

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

UESLEN ROCHA SILVA

**NANOPARTICULAS MULTIFUNCIONAIS DE FLUORETO DE LANTÂNIO
DOPADAS COM Nd³⁺ COMO AGENTES DE CONTRASTES E TERAPÊUTICOS**

Maceió

2016

UÉSLEN ROCHA SILVA

**NANOPARTICULAS MULTIFUNCIONAIS DE FLUORETO DE LANTÂNIO
DOPADAS COM Nd³⁺ COMO AGENTES DE CONTRASTES E TERAPÊUTICOS**

Tese apresentada ao Instituto de Física da
Universidade Federal de Alagoas, como parte
dos requisitos para obtenção do Título de Doutor
em Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Jacinto da Silva.

Orientador em co-tutela: Prof. Dr. Daniel Jaque
García.

Maceió

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586n Silva, Uéslen Rocha.
Nanopartículas multifuncionais de fluoreto de lantânio dopadas com Nd^{3+} como agentes de contrastes e terapêuticos / Uéslen Rocha Silva. – 2016.
174 f. : il., graf.

Orientador: Carlos Jacinto da Silva.
Coorientador: Daniel Jaque García.
Tese (doutorado em Física da Matéria Condensada) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Maceió, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Bioimagem fluorescente. 2. Nanopartículas. 3. Nanotermometria.
4. Óptica. 5. Neodímio. 6. Janela biológica. 7. Terapia fototérmica. I. Título.

CDU: 535.39

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
TESE DE DOUTORADO

***“Nanopartículas Multifuncionais de Fluoreto de Lantânio Dopadas
com Nd³⁺ como Agentes de Contrastes e Terapêuticos”***

por

Uéslen Rocha Silva

A Banca Examinadora composta pelos professores Carlos Jacinto da Silva (orientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Daniel Jaque Garcia (orientador em cotutela), da Universidad Autónoma de Madrid, Maria Tereza de Araújo, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Marília Oliveira Fonseca Goulart, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, Cristina Kurachi, do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo e Andris Figueiroa Bakuzis, do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, consideram o candidato aprovado com grau “ A ”.

Maceió, 9 de setembro de 2014



Prof. Dr. Carlos Jacinto da Silva



Prof.ª. Dr.ª. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Prof. Dr. Daniel Jaque Garcia



Prof.ª. Dr.ª. Cristina Kurachi



Prof.ª. Dr.ª. Maria Tereza de Araújo



Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis

À Deus, pois o temor do Senhor

é o início de toda sabedoria.

À minha esposa Valéria Oliveira.

Aos Meus Pais:

Joaquim Alves e Amelivalda Rocha.

E aos meus irmãos:

Andercleisson Rocha e Aislane Rocha.

AGRADECIMENTOS

Antes de começar a escrever minhas palavras de gratidão a todos aqueles que me ajudaram ao longo de todo o doutorado, tenho primeiro que agradecer ao bom Deus por ter me ajudado chegar ao final desta tese. Fico grato por toda providência e misericórdia do Senhor para com a minha vida, tanto nos momentos felizes quanto nos tristes. Agradeço ao Senhor por cada pessoa que Ele colocou em minha vida, pois quando estamos longe de casa Deus sempre nos dá amigos mais chegados que irmãos.

Quando começamos um curso de pós-graduação, sem dúvida, começamos uma nova jornada em nossa carreira acadêmica. No atual modelo educacional que temos, o curso de pós-graduação em Física nos proporciona um tempo maior para reflexionarmos sobre as diversas áreas da Física ao passo que nos leva a uma visão mais profunda de temas específicos, em meu caso a espectroscopia óptica. De fato, nos abre uma janela voltada para um imenso horizonte onde podemos enxergar muito mais além do que podemos ver.

Um especial agradecimento à minha esposa Valéria, por ter aceitado estar sempre ao meu lado, com disposição e ânimo. Em outras palavras, sempre foi compreensiva, auxiliadora e acima de tudo, corajosa. Amo-te!

Aos meus pais, Dona Neres e Seu Joaquim, pela educação, carinho e principalmente pelo incentivo. O resultado desta tese é fruto da educação que vocês me deram e, portanto, ela é tanto minha quanto de vocês.

Aos meus irmãos Andercleisson e Aislane que sempre torceram e me apoiaram em todos os momentos. E igualmente a todos os meus familiares, obrigado pelo carinho.

Ao professor Carlos Jacinto, que me orientou na realização deste trabalho. Agradeço pela oportunidade que foi confiada, pelos conselhos e por ter sido mais do que um orientador, ter sido um amigo.

Aos professores Daniel Jaque e José Garcia Solé colaboradores e orientadores na realização desse trabalho. Ambos me acolheram com enorme afeição em seu grupo de

pesquisa, me propiciando um excelente ambiente de trabalho e uma nova via de conhecimento na minha carreira profissional.

Ao Pastor Fábio Diniz, pelo acolhimento e acima de tudo por ser um irmão na fé em Cristo. Agradeço à Deus pelo Libre Acceso. Não posso me esquecer da Igreja Batista da Comunhão, sou grato a todos vocês meus irmãos.

Aos professores Thiago Mariz e Itálo Nunes, que ministraram os cursos com muita responsabilidade e empenho.

Ao Dr. Kagola Upendra Kumar, pós-doc do projeto PNPd/CAPES N° 02727/09-9, pelo grande auxílio no desenvolvimento das nanopartículas utilizadas, pois sem elas não haveriam resultados para escrever esta tese.

Tenho enorme gratidão pela amizade conquistada e adquirida ao longo de todo meu período em Maceió. Posso dizer que sou mais que abençoado pelos amigos casais: Elton Malta e Sybelle Malta, Wagner Ferreira e Laura Ferreira e Wandearley Dias e Socorro Pereira.

Aos colegas de curso e de pós-graduação Ana Paula, Job Saraiva, Leônidas, José Leandro, Gentil II, José Fábio, Lidiane Omena, Rafael da Silva, Samuel Teixeira e Wesley Queiroz, obrigado pelo apoio e amizade e principalmente pelos momentos de descontração.

Aos colegas e amigos da Espanha Antônio Benayas, Laura Maestro, Praticia Haro, Blanca del Rosal, Luiz Mateo e John, obrigado pelo acolhimento e atenção ao longo da minha estadia em Madrid.

À CAPES pelo apoio financeiro indispensável em minha formação.

Enfim, a todos aqueles que me ajudaram diretamente e/ou indiretamente nesta etapa da minha vida, para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Nesta tese avaliamos as possíveis aplicações de nanocristais de trifluoreto de lantânio (LaF_3) dopados com íons de Nd^{3+} como agentes de contrastes infravermelho na primeira e segunda janelas biológicas do espectro eletromagnético, as quais se estendem de 700 a 1400 nm. Para isso usamos as três emissões de íons de Nd^{3+} centradas em torno de 900, 1060 e 1330 nm, correspondentes a transições geradas a partir do estado metaestável $^4F_{3/2}$. Na comparação com outras nanopartículas (NPs) fluorescentes usadas como agentes de bio-contrastes, tais como, pontos quânticos de semicondutores e NPs multifotônicas luminescentes, as NPs de LaF_3 dopadas com íons de Nd^{3+} apresentam diversas vantagens, tais como, alta eficiência quântica de fluorescência e altas estabilidades química e espectral. Nós demonstramos com a emissão em torno de 1060 nm que é possível obter imagens de alto brilho de células cancerígenas e imagens de alta penetração de modelos animais (ratos). Adicionalmente, demonstramos que a emissão em torno de 900 nm apresenta uma apreciável sensibilidade térmica que permite utilizar tais NPs como nanotermômetros ópticos. Quando a concentração de íons de Nd^{3+} é elevada para valores em torno de 25 mol%, esta sensibilidade térmica vem acompanhada de uma alta eficiência de conversão luz-calor, fazendo as NPs se comportarem como agentes multifuncionais capazes de gerar calor e medir, de forma simultânea, a temperatura local induzida. Isto tem permitido o desenvolvimento de terapias térmicas, controladas em tempo real, de tumores cancerígenos em modelos animais (ratos).

Palavras-chaves: Bioimagem Fluorescente. Nanopartículas. Nanotermometria Óptica. Neodímio. Janela Biológica. Terapia Fototérmica.

ABSTRACT

In this work, we investigated the possible applications of Nd³⁺ ions doped lanthanum trifluoride (LaF₃) nanocrystals as infrared contrast agents in the first and second biological windows of the electromagnetic spectrum, which extend from 700 to 1400 nm. For this, we use the three emissions of Nd³⁺ ions centered around 900, 1060, and 1330 nm, corresponding to transitions generated from the metastable state ⁴F_{3/2}. In comparison with other fluorescent nanoparticles (NPs) used as biolabels agents, such as semiconductor quantum dots and multiphotonic luminescent NPs, the Nd³⁺ doped LaF₃ NPs present several advantages such as high fluorescence quantum efficiency and high chemical and spectral stabilities. We have demonstrated that, with the emission around 1060 nm is possible to obtain high brightness images of cancer cells and high penetration images of animal models (mice). Additionally, we have demonstrated that the emission around 900 nm has an appreciable thermal sensitivity that allows the use of such NPs as optical nanothermometers. As the Nd³⁺ concentration is increased to values around 25 mol%, this thermal sensitivity comes with a high conversion efficiency of light-to-heat, so that the NPs work as multifunctional agents capable of generating heat and measuring, simultaneously, induced local temperature. This has allowed the development of real time controlled thermal therapies of cancerous tumors in animal models (mice).

Keywords: Fluorescence Bioimaging. Nanoparticles. Optical Nanothermometry. Neodymium. Biological Window. Photothermal Therapy.

RESUMEN

En esta tesis doctoral se ha investigado la posible aplicación de nano cristales de trifloruro de lantano dopadas con iones Neodimio como agentes de contraste infrarrojos en la primera y segunda ventanas biológicas del espectro electromagnético, las cuales se extienden desde 700 hasta 1400 nm. Para ello se han utilizado las tres emisiones generadas por los iones Neodimio centradas a 900,1060 y 1334 nm, correspondientes a las transiciones generadas desde el estado metastable $^4F_{3/2}$. En comparación con otras nano-partículas fluorescentes usadas como agentes de bio-contraste (tales como puntos cuánticos de semi-conductor y nano-partículas luminiscentes a multi-fotónicas) las nano-partículas de trifloruro de lantano dopadas con iones neodimio presentan diversas ventajas tales como una alta eficiencia cuántica, alta estabilidad química y alta estabilidad espectral. En este trabajo se ha demostrado que mediante el uso de la emisión en torno a 1060 nm es posible obtener imágenes de alto brillo tanto de células cancerígenas como imágenes de alta penetración de modelos animales (ratones). De forma adicional, en esta tesis se demuestra como la emisión en torno a 900 nm presenta una apreciable sensibilidad térmica que permite utilizar nuestras nanopartículas como nano-sensores térmicos. Cuando la concentración de iones neodimio se incrementa hasta niveles cercanos al 25 mol.%, esta sensibilidad térmica viene acompañada de una alta eficiencia de conversión luz-calor, de tal manera que las nano-partículas se comportan como agentes multifuncionales capaces de generar calor y medir, de forma simultánea, la temperatura local. Esto ha permitido el desarrollo de terapias térmicas controladas de tumores cancerígenos en modelos animales (ratones).

Palabras-claves: Bio-imágenes Fluorescent. Nano-partículas. Nano-temometría. Neodimio. Janela Biológica. Terapia Fototérmica.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (a) O coeficiente de atenuação do sangue humano (oxigenado) esta na faixa espectral entre 300-1700 nm. As extensões espectrais tanto da primeira como da segunda “*janelas biológicas*” são esquematicamente indicadas. Também estão incluídos as emissões espectrais das NPsL em diferentes regiões do espectro que foram anteriormente utilizadas para o bioimagemento fluorescente. (b) O espectro de emissão de uma suspensão coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtidos sob excitação óptica em 808 nm. Onde temos destacado as três bandas de emissão.....34
- Figura 2 - Tabela periódica mostrando todos os elementos. Os Lantanídeos e Actinídeos estão na parte inferior da tabela periódica.35
- Figura 3 - Diagrama de nível de energia para íons Ln^{3+} mostrando os principais níveis emissores e as transições para os níveis do estado fundamental [48].40
- Figura 4 - Esquema simplificado do desdobramento dos níveis de energia do íon de Nd^{3+} quando é submetido a um campo cristalino. Adaptado da referência [51]42
- Figura 5 - Descrição da interação de uma onda eletromagnética com a matéria segundo o modelo de Lorentz, mostrando que a energia é transferida a partir da radiação incidente para o átomo, criando um momento de dipolo, o qual re-irradia denominado como radiação secundária. Dependendo do meio (das propriedades da matéria) o dipolo irá emitir diferente tipo de radiação51
- Figura 6 - Propagação de um raio de luz de um meio (ar) para outro meio (por exemplo, um tecido biológico).52
- Figura 7 - Coeficiente de absorção de alguns importantes cromóforos presentes no tecido biológico (neste caso a pele humana). Esta figura é uma adaptação da referencia [3].....57

Figura 8 - Os espectros de absorção (a) e de emissão (b) de fluoróforos (tecidos importantes responsáveis por autofluorescência em solução aquosa). Adaptada da referência [6].	58
Figura 9 - Representação dos possíveis efeitos causados pelo aumento da temperatura sobre a luminescência. As linhas vermelhas correspondem a altas temperaturas. Esta é uma adaptação da referência [5].	73
Figura 10- Esquema dos efeitos causados por diferentes tratamentos térmicos em função do aumento da temperatura.	77
Figura 11- Esquema conceitual das nanopartículas usadas nessa tese, com características ópticas luminescentes, nanoaquecedoras e de nanotermômetros, para processos de termoterapia controlada.	80
Figura 12- (a) Processo de mistura, aquecimento e agitação da solução. (b) Solução branca forma após o processo de mistura. (c) Centrifugação da solução branca para separar a parte sólida da líquida. (d) e (e) lavagem e secagem. (f) resultado final de todo o processo: NPs de LaF_3 dopadas com 25mol% de Nd^{3+}	88
Figura 13- Processo de esmagamento dos cristais até se transformarem em pó.	88
Figura 14- (a) Distribuição do tamanho das NPs em histograma, com um diâmetro médio de entre 12 - 15 nm. (b) Imagem digital de uma cubeta contendo uma solução aquosa de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (a concentração foi ajustada para 0,3% em massa NPs na solução).	90
Figura 15- Representação esquemática do microscópio confocal	91
Figura 16- (a) Eficiência Quântica de Fluorescência (η) do nível $^4\text{F}_{3/2}$ do Nd^{3+} em nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em função da concentração de Nd^{3+} . Os pontos sólidos são dados experimentais obtidos a partir da técnica de Espectroscopia de Lente Térmica e a linha vermelha é apenas para guiar os olhos. (b) Brilho dado pelo produto $[\text{Nd}^{3+}] \cdot \eta$ versus a concentração de íons de Nd^{3+}	96

- Figura 17- (a) Imagem digital de uma cubeta contendo uma solução aquosa de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (a concentração foi ajustada para 0,3% em massa NPs na solução). (b) Imagem de fluorescência no infravermelho da solução aquosa com NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando excitadas opticamente por um feixe laser de 808 nm (esquemáticamente indicado por uma seta vermelha). Um filtro foi colocado entre a cubeta contendo (NPs + água) e a câmera a fim de bloquear a radiação laser em 808 nm. (c) Intensidade de luminescência (no IV) gerada a partir da dispersão coloidal (NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ + água) em uma cubeta (como demonstrado em (a)) com uma densidade de potência de $1\text{W}/\text{cm}^2$ versus o tempo de irradiação98
- Figura 18- Espectro de emissão de uma suspensão coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtidos após excitação óptica em 808 nm..99
- Figura 19- Espectro do coeficiente de extinção do tecido sintético usado nesta tese.....
.....101
- Figura 20- Espectro do coeficiente de extinção de um tecido sintético (o qual simula as propriedades ópticas de tecido humano *in vitro*) no intervalo espectral de 600-1200 nm. Também foi incluído o espectro de emissão das NPs de LaF_3 dopadas com Nd^{3+} . Indicamos também a transição eletrônica que corresponde a cada banda de emissão. O espectro da fonte de laser de 808 nm (excitação) utilizado ao longo de todo este trabalho também foi incluído.102
- Figura 21- Diagrama esquemático que mostra o procedimento experimental usado para determinar a profundidade de penetração alcançada pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. O tecido sintético utilizado nesses experimentos (simulando o tecido da pele humana *in vitro*) atingiu um coeficiente de extinção de 11 cm^{-1} em 808 nm. Um tecido sintético de formato geométrico triangular foi colocado entre a objetiva (focal/coletora) e a dispersão coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. A espessura do tecido entre a objetiva e as nanopartículas foi continuamente variada através do deslocamento do sistema de "cubeta + tecido" ao longo de uma direção perpendicular à direção de propagação do feixe laser (como indicado pela se.103

- Figura 22- Intensidade da luminescência gerada pelas nanopartículas core/shell de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtida mediante o processo de excitação por um fóton (comprimento de onda de excitação de 800 nm), em função da espessura do tecido versus a intensidade da luminescência, gerada pelo processo de excitação por dois fótons (comprimento de onda de excitação de 920 nm). Os pontos são dados experimentais e as linhas tracejadas representam a melhor opção para uma relação linear (observe a escala logarítmica).105
- Figura 23- (a) Diagrama esquemático do microscópio de fluorescência de feixe duplo utilizado nas medições intratecido. Note que entre as NPs luminescentes de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ e sistema óptico de aquisição é colocado um tecido sintético de espessura variável. (b) Vista superior esquemática da amostra contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. São indicadas a localização e a extensão espacial do feixe de excitação em 808 nm como também o “spot” coletado e analisado. Através do mapeamento unidimensional da objetiva, é possível avaliar a resolução espacial intratecido alcançada pelas três diferentes bandas de emissão dos íons de Nd^{3+}108
- Figura 24- Dependência do coeficiente de extinção com o comprimento de onda do Intralipid®. A linha tracejada indica a contribuição estimada do coeficiente de espalhamento para o coeficiente de extinção109
- Figura 25 - Intensidade da luminescência intratecido em função da espessura do tecido sintético obtido para os três canais de emissão dos íons de Nd^{3+} . Os pontos são dados experimentais e a linha tracejada é um guia para os olhos. 110
- Figura 26 - Profundidades de penetração óptica obtidos em função do comprimento de onda de emissão médio das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais incluídos na Figura 6.10 para um decaimento exponencial simples. Os pontos são dados experimentais e a linha tracejada é um guia para os olhos.111
- Figura 27 - (a) Perfis de intensidade de fluorescência intratecido das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando opticamente excitadas por um feixe laser sintonizado em 808 nm

como descrito esquematicamente na Figura 6.8(b). Os dados experimentais obtidos para cada um dos três canais de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ são incluídos, assim como o perfil de intensidade obtido na ausência do tecido sintético o qual fornece o tamanho radial real do feixe (*spot*) de excitação 808 nm. (b) Razão da resolução, como definido no texto, em função dos três comprimentos de onda de emissão médios correspondentes aos três canais de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Os pontos representam os dados experimentais e a linha tracejada é apenas um guia para os olhos..... 114

Figura 28 - (a) $\beta \cdot I_{pen}$ e (b) $\beta \cdot r$ produtos obtidos para os três comprimentos de onda de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Os pontos são dados experimentais e as linhas tracejadas são guias para os olhos.116

Figura 29- (a) Percentagem de sobrevivência das células HeLa incubadas por um período de 1h com diferentes diluições de solução aquosa contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ com uma concentração inicial de 3 mg/mL. (b) Percentagem de sobrevivência da linha de células tipo HeLa com diferentes tempos de incubação com uma solução contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ na concentração de 0,03 mg/mL. Cada barra corresponde ao valor médio obtido a partir de três experiências diferentes.118

Figura 30 - (a) Espectro de emissão Intracelular obtido a partir de uma célula cancerosa de HeLa incubada com NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. (b) imagem óptica de transmissão de uma célula HeLa após incubação com $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. (c) A imagem por fluorescência da mesma célula cancerosa HeLa incluída em (b), obtida através da monitorização da distribuição espacial da intensidade de emissão ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ em torno de 1050 nm. (d) Sobreposição das imagens (b) e (c) revelando que as NPs fluorescentes foram incorporadas dentro da célula cancerosa HeLa. A barra de escala em todas as imagens é de 20 μm 119

Figura 31 - (a) Representação esquemática do set-up experimental desenvolvido para o imageamento de fluorescência *in vivo* na região espectral da segunda janela biológica baseado na emissão de 1050 nm das NPs $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. (b) a dependência espectral tanto da resposta espectral da câmara CMOS e como

também do filtro utilizado durante o imageamento *in vivo*. Note que a combinação de ambas as curvas nos permite a detecção da luminescência (em 1050 nm) gerada a partir das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$121

Figura 32 - (a) Parte Superior (lado esquerdo): Fotografia digital do “musculo peitoral” utilizado para os experimentos *ex vivo*; o local da injeção intratecido das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ está indicado por uma seta. No meio: Imagem fluorescente infravermelha em 1050 nm do peito de frango, gerada a partir da injeção intratecido das NPs dopadas com Nd^{3+} . Parte Inferior: Sobreposição da fluorescência e imagem óptica do peito de frango, revelando que o sinal de luminescência é gerado apenas no local onde foi feita a injeção. (b) Parte Superior (lado direito): imagens fluorescentes infravermelha do peito de frango obtidos para diferentes profundidades de injeção. Parte inferior: Intensidade integrada da luminescência em função da profundidade da injeção. Os pontos são dados experimentais e a linha sólida é o ajuste mais adequado para um decaimento mono-exponencial.122

Figura 33 - (a) mostra a imagem digital de um rato no qual foi feita a injeção subcutânea. A região onde as NPs foram injetadas é indicada pela seta de cor preta. (b) Imagem fluorescente no IV foi obtida a partir da emissão em 1050 nm, gerada pela injeção subcutânea (no rato) das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando opticamente excitadas por um laser de diodo em 808 nm (c) Sobreposição das imagens (a) e (b): digital e fluorescente. (d) mostra a imagem digital de um rato no qual foi feita a injeção subcutânea. O local da injeção é indicado pela seta de cor preta. (e) Imagem fluorescente no IV em 1050 nm gerada a partir das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ injetadas de forma intramuscular em um rato quando opticamente excitadas com um laser de diodo em 808 nm (f) Sobreposição das imagens (d) e (e): digital e fluorescente.124

Figura 34 - (a) Imagem óptica de um rato após a administração por via intravenosa através do seio venoso retro-orbital de 50 μL de uma suspensão coloidal de nanopartículas de Nd^{3+} (15 mol.%): LaF_3 diluída em fosfato salino (PBS).

A concentração de NPs nesta solução foi de 1 mg/mL. (b) Imagem fluorescente no IV do corpo inteiro de um rato, obtida uma hora após a injeção. O Rato foi iluminado por um feixe laser expandido. (c) Sobreposição de ambas as imagens: digital e fluorescente126

Figura 35 - (a) Espectros de emissão normalizados das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtidos em 10 e 60 °C. (b) É evidenciado o desvio espectral induzido pela temperatura no pico de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em torno de 864 nm (obtidos em 10 e 60 °C). (c) Variação da razão entre as intensidades emitida de 863 e 885 nm com a temperatura. Os pontos são dados experimentais e a linha sólida é o melhor ajuste linear. (d) Deslocamento da emissão da principal linha espectral em torno de 864 nm em função da temperatura. Os pontos são dados experimentais e a linha sólida é o melhor ajuste linear132

Figura 36 - (a) Decomposição do espectro de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtido em 20°C. As linhas de emissão foram devidamente identificadas de acordo com o diagrama de nível de energia mostrado na figura (b) Intensidade de luminescência da amostra $\text{LaF}_3:10\text{Nd}$ para várias temperaturas.134

Figura 37 - (a) Espectros de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtidos em 30 °C antes e depois de um ciclo térmico de 30 °C até 80 °C. Não foram observadas diferenças indicando reversibilidade dos mecanismos observados. (b) Razão das intensidades emitidas em 885 e 863 nm versus o aumento e diminuição da temperatura da amostra. Nenhuma histerese foi observada.137

Figura 38- Representação esquemática do aparato experimental utilizado para hipertermia intratecido controlada de feixe único. Um feixe laser com comprimento de onda em 808 nm é focalizado em um microcanal contendo a solução aquosa com nano-bastões de ouro (nano-aquecedores) e nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (nanotermômetros). A solução foi colocada embaixo de um tecido sintético com 1,0 mm de espessura. A luminescência das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foi coletada utilizando a mesma objetiva e a temperatura intratecido foi extraída da análise espectral da luminescência. O diagrama à direita reflete o fato de ambos os nano-

- aquecedores e nanotermômetros serem simultaneamente excitados pela radiação em 808 nm.138
- Figura 39 - (a) Espectros de emissão normalizados gerados pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ intratecido, obtidos em duas potências do laser de excitação em 808 nm (30 e 85 mW). Para uma melhor visualização, ambos os espectros foram normalizados pelos picos de intensidade. A intensidade emitida com a potência de excitação de 30 mW era aproximadamente três vezes menor que com 85 mW. A inserção mostra em detalhe o deslocamento para o vermelho do pico de emissão de 863 nm. (b) Temperatura intratecido versus a potência do laser de excitação, calculada a partir da análise ratiométrica dos espectros de fluorescência intratecido. Os pontos são dados experimentais e a linha tracejada é o melhor ajuste linear.140
- Figura 40 - As figuras (a), (b) e (c) mostram diagramas esquemáticos dos diferentes processos radiativo e não radiativo (transferência de energia) que podem ocorrer nos íons de Nd^{3+} após excitação óptica com comprimento de onda em ~808 nm.142
- Figura 41 - (a) Imagens térmicas, no estado estacionário, de soluções aquosas de NPs de LaF_3 com diferentes concentrações de íons de Nd^{3+} (0, 5, 15 e 25 mol%) sob excitação óptica em ~808 nm para uma potência de excitação fixa de 1,7 W. (b) Temperatura máxima do volume excitado da solução aquosa de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em função da potência de excitação em 808 nm, para as diferentes concentrações de íons de Nd^{3+} . Os pontos são dados experimentais e as linhas são ajustes lineares.143
- Figura 42 - Fluorescência no IV e imagem térmica das soluções coloidal contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ com diferentes concentrações,. Todas as imagens foram obtidas sob as mesmas condições experimentais, sob excitação óptica em 808 nm com uma densidade de potência constante de $4\text{W}/\text{cm}^2$145
- Figura 43 - Variação da intensidade emitida e do calor gerado devido a excitação óptica em 808 nm, em função da variação da concentração de íons de neodímio

na matriz. Os pontos são dados experimentais e as linhas pontilhadas são guias para os olhos.146

Figura 44 - (a) Imagem óptica do tecido de origem animal usado no experimento foto-térmico *ex vivo*. A seta mostra onde as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foram injetadas. (b) e (c) mostram imagens térmicas do tecido muscular peitoral quando foram iluminados com laser em 808 nm ($1,5 \text{ W/cm}^2$) nas regiões sem e com injeção de NPs (situações *off-* e *on-target*, respectivamente). (d) Temperatura da superfície da amostra em função da intensidade do laser para as duas situações *off-* e *on-target* (fora do alvo e sobre o alvo). Os pontos sólidos representam os dados experimentais e as linhas sólidas são ajustes lineares.148

Figura 45 - (a) Espectros de emissão correspondentes a transição $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{F}_{9/2}$ da solução aquosa contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, obtidos nas temperaturas de 20 e 60°C. No detalhe apresetamos a dependência da razão das intensidades medidas em 887 e 866 nm versus a temperatura. Os pontos sólidos são dados experimentais e a linha tracejada é o melhor ajuste linear. (b) Diagrama experimental utilizado para medidas em tempo real e simultânea das temperaturas induzidas opticamente na injeção e na superfície do tecido biológico.....150

Figura 46- (a) Espectros de emissão de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ injetadas em uma amostra *ex vivo* para duas intensidades de excitação do laser em 808 nm, 0,5 e 3,7 W/cm^2 . O inset mostra a imagem térmica da amostra enquanto era irradiado pelo feixe laser com intensidade de 3,7 W/cm^2 . (b) Incremento de temperatura induzido pelo laser na região da injeção de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, determinado a partir da análise dos espectros de emissão sub-tecido. O incremento de temperatura induzido pelo laser na superfície do tecido é também apresentado. Os pontos são dados experimentais e as linhas tracejadas são os melhores ajustes lineares.....152

Figura 47- Representação esquemática dos diferentes passos seguidos neste trabalho para o desenvolvimento de tratamentos foto-térmicos controlado de

tumores em camundongos por meio da inoculação de uma solução de NPs LaF₃ com alta concentração de Nd³⁺159

Figura 48 - Imagem digital de um rato com dois tumores, um em cada lado. Uma suspensão coloidal de NPs de Nd³⁺ (25 mol.%):LaF₃ foi injetada apenas no tumor localizador do lado esquerdo. Já o tumor do lado direito foi utilizado como controle, ou seja, foi injetada apenas uma solução de PBS. As Figuras (b) e (c) correspondem respectivamente a imagens de fluorescência e térmica, do mesmo animal sob excitação óptica em 808 nm. (d) Evoluções temporais das temperaturas na superfície e dentro do tumor, a partir de análises das imagens fluorescente (como na fig. b) e térmica (como na Figura c). Os pontos são dados experimentais e a linha pontilhada é apenas para guiar os olhos.....161

Figura 49 - Fotografia digital dos mesmos animais apresentados na Figura 49 (a) e (b) representam as imagens digitais dos ratos após o tratamento (15 min e 20 dias, respectivamente) térmico com a solução coloidal de NPs de Nd³⁺:LaF₃ excitada opticamente pelo laser em 808 nm a 4W/cm². Na Figura 49(c) é apresentada a evolução de ambos os tumores (tratados e controle). Os símbolos são dados experimentais e a linha pontilhada é apenas para guiar os olhos.....163

Figura 50 - Intensidade emitida obtida a partir dos diferentes órgãos do animal, no intervalo espectral de 1300 a 1500 nm. Assume-se que a intensidade emitida a partir dos órgãos é proporcional a concentração de NPs de Nd³⁺:LaF₃ em cada órgão. Em todos os casos a intensidade de fluorescência integrada foi normalizada pelo peso de cada órgão.....164

Figura 51- (a) Fotografia digital de um rato com dois tumores, um em cada lado. Em ambos os tumores foram injetadas soluções coloidais contendo NPs de Nd³⁺:LaF₃. Neste caso, o tumor do lado esquerdo foi utilizado como controle (sem irradiação laser); Por outro lado, o tumor localizado do lado direito foi submetido ao tratamento fototérmico.....165

Figura 52 - Percentual das células de MB-MDA-231 sobreviventes após a incubação com solução coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ por um tempo de incubação de 2, 5, 15 e 24 horas. Duas concentrações de NPs foram utilizadas: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada experimento foi realizado de forma independente, tal que as barras representam o valor médio de cada um. A barra de erro corresponde ao desvio padrão.....	166
Figura A.1 - Aberração cromática longitudinal.....	174
Figura A.2 - Difração a partir de uma abertura circular com diâmetro D_0 . A direita é mostrado o disco de Airy.....	176
Figura A.3 - Distinguindo dois objetos segundo o critério de Rayleigh.....	177
Figura B.1 - A figura mostra um esquema simples baseado no princípio da microscopia confocal. Neste caso uma fonte pontual de luz ilumina uma região do objeto e o detector recebe radiação da área do ponto do objeto. A imagem é construída através da varredura da fonte que está em sincronia com o detector.....	178

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Número atômico, estrutura eletrônica, raio iônico e as configurações trivalentes dos elementos TR ([Xe] representa a configuração do Xenônio que é: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^6 5s^2 4d^{10} 5p^6$ 37
- Tabela 2 - Visão geral das modalidades e imageamento. Tabela adaptada da referência [20].....60
- Tabela 3 - Coeficientes de extinção, absorção e espalhamento do Intralipid® obtidos a partir da Figura 24 para os três canais de emissão das NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$110
- Tabela 4 - Comparação dos valores de profundidade de penetração alcançada para cada comprimento de emissão médio112
- Tabela 5 - Sensibilidades térmicas publicadas anteriormente na literatura de nanopartículas dopadas com ions TRs. Também foi incluído o comprimento de onda de atuação médio de cada nanopartícula.133
- Tabela A - Os cinco tipos básicos de aberração, que são devido à geometria das lentes ou espelhos.175

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolos	Descrição
μ	Permeabilidade magnética
ϵ	Permissividade elétrica
$\omega = 2\pi\nu$	Frequência angular
χ	Susceptibilidade Linear
e	Carga do elétron
n	Índice de refração
\vec{v}	Velocidade da onda
α_{abs}	Coefficiente de absorção
α_{esp}	Coefficiente de espalhamento
α_{ext}	Coefficiente de extinção
σ_{abs}	Seção de choque de absorção
σ_{esp}	Seção de choque de espalhamento
l_a	Caminho óptico/ ou livre médio
P	Polarização Linear
η	Eficiência quântica de fluorescência
$I_{(z)}$	Intensidade
I_0	Intensidade Incidente
δ	Profundidade de Penetração óptica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	24
2	NANOPARTÍCULAS LUMINESCENTES, ÍONS TERRAS-RARAS E NANOPARTÍCULAS DOPADAS COM ÍONS DE Nd³⁺	31
2.1	Estado da Arte: Nanopartículas Luminescentes como Agentes de Contraste	31
2.2	Íons Terras Raras (Lantanídeos)	35
2.2.1	Sistemas Dopados com Íons de Neodímio	40
2.2.2	Nanopartículas Luminescentes Dopadas com Íons Lantanídeos	42
3	PROPRIEDADES ÓPTICAS DOS TECIDOS BIOLÓGICOS E MODALIDADES DE IMAGIAMENTO	50
3.1	Representação Clássica da Interação Luz-Matéria	50
3.1.1	Absorção	53
3.1.2	Espalhamento	54
3.1.3	Meios Túrbidos.....	55
3.2	Aspectos Fundamentais da óptica dos Tecidos	56
3.2.1	Autofluorescência	57
3.2.2	Tecidos Sintéticos (Phantom Tissue)	58
3.3	Modalidades de Imagiamento	59
3.3.1	Imagiamento Óptico por Fluorescência	62
4	TERMOMETRIA, NANOTERMOMETRIA E TERAPIA FOTOTÉRMICA	66
4.1	Primórdios da Termometria	66
4.2	Termometria em Micro e Nanoescala: Nanotermometria	67
4.2.1	Termômetros Luminescentes	71
4.2.2	Nanotermometria Luminescentes	72

4.3	Terapia Térmica – Hipertermia	75
4.3.1	Visão Geral: Nanopartículas para Terapias Fototérmicas e Nanopartículas Multifuncionais	78
5	MÉTODOS EXPERIMENTAIS E MATERIAIS UTILIZADOS	86
5.1	Nanopartículas de Trifluoreto de Lantânio (LaF₃)	86
5.1.1	Síntese de Nanopartículas do tipo core/shell (Nd ³⁺ :LaF ₃)/shell (LaF ₃)	87
5.1.2	Síntese de Nanopartículas do tipo core (Nd ³⁺ :LaF ₃)	87
5.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	89
5.3	Medidas de Microscopia de Fluorescência e Imagens por Fluorescência	90
5.3.1	Imagens Térmicas	91
5.4	Estudo da toxicidade a nível celular das Nanopartículas	92
6.	IMAGIAMENTO POR FLUORESCÊNCIA: IN VITRO, EX VIVO E IN VIVO	94
6.1	Determinação da Eficiência Quântica de Fluorescência das NPs Core/Shell de Nd³⁺:LaF₃	95
6.2	Foto-Luminescência das NPs de Nd³⁺:LaF₃	97
6.3	Propriedades ópticas de Tecido Sintético para Primeira Janela Biológica	100
6.3.1	Análise da Profundidade de Penetração Óptica <i>in Vitro</i> com emissão e excitação na primeira Janela Biológica	101
6.4	Análise da Profundidade de Penetração óptica e Resolução óptica <i>in vitro</i> (Intralipid®) na II Janela Biológica.	105
6.4.1	Resolução Espacial versus o Comprimento de onda de Emissão (λ_{Med})	111
6.5	Imagiamento Óptico <i>in Vitro</i> na II-Janela Biológica	116
6.5.1	Célula Utilizada para Imagiamento <i>in Vitro</i>	116
6.5.2	Resultados: Imagiamento Óptico <i>in Vitro</i>	118
6.6	Imagiamento óptico <i>in Vivo</i> na II-Janela Biológica	120
6.6.1	Resultados: Imagiamento Óptico <i>in Vivo</i>	120
6.7	Conclusões	126

7	NANOPARTÍCULAS DE Nd³⁺:LaF₃ COMO NANOTERMÔMETROS LUMINESCENTES E NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS	131
7.1	Nanopartículas de Nd³⁺:LaF₃ como Sensores Térmicos	131
7.1.1	Hipertermia Controlada Intratecido <i>in Vitro</i>	137
7.2	Nanopartículas Multifuncionais de Nd³⁺:LaF₃	141
7.2.1	Nanopartículas de Nd ³⁺ :LaF ₃ como Nano-aquecedores	141
7.2.2	Hipertermia Controlada Intratecido <i>in Vitro</i>	144
7.3	Terapia Fototérmica <i>ex Vivo</i> Baseadas em Nanopartículas Multifuncionais de Nd³⁺:LaF₃	147
7.4	Conclusões	152
8.	TERAPIA FOTOTÉRMICA INTRATUMORAL CONTROLADA	157
8.1	Terapia Fototérmica baseadas Nanopartículas Multifuncionais de Nd³⁺:LaF₃	157
8.1.1	Descrição Experimental: Terapia Fototérmica <i>in Vivo</i>	158
8.2	Resultados e Discussões	160
8.3	Conclusões	166
9.	CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS GERAIS	169
9.1	Lista das Publicações do Autor Durante o Desenvolvimento da Tese	171
	Apêndices	173
A	Fundamentos de Microscopia Óptica	173
B	Microscopia Confocal	177

1 INTRODUÇÃO GERAL

Vivemos em uma era de sucessivas revoluções tecnológicas que constantemente afetam as nossas vidas, transformando nossos estilos e modos de interações sociais. O passado é testemunha dos nossos avanços tecnológicos, e sem dúvida a fotônica faz parte dele. A fotônica é a ciência da geração, emissão, transmissão, modulação, processamento de sinais, amplificação e detecção da luz. A proposta teórica de uma luz monocromática e altamente direcionada (o laser) revolucionou a fotônica. Desde o advento do laser por volta do ano de 1960 [1, 2], seu uso é cada vez mais crescente nas mais diversas áreas da ciência e nas várias aplicações cotidianas (DVDs, Blu-Rays, impressoras, na indústria para cortar metal, na medicina para cortar tecidos e tratar doenças como o câncer, bem como no campo das telecomunicações para a transmissão de dados por meio das fibras ópticas).

Uma das áreas da fotônica que tem crescido muito nos últimos anos é a da biofotônica, que estuda as interações da luz com a matéria biológica. As utilizações da biofotônica na medicina são inúmeras e uma delas é detectar e tratar doenças como o câncer [3].

Dentre os inúmeros problemas de saúde que a população mundial apresenta, o combate ao câncer talvez seja um dos mais desafiadores. Para se ter uma ideia, o câncer está entre as principais causas de morte em todo o mundo, e essa também é a realidade do Brasil, pois segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (conhecido como INCA), a estimativa de casos de câncer no Brasil para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, são de aproximadamente 576 mil novos casos. Ao todo, essa estimativa inclui 19 tipos específicos de câncer, tais como: o câncer na cavidade oral, no brônquio e no pulmão, o melanoma maligno da pele, outras neoplasias malignas da pele, na mama feminina, no colo do útero, no corpo do útero, no ovário, na próstata, na bexiga, etc. Em todos esses casos, o êxito da cura do câncer reside em um diagnóstico rápido/precoce e na aplicação de um tratamento adequado. Atualmente os métodos de detecção e tratamento de câncer são em muitos casos altamente invasivos (como no caso da biopsia e cirurgia) e em outros casos provocam efeitos colaterais indesejados devido à sua baixa seletividade (como no caso de quimioterapia e radioterapia). Assim, é de fundamental importância encontrar novas técnicas de diagnóstico e terapia que melhorem a detecção desses tumores, aumentando

com isto a chance de êxito, principalmente nos tratamentos em que as terapias convencionais não são tão eficientes. Dentro desta busca, a nanofotônica tem surgido como uma técnica bastante promissora para a detecção precoce de doenças e para novas modalidades de terapias ativadas pela luz [4].

Uma das grandes marcas do nosso século é a busca pela interdisciplinaridade, que cada vez mais tem ajudado a combinar as tecnologias produzidas por cada campo. Um exemplo disto é a nanobiofotônica que integra os avanços da fotônica, da nanotecnologia e da biotecnologia. Tal junção tem possibilitado o desenvolvimento de nanoferramentas para diversas aplicações em nanomedicina. Um bom exemplo dessas nanoferramentas são as sínteses de nanopartículas (NPs) com tamanhos de apenas alguns nanômetros e diversas funcionalidades físicas, químicas e biológicas [5, 6].

De fato, os avanços na sintetização das NPs têm crescido bastante, e basicamente são três tipos de melhorias que se buscam para este tipo de sistema: NPs luminescentes com alta eficiência de emissão, NPs com emissão no infravermelho e NPs multifuncionais. Nos parágrafos a seguir detalharemos um pouco mais cada uma delas.

Como falamos anteriormente, a primeira grande busca é pela capacidade de sintetizar nanopartículas luminescentes com alta eficiência de emissão, de forma a proporcionar bioimagens fluorescentes com alto contraste e obtidas a partir de baixas intensidades de excitação, o que então reduz os efeitos colaterais induzidos pela radiação laser nos sistemas biológicos sob investigação. Essas possibilidades serão apresentadas e discutidas no capítulo dois e demonstradas no capítulo cinco. Podemos dizer que há dois grupos de NPs aplicáveis à detecção do câncer: Nanopartículas Luminescentes (NPsL) e Nanopartículas Magnéticas (NPsM). Atualmente existem inúmeros grupos de pesquisas trabalhando na síntese de NPsL, principalmente na síntese de nanocristais (NCs) dopados com íons terras-raras (NPs-TR) e NPs semicondutoras (pontos quânticos, QDs). No caso das NPsM, o seu potencial na detecção de doenças baseia-se nas suas propriedades magnéticas e de como elas afetam o sinal de contraste para a geração da imagem. Por exemplo, técnicas baseadas na ressonância magnética nuclear [7]. É possível encontrar na literatura muitos exemplos do sucesso do uso de NPsM para a detecção de tecidos cancerosos em *in vivo*.

Muito esforço tem sido feito no desenvolvimento de NPs cujas fotoluminescência e excitação estão situadas na região espectral do infravermelho (IV). De fato, tais NPs já têm sido recomendadas para bioimagem fluorescente, ou

melhor dizendo, para aplicações onde existe a necessidade de maior profundidade de penetração óptica no tecido biológico, por exemplo, no caso de imageamento de pequenos animais [8-11]. Por outro lado, NPs que emitem no IV também têm sido recomendadas como componentes básicos para os agentes luminescentes ativadores de reações químicas (no caso, de reações químicas ativadas pela incidência de luz no infravermelho) utilizadas no tratamento de células cancerosas (por meio da geração de oxigênio singleto) [12, 13].

A terceira frente de batalha e provavelmente a mais desafiadora é a síntese de NPs luminescentes multifuncionais capazes de fornecer diversas informações dos sistemas biológicos sob imageamento. O princípio de funcionamento dessas NPs multifuncionais está vinculado às modificações causadas em seus espectros fluorescentes por pequenas variações nas condições do meio no qual estão inseridas, tais como a temperatura, a composição química, o nível de pH, densidade, e assim por diante [14-16]. Nesse caso, uma análise espectral apropriada da luminescência gerada pelas NPs fornece informações significativas sobre as propriedades dos bio-sistemas em que elas estão incorporadas. Em particular, muita atenção tem sido dada às NPs luminescentes multifuncionais capazes de atuarem ao mesmo tempo como nanotermômetros luminescentes (NTmLs), marcador biológico e agente fototérmico, que caracterizam sua multifuncionalidade [17]. O sensoriamento térmico de biosistemas é de grande interesse [18, 19]. Em princípio, qualquer NPsL cuja propriedade luminescente (em termos de intensidade, posição espectral, forma espectral ou tempo de decaimento) é fortemente dependente da temperatura, pode ser considerada como potencial NTmL. No entanto, as aplicações no mundo real de NTmLs como sensor térmico intracelular requer várias características adicionais. Essas NPsLs devem ser facilmente dispersíveis em meio aquoso tal que permitam uma fácil incorporação na célula e, além disso, devem possuir eficiência quântica de fluorescência (η) relativamente alta, de forma que proporcionem contrastes de imagens com alta qualidade. Também, devem mostrar longa estabilidade térmica sem degradação durante excitação óptica e ter mínima interação com o meio investigado. É também imperativo que elas sejam excitadas por fótons no IV-próximo (no intervalo espectral de 700 a 1400 nm). O uso de radiação no IV-próximo casada com a “*janela de transparência biológica*” ou simplesmente “*janela biológica*” possibilita uma profundidade de penetração maior e, portanto, a possibilidade de imagens térmicas tridimensionais reais.

Os princípios de funcionamento, detecção e análise dos NTmLs serão descritos com mais detalhes no capítulo quatro desta tese.

Muita atenção também tem sido dada ao desenvolvimento de NPs capazes de gerar calor de forma eficiente quando iluminadas com radiação laser [20]. A utilização da luz laser para induzir terapias foto-térmicas, tais como hipertermia e/ou ablação térmica, tem sido considerada uma técnica não muito confiável devido ao fato de que os tecidos humanos apresentam fortes coeficientes de extinção óptico na região espectral do visível, o que tem limitado os tratamentos fototérmicos a tumores superficiais [21, 22]. Além disso, é esperado que ocorra a absorção da radiação laser tanto pelos tecidos saudáveis como também pelos cancerosos, o que leva a uma redução na eficiência da entrega de calor no interior do tumor, pois a probabilidade de danos nos tecidos adjacentes (região sem interesse) é fortemente aumentada. No entanto, o surgimento de nanomateriais bio-compatíveis [23-25] capazes de, simultaneamente gerar luminescência (NPsL) e aquecer (NPs fototérmicas - NPsFT) sob excitação óptica (por exemplo, com laser), tem revivido o interesse em terapias fototérmicas [26-31], pois essas NPs são pequenas o suficiente para serem transportadas pela corrente sanguínea, podendo ser direcionadas a aderir-se e/ou interiorizar-se nas células, tecidos e tumores, permitindo, portanto, a indução de calor somente na região desejada [32]. No capítulo quatro discutiremos os tipos de tratamentos fototérmicos bem como os nanomateriais mais comumente usados, enquanto que nos capítulos posteriores apresentaremos os resultados por nós obtidos.

Dentro desse contexto, as NPs (também chamadas de Nanocristais - NCs) de Fluoreto de Lantânio (LaF_3) têm sido bastante exploradas por ser uma excelente matriz hospedeira para os íons Lantanídeos (Ln^{3+}) devido às suas estabilidades térmica e estrutural, ser quimicamente inerte, não sofrerem nenhuma degradação quando em contato com o ar, possuir energia de fônons baixa que resulta em observações de diversas transições não tão comuns, etc. [33, 34, 35].

Dentre os vários íons terras-raras (TRs) usados, o íon de neodímio se destaca por:

- 1) possuir uma larga banda de absorção (400 – 900 nm) que coincide com linhas de emissão no IV de lasers de diodo, como em 808 nm;
- 2) ser um sistema laser de quatro níveis e possuir bandas de emissão no IV.

Devido a todas essas características interessantes, as NPs de Nd³⁺:LaF₃ nos dão boas esperanças como agentes luminescentes para diversas aplicações. Nos capítulos 6, 7 e 8 apresentamos as potenciais aplicações dessas NPs como marcadores biológicos, nanotermômetros fluorescentes e agentes fototérmicos para terapia.

REFERÊNCIAS

- [1] Maiman, T. H. Stimulated Optical Emission in Ruby. *J. Opt. Soc. Am.* **1960**, 50, 1134-1134.
- [2] Maiman, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby Masers. *Nature* **1960**, 187, 493 - 494.
- [3] Prasad, P. N. Introduction to Biophotonics. *Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey* **2003**.
- [4] Prasad, P. N. Nanophotonics. *Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey* **2004**.
- [5] Debasu, M. L.; Ananias, D. I.; Pastore-Santos, I.; Liz-Marzan, L. M.; Rocha, J.; Carlos, L. D. All-in-one Optical Heater-thermometer Nanoplatfom Operative from 300 to 2000 k based on Er⁽³⁺⁾ Emission and Blackbody Radiation. *Adv. Mater.* **2013**, 25, 4868-4874
- [6] Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. Nanomedicine--Challenge and Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 872-897.
- [7] Krishnan, K. M. Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. *IEEE Trans. Magn.* **2010**, 46, 2523-2558.
- [8] Chatterjee, D. K.; Rufalhah, A. J.; Zhang, Y. Upconversion Fluorescence Imaging of Cells and Small Animals Using Lanthanide Doped Nanocrystals. *Biomaterials* **2008**, 29, 937-943.
- [9] Zhou, J.; Sun, Y.; Du, X. X.; Xiong, L. Q.; Hu, H.; Li, F. Y. Dual-Modality In Vivo Imaging Using Rare-Earth Nanocrystals with Near-Infrared to Near-Infrared (NIR-to-NIR) Upconversion Luminescence and Magnetic Resonance Properties. *Biomaterials* **2010**, 31, 3287-3295.
- [10] Nyk, M.; Kumar, R.; Ohulchansky, T. Y.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N. High Contrast In Vitro and In Vivo Photoluminescence Bioimaging Using Near Infrared to Near Infrared Up-Conversion in Tm⁺³ and Yb⁺³ Doped Fluoride Nanophosphors. *Nano Lett.* **2008**, 8, 3834-3838.
- [11] Chen, G.; Ohulchansky, T. Y.; Liu, S.; Law, W.-C.; Wu, F.; Swihart, M. T.; Agren, H.; Prasad, P. N. Core/Shell NaGdF₄:Nd³⁺/NaGdF₄ Nanocrystals with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Downconversion Photoluminescence for Bioimaging Applications. *ACS Nano* **2012**, 6, 2969-2977.

- [12] Krasnovsky, J. A. A.; N. N. Drozdova; Ivanov, A. V.; Ambartsumian, R. V. Activation of Molecular Oxygen by Infrared Laser Radiation in Pigment-Free Aerobic Systems. *Biochemistry* **2003**, 68, 1178–1182.
- [13] Nathan, R. A.; Adelman, A. H. Photosensitized Generation of Singlet Molecular Oxygen With Near-Infrared Radiation. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 674–675.
- [14] Cao, T.; Yang, T.; Gao, Y.; Zhou, J.; Li, Z.; Li, F. High-Quality Water-Soluble and Surface-Functionalized Upconversion Nanocrystals as Luminescent Probes for Bioimaging. *Biomaterials* **2011**, 32, 2959–2968.
- [15] Wang, F.; Zhang, Y.; Fan, X.; Wan, M. Facile Synthesis of Water-soluble LaF₃:Ln³⁺ Nanocrystals. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 1031–1034.
- [16] Xie, M. Y.; Yu, L.; He, H.; Yu, X. F. Synthesis of Highly Fluorescent LaF₃:Ln³⁺/LaF₃ Core/Shell nanocrystals by a Surfactant-Free Aqueous Solution Route. *J. Solid State Chem.* **2009**, 182 597–601.
- [17] Rocha, U.; Silva, C. J. d.; Silva, W. F.; Guedes, I.; Benayas, A.; Maestro, L. M.; Elias, M. A.; Bovero, E.; Veggel, F. C. J. M. v.; Solé, J. G.; Jaque, D. Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, 7, 1188–1199.
- [18] Zohar, O.; Ikeda, M.; Shinagawa, H.; Inoue, H.; Nakamura, H.; Elbaum, D.; Alkon, D. L.; Yoshioka, T. Thermal Imaging of Receptor-Activated Heat Production in Single Cells. *Biophys. J.* **1998**, 74, 82–89.
- [19] Suzuki, M. T., V.; Oyama, K.; Ishiwata, S. Microscopic Detection of Thermogenesis in a Single HeLa Cell. *Biophys. J.* **2007**, 92, L46–L48.
- [20] Pissuwan, D.; Valenzuela, S. M.; Cortie, M. B. Therapeutic Possibilities of Plasmonically Heated Gold Nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2006**, 24, 62–67.
- [21] Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photothermal therapy (PPTT) Using gold Nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **2008**, 23, 217–228.
- [22] Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2115–2120.
- [23] Doane, T. L.; Buda, C. The Unique Role of Nanoparticles in Nanomedicine: Imaging, Drug, Delivery and Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2885–911.
- [24] Sharma, R.; Chen, C. J. Newer Nanoparticles in Hyperthermia Treatment and Thermometry. *J. Nanopart. Res.* **2009**, 11, 671–689.
- [25] Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schuth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int.l Ed. Engl.* **2007**, 46, 1222–1244
- [26] Huang, X. H.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Application. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 4880–4910.
- [27] Huang, H. S.; Hainfeld, J. F. Intravenous Magnetic Nanoparticle Cancer Hyperthermia. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, 8, 2521–2532.

- [28] Kobayashi, T. Cancer Hyperthermia Using Magnetic Nanoparticles. *Biotechnol. J.* **2011**, 6, 1342–1347.
- [29] Chen, J.; Glaus, C.; Laforest, R.; Zhang, Q.; Yang, M.; Gidding, M.; Welch, M. J.; Xia, Y. *Small* **2010**, 6, 811–817.
- [30] Rocha, U.; Kumar, K. U.; Jacinto, C.; Villa, I.; Sanz-Rodríguez, F.; Cruz, M. d. C. I. d. I.; Juarranz, A.; Carrasco, E.; Veggel, F. C. J. M. v.; Bovero, E.; Solé, J. G.; Jaque, D. Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles for Fluorescence Bioimaging in the Second Biological Window. *Small* **2014**, 10, 1141–1154.
- [31] Rocha, U. Nd³⁺ Doped LaF₃ Nanoparticles as Self-monitored Photo-Thermal Agents. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, 104, 053703.
- [32] Feng, W.; Han, C.; Li, F. Upconversion-Nanophosphor-Based Functional Nanocomposites *Adv. Mater.* **2013**, 25, 5287-5303
- [33] Qin, R.; Song, H.; Pan, G.; Bai, X.; Dong, B.; Xie, S.; Liu, L.; Dai, Q.; Qu, X.; Ren, X.; Zhao, H. Polyol-Mediated Synthesis of Hexagonal LaF₃ Nanoplates Using NaNO₃ as a Mineralizer. *Cryst. Growth Des.* **2009**, 9, 1750–1756.
- [34] Weber, M. J. Probabilities for Radiative and Nonradiative Decay of Er³⁺ in LaF₃. *Phys. Rev.* **1967**, 157, 262 - 263.
- [35] Sun, W.; Cui, X.; Wang, Z.; Wei, W.; Peng, B. Luminescence Properties of Nd³⁺-doped LaF₃ Nanocrystals with a Long Lifetime in Organic Solvents. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 6990–6993.

2 NANOPARTÍCULAS LUMINESCENTES, ÍONS TERRAS-RARAS E NANOPARTÍCULAS DOPADAS COM ÍONS DE Nd³⁺

Neste capítulo serão abordados os requisitos teóricos necessários para o desenvolvimento dessa tese, a fim de facilitar a leitura dos capítulos seguintes. Primeiro será apresentado as características gerais dos íons terras-raras, com particular interesse em sistemas dopados com íons de Neodímio (Nd³⁺), tal íon é o foco da nossa tese. Também serão abordados os tipos de nanopartículas (NPs) usadas como agentes de contrastes para o bioimagem por fluorescência cujas emissões correspondem a região espectral de transparência dos tecidos biológicos. Além disso, serão discutidos os mecanismos de perdas via processos radiativos e não radiativos (devido às interações entre os íons dopantes).

2.1 Estado da Arte: Nanopartículas Luminescentes como Agentes de Contraste

Atualmente Nanopartículas Luminescentes (NPsL) são consideradas essenciais no campo da biofotônica moderna. Elas têm sido extensivamente usadas em diversos tipos de aplicações, por exemplo, bio-imagens de alta resolução, sensor intracelular e liberação de fármacos por meios ópticos [1-3]. É bastante evidente que as NPsL irá desempenhar um papel crucial, em um futuro próximo, nos procedimentos de diagnósticos e terapias para diversos tipos de câncer. Grande parte da pesquisa e trabalhos feitos até agora com NPsL foram focados na concepção, desenvolvimento e aplicação de nanopartículas que emitem no visível [4-8]. A razão para isso é que a maioria dos sistemas de imagens usados na bio-medicina (incluindo microscópio confocal, microscópios fluorescentes e sistema de “imagem” de pequenos animais) tem sua resposta espectral otimizada para o intervalo de emissão espectral no visível. Pois a detecção de luz foi baseada em fotomultiplicadores convencionais ou detectores de avalanche de semicondutores com um ganho máximo nesta região espectral.

Apesar dos resultados obtidos até agora, em experimentos *in vitro*, usando NPsL emitindo no visível, sua aplicação *in vivo* é bastante limitada. Isto é devido ao fato da luz visível não poder penetrar eficientemente nos tecidos por causa da combinação dos fenômenos de espalhamento da luz (devido ao fato dos tecidos serem não homogêneos) e da absorção causada por diferentes compostos presentes em um tecido humano real, como o sangue (ver Figura 1(a)) [9-12]. Contudo, esta limitação pode ser superada (para

alcançar maiores profundidades de penetração) usando NPsL que emitem dentro da “*Janela Biológica*” (JB) do tecido humano, isto é, uma região espectral onde os tecidos são parcialmente transparentes. Há um passado não muito distante muitos esforços foram feitos para desenvolver NPsL cujas propriedades estivessem dentro da chamada *Primeira Janela Biológica* (I-JB) que se estende de 700 até 950 nm [12, 13]. Nesta região espectral a absorção da água e de outros componentes típicos dos tecidos humanos (como a hemoglobina) é desprezível de modo que o coeficiente de extinção do tecido é, aproximadamente, causado apenas pelo espalhamento da luz (ver Figura 1(a))[9, 12, 13]. É possível encontrar na literatura uma grande variedade de NPsL que emite na I-JB, podemos então classifica-las em dois grupos:

i) NPsL que são excitadas dentro da I-Janela Biológica mas emitem fora dela

Este grupo é constituído por NPs que são excitadas de forma multifotônica. Estas nanopartículas podem ser excitadas na região do infravermelho e por causa do processo de excitação por multi-fótons, podem vir a emitir no visível. Dentre essas NPs destacamos os semicondutores Quantum Dots (QDs), Nanobastões de Ouro e nanopartículas “up converting” dopadas com íons terras-raras, cujas regiões de emissão espectral estão esquematicamente indicadas na Figura 1(a) [7, 14-19]. Este conjunto de NPs quando aplicadas em experimentos *in vitro* tem propiciado excelentes resultados em termos de resolução de imagem (por causa do grande confinamento espacial da fluorescência gerada a partir da excitação por multi-fótons), mas não obtiveram o mesmo êxito em relação ao imageamento *in vivo* intratecido a grandes profundidades. O fato da radiação de excitação estar situada dentro do intervalo espectral da *primeira janela biológica* melhora, significativamente, a profundidade de penetração da excitação no tecido. No entanto, a radiação emitida no visível é fortemente afetada (espalhada e absorvida) pelos componentes do tecido, dificultando, portanto, a detecção da luz emitida.

ii) NPsL que são excitadas e emitem dentro da I-Janela Biológica

Neste caso, tanto a radiação de excitação quanto à radiação emitida estão situadas dentro da janela biológica sendo, portanto, fracamente atenuadas pelos

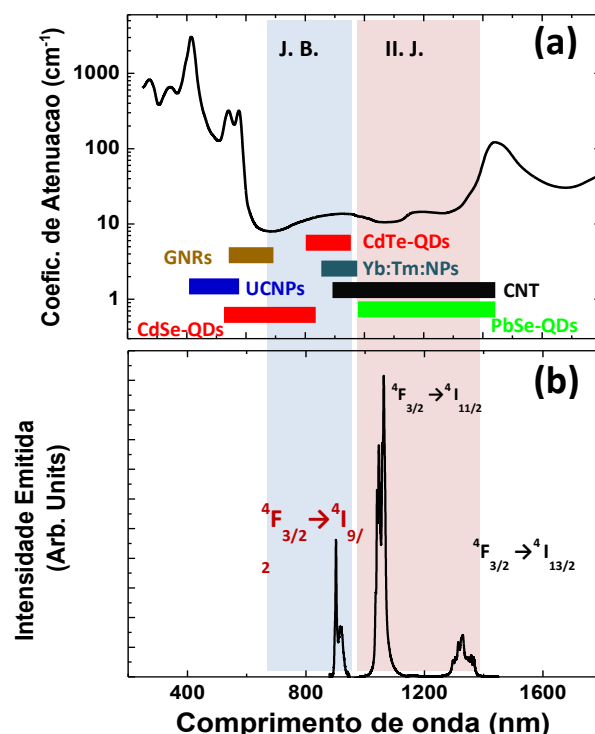
coeficientes ópticos dos tecidos. Permitindo, então, uma significativa melhoria (em termos da profundidade de penetração óptica) em comparação com as NPs que emitem no visível. Estas nanopartículas são tradicionalmente denominadas como NPsL IV-IV e têm sido extensivamente aplicadas em experimentos de imageamento *in vitro* e *in vivo*. No entanto, existem dois tipos principais de NPsL IV-IV: (i) NPsL que são excitadas via processos de excitação multifotônica; tais como QDs CdTe (com diâmetros de aprox. 5 nm) e algumas NPsL dopadas com íons lantanídeos – geralmente nanocristais codopados com íons $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ (suas emissões estão indicadas na Figura 1(a) [19-26] (ii) NPsL IV-IV que são excitadas por um fóton (NPs *down conversion*), por exemplo, nanocristais dopadas com Nd^{3+} e Er^{3+} [27-29]. Para essas NPs, a resolução espacial da imagem fluorescente é um pouco reduzida. Por outro lado, tem sido demonstrado que as profundidades de penetração alcançada pelas NPs IV-IV (devido à dependência linear da intensidade da luz emitida com a radiação de excitação) são de magnitudes maiores em comparação com as NPsL excitadas via processo de multifótons.

Grande atenção agora tem sido dada ao desenvolvimento de NPsL cujas emissões estão localizadas na região espectral da *segunda janela biológica (II-JB)*, que se estende desde 1000 nm até 1400 nm. Esta região espectral é limitada pelas duas bandas de absorção da água presentes em 980 nm e 1500 nm. Na II-JB o fenômeno do espalhamento óptico é bem mais reduzido em comparação com o mesmo coeficiente da I-JB, isto decorrente do uso de comprimento de ondas mais longos. Já é bem conhecido que a redução da influência do coeficiente de espalhamento poderá levar a uma melhoria na resolução espacial das imagens intratecido, uma vez que os efeitos de atenuação óptica foram minimizados [10, 30]. Além disso, tal redução também poderá favorecer a profundidade de penetração óptica, em relação aos valores obtidos pelos agentes de contraste na I-JB. Devido a essas possíveis melhorias ambos os parâmetros (resolução da imagem e profundidade de penetração), há agora um grande interesse no desenvolvimento de NPsL gerando emissão luminescente na II-JB.

Ainda dentro desse mesmo contexto, uns dos nanomateriais luminescentes para o bioimageamento dentro da II-JB, são os Nanotubos de Carbono (NTsC) [31-34]. Quando opticamente excitadas (por um fóton) no infravermelho (800 nm) exibem uma banda de emissão que se estende desde 900 nm até 1500 nm, de modo que cobre toda extensão da *segunda janela biológica* (ver Figura 1(a)). Esta ampla banda de emissão já foi usada para o imageamento anatômico intratecido (profundo) de pequenos animais (ratos) [34, 35]. Apesar desses bons resultados os NTsC apresentam muitos

inconvenientes. Um dos principais é a dificuldade de sintetizar nanotubos de carbono com alta eficiência quântica. Uma vez que a eficiência quântica dos nanotubos reportados na literatura (até o momento desta tese) era de aproximadamente 10% [32]. A consequência da baixa eficiência quântica é refletida no aumento da geração de calor devido à radiação de bombeio, fator que é indesejável durante o imageamento óptico. Além dos NTsC os quantum dots fluorescentes, tais como o PbSe e Ag₂S, também figuram como bons candidatos para o imageamento óptico na II-JB [36, 37]. Os QDs possuem uma característica intrigante e interessante, uma vez que sua emissão fluorescente depende fortemente do tamanho do QDs (ver Figura 1(a)).

Figura 1: (a) O coeficiente de atenuação do sangue humano (oxigenado) está na faixa espectral entre 300-1700 nm. As extensões espectrais tanto da primeira como da segunda “*janelas biológicas*” são esquematicamente indicadas. Também estão incluídas as emissões espectrais das NPL em diferentes regiões do espectro que foram anteriormente utilizadas para o bioimageamento fluorescente. (b) O espectro de emissão de uma suspensão coloidal de NPs de Nd³⁺:LaF₃ obtidos sob excitação óptica em 808 nm. Onde temos destacado as três bandas de emissão.



Fonte: Autor, 2014.

De fato, é possível encontrar na literatura (o que seria o primeiro relato) de experimentos *in vivo* usando QDs de Ag₂S [36]. No entanto, os quantum dots emissores

na região espectral do IV apresentam baixa eficiência quântica de fluorescência, justamente na II-JB. Um exemplo é QD de PbSe apresentando um valor próximo a 30% da eficiência quântica (e próximo a 15% para o Ag₂S) [36, 37]. Portanto, a busca de novas NPsL cujas propriedades ópticas de emissão (como também eficiência quântica) na região espectral da segunda janela biológica é uma questão em aberto. Dentro desse contexto nanopartículas de LaF₃ dopadas com íons de Nd³⁺ surge com grande potencial por apresentar emissões na primeira e segunda janelas biológicas (ver Figura 1(b)), o uso dessas nanopartículas como marcadores biológicos será discutido no capítulo seis.

2.2 Íons Terras-raras (Lantanídeos)

Os elementos terras-raras (TRs) são constituídos pelos átomos das séries dos lantanídeos e actinídeos. A palavra “lantanídeo” tem sua origem da palavra grega *lanthaneien* que pode ser traduzida como "posição secreta" ou “escondido” [38]. A série de lantanídeos abrange 15 elementos desde lantânio (La, Z=57) até o lutécio (Lu, Z=71); os actinídeos estão logo abaixo dos lantanídeos na tabela periódica, preenchendo a camada 5f, começando pelo Tório (Th, Z=90) e terminando com o Lawrêncio (Lr, Z=103), ver Figura 2.

Figura 2: Tabela periódica mostrando todos os elementos. Os Lantanídeos e Actinídeos estão na parte inferior da tabela periódica.

Período	Grupo																18	
1	1 H	2																10 Ne
2	3 Li	4 Be																18 Ar
3	11 Na	12 Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra		104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
Lantanídeos			57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu	
Actinídeos			89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr	

(fonte: <http://www.quimicaonline.net/?tag=tabela-periodica>).

Mas, nesta tese, não trataremos dos actinídeos, discutiremos somente os lantanídeos (mais especificamente o Neodímio). O nome íons terras-raras veio devido à raridade dos minerais no qual os elementos TRs estão (ou não) concentrados. Contudo, eles não são tão raros como o nome propõe. Esses íons são mais comuns do que o ouro,

prata ou platina e podem ser encontrados em abundância na crosta terrestre, a ponto de tornar o termo terras-raras inadequado [39]. A maior parte dos íons lantanídeos foram descobertas no início do século XIX e ao longo do século XX [40]. Desde sua descoberta, estes íons vêm evoluindo rapidamente e ganhando cada vez mais importância tecnológica.

Os TRs, em sua totalidade, podem formar cátion trivalente, com configuração eletrônica $4f^{n-1} 5s^2 5p^6$, sendo que alguns podem formar cátion bivalente, $4f^n 5s^2 5p^6$, e tetravalente. Os lantanídeos, com exceção do Escândio ($[Ar] 3d^1 4s^2$) e do Ítrio ($[Kr] 4d^1 5s^2$), em sua forma trivalente, possuem uma estrutura eletrônica que pode ser representada em função do gás nobre Xenônio ($[Xe] 1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^6 5s^2 4d^{10} 5p^6$) [41], segundo a expressão $[Xe] 4f^n$, onde n varia de 0 a 14 (0 para o Lantânio-La e 14 para o Lutécio-Lu). Outra importante característica dos elementos da série lantanídea é o fenômeno da contração lantanídea, que ocorre em função de uma blindagem imperfeita por parte dos elétrons da camada $4f$ sobre os outros elétrons da mesma camada. Isto gera um aumento da carga nuclear efetiva (pois os elétrons de valência tendem a ser atraídos para mais perto do núcleo e os átomos tendem a ficar menores) de modo a reduzir o raio atômico com o aumento do número atômico [42]. Este efeito foi descoberto por M. G. Mayer [43], onde observou que tanto a energia quanto a extensão espacial das funções de onda do nível $4f$ diminuíam rapidamente no começo da série lantanídica.

No caso do neodímio, por exemplo, existe uma contração tão grande na função de onda que o máximo de tal função se localiza mais internamente do que aquelas dos níveis $5s$ e $5p$. Isto é possível porque os elétrons da camada $4f$ possuem uma blindagem mais fraca, e por conta disso estão susceptíveis a sofrerem uma maior atração pela carga nuclear do que os outros níveis a medida que avançamos dentro da série dos lantanídeos. Um pequeno resumo das configurações eletrônicas de átomos de lantanídeos e íons lantanídeos trivalentes é apresentado na Tabela 1.

As propriedades espectroscópicas desses elementos estão associadas às transições eletrônicas que ocorrem entre os níveis de energia do átomo. Para o caso dos TRs tais transições geralmente ocorrem dentro da própria camada $4f$, como também da camada $4f$ para o nível mais externo $5d$, o que dá origem a banda $4f^{n-1}5d$. Esse efeito pode ser observado, em materiais dopados com íons trivalentes, onde a luminescência ocorre devido às transições entre os estados $f-f$ numa região espectral que vai do ultravioleta até o infravermelho do espectro eletromagnético. Em nosso caso

estudaremos as emissões do íon Nd^{3+} na região do infravermelho (em torno de 900, 1050 e 1330 nm).

Em geral as matrizes sólidas escolhidas para hospedarem os íons terras-raras, podem ser divididas em dois os grupos: sólidos cristalinos e amorfos. Entretanto, já é possível encontrar na literatura materiais mistos formados por íons TRs e nanotubos de carbono e/ou outras formas geométricas desse material (por exemplo, nanofio) [44]. Já é conhecido na literatura que em matrizes amorfas a largura de linha dos TRs é maior do que em cristais devido ao fato que na rede amorfa cada íon sofre a perturbação do campo em seu entorno de forma particular. Podemos citar que bandas de emissões largas são muito procuradas para aplicações em lasers de pulsos ultra-curtos. Além da largura de linha, outra característica dos íons TRs que é afetada pela matriz hospedeira é a seção de choque. Isto é, para uma determinada transição de certo íon TR as amplitudes das seções de choque de absorção/emissão são geralmente maiores em meios cristalinos que em meios amorfos [45].

Tabela 1: Número atômico, estrutura eletrônica, raio iônico e as configurações trivalentes dos elementos TRs ([Xe] representa a configuração do Xenônio que é: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^6 5s^2 4d^{10} 5p^6$).

Nº Atômico	Elemento	Configuração Eletrônica	Raio Iônico TR ³⁺ (Å)	Raio	
		Neutra		Iônico	TR ³⁺ (Å)
57	La – Lantânio	[Xe] 6s ² 4f ⁰ 5d	1,15	1,060	f ⁰
58	Ce – Cério	[Xe] 6s ² 4f 5d	1,02	1,034	f ¹
59	Pr – Praseodímio	[Xe] 6s ² 4f ³	1,00	1,013	f ²
60	Nd – Neodímio	[Xe] 6s ² 4f ⁴	0,99	0,995	f ³
61	Pm – Promécio	[Xe] 6s ² 4f ⁵	0,98	-	f ⁴
62	Sm – Samário	[Xe] 6s ² 4f ⁶	0,97	0,964	f ⁵
63	Eu – Európio	[Xe] 6s ² 4f ⁷	0,97	0,950	f ⁶
64	Gd – Gadolímio	[Xe] 6s ² 4f ⁷ 5d	0,97	0,938	f ⁷
65	Tb – Tércio	[Xe] 6s ² 4f ⁹	1,00	0,923	f ⁸
66	Dy – Disprósio	[Xe] 6s ² 4f ¹⁰	0,99	0,908	f ⁹

67	Ho – Hólmio	[Xe] 6s ² 4f ¹¹	0,97	0,894	f ¹⁰
68	Er – Érbio	[Xe] 6s ² 4f ¹²	0,96	0,881	f ¹¹
69	Tm – Túlio	[Xe] 6s ² 4f ¹³	0,95	0,870	f ¹²
70	Yb – Itérbio	[Xe] 6s ² 4f ¹⁴	0,94	0,930	f ¹³
71	Lu – Lutécio	[Xe] 6s ² 4f ¹⁴ 5d	0,93	0,850	f ¹⁴

Fonte: P. Urquhart, 1988 [41].

Na realidade em materiais “*bulk*” devemos não somente dar atenção ao fato da matriz hospedeira ser um cristal, um vidro, uma cerâmica, etc., é preciso levar em conta as propriedades ópticas, mecânicas e térmicas, tais como: a composição química da matriz hospedeira, o índice de refração, a energia máxima de fônon, dentre outros. Tais fatores podem influenciar fortemente nas características espectroscópicas dos íons TRs usados como dopante. É verdade também que em nanocristais dopados com íons TRs as propriedades ópticas do meio não se diferenciam significativamente dos seus contrapostos “*bulk*” [46].

Podemos dizer no caso dos íons TRs, que a transição eletrônica mais importante é por dipolo elétrico. Embora, essas transições ($f - f$) sejam proibidas pela regra de Laporte para os estados da camada $4f$ por conectarem transições de mesma paridade (isto é, as paridades das funções de onda dos estados inicial e final são as mesmas). Contudo, quando esses elementos são incorporados em matrizes sólidas cristalográficas não centro-simétricas, irá ocorrer a quebra de paridade. Fazendo com que tais transições, ($f - f$), passem a ser permitidas devido a influencia da rede cristalina (pois ocorre uma mistura dos estados $4f^n$ com aqueles de paridade diferentes do campo cristalino). O fato é que agora os estados $4f^n$ já não possuem mais paridade definida, permitindo então que as transições $f - f$ ocorram pelo mecanismo de dipolo elétrico forçado [47].

Matematicamente, os níveis de energia da camada $4f$ de um íon TR imerso em uma matriz sólida, pode ser descrito pelo hamiltoniano, H . Uma vez que as linhas espectrais originam-se de transições dentro da camada $4f$ podemos obter os níveis de energia dos elétrons dessa camada para suas diferentes configurações $4f^n$, com $n = 1, \dots, 14$. Nesse caso os cálculos desses níveis podem ser feitos utilizando métodos da Mecânica Quântica, isto é, resolvendo um problema de autovalor (mediante o uso da teoria da perturbação). Considerando que num íon terra-rara todas as camadas

eletrônicas, exceto a $4f$, são esfericamente simétricas e que desta forma não contribuem significativamente para as posições relativas dos níveis de energia $4f$, sendo assim podemos escrever o Hamiltoniano que descreve os níveis de energia da camada eletrônica $4f^n$, como:

$$H = -\overbrace{\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \frac{Z^* e^2}{r_i}}^{H_{CC}} + \overbrace{\sum_{i<j}^N \frac{e^2}{r_{ij}}}_{H_C} + \overbrace{\sum_{i=1}^N \zeta(r_i) S_i \cdot L_i}_{H_{SO}} \quad (2)$$

onde $N = 1, \dots, 14$ é o número de elétrons da camada $4f$, Z^* é a carga blindada (efetiva) do núcleo, uma vez que desprezamos as camadas eletrônicas fechadas, r_i é a distância entre o núcleo e o elétron i , r_{ij} é a distância entre dois elétrons i e j , L_i e S_i são o momento angular e spin do elétron i e $\zeta(r_i)$ é a função de acoplamento Spin-Órbita:

$$\zeta(r_i) = -\frac{\hbar^2}{2m_e c^2 r_i} \frac{dU(r_i)}{dr_i} \quad (2.1)$$

onde $U(r_i)$ é o potencial no qual o elétron i está se movendo.

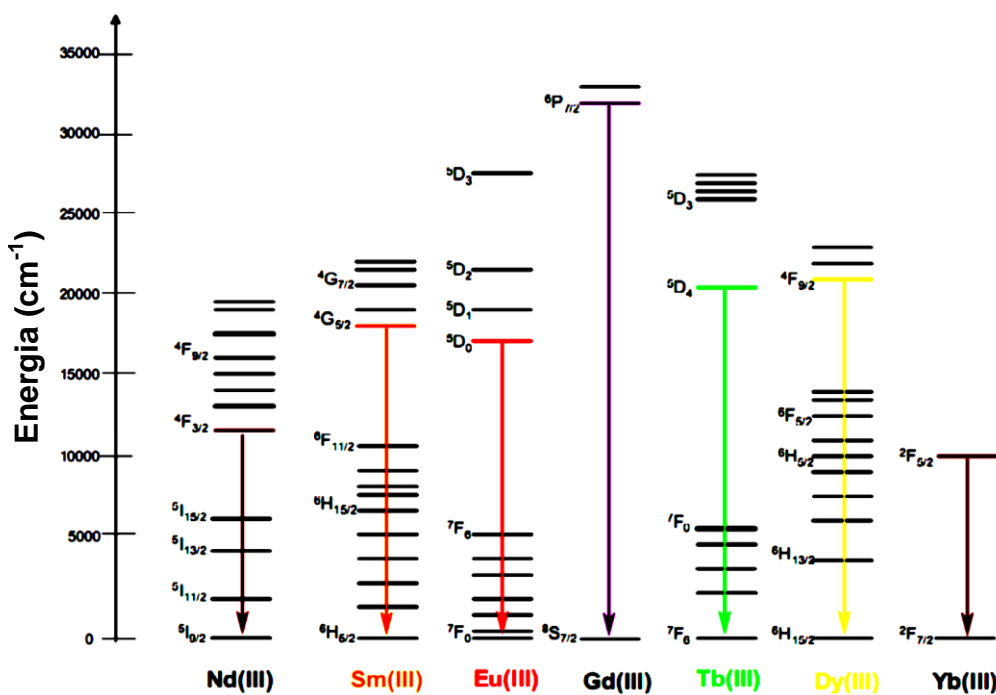
O primeiro termo da equação (2) é associado à energia cinética dos elétrons da camada $4f$ e o segundo termo representa as interações coulombianas com o núcleo. Vale ressaltar que esses dois termos são simétricos e não removem qualquer degenerescência da configuração dos elétrons $4f$, então todos os estados de tal configuração possuem a mesma energia. Logo, os dois últimos termos serão os responsáveis por determinar a estrutura de níveis dos elétrons da camada $4f$ e que por sua vez estão associados às interações coulombianas mútuas dos elétrons H_C e sua interação Spin-Órbita H_{SO} dos elétrons $4f$.

Existem dois casos limites que envolvem estas interações (entre os hamiltonianos H_C e H_{SO}) [41]: O caso em que $H_C \gg H_{SO}$ é chamado de acoplamento LS, ou acoplamento Russel-Saunders, onde a interação Spin-Órbita é apenas uma pequena perturbação na estrutura dos níveis de energia; E o caso onde $H_{SO} \gg H_C$, em que a interação dominante é a interação spin-órbita, apresentando maior intensidade que a interação Coulombiana, conhecido como acoplamento $j - j$. A interação dos elétrons da camada $4f$ com as camadas fechadas não modifica a simetria do segundo termo da equação (2), mas apenas sua magnitude. Com isso, a carga real do núcleo pode ser

substituída pela carga blindada, ou efetiva Z^* . Os dois primeiros termos não removem qualquer degenerescência nas configurações $4f^n$, uma vez que os mesmos são esfericamente simétricos.

A estrutura dos níveis de energia de alguns íons TR na forma trivalente é apresentada na Figura 3, onde foi considerado o espectro óptico de cada um dos íons dopados em matrizes cristalinas de LaF_3 [48]. Apresentamos até aqui a natureza dos íons TRs e os vários fatores que influenciam nas propriedades espectroscópicas dos íons TRs. Na subseção (2.2.1) passaremos a estudar essas propriedades de um modo mais particular, ou seja, para o íon TRs de nosso interesse o Nd^{3+} .

Figura 3: Diagrama de nível de energia para íons Ln^{3+} mostrando os principais níveis emissores e as transições para os níveis do estado fundamental [48].



Fonte: Autor, Referência [48].

2.2.1 Sistemas dopados com Íons de Neodímio

O Neodímio e o Praseodímio foram descobertos ao mesmo tempo. Em 18 de Junho de 1885 um químico conseguiu realizar a separação dos íons (a partir do dídimo que era considerado uma mistura de elementos na época) anunciando o resultado frente à Academia de Ciências de Viena. Tal façanha foi realizada pelo químico Baron Carl Auel. O Neodímio é um metal (macio e maleável) de coloração branco-prateado, sendo moderadamente reativo e oxida rapidamente para uma cor amarelada quando posto em

contato com o ar. Ele tem uma estrutura hexagonal, uma densidade de $7,004 \text{ g/cm}^3$, um ponto de fusão de $1021 \text{ }^\circ\text{C}$ e um ponto de ebulição de $3027 \text{ }^\circ\text{C}$. Óxido de neodímio ocorre como um sesquióxido (ou seja, um óxido que tem dois átomos de um elemento combinados com três de oxigênio) com a fórmula Nd_2O_3 . O óxido é um pó branco pálido com um ponto de fusão de $2233 \text{ }^\circ\text{C}$. A título de informação, o Neodímio é um dos principais constituintes do mineral monazita, que por sua vez é a segunda maior fonte de elementos terras-raras da crosta terrestre. Depósitos de monazita estão localizados na Austrália, China, Estados Unidos, Índia, Malásia, África do Sul, Sri Lanka, Tailândia e Brasil, tornando o neodímio um dos elementos mais abundantes da Terra.

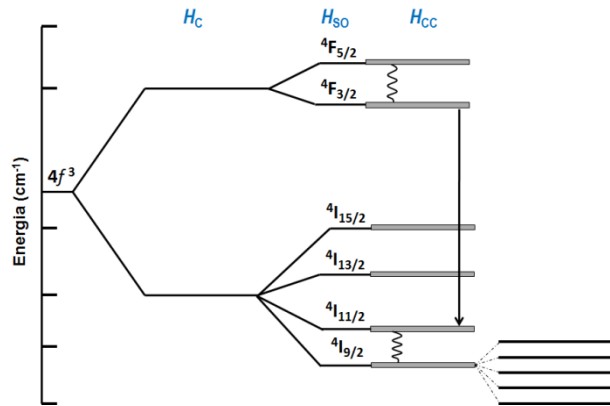
Desde sua descoberta este elemento vem sendo o foco de numerosas pesquisas por causa das suas excelentes propriedades ópticas. Em um passado não tão distante, isto é, somente um ano após a invenção do primeiro laser (de rubi) em 1960 pelo físico Theodore Maiman, surgiu uma matriz vítrea dopada com Nd^{3+} , constituindo o primeiro laser de Nd^{3+} [49]. Não seria muito dizer que o íon de Nd^{3+} é um dos TRs mais estudados; suas aplicações se estendem por diversos campos incluindo dispositivos lasers em indústrias e pesquisa básica, optoeletrônica, dispositivos magnéticos, indústria civil, medicina e outros [50].

O átomo de neodímio neutro tem configuração $4f^4 6s^2$. Quando incorporados como íon trivalente em uma matriz apresenta a configuração $4f^3$. Na Figura 4 apresentamos de forma simplificada os desdobramentos do nível energético $4f^3$ do íon de neodímio, que ocorre em consequência da combinação de diferentes interações: a repulsão Coulombiana (H_C), o acoplamento Spin-Órbita (H_{SO}) e com o campo cristalino (H_{CC}). Sua distribuição simplificada de níveis (quatro níveis atômicos) facilita em muito a inversão de população – essa é uma das principais razões deste íon ser amplamente empregado como meio ativo em lasers [51].

O Nd^{3+} possui banda de absorção na região do infravermelho em 800 nm (${}^4\text{I}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{F}_{5/2}$), as emissões de maior interesse são em torno de 890 , 1060 (emissão de fotoluminescência bastante intensa, fotoluminescência com tempo de vida longo) e 1330 nm , provenientes das transições ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$, ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{11/2}$ e ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{13/2}$. A primeira emissão citada tem sido aplicada para o bioimagem por fluorescência [12, 13]. A emissão em 1060 nm é a emissão laser principal deste íon, além de suas aplicações industriais também são relatados na literatura estudos no campo da medicina e odontologia. Não obstante, ao longo desta tese exploramos as principais transições no

infravelho do íon Nd^{3+} . E neste ponto é factível destacar a importância que o Nd^{3+} vem adquirindo no cenário da física aplicada a medicina [52].

Figura 4: Esquema simplificado do desdobramento dos níveis de energia do íon de Nd^{3+} quando é submetido a um campo cristalino. Adaptado da referência [51].



Fonte: Autor, Referência [51].

Nesta tese, temos proposto o uso de nanopartículas de LaF_3 , do tipo *core e core/shell*, dopadas com íons de Neodímio para bioimagem intratecido baseando-se nas bandas de emissão características dos íons de Nd^{3+} em torno 900, 1050 e 1330 nm associadas as respectivas transições ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$, ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ e ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$. Como será demonstrado nos capítulos posteriores, por meios estudos sistemáticos determinamos as condições ótimas para o uso dessas nanopartículas para imagem por fluorescência de alta resolução através de experimentos *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*.

2.2.2 Nanopartículas Luminescentes Dopadas com Íons Lantanídeos

Lantanídeos trivalentes (Ln^{3+}) são considerados sistemas luminescentes ativos e são amplamente utilizados em lasers de estados sólidos, lâmpadas luminescentes, display plano, sistemas de comunicação baseados em fibras-ópticas e outros dispositivos fotônicos [53]. Devido a sua estrutura eletrônica única, os íons de Ln^{3+} quando depositados em sólidos podem emitir eficientemente fótons na região espectral do ultravioleta, visível até o infravermelho (IV). Importantes contribuições de trabalhos pioneiros realizados por Dieke, Judd, Wybourne [54-57] e outros com estudos teóricos e experimentais da estrutura eletrônica ($4f^n$) ajudaram a compreender (de forma mais completa) muito das propriedades espectroscópicas dos íons Ln^{3+} [58-61].

Devido ao desenvolvimento rápido da nanotecnologia e biotecnologia, em particular o desenvolvimento de novos métodos de síntese de materiais, tem surgido um crescente interesse na manipulação da síntese, propriedades ópticas e bioaplicações de materiais dopados com íons de Ln^{3+} em escala nanométrica. Isto pode ser bem estabelecido pelo número de artigos recentemente publicados relacionados à NPs dopadas com íons Ln^{3+} , ao longo dos últimos anos (por exemplo, buscar no ISI Web of Science “lanthanide or rare earth” e “nanoparticles OR nanocrystals”).

Materiais nanocristalinos e nanoestruturados, como partículas de 100 nm ou menos, podem exibir novas propriedades magnéticas, eletrônicas, ópticas ou termodinâmicas em comparação com seus análogos (“*bulk*”) [62]. De fato, uma grande variedade de matrizes para “encapsular” os íons Ln^{3+} tem sido amplamente estudada ao longo dos últimos anos [63]. Como mencionado a natureza da emissão dos íons lantanídeos não é significativamente influenciada pelo ambiente (pH, solvent, etc), mas o tempo de vida dos níveis de energia e a eficiência dos processos de transferência de energia são. Como já mencionado, quando os íons de Ln^{3+} se tornam parte de uma estrutura cristalina, a simetria do campo cristalino e a energia de fônon da matriz poderá afetar a emissão observada por meio do favorecimento, ou não, de certas transições.

NPs dopadas com íons de Ln^{3+} podem servir como ativadores ópticos, ou ainda, como sondas sensíveis da estrutura local em torno de uma rede catiônica de um determinado hospedeiro. Além disso, também oferecem vantagens (por exemplo, maior fotoestabilidade) em relação a outros bio-macrodadores como, por exemplo, fluoróforos (corantes) orgânicos e pontos quânticos (mais conhecidos como Quantum dots-QDs) [64-67]. É importante salientar que a natureza da luminescência dos íons lantanídeos é diferente da luminescência observada nos corantes orgânicos ou QDs [68]. A luminescência gerada pelos corantes orgânicos envolve os estados ligado, anti-ligado e não ligado dos níveis de energia que por sua vez estão sujeitos a uma série de vibrações. Enquanto que a luminescência gerada pelos QDs é graças ao confinamento quântico do éxciton decorrente da miniaturização do semiconductor.

Na realidade as NPs inorgânicas luminescentes dopadas com íons de Ln^{3+} possuem características físico-químicas superiores, tais como tempo de vida longo (de muitos milissegundos), *Stoke-shift* grande, linhas de emissão estreitas, alta resistência à fotodegradação (os íons lantanídeos trivalentes podem passar quase que por um número infinito fotociclos sem serem afetados (fotodegradados)) e baixa toxicidade (a nível

celular e de pequenos animais) sendo, portanto, considerados como uma nova geração de biosensores luminescentes [27, 28].

De fato, a falta de fotodegradação é uma importante vantagem sobre as moléculas orgânicas que podem suportar um número finito de fotociclos (frequência de energia de entrada) antes de quebrar (fotodegradar) e perder as suas características de fluorescência. Os QDs são melhores do que os fluoróforos orgânicos sobre esse aspecto, no entanto eles ainda não são tão resistentes como os íons lantanídeos. A maior parte dos íons Ln^{3+} relatados pela literatura não são sensíveis à umidade ou ar (isto é, não se degradam sob estas condições), diferentemente de alguns QDs que tem suas propriedades alteradas sob tais condições [69-70]. Vale ressaltar que a larga diferença de energia entre as bandas de excitação e de emissão dos íons lantanídeos (grande *Stoke-shift*) elimina os problemas técnicos relacionados com a sobreposição (ou superposição) da excitação e emissão. Especialmente no caso da microscopia óptica onde a excitação tem de ser filtrada para fora do sinal de emissão.

REFERÊNCIAS

- [1] Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 161-171.
- [2] Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J. Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology. *Nanotechnol., Sci. Appl.* **2008**, 1, 17-32.
- [3] Sivaraman, D.; Biswas, P.; Cella, L. N.; Yates, M. V.; Chen, W. Detecting RNA Viruses in Living Mammalian Cells by Fluorescence Microscopy. *Trends Biotech.* **2011**, 29, 307-313.
- [4] Maestro, L. M.; Jacinto, C.; Rocha, U.; Cruz, M. C. I.-d. I.; Sanz-Rodríguez, F.; Juarranz, A.; Solé, J. G.; Jaque, D. Optimum Quantum Dot size for Highly Efficient Fluorescence Bioimaging. *J. Appl. Phys.* **2012**, 111, 023513.
- [5] Jamieson, T.; Bakhshi, R.; Petrova, D.; Pocock, R.; Imani, M.; Seifalian, A. M. Biological Applications of Quantum Dots. *Biomaterials* **2007**, 28, 4717-4732.
- [6] Wu, J.; Wang, G.; Jin, D.; Yuan, J.; Guan, Y.; Piper, J. Luminescent Europium Nanoparticles with a Wide Excitation Range from UV to Visible Light for Biolabeling and Time-Gated Luminescence Bioimaging. *Chem. Commun.* **2008**, 365-367.
- [7] Mader, H. S.; Kele, P.; Saleh, S. M.; Wolfbeis, O. S. Upconverting Luminescent Nanoparticles for Use in Bioconjugation and Bioimaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 582-596.
- [8] Chen, H.; Li, B.; ChuanWang; Zhang, X.; Cheng, Z.; Dai, X.; Zhu, R.; Gu, Y. Characterization of a Fluorescence Probe Based on Gold Nanoclusters for Cell and Animal Imaging. *Nanotechnology* **2013**, 24, 055704.

- [9] Frangioni, J. V. In vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 626–634.
- [10] Bashkatov, A. N.; Genina, E. A.; Kochubey, V. I.; Tuchin, V. V. Optical Properties of Human Skin, Subcutaneous and Mucous Tissues in the Wavelength Range from 400 to 2000 nm. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2005**, 38, 2543–2555.
- [11] Xu, C. T.; Svensson, N.; Axelsson, J.; Svenmarker, P.; Somesfalean, G.; Chen, G.; Liang, H.; Liu, H.; Zhang, Z.; Andersson-Engels, S. Autofluorescence Insensitive Imaging Using Upconverting Nanocrystal in Scattering Media. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 171103.
- [12] Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S. Second Window for *in Vivo* Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 710–711.
- [13] Weissleder, R. A Clearer Vision for *in Vivo* Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 316–317.
- [14] Ang, L. Y.; Lim, M. E.; Ong, L. C.; Zhang, Y. Applications of Upconversion Nanoparticles in Imaging, Detection and Therapy. *Nanomedicine* **2011**, 6, 1273–1288.
- [15] Maestro, L. M.; Rodriguez, E. M.; Vetrone, F.; Naccache, R.; Ramirez, H. L.; Jaque, D.; Capobianco, J. A.; Solé, J. G. Nanoparticle for Highly Efficiently Multiphoton Fluorescence Bioimaging. *Opt. Expr.* **2010**, 18, 23544–23553.
- [16] Larson, D. R.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Clark, S. W.; Bruchez, M. P.; Wise, F. W.; Webb, W. W. Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging *in Vivo*. *Science* **2003**, 300, 1434–1436.
- [17] Wang, H.; Huff, T. B.; Zweifel, D. A.; He, W.; Low, P. S.; Wei, A.; Cheng, J.-X. *In Vitro* and *in Vivo* Two-Photon Luminescence Imaging of Single Gold Nanorods. *PNAS* **2005**, 102, 15752–15756.
- [18] Vetrone, F.; Naccache, R.; Fuente, A. J. d. l.; Sanz-Rodríguez, F.; Blazquez-Castro, A.; Rodriguez, E. M.; Jaque, D.; Solé, J. G.; Capobianco, J. A. Intracellular Imaging of HeLa Cells by Non-Functionalized NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺ Upconverting Nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, 2, 495–498.
- [19] Gai, S.; Yang, P.; Li, C.; Wang, W.; Dai, Y.; Niu, N.; Lin, J. Synthesis of Magnetic, Up-Conversion Luminescent, and Mesoporous Core–Shell-Structured Nanocomposites as Drug Carriers. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20, 1166–1172.
- [20] Maestro, L. M.; Ramírez-Hernández, J. E.; Bogdan, N.; Capobianco, J. A.; Vetrone, F.; Solé, J. G.; Jaque, D. Deep Tissue Bio-Imaging Using Two-Photon Excited CdTe Fluorescent Quantum Dots Working within the Biological Window. *Nanoscale* **2012**, 4, 298–302.
- [21] Zintchenko, A.; Susha, A. S.; Concia, M.; Feldmann, J.; Wagner, E.; Rogach, A. L.; Ogris, M. Drug Nanocarriers Labeled with Near-Infrared-Emitting Quantum Dots (Quantoplexes): Imaging Fast Dynamics of Distribution in Living Animals. *Mol. Ther.* **2009**, 17, 1849–1856.
- [22] Dong, N.-N.; Pedroni, M.; Piccinelli, F.; Conti, G.; Sbarbati, A.; Ramírez-Hernández, J. E.; Maestro, L. M.; Cruz, M. C. I.-d. l.; Sanz-Rodríguez, F.; Juarranz, A.; Chen, F.; Vetrone, F.; Capobianco, J. A.; Solé, J. G.; Bettinelli, M.; Jaque, D.; Speghini, A. NIR-to-NIR Two-Photon Excited CaF₂:Tm³⁺, Yb³⁺

- Nanoparticles: Multifunctional Nanoprobes for Highly Penetrating Fluorescence Bio-Imaging. *ACS Nano* **2011**, 11, 8665-8671.
- [23] Pichaandi, J.; Boyer, J.-C.; Delaney, K. R.; Veggel, F. C. J. M. v. Two-Photon Upconversion Laser (Scanning and Wide-Field) Microscopy Using Ln³⁺-Doped NaYF₄ Upconverting Nanocrystals: A Critical Evaluation of their Performance and Potential Bioimaging. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 19054-19064.
- [24] Chen, G.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanophotonics and Nanochemistry: Controlling the Excitation Dynamics for Frequency Up- and Down-Conversion in Lanthanide-Doped Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 1474-1486.
- [25] Chen, G.; Shen, J.; Ohulchanskyy, T. Y.; Patel, N. J.; Kutikov, A.; Li, Z.; Song, J.; Pandey, R. K.; Ågren, H.; Prasad, P. N.; Han, G. (α-NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ Core/Shell Nanoparticles with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Upconversion for High-Contrast Deep Tissue Bioimaging. *ACS Nano* **2012**, 6, 8280-8287.
- [26] Li, C.; Lin, J. Rare earth fluoride nano-/microcrystals: synthesis, surface modification and application. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 6831-6847.
- [27] Rocha, U.; Silva, C. J. d.; Silva, W. F.; Guedes, I.; Benayas, A.; Maestro, L. M.; Elias, M. A.; Bovero, E.; Veggel, F. C. J. M. v.; Solé, J. G.; Jaque, D. Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, 7, 1188-1199.
- [28] Chen, G.; Ohulchanskyy, T. Y.; Liu, S.; Law, W.-C.; Wu, F.; Swihart, M. T.; Ågren, H.; Prasad, P. N. Core/Shell NaGdF₄:Nd³⁺/NaGdF₄ Nanocrystals with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Downconversion Photoluminescence for Bioimaging Applications. *ACS Nano* **2012**, 6, 2969-2977.
- [29] Chen, G.; Shen, J.; Ohulchanskyy, T. Y.; Patel, N. J.; Kutikov, A.; Li, Z.; Song, J.; Pandey, R. K.; Ågren, H.; Prasad, P. N.; Han, G. (α-NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ Core/Shell Nanoparticles with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Upconversion for High-Contrast Deep Tissue Bioimaging. *ACS Nano* **2012**, 6, 8280-8287.
- [30] Chen, C.; Lu, J. Q.; Ding, H.; Jacobs, K. M.; Du, Y.; Hu, X.-H. A Primary Method for Determination of Optical Parameters of Turbid Samples and Application to Intralipid Between 550 and 1630nm. *Opt. Expr.* **2006**, 14, 7420-7435.
- [31] O'Connell, M. J.; Bachilo, S. M.; Huffman, C. B.; Moore, V. C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Rialon, K. L.; Boul, P. J.; Noon, W. H.; Kittrell, C.; Ma, J.; Hauge, R. H.; Weisman, R. B.; Smalley, R. E. Band Gap Fluorescence from Individual Single-Walled Carbon Nanotubes. *Science* **2002**, 297, 593-596.
- [32] Choi, J. H.; Nguyen, F. T.; Barone, P. W.; Heller, D. A.; Moll, A. E.; Patel, D.; Boppart, S. A.; Strano, M. S. Multimodal Biomedical Imaging with Asymmetric Single-Walled Carbon Nanotube/Iron Oxide Nanoparticle Complexes. *Nano Lett.* **2007**, 7, 861-867.
- [33] Kodach, V. M.; Kalkman, J.; Faber, D. J.; Leeuwen, T. G. v. Quantitative Comparison of the OCT Imaging Depth at 1300 nm and 1600 nm. *Biomed. Opt. Express* **2010**, 1, 176-185.

- [34] Welsher, K.; Sherlock, S. P.; Dai, H. Deep-Tissue Anatomical Imaging of Mice Using Carbon Nanotube Fluorophores in the Second Near-Infrared Window. *PNAS* **2011**, 108, 8943-8948.
- [35] Yi, H.; Ghosh, D.; Ham, M.-H.; Qi, J.; Barone, P. W.; Strano, M. S.; Belcher, A. M. M13 Phage-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes: As Nanoprobes for Second Near-Infrared Window Fluorescence Imaging of Targeted Tumors. *Nano Lett.* **2012**, 12, 1176–1183.
- [36] Hong, G.; Robinson, J. T.; Zhang, Y.; Diao, S.; Antaris, A. L.; Wang, Q.; Dai, H. In Vivo Fluorescence Imaging with Ag₂S Quantum Dots in the Second Near-Infrared Region. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 9818-9821.
- [37] Semonin, O. E.; Johnson, J. C.; Luther, J. M.; Midgett, A. G.; Nozik, A. J.; Beard, M. C. Absolute Photoluminescence Quantum Yields of IR-26 Dye, PbS, and PbSe Quantum Dots. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 2445–2450.
- [38] Bunzli, J.-C. G.; Piguet, C. Taking Advantage of Luminescent Lanthanide Ions. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 1048–1077.
- [39] Jones, A. P.; Wall, F. Rare earth minerals: chemistry, origin, and ore deposits. *Chapman and Hall: London* **1996**.
- [40] Weast, R. C. CRC Handbook of Chemistry and Physics (64th Edition - 1983-1984). *Baco Raton Florida, USA*.
- [41] Urquhart, P. Review of Rare Earth doped Fibre lasers and Amplifiers, . *IEE Proc. J. Optoelectronics* **1988**, 135, 385-407.
- [42] Wybourne, B. G. Spectroscopic Properties of Rare Earths. *Interscience Publ., New York: Wiley and Sons, Int.* **1965**.
- [43] Mayer, M. G. Rare-earth and Transuranic Elements. *Phys. Rev.* **1941**, 60, 184–187.
- [44] Li, Q.-P.; Yan, B. Multi-walled Carbon Nanotube-based Ternary Rare Earth (Eu³⁺, Tb³⁺) hybrid Materials with Organically Modified Silica–Oxygen Bridge. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, 380, 67-74.
- [45] Kenyon, J. A. Recent Developments in Rare-Earth Doped Materials for Optoelectronics. *Prog. Quant. Electron.* **2002**.
- [46] Cao, G. Nanostructures and Nanomaterials. *World Scientific Publishing Company* **2004**.
- [47] Wyborne, B. G. Spectroscopic Properties of Rare Earths. *New York: John Wiley & Sons* **1965**.
- [48] Carnall, W. T.; Goodman, G. L.; Rajnak, K.; Rana, R. S. A Systematic Analysis of the Spectra of the Lanthanides Doped into Single Crystal LaF₃. *Argonne National Laboratory* **1988**.
- [49] Snitzer, E. Optical Maser Action of Nd⁺³ in a Barium Crown Glass. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, 7, 444 - 446.
- [50] Campbell, J. H.; Suratwala, T. I. Nd-Doped Phosphate Glasses for High-Energy/high-Peak-Power Lasers. *J. Non-Cryst. Solids* **2000**, 263&264, 318 - 341.

- [51] Asawa, C. K.; Robinson M. Temperature-dependent concentration quenching of fluorescence by cross relaxation of Nd³⁺ in LaF₃. *Phys. Rev.* **1966** 141, 251–258.
- [52] Moncorge, R. Nd Doped Crystals for Medical Laser Applications. *Opt. Mater.* **1997**, 8, 109-119.
- [53] Tanabe, S. Optical transitions of rare earth for amplifiers: how the local structure works in glass. *J. Non-Crys. Solids* **1999**,259, 1-9.
- [54] Crosswhite, H. M.; Crosswhite, H. Parametric Model fo *f*-shell. I. The effective-operator Hamiltanian. *J. Opt. Soc. Am. B* **1984**, 1, 246–254.
- [55] Dieke, G. H. Spectra and Energy Levels of Rare Earth Ions in Crystals, . *Wiley, New York* **1968**.
- [56] Wybourne, B. G. Spectroscopic Properties of Rare Earths *Interscience, New York* **1965**.
- [57] Judd, B. R. Operator Techniques in Atomic Spectroscopy. *McGraw-Hill, New York* **1963**.
- [58] Carnall, W. T.; Goodman, G. L.; Rajnak, K.; Rana, R. S. A systematic of the Spectra of the Lanthanides Doped into Single Crystals LaF₃. *J. Chem. Phys.* **1989**, 90, 3443–3457.
- [59] Blasse, G.; Grabmaier, B. C. Luminescent Materials. *Springer-Verlag, Berlin* **1994**.
- [60] Hufner, S. Optical Spectra of Transparent Rare Earth Compounds,. *Academic Press, New York* **1978**.
- [61] Liu, G.; Jacquier, B. Spectroscopic Properties of Rare Earths in Optical Materials. *Springer, Berlin* **2005**.
- [62] Bunzli, J.-C. G.; Eliseeva, S. V. Intriguing aspects of lanthanide luminescence. *Chem. Sci* **2013**, 4, 1939–1949.
- [63] Liu, Y.; Tu, D.; Zhuab, H.; Chen, X. Lanthanide-doped Luminescent Nanoprobes: Controlled Synthesis, Optical Spectroscopy, and Bioapplications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6924–6958.
- [64] Maestro, L. M.; Ramíres-Hernández, J. E.; Bogdan, N.; Capobianco, J. A.; Vetrone, F.; Solé, J. G.; Jaque, D. Deep Tissue Bio-Imaging Using Two-Photon Excited CdTe Fluorescent Quantum Dots Working within the Biological Window. *Nanoscale* **2012**, 4, 298-302.
- [65] Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Third Edition ed. Springer: Baltimore, MD* **2006**, 955.
- [66] Klostranec, J. M.; Chan, W. C. W. Quantum Dots in Biological and Biomedical research: Recent Progress and Present challenges. *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1953-1964.
- [67] Maestro, L. M.; Jacinto, C.; Rocha, U.; Cruz, M. C. I.-d. I.; Sanz-Rodriguez, F.; Juarranz, A.; Solé, J. G.; Jaque, D. Optimum Quantum Dot size for Highly Efficient Fluorescence Bioimaging. *J. Appl. Phys.* **2012**, 111, 023513.

- [68] Biju, V.; Itoh, T.; Anas, A.; Sujith, A.; Ishikawa, M. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 2469-2495.
- [69] Diamente, P. R.; Veggel, F. C. J. M. v. Water-soluble Ln(³⁺)-doped LaF₃ Nanoparticles: Retention of Strong Luminescence and Potential as Biolabels. *J. Fluoresc.* **2005**, 15, 543-551.
- [70] Wang, F.; Zhang, Y.; Fan, X.; Wan, M. Facile Synthesis of Water-soluble LaF₃:Ln³⁺ Nanocrystals. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 1031–1034.

3 PROPRIEDADES ÓPTICAS DOS TECIDOS BIOLÓGICOS E MODALIDADES DE IMAGIAMENTO

Técnicas baseadas no uso da fotônica para diagnósticos e terapias a nível clínico cada vez mais tem cativado os pesquisadores, por serem não invasivas e de baixo custo. O sucesso de muitas dessas técnicas vem do fato do bom entendimento da interação da luz-tecido. A forma de como a luz irá interagir com um determinado tecido biológico dependerá das características e parâmetros da fonte de luz incidente (por exemplo, comprimento de onda, taxa de fluência e tempo de irradiação) como também das propriedades ópticas dos tecidos (esta varia de tecido para tecido). Neste capítulo discutiremos os fenômenos básicos, tais como, refração e reflexão, absorção, espalhamento e autofluorescência que surgem devido à interação luz-matéria (tecido biológico). Em seguida, serão tratadas as características das técnicas de imagiamento, com particular interesse no imagiamento óptico por fluorescência.

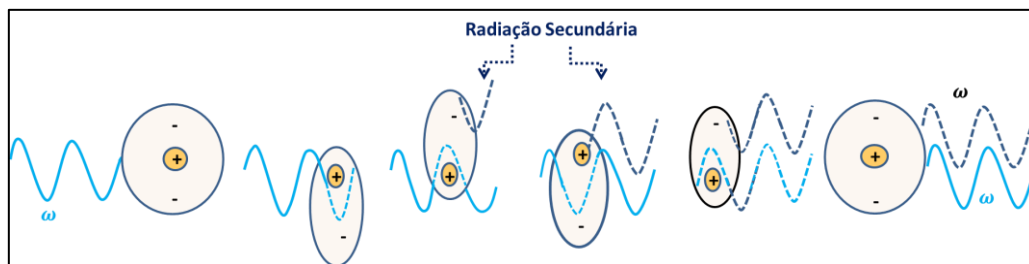
3.1 Representação Clássica da Interação Luz-Matéria

Para entendermos o modo como a luz se propaga dentro de um tecido devemos primeiro compreender as interações básicas da luz com a matéria. As quantidades macroscópicas que podem ser mensuradas, tais como, a seção transversal de absorção e o espalhamento surgem devido à propagação da onda eletromagnética num dado material (tais como, átomos, moléculas, íons, elétrons livres ou ligados à átomos do material e outros). De fato, quando há ondas eletromagnéticas propagando-se num dado material, uma parcela da energia eletromagnética da onda é absorvida e pode ser transformada em outra forma de energia, como por exemplo, vibracional (calor) e translacional. Além disso, essa absorção pode ocorrer de forma diferente quando ondas de frequências diferentes propagam-se no material, de modo a ocorrer o fenômeno da dispersão. Nesse caso, as grandezas que caracterizam o material, μ e ϵ , assim como a velocidade da onda (\vec{v}), passam a depender da frequência da onda incidente, uma vez que \vec{v} é definida pelas grandezas μ e ϵ . O meio nesse caso é chamado de dispersivo.

Para estudar a absorção e a dispersão que ocorrem com as ondas eletromagnéticas, podemos considerar um modelo simples clássico para interação entre as ondas e os átomos ou moléculas do meio. Tal modelo é conhecido como modelo de

Lorentz, desenvolvido por H. A. Lorentz por volta de 1900 e é um dos modelos mais usados pela teoria eletromagnética. Esse modelo consiste em considerar os elétrons do material como osciladores harmônicos forçados pelo campo eletromagnético da onda incidente. Ele prediz que o dipolo oscilante irá gerar uma radiação secundária, ou seja, o dipolo irá irradiar e espalhar luz na mesma frequência do campo incidente. A distribuição da energia desta radiação secundária dependerá da magnitude do momento de dipolo gerado. A Figura 5 ilustra essa situação.

Figura 5: Descrição da interação de uma onda eletromagnética com a matéria segundo o modelo de Lorentz, mostrando que a energia é transferida a partir da radiação incidente para o átomo, criando um momento de dipolo, o qual re-irradia denominado como radiação secundária. Dependendo do meio (das propriedades da matéria) o dipolo irá emitir diferente tipo de radiação.



Fonte: Autor, 2014.

Além disso, quando consideramos a interação da luz com um “bulk”, como um agregado de moléculas com uma escala de tamanho comparável ou de maior comprimento da onda incidente ocorre também os fenômenos da reflexão e refração.

A resposta óptica do meio em relação à propagação da luz através dele pode ser descrita pelo índice de refração, n , o qual determina a fase e a velocidade de propagação da onda. Podemos relacionar o índice de refração com a susceptibilidade linear χ pela relação (para meios onde a polarizabilidade é linear, sendo dada por $P = \chi E$):

$$n^2 \approx 1 + \chi/\epsilon_0 \quad (3.1)$$

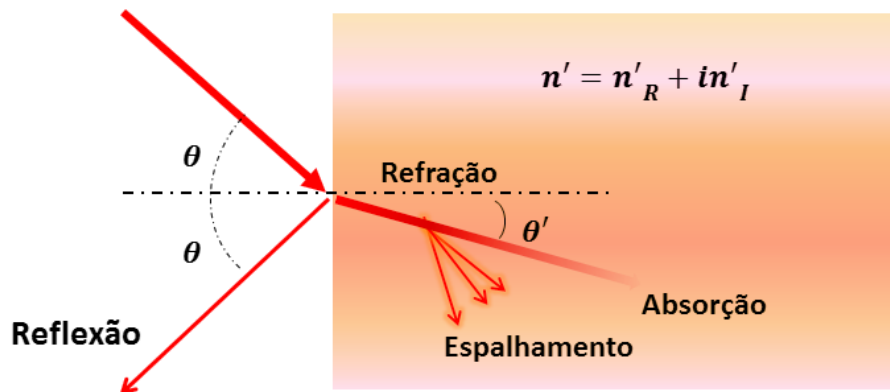
O índice de refração n em alguns casos (perto e de ressonância) torna-se uma quantidade complexo dada por:

$$n = n_R + in_I \quad (3.2)$$

A parte real, n_R , determina a refração e dispersão, enquanto que a parte imaginária, n_I , descreve o fenômeno da absorção de luz em um meio. A Figura 6 representa vários processos quando a luz entra em contato com um meio (tal como o ar) e outro meio (tal como um meio material) de interesse. A reflexão na interface entre os dois meios (por exemplo, ar e tecido) e a refração (mudança do ângulo de propagação do raio de luz quando ela passa de um meio para outro com diferente índice de refração) são governados pela lei de Fresnel. A propagação do feixe de luz do ar para o meio (por exemplo, o tecido) com índice de refração n' , a reflectância R (razão entre as intensidades da luz refletida e incidente), é dado como (para o caso de uma incidência normal, $\theta = 0$).

$$R = \left(\frac{n'_R - 1}{n'_R + 1} \right)^2 \quad (3.3)$$

Figura 6: Propagação de um raio de luz de um meio (ar) para outro meio (por exemplo, um tecido biológico).



Fonte: Autor, 2014.

Para uma superfície lisa e plana, o feixe de luz refletido tem o mesmo ângulo do feixe incidente. O comportamento da refração é dado pela lei de Snell, onde n e n' são os índices do meio de incidência e de interesse, respectivamente.

$$n \sin \theta = n' \sin \theta' \quad (3.4)$$

O comportamento da absorção e do espalhamento da luz serão discutidos nas próximas seções.

3.1.1 Absorção

O coeficiente de absorção $\alpha_{abs}(\lambda)$ é definido como a probabilidade de um fóton ser absorvido em um dado meio por unidade de comprimento (mm^{-1} ou cm^{-1}). Segue que o inverso de $\alpha_a(\lambda)$,

$$l_a = \frac{1}{\alpha_{abs}} \quad (3.5)$$

é chamado de absorção do caminho livre médio, ou absorção do caminho óptico, representando a distância média que um fóton viaja antes de ser absorvido, ou seja, a distância necessária para a intensidade da radiação incidente decrescer de um fator de $1/e$ do seu valor original. O coeficiente de absorção também pode ser expresso em termos da densidade de partículas, ρ , (densidade de volume) e da seção de choque de absorção, σ_{abs} ,

$$\alpha_{abs}(\lambda) = \rho\sigma_{abs} \quad (3.6)$$

Para meio homogêneo e não espalhador, o coeficiente de absorção é definido pela seguinte relação:

$$dI = -\alpha_{abs}(\lambda)I dz \quad (3.6)$$

onde dI é a variação diferencial da intensidade do feixe de luz colimado (I) percorrendo um caminho infinitesimal dz através de um meio homogêneo com coeficiente de absorção $\alpha_{abs}(\lambda)$. Se integrarmos a expressão (3.6) sobre toda a espessura o produto será a lei de Beer Lambert dado por:

$$I_{(z)} = I_0 e^{-\alpha_{abs}(\lambda)z} \quad (3.7)$$

sendo z a distância percorrida pela luz no meio. I_0 é a intensidade da luz em $z = 0$ e $I_{(z)}$ é a intensidade (W/cm^2) da luz atenuada pela absorção [1]. A qual pode ser expressa como:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon(\lambda)Cz} \quad (3.8)$$

onde $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de extinção molar em cm^{-1} (moles/litro) $^{-1}$ com comprimento de onda λ , C é dado em (moles/litros) é a concentração molar das espécimes absorvedoras, e z é a espessura em unidade de comprimento (cm, mm ou m). O coeficiente de extinção molar é a medida da potencia absorvida dada por $\varepsilon(\lambda) = \alpha_{abs}/C$.

3.1.2 Espalhamento

Quando um material é irradiado por uma onda eletromagnética, as cargas elétricas presentes neste material são postas em movimento oscilatório pelo campo elétrico da onda incidente. A aceleração das cargas re-irradia a energia eletromagnética em todas as direções, gerando uma radiação secundária. Esta radiação secundária é chamada de radiação espalhada pelo material. Se a frequência da luz espalhada é a mesma frequência da luz incidente, ocorre então o espalhamento elástico, mas se a frequência da onda incidente é diferente da onda espalhada ocorre o espalhamento inelástico. Já para o caso onde a energia eletromagnética é transformada em energia térmica, ocorre o fenômeno da absorção. Os fenômenos de espalhamento e absorção não são processos independentes, entretanto, dependendo da situação, um destes eventos pode ser mais proeminente do que o outro.

O espalhamento óptico é causado pela não homogeneidade do índice de refração de um determinado meio. A distribuição espacial e de intensidade da luz espalhada depende do tamanho e da forma do meio espalhador (de como ele afeta o comprimento de onda óptico) e da divergência do índice de refração. Na prática o espalhamento pode ser classificado em duas categorias: (1) O limite Rayleigh para o caso no qual o raio das partículas espalhadoras é considerado menor do que o comprimento de onda, λ , da luz incidente. Neste caso, o padrão de dispersão (espalhamento) é isotrópico, ou seja, independente do ângulo de espalhamento; (2) O regime Mie, quando o tamanho do dispersor é comparável ao comprimento de onda da luz incidente, por exemplo, quando uma partícula com tamanho maior do que micrometro é iluminada por uma fonte de radiação UV ou IV. Temos que no regime Mie a intensidade da luz espalhada cresce para menores comprimentos de onda sendo, aproximadamente, proporcional a λ^{-2} ; enquanto que no limite Rayleigh a intensidade da luz espalhada é proporcional a λ^{-4} .

De forma semelhante à absorção, podemos definir o coeficiente de espalhamento, α_{esp} , para um feixe de luz colimado:

$$I = I_0 e^{-\alpha_E(\lambda)z} \quad (3.9)$$

onde I é a componente da luz incidente (não espalhada) após percorrer uma amostra não absorvedora de comprimento z . Podemos ainda, escrever o coeficiente de espalhamento em termos da densidade de partículas, ρ , e da seção de choque de espalhamento, σ_{esp} ,

$$\alpha_{esp} = \rho\sigma_{esp} \quad (3.10)$$

Pode-se escrever, também, o caminho livre médio do espalhamento que representa a distância média que os fótons percorrem antes de serem espalhados, como $l_E = 1/\alpha_{esp}$ [1].

3.1.3 Meios Túrbidos

Nas seções anteriores consideramos dois eventos (absorção e espalhamento) separadamente. Contudo, os sistemas biológicos são complexos e compostos de uma grande variedade de elementos celulares e fluidos teciduais, de modo que grande parte dos tecidos biológicos engloba, simultaneamente, ambos os eventos. De modo que podemos determinar o *coeficiente total de extinção*, dado por:

$$\alpha_{ext} = \alpha_{abs} + \alpha_{esp} \quad (3.11)$$

Semelhantemente aos processos de absorção, a intensidade de atenuação total em um tecido pode ser descrita como

$$I(z) = I_0 e^{-(\alpha_{abs} + \alpha_{esp})z} \quad (3.12)$$

Nessa equação, $I(z)$ é a intensidade de luz em uma profundidade z do tecido biológico; I_0 é a intensidade incidente, α_{abs} coeficiente de absorção; α_{esp} coeficiente de espalhamento. Outro termo utilizado para descrever a transparência óptica de um tecido é a *profundidade de penetração óptica*, δ , definido como a distancia que a luz percorre dentro do tecido, até que sua intensidade caia por uma fração de $1/e$ ($= 0,37$) da intensidade original do feixe incidente I_0 . Da equação 3.12 podemos encontrar que a

profundidade de penetração δ , é igual a $\frac{1}{\alpha_{abs} + \alpha_{esp}}$. Portanto, a profundidade de penetração óptica é, principalmente, dependente do tipo de tecido, concentração celular, vascularização dos tecidos e do comprimento de onda da luz incidente [1].

3.2 Aspectos Fundamentais da Óptica dos Tecidos

Já é bem conhecido que quando a luz incide sobre a matéria (por exemplo, o tecido biológico) quatro efeitos, em princípio, podem modificar a forma de sua propagação: espalhamento, absorção, reflexão e refração [1]. De fato, a forma de como a luz irá interagir com um determinado tecido biológico dependerá das características e parâmetros da fonte de luz incidente (comprimento de onda, taxa de fluência e tempo de irradiação) como também das propriedades ópticas dos tecidos (e esta varia de tecido para tecido). No entanto, mesmo que cada tecido tenha o seu próprio espectro de absorção óptica, em geral, é possível aproximar as propriedades ópticas dos tecidos com as propriedades ópticas da água, devido ao fato de que mais de 70 % do corpo humano é constituído por água.

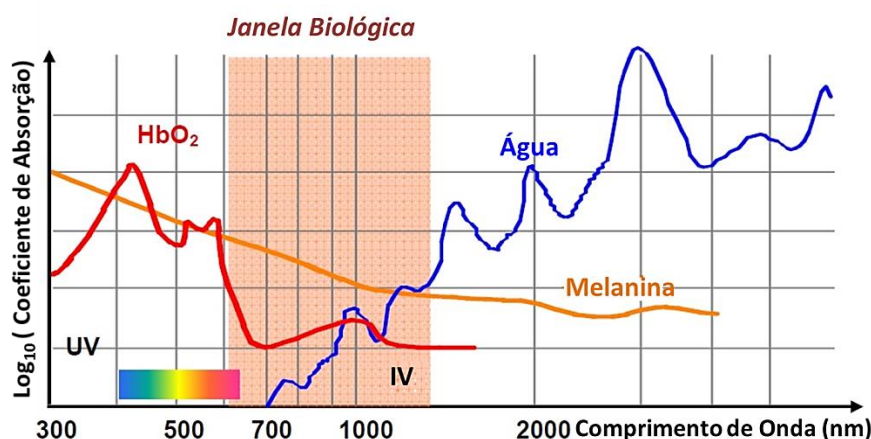
A água apresenta certa transmitância na região do visível e intensa banda de absorção na região do UV (< 300 nm) e do Infravermelho (IV) (> 2000 nm). De forma análoga os tecidos mostram marcantes bandas de absorção na região do UV e do IV. Vale ressaltar, que nos tecidos biológicos existem outros constituintes que também são responsáveis pela absorção. Os compostos responsáveis pela absorção dos tecidos biológicos são conhecidos como cromóforos. Cada cromóforo absorve em uma região espectral específica, determinando a intensidade da absorção em cada comprimento de onda (ou seja, do visível até o infravermelho). Por exemplo, o sangue exibe uma forte banda de absorção na região do visível devido à presença dos cromóforos, tais como, hemoglobina e melaninas. Não obstante, quando observamos o comportamento do tecido biológico “mole”, com respeito à absorção na região espectral do infravermelho (IV), os componentes mais absorvedores são as oxi-hemoglobina, desoxihaemoglobinas e a água, com o valor absoluto de α_{abs} , dependendo da concentração molar de cada componente.

Contudo a região espectral onde a absorção combinada dos compostos orgânicos e água são mínimas é denominada como *janela biológica* ou *janela terapêutica*. Há também a contribuição de outros cromóforos em menor intensidade, tais como a melanina, lipídios e etc. Um tecido "típico" tem 8% de volume de sangue e 29% de teor

de lípidos, logo o absorvedor dominante é a hemoglobina, sendo responsável de 39-64% da absorção total de comprimentos de onda IV [2]. A Figura 7 mostra os espectros de absorção dos cromóforos mais comuns [3].

No final da região do IV e da janela biológica, a penetração da luz é limitada pelas propriedades de absorção da água. Dentro da janela biológica o fenômeno do espalhamento é dominante sobre a absorção, de modo que a luz se propaga de forma difusa [1]. Portanto, a profundidade de penetração da luz em um tecido vivo é fortemente dependente do comprimento de onda utilizado, uma vez que as quantidades absorção e espalhamento dos tecidos dependem do comprimento de onda usado.

Figura 7: Coeficiente de absorção de alguns importantes cromóforos presentes no tecido biológico (neste caso a pele humana). Esta figura é uma adaptação da referência [3].



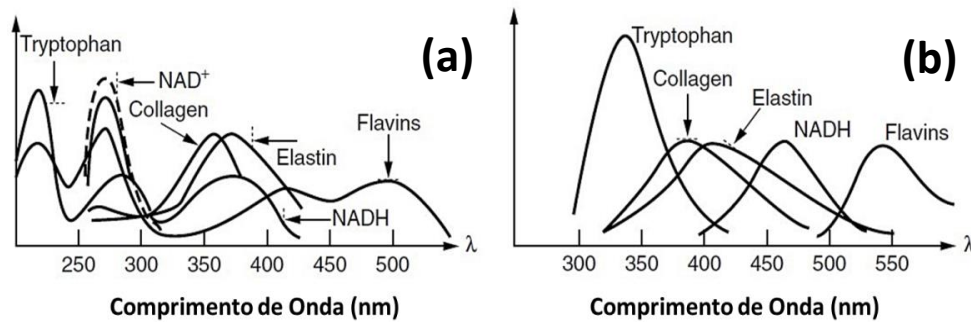
Fonte: Autor, Referência [3].

3.2.1 Autofluorescência

Sempre que o tecido absorve luz, existe uma possibilidade de que será emitida luz fluorescente, isto é de que ocorra a autofluorescência. A autofluorescência de tecidos biológicos é obtida a partir das moléculas fluorescentes endógenas (fluoróforos) [4]. Quase todos os tecidos biológicos apresentam emissão fluorescente quando excitados na região espectral do ultravioleta (UV) ao IV. Os fluoróforos endógenos mais importantes são os colágenos, elastina e NADH/NADPH (nicotinamida, adenina, dinucleotídeo e fosfato) [5, 6]. Além disso, as propriedades ópticas dos tecidos, como espalhamento e absorção, influenciam na forma e na intensidade do espectro da autofluorescência. A Figura 8 mostra o espectro de emissão e absorção de importantes

fluoróforos endógenos que são responsáveis pela autofluorescência observada em amostras típicas de tecidos [7].

Figura 8: Os espectros de absorção (a) e de emissão (b) de fluoróforos (tecidos importantes responsáveis por autofluorescência em solução aquosa). Adaptada da referência [6].



Fonte: Autor, Referência [6].

Como demonstrado na Figura 8, a absorção está na região espectral inferior a 500 nm, já os espectros fluorescentes estão localizados na região do azul e do verde. Evidentemente que quando um fóton é emitido por um fluoróforo ele estará sujeito aos fenômenos da absorção e espalhamento. O fenômeno da autofluorescência dos tecidos já foi exaustivamente explorado a fim de extrair padrões espectrais que indicam áreas de tecidos doentes (por exemplo, a intensidade da autofluorescência geralmente é reduzida devido à presença de um tumor quando comparada com o tecido sadio) [8, 9]. No entanto, quando se trata de imagens ópticas o fenômeno da autofluorescência é algo indesejável [6]. Para um estudo mais detalhado sobre a autofluorescência ver a referência [10].

3.2.2 Tecidos Sintéticos (Phantom Tissues)

Os tecidos sintéticos (também conhecidos como “*phantom tissues*”) são meios que simulam as propriedades ópticas dos tecidos biológicos. Atualmente, os tecidos sintéticos são utilizados para auxiliarem nos estudos e entendimentos da interação da luz com material biológico, por exemplo, monitorar a propagação da luz no tecido, absorção e espalhamento. De fato, tais materiais podem auxiliar na calibração e nos testes de desempenho dos equipamentos.

Existe uma grande variedade de tecidos sintéticos. Geralmente são soluções (ou gel) túrbidas constituídas de materiais absorvedores e espalhadores. Os meios absorvedores utilizados variam entre corantes moleculares, tinta (do mesmo tipo usado

em caneta esferográfica), células entre outros. Os espalhadores mais utilizados são as emulsões lipídicas (Intralipid® e leite), materiais orgânicos como soja e agar, como também alguns materiais inorgânicos (dióxido de titânio e alumina) [11-15].

Construir um tecido sintético ideal, que seja capaz de reproduzir/simular todas as propriedades ópticas de um tecido real, é quase impossível. Contudo, podemos ajustar alguns parâmetros, como a concentração, para as propriedades ópticas similares de diferentes tecidos reais em determinadas regiões espectrais.

3.3 Modalidades de Imagiamento

A primeira imagem médica foi obtida por volta de 1895 pelo físico alemão Wilhelm Röntgen logo após ter descoberto os raios-X. Röntgen fez uma imagem dos ossos da mão de sua esposa, Anna Bertha Roentgen (1839-1919), com seu anel de casamento. Tal descoberta deu início a um intenso desenvolvimento de novas técnicas de imagiamento a nível clínico [16, 17], como a tomografia computadorizada de raios-X, imagiamento por ressonância magnética (IRM), tomografia por emissão de pósitron, ultrassom e imagem óptica, que atualmente são ferramentas indispensáveis para o diagnóstico médico (ver Tabela 2). Essas tecnologias de aquisição de imagens diferem predominantemente uma da outra nos seguintes aspectos: resolução, profundidade de penetração, resolução temporal e na energia gasta para geração de imagens.

Imagem nuclear (Tomografia por Emissão de Pósitron - PET e Tomografia Computadorizada por Emissão de um Único Fóton - SPETC) é uma das modalidades de imagiamento molecular mais usada em aplicações clínicas. Neste caso, partículas emitindo raios- γ circulam dentro do corpo gerando o contraste necessário quando agregadas sobre o alvo desejado. Sem a necessidade de uma fonte de excitação externa. E, além disso, tem ilimitada profundidade de penetração nos sistemas biológicos (tecido). PET/SPETC tem conseguido imagens extremamente sensíveis por meio da detecção de pequenas concentrações de radionuclídeos, aproximadamente 10^{-11} moles/L [18]. Todavia, a modalidade de imagiamento nuclear sofre com algumas desvantagens, como: limitada resolução espacial (1 mm) a qual é determinada pela resolução do detector e sistema de aquisição de imagem; pouca resolução anatômica; exposição dos tecidos a radiação particularmente com potencial de dano elevado, especialmente para os rins por causa da farmacocinética; longo tempo de aquisição (de minutos a várias horas); a necessidade de acesso direto ou indireto ao ciclotron para facilitar o PET [19, 20].

Tabela 2: Visão geral das modalidades e imageamento. Tabela adaptada da referência [20].

Modalidades	Sinal (Energia detectada)	Resolução (µm)	Profundidade	Aplicação Ideal	Custos *
Imagem por Ressonância Magnética (IRM)	Ondas RF (radiação não ionizante)	10–100	Sem Limite	À avaliação anatômica, investigação fisiológica, eventos metabólicos, moleculares e genéticos.	\$\$\$
Tomografia por Emissão de Positrón (PET)	Raios-γ (radiação ionizante)	0.8–1,4	Sem Limite	Investigação fisiológica, eventos metabólicos, moleculares e genéticos.	\$\$\$
Tomografia Computadorizada por Emissão de um Único Fóton (SPETC)	Raios-γ (radiação ionizante)	0.8–1,4	Sem Limite	Investigação fisiológica, eventos metabólicos, moleculares e genéticos.	\$\$
Tomografia Computadorizada (TC)	Raios-X (radiação ionizante)	50	Sem Limite	À avaliação anatômica	\$\$
Ultrassom	Ondas de som (radiação não ionizante)	50	mm	À avaliação anatômica, investigação fisiológica, metabólicos, moleculares e genéticos.	\$\$
Imagem Óptica por Fluorescência	Ondas de luz (radiação não ionizante)	0,3	cm	Eventos metabólicos, moleculares e genéticos.	\$

Os símbolos representam aprox. \$ < 100,000; \$\$ 100–300,000; \$\$\$ 1–3 milhões de dólares (atualmente 1 dollar = 2,20 reais)

Fonte: Quek; Leong 2012.

Imagem por Ressonância Magnética (IRM) é uma técnica de imagiologia médica usada para visualizar a estrutura e as funções internas do corpo. Ela explora um fenômeno quântico bastante curioso, que ocorre em escala nuclear, e que foi descoberto de forma independente por Felix Bloch e Edward Purcell [21-23], logo após a segunda guerra mundial. Esse fenômeno trata-se, basicamente, da interação do átomo com um campo eletromagnético, isto é, quando uma determinada substância (ou tecido vivo) é colocada sob a ação de um campo magnético intenso a substância adquire uma leve magnetização, por conta do alinhamento dos seus spins nucleares com a direção do campo. Para a imagem ser gerada são aplicados sobre a amostra pulsos de radiofrequência (ou seja, um campo magnético menos intenso e oscilante) deslocando os spins da direção em que se encontravam predominantemente orientados, fazendo-os oscilarem entre estados de energia mais excitados e mais baixos, e dessa forma, a energia excedente é emitida na forma de energia eletromagnética. Essa energia ao ser detectada pelo equipamento é processada e convertida em uma imagem ou informação.

* Os principais átomos que compõe o tecido humano são: hidrogênio, oxigênio, carbono, fosforo, cálcio, flúor, sódio, potássio e nitrogênio.

regiões do corpo humano, devido ao fato de que cada átomo possui uma frequência de

ressonância diferente, para o mesmo campo magnético aplicado. IRM tem grande poder de penetração nos tecidos, não expõe o corpo a radiação ionizante, permite um mapeamento do corpo inteiro e possui um excelente contraste com tecidos mucosos. No entanto, muitas destas imagens não são sensíveis o suficiente para detectar os tumores malignos de menor porte, especialmente quando eles estão em sua fase inicial, pois a resolução das imagens RM é da ordem de 1 mm [23]. A baixa sensibilidade leva a um aumento no tempo de aquisição de dados e conseqüentemente do mapeamento, de aproximadamente 1 hora. Talvez esta seja a principal desvantagem do IRM. Outra desvantagem é o alto custo da infraestrutura.

Historicamente a descoberta dos raios-X e o seu uso na tomografia computadorizada para o diagnóstico clínico foi um marco na física e na medicina. Diferentemente de imagens por raios-X, na TC a fonte de “scaneamento” gira ao redor da amostra para produzir uma réplica tridimensional (3-D). As vantagens da TC inclui alta resolução espacial (1-2 mm) [24, 25], alta profundidade de penetração, possibilidade de imagem de corpo inteiro, aquisição de dados rápida e alta qualidade de dados da anatomia. As desvantagens da TC são a exposição a altos níveis de radiação (raios-X), baixa sensibilidade, baixo contraste e resolução de tecidos moles e tem sido moderadamente de alto custo [ver Tabela 2]. Devido a estas dificuldades e à falta de “agentes testes”, a aplicação de TC em imagem molecular ainda é muito limitada. A resolução real de uma imagem esta na faixa de 0,1 mm semelhantemente as imagens obtidas usando a técnica de raios-X.

As modalidades de imagem ópticas e de ultrassom (ou ultra-sonografia - US) são consideradas as mais seguras. A modalidade óptica será descrita na próxima seção. A história do US remonta a 1794, quando Lazzaro Spallanzini demonstrou que os morcegos se orientavam mais pela audição do que a visão para localizar os alimentos e obstáculos [26]. Em 1880 Jacques e Pierre Cuire deram uma contribuição valiosa para o estudo do US, descrevendo as características físicas de alguns cristais (piezoelectricidade). Já as pesquisas relacionadas a aplicações médicas se deu após o término da segunda guerra mundial. Um dos pioneiros foi Douglas Howry juntamente com W. Roderic Bliss, que em meados dos anos 50, construíram o primeiro sistema com finalidades médicas [26]. O imageamento por US é um dos métodos de diagnóstico mais versáteis, de aplicação relativamente simples e com excelente relação custo benefício. A geração da imagem está baseada na reflexão da onda incidente, por

exemplo, de órgãos internos de um corpo humano, com uma resolução relativamente baixa de faixa de 0,1 mm.

As vantagens de imagem por US incluem alta resolução espacial, baixo custo, o uso de radiação não ionizante, aquisição de imagens em tempo real e alta sensibilidade. Entretanto, para este método, o mapeamento do corpo inteiro não é possível e a qualidade da imagem depende muito da experiência do operador. A resolução da imagem por US depende da frequência que geralmente está situada entre 5 e 15 MHz [27]. A técnica de US também tem um potencial de aumentar a resposta inflamatória e aquecimento dos tecidos [28, 29]. Nessa modalidade, as NPs não são tão importantes, isto é, não desempenham um papel fundamental para o aperfeiçoamento desta técnica, devido ao fato da dificuldade de detecção de NPs (>1000 nm) pelo método de US, pois a frequência da onda de US deve aumentar até valores maiores do que 30 MHz.

3.3.1 Imagiamento Óptico por Fluorescência

Imagiamento óptico por fluorescência é uma das técnicas mais promissoras devido a sua superior sensibilidade, uso de brilho intenso, maior resolução, uma detecção mais rápida e a possibilidade do uso de inúmeros comprimentos de onda. A resolução do imagiamento por fluorescência pode ser comparada ao tamanho do agente de contraste utilizado tais como, nanopartículas luminescentes (variando de 1 a 100 nm) e fluoróforos (por exemplo, molécula orgânica). Além disso, esse é um método bastante versátil, onde a qualidade do contraste da imagem pode ser gerada através da modulação da intensidade, comprimento de onda, polarização, coerência, interferências, tempo de vida e efeitos não lineares. As vantagens deste método incluem: o uso de radiação não ionizante, a rápida aquisição de dados (poucos minutos) comparada em relação ao IRM, alta resolução espacial (da ordem de nanômetros), facilidade em análises quantitativas e alta sensibilidade (detectável para concentrações tão baixas quanto 10^{-8} moles/L) e miniaturização para o uso intracórporeo (endoscópico). Além disso, essa modalidade tem um menor custo quando comparada com as outras. Apesar de todas essas vantagens, o imagiamento óptico sofre com alguns inconvenientes, tais como, a profundidade de penetração (da ordem de cm) [30]. No entanto, quando o comprimento de onda adequado (na região espectral da primeira e segunda janelas biológicas) é usado, a profundidade de penetração é substancialmente positiva podendo alcançar regiões de estrutura molecular complexa, as quais não são acessíveis a outros agentes moleculares [32-34].

Existem inúmeras opções de imageamento óptico, de modo que podemos dividir nos seguintes grupos [31]:

- 1) Modalidades de imageamento microscópico: microscopia, microscopia confocal, microscopia por fluorescência e microscopia por multifóton;
- 2) Modalidades de imagens endoscópicas: endoscopia óptica e espectroscopia;
- 3) Tomografia por coerência óptica;
- 4) Imagem de reflectância difusa.

REFERÊNCIAS

- [1] Niemz, M. H. *Laser-Tissue Interactions. Springer-Verlag, Berlin 1996.*
- [2] Lim, Y. T.; Kim, S.; Nakayama, A.; Stott, N. E.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Selection of Quantum Dot Wavelengths for Biomedical Assays and Imaging. *Mol. Imaging* **2003**, 2, 50-64.
- [3]. J.-L.Boulnois. Photophysical Processes in Recent Medical Laser Developments: A Review. *Lasers Med. Sci.* **1986**, 1, 47-66.
- [4] Andersson-Engels, S.; Johansson, J.; Svanberg, K.; S.Svanberg. Fluorescence Imaging and Point Measurements of Tissue: Applications to the Demarcation of Malignant Tumors and Atherosclerotic Lesions from Normal Tissue. *Photochem. Photobiol.* **1991**, 53, 807-814.
- [5] Andersson-Engels, S.; Johansson, J.; Stenram, U.; Svanberg, K.; Svanberg, S. Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence. *IEEE J. Quant. Electr.* **1990**, 26, 2207-2217.
- [6] Frangioni, J. V. In vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 626-634.
- [7] Katz, A.; Alfano, R. R. Noninvasive Fluorescence-Based Instrumentation for Cancer and Precancer Detection and Screening, in G. E. Cohn, ed., In Vitro Diagnostic Instrumentation. *Proceedings of SPIE, Bellingham* **2000**, 3931, 223-226.
- [8] Andersson-Engels, S. K.; linteberg, C.; Svanberg, K.; Svanberg, S. In vivo Fluorescence Imaging for Tissue Diagnostics *Phys. Med. Biol.* **1997**, 42, 815 - 824.
- [9] Pogue, B. W.; Gibbs-Strauss, S.; Valdés, P. A.; Samkoe, K.; Roberts, D. W.; Paulsen, K. D. Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies. *Quantum Electron.* **2010**, 16, 493-505.
- [10] Prasad, P. N. Introduction to Biophotonics. *Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey* **2004**.

- [11] Cubeddu, R.; Pifferi, A.; Taroni, P.; Torricelli, A.; Valentini, G. Time-Resolved Imaging on a Realistic Tissue Phantom: μ_s' and μ_a Images versus Time-Integrated Images. *Appl. Opt* **1996**, 35, 4533-4540.
- [12] Madsen, S. J.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C. The Use of India Ink as an Optical Absorber in Tissue-Simulating Phantoms. *Phys. Med. Biol.* **1992**, 37, 985–993.
- [13] Kobayashi, M.; Ito, Y.; Sakauchi, N.; I.Oda; Konishi, I.; Tsunazawa, Y. Analysis of Nonlinear Relation for Skin Hemoglobin Imaging. *Opt. Express* **2001**, 9, 802–812.
- [14] Staveren, H. J. v.; Moes, C. J. M.; Marie, J. v.; Scott A. Prahl; Gemert, M. J. C. v. Light Scattering in Intralipid-10% in the Wavelength Range of 400 -1100 nm. *Appl. Opt.* **1991**, 30, 4507-4514.
- [15] Welsher, K.; Sherlock, S. P.; Dai, H. Deep-Tissue Anatomical Imaging of Mice Using Carbon Nanotube Fluorophores in the Second Near-Infrared Window. *PNAS* **2011**, 108, 8943-8948.
- [16] Rudin, M.; Weissleder, R. Molecular imaging in drug discovery and development. . *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 123-131.
- [17] Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. Molecular Imaging in Living Subjects: Seeing Fundamental Biological Processes in a New Light. *Gene. Dev.* **2003**, 17, 545-580.
- [18] Bugaj, J. E.; Achilefu, S.; Dorshow, R. B.; Rajagopalan, R. Novel Fluorescent Contrast Agents For Optical Imaging of In Vivo Tumors Based on a Receptor-Targeted Dye-Peptide Conjugate Platform *J. Biomed.Opt.* **2001**, 6, 122-133.
- [19] Debbage, P.; Jaschke, W. Molecular Imaging with Nanoparticles: Giant Roles for Dwarf Actors *Histochemistry and Cell Biology* **2008**, 130, 845 - 875.
- [20] Quek, C.-H.; Leong, K. W. Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in Vivo Optical Imaging. *Nanomaterials* **2012**, 2, 92-112.
- [21] Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37-38.
- [22] Bloch, F.; Hanson, W.; Packard, M. Nuclear Infracation. *Phys. Rev.* **1946**, 69, 127.
- [23] Geva, M. D. T. Magnetic Resonance Imaging: Historical Perspective. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* **2006**, 8, 573–580.
- [24] Worthy, S. High Resolution Computed Tomography of the Lungs. *British Medical J ournal* **1995**, 310, 615-616.
- [25] Herman, G. Fundamentals of Computerized Tomography: Image Reconstruction from Projection. *Springer, Berlin* **2009**.

- [26] Kane, D.; Grassi, W.; Sturrock, R.; Balint, P. V. A brief History of Musculoskeletal Ultrasound: 'From Bats and Ships to Babies and Hips'. *Rheumatology* **2004**, 43, 931–933.
- [27] Lindner, J. Evolving Applications for Contrast Ultrasound. *The American Journal of Cardiology* **2002**, 90, 72 - 80.
- [28] Speed, C. A. Therapeutic Ultrasound in Soft Tissue Lesions. *Rheumatology* **2001**, 40, 1331-1336.
- [29] Hangiandreou, N. J. AAPM/RSNA Physics Tutorial for Residents: Topics in US. *Radiographics* **2003**, 23, 1019-1033.
- [30] Quek, C.-H.; Leong, K. W. Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in Vivo Optical Imaging. *Nanomaterials* **2012**, 2, 92-112.
- [31] Dhawan, A. P.; D'Alessandro, B.; Fu, X. Optical Imaging Modalities for Biomedical Applications. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* **2010**, 3, 69 - 91.
- [32] Ang, L. Y.; Lim, M. E.; Ong, L. C.; Zhang, Y. Applications of Upconversion Nanoparticles in Imaging, Detection and Therapy. *Nanomedicine* **2011**, 6, 1273-1288.
- [33] Jacobsohn, L. G.; Sprinkle, K. B.; Kucera, C. J.; James, T. L.; Roberts, S. A.; Qian, H.; Yukihara, E. G.; DeVol, T. A.; Ballato, J. Synthesis, Luminescence and Scintillation of Rare Earth Doped Lanthanum Fluoride Nanoparticles. *Optical Materilas* **2010**, 33, 136–140.
- [34] Liu, Y.; Tu, D.; Zhuab, H.; Chen, X. Lanthanide-doped Luminescent Nanoprobes: Controlled Synthesis, Optical Spectroscopy, and Bioapplications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6924--6958.

4 TERMOMETRIA, NANOTERMOMETRIA E TERAPIA FOTOTÉRMICA

4.1 Primórdios da Termometria

Historicamente por meio dos seus sentidos o homem interage com o mundo físico que o cerca. A primeira noção de temperatura de um sistema foi estabelecida a partir da sensação térmica que o tato proporciona, comumente chamada pelos termos “quente”, “frio”, gelado etc. No decorrer dos tempos os conhecimentos empíricos de temperatura foram se acumulando até a presente época. Contudo, quando analisamos a temperatura em termos científicos, o critério sensitivo é bastante vago e impreciso. Além disso, se utilizarmos somente o sentido humano para mensurar a temperatura, seria possível distinguir somente entre o “mais frio” e o “mais quente” em relação a nossa própria temperatura corpórea. Este método, o uso do corpo humano, induz facilmente o observador ao erro.

Surge então a necessidade de estabelecer um instrumento padronizado de medida de temperatura que independa do sentido tato. Por volta de 300 a. C. Filo de Bizâncio construiu um instrumento para medir determinadas temperaturas, pouco mais de cem anos depois Ctésibo de Alexandria reinventou o instrumento utilizando um vidro em forma de “U” invertido posicionando reservatórios em cada extremidade. Em meados do século XVI este sistema foi melhorado pelo físico Galileu Galilei. Podemos dizer que Galileu realizava medições da temperatura de maneira indireta, ou seja, por comparação. Embora tivesse obtido resultados satisfatórios, o instrumento tinha sérios problemas, pois apresentava certa sensibilidade à variação da pressão atmosférica no local onde se encontrava, devido ao fato de ser um instrumento aberto ao meio exterior. Além disso, o líquido (sensor termométrico) evaporava com o tempo, tornando as leituras mais inexatas e não reprodutíveis.

Mais tarde, por volta do ano 1709, o físico Gabriel Fahrenheit, criou um termômetro a álcool com uma escala termométrica que variava entre 32° F (0° C) e os 212° F (100° C) muito mais confiáveis. Pouco tempo depois Fahrenheit percebeu que o mercúrio era mais uniforme que o álcool, construindo então o primeiro termômetro de mercúrio a vácuo. Este modelo revolucionou o sistema de medidas termométricas devido a sua precisão, reprodutibilidade e qualidade na construção do instrumento.

A finalidade do termômetro é medir a temperatura dos corpos e geralmente isso é feito por meio de comparações entre a variação de propriedades das substâncias como

volume, pressão, resistência elétrica, etc, em função da mudança da temperatura. Na construção de um termômetro, a sensibilidade é um parâmetro crucial que pode ser compreendido da seguinte forma: *i*) a rapidez da resposta do instrumento às variações de temperaturas, e *ii*) a capacidade de distinguir pequenas variações de temperatura. Dos vários tipos de termômetros existentes, um difere do outro apenas pela grandeza termométrica, por exemplo, termômetros de líquido, como os de mercúrios e etanol, onde a grandeza termométrica é o volume do líquido, que pode variar a sua altura ao longo da coluna em função das variações da temperatura. Essa relação não é linear, porém, para diferenças de temperaturas pequenas, a função termométrica se reduz a forma linear do tipo $t(x) = ax + b$. Onde t é a temperatura da substância utilizada, sendo modificada pela propriedade x da substância. As constantes a e b irão depender da substância utilizada e podem ser estimadas especificando dois pontos na escala de temperatura.

Relatos históricos por volta de 1611 indicam que o médico italiano Santorio (Sanctorius Santori da Capodistria, 1561-1636) adaptou o termoscópio idealizado por Galileu com a finalidade de determinar a temperatura do corpo humano. Tal instrumento é chamado de *termoscópio clínico*. Ele era robusto e demorava cerca de 20 min para realizar cada medida. O próprio Santorio relatou que os pacientes reclamavam do bulbo do termômetro. Tal inconveniente foi sanado por Thomas Clifford Albutt (1836-1925) em torno de 1866, que inventou o termômetro clínico de tamanho muito menor que o modelo utilizado por Santorio e outros. Além do menor tamanho, este novo instrumento demorava apenas cinco minutos para aferir a temperatura. O termômetro de Albutt dominou os consultórios por muito tempo, porém desde a década passada vem sendo substituído pelos termômetros digitais. No entanto, o uso de termômetros digitais para medir a temperatura local de sistema (eletrônicos, ópticos e biológicos) a micro e nanoescala é bastante limitado. Na próxima seção iremos discutir de forma mais detalhada a termometria a partir de materiais em micro e nanoescala.

4.2 Termometria em Micro e Nanoescala: Nanotermometria

A temperatura é uma das propriedades mais fundamentais da termodinâmica. Desde a primeira tentativa (por Galileu Galilei em 1593) de desenvolver uma escala numérica para o termômetro, a medição precisa da temperatura, com grande resolução espacial tem sido um tópico de pesquisa bastante desafiador. Avanços em nano e biotecnologia demandam uma termometria precisa, capaz de avaliar sistemas no regime

de micro e nanoescala (Nanotermometria), onde os métodos convencionais não são capazes de realizar medidas. O desenvolvimento de um Nanotermômetro não se trata apenas da miniaturização do tamanho, mas também da manipulação de novas propriedades físicas e químicas dos materiais, pelo fato dessas propriedades serem drasticamente alteradas em uma escala de comprimento tão reduzida [1]. De fato, a nanotermometria busca extrair o conhecimento da temperatura local de um dado sistema com uma resolução espacial sub-micrométrica. Tal conhecimento é necessário para o completo entendimento de sistemas micrométricos e nanoestruturados cuja dinâmica e desempenho dependem fortemente da temperatura. A atual tecnologia junto ao recente desenvolvimento da nanomedicina proporcionou o surgimento de um grande número desses sistemas [1-5]. O número de técnicas usadas para medir a temperatura é bastante extenso, por exemplo, medidas de fenômenos como termoeletricidade, temperatura dependente da resistência de condutores elétricos, fluorescência e características espectrais. Além disso, as medições da temperatura podem ser realizadas por meio de um contato direto com o meio, ou através de um método não invasivo (sem contato). Não é uma tarefa fácil enumerar todos os sistemas/campos (sendo quase impossível) que atualmente são explorados pela nanotermometria. Como primeira aproximação, podemos identificar três áreas que podem claramente fazer uso da nanotermometria e se beneficiar de modo significativo devido ao crescente desenvolvimento da nanotermometria com respeito a sensibilidades e resoluções mais altas: **micro/nano-eletrônica, fotônica integrada e biomedicina.**

Micro/nano-eletrônica - a miniaturização dos dispositivos eletrônicos e circuitos com suas comutações cada vez mais rápidas fazem do aquecimento localizado um problema fundamental. De fato, com a redução das dimensões dos canais de condução elétrica o aquecimento local, devido ao efeito Joule, não pode ser desprezado. Sendo assim, qualquer variação na resistência (por menor que seja) nos canais de condução, em sua maior parte sendo causada por uma modificação local da geometria dos micro/nano-condutores ou pela existência de espalhamentos devido a defeitos dentro dos mesmos, poderá levar ao surgimento de um “ponto quente”, ou seja, um aumento da temperatura em regiões bem localizadas. O conhecimento da localização exata de tais singularidades térmicas é de grande importância, a fim de evitar danos catastróficos e permanentes na estrutura do material [6]. Contudo, a determinação da magnitude e localização dessas singularidades térmicas, não é uma tarefa fácil, pois depende tanto da estrutura do dispositivo quanto da qualidade dos circuitos integrados.

Essas dificuldades tornam o uso da nanotermometria em micro/nano-eletrônica uma ferramenta importante para a detecção desses “pontos quentes” [7].

Fotônica Integrada (fotodispositivos) - neste caso a temperatura também é um parâmetro crítico, uma vez que o desempenho de muitos destes sistemas dependem das propriedades ópticas que constituem o material. Por exemplo, o controle da luz e a manipulação de muitos dispositivos fotônicos são feitos por meio de variações sub-micrométricas do índice de refração, o qual é uma propriedade física fortemente dependente da temperatura [7, 8]. De fato, a temperatura não afeta apenas o índice de refração, mas também o ganho óptico de lasers integrados, propriedades espectrais da estrutura dos “band-gap”, como também a eficiência de conversão óptica de conversores não lineares, tais como super-redes ópticas [9]. Neste contexto, podemos dizer que qualquer variação na temperatura local dentro dos dispositivos fotônicos integrados poderia afetar fortemente seu desempenho ou ainda, poderia levar a danos irreversíveis [10]. Portanto, o uso da nanotermometria para coletar conhecimentos de singularidades na temperatura induzidos durante o funcionamento de tais dispositivos é primordial para o desenvolvimento de equipamentos fotônicos integrados confiáveis, eficientes e mais completos, tornando então a nanotermometria uma ferramenta indispensável. Esta aplicação pode ser facilmente estendida para dispositivos baseados em fluidos-ópticos onde a luz é usada para manipular objetos da escala de micrometros (até mesmo espécies vivas), que estão propagando-se dentro de micro-fluidos através do uso de forças ópticas [5]. Neste caso, a absorção residual no comprimento de onda da radiação laser pode causar retenção de calor e, em última instância, levar ao mau funcionamento dos dispositivos devido ao aparecimento de correntes de convecção [11].

Biomedicina - é bem conhecido que em qualquer biosistema a temperatura desempenha um papel fundamental determinando suas propriedades e dinâmicas [12-15]. Por exemplo, a temperatura é um dos parâmetros críticos e determinantes nas taxas de divisão celular, reações enzimáticas, mudanças nas atividades metabólicas e na determinação da taxa de crescimento dos tecidos [15]. Sem dúvidas, a temperatura afeta drasticamente a mecânica, óptica e propriedades estruturais de importantes biomoléculas, semelhante às proteínas que podem sofrer processo de desnaturação, quando são expostas a condições diferentes àquelas que foram produzidas, tais como variações de temperatura (quando suas temperaturas elevam-se poucos graus acima de 37 °C), mudança no pH, entre outras [16]. Sendo assim, para o completo entendimento da dinâmica dos biosistemas, o monitoramento simultâneo de sua temperatura é

fundamental para elucidar a origem do comportamento observado. Logo, o interesse em compreender o comportamento térmico do biosistema é um ponto crucial para detecção prematura e tratamento de doenças. Geralmente uma das primeiras indicações de qualquer doença (tais como inflamações, câncer ou problemas cardíacos) é o surgimento de singularidades térmicas [17, 18]. De fato, células com câncer têm temperaturas mais altas em comparação com as células sadias devido ao aumento da atividade metabólica. Nesse caso as singularidades térmicas já podem ser detectadas e associadas a tumores incipientes (primeiros estágios), ou seja, possibilitando a sua detecção já com tamanhos abaixo de 1mm. Esta habilidade abre grandes oportunidades e perspectivas, pois a detecção do câncer com tal método constituiria um grande salto em comparação com as técnicas tradicionais de imageamento, tal como a tomografia, que detecta os tumores quando já estão com um tamanho de vários milímetros [19]. Isto é especialmente importante (até mesmo um sonho de muitos pesquisadores), pois a detecção prematura de tumores pode, por exemplo, aumentar o êxito da “cura” dessas enfermidades. O sensoriamento térmico de alta resolução também é necessário nos processos terapêuticos de câncer, tal como, hipertermia que é baseada na elevação da temperatura tumoral, induzida por uma fonte externa, até níveis citotóxicos (43-45 °C) [16, 20-23]. O aumento na temperatura pode ser feito de modo controlado a fim de minimizar os danos termicamente induzidos nos tecidos em torno da região tratada. Isso pode ser feito se a temperatura do tumor for continuamente monitorada (em tempo real), enquanto se realiza o tratamento por hipertermia de tal forma que ela passa a ser imediatamente interrompida quando a temperatura local alcançar níveis citotóxicos, evitando então aquecimentos excessivos e desnecessários. A construção de tal plataforma, de certa forma, pode ser considerada uma realidade devido aos avanços no campo da nanomedicina, pois atualmente os nanotermômetros são manufaturados com tamanhos bastante reduzidos (poucos nm) de modo a serem facilmente incorporados em tumores e células cancerosas podendo posteriormente fornecer informações térmicas de tais sistemas. Termometria em nanoescala busca, portanto, um novo padrão no uso de ambos, materiais e propriedades termométricas.

Devido à particularidade de cada sistema são necessários diferentes sensores térmicos para diferentes aplicações. Por exemplo, as características necessárias que um nanotermômetro deve possuir de forma a habilitá-lo a aplicações biológicas diferem bastante das características necessárias para dispositivos de fluidos-ópticos usados para o imageamento térmico. Em biomedicina, os nanotermômetros devem ser não tóxicos

(biocompatíveis), solúveis em água e muito estáveis sob a irradiação da luz, de forma a não liberar componentes tóxicos para o biosistema, mais precisamente para as células. As características mais populares dos nanotermômetros tem sido a miniaturização do tamanho geométrico dos termômetros convencionais, embora algumas alternativas sejam mais radicais. Exemplos de tal miniaturização contêm:

- Termômetros luminescentes baseados na dependência da temperatura com a intensidade da emissão e/ou tempo de vida de corantes, semicondutores tais como quantum dots, e Nanopartículas (NPs) dopadas com Ln^{3+} .
- Termômetros infravermelhos (IV) em nanoescala a partir de NPs metálicas baseados na radiação do corpo negro.
- Mapeamento por microscópicos térmicos baseados em Nanopartículas (NPs) dopadas com Ln^{3+} .

4.2.1 Termômetros Luminescentes

As limitações de termômetro de contato para trabalhar em escalas sub-micrométrica é bem conhecida, tais dificuldades levaram ao desenvolvimento de técnicas de termometria sem a necessidade de contato com o meio, tais como, termografia no infravermelho, termorefletância, interferometria óptica e luminescência.

Termografia no infravermelho – pelo fato de todos os corpos estarem a uma temperatura superior ao zero absoluto, eles emitem radiação térmica. Os sistemas de termografia no infravermelho captam essa radiação e convertem-na em uma imagem que representa a distribuição da temperatura na superfície do objeto observado [24, 25]. Podemos classificar esses sistemas como pontuais (por exemplo, o pirômetro que mede a temperatura em um dado ponto), lineares (scanners de linha, que fornecem o perfil da temperatura - mapa térmico) e superficiais (por exemplo, câmeras térmicas que são sistemas de formação de imagens térmicas em tempo real a partir da distribuição da temperatura superficial) [26-28]. Esses métodos têm sido aplicados em diversas áreas (médicas, industrial, construção civil, eletrônica, etc).

Termorefletância e interferometria óptica usam a luz refletida que fornece informações sobre o estado do aquecimento local do dispositivo ou estrutura.

Termorefletância – explora a dependência da temperatura com relação ao coeficiente de reflexão de um material (onde o índice de refração é dependente da temperatura), obtendo então um perfil da temperatura através da análise das imagens

formadas pela reflexão, no entanto, a resolução espacial é limitada pelo sistema de imageamento óptico do equipamento [29, 30].

Interferometria óptica – é baseada em medir a variação da radiação proporcionada pela superposição de dois feixes ópticos. Ela fornece informações da temperatura local como também realiza medidas precisas da expansão térmica ou deformação de uma dada superfície [31].

Entre os métodos de termometria sem contato, a determinação da temperatura a partir da dependência térmica da luminescência (tais como forma da banda, posição do pico, intensidade e tempo de vida dos estados excitados) tem atraído muito interesse, por ser uma técnica bastante precisa. Na próxima seção veremos de forma mais detalhada a nanotermometria a partir de materiais luminescentes.

4.2.2 Nanotermometria Luminescentes

Nanotermometria óptica é baseada nas análises das mudanças induzidas pela temperatura sobre as propriedades ópticas dos materiais luminescentes. Sem dúvida essa é uma técnica promissora para sensoriamento térmico em nanoescala [1]. Dentre os muitos sensores térmicos luminescentes existentes podemos citar os corantes orgânicos, polímeros, NPs metálicas, Quantum Dots, e nanomateriais dopados com íons Ln^{3+} [32-35]. Nesses casos, a avaliação da temperatura é feita por meio das medidas espectroscópicas (intensidade, forma da banda, posição espectral, polarização, tempo de vida e largura da banda, ver Figura 9) dos parâmetros caracterizam a luminescência dos nanosensores.

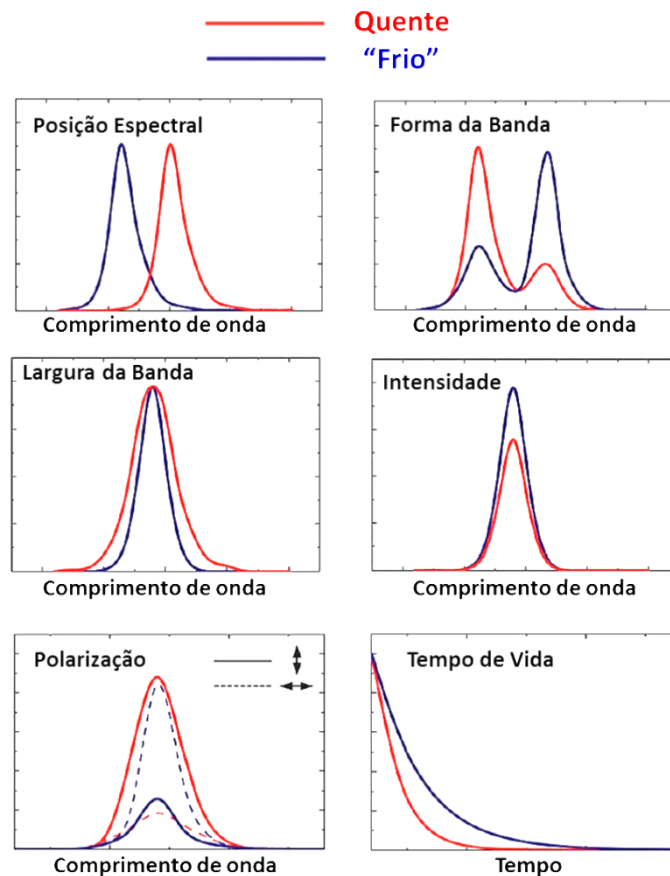
A Figura 9 também demonstra qualitativamente como o espectro de emissão de luminescência é afetado quando cada parâmetro é modificado devido a variação da temperatura local. Portanto, com base nessas características é possível delinear um subconjunto de definições para nanotermometria, tais como:

- *Nanotermometria baseada em intensidade de luminescência (NtIL)*: neste caso, o parâmetro térmico (a ser usado para o sensoriamento) é obtido através da análise da intensidade da luminescência. Quando ocorrem variações na temperatura, uma parcela do número total de fótons emitidos por segundo também muda, fazendo com que o espectro de emissão se torne menos (ou mais) intensas. Essas mudanças na intensidade da luminescência geralmente são causadas pela ativação térmica do processo de

quenching da luminescência e/ou devido ao aumento da probabilidade de decaimentos não radiativos.

- *Nanotermometria baseada na Forma da Banda de Luminescência (NtBL)*: Neste caso buscamos relacionar as intensidades relativas de diferentes linhas espectrais que compõem o espectro da luminescência. Em muitos casos a temperatura induz variações na forma da banda luminescente e em geral isso ocorre quando os estados eletrônicos dos quais as emissões estão sendo geradas são termicamente acoplados.

Figura 9: Representação dos possíveis efeitos causados pelo aumento da temperatura sobre a luminescência. As linhas vermelhas correspondem a altas temperaturas. Esta é uma adaptação da referência [5].



Fonte: Autor, referência [5].

- *Nanotermometria baseada na Posição dos Espectros de Luminescência (NtPEL)*: este método tem como base a análise da posição espectral das linhas de emissão, as quais são determinadas pelo “gap” de energia entre os dois níveis eletrônicos envolvidos nesse processo. Além disso, a variação da largura do gap de energia depende tanto da

temperatura como de outros parâmetros que fazem parte do processo de emissão do material, por exemplo, o índice de refração e as distâncias inter-atômicas (densidade). Sendo assim, as linhas, de emissão de qualquer material emissor são esperadas apresentarem dependência com a temperatura. De fato, *NtPEL* explora o deslocamento do espectro (shift espectral) de um dado material devido a variações na temperatura.

- *Nanotermometria baseada na Polarização da Luminescência (NtPL)*: em meios anisotrópicos a radiação emitida é geralmente polarizada de forma não isotrópica, e conseqüentemente a forma e intensidade da radiação emitida são fortemente dependentes da sua polarização. Este fato nos permite definir um parâmetro que iremos chamar de “anisotropia da polarização”, o qual é a razão entre a intensidade da luminescência emitida nos dois estados ortogonais da polarização. Em resumo, *NtPL* é baseada na influência da temperatura sobre a “anisotropia da polarização”.

- *Nanotermometria baseada na Largura de Banda da Luminescência (NtLBL)*: a largura de várias linhas de emissão, que fazem parte de um espectro de luminescência é determinada pelas propriedades do material (por exemplo, o grau de desordem dos átomos) como também da sua temperatura. Já é conhecido que muitos materiais luminescentes sofrem um aumento da temperatura local, devido ao aumento da densidade de fônons no material, contribuindo assim para o alargamento espectral não-homogêneo do espectro de luminescência. As variações na largura do espectro de luminescência são exploradas pela *NtLBL* a fim de realizar uma leitura térmica do meio.

- *Nanotermometria baseada no Tempo de Vida da Luminescência (NtTVL)*: o tempo de vida, τ_f , da luminescência é definido como o tempo que a intensidade da luminescência emitida é reduzida a $1/e$ do valor inicial. Este é um bom indicativo da probabilidade total de decaimento da intensidade emitida (de fato, esta probabilidade é definida como o inverso do tempo de vida da luminescência). A probabilidade de decaimento a partir dos níveis eletrônicos depende de um enorme número de fatores sendo que muitos deles apresentam certa dependência com a temperatura (como processos de transferência de energia assistido por fônons e decaimentos por multifônons). A dependência com a temperatura faz possível extrair (realizar) a leitura térmica a partir da determinação do tempo de vida.

Em resumo, a nanotermometria baseada na luminescência fornece muitas opções para monitorar a temperatura de um dado material, a partir das análises de espectros de emissão. É importante salientar que a sensibilidade térmica varia de sistema para sistema. Obviamente, a magnitude desse efeito depende de quão grande será a variação espectral induzida pela temperatura. Sistemas que mostram notáveis mudanças nas propriedades de luminescência quando submetidos a pequenas variações na temperatura são classificados como excelentes sensores térmicos, pois são dotados de grande sensibilidade térmica. Agora vamos levar nossa discussão em termos da resolução espacial na nanotermometria por luminescência (muitas vezes difícil de ser estimada) que é determinada pela resolução espacial na qual o espectro de emissão foi coletado.

Obter imagens por meio da luminescência com “*high resolution*” demanda que o volume ativo (volume luminescente) seja o menor possível, ou seja, se faz necessário que a aquisição do espectro de emissão de luminescência tenha “alta resolução espectral”. Um bom exemplo disso é o caso de um sistema luminescente constituído de centros de luminescência (tal como, NPsL) distribuídos de forma homogênea ao longo de toda sua extensão. Quando submetido ao mapeamento térmico (mediante a análise dos espectros de luminescência), a alta resolução poderá ser alcançada mediante o uso da microscopia confocal de luminescência (baseando-se no uso simultâneo/combinado de óptica com grande abertura numérica e filtros espectrais). Logo, o limite da resolução espacial admitido desse mapeamento térmico será limitado pelo tamanho das nanopartículas luminescentes.

4.3 Terapia Térmica – Hipertermia

Tratamentos térmicos são baseados em elevar a temperatura de uma parte ou do corpo como um todo a níveis acima de sua temperatura normal por um determinado período de tempo. No caso dos seres humanos, qualquer elevação de temperatura acima da temperatura normal do corpo (cerca de 37 °C) é geralmente considerada como um sinal negativo, uma vez que esse estado pode indicar a presença da doença (inflamações). Outro fato importante é que elevar a temperatura acima de 37 °C pode levar a danos irreversíveis e mesmo a falha fatal do órgão. No entanto, ao contrário do pensamento geral, os incrementos de temperatura controlada pode ter efeitos positivos em pacientes com uma doença em curso, como o câncer, como por exemplo, tratamentos térmicos via hipertermia.

O termo Hipertermia é uma combinação de duas palavras gregas: hiper (origem/elevação) e termo (calor) e refere-se ao aumento da temperatura do corpo ou de tecidos selecionados por um determinado período de tempo, ou seja, é um procedimento terapêutico usado para aumentar a temperatura de uma região do corpo afetada por alguma doença, principalmente o câncer [22]. Podemos dizer que esse método foi experimentado pela primeira vez por Hipócrates (460-370 a. C.), denominado por muitos como o pai da medicina, propondo que tratassem tumores superficiais por meio da cauterização com ferro quente [40]. Hipócrates acreditava que qualquer doença poderia ser curada através do aquecimento do corpo do paciente. De fato, o uso de altas temperaturas, como método de tratamento de várias doenças (incluindo células malignas) foi comum em tempos passados para várias culturas. Um bom exemplo é o do filósofo grego Parmênides (540 – 470 a. C.) que estava profundamente convencido da eficácia da hipertermia como pode ser evidenciado por suas palavras: “Dê-me o poder de produzir febre e vou curar todas as doenças”.

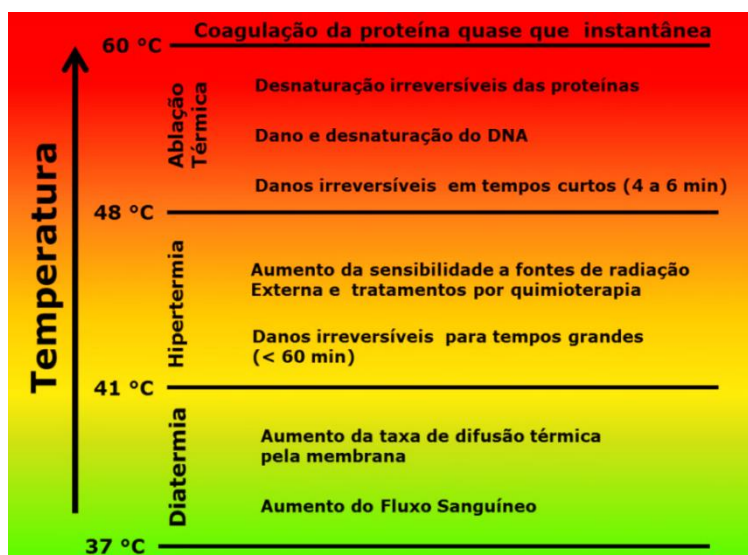
Os efeitos benéficos da terapia térmica no tratamento de câncer foram observados pela primeira vez no século 19. Pois foi neste século que o primeiro artigo sobre hipertermia foi publicado em 1866, por um cirurgião alemão Carl D. W. Busch (1826-1881). Onde descreveu o caso de uma mulher de 43 anos de idade, com um avançado sarcoma no rosto, que desapareceu depois de uma febre alta prolongada [41]. A descoberta de Busch foi de fundamental importância, porque foi o primeiro caso relatado, mostrando que a alta temperatura pode matar, seletivamente, as células cancerosas sem afetar as saudáveis. Mais tarde, nos anos de 1960, uma série de estudos bioquímicos envolvendo os efeitos da temperatura sobre as células normais e malignas (cancerosas) foram conduzidos usando células de roedores. Com base nessas observações os pesquisadores concluíram que as células cancerosas se mostraram mais sensíveis ao calor do que as células normais. Desde então a hipertermia vem se estabelecendo como uma modalidade de tratamento de tumores malignos ou profundamente enraizados, por meio da elevação da temperatura local entre 41 e 45 °C, por determinado período de tempo (geralmente 30 min., clinicamente comprovada). Ela pode ser aplicada, sozinha ou em combinação com outros procedimentos terapêuticos, como um tratamento alternativo. Quando células tumorais são submetidas a um tratamento de hipertermia os efeitos causados são fortemente dependentes da magnitude do aquecimento e duração do tratamento [42-44]. Se a temperatura da célula é elevada até a temperatura de 45 °C, o calor atua simultaneamente, processos de desnaturação de

proteínas e degradação celular, causando danos irreversíveis, levando até a morte celular (nesse caso as células morrem, por estarem vivendo em condições de hipoxia, ou seja, com baixa quantidade de oxigênio) [16, 23].

A modificação induzida pela temperatura não só leva a célula a morte, mas também (como já foi citado anteriormente) torna as células tumorais mais “sensíveis” a estímulos de fontes externas (por exemplo, radioterapia). Além disso, a combinação de drogas e aquecimento local também tem atraído grande atenção nos últimos anos. Quando a temperatura celular é elevada acima do nível normal (37 ° C) a sua resposta a certos fármacos é muito diferente do que o observado em condições normais. Por exemplo, as drogas cujo efeito terapêutico é baseado em reações químicas aconteceriam de forma mais eficiente e mais rápida em maiores temperatura (intervalos do tratamento por hipertermia) [12].

O método a ser aplicada para alcançar a hipertermia (ou outro tipo de tratamento térmico) controlada depende da natureza, do tamanho e localização da área a ser tratada. A Figura 10 mostra os tipos de tratamentos térmicos comumente utilizados em tumores cancerosos [45].

Figura 10: Esquema dos efeitos causados por diferentes tratamentos térmicos em função do aumento da temperatura.



Fonte: Autor, 2014.

No caso da hipertermia, quando os tumores, sob tratamento, estão localizados profundamente dentro dos tecidos (ou corpo), geralmente são utilizadas técnicas de

aquecimento por micro-ondas (ou radiofrequências) geradas a partir de micro-antenas. Por outro lado, quando os tumores estão superficialmente localizados, o tratamento por hipertermia pode ser feito utilizando ondas de baixa frequência (micro-ondas ou ondas de ultra-som) geradas a partir de uma fonte fora do corpo. Independentemente do método utilizado, o controle dinâmico sobre o incremento progressivo da temperatura induzida localmente deve ser feito de modo a manter a temperatura no nível desejado e, assim, evitar danos colaterais indesejáveis e irreversíveis nos tecidos vizinhos a região de tratamento [22, 46-49]. Esses efeitos (geralmente relacionados às mudanças induzidas pela temperatura na elasticidade dos tecidos e fluxo de sangue) são difíceis de prevêr (e modelar) [50, 51]. Portanto, o processo de aquecimento deve ser acompanhado por leitura térmica em tempo real, de modo que os parâmetros de aquecimento possam ser ajustados adequadamente, controlando, portanto, a temperatura final da área a ser tratada. Como será discutido com mais detalhes na próxima seção, alguns tipos de nanopartículas têm figurado como importantes candidatos para hipertermia local controlada.

4.3.1 Visão Geral: Nanopartículas para Terapias Fototérmicas e Nanopartículas Multifuncionais

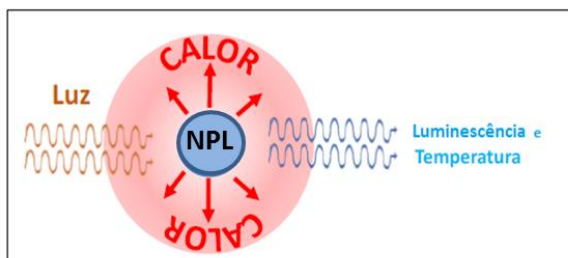
A nanotecnologia tem proporcionado interessantes alternativas para terapia fototérmicas. Em particular, o desenvolvimento de nanopartículas capazes de gerar calor durante a irradiação da luz laser tem atraído muita atenção nos últimos anos. De fato, o surgimento de NPs biocompatíveis [55-57] capazes de gerar calor (aquecerem) quando excitadas por uma fonte de radiação externa, tem revivido o interesse em terapias fototérmicas [52, 53] [58-63, 54]. Podemos dividir estes tipos de NPs em dois grupos, dependendo do mecanismo de excitação: (i) NPs Magnéticas (NPs-M), que são capazes de gerar calor quando em contato com campos magnéticos (não tratada nesta tese). (ii) NPs fototérmicas (NPs-Fts) capazes de gerar calor sob excitação óptica, isto é, converter luz (lazer) em calor [54, 64-73]. Nesta tese foram estudadas apenas NPs-Fts.

Uma das vantagens do uso de NPs-Fts é a possibilidade de serem combinadas com sistemas acoplados a fibra ópticas, facilitando a profundidade de penetração da excitação e detecção intracórpore, como também a liberação/geração de calor com mais precisão na região afetada. Além disso, elas também podem ser utilizadas em tratamentos de hipertermia intratecidos, mediante o uso de fontes de excitação óptica com comprimentos de onda que se encontram dentro das ditas *janelas biológicas*

(regiões espectrais, onde os tecidos humanos tornam-se parcialmente transparentes). Ao atuarem dentro da janela de transparência biológica, onde a atenuação do laser é minimizada, os tratamentos fototérmicos podem ser altamente seletivos, isto é, a terapia fototérmica induzida pela luz é produzida somente na região espacial onde as NPs-Fts foram introduzidas. Na literatura podemos encontrar, até agora, vários tipos de NPs-Fts, tais como nanopartículas metálicas, nanocristais semicondutores, nanocristais de grafeno e nanotubos de carbono [29, 70-72, 74-78]. Poucos trabalhos foram publicados na literatura sobre o uso de nanocristais dopados com íons terras-raras (NCs-TR) como NPs-Fts, e tais suspensões coloidais ainda não foram submetidas a testes de biocompatibilidade [79].

Certas NPs-TRs têm demonstrado ser sensores luminescentes altamente eficientes quando excitados com radiação IV dentro da região espectral das *janelas biológicas* [80-82]. Devido a este fato, NPs-TRs são hoje consideradas de grande potencial para bio-imagem florescentes (ver capítulo 6). Além disso, as NPs-TRs podem ser utilizadas para o bioimagem fluorescente de alta resolução (da ordem de nanômetros) utilizando fontes de laser CW; fontes muito mais simples e acessíveis em relação aos lasers de pulsos curtos necessários para excitar os tradicionais sensores fluorescentes usados em microscopia de fluorescência por multifóton (por exemplo, quantum dots semicondutores ou nanopartículas metálicas que requerem lasers IV com pulsos curtos) [83]. Como foi discutido anteriormente, NPs-TR, em alguns casos, apresentam a habilidade do sensoriamento térmico por luminescência (em especial NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$). Esta característica é de especial relevância, uma vez que poderia ser usada para o monitoramento térmico e, conseqüentemente, para o real controle do tempo das terapias foto-térmicas. A Figura 11 esquematiza as características de uma NP multifuncional (geradoras de calor e sondas térmicas, operando na janela biológica). Portanto, a demonstração de conversão eficiente de luz para calor de suspensões coloidais biocompatíveis multifuncionais de NPs-TRs abriria novos caminhos para realização do imageamento de fluorescência e tratamento de biosistemas simultaneamente.

Figura 11: Esquema conceitual das nanopaticulas usadas nessa tese, com características ópticas luminescentes, nanoaquecedoras e de nanotermômetros, para processos de termoterapia controlada.



Fonte: Autor, 2014.

REFERÊNCIAS

- [1] Lee, J.; Kotov, N. A. Thermometry Design at the Nanoscale. *Nanotoday* **2007**, 2, 48 - 51.
- [2] Brites, C. D. S.; Lima, P. P.; Silva, N. J. O.; Millán, A.; Amaral, V. S.; Palacio, F.; Carlos, L. D. Thermometry at the Nanoscale. *Nanoscale* **2012**, 4, 4799–4829.
- [3] Vetrone, F.; Naccache, R.; Fuente, A. J. d. I.; Sanz-Rodríguez, F.; Blazquez-Castro, A.; Rodriguez, E. M.; Jaque, D.; Solé, J. G.; Capobianco, J. A. Intracellular Imaging of HeLa Cells by Non-Functionalized NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺ Upconverting Nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, 2, 495–498.
- [4] Vetrone, F.; Naccache, R.; Zamarron, A.; Fuente, A. J. d. I.; Sanz-Rodríguez, F.; Maestro, L. M.; Rodriguez, E. M.; Jaque, D.; Sole, J. G.; Capobianco, J. A. Temperature Sensing Using Fluorescent Nanothermometers. *ACS Nano* **2010**, 4, 3254–3258.
- [5] Jaque, D.; Vetrone, F. Luminescence Nanothermometry. *Nanoscale* **2012**, 4301 – 4326.
- [6] Reda, S. Thermal and Power Characterization of Real Computing Devices. *IEEE Trans. Eng.* **2011**, 1, 76 - 87.
- [7] Volz, S. Thermal Nanosystems and Nanomaterials. *Springer: Topics in Applied Physics* **2009**, 118.
- [8] Jundt, D. H. Temperature-dependent Sellmeier Equation for the Index of Refraction, n_e , in Congruent Lithium Niobate. *Opt. Lett.* **1997**, 22, 1553 - 1555.
- [9] Romero, J. J.; Jaque, D.; Solé, J. G. a.; Kaminskii, A. A. Diffuse Multiself-Frequency Conversion Processes in the Blue and Green by Quasicylindrical Ferroelectric Domains in Nd³⁺:Sr_{0.6}Ba_{0.4}(NbO₃)₂ Laser Crystal. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78, 1961 - 1963.
- [10] Nenna, G.; Flaminio, G.; Fasolino, T.; Minarini, C.; Miscioscia, R.; Palumbo, D.; Pellegrino, M. A Study on Thermal Degradation of Organic LEDs Using IR Imaging. *Macromol. Symp.* **2007**, 247, 326 – 332.

- [11] Ebert, S.; Travis, K.; Lincoln, B.; Guck, J. Fluorescence Ratio Thermometry in a Microfluidic Dual-Beam Laser Trap. *Opt. Express* **2007**, 15, 15493-15499.
- [12] Itoh, Y.; Kazaoka, Y.; Nitta, M.; Yamada, Y.; Honda, N. Combining anti-tumor drugs with mild hyperthermia increases the cytotoxic effects of drugs on human leukemia cells in vitro. *Mol. Med. Rep.* **2009**, 2, 411–415.
- [13] Zohar, O.; Ikeda, M.; Shinagawa, H.; Inoue, H.; Nakamura, H.; Elbaum, D.; Alkon, D. L.; Yoshioka, T. Thermal Imaging of Receptor-Activated Heat Production in Single Cells. *Biophys. J.* **1998**, 74, 82–89.
- [14] Suzuki, M. T., V.; Oyama, K.; Ishiwata, S. . Microscopic Detection of Thermogenesis in a Single HeLa Cell. *Biophys. J.* **2007**, 92, L46–L48.
- [15] Tardieu, F.; Reymond, M.; Hamard, P.; Grainer, C.; Muller, B. Spatial Distributions of Expansion Rate, Cell Division Rate and Cell Size in Maize Leaves: A Synthesis of the Effects of Soil Water Status, Evaporative Demand and Temperature. *J. Exp. Bot.* **2000**, 51, 1505-1514.
- [16] Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Cri. Rev. Oncol. Hemat.* **2002**, 43, 33–56.
- [17] Sanchez, B. M.; Lesch, M.; Brammer, D.; Bove, S. E.; Thiel, M.; Kilgore, K. S. Use of a Portable Thermal Imaging Unit as a Rapid, Quantitative Method of Evaluating Inflammation and Experimental Arthritis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2008**, 57, 169-175.
- [18] Stark, A. M.; Way, S. The Use of Thermovision in the Detection of Early Breast Cancer. *Cancer* **1974**, 33, 1664 -1670.
- [19] Michaelson, J. S.; Satija, S.; Kopans, D.; Moore, R.; Silverstein, M.; Comegno, A.; Hughes, K.; Taghian, A.; Powell, S.; Smith, B. Gauging the Impact of Breast Carcinoma Screening in Terms of Tumor Size and Death Rate. *Cancer* **2003**, 98, 2114-2124.
- [20] Matsuda, H.; Sugimachi, K.; Kuwano, H. Hyperthermia, Tissue Microcirculation, and Temporarily Increased Thermosensitivity in VX2 Carcinoma in Rabbit Liver. *Cancer Res.* **1989**, 49, 2777-2782.
- [21] Cetas, T. C.; Connor, W. G. Thermometry Considerations in Localized Hyperthermia. *Med. Phys.* **1978**, 5, 79 - 91.
- [22] Habash, R. W. Y.; Bansal, R.; Krewski, D.; Alhafid, H. T. Thermal Therapy, Part 2: Hyperthermia Techniques. *CRC Crit. Rev. Bioeng.* **2006**, 34, 491–542.
- [23] Dewey, W. C. Arrhenius Relationships from the Molecule and Cell to the Clinic. *Int. J. Hyper.* **1994**, 10, 457–483.
- [24] Ulrickson, M. Superficial Thermography. *J. Vac. Sci. Technol. A* **1986**, 4, 1805 - 1809.
- [25] Barnes, R. B. Thermal Camera Utilizes Infrared Radiations. *Electrical Eng.* **1957**, 76, 1109 - 1111.
- [26] Teyssieux, D.; Thiery, L.; Cretin, B. Near-Infrared Thermography Using a Charge-Coupled Device Camera: Application to Microsystems. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, 78, 034902.

- [27] Fletcher, D. A.; Kino, G. S.; Goodson, K. E. Thermal Microscopy with A Microfabricated Solid Immersion Lens. *Microscale Thermophys. Eng.* **2003**, 7, 267–273.
- [28] Kennedy, D.; Lee, T.; Seely, D. A Comparative Review of Thermography as a Breast Screening Technique. *Integr. Can. Ther.* **2009**, 08, 9-16.
- [29] Cahilla, D. G.; Ford, W. K.; Goodson, K. E.; Mahan, G. D.; Majumdar, A.; Maris, H. J.; Merlin, R.; Phillpot, S. R. Nanoscale Thermal Transport. *J. Appl. Phys.* **2003**, 93, 793–818.
- [30] Tessier, G.; Bardoux, M.; Boue, C.; Fournier, D. Back Side Thermal Imaging of Integrated Circuits at High Spatial Resolution. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 90, 171112.
- [31] Asheghi, M.; Yang, Y. Micro- and Nano-Scale Diagnostic Techniques for Thermometry and Thermal Imaging of Microelectronic and Data Storage Devices, in *Microscale Diagnostic Techniques*. Ed. K. S. Breuer, Springer-Verlag, Berlin **2005**, 155-196.
- [32] Maestro, L. M.; Jacinto, C.; Silva, U. R.; Vetrone, F.; Capobianco, J. A.; Jaque, D.; Solé, J. G. CdTe Quantum Dots as Nanothermometers: Towards Highly Sensitive Thermal Imaging. *Small* **2011**, 7, 1774-1778.
- [33] Wawrzynczyk, D.; Bednarkiewicz, A.; Nyk, M.; Strek, W.; Samoc, M. Neodymium(III) Doped Fluoride Nanoparticles as Non-Contact Optical Temperature Sensors. *Nanoscale* **2012**, 4, 6959–6961.
- [34] Brites, C. D. S.; Lima, P. P.; Silva, N. J. O.; Milla, A.; Amaral, V. S.; Palaciob, F.; Carlos, L. D. Lanthanide-based Luminescent Molecular Thermometers. *New J. Chem.* **2011**, 35, 1177–1183.
- [35] Maestro, L. M.; Haro-González, P.; Coello, J. G.; Jaque, D. Absorption Efficiency of Gold Nanorods Determined by Quantum Dot Fluorescence Thermometry. *Appl. Phys. Lett.* **2012**, 100, 201110.
- [36] Imbuschand, G. F.; Henderson, B. *Optical Spectroscopy of Inorganic Solids*. Oxford Science Publications, London **2006**.
- [37] Mackowiak, P. A. Temperature Regulation and the Pathogenesis of Fever. *Principles and practice of infectious diseases* **2000**, 6, 703-718.
- [38] Wunderlich, C. A. On the temperature in diseases. *The New Sydenham Society*, **1871**.
- [39] O'Grady, N. P.; Barie, P. S.; Bartlett, J. G.; Bleck, T.; Garvey, G.; Jacobi, J.; Linden, P.; Maki, D. G.; Nam, M.; Pasculle, W. Practice Guidelines for Evaluating New Fever in Critically Ill Adult Patients. *Clin. Infect. Dis.* **1998**, 26, 1042-1059.
- [40] Soares, P.; Ferreira, I.; Igreja, R.; Novo, C.; Borges, J. Application of Hyperthermia for Cancer Treatment: Recent Patents Review. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* **2012**, 7, 64-73.
- [41] Vorst, A. V.; Rosen, A.; Kotsuka, Y. RF. Microwave Interaction with Biological Tissues. *Wiley-IEEE Press* **2006**.
- [42] Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Eckelt, L.; Feussner, A.; WaldÖFner, N.; Scholz, R.; Deger, S.; Wust, P.; Loening, S. A.; Jordan, A. Clinical

- Hyperthermia of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Presentation of a Interstitial Tchenique *Int. J. Hyper.* **2005**, 21, 637-647.
- [43] Marmor, J. B.; Pounds, D.; Postic, T. B.; Hahn, G. M. Treatment of Superficial Human Neoplasms by Local Hyperthermia Induced by Ultrasound. *Cancer* **1979**, 43, 188-197.
- [44] Zee, J. v. d.; González, D. G. Regional Hyperthermia for Rectal Cancer. *The Lancet* **2000**, 356, 772.
- [45] Zee, J. v. d. Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.* **2002**, 13, 1173–1184.
- [46] Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. The Cellular and Molecular Basis of Hyperthermia. *Cri. Rev. Oncol. Hemat.* **2002**, 43, 33–56.
- [47] Roti, J. L. R. Cellular Responses to Hyperthermia (40–46°C): Cell Killing and Molecular Events. *Int. J. Hyper.* **2008**, 24, 3 - 15.
- [48] Chicheł, A.; Skowronek, J.; Kubaszewska, M.; Kanikowski, M. Hyperthermia – Description of a Method and a Review of Clinical Applications. *Rep. Prac. Oncol. Radiother.* **2007**, 12, 267-275.
- [49] Burlaka, A.; Lukin, S.; Prylutska, S.; Remeniak, O.; Prylutskyy, Y.; Shuba, M.; Maksimenko, S.; Ritter, U.; Scharff, P. Hyperthermic Effect of Multi-Walled Carbon Nanotubes Stimulated with Near Infrared Irradiation for Anticancer Therapy: In Vitro Studies. *Exp. Oncol.* **2010**, 32, 48-50.
- [50] Song, C. W. Efect of Local Hyperthermiaon BlodFlowand Microenvironment: A Review. *Cancer Res.* **1984**, 44, 4721s-4730.
- [51] Chen, S. S.; Humphrey, J. D. Heat-Induced Changes in the Mechanics of a Collagenous Tissue. *J. Biomech.* **1997**, 31, 211-216.
- [52] Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Plasmonic Photothermal therapy (PPTT) Using gold Nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **2008**, 23, 217-228.
- [53] Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2115-2120.
- [54] Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Au Nanoparticles Target Cancer. *Nano Today* **2007**, 2, 18-29.
- [55] Riehemann, K.; Schneider, S. W.; Luger, T. A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. Nanomedicine--Challenge and Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.Engl.* **2009**, 48, 872-897.
- [56] Debasu, M. L.; Ananias, D.; I, P.-S.; Liz-Marzan, L. M.; Rocha, J.; Carlos, L. D. All-In-One Optical Heater Thermometer Nanoplateform Operative from 300 to 2000 K Based on Er³⁺ Emission Blackbody Radiation. *Adv. Materials* **2013**, 25, 4868-4874
- [57] Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schuth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int.l Ed. Engl.* **2007**, 46, 1222-1244

- [58] Colombo, M. et. al. Biological Application of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4306-4334.
- [59] Huang, H. S.; Hainfeld, J. F. Intravenous Magnetic Nanoparticle cancer Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2013**, 8, 2521–2532.
- [60] Bañobre-López, Manuel et al. Magnetic Nanoparticles-Based Hyperthermia. *Rep. Prac. Oconl. Radiother.* **2013**, 18, 397-400.
- [61] Chen, J.; Glaus, C.; Laforest, R.; Zhang, Q.; Yang, M.; Gidding, M.; Welch, M. J.; Xia, Y. *Small* **2010**, 6, 811–817.
- [62] Rocha, U.; Kumar, K. U.; Jacinto, C.; Ramiro, J.; Caamaño, A. A.; Solé, J. G.; Jaque., D. *Appl. Phys. Lett.* **2013**, in press.
- [63] Rocha, U.; Kumar, K. U.; Jacinto, C.; Villa, I.; Sanz-Rodríguez, F.; Cruz, M. d. C. I. d. I.; Juarranz, A.; Carrasco, E.; Veggel, F. C. J. M. v.; Bovero, E.; Solé, J. G.; Jaque, D. *Small* **2013**, DOI: 10.1002/sml.201301716.
- [64] Kobayashi, T. Cancer Hyperthermia Using Magnetic Nanoparticles. *Biotechnol. J.* **2011**, 6, 1342–1347.
- [65] Tartaj, P.; Morales, M. d. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Gonzalez-Carreño, T.; Serna, C. J. The Rreparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, 36, R182–R197.
- [66] Hergt, R.; Dutz, S.; Müller, R.; Zeisberger, M. Magnetic Particle Hyperthermia: Nanoparticle Magnetism and Materials Development for Cancer Therapy. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, 18, S2919–S2934.
- [67] Huang, X. H.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Application. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 4880-4910.
- [68] Li, J.-L.; Gu, M. Gold-Nanoparticle-Enhanced Cancer Photothermal Therapy. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2010**, 16, 989-996.
- [69] Martirosyan, K. S. Thermosensitive Magnetic Nanoparticles for Self-Controlled Hyperthermia Cancer Treatment. *J. Nanomed. Nanotechol.* **2012**, 3, doi:10.4172/2157-7439.1000e112.
- [70] Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2003**, 36, R167-R181.
- [71] Chen, J.; Glaus, C.; Laforest, R.; Zhang, Q.; Yang, M.; Gidding, M.; Welch, M. J.; Xia, Y. Gold Nanocages as Photothermal Transducers for Cancer Treatment. *Small* **2010**, 6, 811-817.
- [72] Chen, J.; Wang, D.; Xi, J.; Au, L.; Siekkinen, A.; Warsen, A.; Li, Z.-Y.; Zhang, H.; Xia, Y.; Xia, X. Immuno Gold Nanocages with Tailored Optical Properties for Targeted Photothermal Destruction of Cancer Cells. *Nano Lett.* **2007**, 7, 1318–1322.
- [73] Branquinho, L. C.; Carriao, M. S.; Costa, A. S.; Zufelato, N.; Sousa, M. H.; Miotto, R.; Ivkov, R.; Bakuzis, A. F. Effect of Magnetic Dipolar Interactions on Nanoparticle Heating Efficiency: Implications for Cancer Hyperthermia. *Nature* **2013**, 3 2887.

- [74] Baloch, K. H.; Voskanian, N.; Bronsgeest, M.; Cumings, J. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7, 316-319.
- [75] Chatterjee, D. K.; Rufalhah, A. J.; Zhang, Y. Upconversion Fluorescence Imaging of Cells and Small Animals Using Lanthanide Doped Nanocrystals. *Biomaterials* **2008**, 29, 937–943.
- [76] Kam, N. W. S.; O'Connell, M.; Wisdom, J. A.; Dai, H. J. Carbon Nanotubes as Multifunctional Biological Transporters and Near-Infrared Agents for Selective Cancer Cell Destruction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 11600-11605.
- [77] Moon, H. K.; Lee, S. H.; Choi, H. C. In Vivo Near-Infrared Mediated Tumor Destruction by Photothermal Effect of Carbon Nanotubes. *ACS Nano* **2009**, 3, 3707–3713.
- [78] Sortino, S. Photoactivated Nanomaterials for Biomedical Release Applications. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 301-318.
- [79] Huang, H.-C.; Rege, K.; Heys, J. J. Spatiotemporal Temperature Distribution and Cancer Cell Death in Response to Extracellular Hyperthermia Induced by Gold Nanorods. *ACS Nano* **2010**, 4, 2892–2900.
- [80] Bednarkiewicz, A.; Wawrzynczyk, D.; Nyk, M.; Strek, W. Optically Stimulated Heating Using Nd³⁺ doped NaYF₄ Colloidal Near Infrared Nanophosphors. *Appl. Phys. B* **2010**, 103, 847-852.
- [81] Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S. Second Window for *in Vivo* Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 710-711.
- [82] Weissleder, R. A Clearer Vision for *in Vivo* Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 316-317.
- [83] Rocha, U.; Jacinto da Silva, C.; Ferreira Silva, W.; Guedes, I.; Benayas, A.; Martinez Maestro, L.; Acosta Elias, M.; Bovero, E.; van Veggel, F. C.; Garcia Sole, J. A. Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles. *Acs Nano* **2013**, 7, 1188-1199.

5 MÉTODOS EXPERIMENTAIS E MATERIAIS UTILIZADOS

Neste capítulo iremos, inicialmente, descrever os métodos de sínteses utilizados para o crescimento das nanopartículas utilizadas nesta tese, bem como os experimentos realizados para a melhor compreensão da morfologia (Microscopia de Transmissão Eletrônica).

Também realizaremos a descrição dos procedimentos experimentais aplicados na caracterização óptica das nanopartículas utilizadas nesta tese: luminescência, absorção, eficiência quântica de fluorescência e eficiência de conversão luz-calor, etc. Bem como o aparato experimental utilizado para aquisição das imagens por fluorescência: microscópio confocal.

5.1 Nanopartículas de Trifluoreto de Lantânio (LaF₃)

O tipo de NP explorada nesta tese é baseado na matriz de trifluoreto de lantânio (LaF₃) dopada com apenas um tipo de íon lantanídeo luminescente: Nd³⁺. Inicialmente as pesquisas foram realizadas com NPs do tipo *core* (núcleo)/*shell* (casca) de Nd³⁺:LaF₃/LaF₃ sintetizadas pelo grupo de pesquisa da University of Victoria liderado pelo Prof. Dr. Frank C. M. van Veggel. Logo depois, ou seja, todas as demais NPs, foram produzidas pelo grupo de pesquisa GFFC (Grupo de Fotonica e Fluidos Complexos) do Instituto de Física – UFAL (Universidade Federal de Alagoas), mas somente no formato *core* (Nd³⁺:LaF₃). Contudo, as nanopartículas apresentaram as mesmas propriedades ópticas (tais como intensidades luminescentes e picos de emissão).

A matriz LaF₃ é interessante, pois apresenta baixa energia de fônon (baixa energia vibracional), por causa da alta ionicidade da ligação Ln-F (entre os terras-raras e o fluoreto) e como consequência o *quenching* da luminescência é reduzido (ou seja, as perdas pelos processos não radiativos são mínimas) maximizando, portanto, a eficiência quântica de fluorescência.

Por volta dos anos 2000 surgiram os primeiros estudos na literatura sobre as NPs de LaF₃. Desde então o número de trabalhos sobre a síntese de nanopartículas de LaF₃, com boa dispersão em solventes orgânicos, dopadas com os íons trivalentes lantanídeos luminescentes tem aumentado consideravelmente [1-4]. Em geral essas NPs foram preparadas através do método de coprecipitação usando o NdF como “precipitador” ou outro agente similar e utilizando como solventes etanol e água. Dentre esses trabalhos,

destacamos os publicados por van Vaggel *et al.*[2], reportando a síntese de nanocristais de LaF_3 solúveis em água usando citrato ou ligantes a base de fosfato monoéster. No entanto, o uso de ligantes pode criar domínios não homogêneos na superfície da nanopartícula levando a uma redução da eficiência quântica de fluorescência (*quenching* de fluorescência). Contudo, como será descrito na seção 5.3, utilizamos nesta tese um método simples para sintetizar as NPs de LaF_3 dopadas com Nd^{3+} altamente solúveis em água sem o uso de quaisquer ligantes.

5.1.1 Síntese de Nanopartículas do tipo core/shell ($\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$)/shell (LaF_3)

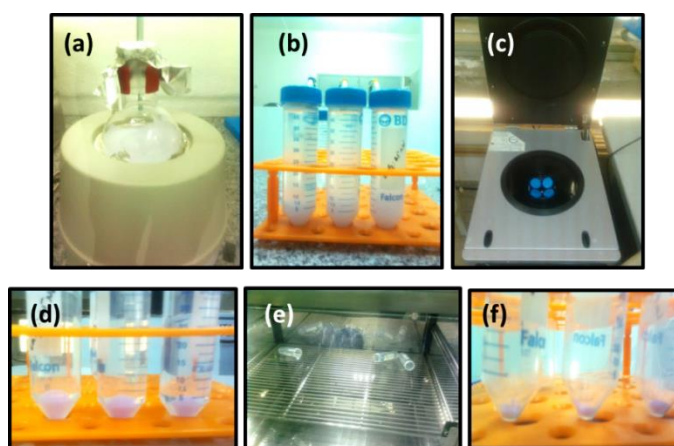
As nanopartículas *core/shell* de LaF_3 dopadas com íons de Nd^{3+} usadas nesta tese foram preparadas por meio da técnica de coprecipitação em solução aquosa, na presença de citratos. Cerca de 3 gramas de ácido cítrico foi diluído em 35 mL de água e neutralizada com $\text{NH}_4\text{-OH}$ até o pH da solução chegar a aproximadamente 6; em seguida, esta solução foi colocada em um forno e aquecida até chegar a 75 °C; $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 3 mL de metanol e, logo após, foi adicionado a ele mais 3 mL de água (gota a gota) contendo 0,266 g de NaF. Após 10 minutos, 3 mL de uma solução metanólica contendo 0,6 g de $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi adicionada gota a gota (mediante o uso de uma micropipeta) a mistura enquanto era agitada, para formação do shell em torno da partícula core. A solução ficou em “descanso” de modo a deixar a reação continuar durante 2 horas e, finalmente, as nanopartículas foram precipitadas pela adição de uma quantidade extra de etanol à mistura final (da reação). Depois foram levadas para centrifugação, separando a parte sólida do líquido e logo depois foi posta para secar durante 24 h.

5.1.2 Síntese de Nanopartículas do tipo core ($\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$)

As nanopartículas de LaF_3 dopadas com íons de Nd^{3+} utilizadas nesta tese foram preparadas pelo método de coprecipitação química utilizando os reagentes cloreto de Lantânio-III (LaCl_3 99,99 %) e cloreto de neodímio-III (NdCl_3 99,99 %). Estes produtos foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich, e não houve a necessidade de qualquer processo de purificação extra. Foram adicionados 0,95 mol de LaCl_3 e 0,05 mol de NdCl_3 a 80 mL de água destilada em um balão de fundo redondo de gargalo único, a qual era mantida sob agitação magnética contínua por 15 min, e aquecida a 75 °C. Em seguida, 3 mols de NH_4F foram diluídos em 3 mL de água destilada, as quais

foram adicionadas gota a gota na solução química mista. A temperatura da mistura foi mantida a 75 °C durante 3 horas à condições normais de pressão, mas sob contínua agitação. Ao longo do processo de mistura, foi se formando gradualmente uma solução branca. As nanopartículas obtidas foram coletadas por meio da centrifugação da solução a 8000 rpm por sete minutos. Em seguida a massa precipitada foi lavada várias vezes com água destilada, e centrifugada a 12000 rpm por 12 min e, finalmente, secada a 60 °C em condições normais de pressão durante 12 horas. A Figura 12 mostra em imagens o que foi descrito acima.

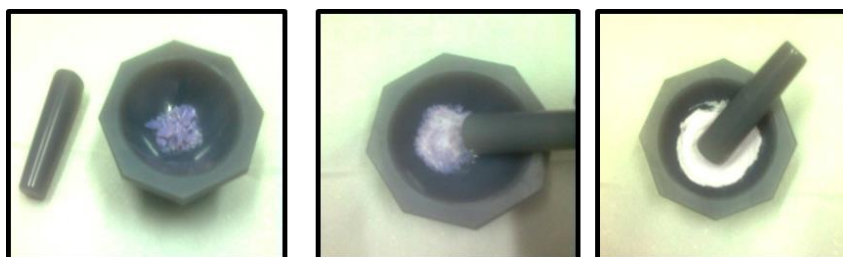
Figura 12: (a) Processo de mistura, aquecimento e agitação da solução. (b) Solução branca forma após o processo de mistura. (c) Centrifugação da solução branca para separar a parte sólida da líquida. (d) e (e) lavagem e secagem. (f) resultado final de todo o processo: NPs de LaF₃ dopadas com 25mol% de Nd³⁺.



Fonte: Autor, 2014.

Após o processo de secagem (ver Figura 12(e)) o material foi recolhido e “esmagado” como mostra a Figura 13 até se transformar em um pó branco.

Figura 13: Processo de esmagamento dos cristais até se transformarem em pó.



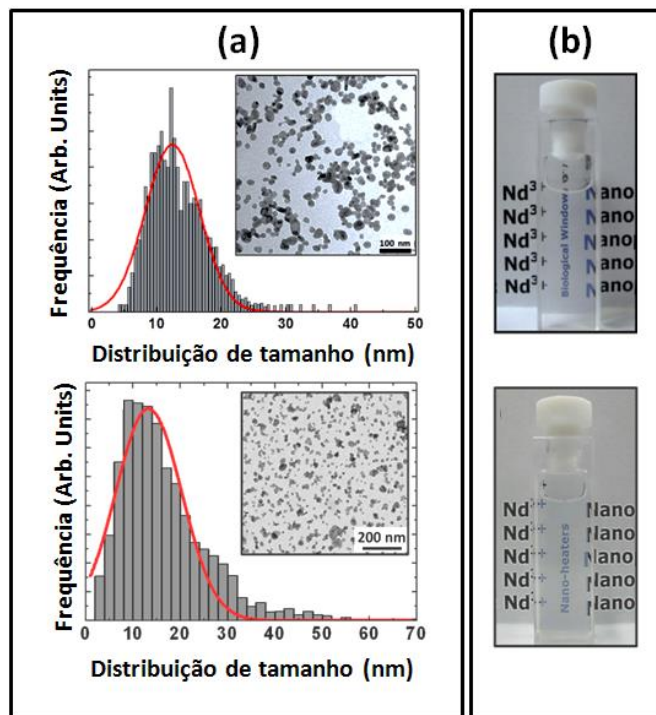
Fonte: Autor, 2014.

5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A avaliação da geometria e tamanho das nanopartículas de fluoreto de lantânio foi obtida através da microscopia eletrônica de transmissão (JEM-1010 de Joel (Japão)) do centro de Medicina da Universidade Autônoma de Madrid, operado com 80 kV. A câmera digital utilizada para realizar as imagens foi a *4kx4k* TemCam-F416 de TVIPS. Para visualizarmos as amostras no MET, foi necessário seguir alguns passos durante a sua preparação. Inicialmente fizemos uma diluição das amostras a analisar (de 1/10 ou 1/100). Depois, uma pequena gota da suspensão foi colocada em cabon grid (redes de carbono) e deixada em contato com o ar por cinco minutos até evaporar (secar) todo o líquido. Posteriormente, colocamos os *grids* em um porta amostras, com capacidade máxima para as duas amostras, que por sua vez foi inserido na câmara de observação do equipamento, e finalmente realizamos a observação das amostras. As imagens MET foram capturadas em regiões escolhidas de forma aleatória na superfície de cada placa. Com as imagens obtidas, foram feitas contagens e determinação dos diâmetros das nanopartículas com o auxílio do software Image J e os dados obtidos foram tratados em outro software para gerar os histogramas de distribuição de tamanho.

A Figura 14(a) e (b) mostra imagens MET das NPsL de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopadas com 15 mol% e 25mol% de Nd^{3+} usadas ao longo desta tese. É possível observar certo grau de aglomerados e isso pode ter ocorrido na preparação das amostras nos *grids*. De fato, efeitos similares foram relatados por trabalhos de imagens TEM com alta resolução [5]. A Figura 14(b) mostra que as NPsL de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ estão bem dispersas na água, para ambas concentrações, sugerindo que a solução coloidal (NPs + água) não forma agregados significativos. A partir da análise das imagens TEM, é possível fazer uma triagem do número de NPs (em um dado volume) como mostra a Figura 14. As NPsL de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ tem em média entre 12 - 15 nm de diâmetro em ambas concentrações (15mol% e 25mol%) e uma dispersão perto dos 30%. A média e dispersão de tamanho estimado são independentes da concentração de Nd^{3+} . É importante salientar que este valor para dispersão das NPs em água não invalida os efeitos observados. Em relação a isso também é importante dizer que, ao contrário de outros nanosensores fluorescentes tais como, quantum dots, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, etc, as propriedades ópticas dos íons incorporados nos nanocristais não são afetadas substancialmente devido à ausência do efeito de confinamento quântico que surge com a miniaturização do material.

Figura 14: (a) Distribuição do tamanho das NPs em histograma, com um diâmetro médio de entre 12 - 15 nm. (b) Imagem digital de uma cubeta contendo uma solução aquosa de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (a concentração foi ajustada para 0,3% em massa NPs na solução).



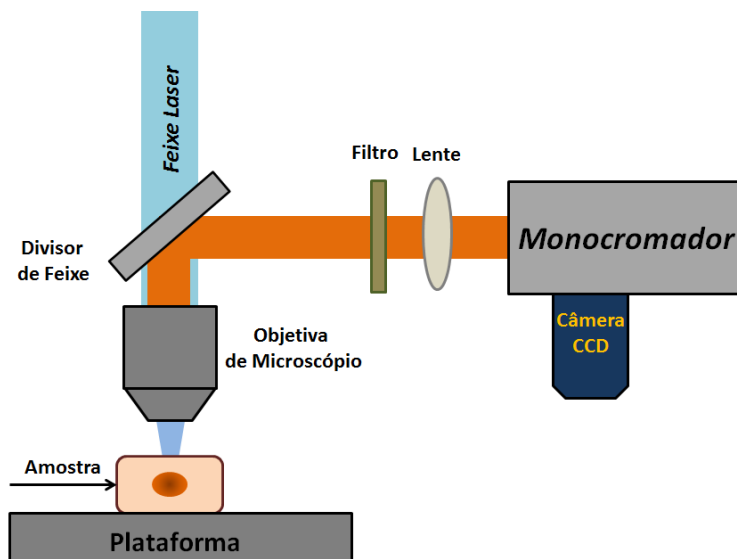
Fonte: Autor, 2014.

5.3 Medidas de Microscopia de Fluorescência e Imagens por Fluorescência

As medidas de fluorescência, incluindo as medidas de fluorescência em função da temperatura e os mapas de fluorescência (experimentos *in vitro*), foram realizadas usando um microscópio confocal convencional (mais detalhes do microscópio confocal podem ser encontradas nos Apêndices A e B). A Figura 15 mostra a descrição do aparato experimental utilizado nesses experimentos. O feixe de bombeio é focalizado sobre a amostra, por uma objetiva específica para região do infravermelho, e a fluorescência gerada neste plano focal é coletada pela mesma objetiva e focalizada na entrada de um monocromador. Para eliminar as possíveis contribuições/interferências do laser na emissão fluorescente é colocado um divisor de feixe e vários filtros são colocados ao longo do caminho óptico. A amostra é colocada sobre uma plataforma motorizada que possui mobilidade em relação aos dois eixos perpendiculares a direção do feixe de excitação, o passo mínimo (deslocamento) é de 0,2 μm . Este deslocamento é

controlado pelo programa LabSpec 5, o qual permite a realização de mapas espectroscópicos bidimensionais.

Figura 15: Representação esquemática do microscópio confocal



Fonte: Autor, 2014.

A fluorescência gerada foi espectralmente analisada por um detector, que dependendo do caso era um detector resfriado (a nitrogênio) do tipo InGaAs ou uma câmera CCD Synapse, que por sua vez estava conectado a um monocromador de alta resolução (IR550M). A resposta espectral de todo o sistema de detecção (objetiva, monocromador e detector) foi experimentalmente obtida por meio de medidas do espectro de emissão da amostra referência que foi um cristal de Nd:YAG e lâmpadas incandescente.

Para os experimentos de sensibilidade térmica (medidas em função da temperatura) acoplamos sobre a plataforma motorizada um sistema de controle de temperatura (Linkam PE120). Este sistema fornece a possibilidade de controle da temperatura da amostra na região de 25 °C a 120 °C com uma resolução de 0,1 °C.

5.3.1 Imagens Térmicas

As imagens térmicas apresentadas nesta tese (ver capítulos oito e nove) foram obtidas por meio da câmera térmica Fluke Ti10. Dessa forma, tais imagens são obtidas a partir da “radiação térmica” emitida pelos sistemas sob estudo. Os detectores desta câmera são do tipo microbolômetro - se trata de um tipo de detector específico para

câmeras térmicas. Ao posicionar a câmera na direção do objeto, seus detectores captam a radiação térmica emitida pelo objeto (na região do infravermelho). A radiação absorvida eleva a temperatura do detector mudando a sua resistência elétrica. Após uma complexa calibração, o *software* da câmera relaciona a intensidade da radiação que atinge o detector com a radiação de corpo negro emitida pela amostra permitindo, portanto, determinar a temperatura da amostra e, conseqüentemente, gerar imagens térmicas de sua superfície.

5.4 Estudo da toxicidade a nível celular das Nanopartículas

Os estudo de toxidade das NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ em células cancerosas HeLa e MB-MDA-231 (células de câncer de mama (carcioma)), as quais foram utilizadas na presente tese ver capítulos 7 e 9, foram realizados através do método de ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio). O MTT é um ensaio colorimétrico não radioativo simples para medir a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. O MTT é um sal tetrazólio solúvel em água e de coloração amarela. Células metabolicamente ativas são capazes de converter este corante em um cristal de formazan por meio da redução da fragmentação do anel de tetrazólio [6]. Os cristais de formazan podem ser diluídos em um solvente orgânico, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), e a quantidade do mesmo é quantificada através da medida da absorbância da solução em 540 nm, e por meio dos resultados obtidos (intensidade do espectro de absorção de formazan em DMSO) é possível estimar o número de células vivas na solução.

Em nosso caso, para determinar a citotoxicidade/viabilidade celular, as células foram colocadas em uma placa de 24 poços a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após 48 horas de cultura, o meio nos poços foi trocado por um novo contendo NPs com duas diferentes concentrações (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as células foram incubadas em diferentes períodos de tempo (2, 5, 8, 15 e 24 horas). Após a incubação, o meio foi removido e adicionado outro sem NPs. Após 24 h, 0,5 mL da solução de corante de MTT (0,05 mg/mL de MTT, Sigma) foi adicionado a cada poço. Após um tempo de incubação de 2-3h a uma temperatura de 37 °C e 5% de CO_2 , o meio foi removido e cristais de formazan foram solubilizados em 0,5 mL de DMSO (Merck) e a solução foi misturada vigorosamente para dissolver o corante.

A absorvância em 540 nm foi obtida usando um leitor de microplacas (Espectra Fluor 4, Tecan). A porcentagem de viabilidade das células incubadas com as NPs, em relação às células de controle (isto é, sem incubação com NPs) foi calculada como $([A]_{\text{teste}}/[A]_{\text{controle}}) \times 100$, onde $[A]_{\text{teste}}$ é a absorvância das amostras testadas e $[A]_{\text{controle}}$ é a absorção da amostra de controle.

REFERÊNCIAS

- [1] Wang, J.; Bo, S.; Song, L.; Hu, J.; Liu, X.; Zhen, Z. One-Step Synthesis of Highly Water-Soluble $\text{LaF}_3:\text{Ln}^{3+}$ Nanocrystals in Methanol Without Using Any Ligands. *Nanotechnology* **2007**, 18, 465606.
- [2] Stouwdam, J. W.; Veggel, F. C. J. M. v. Near-infrared Emission of Redispersible Er^{3+} , Nd^{3+} , and Ho^{3+} Doped LaF_3 Nanoparticles. *Nano Lett.* **2002**, 2, 733–737.
- [3] Jacobsohn, L. G.; Sprinkle, K. B.; Kucera, C. J.; James, T. L.; Roberts, S. A.; Qian, H.; Yukihiro, E. G.; DeVol, T. A.; Ballato, J. Synthesis, Luminescence and Scintillation of Rare Earth Doped Lanthanum Fluoride Nanoparticles. *Optical Materilas* **2010**, 33, 136–140.
- [4] Wang, F.; Zhang, Y.; Fan, X.; Wan, M. Facile Synthesis of Water-soluble $\text{LaF}_3:\text{Ln}^{3+}$ Nanocrystals. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 1031–1034.
- [5] Dong, C.; Raudsepp, M.; van Veggel, F.C.J.M. Kinetically-Determined Crystal Structures of Undoped and La^{3+} -doped LnF_3 . *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 472-478.
- [6] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxic Assay. *J. Immunol. Methods* **1993**, 95, 55 – 63.

6 IMAGIAMENTO POR FLUORESCÊNCIA: *IN VITRO*, *EX VIVO* E *IN VIVO*.

Neste capítulo investigamos sistematicamente as possíveis aplicações intratecido das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ para imagiamento por fluorescência na região espectral da *I e II Janelas Biológicas*. Este capítulo está dividido em duas partes. Na primeira parte, iremos avaliar a profundidade de penetração óptica alcançada pela banda de emissão tradicionalmente usada do íon de neodímio para imagiamento por fluorescência na *primeira janela biológica*. Devido à alta Eficiência Quântica de Fluorescência (η), a profundidade de penetração nos tecidos é melhorada em comparação com outros sistemas luminescentes, tais como Quantum Dots. Além disso, também investigamos a profundidade de penetração e resolução espacial óptica intratecido que pode ser alcançada pelas três bandas de emissão do íon de Nd^{3+} na região espectral da *segunda janela biológica*. Por meio da comparação desses estudos determinamos a banda de emissão “ótima ou ideal” do íon Nd^{3+} para o bioimagiamento por fluorescência intratecido. Na segunda parte deste capítulo, uma vez que foi identificada a "emissão ótima", as nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foram usadas, para imagiamento *in vitro* (célula única) e *in vivo* (animal pequeno) na *segunda janela biológica*.

6.1 Determinação da Eficiência Quântica de Fluorescência das NPs Core/Shell de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$

A eficiência quântica de fluorescência (η) é uma das mais importantes propriedades ópticas de materiais fluorescentes, sendo definida como a razão do número de fótons emitidos pelos absorvidos do bombeio. A técnica de espectroscopia de Lente Térmica (LT) foi usada para determinar a dependência de η com a concentração nominal de íons de Nd^{3+} (0, 2, 5, 10, 15, 20 e 25mol.%) nas NPs de fluoreto de lantânio. Já é bastante conhecido que em sistemas luminescentes dopados com íons de Nd^{3+} , a eficiência quântica de fluorescência (como também a intensidade do brilho da luminescência) é fortemente dependente da concentração de íons de Nd^{3+} no material [1 - 3].

De fato, a intensidade da luminescência de sistemas dopados com íons de Nd^{3+} geralmente é avaliada pelo produto $[\text{Nd}^{3+}] \cdot \eta$, onde $[\text{Nd}^{3+}]$ representa a concentração de Nd^{3+} e η a eficiência quântica de fluorescência [3]. O termo $[\text{Nd}^{3+}]$ é diretamente proporcional à fração de fótons que são absorvidos pelos íons durante o processo de

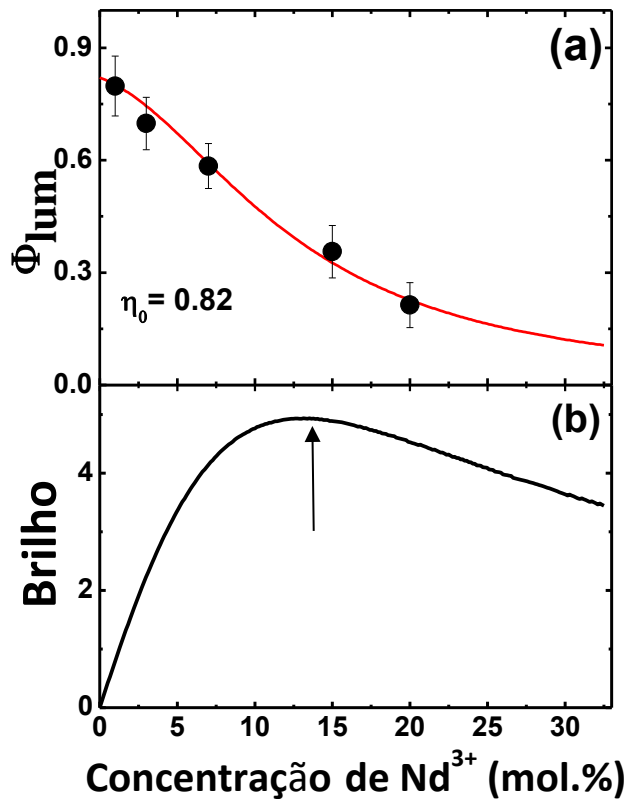
excitação. Desta forma, o produto $[\text{Nd}^{3+}] \cdot \eta$ é proporcional à fração de fótons que são emitidos, ou seja, é um parâmetro que avalia a relação de brilho do sistema sob estudo. De um modo geral, sistemas dopados com Nd^{3+} , quando opticamente excitados, são passivos de processos de transferência de energia tais como relaxação cruzada e migração de energia, os quais geralmente reduzem η com o aumento da concentração de Nd^{3+} . Por outro lado, quando se aumenta a concentração de íons, aumenta-se o coeficiente de absorção óptica e, portanto, a eficiência de absorção. Dessa forma, se com o aumento da concentração de íons há um favorecimento no processo de absorção do bombeio e um desfavorecimento no η , deve haver uma concentração de íons ideal, de modo a maximizar o brilho da luminescência. Esta é obtida através do valor máximo no produto $[\text{Nd}^{3+}] \cdot \eta$ [3]. Para encontrar esta concentração “ideal” precisamos determinar de forma precisa η . Esta não é uma tarefa fácil e para isso foi feito uso da técnica de Lente térmica (LT) cujos aspectos fundamentais podem ser encontrados nas referências [4-6]. Esta técnica já foi aplicada com sucesso na determinação de η de suspensões coloidais de NPs semicondutoras, comumente chamadas de Quantum Dots (QDs) [6, 7] e segundo nossas pesquisas, essa foi a primeira vez que a técnica de LT foi aplicada na determinação de η de uma dispersão coloidal contendo NPs dopadas com íons terras-raras.

A Figura 16(a) mostra os resultados experimentais obtidos para η do nível emissor ${}^4\text{F}_{3/2}$ de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em função da concentração de Nd^{3+} . É bastante evidente o decréscimo progressivo de η com o aumento da concentração dos íons de neodímio. Semelhantemente a outros sistemas luminescentes dopados com Nd^{3+} , este comportamento é associado ao surgimento dos processos de migração de energia e relaxação cruzada que aumenta a taxa de decaimento não radiativo e eles crescem com a concentração de íons. Devemos salientar que o “*shell*” de LaF_3 desempenha um papel importante, minimizando os possíveis “*quenching*” de fluorescência dos íons de Nd^{3+} causada por defeitos de superfície e outros processos. Tal efeito geralmente ocorre em NPs do tipo “*core*”, e neste caso, seria presente nas NPs “*core*” de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, devido a ausência de uma camada protetora o “*shell*”.

A partir da Figura 16 vemos que para baixas concentrações de Nd^{3+} η chega próxima a 0,8 enquanto que em concentrações mais altas este valor diminui para 0,2 (para concentração de 20mol%). Estes valores são comparáveis com resultados anteriormente publicados por outros grupos de pesquisa [8-10]. Note que esses valores

de η também podem ser comparados aos resultados publicados recentemente para QDs-CdTe [6] cujo η foi de aproximadamente 0,5 para QDs de tamanhos intermediários (em torno de 4 nm) e decrescendo até 0,2 para QDs de tamanhos “pequenos” e “grandes” (cerca de 1 e 8 nm). Além disso, é importante observar aqui que os resultados dessas eficiências correspondem a excitação no visível (um fóton), que é impraticável para experimentos de profundidade de penetração óptica em tecidos [11].

Figure 16: (a) Eficiência Quântica de Fluorescência (η) do nível ${}^4F_{3/2}$ do Nd^{3+} em nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em função da concentração de Nd^{3+} . Os pontos sólidos são dados experimentais obtidos a partir da técnica de Espectroscopia de Lente Térmica e a linha vermelha é apenas para guiar os olhos. (b) Brilho dado pelo produto $[\text{Nd}^{3+}] \cdot \eta$ versus a concentração de íons de Nd^{3+} .



Fonte: Autor, 2014.

Um bom exemplo são os resultados encontrados para as nanopartículas do tipo core/shell de NaGdF_4 dopadas com neodímio [8] onde η para a mesma concentração nominal de Nd^{3+} (~3%) é 70% para NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ e 40% para as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{NaGdF}_4$ [8]. Estes resultados indicam que as NPs de Neodímio usadas ao longo

desta tese são bastante fluorescentes. Embora a diferença entre os valores seja significativa, devemos levar em conta o fato de que η foi determinado por diferentes métodos experimentais (recordamos que nesta tese usamos a espectroscopia de Lente Térmica enquanto que no trabalho [8] foi usado o método da amostra referência (método por comparação de espectro de emissão). Além disso, estas NPs *core/shell* são constituídas de distintos materiais e foram fabricadas em diferentes laboratórios sob diferentes condições experimentais. De fato, tais fatores podem influenciar nos valores de η final do Nd^{3+} , devido às diferentes propriedades do material utilizado para formar o *core/shell*, bem como a forma na qual os íons estão distribuídos/arranjados dentro do material. Em geral, quando temos um material com baixa concentração de Nd^{3+} , é esperado que η alcance valores próximos de 1, devido ao grande “*gap*” de energia entre o estado emissor $^4\text{F}_{3/2}$ (maior energia) e o próximo estado de menor energia $^4\text{I}_{15/2}$ [12].

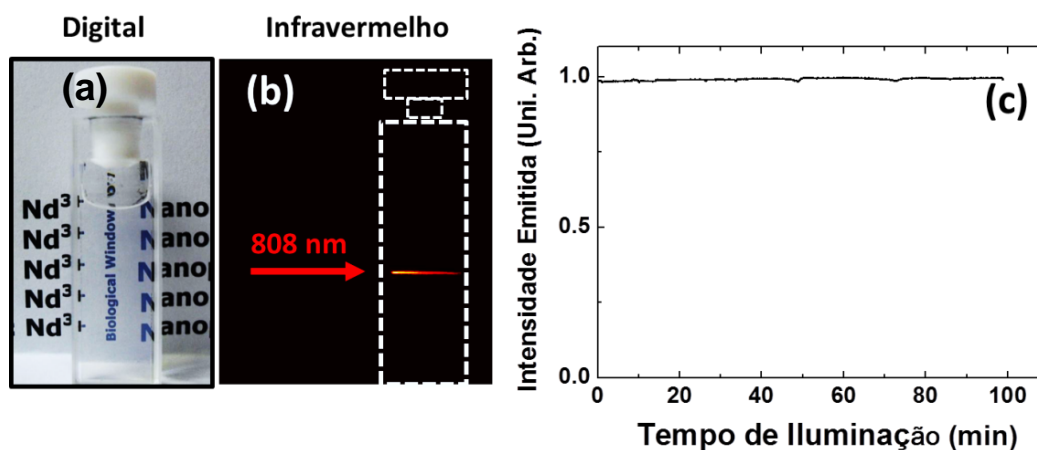
Comparando os nossos resultados com os das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{NaYF}_4$ que são amplamente utilizadas na literatura, o valor de η em uma concentração molar de 15% de Nd^{3+} das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{NaYF}_4$ tem sido relatada como sendo de 6%, valor que é mais de quatro vezes menor que o obtido para as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ [13]. A partir dos dados experimentais incluídos na Figura 16(a) é possível elucidar a influência da concentração dos íons de Nd^{3+} no brilho da luminescência das NPs de fluoreto de lantânio dopadas com neodímio. A Figura 16(b) mostra a dependência do produto $[\text{Nd}^{3+}] \cdot \eta$ com a concentração de Nd^{3+} . Como esperado, os resultados experimentais confirmam que o “brilho” das NPs não segue uma tendência monótona, revelando a existência de uma concentração ideal de Nd^{3+} perto de 15mol% (região indicada por uma seta na Figura 16(b)).

6.2 Foto-Luminescência das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$

Dentre as várias concentrações utilizadas nesta tese, consideramos como a ideal, para o bioimagem fluorescente, aquela NP com maior brilho (o brilho pode ser definido como o produto da concentração de Nd^{3+} pela intensidade de emissão da fluorescência quântica – ver seção anterior). Esta concentração otimiza a densidade de absorção óptica enquanto mantém a eficiência quântica relativamente alta, em torno de 50% [14, 15]. A habilidade de emissão no infravermelho das NPs dispersas em água foi inicialmente verificada, por meio de um experimento simples, pela aquisição de uma

imagem no infravermelho das NPs dentro de uma cubeta (ver Figura 17(a)), quando excitada por um feixe laser em 808 nm (como esquematizado na Figura 17(b)).

Figura 17: (a) Imagem digital de uma cubeta contendo uma solução aquosa de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (a concentração foi ajustada para 0,3% em massa NPs na solução). (b) Imagem de fluorescência no infravermelho da solução aquosa com NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando excitadas opticamente por um feixe laser de 808 nm (esquemáticamente indicado por uma seta vermelha). Um filtro foi colocado entre a cubeta contendo (NPs + água) e a câmera a fim de bloquear a radiação laser em 808 nm. (c) Intensidade de luminescência (no IV) gerada a partir da dispersão coloidal (NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ + água) em uma cubeta (como demonstrado em (a)) com uma densidade de potência de $1\text{W}/\text{cm}^2$ versus o tempo de irradiação.



Fonte: Autor, 2014.

A imagem no infravermelho da Figura 17(b) foi obtida através de uma câmera CCD de Si e com a utilização de um filtro adequado, de modo que apenas os comprimentos de onda maiores do que 850 nm atingissem a câmera CCD. A fotostabilidade das NPs em solução aquosa foi verificada através da detecção da intensidade emitida em função do tempo de excitação para diferentes valores de intensidade de bombeio. Como pode ser observada na Figura 17(c), a intensidade da luminescência permaneceu constante durante todo o tempo de irradiação (cerca de uma hora e meia). Além disso, também verificamos que a intensidade emitida no IV aumentou linearmente com o aumento da intensidade de excitação usadas neste experimento (o valor máximo utilizado neste experimento foi de aproximadamente 2

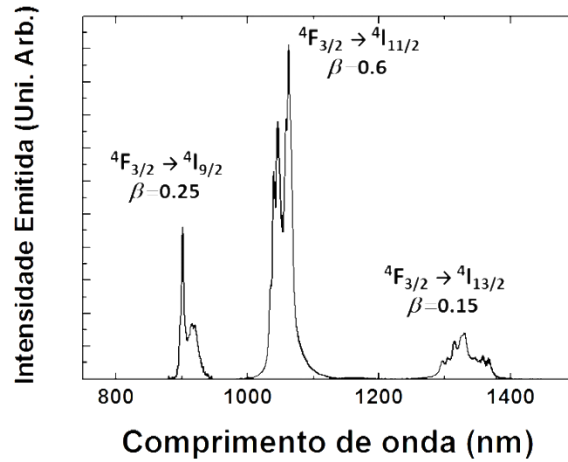
W/cm²). Estes resultados indicam que as nanopartículas de Nd³⁺:LaF₃ usadas nesta tese são altamente foto-estável.

Conforme apresentado na Figura 18, a fluorescência no IV gerada pelas NPs de Nd³⁺:LaF₃ é constituída por três bandas de emissão, todas elas provenientes do nível metaestável ⁴F_{3/2} dos íons de Nd³⁺. A intensidade de todas as transições dependerá das razões de ramificações (β). β é a probabilidade relativa para ocorrer uma dada transição radiativa e elas podem ser estimadas a partir do espectro de fluorescência demonstrado na Figura 18.

De fato, após as devidas correções feitas no sistema de detecção, as razões de ramificações foram estimadas como segue:

$$\beta_{9/2} = \frac{\int_{850}^{950} I_l(\lambda)d\lambda}{\int_{850}^{1500} I_l(\lambda)d\lambda} = 0.25, \quad \beta_{11/2} = \frac{\int_{950}^{1150} I_l(\lambda)d\lambda}{\int_{850}^{1500} I_l(\lambda)d\lambda} = 0.6, \quad \beta_{13/2} = \frac{\int_{1150}^{1500} I_l(\lambda)d\lambda}{\int_{850}^{1500} I_l(\lambda)d\lambda} = 0.15 \quad (6.1)$$

Figura 18: Espectro de emissão de uma suspensão coloidal de NPs de Nd³⁺:LaF₃ obtidos após excitação óptica em 808 nm.



Fonte: Autor, 2014.

onde $I_l(\lambda)$ é a intensidade emitida no comprimento de onda λ . Os valores obtidos para β , são comparáveis aos resultados previamente publicados para outros sistemas dopados com íons de neodímio [16, 17]. De acordo com estes valores, é evidente, que a transição com maior probabilidade de emissão é a ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$, emitindo em torno de 1050 nm. Note que esta transição é bem mais (cerca de duas vezes mais) provável de ocorrer do que a banda de emissão “tradicionalmente” usada (${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ em torno de 910 nm).

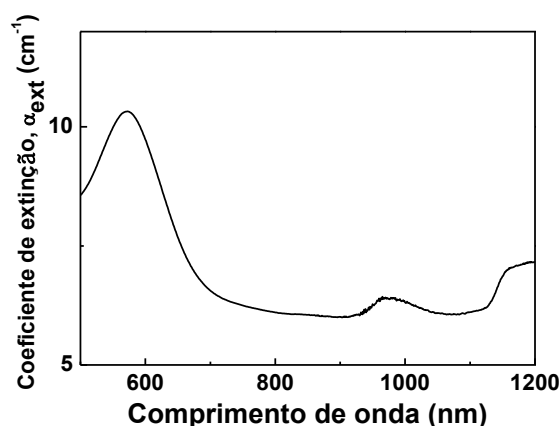
Surge, portanto, uma nova oportunidade capaz de aumentar o contraste das imagens por fluorescência, devido a um simples deslocamento da faixa de detecção espectral (de 900 nm até 1100 nm). Entretanto, a intensidade final do sinal detectado das três transições fluorescentes pode não depender apenas do *branching ratio* (razões de ramificação), mas também da resposta óptica do sistema de aquisição. Uma vez que, a maior parte dos detectores usados para imageamento por fluorescência no intervalo espectral da janela biológica (I e II) são do tipo InGaAs. E que tais detectores, geralmente, apresentam uma sensibilidade de detecção com relação às emissões em 910, 1050 e 1330 nm de aproximadamente 0,4, 0,8 e 0,8 (em unidades arbitrárias). Podemos, então, concluir que as transições em ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ e ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ não sofrem qualquer tipo de compensação ou ganho devido ao aumento da sensibilidade de detecção nesta região espectral. E que imagens de máximo contraste poderão ser obtidas, com o uso das NPs de lantânio dopadas com íons de Nd^{3+} , mediante o monitoramento da variação espacial da intensidade da banda de emissão ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$. Porém, isto não garante que a emissão em torno de 1050 nm (${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$) seja a emissão ideal para o imageamento de tecidos a grandes profundidades, porque outros fatores devem ser levados em conta, tais como a dependência do comprimento de onda e da resolução com a profundidade de penetração nos tecidos. E esses pontos serão discutidos nas próximas seções.

6.3 Propriedades ópticas de Tecido Sintético para Primeira Janela Biológica

O tecido sintético usado ao longo desta tese foi fabricado a partir da mistura de um meio espalhador (Agar) e de vários componentes absorvedores (tinta azul indiana, óleo de oliva e água) de modo que as propriedades ópticas do tecido humano real foram reproduzidas *in vitro*. A utilização da Agarose (um dos principais componentes do Agar) como meio espalhador, em tecidos sintéticos foi inicialmente relatada por Cubeddu *et al.*[18]. A Hemoglobina e Melanina são os principais componentes responsáveis pela absorção da luz no visível e no ultravioleta, como relatado por Kobayashi *et al.* [19]. Inicialmente, dissolvemos uma certa quantidade (0,36 g) de pó de Agar em água destilada para obter uma solução com aproximadamente 1% do volume total da solução. Em seguida, quantidades apropriadas de óleo de oliva e tinta azul indiana foram adicionadas à mistura. As porcentagens ideais (tais que reproduzam as propriedades do tecido humano *in vitro*) foram de 0,50% (200 μ L) de tinta azul indiana e 0,32% (128 μ L) de óleo de oliva adicionado diretamente à mistura aquosa água +

Agar. A Figura 19 mostra o espectro do coeficiente de extinção, α_{ext} , do tecido sintético produzido.

Figura 19: Espectro do coeficiente de extinção do tecido sintético usado nesta tese.



Fonte: Autor, 2014.

Como pode ser observado, a relação entre os diferentes constituintes foi ajustada de forma a reproduzir as principais características do espectro de absorção da pele humana na região do visível: coeficiente de extinção alto ($> 8 \text{ cm}^{-1}$) devido a presença da hemoglobina e melanina; *background* da absorção/coeficiente de extinção (aproximadamente de 6 cm^{-1}) na região espectral de 700 a 900 nm devido ao espalhamento; relevante absorção em torno de 900 nm, devido a presença da água.

O tecido sintético produzido acima foi utilizado para os estudos comparativos de profundidade de penetração óptica intratecido alcançada entre as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ e a suspensão aquosa de QDs CdTe (com 7,8 nm de diâmetro) fornecidos pela Plasmachem Inc. Essas medidas foram realizadas usando o microscópio confocal descrito na seção 5.5.

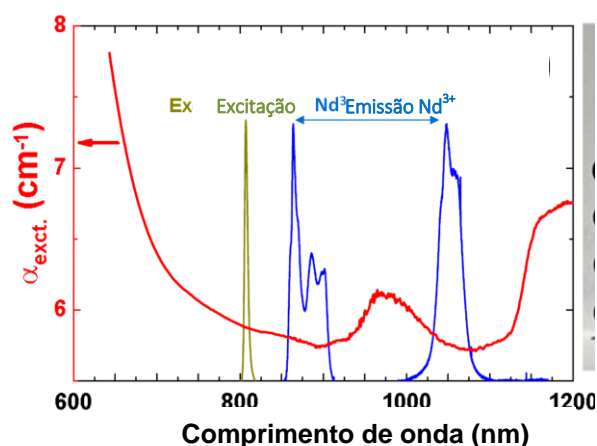
6.3.1 Análise da Profundidade de Penetração Óptica in Vitro com emissão e excitação na primeira Janela Biológica.

A Figura 20 mostra o espectro de emissão da solução coloidal contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando opticamente excitadas por uma fonte de radiação laser sintonizada em 808 nm. Claramente observamos a presença das bandas de emissão características dos íons de Nd^{3+} em torno de 910 nm e 1050 nm associadas às respectivas transições ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$ e ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{11/2}$, cuja posição espectral (de ambas as transições) corresponde à

região onde o tecido humano apresenta valores mínimos para o coeficiente de extinção, ou seja, dentro da *janela biológica*.

Para ilustrar esta excepcional propriedade, incluímos na Figura 20 o coeficiente de extinção do tecido sintético que simula as propriedades do tecido humano real [20]. Nesta região a absorção do tecido (devido à presença da banda de absorção da água e de outros componentes, tal como hemoglobina [20-21]), decresce para maiores comprimentos de onda onde o fenômeno do espalhamento é mais proeminente. Como pode ser visto, para este tipo de tecido sintético as bandas de emissão características dos íons de neodímio estão localizadas ao lado da banda de absorção da água.

Figura 20: Espectro do coeficiente de extinção de um tecido sintético (o qual simula as propriedades ópticas de tecido humano *in vitro*) no intervalo espectral de 600-1200 nm. Também foi incluído o espectro de emissão das NPs de LaF₃ dopadas com Nd³⁺. Indicamos também a transição eletrônica que corresponde a cada banda de emissão. O espectro da fonte de laser de 808 nm (excitação) utilizado ao longo de todo este trabalho também foi incluído.



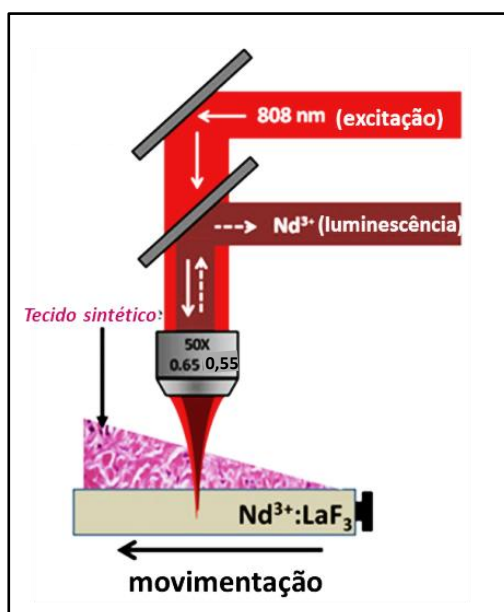
Fonte: Autor, 2014.

Também incluímos na Figura 20 o espectro da radiação laser utilizado como fonte de excitação óptica dos íons de Nd³⁺ que em nossas condições experimentais é centrado em 808 nm. Note que a excitação está situada dentro da *janela biológica* [23]. Como iremos discutir mais adiante, o fato de termos a banda de absorção das NPs de Nd³⁺:LaF₃ e a excitação óptica em 808 nm é uma interessante vantagem, pois coincide com o comprimento de onda de ressonância do plasmons dos nanobastões de ouro (NBO), um dos nanomateriais mais eficientes utilizados em terapia fototérmica [24].

Os dados incluídos na Figura 20 indicam a possibilidade de alcançar grande profundidade de penetração, para ambos, comprimento de onda de excitação óptica e de emissão, favorecendo então o uso das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ como agentes de imageamento e nanosensores intratecido. Entretanto, a obtenção de grande profundidade de penetração requer uma escolha adequada da concentração dos íons de Nd^{3+} , pois desta forma podemos otimizar a intensidade luminescente [1, 25, 26].

A Figura 21 mostra o aparato experimental utilizado para determinar a profundidade de penetração alcançada pela emissão das nossas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em um dado tecido sintético.

Figura 21: Diagrama esquemático que mostra o procedimento experimental usado para determinar a profundidade de penetração alcançada pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. O tecido sintético utilizado nesses experimentos (simulando o tecido da pele humana *in vitro*) atingiu um coeficiente de extinção de 11 cm^{-1} em 808 nm. Um tecido sintético de formato geométrico triangular foi colocado entre a objetiva (focal/coletora) e a dispersão coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. A espessura do tecido entre a objetiva e as nanopartículas foi continuamente variada através do deslocamento do sistema de "cubeta + tecido" ao longo de uma direção perpendicular à direção de propagação do feixe laser (como indicado pela seta).



Fonte: Autor, 2014.

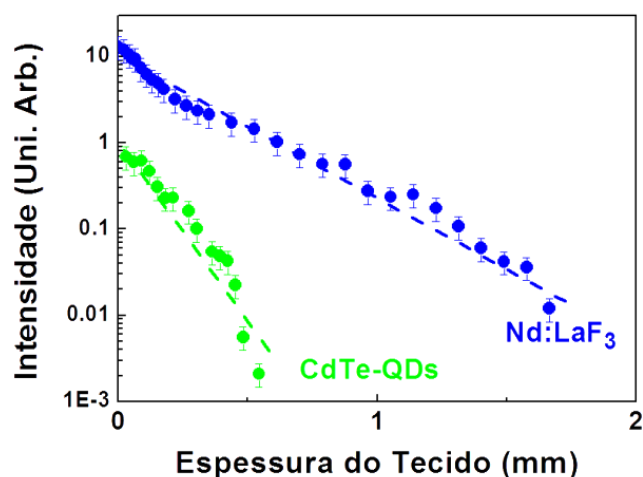
Basicamente, as NPs core/shell de lantânio dopadas com uma concentração nominal de 15mol% de Nd^{3+} foram dispersas em água destilada formando uma

concentração resultante de 0,3 % em massa de NPs. A dispersão coloidal foi introduzida em um microcanal com dimensão de 200 μm (fornecido comercialmente pela *Ibidi Inc.*) e em seguida foi opticamente excitado com um feixe laser CW sintonizado em 808 nm. O feixe laser foi focalizado sobre o microcanal por uma objetiva de magnitude de 20X (abertura numérica de 0,2 gerando um *spot* com tamanho de 2,5 μm). Esta mesma objetiva foi utilizada para coletar a luminescência dos íons de Nd^{3+} , que após passar através de diferentes filtros e aberturas, foi analisada por um espectrofotômetro de alta resolução. Foi colocado um tecido sintético com espessura variável entre o microcanal e a objetiva. Esta configuração experimental nos permitiu medir a luminescência das NPs em função da espessura do tecido sintético, através de um simples deslocamento da solução coloidal.

O tecido utilizado nestes experimentos foi constituído de um meio de espalhamento (por exemplo, o Agar) e por outros componentes absorvedores (tinta Indiana e azeite), conforme descrito na seção 6.3 [19, 20, 27]. A relação da concentração de cada constituinte foi ajustada de modo a reproduzir as principais características do espectro de extinção do tecido humano *in vitro*, como demonstrado na Figura 19 onde o coeficiente de espalhamento é aproximadamente 10 cm^{-1} no intervalo espectral de 700-980 nm. A presença das bandas de absorção no visível e no infravermelho é referente ao pico de absorção da hemoglobina e a banda de absorção da água [28].

A Figura 22 mostra a intensidade de luminescência emitida a partir da dispersão coloidal contendo de NPs *core/shell* $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em função da espessura do tecido sintético. Os pontos experimentais correspondem à intensidade luminescente coletada em torno de 885 nm (emissão associada à transição ${}^4\text{F}_{3/2}\rightarrow{}^4\text{I}_{9/2}$). Resultados similares foram obtidos para a luminescência referente à transição ${}^4\text{F}_{3/2}\rightarrow{}^4\text{I}_{11/2}$ (emissão em torno de 1060 nm). A partir dos dados incluídos na Figura 22 vemos que a profundidade de penetração alcançada é de aproximadamente 2 mm. Obviamente, esta profundidade de penetração pode ser melhorada aumentando a potência de excitação ou ainda melhorando a sensibilidade do sistema de detecção. Contudo, a profundidade de penetração obtida é da mesma ordem de grandeza de outros resultados obtidos com NPs dopadas com íons terras-raras emitindo dentro da primeira *janela biológica* [29].

Figura 22: Intensidade da luminescência gerada pelas nanopartículas core/shell de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtida mediante o processo de excitação por um fóton (comprimento de onda de excitação de 800 nm), em função da espessura do tecido versus a intensidade da luminescência, gerada pelo processo de excitação por dois fótons (comprimento de onda de excitação de 920 nm). Os pontos são dados experimentais e as linhas tracejadas representam a melhor opção para uma relação linear (observe a escala logarítmica).



Fonte: Autor, 2014.

A fim de “validar” os nossos resultados, fizemos uma comparação entre a profundidade de penetração óptica alcançada pelas NPs core/shell de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ e os resultados obtidos usando Quantum Dots CdTe com 8 nm de diâmetro (comprados comercialmente) sob as mesmas condições experimentais. Esses nanosensores foram recentemente recomendados como excelentes agentes para bioimagem intratecido [30]. Para este fim, uma suspensão coloidal contendo as NPs core/shell $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foi substituída por uma solução contendo QDs CdTe com a mesma concentração (0,3 % em massa) introduzidas em um microcanal do mesmo tipo. A suspensão contendo os QDs de CdTe foi excitada por um laser de Ti:Safira mode-locked (Tsunami, Spectra Physics) sintonizado em 920 nm fornecendo pulsos laser de 100 fs com uma taxa de repetição de 50 MHz. A intensidade de potência média do laser foi de 100 mW (a mesma potência utilizada para determinar a profundidade de penetração atingida pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$). O laser em 920 nm foi focalizado na solução coloidal por uma objetiva de 50X e abertura numérica de 0,55. Após a excitação por multifótons (dois fótons), foi observada a luminescência gerada pelos QDs de CdTe em torno de 780 nm. A fluorescência no infravermelho foi coletada usando a mesma objetiva e, depois de

passar através de vários filtros e aberturas, foi espectralmente analisadas por um espectrômetro de alta resolução.

Como pode ser observado uma profundidade de penetração muito superior foi alcançada pelas NPs core/shell de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, embora ambas as emissões estivessem situadas dentro da *primeira janela biológica* sendo, portanto, afetadas por coeficiente de extinção similar. Atribuímos essa diferença significativa aos diferentes métodos de excitação que foram utilizados. Como foi dito anteriormente, quando a excitação é realizada por um processo de multifotons, a eficiência da luminescência é fortemente dependente da densidade de fótons na região do foco de excitação [30, 31]. Diferentemente, os sistemas luminescentes que são excitados por um fóton (o caso das NPs core/shell de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$), esta dependência é menos crítica, pois a luminescência aumenta linearmente com o aumento da densidade de fótons de excitação. Na realidade, quando analisamos a interação do laser com o tecido (real ou sintético) temos que levar em conta vários fatores, tais como o fenômeno do espalhamento, absorção do tecido, distorção do feixe e o surgimento de aberrações ópticas. A combinação destes fatores faz com que a intensidade de excitação decresça muito rapidamente com a espessura do tecido.

De fato, a atenuação da densidade de excitação intratecido afeta de forma mais pronunciada a eficiência da excitação por multifótons do que por apenas um fóton [29, 30]. Isto é, no caso da luminescência gerada por dois fótons a intensidade é proporcional ao quadrado da intensidade de excitação ($I_{2f} \sim (e^{-2d/l})^2 = e^{-4d/l}$). Em outras palavras, a intensidade emitida decresce exponencialmente com $2d/l$, enquanto que no processo de 1 fóton decresce de forma linear com d/l . Isto explica o fato de termos obtido uma maior profundidade de penetração para as NPs dopadas com íons de Nd^{3+} . Vale ressaltar, que nossas conclusões estão de acordo com os resultados obtidos por Min Gu *et al.* [30] onde os autores realizaram o imageamento óptico de um polímero luminescente inserido em um meio turbido usando ambos os processos de excitação (multifótons e por um fóton). Neste caso, os autores observaram que o sinal proveniente da excitação por multifótons decrescia muito mais rapidamente, embora a resolução da imagem fosse muito maior (o que era de esperar já que este é um processo não linear). Segundo os autores, a profundidade de penetração obtida sob excitação multifotônica foi limitada pela robustez/força do processo de absorção de dois fótons [30]. Entretanto, a melhoria proporcionada na profundidade de penetração através da excitação por um

fóton é garantida à custa de uma perda de resolução espacial final [31]. No entanto, esta perda de resolução pode ser parcialmente compensada por meio do uso da microscopia confocal.

Portanto, os dados incluídos na Figura 22 revelam que sob as mesmas condições experimentais (concentrações de NPs, intensidade de excitação, mesmos aparatos ópticos e assim por diante) a intensidade de emissão gerada pela suspensão coloidal de NPs *core/shell* de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ teve maior magnitude que a intensidade de emissão gerada pela suspensão coloidal formada por QDs de CdTe. Essa maior eficiência é atribuída ao fato de que as NPs *core/shell* de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ são excitadas por um fóton (processo chamado de *down-conversion*) enquanto que os QDs de CdTe são excitados por dois fótons [31].

6.4 Análise da Profundidade de Penetração óptica e Resolução óptica in vitro (Intralipid®) na II Janela Biológica

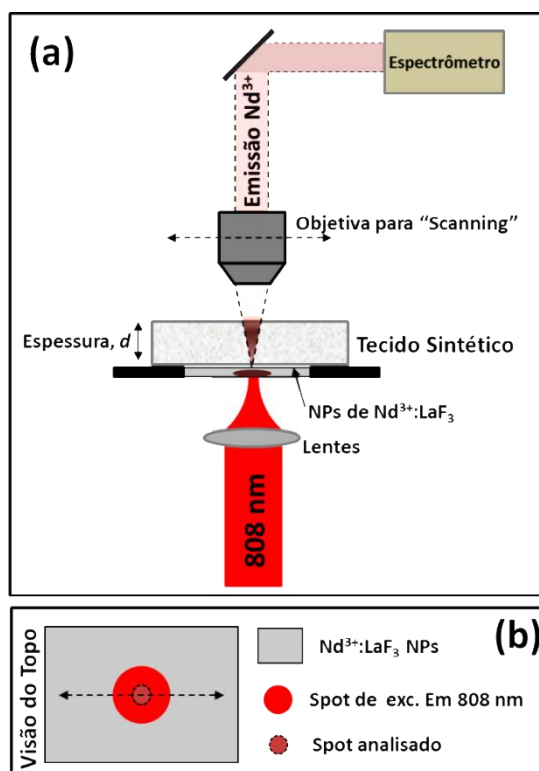
As profundidades de penetração óptica obtidas com as três bandas de emissão do neodímio nas medidas intratecido assim como a resolução espacial alcançada pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopadas com 15 mol.%, foram investigadas usando um microscópio de fluorescência de feixe duplo esquematicamente demonstrado na Figura 23(a). Semelhantemente ao caso da microscopia de fluorescência básica as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopadas com 15 mol.% (Neste caso as NPs são do tipo *core* e não *core/shell*) foram opticamente excitadas por um feixe laser em 808 nm focalizado sobre a suspensão coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ através de uma lente de abertura numérica pequena, gerando um *spot* laser de 150 μm sobre a amostra.

A luminescência gerada no infravermelho pelas NPs de Nd^{3+} (15 mol.%): LaF_3 foi coletada por uma objetiva de 50X localizada em frente a ótica utilizada para focalizar a radiação laser em 808 nm. A luminescência foi coletada pela objetiva e espectralmente analisada por um espectrômetro de alta resolução conectado a um detector InGaAs sendo, portanto, possível determinar simultaneamente as intensidades das três linhas de emissão do Nd^{3+} e como elas são atenuadas pelo tecido sintético. Este arranjo experimental nos permitiu colocar um tecido sintético de espessura variável entre a amostra (suspensão coloidal de NPs) e o sistema de detecção óptica.

As profundidades de penetração alcançadas para as diferentes bandas de emissão do íon de Nd^{3+} foram obtidas mediante o monitoramento da luminescência gerada no centro do feixe de excitação em 808 nm para diferentes espessuras do tecido. Esse

microscópio de feixe duplo também foi utilizado para avaliar a resolução espacial que pode ser alcançada com o uso das três bandas de emissão das NPs de Nd^{3+} (15 mol.%): LaF_3 . Para isto, por meio da objetiva do microscópio realizamos um mapeamento linear sobre o *spot* de excitação, como pode ser visto na Figura 23(b). O material utilizado para simular as propriedades ópticas do tecido mucoso ou “gordo” nos experimentos de profundidade de penetração óptica foi a solução de Intralipid® 10% (seguindo, portanto, o mesmo padrão dos trabalhos citados na literatura que tratam de propagação da luz no interior de tecidos na II-JB) [28, 32, 33].

Figura 23: (a) Diagrama esquemático do microscópio de fluorescência de feixe duplo utilizado nas medições intratecido. Note que entre as NPs luminescentes de Nd^{3+} : LaF_3 e sistema óptico de aquisição é colocado um tecido sintético de espessura variável. (b) Vista superior esquemática da amostra contendo as NPs de Nd^{3+} : LaF_3 . São indicadas a localização e a extensão espacial do feixe de excitação em 808 nm como também o “*spot*” coletado e analisado. Através do mapeamento unidimensional da objetiva, é possível avaliar a resolução espacial intratecido alcançada pelas três diferentes bandas de emissão dos íons de Nd^{3+} .

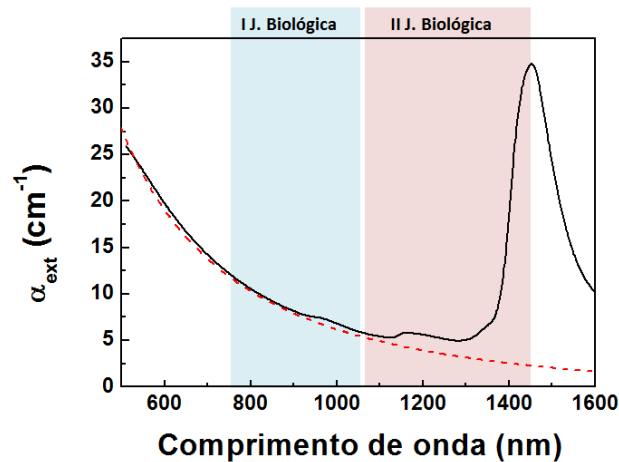


Fonte: Autor, 2014.

O Intralipid® é um meio dispersivo e absorvedor que geralmente é utilizado para simular as propriedades ópticas da pele humana na I e II janelas biológicas. Nesta tese

foi utilizado o Intralipid® 10% cujo coeficiente de extinção (obtido através de um espectrômetro de absorção Perkin Elmer Lambda de feixe duplo) é mostrado na Figura 24.

Figura 24: Dependência do coeficiente de extinção com o comprimento de onda do Intralipid®. A linha tracejada indica a contribuição estimada do coeficiente de espalhamento para o coeficiente de extinção.



Fonte: Autor, 2014.

Para comprimentos de onda curtos o coeficiente de extinção do Intralipid® é dominado pelo coeficiente de espalhamento da luz, fator que é fortemente dependente do comprimento de onda utilizado e da região biológica estudada. Em nosso caso, observamos que o coeficiente de extinção na região espectral de 500-600 nm (região onde o espalhamento pode ser considerado dominante) pode ser descrito por uma dependência de λ^{-2} (ver linha pontilhada na Figura 24). Esta dependência do comprimento de onda é semelhante aos resultados previamente publicados de vários tecidos humanos [20, 21, 28, 34, 35]. Para comprimentos de onda grandes (>1200 nm) o coeficiente de extinção aumenta fortemente devido à presença da banda de absorção da água [11]. O coeficiente de extinção, α_{ext} , de qualquer tecido é a soma dos coeficientes de absorção (α_{abs}) e espalhamento (α_{esp}), isto é:

$$\alpha_{ext} = \alpha_{abs} + \alpha_{esp} \quad (6.2)$$

Se assumirmos que o valor do α_{esp} pode ser extraído do ajuste exponencial (correspondente a λ^{-2}) feito no espectro da Figura 24, então, podemos facilmente obter

os valores dos coeficientes α_{ext} , α_{abs} e α_{esp} das emissões em torno de 910, 1050 e 1330 nm, correspondem as três emissões geradas no IV pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Os valores desses coeficientes estão listados na Tabela 3.

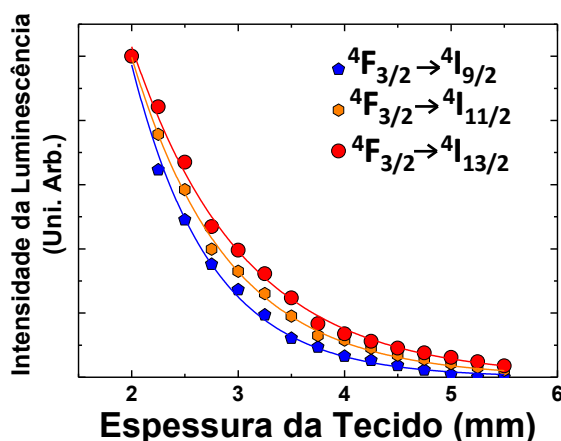
Tabela 3: Coeficientes de extinção, absorção e espalhamento do Intralipid® obtidos a partir da Figura 24 para os três canais de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$.

<i>Transição</i>	${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$	${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$	${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$
$\lambda_{med.}$	910 nm	1050 nm	1330 nm
$\alpha_{ext} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	7,9	6,0	5,0
$\alpha_{abs} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	0,3	0,5	2,0
$\alpha_{esp} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	7,6	5,5	3,0

Fonte, Autor 2014.

A Figura 25 mostra as intensidades luminescentes coletadas a partir das três bandas de emissão do Nd^{3+} em função da espessura do tecido sintético.

Figura 25: Intensidade da luminescência intratecido em função da espessura do tecido sintético obtido para os três canais de emissão dos íons de Nd^{3+} . Os pontos são dados experimentais e a linha tracejada é um guia para os olhos.



Fonte: Autor, 2014.

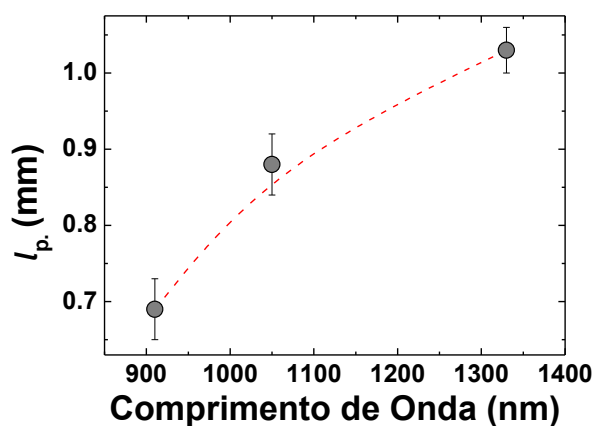
Em todos os casos (para os três comprimentos de onda), as intensidades emitidas decresceram com comportamentos muito similares em função do aumento da espessura do tecido, indicando que as três bandas de emissão são atenuadas dentro do tecido

sintético, quer seja por processos de absorção, ou por processos de espalhamento ou ainda pela combinação de ambos. Os resultados apresentados na Figura 25 claramente concordam com os dados obtidos para os coeficientes ópticos incluídos na Tabela 3. Evidenciando que nem o coeficiente de absorção e nem o coeficiente de espalhamento atenua completamente qualquer uma das três emissões.

6.4.1 Resolução Espacial versus o Comprimento de onda de Emissão (λ_{Med})

Os resultados obtidos para as profundidades de penetração óptica em função do pico do comprimento de onda de emissão são mostrados na Figura 26, foram obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais incluídos na Figura 25 para um decaimento exponencial simples onde os pontos representam os dados experimentais e a linha pontilhada é apenas para guiar os olhos.

Figura 26: Profundidades de penetração óptica obtidos em função do comprimento de onda de emissão médio das NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$, obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais incluídos na Figura 25 para um decaimento exponencial simples. Os pontos são dados experimentais e a linha tracejada é um guia para os olhos.



Fonte: Autor, 2014.

Os valores obtidos a partir dos melhores ajustes para profundidade de penetração de cada banda de emissão correspondentes às transições ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ (910 nm), ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ (1050 nm) e ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ (1330 nm), estão listado na Tabela 4. Como pode ser observado, a profundidade de penetração óptica é maior para maiores comprimentos de onda, como previsto pela Figura 24.

Tabela 4: Comparação dos valores de profundidade de penetração alcançada para cada comprimento de emissão médio.

<i>Transição</i>	${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$	${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$	${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$
$\lambda_{med.}$	910 nm	1050 nm	1330 nm
Profun. De Penetração (mm)	0,69	0,88	1,22

Fonte: Autor, 2014.

É evidente que a profundidade de penetração obtida em nossas condições experimentais, aumenta progressivamente com o comprimento de onda utilizado. De fato, a profundidade de penetração alcançada pela emissão em 1330 nm é cerca de 40% maior do que a profundidade obtida utilizando a banda de emissão em 910 nm, como pode ser observado na Figura 26.

Podemos agora comparar os resultados experimentais obtidos para profundidade de penetração óptica com aqueles deduzidos a partir da teoria da difusão para a propagação da luz em meios túrbidos (ver equação 6.3), a equação 6.3 geralmente é utilizada para descrever a transferência de energia do laser para os tecidos [33, 36, 37]. Tal teoria prevê que quando a absorção é dominada pelo coeficiente de espalhamento, a profundidade de penetração óptica, l_p , é determinada pelos coeficientes de absorção e dispersão de acordo com a seguinte expressão:

$$l_p = [3\alpha_{abs} \cdot (\alpha_{abs} + \alpha_{esp})]^{-1/2} \quad (6.3)$$

Se utilizarmos os valores da Tabela 3, a expressão (6.3) prevê as seguintes profundidades de penetração: 3.8, 3.3 e 1.8 mm para as respectivas transições ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ (910 nm), ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ (1050 nm) e ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ (1330 nm). Estes valores supeestimam os resultados obtidos anteriormente. Contudo, as profundidades de penetração previstas pela expressão (6.3) seguem uma tendência oposta aos resultados encontrados experimentalmente para profundidade de penetração do comprimento de onda médio (λ_{med}). Embora a aplicação da teoria de difusão necessite de uma determinação individual dos parâmetros da absorção e espalhamento, gostaríamos de salientar que a principal razão da discrepância entre os resultados deve-se ao fato de que a expressão (6.3) foi deduzida assumindo um feixe laser colimado (feixe laser de propagação), enquanto, que no nosso caso estamos longe de satisfazer essa condição.

Lembramos que, em nosso aparato experimental usamos peças ópticas com valores das aberturas numéricas altos para coletar a luminescência.

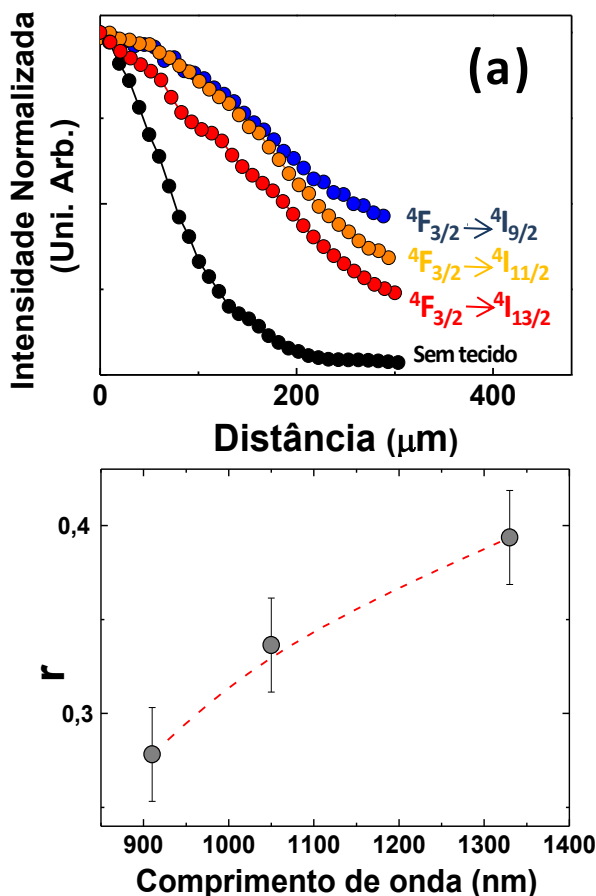
Por esta razão, temos estimado a profundidade de penetração, simplesmente como o inverso do coeficiente de extinção (isto é, $l_p = \alpha_{ext}^{-1}$) cujos valores são: 1.3, 1.7 e 2.0 mm para as respectivas transições ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$, ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ e ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ [38]. Note que estes valores são bem mais próximos dos valores obtidos experimentalmente. Portanto, podemos concluir (até este ponto) às aplicações ópticas de imageamento intratecido envolvendo feixe laser não colimado, o fenômeno de espalhamento desempenha um papel importante (dominante) na determinação do limite da profundidade de penetração óptica. Portanto, nossos resultados experimentais fornecem evidências de que a profundidade de penetração óptica obtida usando NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$ pode ser melhorada usando as bandas de luminescência, ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ (1050 nm) e ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ (1330 nm), situadas na segunda janela biológica. Pois a baixa influencia do coeficiente de espalhamento típico de tecidos na região da II-JB, pode compensar a característica dominante do coeficiente de absorção devido aos picos de absorção da água (ver Tabela 3), permitindo que a luz alcance maiores distâncias para a profundidade de penetração.

O fenômeno de espalhamento óptico, não afeta somente a profundidade de penetração óptica reduzindo a capacidade de penetração da luz no tecido, mas também afeta a resolução das imagens por fluorescência intratecido. O fenômeno de espalhamento faz com que os fótons gerados, inicialmente a partir da mesma posição dentro do objeto (ponto de luminescência), atinjam o plano da imagem em locais diferentes e reduzindo então a resolução espacial da imagem por fluorescência. Espera-se, portanto, que a resolução das imagens por fluorescência a certa profundidade em tecidos seja melhorada ao deslocarmos a fluorescência detectada para regiões espectrais onde o coeficiente de espalhamento é mínimo.

Da Tabela 3, notamos como as variações significativas dos valores de α_{esp} afeta cada um dos três canais de emissão, pois o α_{esp} em 1330 nm (comprimento de onda de emissão associado ao canal ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$) é menos da metade do coeficiente de espalhamento em 910 nm (correspondente à transição ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$). Indicando que a resolução das imagens por fluorescência obtidas usando NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$ é fortemente dependente do canal de emissão usado para o imageamento. Para verificar esta afirmação, usamos o arranjo experimental descrito pela Figura 23(a). A amostra foi

colocada na região focal do feixe laser em 808 nm, criando então um “ponto de luminescência” sobre a amostra. O raio do feixe na amostra foi determinado através da aquisição da variação espacial da luminescência gerada pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (ou seja, obtido por um mapeamento linear feito através da varredura da objetiva, que coleta a luminescência conforme ilustrado na Figura 23(b)). Tamanho real do “ponto de luminescência” gerado pelas NPs dopadas com íons Neodímio foi inicialmente medido sem a presença do tecido sintético. Os resultados estão incluídos na Figura 27(a).

Figura 27: (a) Perfis de intensidade de fluorescência intratecido das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando opticamente excitadas por um feixe laser sintonizado em 808 nm como descrito esquematicamente na Figura 23(b). Os dados experimentais obtidos para cada um dos três canais de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ são incluídos, assim como o perfil de intensidade obtido na ausência do tecido sintético o qual fornece o tamanho radial real do feixe (*spot*) de excitação 808 nm. (b) Razão da resolução, como definido no texto, em função dos três comprimentos de onda de emissão médios correspondentes aos três canais de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Os pontos representam os dados experimentais e a linha tracejada é apenas um guia para os olhos.



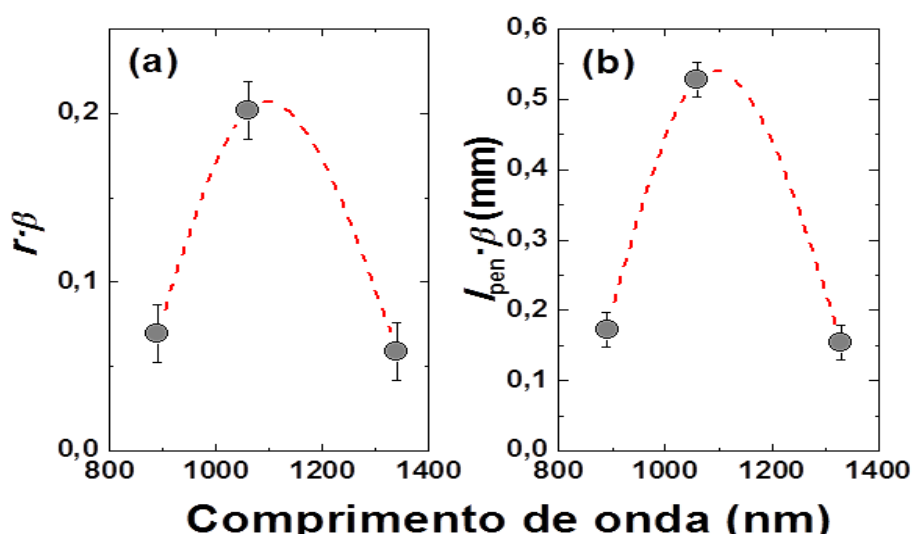
Fonte: Autor, 2014.

A partir dos dados experimentais estimamos o tamanho real do “spot” de luminescência, w_{real}^{spot} , como sendo 150 μm medida da largura a meia altura (em inglês FWHM). Logo após isto, colocamos um tecido sintético de 1 cm de espessura (entre a amostra e a objetiva, ver Figura 24) e coletamos a luminescência gerada pelo “spot” de luminescência. Na presença do tecido sintético, foi observado que o tamanho medido do “spot” de luminescência, calculado a partir dos perfis de intensidade da fluorescência, era fortemente dependente do canal de emissão sob monitoramento, como mostra a Figura 27(b). É notório que o perfil de intensidade mais similar ao perfil real (isto é, na ausência de tecido *phantom*) foi o proveniente do canal de emissão ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ (1330 nm). Os valores obtidos para o tamanho do *spot* intra-tecido, w_{medido}^{spot} , foram 520, 430 e 360 μm , estimados a partir dos perfis de intensidade das respectivas emissões (${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ (910 nm), ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$ (1050 nm) e ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ (1330 nm)). Vamos agora, definir um parâmetro importante o *fator de resolução*, r , como a razão entre o tamanho do *spot* real e o *spot* medido, ou seja, $r = w_{real}^{spot} / w_{medido}^{spot}$. Foi observado que este fator (veja a Figura 27(b)) aumenta com o comprimento de onda de emissão médio, indicando que a resolução espacial do imageamento óptico de fluorescência intratecido por meio das NPs dopadas com íons de Nd^{3+} pode ser melhorada se for utilizada as emissões em 1330 nm (${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$) ou em 1050 nm (${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{11/2}$) em vez da emissão em 910 nm (${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$), ou seja, a resolução é melhorada substancialmente usando as linhas de emissão situadas na II *janela biológica*.

Podemos extrair das Figuras 25, 26 e 27 que quanto maior for o comprimento de onda de emissão médio da transição dos íons de Neodímio, maior será a profundidade de penetração e ampla (alta qualidade) será a resolução espacial obtida durante o imageamento por fluorescência intratecido. Desta forma, ambos os resultados (ver Figuras 25, 26 e 27) parecem indicar o canal de emissão ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ (1330 nm) como ideal para bioimagem intratecido. Por outro lado, a qualidade final da imagem fluorescente intratecido não dependerá somente da profundidade de penetração e da resolução espacial, mas também da intensidade da fluorescência usada para realizar o imageamento. O nível da intensidade de fluorescência pode influenciar tanto no contraste da imagem como no tempo de integração necessário que garante uma ótima relação sinal ruído (geralmente são preferidos tempos de integração pequenos, para minimizar ou evitar o dano induzido pelo laser no tecido biológico).

De fato, como evidenciado pela Figura 18 a intensidade das três transições de fluorescência originárias do estado metaestável $^4F_{3/2}$ está longe de ser homogênea, uma vez que a intensidade relativa de cada banda é, de fato, dada pelas correspondentes razões de ramificações (β). Deste modo, o caminho para conseguir bioimagens fluorescentes de alta qualidade passa pela otimização/ajuste simultâneo do β , da profundidade de penetração e da resolução espacial. Portanto, propomos que o canal de emissão ideal para o bioimagem intratecido seja aquele que obtiver o máximo em ambos os produtos, $\beta \cdot l_p$ e $\beta \cdot r$. Como demonstrado pela Figura 28 à otimização de ambos os produtos é alcançada pelo canal de emissão $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$ (associado ao comprimento de emissão média 1050 nm). Finalmente, sugerimos que as melhores imagens por fluorescência intra-tecido mediante as NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$ seja obtida ao monitorar a emissão $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$ em torno de 1050 nm.

Figura 28: (a) $\beta \cdot l_{pen}$ e (b) $\beta \cdot r$ produtos obtidos para os três comprimentos de onda de emissão das NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$. Os pontos são dados experimentais e as linhas tracejadas são guias para os olhos.



Fonte: Autor, 2014.

6.5 Imagiamento Óptico *in Vitro* na II-Janela Biológica

6.5.1 Célula Utilizada para Imagiamento *in vitro*

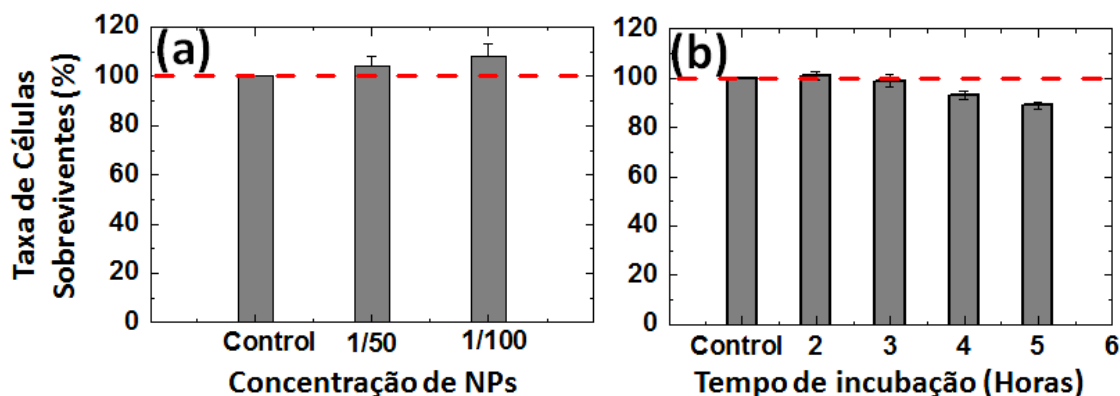
Henrietta Lacks, americana de 30 anos havia sido diagnosticada com um câncer no colo do útero que a minava por dentro. Negra, pobre e mãe de 5 filhos, Henrietta morava em Baltimore, no sul dos EUA, durante o período de segregação racial. Estava

internada no único hospital do estado que atendia negros e seu corpo não respondia mais aos tratamentos. O câncer de Henrietta se espalhou rápido demais. Os médicos não conseguiam entender como os tumores haviam tomado os rins, a bexiga e boa parte dos intestinos em tão pouco tempo. No dia 4 de outubro de 1951, em meio a berros de dor, Henrietta morreu. Mas, por mais triste que seja foi sua morte que entrou para a história. Um pedaço de Henrietta sobreviveu e está vivo até hoje, graças ao trabalho do médico fisiologista George Gray que cultivou as células de tecido tumoral provenientes do corpo de Henrietta, estabelecendo a linhagem que hoje é denominada como HeLa, utilizada até os dias de hoje em todo mundo.

Essas células de carcinoma humano derivada de um cancro do colo do útero, HeLa, foram usadas nesta tese. As células HeLa foram rotineiramente cultivadas usando meio modificado por Dulbecco de Eagle (DMEM) contendo 10% (vol/vol) de soro fetal de vitelo (FCS), 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina. As culturas de células foram realizadas a 37 °C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e depois incubadas com a solução aquosa de Nd³⁺:LaF₃. A solução coloidal original (concentração em massa de 0,3%) foi diluída em PBS (1:10 em vol/vol). Após um tempo de incubação de 3 horas, as células foram novamente lavadas com PBS e colocadas em uma lâmina de microscópio. Em seguida, foram obtidas imagens fluorescentes com o microscópio confocal de fluorescência, como descrito anteriormente.

Para aplicações em medicina, um aspecto importante a ser considerado é a toxicidade dessas nanopartículas. Então, nós investigamos a viabilidade e/ou condição das células HeLa após a incubação com as NPs de Nd³⁺:LaF₃. Para isso, utilizamos o método de ensaio MTT, baseando-se na atividade de desidrogenase mitocondrial (ver seção 5.6). Os resultados da taxa de sobrevivência celular são mostrados na Figura 29 onde foram utilizados diferentes concentrações de NPs e diferentes tempos de incubação (ver Figura 29(a) e 29(b)). Como pode ser observado, nenhum sinal relevante de toxicidade foi encontrado, no que diz respeito a taxa de sobrevivência das células HeLa, mesmo após tempos de incubação de aproximadamente 5 horas (para estes tempos a taxa de sobrevivência celular foi perto dos 90%). Os resultados da Figura 29 indicam que as NPs de Nd³⁺:LaF₃ (com uma concentração molar de 15 mol.% de Nd³⁺) são dotadas de um alto grau de bio-compatibilidade.

Figura 29: (a) Percentagem de sobrevivência das células HeLa incubadas por um período de 1h com diferentes diluições de solução aquosa contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ com uma concentração inicial de 3 mg/mL. (b) Percentagem de sobrevivência da linha de células tipo HeLa com diferentes tempos de incubação com uma solução contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ na concentração de 0,03 mg/mL. Cada barra corresponde ao valor médio obtido a partir de três experiências diferentes.



Fonte: Autor, 2014.

6.5.2 Resultados: Imagiamento Óptico *in Vitro*

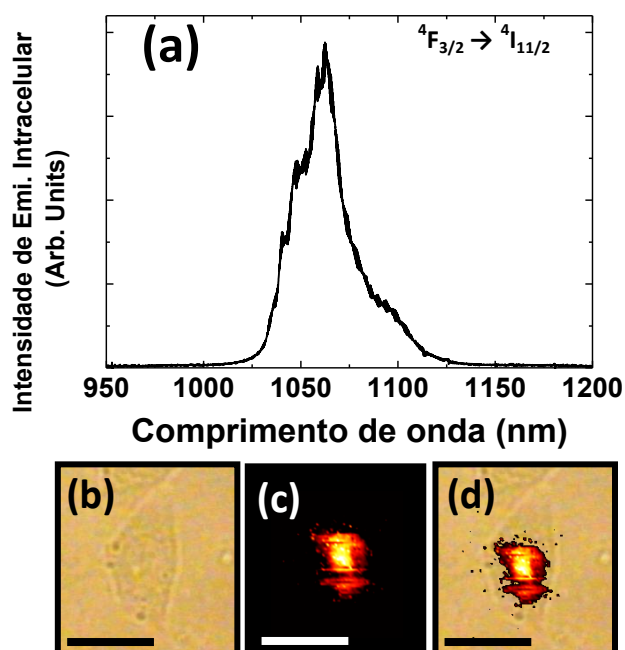
Como explicitado na seção anterior, nossos resultados indicam a banda de emissão em 1050 nm (${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{11/2}$) como a ideal para construção de bioimagens fluorescentes e até o momento não há evidência sobre o uso desta banda de emissão para tal finalidade. Por outro lado, é possível encontrar na literatura estudos *in vitro* e *in vivo* com nanopartículas dopadas com íons Nd^{3+} usando a transição ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$ (910 nm) para gerar contraste óptico [8]. No entanto, conhecemos que não há relatos do uso das NPsL de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ para bioimagem (nem *in vivo*, nem *in vitro*). Portanto, no intuito de apresentarmos evidências do potencial das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ para bioimagens na II segunda janela biológica, nós realizamos experimentos de imagiamento *in vitro* e *in vivo*.

Para realização dos experimentos *in vitro*, incubamos as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em células cancerosas do tipo Hela, como descrito na seção de métodos experimentais. Após a incubação, as células Hela foram examinadas em um microscópio confocal cuja fonte de excitação foi um laser de Ti:Safira (no modo CW) sintonizado em 808 nm e a fluorescência detectada foi espectralmente analisada (após passar por um monocromador, ver Figura 15) por um detector InGaAs (no intervalo de 1000 – 1200

nm). A radiação laser em 808 nm foi focalizada por uma objetiva de 50X, gerando um *spot* laser com diâmetro de aproximadamente um μm sobre a amostra.

A Figura 30 mostra o espectro de emissão de fluorescência obtido quando o feixe laser em 808 nm foi focalizado em uma única célula cancerosa. Como pode ser observado, a fluorescência intracelular mais intensa associada a banda de emissão característica dos íons de Nd^{3+} em 1050 nm é facilmente detectada. Isto indica que as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foram incorporadas com sucesso dentro das células com câncer. Provavelmente por um processo de endocitose (processo celular que ocorre na resposta imunológica do organismo, executado por macrófagos para degradar agentes patogênicos, tais como, moléculas, bactérias, vírus ou partículas pequenas, e que consiste em absorver e eliminar o intruso) [39].

Figura 30: (a) Espectro de emissão Intracelular obtido a partir de uma célula cancerosa de HeLa incubada com NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. (b) imagem óptica de transmissão de uma célula HeLa após incubação com $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. (c) A imagem por fluorescência da mesma célula cancerosa HeLa incluída em (b), obtida através da monitorização da distribuição espacial da intensidade de emissão ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$ em torno de 1050 nm. (d) Sobreposição das imagens (b) e (c) revelando que as NPs fluorescentes foram incorporadas dentro da célula cancerosa HeLa. A barra de escala em todas as imagens é de 20 μm .



Fonte: Autor, 2014.

Certos da incorporação intracelular das NPs dopadas com Nd^{3+} , podemos agora determinar a distribuição espacial das NPs dentro da célula HeLa. Para isto, medimos a distribuição espacial da intensidade da fluorescência em 1050 nm ao longo de toda a célula HeLa, mediante um mapeamento feito pelo feixe de excitação em 808 nm, sobre toda a área celular. A Figura 30(b) apresenta a imagem de transmissão óptica (uma imagem digital) de uma única célula HeLa sob investigação. Já a Figura 30(c) mostra a variação espacial da intensidade da fluorescência em 1050 nm gerada pelas NPs de lantânio dopadas com íons de Nd^{3+} . Para uma melhor compreensão a Figura 30(d) mostra a sobreposição de ambas as imagens (b) e (c), demonstrando que as NPs foram totalmente incorporadas dentro da célula cancerosa. Claramente é observado que as NPs ficaram mais concentradas próximo ao núcleo da célula e região onde se situa o complexo de Golgi, caracterizando uma distribuição não homogênea, concordando com estudos anteriores, revelando que a aglomeração intracelular de NPs ocorrerá para tempos de incubação moderados, tais como os tempos usados nesses estudos [40]. A Figura 30 constitui a primeira bioimagem de células cancerosas baseadas na emissão de fluorescência IV em 1050 nm (${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{11/2}$) de NPs dopadas com íon de Neodímio.

6.6 Imagiamento óptico *in Vivo* na II-Janela Biológica

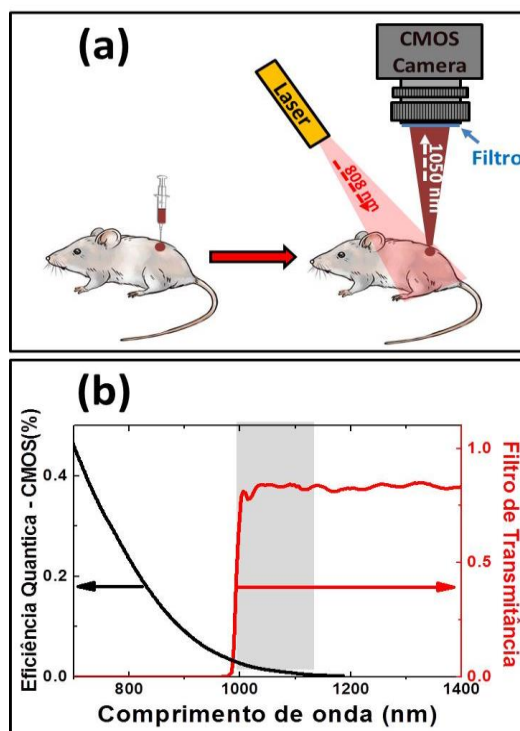
Para o desenvolvimento dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos da linha CD1, com nove semanas de idade e aproximadamente 35g de peso corporal. Para inoculação das nanopartículas e aquisição das imagens *in vivo*, os camundongos foram anestesiados pela via respiratória com a utilização de 2% de usuoflorano. As nanopartículas de Nd^{3+} (15 mol.%): LaF_3 foram inoculadas no animal de forma intravenosa, subcutânea e intramuscular caracterizando experimentos de imagiamento fluorescente a três profundidades diferentes. O volume da suspensão coloidal de NPs de Nd^{3+} (15 mol.%): LaF_3 (dispersas em PBS - Phosphate Buffered Saline) injetada em todos os casos foi de 50 μL , com uma concentração final em massa de NPs de 1 mg/mL.

6.6.1 Resultados: Imagiamento óptico *in vivo*

Motivados pelos bons resultados obtidos nos experimentos de imagiamento *in vitro*, direcionamos nossa atenção para os experimentos *in vivo*. Para este propósito, a fim de buscar um parâmetro de comparação e/ou controle, antes de realizarmos os experimentos *in vivo*, determinamos a sensibilidade e profundidade de penetração

máxima intratecido do nosso sistema de imageamento simplificado. Inicialmente projetamos e desenvolvemos um sistema simplificado de imageamento no infravermelho próximo, como esquematicamente descrito na Figura 31(a). Basicamente, utilizamos uma câmera convencional *CMOS* (cuja resposta espectral é mostrada na Figura 31(b)) para aquisição das imagens em pequenos animais.

Figura 31: (a) Representação esquemática do *set-up* experimental desenvolvido para o imageamento de fluorescência *in vivo* na região espectral da segunda janela biológica baseado na emissão de 1050 nm das NPs $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. (b) a dependência espectral tanto da resposta espectral da câmara *CMOS* e como também do filtro utilizado durante o imageamento *in vivo*. Note que a combinação de ambas as curvas nos permite a detecção da luminescência (em 1050 nm) gerada a partir das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$.



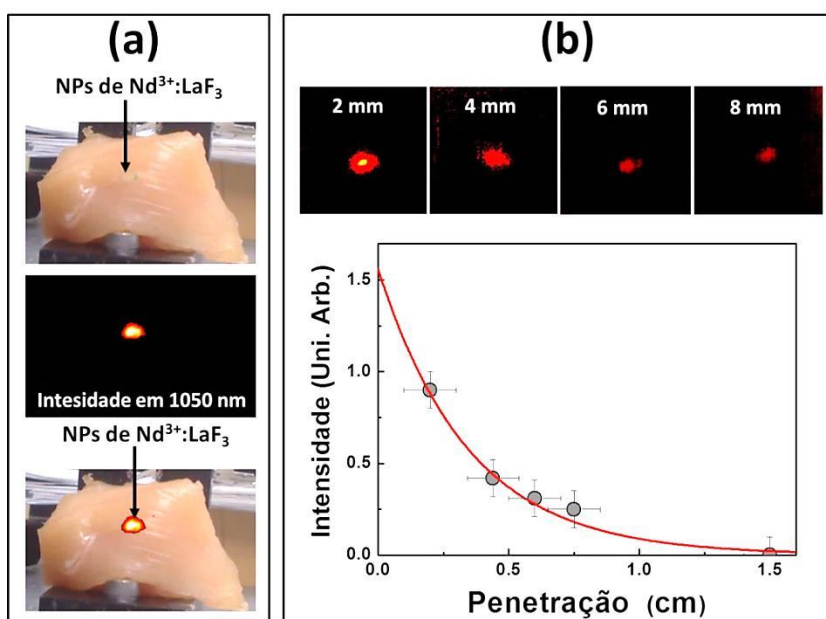
Fonte: Autor, 2014.

Para assegurar que as imagens fluorescentes eram tomadas somente em termos da variação espacial da intensidade de emissão em 1050 nm gerada a partir das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (identificada como o comprimento de onda ideal para o imageamento) foi utilizado um filtro *bandpass* com um limite de corte em 1000 nm. A combinação da resposta espectral da câmera *CMOS* com a transmitância do filtro em 1050, nos garantindo que apenas a fluorescência em 1050 nm atingia a câmera. Após a injeção das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ nos ratos de laboratório tipo (CD1), elas foram opticamente excitadas

por uma fibra acoplada ao laser de diodo sintonizado em 808 nm com uma densidade de potência de 1 W/cm^2 . Em todos os casos foi injetado $100 \mu\text{L}$ da solução coloidal (contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3 + \text{água}$) numa concentração de 3 mg/mL . A fim de buscar um parâmetro de comparação e/ou controle, antes de realizarmos os experimentos *in vivo*, determinamos a sensibilidade e profundidade de penetração máxima intratecido do nosso simplificado sistema de imageamento. Foram realizados experimentos sistemáticos *ex vivo*, onde foi injetado NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ no musculo peitoral de aves galiformes a diferentes profundidades.

A Figura 32(a) exhibe uma imagem digital do musculo peitoral de aves galiformes (daqui em diante iremos nos referir como musculo peitoral) utilizado nestes experimentos. A seta vermelha indica o local da injeção intratecido com a suspensão coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$.

Figura 32: (a) Parte Superior (lado esquerdo): Fotografia digital do “musculo peitoral” utilizado para os experimentos *ex vivo*; o local da injeção intratecido das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ está indicado por uma seta. No meio: Imagem fluorescente infravermelho em 1050 nm do tecido muscular, gerada a partir da injeção intratecido das NPs dopadas com Nd^{3+} . Parte Inferior: Sobreposição da fluorescência e imagem óptica do tecido muscular peitoral, revelando que o sinal de luminescência é gerado apenas no local onde foi feita a injeção. (b) Parte Superior (lado direito): imagens fluorescentes infravermelho do músculo peitoral obtidos para diferentes profundidades de injeção. Parte inferior: Intensidade integrada da luminescência em função da profundidade da injeção. Os pontos são dados experimentais e a linha sólida é o ajuste mais adequado para um decaimento mono-exponencial.



Fonte: Autor, 2014.

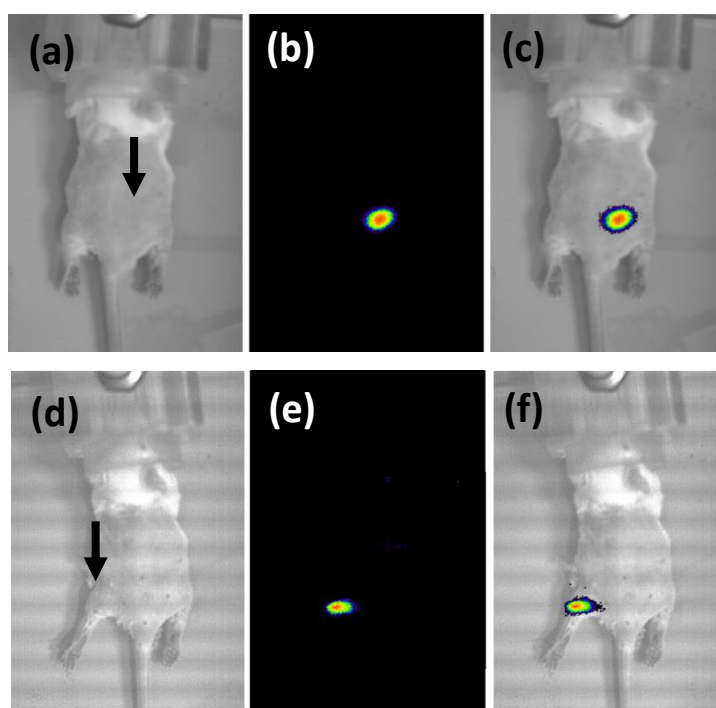
A imagem do meio mostra a imagem no IV capturada pelo sistema câmera + filtro quando o musculo peitoral foi iluminado pelo laser de diodo em 808 nm. Esta imagem por fluorescência, claramente indica a região onde foi injetada a solução contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ pela presença notória de um ponto brilhante (ver a imagem inferior da Figura 32 (a)). As imagens mostradas na Figura 32(a) foram obtidas para certo volume de NPs injetados a aproximadamente 2 mm de profundidade, resultando numa grande proporção sinal ruído.

A fim de obter uma estimativa das profundidades de penetração alcançadas pela banda de fluorescência em 1050 nm das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ no tecido animal *ex vivo*, injetamos a mesma quantidade da solução contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em diferentes profundidades com relação a superfície do tecido animal (*musculo peitoral*). As imagens obtidas em função da profundidade da injeção estão na Figura 32(b). Nesta figura, os pontos são os dados experimentais obtidos a partir das imagens fluorescentes com emissão em 1050 nm, a linha sólida é o ajuste para um decaimento exponencial mais adequado. A partir destes ajustes determinamos que o comprimento de penetração óptica é de $\sim 0,32$ cm. Embora seja claro a possibilidade de obter imagens fluorescentes no IV com alta razão sinal/ruído com de injeções até um cm.

Os resultados apresentados na Figura 32 são bastante encorajadores, sugerindo que as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ podem ser potencialmente utilizadas para aplicações de imagens reais *in vivo*. Para verificação desta afirmação, nós injetamos de forma subcutânea cerca de 100 μL de uma suspensão coloidal (PBS + NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$) em um rato fêmea CD1 anestesiado com isoflurano e com os pelos devidamente raspados. Estimamos que a profundidade da injeção subcutânea (região onde as NPs foram depositadas) foi ~ 2 mm. Após a injeção, o animal foi mapeado através do aparato experimental descrito na Figura 31.

A Figura 33(b) mostra a imagem fluorescente gerada a partir da injeção subcutânea das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ usando a emissão em 1050 nm. A imagem foi obtida com alto contraste, consistindo entre o “ponto luminescente” e o fundo negro. O “ponto luminescente” foi atribuído ao local onde as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foram injetadas (ver a sobreposição das imagens na Figura 33(c)). Embora todo o corpo do animal tivesse sido iluminado com a radiação laser em 808 nm, nenhum sinal de luminescência foi obtido das outras regiões do rato, isto é, nenhum sinal de tecidos autofluorescentes contribuiu para formação da imagem fluorescente.

Figura 33: (a) mostra a imagem digital de um rato no qual foi feito a injeção subcutânea. A região onde as NPs foram injetadas é indicada pela seta de cor preta. (b) Imagem fluorescente no IV foi obtida a partir da emissão em 1050 nm, gerada pela injeção subcutânea (no rato) das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando opticamente excitadas por um laser de diodo em 808 nm. (c) Sobreposição das imagens (a) e (b): digital e fluorescente. (d) mostra a imagem digital de um rato no qual foi feito a injeção subcutânea. O local da injeção é indicado pela seta de cor preta. (e) Imagem fluorescente no IV em 1050 nm gerada a partir da NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ injetadas de forma intramuscular em um rato quando opticamente excitadas com um laser de diodo em 808 nm. (f) Sobreposição das imagens (d) e (e): digital e fluorescente.



Fonte: Autor, 2014

A fim de verificarmos a possibilidade do uso das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em aplicações de imageamento *in vivo* em grandes profundidades (ou seja, marcas superiores a 2 mm), realizamos injeções intramusculares em um segundo rato. Neste caso foi injetado 100 μL de uma suspensão coloidal (PBS + NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$) com uma concentração de 3mg/mL de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em um dos músculos da perna do animal (ver Figura 32(d)). A profundidade estimada da injeção intramuscular foi estimada em 4 mm. A imagem fluorescente no IV correspondente a injeção intramuscular no rato é mostrada na Figura 33(e). Mais uma vez, a imagem apresenta alto contraste e nenhuma evidência de qualquer autofluorescência, indicando que o

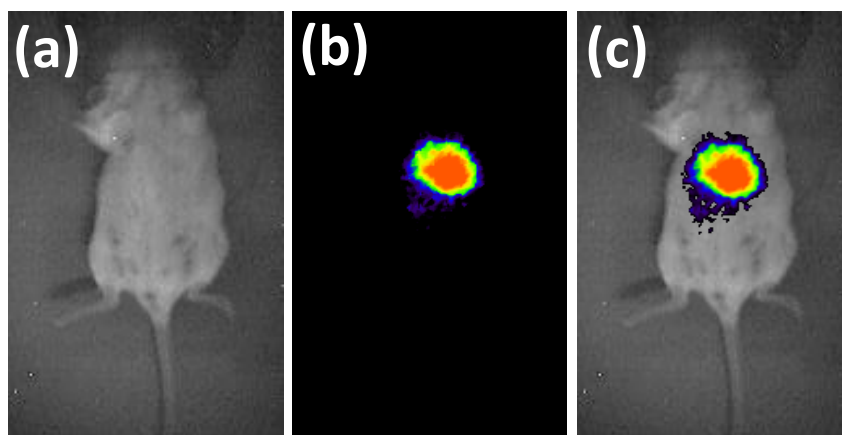
surgimento da luminescência no IV é proveniente apenas das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ injetadas na perna do animal (ver a sobreposição das imagens na Figura 33(f)).

É importante salientar que o comprimento de penetração máximo (~ 1 cm) alcançado para aquisição das imagens com as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ não constitui um limite da penetração óptica para essas NPs. Por exemplo, este valor não pode ser comparado ao valor de 3,2 cm com o uso das nanopartículas *core* ($\text{NaYbF}_4:\text{Tm}^{3+}$)/*shell* (CaF_2) no imageamento intratecido (em tecido animal *ex vivo*, nesse caso porco), pois tais medidas foram tomadas em condições experimentais bastantes diferentes daquelas usadas em nosso trabalho [33]. De fato, a profundidade por nós obtida pode, com certeza, ser melhorada ao usarmos um sistema de detecção mais sofisticado em relação ao sistema que foi utilizado ou por um ligeiro aumento da densidade de potência do laser em 808 nm. No entanto, com o intuito de vislumbrar a aquisição de imagens reais intracampo de animais vivos (*in vivo*), temos finalmente obtido imagens fluorescentes intracampo, através de uma injeção intravenosa (feita através do seio venoso retro-orbital do rato) de 50 μL da suspensão coloidal (PBS + NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$) a uma concentração de 1 mg/mL de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$.

A Figura 34(b) mostra uma imagem fluorescente de todo o corpo do animal, cerca de uma hora após as NPs serem injetadas. Nesse experimento, usamos como sistema de detecção uma câmera InGAAs IV, ao invés da câmera CMOS utilizada anteriormente, de modo que um maior o ganho da intensidade de luminescência foi obtido na região espectral de 1000-1100 nm.

Note que, mais uma vez obtemos uma imagem fluorescente de alto contraste. Contudo, os resultados obtidos neste experimento ainda são considerados preliminares. Não obstante, a partir da análise da imagem sobreposta (digital e fluorescente) podemos afirmar que as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ provavelmente estão situadas no fígado ou no baço do animal (ver Figura 34(c)). O que de fato, concorda com trabalhos publicados na literatura sobre imagens fluorescentes geradas a partir da administração de NPs luminescentes de forma intravenosa [41, 42]. Além disso, os camundongos nos quais foram injetadas as NPs não apresentaram qualquer evidência de efeitos adversos (não apresentaram stress, dor ou perda de peso), durante duas semanas. Este resultado, em combinação com estudos de toxicidade *in vitro* apresentados nesta tese, suporta a baixa toxicidade (biocompatibilidade) das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (dopadas com 15 mol.% de neodímio) por nós utilizadas.

Figura 34: (a) Imagem óptica de um rato após a administração por via intravenosa através do seio venoso retro-orbital de 50 μL de uma suspensão coloidal de nanopartículas de Nd^{3+} (15 mol.%): LaF_3 diluída em fosfato salino (PBS). A concentração de NPs nesta solução foi de 1 mg/mL. (b) Imagem fluorescente no IV do corpo inteiro de um rato, obtida uma hora após a injeção. O Rato foi iluminado por um feixe laser expandido. (c) Sobreposição de ambas as imagens: digital e fluorescente.



Fonte: Autor, 2014.

6.7 Conclusões

Neste capítulo investigamos sistematicamente as propriedades de luminescência das nanopartículas core-shell de LaF_3 dopadas com íons de Nd^{3+} . Quando opticamente excitadas na primeira janela biológica (808 nm) essas NPs apresentam bandas de emissão dos íons de Nd^{3+} muito intensas em torno de 885, 1060 e 1340 nm, localizadas na primeira e segunda janelas de transparência dos tecidos humanos, ou seja, situadas na chamada *primeira e segunda janelas biológicas*. A espectroscopia de Lente Térmica foi usada para obter a eficiência quântica de fluorescência (η) do nível metaestável $^4\text{F}_{3/2}$ do íon de Nd^{3+} em função da concentração de íons. As amostras menos dopadas apresentaram valores de η de ~80%, indicando essas NPs como altamente eficientes e com um quenching de concentração relativamente baixo, pois a amostra mais dopada ainda apresentou um valor relativamente alto de η , o qual foi atribuído à estrutura core-shell que blinda os íons de Nd dos processos de transferência de energia, permitindo o uso de altas concentrações de íons sem alterar a estrutura cristalina da matriz. Foi ainda verificado que na concentração de ~15 mol% de Nd^{3+} o brilho da luminescência é otimizado, ou seja, essa é a concentração ideal para imageamento fluorescente

(concentração na qual o aumento da absorção compensa a redução de η). A partir desta condição ideal de dopagem, realizamos experimentos de profundidade de penetração óptica em tecido sintético e foram obtidos resultados com profundidade de penetração de $\sim 2,0$ mm [10], isso com excitação por um fóton. Esse valor é significativamente maior que o comprimento de penetração atingido usando Quantum Dots semicondutores de CdTe sob excitação por dois fótons e emitindo também no infravermelho.

Em resumo, avaliamos o uso das nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (dopadas com 15 mol.% de Nd^{3+}) como agentes de contraste de imagens fluorescentes no infravermelho tanto *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Quando opticamente excitadas com uma radiação laser em 808 nm tais NPs apresentam três bandas de emissão em torno de 910, 1050 e 1330 nm, todas surgindo a partir do estado metaestável $^4\text{F}_{3/2}$ dos íons de Nd^{3+} . Observamos que entre essas três transições fluorescentes a mais intensa é a em torno de 1050 nm, e a mesma é especialmente adequada para o bioimagem intratecido por fluorescência. Além disso, a transição $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2}$ (1050 nm) está situada na região espectral da segunda janela biológica onde, simultaneamente, os tecidos biológicos apresentam coeficientes de espalhamento e absorção pequenos. Esta banda de fluorescência “ideal” foi utilizada para obter imagens de alto contraste fluorescente no infravermelho para o caso *in vitro* (células HeLa de cancro), demonstrando uma baixa toxicidade a nível celular. No mesmo sentido, os resultados obtidos nos experimentos *ex vivo* a partir da emissão fluorescente no IV das NPs dopadas com íons de Nd^{3+} , onde relatamos a possibilidade de aquisição de imagens a uma profundidade de 1 cm, foi essencial para o nosso próximo passo. Finalmente, também obtivemos as primeiras imagens fluorescentes *in vivo* usando nanopartículas dopadas com íons de neodímio emitindo na segunda janela biológica sob excitação óptica em 808 nm. As imagens *in vivo* foram geradas com alto contraste, e sem nenhuma contribuição de qualquer autofluorescência apreciável.

Consequentemente, evidenciamos que a linha de emissão em 1050 nm das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ surge como uma poderosa ferramenta para geração de imagens fluorescentes de grande penetração *in vivo*. Portanto, os resultados apresentados neste trabalho, juntamente com a sua potencial capacidade para o sensor de temperatura (tais resultados serão apresentados no capítulo sete) faz das nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ promissoras nanosondas multifuncionais para imagens de fluorescência *in vivo* com larga aplicação na biomedicina.

REFERÊNCIAS

- [1] Powell, R. C. *Physics of Solid-State Laser Materials*. Springer-Verlag: New York **1998**.
- [2] Santos, D. R. S.; Santos, C. N.; Camargo, A. S. S.; Silva, W. F.; Santos, W. Q.; Vermelho, M. V. D.; Astrath, N. G. C.; Malacarne, L. C.; Li, S. M.; al., A. C. H. e. Thermo-Optical Characteristics and Concentration Quenching Effects in Nd³⁺ Doped Yttrium Calcium Borate Glasses. *J. Chem. Phys.* **2011**, 134, 124503.
- [3] Lupei, V.; Lupei, A.; Georgescu, S.; Taira, T.; Sato, Y.; Ikesue, A. The Effect of Nd Concentration on the Spectroscopic and Emission Decay Properties of Highly Doped Nd:YAG Ceramics. *Phys. Rev. B* **2001**, 64, 092102.
- [4] Shen, J.; Lowe, R. D.; Snook, R. D. A Model for CW Laser Induced Mode-Mismatched Dual-Beam Thermal Lens Spectrometry. *Chem. Phys* **1992**, 165, 385–396.
- [5] Jacinto, C.; Messias, D. N.; Andrade, A. A.; Lima, S. M.; Baesso, M. L.; Catunda, T. Thermal Lens and Z-scan Measurements: Thermal and Optical Properties of Laser Glasses. *J. Non-Cryst. Solids* **2006**, 352, 3582–3597.
- [6] Maestro, L. M.; Jacinto, C.; Rocha, U.; Cruz, M. C. I.; Sanz-Rodriguez, F. Optimum Quantum Dot Size for Highly Efficient Fluorescence Bioimaging. *J. Appl. Phys* **2012**, 023513.
- [7] Cruz, R. A.; Pilla, V.; Catunda, T. Quantum Yield Excitation Spectrum (UV-visible) of CdSe/ZnS Core-Shell Quantum Dots by Thermal Lens Spectrometry. *J. Appl. Phys* **2010**, 107, 083504.
- [8] Chen, G.; Ohulchanskyy, T. Y.; Liu, S.; Law, W.-C.; Wu, F.; Swihart, M. T.; Ågren, H.; Prasad, P. N. Core/Shell NaGdF₄:Nd³⁺/NaGdF₄ Nanocrystals with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Downconversion Photoluminescence for Bioimaging Applications. *ACS Nano* **2012**, 6, 2969–2977.
- [9] Chen, G.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanophotonics and Nanochemistry: Controlling the Excitation Dynamics for Frequency Up- and Down-Conversion in Lanthanide-Doped Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 1474–1486.
- [10] Kumar, G. A.; Chen, C. W.; Ballato, J.; Riman, R. E. Optical Characterization of Infrared Emitting Rare-Earth-Doped Fluoride Nanocrystals and Their Transparent Nanocomposites. *Chem. Mater.* **2007**, 19, 1523-1528.
- [11] Maestro, L. M.; Rodriguez, E. M.; Vetrone, F.; Naccache, R.; Ramirez, H. L.; Jaque, D.; Capobianco, J. A.; Solé, J. G. Nanoparticle for Highly Efficient Multiphoton Fluorescence Bioimaging. *Opt. Express* **2010**, 18, 23544–23553.
- [12] Sole, J. G.; Baussá, L. E.; Jaque, D. An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids. *Jhon Wiley & Sons: England* **2005**.
- [13] Rocha, U.; Jacinto da Silva, C.; Ferreira Silva, W.; Guedes, I.; Benayas, A.; Martinez Maestro, L.; Acosta Elias, M.; Bovero, E.; van Veggel, F. C.; Garcia Sole, J. A. Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles. *Acs Nano* **2013**, 7, 1188-1199.
- [14] Asawa, C. K.; Robinson M. Temperature-Dependent Concentration Quenching of Fluorescence by Cross Relaxation of Nd³⁺ in LaF₃. *Phys. Rev.* **1966**, 141, 251–258.

- [15] Campbell, J. H.; Suratwala, T. I. Nd-Doped Phosphate Glasses for High-Energy/high-Peak-Power Lasers. *J. Non-Cryst. Solids* **2000**, 263&264, 318 - 341.
- [16] Sun, W.; Cui, X.; Wang, Z.; Wei, W.; Peng, B. Luminescence Properties of Nd³⁺-Doped LaF₃ Nanocrystals with a Long Lifetime in Organic Solvents. *J. Mater. Chem* **2012**, 22, 6990-6993.
- [17] Pokhrel, M.; Ray, N.; Kumar, G. A.; Sardar, D. K. Comparative Studies of the Spectroscopic Properties of Nd³⁺: YAG Nanocrystals, Transparent Ceramic and Single Crystal *Opt. Mater. Express* **2012**, 2, 235-249.
- [18] Cubeddu, R., et al. Time-Resolved Imaging on a Realistic Tissue Phantom: μ s' and μ a Images versus Time-Integrated Images. *Appl. Opt.* **1996**, 35, 4533-4540.
- [19] Kobayashi, M., et al., Analysis of Nonlinear Relation for Skin Hemoglobin Imaging. *Opt. Express* **2001**, 9, 802–812.
- [20] Bashkatov, A.N., et al., Optical Properties of Human Skin, Subcutaneous and Mucous Tissues in the Wavelength Range from 400 to 2000 nm. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2005**, 38, 2543–2555.
- [21] Frangioni, J.V., In vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 626–634.
- [22] Marquez, G., et al., Anisotropy in the Absorption and Scattering Spectra of Chicken Breast Tissue. *Appl. Opt.* **1998**, 37, 798–804.
- [23] Semonin, O.E.; et al. Absolute Photoluminescence Quantum Yields of IR-26 Dye, PbS, and PbSe Quantum Dots. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 2445–2450.
- [24] Maestro, L. M.; et al., Absorption Efficiency of Gold Nanorods Determined by Quantum Dot Fluorescence Thermometry. *Appl. Phys. Lett.* **2012**, 100, 201110.
- [25] Campbell, J.H.; Suratwala T.I. Nd-Doped Phosphate Glasses for High-Energy/high-Peak-Power Lasers. *J. Non-Cryst. Solids* **2000**, 263&264, 318 - 341.
- [26] Santos, D.R.S.; et al. Thermo-Optical Characteristics and Concentration Quenching Effects in Nd³⁺ Doped Yttrium Calcium Borate Glasses. *J. Chem. Phys.* **2011**, 134, 124503.
- [27] Madsen, S.J.; Patterson, M.S.; Wilson, B.C. The Use of India Ink as an Optical Absorber in Tissue-Simulating Phantoms. *Phys. Med. Biol.* **1992**, 37, 985–993.
- [28] Welsher, K., S.P. Sherlock, and H. Dai, Deep-Tissue Anatomical Imaging of Mice Using Carbon Nanotube Fluorophores in the Second Near-Infrared Window. *PNAS* **2011**, 108, 8943-8948.
- [29] Dong, N.N.; et al. NIR-to-NIR Two-Photon Excited CaF₂: Tm³⁺, Yb³⁺ Nanoparticles: Multifunctional Nanoprobes for Highly Penetrating Fluorescence Bio-Imaging. *ACS Nano*, **2011**, 5, 8665-8671.
- [30] Gu, M.; et al. Comparison of Penetration Depth Between Two-Photon Excitation and Single-Photon Excitation in Imaging Through Turbid Tissue Media. *Appl. Phys. Lett* **2000**, 77, 1551-1553.
- [31] Helmchen, F.; Denk, W. Deep Tissue Two-Photon Microscopy. *Nat. Methods* **2005**, 2, 932-940.

- [32] Weissleder, R. A Clear Vision for In Vivo Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 316-317.
- [33] Chen, G., et al., (α -NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ Core/Shell Nanoparticles with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Upconversion for High-Contrast Deep Tissue Bioimaging. *ACS Nano* **2012**, 6, 8280-8287.
- [34] Michels, R., Foschum, F.; Kienle, A. Optical Properties of Fat Emulsions. *Opt. Expr.* **2008**, 16, 5907-5925.
- [35] Staveren, H.J.v.; et al. Light Scattering in Intralipid-10% in the Wavelength Range of 400 -1100 nm. *Appl. Opt.* **1991**, 30, 4507-4514.
- [36] Wu, J.; et al. Luminescent Europium Nanoparticles with a Wide Excitation Range from UV to Visible Light for Biolabeling and Time-Gated Luminescence Bioimaging. *Chem. Commun.* **2008**, 365–367.
- [37] Gai, S.; et al. Synthesis of Magnetic, Up-Conversion Luminescent, and Mesoporous Core–Shell-Structured Nanocomposites as Drug Carriers. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20, 1166-1172.
- [38] Prasad, P.N. Introduction to Biophotonics. *Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey*, **2003**.
- [39] Howland, J. Biochemistry. *By D. Voet and J. G. Voet. John Wiley and Sons, New York*, **1990**, 1223.
- [40] Vetrone, F.; et al. Intracellular Imaging of HeLa Cells by Non-Functionalized NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺ Upconverting Nanoparticles. *Nanoscale*, **2010**, 2, 495–498.
- [41] Kennedy, L.C.; et al. A new Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small* **2011**, 7, 169-183.
- [42] Khlebtsov, N.; Dykman, L. Biodistribution and Toxicity of Engineered Gold Nanoparticles: A review of in Vitro and in Vivo Studies. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1647-1671.

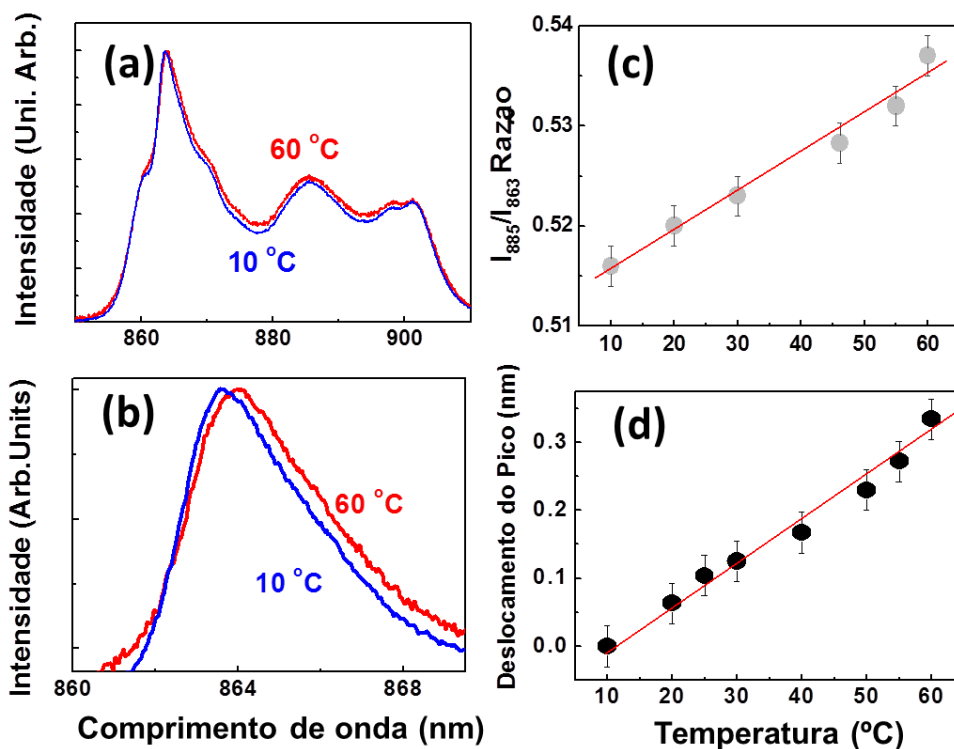
7 NANOPARTÍCULAS DE Nd³⁺:LaF₃ COMO NANOTERMÔMETROS LUMINESCENTES E NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS

Neste capítulo apresentaremos a viabilidade do uso das NPs de Nd³⁺:LaF₃ como nanotermômetros fluorescentes intratecido, observando a sensibilidade térmica presente na banda de emissão do Nd³⁺. No capítulo anterior propomos o uso destas NPs como agentes de contrastes para bioimagem fluorescente intratecido, tirando proveito de suas bandas de luminescência intensas e valor elevado da eficiência quântica de fluorescência. Com base na combinação dessas propriedades demonstramos, pela primeira vez, processo de aquecimento intratecido controlado por um único feixe (ou seja, processo de hipertermia intratecido), mediante o uso de uma dispersão coloidal mista formada pela combinação de NPs de Nd³⁺:LaF₃ e Nanobastões de Ouro (NBO), atuando como nanotermômetros e nanoaquecedores, respectivamente. E posteriormente, também pela primeira vez, demonstraremos como as NPs de LaF₃ com altas concentrações de íons de Nd³⁺ (até 25mol%) podem operar simultaneamente como nano-aquecedores eficientes e como nanotermômetros fluorescentes biologicamente compatíveis, sob excitação de um único feixe laser no infravermelho (808 nm), revelando o caráter multifuncional dessas NPs.

7.1 Nanopartículas de Nd³⁺:LaF₃ como Sensores Térmicos

Uma vez que demonstramos as propriedades de penetração óptica pelas NPs de Nd³⁺:LaF₃ nos tecidos, podemos agora avaliar o uso potencial destas NPs para sensoriamento térmico intratecido, o que exige conhecimentos das repostas térmicas da(s) banda(s) de luminescência. Para as investigações intratecido foi utilizado o mesmo aparato experimental da Figura 21. No entanto, agora o tecido sintético (ou *phantom tissue* (PT)) foi removido e um microcanal de 200 µL preenchido com a solução de NPs de Nd³⁺:LaF₃ com concentração molar de 15mol% de Nd³⁺ foi colocado sobre uma placa aquecedora (com a temperatura controlada com resolução de 0,1 ° C). A placa aqueceu o microcanal contendo a solução aquosa com NPs em um intervalo de temperatura de 10 até 60 °C. A Figura 35 mostra a forma de como a temperatura modifica o espectro de emissão luminescente das NPs de Nd³⁺:LaF₃. O aumento da temperatura influencia na relação de intensidade entre as transições (picos de emissão) como também na posição espectral da banda de emissão.

Figura 35: (a) Espectros de emissão normalizados das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtidos em 10 e 60 °C. (b) É evidenciado o desvio espectral induzido pela temperatura no pico de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em torno de 864 nm (obtidos em 10 e 60 °C). (c) Variação da razão entre as intensidades emitida de 863 e 885 nm com a temperatura. Os pontos são dados experimentais e a linha sólida é o melhor ajuste linear. (d) Deslocamento da emissão da principal linha espectral em torno de 864 nm em função da temperatura. Os pontos são dados experimentais e a linha sólida é o melhor ajuste linear.



Fonte: Autor, 2014.

A Figura 35(a) apresenta o espectro de emissão associado à transição ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ (900 nm), obtido a partir da solução coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopada com 15mol% de Nd^{3+} , nas temperaturas de 10 e 60 °C. A partir de uma primeira inspeção, é evidente que a o aumento da temperatura influência na relação de intensidade entres as transições (picos de emissão) da banda de emissão dessas NPs. Simultaneamente, ver Figura 35(b), o aumento da temperatura induz o deslocamento no pico espectral mais intenso em torno de 863 nm para maiores comprimento de onda, ou seja, um “*red-shift*”. Em ambos os casos os parâmetros ópticos (relação entre as intensidades de pico e posição espectral) exhibe um comportamento linear em relação ao aumento da temperatura na região de interesse para aplicação biológica (20-60 °C).

A partir de uma simples análises dos dados experimentais incluídos nas Figuras 35(c) e (d), podemos estimar a sensibilidade térmica (S) das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopadas com uma concentração de 15mol%. Para isso utilizamos a definição dada por V. Kumar aplicada a sensores luminescentes, $S = \frac{1}{R} \frac{dR}{dT}$, onde R é a razão da fluorecência a temperatura ambiente das intensidades emitidas $I_{885\text{nm}}$ e $I_{863\text{nm}}$ [1]. Considerando o caso, no qual a temperatura afeta a relação de intensidade entre os picos $I_{885\text{nm}} / I_{863\text{nm}}$ (Figura 35(c)), obtemos uma sensibilidade térmica $S_{\text{intensidade}} = 2.3 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. De forma silimar, a sensibilidade térmica obtida para o caso onde a temperatura afeta a posição espectral foi $S_{\text{posição}} = 2.3 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. Os valores encontrados para ambas as sensibilidades térmicas são comparados a valores previamente publicados por outros nanotermômetros luminescentes ratiométricos (cuja relação de intensidades entre os picos de emissão varia linearmente com a temperatura) baseados em íons TRs, como demonstrado na Tabela 5. Além de identificar as sensibilidades térmicas de diferentes tipos de nanopartículas, a Tabela 5 também inclui a região espectral de atuação das mesmas.

Tabela 5: Sensibilidades térmicas publicadas anteriormente na literatura de nanopartículas dopadas com ions TRs. Também foi incluído o comprimento de onda de atuação médio de cada nanopartícula.

Sistema	Comprimento de onda de atuação	Sensibilidade térmica (S)	Referência
$\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (Intensidade Relativa)	$\approx 900 \text{ nm}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$	Esta tese
$\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (Posição Espectral)	$\approx 900 \text{ nm}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$	Esta tese
$\text{Tm}:\text{Yb}:\text{Eu}:\text{NaGdF}_4$	500-650 nm	$2.2 \cdot 10^{-3}$	[2]
$\text{Yb}:\text{Tm}:\text{Y}_2\text{O}_3$	450-800 nm	$4.0 \cdot 10^{-3}$	[3]
$\text{Yb}:\text{Ho}:\text{Y}_2\text{O}_3$	530-750 nm	$2.7 \cdot 10^{-3}$	[3]
$\text{Yb}:\text{Ho}:\text{Zn}:\text{Y}_2\text{O}_3$	$\approx 490 \text{ nm}$	$10.0 \cdot 10^{-3}$	[4]
$\text{Ho}:\text{CaWO}_4$	$\approx 470 \text{ nm}$	$21.0 \cdot 10^{-3}$	[5]
$\text{Er}:\text{Yb}:\text{CaF}_2$	$\approx 550 \text{ nm}$	$16.0 \cdot 10^{-3}$	[6]
$\text{Er}:\text{Yb}:\text{CaF}_2$	$\approx 800 \text{ nm}$	$2.0 \cdot 10^{-3}$	[6]
$\text{Nd}:\text{NaYF}_4$	$\approx 800 \text{ nm}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	[7]

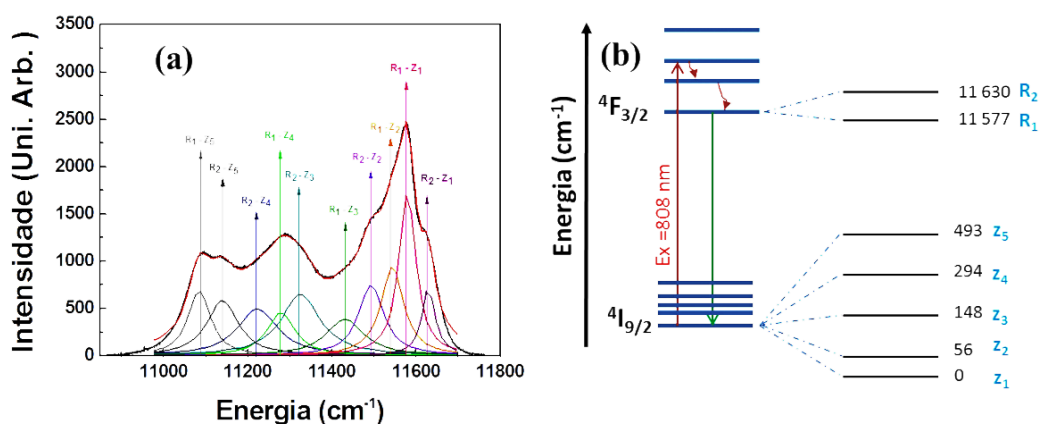
Fonte: Autor, 2014.

Como pode ser observado na Tabela 5, a sensibilidade térmica encontrada para nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ é quase uma ordem de magnitude menor em comparação com as NPs codopadas com Er:Yb. No entanto, quando comparadas a sensibilidade

térmica de nanopartículas cujo comprimento de onda de atuação estão situados na região espectral da primeira janela biológica, as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ mostram uma notável sensibilidade térmica.

A fim de obter uma melhor compreensão do (ou dos) mecanismo físico responsável pela mudança na intensidade relativa entre os picos ($I_{885\text{nm}}$ e $I_{863\text{nm}}$) e bem como do deslocamento espectral da linha de emissão em 863 nm para o vermelho, identificamos os subníveis de energia Stark para ambos os estados ${}^4\text{F}_{3/2}$ e ${}^4\text{I}_{9/2}$ que fazem parte do espectro de emissão da transição ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$ (910 nm). Para este fim foi necessário realizar a deconvolução do espectro de emissão obtido a 20 °C em dez componentes Gaussianas, como mostra a Figura 36(a). As dez componentes representa o número de transições esperadas para ocorrerem devido ao desdobramento Stark dos níveis de energia ${}^4\text{F}_{3/2}$ e ${}^4\text{I}_{9/2}$. Isto nos permitiu construir um sistema simplificado de níveis de energia (apresentado na Figura 36(b)) para os íons de Nd^{3+} na matriz de NPs *core/shell* de LaF_3 .

Figura 36: (a) Decomposição do espectro de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtido em 20°C. As linhas de emissão foram devidamente identificadas de acordo com o diagrama de nível de energia mostrado na figura (b).



Fonte: Autor, 2014.

Vamos inicialmente abordar a situação em que ocorre a mudança na posição espectral devido ao incremento de temperatura. O deslocamento espectral obtido com as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, de aproximadamente 0,3 nm, é bem menor que aqueles obtidos com certos quantum dots usados como nanotermômetros luminescentes ($\sim 0,1 \text{ nm}/^\circ\text{C}$) [8]. Tal deslocamento do pico espectral em 863 nm para maiores comprimento de onda ocorre numa taxa constante de $7 \times 10^{-3} \text{ nm}/^\circ\text{C}$. Em contrapartida os QDs geralmente

emitem no visível e possuem uma largura de banda da ordem de várias dezenas de nanômetros. Se levarmos em consideração que o contraste final do deslocamento espectral induzido pela temperatura é definido como o deslocamento do pico dividido pela largura da banda, podemos dizer que ambos os sistemas (QDs e NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$) são similares em termos do contraste final [7, 9, 10]. Além disso, nossos resultados estão de acordo com aqueles previamente publicados para cristais “*bulk*” de LaF_3 dopados com íons de Nd^{3+} . Como pode ser observado, o pico de emissão em torno de 863 nm ($\sim 11577 \text{ cm}^{-1}$) é associado à transição ${}^4\text{F}_{3/2}(\text{R}_1) \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}(\text{Z}_1)$ (ver Figura 36). Sendo assim, o deslocamento espectral observado é consequência de uma alteração induzida pela temperatura nesta transição. Este comportamento já foi observado e sistematicamente estudado em cristais “*bulk*” de LaF_3 dopados com íons de Nd^{3+} a baixas temperaturas (abaixo de 200 K) [11]. Sendo, inequivocamente, associada a tensões induzidas termicamente na região (rede cristalina) em torno dos íons de Nd^{3+} , decorrentes da interação elétron-fônon. Estas tensões são dependentes da temperatura por meios de alterações vinculadas às amplitudes de vibrações da rede, produzindo, portanto, um efeito substancial sobre a posição do pico da linha de emissão. Para fins de comparação, vamos considerar o caso particular da transição ${}^4\text{F}_{3/2}(\text{R}_1) \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}(\text{Z}_1)$ no cristal de LaF_3 . Johnson e colaboradores [11] demonstraram que essa transição varia linearmente com a temperatura a uma taxa de $\sim 0,14 \text{ cm}^{-1}\text{K}^{-1}$, similar aos resultados obtidos neste tese com as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ no intervalo da temperatura fisiológica (variando com uma taxa de $0,10 \text{ cm}^{-1}\text{K}^{-1}$), estimado a partir da Figura 39(d). Neste caso, a sensibilidade térmica final, obtida a partir da posição espectro da linha de emissão em 863 nm, depende, obviamente, da resolução espectral do setup experimental e também da intensidade do sinal. Com as nossas condições experimentais, estimamos uma precisão líquida na determinação da posição do pico de 863 nm de 0,01 nm, levando a uma resolução térmica em torno de 2°C .

Já no caso em que a mudança é observada na intensidade relativa entre os picos (razão-métrica das intensidades) devido ao aumento na temperatura. Este aumento na razão entre as intensidades dos picos em $\sim 863 \text{ nm}$ e 885 nm é de aproximadamente $0,1\% / ^\circ\text{C}$. A Figura 36(a) mostra, claramente, que muitas transições são geradas a partir do subnível metaestável R_2 (${}^4\text{F}_{3/2}$) de modo a contribuir para a formação do espectro de fluorescência relacionado a transição ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$. O subnível R_2 é termicamente populado a partir do subnível R_1 (Figura 6.2(b)), pois estão termicamente acoplados e, portanto, a população neles segue a distribuição de temperatura de

Maxwell-Boltzmann [12-14]. Sendo assim, as linhas de emissão geradas a partir de R_2 têm suas intensidades elevadas de acordo com o aumento da temperatura enquanto que as linhas com origem em R_1 têm o comportamento inverso. A emissão em 863 nm (11577 cm^{-1}) é principalmente dominada pela transição $R_1 \rightarrow Z_1$ enquanto que a emissão em 885 nm (11283 cm^{-1}) é principalmente dominada pela transição $R_2 \rightarrow Z_4$. Isto, de fato, explica o comportamento induzido pela temperatura observado na Figura 36(a). Efeitos similares foram observados em outros tipos de NPs dopadas com Nd^{3+} [7]. Neste caso, a sensibilidade térmica final irá depender fortemente da razão sinal-ruído dos espectros de emissão. Levando em conta as nossas condições experimentais estimamos que a incerteza na determinação da razão entre as intensidades da luminescência é de $\pm 0,2 \%$, resultando em uma sensibilidade térmica final de $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Este resultado indica que o sensoriamento térmico com base nesta magnitude nos possibilitaria ter, portanto, uma resolução térmica constante em todo o intervalo fisiológico de temperatura (10 a $60 \text{ }^\circ\text{C}$).

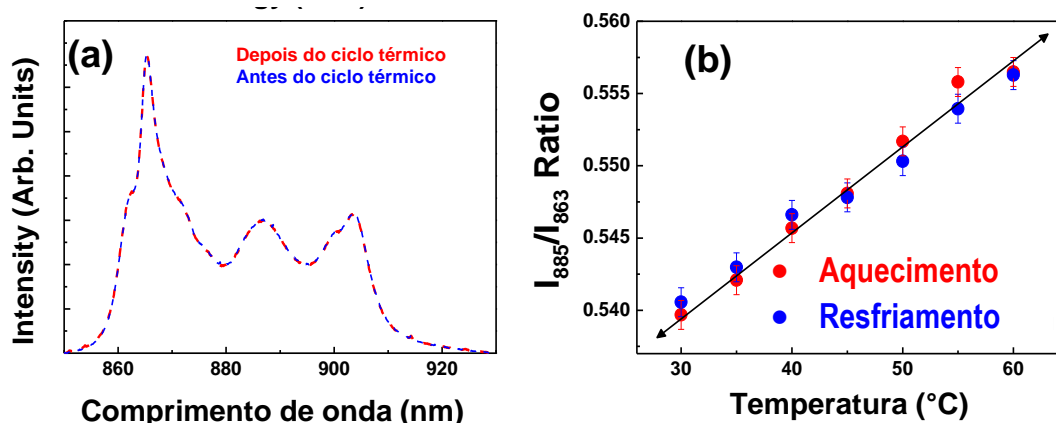
Os resultados obtidos, em ambos os casos, para sensibilidade térmica final podem ser considerados excelentes, pois os nanotermômetros luminescentes apresentados na literatura apresentam em geral sensibilidades pouco abaixo de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ [15, 16]. Portanto, concluímos que as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ são sensores térmicos luminescentes de múltiplos parâmetros, pois a leitura da temperatura pode ser feita a partir do deslocamento espectral das linhas de emissão induzido pela temperatura ou pela razão das intensidades medidas.

Resumidamente, as mudanças observadas no espectro de fluorescência provenientes das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, que fornecem sensibilidade térmica a partir da análise de suas fluorescências, são devidas a modificações no esquema de níveis de energia ou na redistribuição de população dos diferentes estados eletrônicos. Portanto, tais variações observadas no espectro de emissão devem ser totalmente reversíveis. Para confirmar a capacidade de reversibilidade dos nossos nanotermômetros luminescentes (NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$), medimos espectros de emissão em $30 \text{ }^\circ\text{C}$ antes e após aquecermos as amostras de 10 a 60°C . Esses resultados são mostrados na Figura 37(a).

Ambos os espectros são idênticos, indicando que o ciclo térmico não causou nenhuma modificação permanente no espectro de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Além disso, a Figura 37(b) mostra a variação da razão das intensidades de emissão (885 nm/863 nm) com a temperatura, durante o ciclo de aquecimento e resfriamento. Como

pode ser observado, este processo é totalmente reversível sem qualquer evidência de histerese térmica.

Figura 37: (a) Espectros de emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ obtidos em $30\text{ }^\circ\text{C}$ antes e depois de um ciclo térmico de $30\text{ }^\circ\text{C}$ até $80\text{ }^\circ\text{C}$. Não foram observadas diferenças indicando reversibilidade dos mecanismos observados. (b) Razão das intensidades emitidas em 885 e 863 nm versus o aumento e diminuição da temperatura da amostra. Nenhuma histerese foi observada.



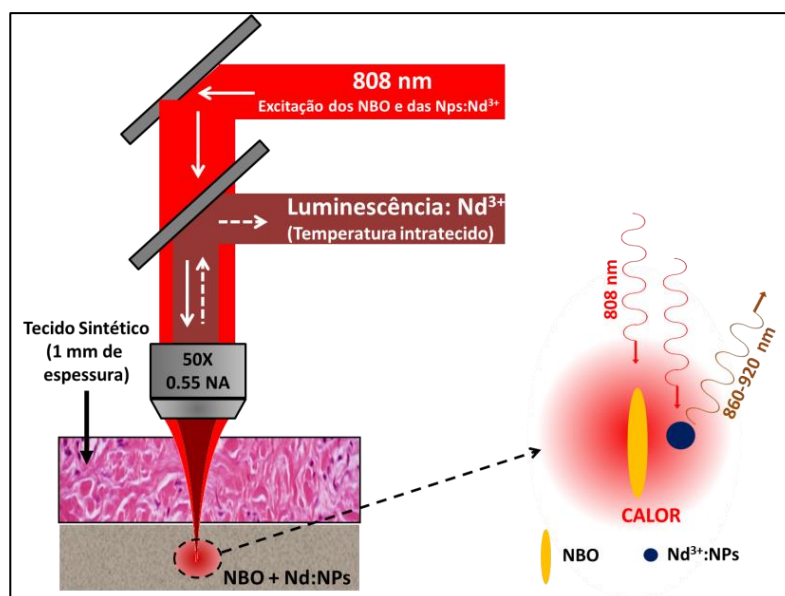
Fonte: Autor, 2014.

7.1.1 Hipertermia Controlada Intratecido in Vitro

Até este momento já foi demonstrado, ao longo desta tese, o excelente potencial de aplicação das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopadas com 15mol% de Nd^{3+} tanto para bioimagem fluorescente intratecido como também para sensoriamento térmico a partir do espectro de luminescência. Um importante passo a ser dado é a combinação/junção dessas duas características que, em princípio, permitiria o sensoriamento térmico intratecido baseando-se nas propriedades luminescentes das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Para demonstrar essa possibilidade, aproveitamos outra notável propriedade das nossas NPs dopadas com 15mol% de Nd^{3+} , o fato de serem eficientemente excitadas por radiação em 808 nm, que é exatamente o comprimento de onda necessário para excitação plasmonica de nanobastões de ouro, os quais exibem 100% de eficiência de aquecimento e são amplamente utilizados em tratamentos fototérmicos [10, 17-19]. De fato, esta coincidência tem sido explorada nesta tese através da preparação de uma solução aquosa contendo ambos os nanomateriais a uma concentração de 0,3% em massa das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3/\text{LaF}_3$ e 0,01% em massa de nanobastões de ouro.

Os nanobastões de ouro usados neste experimento foram adquiridos da empresa *Plasmachem Inc.* com dimensão nominal de 15 nm de diâmetro e 45 nm de comprimento. A dispersão coloidal mista (NPs dopadas com Nd^{3+} + nanobastões de ouro) mostrou um coeficiente de extinção de $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ em 808 nm (comprimento de onda de ressonância dos plasmons dos nanobastões de Au) e exibiu um comportamento coloidal estável, sem evidências de precipitação durante semanas. A dispersão coloidal mista foi introduzida em um microcanal de 100 μm de altura e este foi colocado embaixo do tecido sintético (isto é, tecido de pele humana *in vitro*) com espessura de 1,0 mm, como está esquematicamente demonstrado na Figura 38.

Figure 38: Representação esquemática do aparato experimental utilizado para hipertermia intratecido controlada de feixe único. Um feixe laser com comprimento de onda em 808 nm é focalizado em um microcanal contendo a solução aquosa com nanobastões de ouro (nano-aquecedores) e nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (nanotermômetros). A solução foi colocada embaixo de um tecido sintético com 1,0 mm de espessura. A luminescência das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foi coletada utilizando a mesma objetiva e a temperatura intratecido foi extraída da análise espectral da luminescência. O diagrama à direita reflete o fato de ambos os nano-aquecedores e nanotermômetros serem simultaneamente excitados pela radiação em 808 nm.



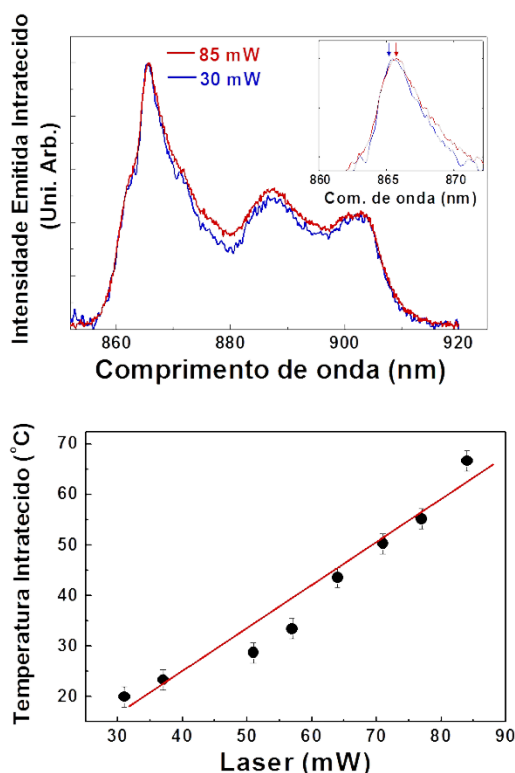
Fonte: Autor, 2014.

Usamos como fonte de excitação um laser de diodo CW em 808 nm acoplado à uma fibra monomodo. O feixe foi focalizado no tecido sintético até atingir a dispersão

coloidal mista usando uma objetiva de microscópio com 50X e abertura numérica de 0,55. A potência do laser (medida antes da objetiva) foi variada entre 30 e 85 mW. A luminescência gerada pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foi coletada pela mesma objetiva e, após passar por várias objetivas e filtro foi espectralmente analisada por um espectrômetro de alta resolução. Como ilustrado na Figura 38, a radiação em 808 nm excita a solução mista ativando simultaneamente dois processos: i) o movimento coletivo dos elétrons na superfície dos nanobastões de ouro (isto é, ativando a ressonância plasmônica), cuja subsequente relaxação resulta em aquecimento local da solução; ii) ativa a luminescência das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ localizadas no volume focal do laser. Como resultado, as propriedades desta luminescência podem ser determinadas pela temperatura da região de excitação, como nos resultados incluídos na Figura 39, que apresentam a possibilidade da determinação da temperatura associada à hipertermia intratecido induzida pelo laser devido à excitação dos NBO.

A Figura 39(a) mostra os espectros de luminescência gerados a partir das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ para potências de excitação de 30 e 85mW. Como pode ser observado, o aumento da potência do laser em 808 nm produz alterações nas características (forma do espectro) de fluorescência. Como era esperado, o decréscimo da razão de intensidade entre as linhas de emissão de 863 nm e 885 nm evidencia a presença de um aquecimento local intratecido bastante significativo, devido à excitação dos plasmons de superfície dos nanobastões de Au. É importante salientar que os espectros de emissão incluídos na Figura 39(a), devido à presença do tecido sintético, têm suas intensidades reduzidas sendo, portanto, um pouco mais ruidosos em relação aos espectros obtidos durante o procedimento de calibração térmica (determinação da escala termométrica – Figura 39). Sob essas condições experimentais, um deslocamento espectral no pico de emissão em 863 nm induzido pela temperatura também é constatado (ver detalhe na Figura 39(a)). No entanto, sua determinação é menos precisa devido ao aumento do ruído, diminuindo, portanto, a resolução térmica a partir de sua análise. Deste modo, uma determinação mais precisa do aumento local de temperatura intratecido induzido pelo laser será mais bem obtida a partir da análise da variação da razão entre as intensidades de emissão (usando a curva de calibração incluída na Figura 35(c)).

Figura 39: (a) Espectros de emissão normalizados gerados pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ intratecido, obtidos em duas potências do laser de excitação em 808 nm (30 e 85 mW). Para uma melhor visualização, ambos os espectros foram normalizados pelos picos de intensidade. A intensidade emitida com a potência de excitação de 30 mW era aproximadamente três vezes menor que com 85 mW. A inserção mostra em detalhe o deslocamento para o vermelho do pico de emissão de 863 nm. (b) Temperatura intratecido versus a potência do laser de excitação, calculada a partir da análise ratiométrica dos espectros de fluorescência intratecido. Os pontos são dados experimentais e a linha tracejada é o melhor ajuste linear.



Fonte: Autor, 2014.

Como pode ser visto na Figura 39(b), a temperatura intratecido em função da potencia de excitação reflete um comportamento quase linear. Temperaturas intratecido tão altas quanto 70 °C foram obtidas, demonstrando o quão eficiente são os nanoaquecedores (NBO). Logo, os nanobastões de ouro são mais do que qualificados para atuarem como agentes ativos de tratamentos via hipertermia por excitação óptica. Cabe ressaltar que, os resultados apresentados na Figura 39(b) relatam, pela primeira vez, a possibilidade da realização de um processo de hipertermia controlada intratecido, induzida a partir de uma fonte de radiação laser em 808 nm. De fato, com base nesta nova abordagem temos demonstrado que a temperatura real intratecido (não somente da

superfície) pode ser monitorada em tempo real, permitindo um total controle sobre a temperatura intratecido. Além disso, a hipertermia intratecido controlada é induzida por apenas um feixe laser, uma vez que ambos os materiais utilizados neste processo são excitados com a mesma fonte (comprimento de onda) de radiação, caracterizando uma grande vantagem prática. Esta é uma das vantagens do sistema proposto aqui para hipertermia controlada em tempo real em relação aos apresentados na literatura que exigem duas fontes ou comprimentos de onda de excitação [10].

7.2 Nanopartículas Multifuncionais de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$

7.2.1 Nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ como Nano-aquecedores

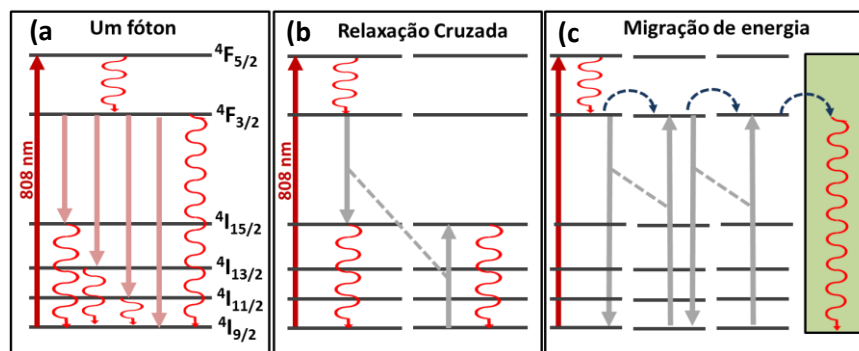
Nesta seção demonstraremos, pela primeira vez, a possibilidade da operação multifuncional das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Para isso, vamos inicialmente avaliar a eficiência de conversão luz \rightarrow calor das soluções aquosas e biocompatíveis de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, pois altas concentrações de íons de Nd^{3+} podem ser incorporadas nos nanocristais hospedeiro de LaF_3 e essas altas concentrações favorecem a eficiência de aquecimento fototérmico. De fato, exploramos o potencial das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ para tratamento por hipertermia fototérmica *in vivo*. Mas, antes foram realizados experimentos *ex vivo* baseados nos processos fototérmicos das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, como a seletividade e profundidade de penetração.

As nanopartículas usadas nestes experimentos são do tipo core e foram desenvolvidas conforme relatado no capítulo cinco e nas referências [7, 20]. Para os experimentos de carga térmica preparamos cinco dispersões aquosas de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ com cinco concentrações diferentes de Nd^{3+} (2, 5, 15, 20 e 25 mol %), todas as dispersões aquosas foram preparadas com as mesmas concentrações de NPs em massa da solução (10% em massa). Todas as soluções aquosas mostraram um excelente comportamento coloidal, sem qualquer sinal de precipitação durante várias semanas.

Na Figura 40(a) mostramos esquematicamente o diagrama simplificado de níveis de energia do íon Nd^{3+} descrevendo a excitação óptica e os processos radiativos e decaimentos multifonônicos possíveis. Após a absorção da energia de excitação, os íons são excitados para o estado $^4\text{F}_{5/2}$ de onde relaxam por multifônons, ou seja, gerando calor, para o nível metaestável e emissor $^4\text{F}_{3/2}$. Do estado metaestável os íons de Nd^{3+} podem decair radiativamente ou não-radiativamente para os níveis inferiores $^4\text{I}_{9/2}$, $^4\text{I}_{11/2}$,

${}^4I_{13/2}$ e ${}^4I_{15/2}$ [21, 22]. Geralmente são observadas emissões nas transições: ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$, ${}^4I_{11/2}$, ${}^4I_{13/2}$ com comprimentos de onda em torno de 900, 1060 e 1340 nm, respectivamente.

Figura 40: As figuras (a), (b) e (c) mostram diagramas esquemáticos dos diferentes processos radiativo e não radiativo (transferência de energia) que podem ocorrer nos íons de Nd^{3+} após excitação óptica com comprimento de onda em ~ 808 nm.



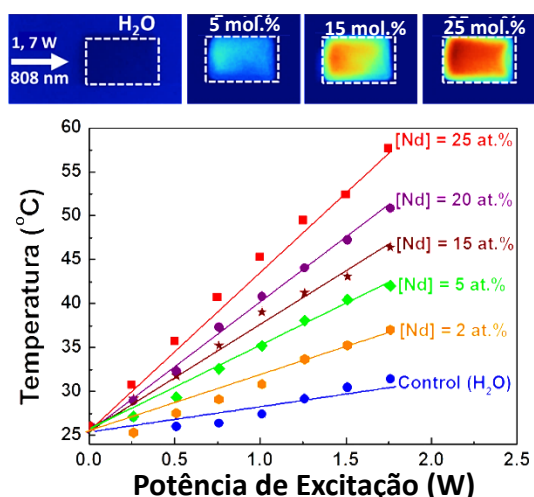
Fonte: Autor, 2014.

A transição radiativa para o nível ${}^4I_{15/2}$ é muito pouco provável de ocorrer e geralmente pouco explorada. A depender da concentração de íons de Nd^{3+} , os processos de transferência de energia podem ser muito eficientes. No grupo de pesquisa GFFC foi medido a eficiência quântica de fluorescência do nível ${}^4F_{3/2}$ do íon de Nd^{3+} na matriz LaF_3 em função da concentração de Nd^{3+} e foi observada uma significativa redução de sua magnitude, indicando a presença dos processos de transferência de energia mostrados na Figura 40 (b) e (c): relaxação cruzada e migração de energia. Na relaxação cruzada, um íon no estado excitado ${}^4F_{3/2}$ transfere não radiativamente energia para outro íon no estado fundamental excitando-o para o nível ${}^4I_{15/2}$, de onde ocorre decaimento por multifônons até o estado fundamental. Já a migração de energia, em princípio, por si só não reduziria a eficiência quântica de fluorescência do nível ${}^4F_{3/2}$, mas ela favorece a relaxação cruzada e transferências de energias para possíveis impurezas presentes no material, como radicais de OH, metais de transição, etc [12-14]. O resultado final desses processos de transferência de energia e consequentes decaimentos por multifônons é a geração de calor no volume local excitado do material e ele deve crescer com a concentração de íons.

A geração de calor na solução coloidal de NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$ induzida pela excitação em ~ 808 nm foi avaliada usando uma câmera termográfica de infravermelho. Colocamos a suspensão coloidal de NPs de $Nd^{3+}:LaF_3$ em cubetas abertas. Em seguida a solução foi excitada com laser acoplado a um cabo de fibra óptica. O comprimento de

onda de excitação foi de 808 nm e o feixe estava colimado, ou seja, não usamos lente ou elementos ópticos para focalizá-lo. Para obter as imagens térmicas usamos uma câmera térmica da Fluke, modelo Ti10. A Figura 41(a) mostra as imagens obtidas das soluções com diferentes concentrações de Nd^{3+} (0 mol%, 5mol%, 15mol% e 25mol%), mantendo fixa em 1,7 W a potência de excitação.

Figura 41: (a) Imagens térmicas, no estado estacionário, de soluções aquosas de NPs de LaF_3 com diferentes concentrações de íons de Nd^{3+} (0, 5, 15 e 25 mol%) sob excitação óptica em ~808 nm para uma potência de excitação fixa de 1,7 W. (b) Temperatura máxima do volume excitado da solução aquosa de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em função da potência de excitação em 808 nm, para as diferentes concentrações de íons de Nd^{3+} . Os pontos são dados experimentais e as linhas são ajustes lineares.



Fonte: Autor, 2014.

Como pode ser observado a solução sem nanopartículas (somente água) apresentou um aquecimento local mínimo. Por outro lado, a solução aquosa contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ apresentaram um aumento da carga térmica considerável e crescente com a concentração de Nd^{3+} . Na Figura 41(b) apresentamos a temperatura máxima induzida no volume iluminado da solução em função da potencia do laser em 808 nm para as diferentes soluções. Em todos os casos, a temperatura aumenta linearmente com o aumento da potência e também cresce com a concentração de Nd^{3+} , apresentando um aumento substancial para a maior concentração, aumento esse interessante para sistemas biológicos. Este resultado já era esperado, pois o coeficiente de absorção cresce com a concentração de íons [15].

7.2.2 Nanopartículas de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ como Nano-aquecedores e Nanopartículas Luminescentes

Até este momento exploramos somente a capacidade de converter luz em calor das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Contudo, umas das maiores vantagens no uso das NPs de fluoreto de lantânio dopadas com íons de Nd^{3+} é a combinação única de suas propriedades ópticas, ou seja, a possibilidade de manter uma relação equilibrada entre a fotoluminescência e a geração de calor, em função da concentração de Nd^{3+} nas NPs [23, 24]. Para este fim, estudamos sistematicamente a fluorescência emitida e o calor gerado de um grupo formado por oito amostras de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopadas com diferentes concentrações de neodímio (1 a 25 mol.%), todas as dispersões aquosas foram preparadas com as mesmas concentrações de NPs em massa da solução (1% em massa).

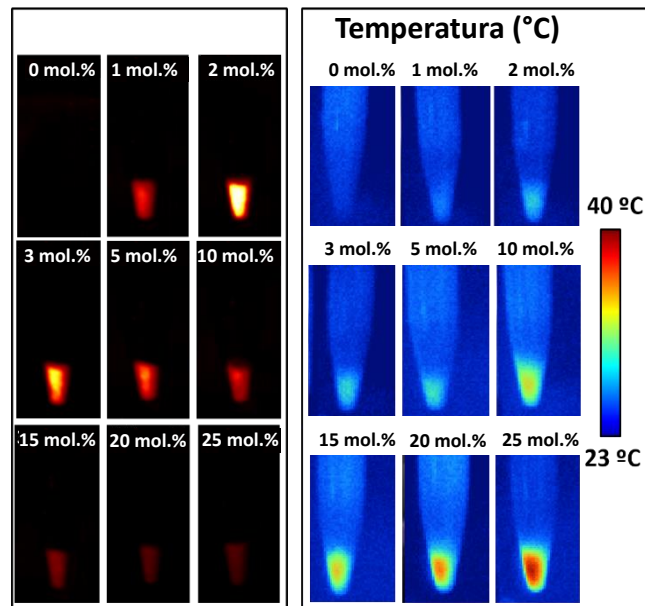
A Figura 42 mostra as imagens de Fluorescência no infravermelho e imagens térmica das diversas soluções coloidais contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ quando opticamente excitada com um feixe de laser de 808 nm a uma densidade de potência de 4 W/cm^2 . As imagens fluorescente foram obtida através da aquisição da fluorescência no infravermelho (em torno de 900 nm) por uma câmera de InAsGa IR (Xenics) e as imagens térmicas foram tomadas pela câmera térmica Fluke Ti10.

Claramente pode ser observado que a eficiência na conversão luz-calor aumenta gradativamente com o aumento da concentração de íons de Nd^{3+} diferentemente da intensidade luminescente emitida que apresenta um comportamento mais complexo. Quando a dispersão coloidal formada com NPs de LaF_3 dopadas com pequena concentração de íons Nd^{3+} (1,0 mol.%) é opticamente excitada, por um feixe laser em 808 nm com densidade de potência de $4,0 \text{ W/cm}^2$, a maior parte da radiação absorvida é re-emitida na forma de luminescência, sem significativa geração de calor, como pode ser observado na Figura 42. Isto ocorre por causa da alta eficiência quântica de fluorescência do nível emissor $^4\text{F}_{3/2}$ e desprezíveis processos de transferência de energia em amostras dopadas com pouca concentração de neodímio.

E como esperado, quando a concentração de íons de neodímio dentro da NP é aumentada (em nosso caso até 25 mol.%), uma significativa quantidade de calor é gerada durante a irradiação laser em consequência do aumento da absorção da energia de bombeio e da redução da eficiência quântica de fluorescência [23, 25-29]. No entanto, vemos a clara evidência da geração simultânea de calor e luminescência das NPs

dopadas com 25 mol.% de Nd^{3+} (ver Figura 42). A partir da Figura 42, por meios das imagens por fluorescência e das imagens térmicas, podemos determinar como a intensidade emitida e o calor gerado induzidos pela intensidade de bombeio varia com o aumento da concentração de Nd^{3+} dentro da matriz.

Figura 42: Fluorescência no IV e imagem térmica das soluções coloidal contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ com diferentes concentrações,. Todas as imagens foram obtidas sob as mesmas condições experimentais, sob excitação óptica em 808 nm com uma densidade de potência constante de $4\text{W}/\text{cm}^2$.

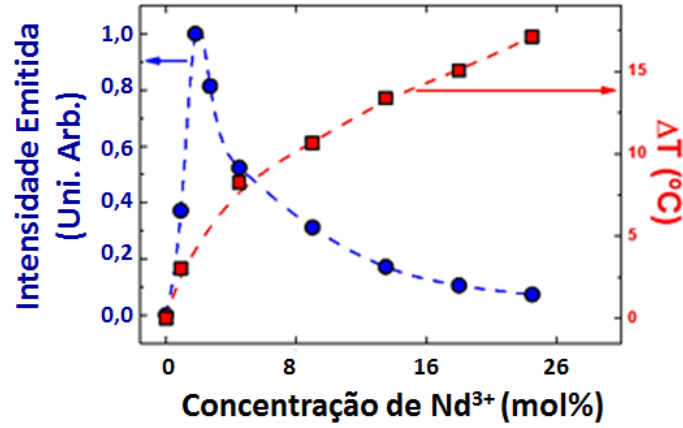


Fonte: Autor, 2014.

A Figura 43 representa o papel desempenhado pelo o aumento da concentração tanto no *quenching* da fluorescência como no aumento do calor liberado em função do aumento da potência de excitação absorvida. De fato, podemos melhor compreender a Figura 43 em termos da P_{abs} (potência de absorvida) e ϕ_{calor} (carga térmica ou calor gerado). Para relacionar estes parâmetros realizamos os seguintes levamos em conta o fato da intensidade da lumescência gerada pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ pode ser escrita como:

$$I_{lum} \propto P_{abs} \cdot \eta_{lum} \quad (7.1)$$

Figura 43: Variação da intensidade emitida e do calor gerado devido a excitação óptica em 808 nm, em função da variação da concentração de íons de neodímio na matriz. Os pontos são dados experimentais e as linhas pontilhadas são guias para os olhos.



Fonte: Autor, 2014.

Onde P_{abs} é a potência absorvida e η_{lum} é a eficiência quântica de fluorescência. De acordo com a lei de Beer-Lambert temos que:

$$P_{abs} \propto 1 - \exp(-\alpha_{abs} \cdot l) \quad (7.2)$$

onde α_{abs} representa o coeficiente de absorção da amostra e l o caminho óptico da solução coloidal contendo as NPs de Nd³⁺:LaF₃. Note que para baixas concentrações (em nosso caso) o coeficiente de absorção:

$$P_{abs} \propto (\alpha_{abs}) \quad (7.3)$$

Disto, podemos agora relacionar a quantidade de calor gerada, ΔT , com a concentração de Nd³⁺ dentro da matriz. Sendo assim, temos que:

$$\Delta T \propto P_{abs} \cdot \phi_{calor} \quad (7.4)$$

onde,

$$\phi_{calor} = \left(1 - \eta_{lum} \cdot \frac{\lambda_{bombeio}}{\lambda_{lum}}\right) \quad (7.5)$$

Substituindo a expressão 7.4 em 7.5, obtemos:

$$\Delta T \propto P_{abs} \cdot \left(1 - \eta_{lum} \cdot \frac{\lambda_{bombeio}}{\lambda_{lum}}\right) \quad (7.6)$$

Note que a expressão (7.5) para carga térmica, representa a fração de energia de bombeio (excitação) absorvida que é transformada em calor. E que depende do comprimento de onda de excitação (em nossos experimentos foram $\lambda_{bombeio} = 808 \text{ nm}$), da eficiência quântica de fluorescência (η_{lum}) e do comprimento de onda de

emissão (λ_{lum}). Se considerarmos o caso no qual as concentrações de Nd^{3+} são pequenas (abaixo de 2 mol.%), onde a eficiência quântica ($\eta_{lum} = 0,8$) é constante vemos que ΔT aumenta linearmente com o aumento da concentração de íons Nd^{3+} dentro da matriz (como demonstrado na Figura 43).

Por outro lado, para níveis acima de 2 mol.%, o fenômeno de *quenching* de concentração entra em cena, devido aos mecanismo de interação entre os íons de neodímio (ver Figura 42). Neste caso, o aquecimento induzido pela intensidade de bombeio é afetado por dois diferentes fatores. Primeiro, de acordo com a expressão (7.3), a potência absorvida aumenta com o aumento da concentração de neodímio dentro da matriz. Segundo, pelo fato da magnitude da eficiência quântica de fluorescência diminuir com o aumento da concentração de Nd^{3+} , de tal forma que a carga térmica (geração de calor) é elevada em função do aumento da concentração de íons de neodímio na matriz. A partir dessas considerações podemos identificar qual é o mecanismo dominante na geração de calor.

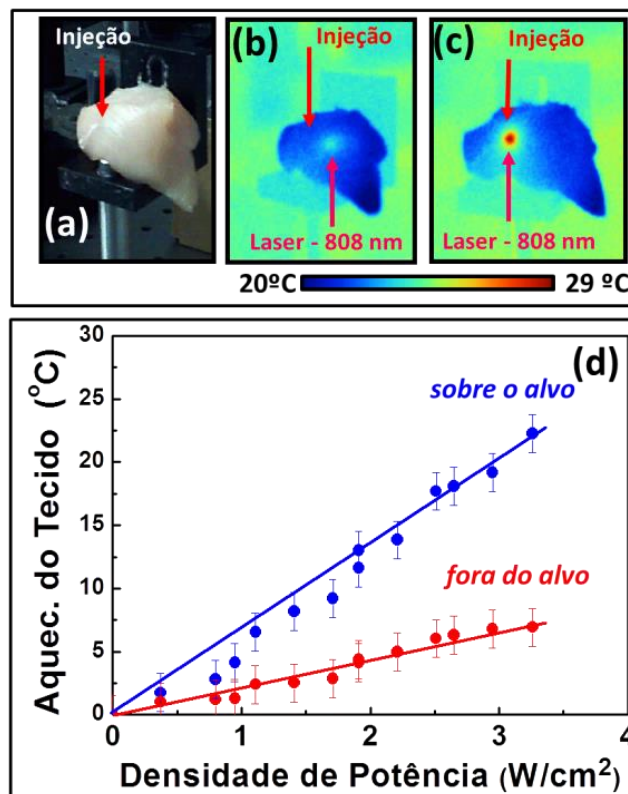
A partir da Figura 43 podemos ver que a razão entre o aumento da temperatura, ΔT , induzido nas amostras com 1 mol.% e 25 mol.% é aproximadamente $\frac{\Delta T(25 \text{ mol.}\%)}{\Delta T(1 \text{ mol.}\%)} \approx 6$. No entanto, a razão entre as carga térmicas é $\frac{\phi_{heat}(25 \text{ mol.}\%)}{\phi_{heat}(1 \text{ mol.}\%)} = \frac{0,84}{0,36} \approx 2$. Portanto, podemos dizer que o fator dominante, comprovado experimentalmente, na contribuição da eficiência da conversão luz-calor para as NPs dopadas com altas concentrações de Nd^{3+} é, principalmente, devido o aumento da concentração de íons de Nd^{3+} dentro da matriz. Pois aumenta a seção de choque de absorção e conseqüentemente a energia absorvida para ser transformada em calor, como já tínhamos previsto.

7.3 Terapia Fototérmica *ex Vivo* Baseadas em Nanopartículas Multifuncionais de Nd^{3+} :LaF₃

Estimulados pelos bons resultados da eficiência de conversão de luz em calor, podemos agora avaliar a aplicação potencial das NPs de Nd^{3+} :LaF₃ para tratamentos foto-térmicos em sistemas biológicos por meio de experimentos *ex vivo*. Para isto foi então injetado 0,1 mL da suspensão coloidal de NPs de Nd^{3+} :LaF₃ em uma amostra de “músculo peitoral de aves *galliformes*”. Foi usada uma solução coloidal com 10% em massa de NPs, nesse caso foram usadas NPs de 25 mol.% de Nd^{3+} . A profundidade da injeção foi estimada em ~2 mm, caracterizando uma injeção subcutânea. A Figura 44(a)

mostra uma imagem digital do musculo peitoral (tecido animal *ex vivo*) usado nestes experimentos *ex vivo*. O local da injeção está indicado por uma seta.

Figura 44: (a) Imagem óptica do tecido de origem animal usado no experimento fototérmico *ex vivo*. A seta mostra onde as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ foram injetadas. (b) e (c) mostram imagens térmicas do tecido muscular peitoral quando foram iluminados com laser em 808 nm ($1,5 \text{ W/cm}^2$) nas regiões sem e com injeção de NPs (situações *off-* e *on-target*, respectivamente). (d) Temperatura da superfície da amostra em função da intensidade do laser para as duas situações *off-* e *on-target* (fora do alvo e sobre o alvo). Os pontos sólidos representam os dados experimentais e as linhas sólidas são ajustes lineares.



Fonte: Autor, 2014.

Para induzir o aquecimento local usamos o mesmo laser de diodo em 808 nm, com um ângulo de incidência de 45° sobre a amostra, e a área do *spot* laser sobre a amostra foi calculada sendo de aproximadamente 0.7 cm^2 . A amostra sob estudo (tecido animal *ex vivo*) foi colocada sobre uma plataforma de controle milimétrico, onde foi possível controlar a posição da injeção em relação a incidência do laser. Para medir a temperatura local, usamos a mesma câmera térmica Fluke Ti10 já mencionada. Como

pode ser observado, a Figura 44(b) mostra a imagem térmica do tecido muscular peitoral com o feixe laser de excitação posicionado fora da região da injeção das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (fora do alvo). Nesse caso o aumento da temperatura local foi apenas de ~ 2 °C para uma intensidade de excitação de $1,7 \text{ W/cm}^2$, isso foi devido ao comprimento de onda de excitação está dentro da I JB onde o coeficiente de absorção do tecido é mínimo.

Já a Figura 44(d) mostra o incremento de temperatura na superfície do tecido animal, em função da intensidade do laser de bombeio. A partir do ajuste linear, a taxa de aquecimento intrínseco do tecido foi de $2 \text{ }^\circ\text{C/W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Como comentado anteriormente, a injeção foi aproximadamente ~ 2 mm abaixo da superfície e mesmo assim a excitação óptica atinge/alcança a solução coloidal. Isso é um indicativo da boa penetração em tecidos biológicos obtida usando comprimento de onda no infravermelho (I JB) e possivelmente, a profundidade de penetração seria melhor se usássemos comprimentos de onda de excitação na segunda janela biológica. Como pode ser observado, um aumento significativo de temperatura local foi obtido, o qual é mais do que necessário para experimentos em sistemas biológicos e provavelmente a temperatura na localização das NPs deve ter uma temperatura maior. Outra observação importante é o aumento linear da temperatura com a potência/intensidade de excitação. Para uma intensidade de excitação de $1,5 \text{ W/cm}^2$, a temperatura superficial aumentou até $10 \text{ }^\circ\text{C}$ (ver Figura 44(c)). O aquecimento induzido opticamente foi a uma taxa de $\sim 7 \text{ }^\circ\text{C/W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (ver Figura 44(d)). Note que esta taxa é cerca de três vezes maior em comparação a configuração “*fora do alvo*”. Esta notável diferença entre as taxas de aquecimento indicam que as NPs de lantânio dopadas com íons de Nd^{3+} podem atuar como nano-aquecedores e serem aplicadas em tratamentos foto-térmicos *in vivo*, uma vez que o calor, somente, foi gerado na região onde as NPs foram introduzidas.

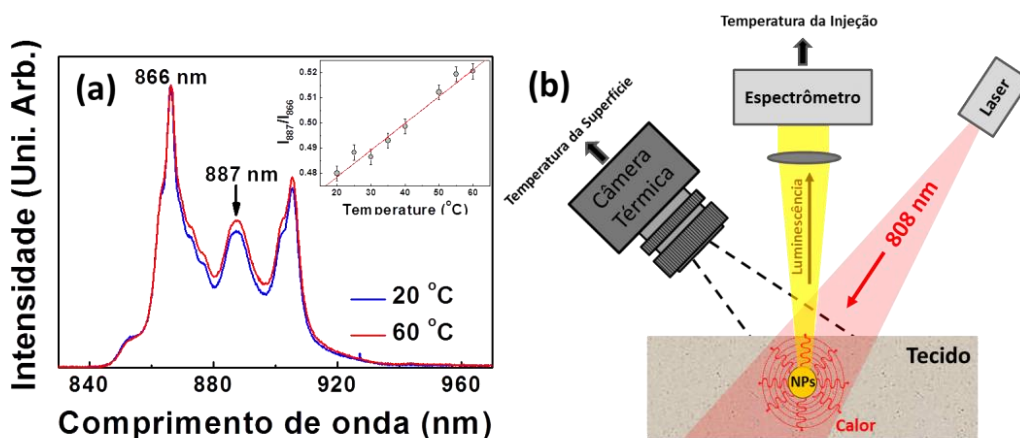
Os resultados aqui apresentados abre a possibilidade de se utilizar NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ para terapias via hipertermia como caráter seletivo de doenças *in vivo*, tais como tumores. Além disso, a excelente característica da fotoluminescência dessas NPs (alta eficiência quântica e ambas excitação e emissão dentro das *janelas biológicas*) permitirá identificar a localização dos nano-aquecedores por meio da fluorescência durante aplicação *in vivo*, bem como, acompanhar a evolução do tumor durante o tratamento fototérmico mediante as imagens de fluorescência.

Durante a terapia foto-térmica a leitura da temperatura na superfície (medida com o termovisor infravermelho) poderá diferir significativamente da temperatura na

região delimitada pela profundidade da injeção subcutânea. Portanto, o controle real da terapia foto-térmica dos tumores localizados a certa profundidade no tecido biológico requer leitura da temperatura do volume tumoral em tempo real. Em princípio, isso poderá ser feito aproveitando a sensibilidade térmica das bandas de fluorescência das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, ou seja, usando estas nanopartículas como nanotermômetros para realizar a leitura da temperatura dentro do volume da injeção.

A Figura 45(a) mostra o espectro de emissão, referente à transição ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$, gerados pela solução aquosa contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ (25 mol.% de Nd^{3+}) nas temperaturas de 20 e 60 °C.

Figura 45: (a) Espectros de emissão correspondentes a transição ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{9/2}$ da solução aquosa contendo as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, obtidos nas temperaturas de 20 e 60°C. No detalhe apresetamos a dependência da razão das intensidades medidas em 887 e 866 nm versus a temperatura. Os pontos sólidos são dados experimentais e a linha tracejada é o melhor ajuste linear. (b) Diagrama experimental utilizado para medidas em tempo real e simultânea das temperaturas induzidas opticamente na injeção e na superfície do tecido biológico.



Fonte: Autor, 2014.

Como pode ser observado, é notável a influência da temperatura nos espectros de emissão, ou seja, na razão das intensidades de alguns picos de emissão. O detalhe da Figura 45(a) apresenta a razão das intensidades de emissão em 887 e 866 nm em função da temperatura. Como pode ser observado, um comportamento linear foi obtido na região de interesse (20-60 °C), ideal para aplicação biológica. A explicação da mudança espectral induzida pela temperatura (ver seção 7.1) surge devido a redistribuição térmica das populações dos subníveis Stark do estado metaestável ${}^4\text{F}_{3/2}$ [11, 21, 30, 31].

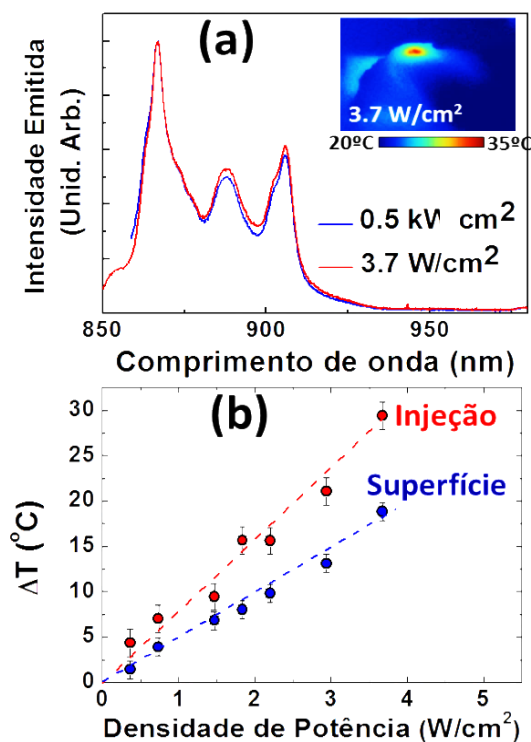
Disto, concluímos que a NP de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ pode ser usada como agente multifuncional, ou seja, como nanoaquecedores e nanotermômetros fluorescentes simultaneamente, usando apenas um único feixe de excitação na região da janela biológica. A grande vantagem nesse caso é a possibilidade do monitoramento (leitura térmica) de sistemas biológicos em tempo real. A fim de comprovarmos essa possibilidade, montamos a configuração experimental ilustrada na Figura 45(b). A partir dessa configuração experimental foi possível realizar ao mesmo tempo as leituras das temperaturas na superfície e dentro do tecido (a diferentes profundidades). A leitura da temperatura na superfície foi obtida mediante o uso de uma câmera térmica no infravermelho, ou seja, por meio da aquisição de imagens térmicas. A câmera térmica foi posicionada em ângulo de 45° em relação a superfície do tecido. Já a leitura da temperatura interna (a diferentes profundidades) foi obtida a partir da análise espectral da fluorescência proveniente da suspensão coloidal (nanotermometria luminescente) injetada no tecido de origem animal (*ex vivo*). O local da injeção foi opticamente excitado de forma semelhante ao esquema apresentado na Figura 44. O volume da solução coloidal injetada foi de $100 \mu\text{L}$ com 10% em massa de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ dopada com uma concentração de 25 mol.% de neodímio. A profundidade da injeção foi estimada em 2 mm. A fluorescência proveniente da injeção foi coletada por um sistema óptico, acoplado a um espectrômetro de alta resolução para a análise espectral. Os resultados estão apresentados na Figura 46.

Os espectros de emissão incluídos na Figura 46(a) foram obtidos após cinco minutos de excitação óptica, tempo de espera necessário para a temperatura atingir o estado estacionário. O intervalo de intensidade explorado foi de: 0,5 a $3,7 \text{ W/cm}^2$. Novamente, o aquecimento no local da injeção é evidenciado por uma clara modificação no espectro de emissão.

Com base nos dados incluídos na Figura 46(a), os quais foram utilizados para calibrar a nossa escala termométrica, foi possível controlar a temperatura da injeção subcutânea em função da intensidade do laser em 808 nm. Os resultados são mostrados na Figura 46(b), onde apresentamos os aumentos das temperaturas da superfície (medido com a câmera térmica) e na injeção (medido com os espectros) versus a intensidade de excitação. Comportamentos lineares foram novamente observados e variação de temperatura de até $30 \text{ }^\circ\text{C}$ na injeção subcutânea. Os resultados incluídos nesta figura revelam diferenças significativas nas taxas de aquecimento na superfície ($\sim 5 \text{ }^\circ\text{C/W}\cdot\text{cm}^{-2}$) e na injeção ($\sim 8 \text{ }^\circ\text{C/W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Isto significa que, para uma dada

intensidade do laser, a temperatura no local de injeção é ~ 60% maior que na superfície do tecido.

Figura 46: (a) Espectros de emissão de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ injetadas em uma amostra *ex vivo* para duas intensidades de excitação do laser em 808 nm, 0,5 e 3,7 W/cm^2 . O inset mostra a imagem térmica da amostra enquanto era irradiado pelo feixe laser com intensidade de 3,7 W/cm^2 . (b) Incremento de temperatura induzido pelo laser na região da injeção de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, determinado a partir da análise dos espectros de emissão sub-tecido. O incremento de temperatura induzido pelo laser na superfície do tecido é também apresentado. Os pontos são dados experimentais e as linhas tracejadas são os melhores ajustes lineares.



Fonte: Autor 2014.

Os dados experimentais incluídos na Figura 46 constituem a demonstração de um processo foto-térmico auto-calibrado com base em um único tipo de nanopartícula e, portanto, abre caminhos para a realização de tratamentos em tempo real via hipertermia controlada com um único feixe laser e uma única nanopartícula.

7.4 Conclusões

Neste capítulo mostramos que além da habilidade de penetração óptica nos tecidos, as NPs de fluoreto de lantânio dopadas com íons de Nd^{3+} exibiram uma notável

sensibilidade térmica na luminescência de $\pm 2^\circ\text{C}$. Variações espectrais em posição de pico de emissão e forma de banda de emissão induzidas termicamente foram observadas e exploradas para nanotermometria óptica. Variações lineares dessas grandezas com a temperatura foram obtidas, indicando serem parâmetros interessantes para sensoriamento térmico. Combinando as duas notáveis propriedades: grande profundidade de penetração em tecidos humanos e sensibilidade térmica das bandas de fluorescência, experimentos de sensoriamento térmico intratecido foram feitos.

A combinação do caráter sensorial das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ com o de nanoaquecedor de nano-bastões de ouro, ambos sob excitação óptica em $\sim 800\text{ nm}$, foi explorado em uma solução mista com os dois para hipertermia intratecido e resultados promissores foram obtidos. No entanto, o uso de mais de uma NP pode não ser tão interessante uma vez que elas podem não ficar juntas no local excitado. Para resolver essa questão, demonstramos também que as próprias NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, além de serem excelentes bio-marcadores fluorescentes e nanosensores, podem também ser utilizadas como agentes foto-térmicos sob excitação óptica no infravermelho próximo (808 nm), dentro da primeira janela biológica.

Neste caso, encontramos que concentrações relativamente altas de íons Nd^{3+} (com concentração de 15-25 mol.%) garantem valores suficientes para a carga térmica na região de temperatura biológica. Como observado, os resultados obtidos com as NPs de fluoreto de lantânio dopadas com uma concentração de 25 mol.% de Nd^{3+} produziram um aquecimento local substancial e ainda continuavam a fornecer intensidade luminescente suficiente para o imageamento óptico e análise de nanotermometria óptica. Os experimentos *ex vivo* foram baseados na injeção subcutânea local da suspensão coloidal aquosa de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em tecido animal (músculo peitoral de aves *galiformes*) revelando o potencial de aplicação dessas amostras para futuros tratamentos foto-térmicos altamente eficiente e seletivos *in vivo*.

Continuando, foi demonstrado que a sensibilidade térmica das bandas de fluorescência de íons de Nd^{3+} pode ser utilizada para avaliar a dinâmica térmica intratecido por meio da leitura da temperatura durante os tratamentos foto-térmico usando um único feixe de excitação. Todas essas características creditam às NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ um caráter multifuncional único, pois elas podem funcionar eficientemente e ao mesmo tempo para imageamento fluorescente, nanotermômetros e nanoaquecedores com uma única fonte de excitação laser de baixa potência sintonizada em 808 nm . Portanto, os resultados aqui relatados abrem uma nova avenida para o desenvolvimento

e concepção de plataformas para o real desenvolvimento de terapias foto-térmicas simples e controladas.

REFERÊNCIAS

- [1] Kumar, V. R. Temperature Sensors and Optical Sensors. *Appl. Phys. B.* **2007**, 88, 297–303.
- [2] Zheng, S.; et al. Lanthanide-doped NaGdF₄ core-shell nanoparticles for non-contact self-referencing temperature sensors. *Nanoscale*, **2014**, 6, 5675-5679.
- [3] Lojpur, V.; et al. Y₂O₃: Yb, Tm and Y₂O₃: Yb, Ho powders for low-temperature thermometry based on up-conversion fluorescence. *Ceramics International* **2013**, 39, 1129-1134.
- [4] Pandey, A.; Rai, V.K. Improved Luminescence and Temperature Sensing Performance of Ho³⁺-Yb³⁺-Zn²⁺:Y₂O₃ Phosphor. *Dalton Transactions* **2013**, 42, 11005-11011.
- [5] Xu, W.; et al. Optical temperature sensing through the upconversion luminescence from Ho³⁺/Yb³⁺ Codoped CaWO₄. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, 188, 1096-1100.
- [6] Dong, N.; et al. NIR-to-NIR Two-Photon Excited CaF₂: Tm³⁺, Yb³⁺ Nanoparticles: Multifunctional Nanoprobes for Highly Penetrating Fluorescence Bio-Imaging. *Acs Nano*, **2011**, 5, 8665-8671.
- [7] Wawrzynczyk, D.; et al. Neodymium(III) Doped Fluoride Nanoparticles as Non-Contact Optical Temperature Sensors. *Nanoscale* **2012**, 4, 6959-6961.
- [8] Maestro, L.M., et al., CdSe Quantum Dots for Two-Photon Fluorescence Thermal Imaging. *Nano Lett.* **2010**, 10, 5109–5115.
- [9] Maestro, L.M., et al. CdTe Quantum Dots as Nanothermometers: Towards Highly Sensitive Thermal Imaging. *Small* **2011**, 7, 1774-1778.
- [10] Maestro, L.M.; et al. Fluorescent Nano-Thermometers Provide Controlled Plasmonic Mediated Intracellular Hyperthermia. *Nanomedicine* **2013**, 8, 379–388.

- [11] Johnson, S.A.; et al. Thermal Shifts in the Energy Levels of LaF₃: Nd³⁺. *J. Opt. Soc. Am.* **1967**, *57*, 734-737.
- [12] Jacinto, C.; et al. Thermal Lens and Z-scan Measurements: Thermal and Optical Properties of Laser Glasses. *J. Non-Cryst. Solids* **2006**, *352*, 3582–3597.
- [13] Jacinto, C. et al. Energy Transfer Processes and Heat Generation in Yb³⁺-doped Phosphate Glasses. *J. Appl. Phys.* **2006**, *100*, 113103.
- [14] Jacinto, C.; et al. Normalized-Lifetime Thermal-Lens Method for the Determination of Luminescence Quantum Efficiency and Thermo-Optical Coefficients: Application to Nd³⁺-doped Glasses. *Phys. Rev. B* **2006**, *73* 125107.
- [15] Brites, C.D.S.; et al. Thermometry at the Nanoscale. *Nanoscale* **2012**, *4*, 4799–4829.
- [16] Jaque, D.; Vetrone, F.; Luminescence Nanothermometry. *Nanoscale* **2012**, 4301-4326
- [17] Maestro, L.M.; et al. Absorption Efficiency of Gold Nanorods Determined by Quantum Dot Fluorescence Thermometry. *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *100*, 201110.
- [18] Chen, J.; et al. Gold Nanocages as Photothermal Transducers for Cancer Treatment. *Small* **2010**, *6*, 811-817.
- [19] Li, J.-L.; Gu, M. Gold-Nanoparticle-Enhanced Cancer Photothermal Therapy. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2010**, *16*, 989-996.
- [20] Quek, C.-H.; Leong, K.W. Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in Vivo Optical Imaging. *Nanomaterials* **2012**, *2*, 92-112.
- [21] Rocha, U.; et al. Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles. *Acs Nano* **2013**, *7*, 1188-1199.
- [22] Rocha, U.; et al. Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles for Fluorescence Bioimaging in the Second Biological Window. *Small* **2014**, *10*, 1141–1154.
- [23] Imbusch, B.H.a.G.F., Optical Spectroscopy of Inorganic Solids. *New York: Oxford Science* **1989**.
- [24] Rocha, U.; et al. Nd³⁺ doped LaF₃ Nanoparticles as Self-monitored Photo-Thermal Agents. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *104*, 053703.
- [25] Bednarkiewicz, A.; et al. Optically Stimulated Heating Using Nd³⁺ Doped NaYF₄ Colloidal Near Infrared Nanophosphors. *Appl. Phys. B* **2010**, *103*, 847-852.

- [26] Ebert, S.; et al. Fluorescence Ratio Thermometry in a Microfluidic Dual-Beam Laser Trap. *Opt. Express* **2007**, 15, 15493-15499.
- [27] Jacinto, C.; et al. Energy Transfer Processes and Heat Generation in Yb³⁺-doped Phosphate Glasses. *J. Appl. Phys.* **2006**, 100, 113103.
- [28] Jacinto, C.; et al. Normalized-Lifetime Thermal-Lens Method for the Determination of Luminescence Quantum Efficiency and Thermo-Optical Coefficients: Application to Nd³⁺-Doped Glasses. *Phys. Rev. B* **2006**, 73, 125107.
- [29] Bunzli, J.-C.G.; Eliseeva, S.V. Intriguing aspects of lanthanide luminescence. *Chem. Sci* **2013**, 4, 1939–1949.
- [30] Sardar, D. K.; Yow, R. M. Inter-Stark Energy Levels and Effects of Temperature on Sharp Emission Lines of Nd³⁺ in LiYF₄. *Phys. Stat. Sol.* **1999** 173, 521 - 533.
- [31] Kushida, T. Linewidths and Thermal Shifts of Spectral Lines in Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet and Calcium Fluorophosphate. *Phys. Rev.* **1969** 185, 500 - 508.

8 TERAPIA FOTOTÉRMICA INTRATUMORAL CONTROLADA

Neste capítulo, apresentaremos terapia via hipertermia controlada mediante o uso de NPs de LaF_3 dopadas com alta concentração de íons de Nd^{3+} . De fato, existem diferenças significativas entre a temperatura intratumoral e a superfície do tecido (pele), de modo que o ajuste incorreto deste parâmetro pode levar ao aparecimento de danos colaterais indesejáveis e irreversíveis. Nossos resultados abrem um novo caminho para a aplicação real da terapia fototérmica com base em NPs a nível clínico.

8.1 Terapia Fototérmica baseadas Nanopartículas Multifuncionais de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$

Vários tipos de NPs fluorescentes (tais como nanotubos de carbono, nanopartículas dopadas com íons terras raras e quantum dots com emissão no infravermelho) têm sido apresentadas como eficientes agentes de contrastes capazes de realizarem bioimagem fluorescente intratecido a alta profundidade, no entanto, foi dada qualquer indicação do uso dessas NPs para sensoriamento térmico intratumoral [1-3]. Por outro lado, NPs atuando como nanotermômetros luminescentes já têm sido utilizadas para realizar a leitura da temperatura em tempo real em sistemas biológicos (tais como células individuais e organismos vivos) durante o tratamento fototérmico [4, 5]. Entretanto, nesses casos, as terapias fototérmicas foram baseadas na combinação de nanoaquecedores e nanotermômetros luminescentes em uma mesma plataforma ou em uma mesma dispersão coloidal [6, 7]. Apesar dos bons resultados obtidos por essa abordagem, a sua real aplicação em tratamentos de tumores é bastante limitada, pois utilizam nanotermômetros luminescentes na região espectral do visível e, portanto, sua profundidade de penetração óptica nos tecidos biológicos é drasticamente reduzida [8]. Como já discutido nesta tese, para superar essa limitação é necessário utilizar nanotermômetros luminescentes com emissões situadas nas janelas biológicas (região espectral de 700 nm até 1400 nm).

Temos demonstrado ao longo desta tese que, além de serem excelentes sensores térmicos, umas das maiores vantagens no uso das NPs de fluoreto de lantânio dopadas com íons de Nd^{3+} é a combinação única de suas propriedades ópticas, ou seja, a possibilidade de manter uma relação equilibrada entre a fotoluminescência e a geração de calor, em função da concentração de Nd^{3+} nas NPs [8-11] conforme relatado na seção

7.3.2. De fato, quando a suspensão coloidal formada pelas NPs de LaF₃ dopadas com 25 mol.% de Nd³⁺ é opticamente excitada por uma fonte de radiação em 808 nm gera, simultaneamente, luminescência e calor (caracterizando sua multifuncionalidade). Nas próximas seção iremos avaliar a real aplicação das NPs de LaF₃ dopadas com 25 mol.% de neodímio para terapia fotérmica controlada em tumores humanos usando o modelo animal murino xenotrasnplante.

8.1.1 Descrição Experimental: Terapia Fototérmica in vivo

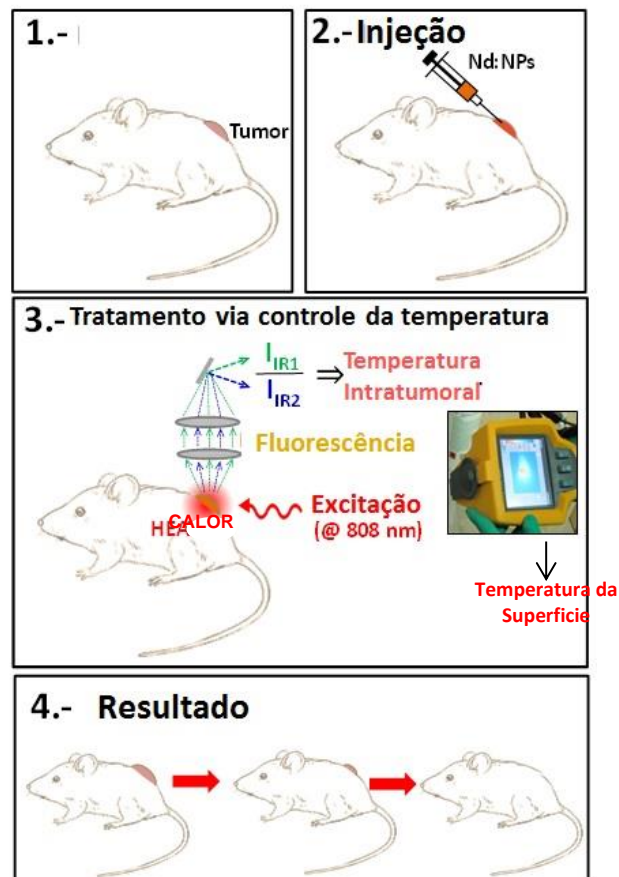
Para o modelo de tumor xenotransplante, inicialmente foram utilizados seis camundongos (fêmeas) sem pelos - atímicas (Harlan) com idade entre 9-16 semanas e com peso de 28-32 g. Para induzir o tumor foram inoculados em ambos os lados dos animais por via subcutânea 10x10⁶ células MDA-MB - 231 suspensas em um volume de 200 µL de PBS em cada flanco. O tamanho do tumor ou ulceração foi avaliado diariamente, a partir do dia subsequente ao dia da injeção, durante 20 dias. Quando os tumores atingiram um volume mínimo de nove mm³, iniciamos o tratamento térmico controlado. A metodologia utilizada para avaliar a eficiência do tratamento térmico mediante o uso combinado de NPs de LaF₃ dopadas com 25 mol.% de Nd³⁺ e radiação laser foi a seguinte: **(i)** tumor sob tratamento completo: NPs+ irradiação laser **(ii)** tumor mantido como controle: PBS + irradiação laser ou somente a solução coloidal contendo NPs sem irradiação laser.

Durante o tratamento, os pequenos animais foram anestesiados com 2% de isoflurano e em seguida foi injetado no tumor uma solução de PBS contendo as NPs de LaF₃ dopadas com 25 mol.% de Nd³⁺. A concentração das NPs de Nd³⁺ (25 mol.%):LaF₃ na solução foi de 50 µg/mL. O volume de NPs injetadas foi estimado em metade do volume total do tumor. No caso dos tumores de controle irradiados somente com laser, foi injetado o mesmo volume de PBS estéril no dentro do tumor. A fim de comprovar a eficiência do tratamento PBS + irradiação laser.

A excitação laser foi feita usando um laser de diodo em 808 nm acoplado a um cabo de fibra multimodo. Para o tratamento do tumor, o feixe laser foi expandido para uma área de aproximadamente três vezes a do tumor e a potência foi ajustada para fornecer uma densidade de potência laser de 4 W/cm². A intensidade do laser foi monitorada durante todo o experimento por meio de ajuste da potência do laser assim como do tamanho do spot laser. Desta forma, controlando a densidade de potência sobre a região tumoral. Para fazer o imageamento do animal como um todo, a área do feixe

laser utilizada foi de $\sim 6 \text{ cm}^2$ e a potência laser foi ajustada para 1 W/cm^2 . As imagens fluorescentes no infravermelho foram obtidas usando uma câmera CCD XEva 17 AsGaIn com sensibilidade na região espectral de 1000-1700 nm. Um filtro *longpass* com comprimento de onda de corte em 850 nm foi usado para remover o “background” da fonte de irradiação em 808 nm. A Figura 47 apresenta esquematicamente a metodologia experimental utilizada para avaliar as aplicações das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ em terapia fototérmica controlada de tumores humanos, onde foi utilizado o modelo animal murino xenotrasnplante.

Figura 47: Representação esquemática dos diferentes passos seguidos neste trabalho para o desenvolvimento de tratamentos foto-térmicos controlado de tumores em camundongos por meio da inoculação de uma solução de NPs LaF_3 com alta concentração de Nd^{3+} .



Fonte: Autor, 2014.

A fluorescência gerada pelas NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ inoculadas foi coletada por uma fibra óptica de abertura numérica pequena colocada a 1 cm da superfície tumoral, e desta forma devido à sensibilidade térmica da banda de fluorescência no intervalo

espectral de 860 a 920 nm, correspondente as transições eletrônicas entre os diferentes subníveis Stark dos estados eletrônicos $^4F_{3/2}$ (estado excitado) e $^4I_{9/2}$ (fundamental) do Nd^{3+} (ver capítulo sete) foi possível monitorar a temperatura intratumoral em tempo real [12-18]. A fibra foi conectada a um espectrômetro de alta resolução e foi feita varredura no intervalo espectral de 850 a 1000 nm com passos de 0,2 nm. O tempo de aquisição foi de 1s e a medida da temperatura em tempo real foi obtida usando um algoritmo para os espectros medidos que permitiam determinar em tempo real a razão de intensidades das bandas emitidas. A temperatura da superfície foi sistematicamente medida usando uma câmera térmica infravermelha (Fluke Ti10). Os animais foram mantidos em condições específicas livre de patógenos e com comida especial. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Autônoma de Madri (CEIT) no projeto FIS-PII2/01253, onde os experimentos foram desenvolvidos.

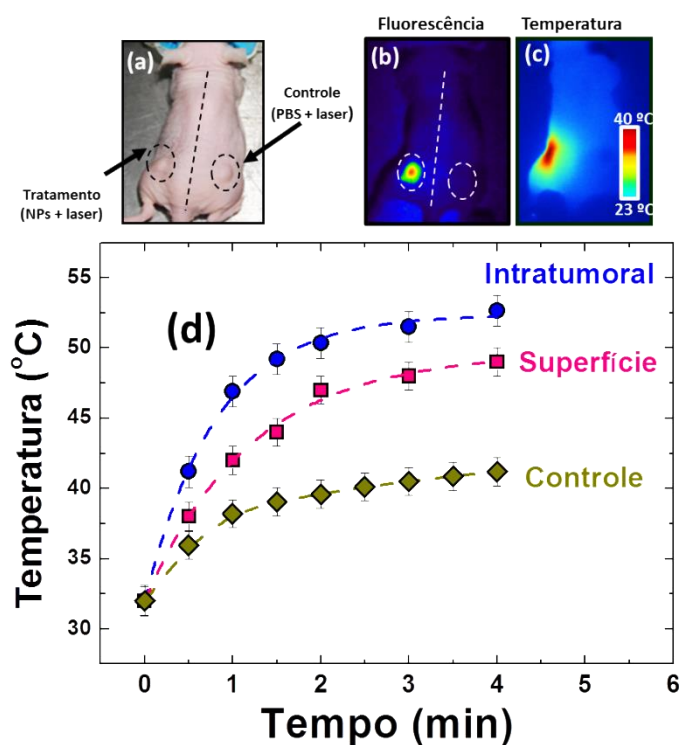
Como pode ser observado, foi realizado o monitoramento da temperatura intratumoral durante o tratamento fototérmico mediante a análise espectral da luminescência proveniente das NPs de Nd^{3+} (25 mol.%): LaF_3 . Coletamos, portanto, a fluorescência gerada de dentro do tumor pelas NPs inoculadas dentro do tumor, usando uma fibra óptica conectada a um espectrômetro de alta resolução.

8.2 Resultados e Discussões

A Figura 48(a) mostra uma imagem digital de um rato com um tumor em cada flanco. No tumor, localizado no flanco esquerdo, foi injetado uma suspensão coloidal contendo NPs de Nd^{3+} (25 mol.%): LaF_3 dispersas em PBS, com uma concentração 0,5 mg/mL de NPs. Já o tumor localizado no flanco direito, o qual foi usado como controle, foi introduzido a mesma quantidade de PBS. Ambos os tumores foram irradiados com laser de diodo, sintonizado em 808 nm com uma intensidade de $4,0 \text{ W/cm}^2$, durante 3 minutos tempo necessário para a estabilização da temperatura. A incorporação das NPs de Nd^{3+} : LaF_3 dentro do tumor (flanco esquerdo) foi evidenciada a partir do imageamento fluorescente no infravermelho, como pode ser observado na Figura 48(b). Embora ambos os tumores estivessem sendo irradiados pelo mesmo feixe laser, somente o tumor situado no lado esquerdo apresentou fluorescência. Usando o esquema experimental apresentado na Figura 47 foi possível medir e monitorar, simultaneamente,

a temperatura superficial (ver Figura 48(c)) e interna do tumor durante todo o tempo de irradiação laser, como mostra a Figura 48(d).

Figura 48: Imagem digital de um rato com dois tumores, um em cada lado. Uma suspensão coloidal de NPs de Nd^{3+} (25 mol.%): LaF_3 foi injetada apenas no tumor localizador do lado esquerdo. Já o tumor do lado direito foi utilizado como controle, ou seja, foi injetada apenas uma solução de PBS. As figuras (b) e (c) correspondem respectivamente a imagens de fluorescência e térmica, do mesmo animal sob excitação óptica em 808 nm. (d) Evoluções temporais das temperaturas na superfície e dentro do tumor, a partir de análises das imagens fluorescente (como na Figura (b)) e térmica (como na Figura (c)). Os pontos são dados experimentais e a linha pontilhada é apenas para guiar os olhos.



Fonte: Autor, 2014.

A partir da análise dos dados obtidos na Figura 48, observamos que a temperatura intratumoral foi em média 20% maior do que a temperatura média na superfície. Isso pode ser atribuído à difusão do calor através do tecido. Em outras palavras, o arrefecimento devido à circulação sanguínea e a perda de calor na superfície em consequência do contato do tecido com o ar, todos eles fazem com que o aquecimento na superfície seja inferior ao intratumoral [19]. Sendo assim, os dados incluídos na Figura 48(d) revelam a importância do monitoramento da temperatura intratumoral em

tempo real indicando, portanto, que não devemos assumir que a real temperatura do tumor seja a temperatura registrada na superfície (como tem sido frequentemente adotado em um passado não tão distante, durante a aplicação de terapias fototérmicas *in vivo*). Além disso, a Figura 48(d) também inclui a evolução temporal do aquecimento gerado na superfície do tumor mantido como controle (tratamento via PBS + laser) quando sujeito ao mesmo procedimento de irradiação laser. Note que o aquecimento gerado devido à absorção do tecido (aquecimento residual) é aproximadamente 50% inferior ao aquecimento induzido pelo tratamento fototérmico combinado via NPs + irradiação laser.

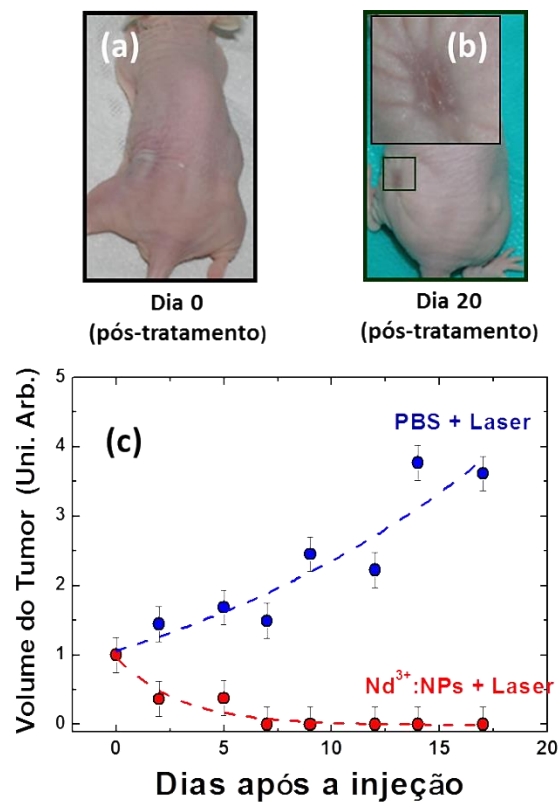
Neste momento, vale a pena ressaltar que a nanotermometria fluorescente oferece a possibilidade de medir a temperatura local do tumor sob tratamento. Em contrapartida, a termometria no infravermelho (radiação térmica) é capaz de fornecer imagens térmicas bi-dimensionais da região sob tratamento térmico (ou seja, imagens térmicas do tumor e dos tecidos vizinhos), tal informação é de especial relevância, pois também contribui para avaliação de danos colaterais. Disto, concluímos que o uso dos dois métodos são complementares entre si, de modo a aumentar o controle e eficiência do tratamento fototérmico.

Os resultados apresentados na Figura 49 avalia sistematicamente a evolução do tumor com o tempo demonstrando, portanto, a eficácia da terapia fototérmica. As Figuras 49(a) e (b) mostram imagens digitais de um rato (da mesma linha dos animais apresentados na Figura 48) com dois tumores, com 15 minutos e 20 dias após o tratamento. Lembrando que um tumor foi submetido ao tratamento fototérmico (NPs + laser) controlado e outro mantido como controle (PBS + laser). Os tumores submetidos à terapia fototérmica (NPs + laser) teve seu tamanho drasticamente reduzido logo nos primeiros cinco dias (ver Figura 49(c)).

A fim de avaliarmos a biodistribuição das nanopartículas injetadas de forma intratumoral, o camundongo foi sacrificado 20 dias após o início do tratamento, de modo que os órgãos internos foram recolhidos e submetidos à análise espectral por fluorescência sob excitação laser em 808 nm. Foram encontradas evidências da presença das NPs somente na cicatriz (decorrente do tratamento na pele do animal) e no baço (ver Figura 50). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados no capítulo cinco, pois as NPs são livres de qualquer revestimento (*shell*), de modo que a carga superficial é neutra [20-22]. Portanto, podemos afirmar que as NPs inicialmente

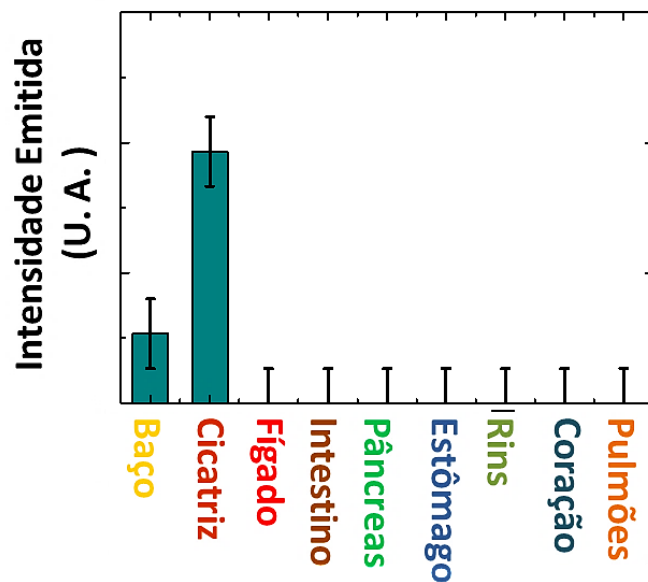
injetadas no tumor ao atingirem a corrente sanguínea são, finalmente, acumuladas no baço.

Figura 49: Fotografia digital dos mesmos animais apresentados na Figura 49 (a) e (b) representam as imagens digitais dos ratos após o tratamento (15 min e 20 dias, respectivamente) térmico com a solução coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ excitada opticamente pelo laser em 808 nm a $4\text{W}/\text{cm}^2$. Na Figura 49(c) é apresentada a evolução de ambos os tumores (tratados e controle). Os símbolos são dados experimentais e a linha pontilhada é apenas para guiar os olhos.



Fonte: Autor 2014.

Figura 50: Intensidade emitida obtida a partir dos diferentes órgãos do animal, no intervalo espectral de 1300 a 1500 nm. Assume-se que a intensidade emitida a partir dos órgãos é proporcional a concentração de NPs de Nd³⁺:LaF₃ em cada órgão. Em todos os casos a intensidade de fluorescência integrada foi normalizada pelo peso de cada órgão.

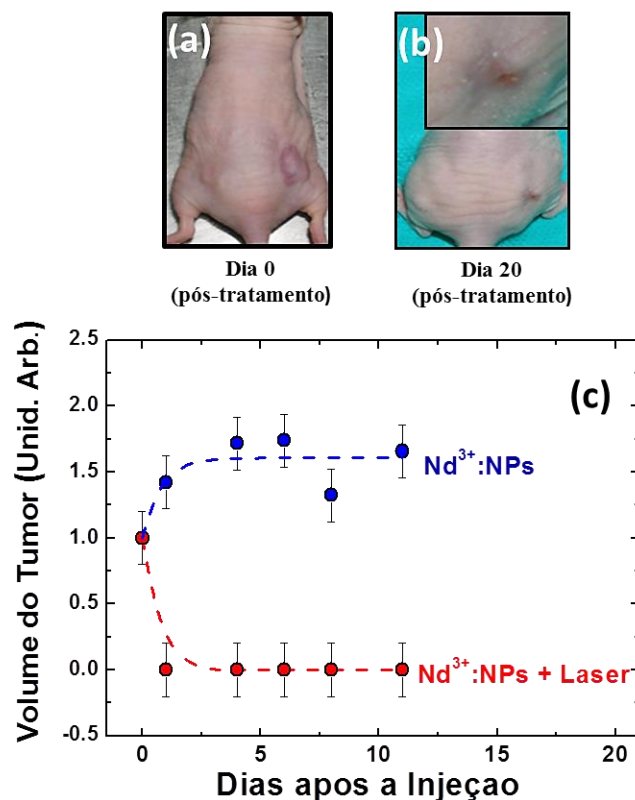


Fonte: Autor, 2014.

Com o intuito de relacionar de forma bem-sucedida e inequívoca a erradicação do tumor por meio do aquecimento induzido opticamente *in vivo*, foi utilizado um grupo diferente de animais. Neste caso, em ambos os tumores foram injetadas soluções densas de NPs de Nd³⁺:LaF₃, mas somente um dos tumores foi irradiado com o laser sintonizado em 808 nm (terapia fototérmica), ver Figura 51(a). As condições experimentais utilizadas tais como volume da suspensão coloidal injetada e intensidade de excitação foram as mesmas empregadas nos experimentos demonstrado na Figura 47.

A Figura 51(b) mostra uma imagem digital de um camundongo após a terapia fototérmica, indicando a completa eliminação do tumor sujeito ao tratamento térmico controlado, tendo como efeito colateral ou sequela uma única ferida não infeccionada. O monitoramento sistemático da evolução temporal dos tumores tratados e dos tumores mantidos como controle é apresentado na Figura 51(c). Essa figura demonstra claramente a eficiência do tratamento fototérmico (NPs +laser) quando comparado com o tumor não irradiado (somente NPs de fluoreto de lantânio).

Figura 51: (a) Fotografia digital de um rato com dois tumores, um em cada lado. Em ambos os tumores foram injetadas soluções coloidais contendo NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Neste caso, o tumor do lado esquerdo foi utilizado como controle (sem irradiação laser); Por outro lado, o tumor localizado do lado direito foi submetido ao tratamento fototérmico.



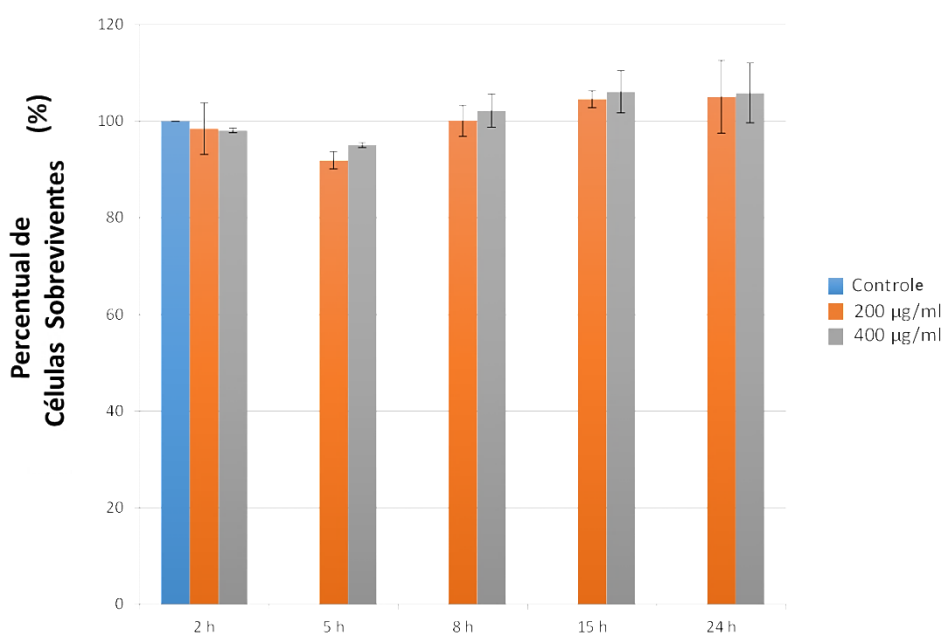
Fonte: Autor, 2014.

Foram realizados também uma série de experimentos *in vitro* com o propósito de determinar se as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ são tóxicas ou não, ou seja, se por si mesmas são terapêuticas sobre as células de câncer de mama (carcioma) MB-MDA-231. Para esta finalidade utilizamos o ensaio MTT de viabilidade celular durante 24 h após a exposição das culturas de células de NPs dispersas no meio de cultura [23]. Foram testadas duas concentrações distintas e cinco tempos de incubação diferentes. De acordo com os nossos resultados *in vivo*, as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ não causam nenhum dano às células MB-MDA-231 em qualquer uma das diferentes condições experimentais utilizadas, como pode ser observado na Figura 52.

Os resultados, *in vitro* e *in vivo*, indicam que o tratamento através apenas das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ não tem qualquer efeito terapêutico sobre as células cancerosas e o tumor. Disto, temos claramente demonstramos o potencial das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ para atuarem

como marcadores biológicos (ou agentes de contraste para imageamento fluorescente) e terapêuticos. De fato, se combinarmos as técnicas de bioimageamento óptico e de tratamento via hipertermia controlada (terapêutica), crescemos em esperança e novas expectativas no campo do tratamento do câncer.

Figura 52: Percentual das células de MB-MDA-231 sobreviventes após a incubação com solução coloidal de NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ por um tempo de incubação de 2, 5, 15 e 24 horas. Duas concentrações de NPs foram utilizadas: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada experimento foi realizado de forma independente, tal que as barras representam o valor médio de cada um. A barra de erro corresponde ao desvio padrão.



Fonte: Autor, 2014.

8.3 Conclusões

Em resumo, as experiências realizadas neste capítulo claramente demonstram que é possível realizar terapia fototérmica com o controle da temperatura de tumores do cancro *in vivo* altamente eficaz a usando nanopartículas biocompatíveis de LaF_3 dopados com íons de Nd^{3+} . A principal vantagem destas nanopartículas é o fato de atuarem ao mesmo tempo como nanoaquecedores e sensores térmicos fluorescentes (nanotermômetros luminescentes), com base nas propriedades dos íons de neodímio (excitação e decaimento). Definitivamente demonstramos a possibilidade da leitura da temperatura intratumoral de forma não invasiva ao longo de todo o tratamento por hipertermia (isto é, em tempo real) através de uma simples análise da luminescência

gerada pelas NPs de LaF₃ dopadas com íons de Nd³⁺ inoculadas dentro do tumor. Não obstante, as medidas da temperatura intratumoral destacaram a importância de usar a temperatura intratumoral real como fonte para o ajuste e controle da terapia em vez da temperatura na superfície (pele) que é tradicionalmente utilizada.

REFERÊNCIAS

- [1] Naczynski, D. J.; et.al. Rare-Earth-Doped Biological Composites as In Vivo Shortwave Infrared Reporters. *Nat. Commun.* **2013**, 4, 2199.
- [2] Au, G.H.; et al. Aqueous CdPbS Quantum Dots for Near-Infrared Imaging. *Nanotechnology* **2012**, 23, 275601.
- [3] Welsher, K.; Sherlock, S.P.; Dai, H. Deep-Tissue Anatomical Imaging of Mice Using Carbon Nanotube Fluorophores in the Second Near-Infrared Window. *PNAS* **2011**, 108, 8943-8948.
- [4] Donner, J.S. Imaging of Plasmonic Heating in a Living Organism. *Acs Nano* **2013**, 7, 8666-8672.
- [5] Donner, J.S.; et al. Mapping Intracellular Temperature Using Green Fluorescent Protein. *Nano Lett.* **2012**, 12, 2107-2111.
- [6] Kucsko, G.; et al. Nanometre-Scale Thermometry in a Living Cell. *Nature* **2013**, 500, 54-58.
- [7] Maestro, L.M.; et al. Fluorescent Nano-Thermometers Provide Controlled Plasmonic Mediated Intracellular Hyperthermia. *Nanomedicine* **2013**, 8, 379–388.
- [8] Smith, A.M.; Mancini, M.C.; Nie, S. Second Window for in Vivo Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, 4, 710-711.
- [9] Rocha, U.; et. al. Nd³⁺ doped LaF₃ nanoparticles as self-monitored photo-thermal agents. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, 104, 053703.
- [10] Imbusch, B.H.a.G.F. Optical Spectroscopy of Inorganic Solids. **1989**, *New York: Oxford Science*.
- [11] Jacinto, C.; et al. Normalized-Lifetime Thermal-Lens Method for the Determination of Luminescence Quantum Efficiency and Thermo-Optical Coefficients: Application to Nd³⁺-doped Glasses. *Phys. Rev. B* **2006**, 73, 125107.
- [12] Jacinto, C.; et al. Energy Transfer Processes and Heat Generation in Yb³⁺-doped Phosphate Glasses. *J. Appl. Phys.* **2006**, 100, 113103

- [13] Bednarkiewicz, A.; et al. Optically Stimulated Heating Using Nd³⁺ Doped NaYF₄ Colloidal Near Infrared Nanophosphors. *Appl. Phys. B* **2010**, 103, 847-852.
- [14] Ebert, S.; et al. Fluorescence Ratio Thermometry in a Microfluidic Dual-Beam Laser Trap. *Opt. Express* **2007**, 15, 15493-15499.
- [15] Bunzli, J.-C.G.; Eliseeva, S.V. Intriguing Aspects of Lanthanide Luminescence. *Chem. Sci.* **2013**, 4, 1939–1949.
- [16] Rocha, U.; et al. Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles. *Acs Nano* **2013**, 7, 1188-1199.
- [17] Johnson, S.A.; et al. Thermal Shifts in the Energy Levels of LaF₃: Nd³⁺. *J. Opt. Soc. Am.* **1967**, 57, 734-737.
- [18] Wawrzynczyk, D.; et al. Neodymium(III) Doped Fluoride Nanoparticles as Non-Contact Optical Temperature Sensors. *Nanoscale* **2012**, 4, 6959–6961.
- [19] Jaque, D.; Vetrone, F. Luminescence Nanothermometry. *Nanoscale* **2012**, 4, 4301-4326.
- [20] Xu, F.; Seffen, K.A.; Lu, T.J. Non-Fourier Analysis of Skin Biothermomechanics. *Int. J. Heat and Mass Trans.* **2008**, 51, 2237-2259.
- [21] Wang, F.; et al. Facile Synthesis of Water-soluble LaF₃:Ln³⁺ Nanocrystals. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 1031–1034.
- [22] Stouwdam, J.W.; Veggel, F.C.J.M.v. Near-infrared Emission of Redispersible Er³⁺, Nd³⁺, and Ho³⁺ Doped LaF₃ Nanoparticles. *Nano Lett.* **2002**, 2, 733–737.
- [23] Rocha, U.; et al. Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles for Fluorescence Bioimaging in the Second Biological Window. *Small* **2014**, 10, 1141–1154.
- [24] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxic Assay. *J. Immunol. Methods* **1993**, 95, 55- 63.

9 CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS GERAIS

O propósito desta tese foi de avaliar a eficiência das NPs de LaF₃ dopadas com íons de Nd³⁺ (Nd³⁺:LaF₃) como agentes de diagnósticos e terapêuticos. Inicialmente investigamos as propriedades ópticas das NPs de Nd³⁺:LaF₃, tais como luminescência, tempo de vida, e eficiência quântica de fluorescência. Mediante excitação laser em 808 nm (CW) foram observadas as três principais bandas de fotoluminescência do íon de Nd³⁺ que são em torno de 900, 1050 e 1330 nm, todas elas se encontram dentro das janelas de transparência dos tecidos humanos, ou seja, encontram-se na chamada *janela biológica* (600 – 1400 nm). Além disso, comprovamos a ausência de fotodegradação sob irradiação laser em 808 nm ao longo de todas as atividades experimentais. Durante todos os experimentos as NPs em solução aquosa permaneceram estáveis e sem a presença de precipitação durante semanas/meses. Como esperado, semelhantemente ao “*bulk*” a transição eletrônica com maior probabilidade de ocorrer é a $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$ em ~1050 nm, considerada a principal emissão luminescente desse íon. A eficiência quântica de fluorescência foi determinada a partir de medidas sistemáticas de um conjunto de NPs de Nd³⁺:LaF₃ com diferentes concentrações de Nd³⁺ (0, 2, 10, 15 e 20 mol%) mediante uso da técnica de espectroscopia de Lente Térmica, donde concluímos que a concentração de íons de Nd³⁺ ideal para bio-imagem fluorescente é a de 15 mol.%. Estudos sobre a morfologia dessas NPs foram realizados por microscopia de transmissão eletrônica (imagens TEM), e a partir das imagens foi possível estimar que o tamanho médio das NPs de LaF₃ está entre 12 e 15 nm.

Aplicações das NPs dopadas com Nd³⁺ para bioimagens fluorescentes com testes *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* também foram realizadas. Nos testes *in vitro* verificamos que entre as três bandas de emissão do Nd³⁺, a mais intensa (em torno de 1050 nm) é a mais adequada para bioimagens de fluorescência a altas profundidades. Esta banda de fluorescência está situada na *segunda janela biológica* onde os tecidos mostram, simultaneamente, baixa dispersão (espalhamento) e baixo coeficiente de absorção. Esta banda de fotoluminescência foi utilizada para obter imagens de alto contraste em *in vitro* de células do tipo HeLa (cancro). Como um primeiro passo para realizarmos experimentos *in vivo*, usamos o método de ensaio MTT baseado na observação das atividades de desidrogenases mitocondriais, para investigar a viabilidade celular das células HeLa após incubá-las com NPs de Nd³⁺:LaF₃. Os resultados indicaram uma

excelente bio-compatibilidade das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$. Também foram obtidas imagens fluorescentes *ex vivo* com base na emissão das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ injetadas em diferentes profundidades de penetração e resultados excelentes foram obtidos para regiões de penetração tão grande quanto 1 cm, devido às excitação e emissão estarem dentro das janelas biológicas. Finalmente obtivemos pela primeira vez, pelo que conhecemos, a aquisição de imagens fluorescente *in vivo* usando NPs dopadas com Nd^{3+} com emissão na *segunda janela biológica* sob excitação óptica em 808 nm.

Uma vez que demonstramos as propriedades de profundidade de penetração, espalhamento e imageamento fluorescente em tecidos usando as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$, investigamos o potencial do material sob estudo para nanosensor térmico intratecido.

Como pôde ser observado, as NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ mostraram bandas de fluorescência com notável sensibilidade térmica no intervalo fisiológico de temperatura (20 a 60 °C), possibilitando, portanto, a detecção de temperatura de sistemas biológicos. O sensor térmico foi baseado em variações espectrais com a temperatura na banda da transição $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{9/2}$ associada à emissão entre 850 e 900 nm, em que tanto a excitação laser quanto a luminescência estão situados na região de transparência óptica dos tecidos (janela biológica), o que favorece e facilita o uso desta NPs como nanotermômetros em biosistemas. Em resumo, foi demonstrado o caráter multifuncional das NPs de $\text{Nd}^{3+}:\text{LaF}_3$ como agentes fototérmicos para diagnóstico e terapias de sistemas biológicos com potencial aplicação em nanomedicina, microfluidica, nanoeletrônica, etc.

As perspectivas de outros usos com as NPs fluorescentes e foto-térmicas estudados aqui são várias. Alguns deles são:

- 1) Devido as altas penetrações em tecidos biológicos e o excelente contraste obtidos, deve-se explorar imagens tridimensionais a partir de NPs de LaF_3 dopadas com Nd^{3+} emitindo em 1340 nm e outros íons com emissões na segunda (1000 – 1400 nm) e terceira (1600 – 1700 nm) janelas biológicas (JBs). Nessas JBs os espalhamentos são mais reduzidos ainda e auto-fluorescências desprezíveis. Exemplos de íons com emissões nessas regiões que podem ser utilizados são: Tm^{3+} , Pr^{3+} , Ho^{3+} , etc.
- 2) Experimentos de penetração com emissões na segunda e terceira JBs;
- 3) Obtenção de um protótipo compacto para imageamento e hipertermia controlada de sistemas biológicos; etc

9.1 Lista das publicações do autor durante o desenvolvimento da tese

- [1] Villa, I.; Vedda, A.; Cantarelli, I. X.; Pedroni, M.; Piccinelli, F.; Bettinelli, M.; Speghini, A.; Quintanilla, M.; Vetrone, F.; **Rocha, U.**; Jacinto, C.; Carrasco, E.; Sanz-Rodríguez, F.; Cruz, A. G.; Rosal, B.; Ortgies, D. H.; Haro-Gonzalez, P.; Solé, J. G.; Jaque, D. G. 1.3 μm Emitting $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$ Nanoparticles for High Contrast in Vivo Imaging in the Second Biological Window. *Nano Res.* **In press**, DOI:10.1007/s12274-014-0549-1.
- [2] Carrasco, E.; Sanz-Rodríguez, F.; de la Fuente, A. J., Haro-Gonzales, P.; del Rosal, B.; Rocha, U.; Kumar, K. U.; Jacinto, C.; Solé, G. J. and Jaque, D. Intratumoral Thermal Reading During Photo-Thermal Therapy by Multifunctional Fluorescent Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **In press**, DOI: 10.1002/adfm.201403653.
- [3] **Rocha, U.**; Kumar, K. U.; Jacinto, C.; Ramiro, J.; Caamaño, A. A.; Solé, J. G.; Jaque, D. Nd^{3+} Doped LaF_3 Nanoparticles as Self-Monitored Photo-Thermal Agents. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, 104, 053703.
- [4] **Rocha, U.**; Kumar, K. U.; Jacinto, C.; Villa, I.; Sanz-Rodríguez, F.; Cruz, M. d. C. I. d. I.; Juarranz, A.; Carrasco, E.; Veggel, F. C. J. M. v.; Bovero, E.; Solé, J. G.; Jaque, D. Neodymium doped LaF_3 Nanoparticles for Fluorescence Bio-Imaging in the Second Biological Window. *Small* **2014**, 10, 1141-54.
- [5] **Rocha, U.**; Silva, C. J. d.; Silva, W. F.; Guedes, I.; Benayas, A.; Maestro, L. M.; Elias, M. A.; Bovero, E.; Veggel, F. C. J. M. v.; Solé, J. G.; Jaque, D. Sub-Tissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, 7, 1188–1199.
- [6] Maestro, L. M.; Jacinto, C.; **Rocha, U.**; Vetrone, F.; Capobianco, J. A.; Jaque, D.; Solé, J. G. Response to "Critical Growth Temperature of Aqueous CdTe Quantum Dots is Non-negligible for their Application as Nanothermometers". *Small* **2013**, 9, 2-3.
- [7] Jaque, D.; Maestro, L. M.; Escudero, E.; Martín Rodríguez, E.; Capobianco, J. A.; Vetrone, F.; Juarranz de la Fuente, A.; Sanz-Rodríguez, F.; Iglesias-de la Cruz, M. C.; Jacinto, C.; **Rocha, U.**; García Solé, J. Fluorescent Nano-Particles for Multi-Photon Thermal Sensing. *J. Lumi.* **2013.**, 133, 249-253
- [8] Santos, C. C.; **Rocha, U.**; Guedes, I.; Vermelho, M. V. D.; Boatner, L. A.; Jacinto, C. Thermal Lens Study of Thermo-Optical Properties and Concentration Quenching of Er^{3+} -Doped Lead Pyrophosphate Based Glasses. *J. Appl. Phys.* **2012**, 111, 123101.
- [9] Maestro, L. M.; Jacinto, C.; **Rocha, U.**; Iglesias-de la Cruz, M. C.; Sanz-Rodríguez, F.; Juarranz, A.; Solé, J. G.; Jaque, D. Optimum Quantum Dot Size for Highly Efficient Fluorescence Bioimaging. *J. Appl. Phys.* **2012**, 111, 023513.
- [10] Maestro, L. M.; Jacinto, C.; **Rocha, U.**; Vetrone, F.; Capobianco, J. A.; Jaque, D.; Solé, J. G. CdTe Quantum Dots as Nanothermometers: Towards Highly Sensitive Thermal Imaging. *Small*, **2011**, 7, 1774–1778.

APÊNDICES

A Fundamentos de Microscopia Óptica

A palavra microscópio tem origem na palavra grega *mikrós* que significa “pequeno” e *skopeîn* que significa “observar”, as quais descrevem exatamente o que a microscopia faz: visualiza pequenos objetos. Isto é alcançado através da ampliação do objeto, aumentando a resolução da imagem. Na microscopia óptica o objeto é submetido a incidência de luz (por exemplo, o laser) e o sinal transmitido, refletido ou emitido é analisado. Tal análise é feita pela Espectroscopia, que nos fornece informações entre a interação da luz e o objeto em questão.

O primeiro microscópio foi inventado em torno de 1595 pelos holandeses Hans Jansen e Zacharias Jansen. O aparato era constituído por duas lentes e vários diafragmas montados dentro de três tubos (ajustáveis entre si), o qual gerava uma ampliação do tamanho real do objeto de 3 a 9 vezes, o que possibilitaria em futuro próximo a visualização de células e bactérias. Apesar de simples, as ideias empregadas para construção dos microscópios atuais são baseadas nos mesmos princípios. Em 1665 Robert Hook, relatou pela primeira vez, experimentos de microscopia óptica. Ele examinou uma fatia de cortiça e verificou que ela era constituída por cavidades poliédricas, às quais ele nominou de “células”. Entretanto, a denominação de “célula” utilizada por Hooke para os poros observados foi devido à comparação entre os quartos dos mosteiros, que eram chamados de celas. Logo o termo célula, cunhado por Hooke, foi empregado em um contexto e sentido diferentes dos atuais.

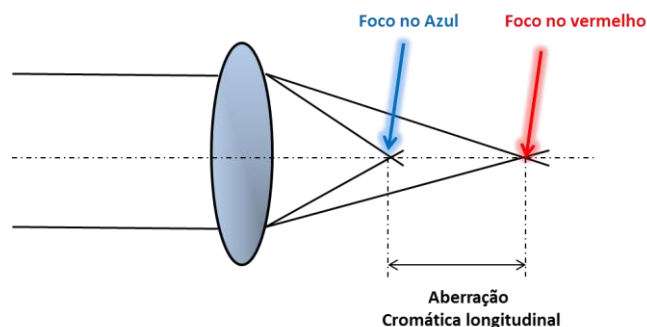
Podemos dizer que os parâmetros de ampliação e resolução formam as principais características de um microscópio. A grande capacidade de ampliação, que torna possível investigar pequenos detalhes de “pequeníssimos e finíssimos” objetos, deixa o campo de visão mais estreito, de modo a dificultar sua orientação sobre a amostra. Por outro lado, uma menor ampliação, embora ofereça uma imagem com menos detalhes, facilita a visualização do objeto como um todo. Geralmente, dependendo da aplicação, a magnitude da ampliação usada em sistemas biológicos, tais como tecido, esta entre 5 a 100 vezes o tamanho original. A resolução da imagem depende de todo o aparato experimental utilizado, tal como, comprimento de onda de excitação óptica, como

também de cada peça óptica localizada entre o caminho óptico percorrido pela luz até chegar ao sistema de detecção, tais como lentes, espelhos, filtros, objetivas e outros.

Tanto a ampliação como a resolução são limitadas pelos fenômenos da aberração e difração óptica da luz. O efeito da aberração ocorre devido à dispersão da luz e geometria da lente. A amostra também contribui para o efeito da aberração óptica. As aberrações não podem ser totalmente extinguidas, mas podem ser drasticamente minimizadas. Já a difração ocorre quando a luz passa por uma abertura com a mesma ordem de tamanho do seu comprimento de onda. De fato, este efeito define o limite da resolução final da imagem, uma vez que ele é dominante sobre o parâmetro da ampliação. Embora o foco da tese não seja a investigação desses efeitos, vamos aqui, fazer apenas um breve resumo deles, pois acreditamos que tais efeitos contribuem para o resultado final da imagem óptica.

As aberrações (desvios ópticos) podem ser classificadas como cromáticas e monocromáticas. As aberrações cromáticas é o resultado da dispersão do índice de refração com o comprimento de onda (isto é, $n = n(\lambda)$), produzindo uma variação focal. Por exemplo, como o índice de refração é maior para o comprimento de onda na região do azul do que no vermelho, a refração desvia mais a luz azul, como pode ser observado na Figura A.1, para uma lente convexa positiva. Sendo assim, diferentes comprimentos de onda iluminando um objeto terão sua imagem formada em pontos diferentes. Note que os comprimentos de ondas intermediários terão focos em posições intermediárias.

Figura A.1: Aberração cromática longitudinal.

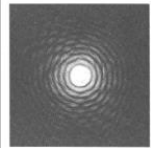

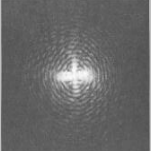
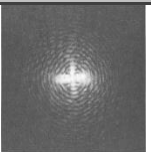
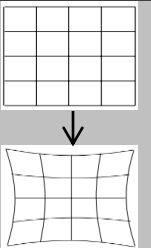


Fonte: Autor, 2014.

Já as aberrações monocromáticas (ou Aberrações de Seidel) ocorrem para qualquer comprimento de onda (cor) e índice de refração. Aberrações monocromáticas são aberrações que surgem devido à geometria dos desvios da teoria paraxial. Teoria de

primeira ordem que corresponde à aproximação $\text{sen}\theta \approx \theta$. Se estendermos a aproximação até o próximo termo ($\text{sen}\theta \approx \theta - \theta^3/6$), já se pode vislumbrar o desvio da teoria paraxial. Esta teoria de terceira ordem descreve as cinco aberrações primárias ou de Seidel. Tais aberrações dominantes que determinam a qualidade da imagem são classificadas como: *esférica*, *coma*, *astigmatismo*, *curvatura* e *distorção* (ver Tabela A). Entretanto, as lentes e objetivas mais avançadas para microscopia são projetadas para compensar uma ou mais aberrações e as informações das correções previstas são dada sobre o corpo da objetiva.

Tabela A - Os cinco tipos básicos de aberração, que são devido à geometria das lentes ou espelhos.

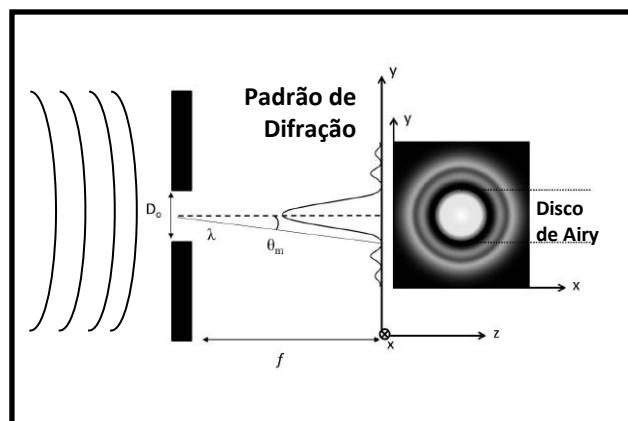
Aberrações de Seidel	Características	Imagem
Esférica	Este efeito está relacionado com raios que fazem grandes ângulos em relação ao eixo óptico do sistema. Diferentes focos.	
Coma	Um efeito fora do eixo que aparece quando os feixes dos raios incidentes fazem o mesmo ângulo em relação ao eixo óptico. Ocorre a degradação da imagem em um ponto.	
Astigmatismo	Não é possível focalizar simultaneamente as linhas verticais e horizontais.	
Curvatura de campo	Aberração da objetiva que provoca um plano de focagem curvo. Faz um objeto plano parecer curvado. Esta perda de nitidez é muitas vezes compensada aumento de profundidade da focagem.	
Distorção	Este efeito é fruto da diferença de ampliação/magnificação lateral da lente. Aberração óptica caracterizada por linhas retas que tomam uma forma curvada, afetando sua reprodução geométrica, especialmente na periferia da lente.	

Como foi dito anteriormente, os efeitos da difração ocorrem quando a abertura, pela qual a luz irá passar, é da mesma ordem do comprimento de onda da luz. No caso de um orifício circular de diâmetro “ D_0 ”, a figura de difração consiste em um ponto central mais intenso (máximo central) e de anéis luminosos concêntricos, alternados por anéis escuros (disco de Airy), como mostrados na Figura A.2. Para o primeiro anel escuro a solução numérica é:

$$\text{sen}\theta = \frac{1,22\lambda}{D_0} \quad (\text{A.1})$$

Aberturas circulares com diâmetros próximos (da ordem de grandeza) ao comprimento de onda incidente não produzem o anel escuro, de modo que a intensidade central é espalhada sobre todo o anteparo (eixo y). Cada ponto de luz (pixel) que participa da formação de uma imagem é difratado e alargado pelo efeito da difração. Portanto, a difração também será o principal limitador da resolução dos microscópios.

Figura A.2: Difração a partir de uma abertura circular com diâmetro D_0 . A direita é mostrado o disco de Airy.



Fonte: Autor, 2014.

O limite da resolução do microscópio é baseado no critério de resolução de Rayleigh. Segundo Rayleigh, dois objetos podem ser distinguidos quando o máximo central de um coincide com o mínimo do outro. Por exemplo, dois orifícios próximos podem produzir seus máximos centrais sobrepostos de modo a não serem distinguidos, ou seja, resolvidos (ver Figura A.3). Note que a resolução é a menor distância entre

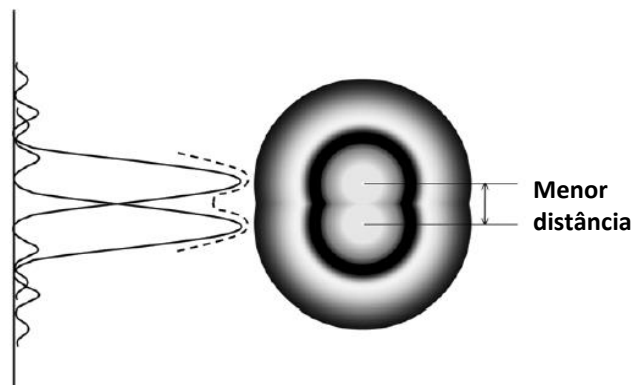
pontos ou parte do objeto. A equação (A.2) define o limite de resolução de um microscópio óptico de acordo com o critério de Rayleigh.

$$R = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \text{sen}\theta} \text{ ou } R = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad (A.2)$$

Onde R é a menor distância discriminativa, n é o índice de refração do meio em que está imersa a lente frontal da objetiva e NA é a abertura numérica. A abertura numérica que aparece na equação acima expressa o poder de resolução das lentes e o brilho da imagem formada, quanto maior a abertura numérica melhor a qualidade da resolução. As lentes objetivas são responsáveis pela ampliação da amostra. Para uma alta ampliação e uma alta resolução necessita-se de lentes objetivas com uma NA grande. Esse parâmetro determina o poder separador do microscópio e é dado na equação (A.3). Note que a resolução só irá depender do comprimento de onda da luz e da abertura numérica.

$$NA = n \cdot \text{sen}\theta \quad (A.3)$$

Figura A.3: Distinguindo dois objetos segundo o critério de Rayleigh.



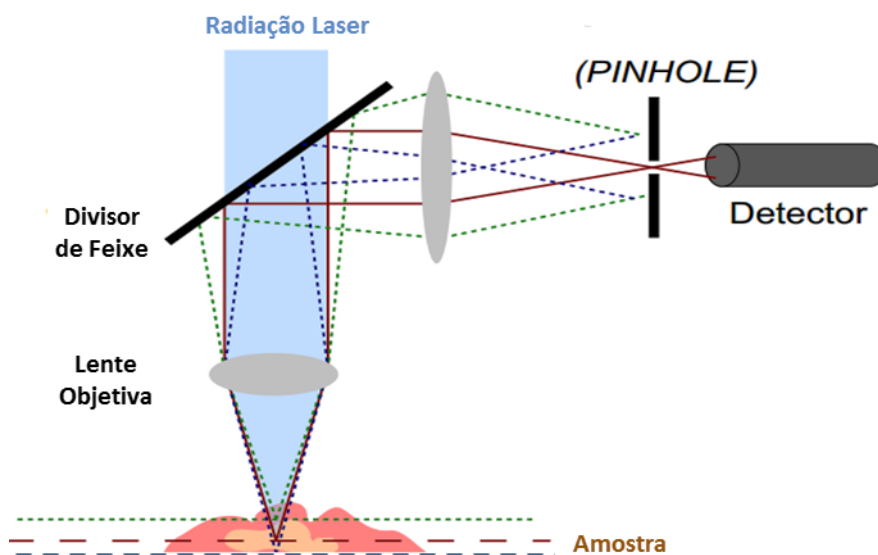
Fonte: Autor, 2014.

B Microscopia Confocal

A principal diferença entre a microscopia óptica convencional e a microscopia óptica confocal é o modo de como a imagem é produzida. A microscopia confocal representa um dos mais importantes avanços, principalmente, porque é uma técnica capaz de visualizar células e tecidos vivos em profundidade. O microscópio confocal

utiliza como fonte de luz o laser. Seu sistema óptico é o mesmo da fluorescência tradicional, com exceção de que a iluminação se dá somente em pequenos pontos iluminados pelo laser. A resolução espacial é controlada pelo orifício chamado pinhole ou íris que elimina a luz proveniente de objetos que estejam fora do plano focal (ver Figura B1). O tamanho do pinhole utilizado dependerá da aplicação, ou seja, a luz emitida pelo objeto (amostra, espécime e outros), que tem comprimento de onda diferente da fonte de excitação. Durante o processo de excitação a luminescência emitida pela amostra é coletada pela mesma objetiva de excitação, tal luminescência passa por filtros e espelhos, mas antes de chegar ao detector passa pelo pinhole de abertura bastante reduzida, de forma que podemos considerar (quase que completamente) que a emissão é gerada somente pelo plano focal. Obviamente, o tamanho do orifício irá afetar a intensidade da luz que atinge o detector, afetando também a resolução da imagem.

Figura B.1: A figura mostra um esquema simples baseado no princípio da microscopia confocal. Neste caso uma fonte pontual de luz ilumina uma região do objeto e o detector recebe radiação da área do ponto do objeto. A imagem é construída através da varredura da fonte que está em sincronia com o detector.



Fonte: Autor, 2014.