EDITAL INTERNO Oportunidade de Nucleação de novos Projetos de Pesquisa – DPDE/IPEN Nº 5/2018

Desenvolvimento de Materiais Fluorescentes: Nanopartículas Fluorescentes de Fosfatos de Cálcio dopados com Lantanídeos para aplicações em Terapia Gênica e em Lasers Randômicos

Proponente: Dra. Flávia Rodrigues de Oliveira Silva

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN)

a) Identificação da proposta

Projeto de inovação envolvendo os centros de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM) – Programa 7: Materiais e Nanotecnologia, Atividade 720: Materiais Cerâmicos e 750: Nanomateriais; o Centro de Biotecnologia (CB) – Programa 8 – Biotecnologia, Atividade 820 – Biofármacos, e o Centro de Lasers e Aplicações (CLA) - Programa 9 – Tecnologia Lasers, Atividade 910 – Desenvolvimento de Lasers - do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), visando a obtenção de nanopartículas de fosfatos de cálcio fluorescentes e suas aplicações como vetores não virais para terapia gênica , bem como sua utilização no desenvolvimento de lasers randômicos.

A síntese de biomateriais fluorescentes vêm sendo realizadas pela proponente e os demais colaboradores do CCTM, desde 2014. Enquanto que o grupo da Dra Maria Helena Bellini Marumo, do CB, desenvolve pesquisas relacionadas à biologia molecular e transcrição gênica usando vetores virais. A proposta desse projeto é unir o conhecimento e força de ambos os grupos para o desenvolvimento de vetores não-virais eficientes para contribuir com o desenvolvimento da terapia gênica, técnica essa tão promissora na medicina moderna.

Adicionalmente, esses fosfatos de cálcio dopados serão estudados em colaboração com o Dr Niklaus Ursus Wetter, no CLA, como novas tecnologias lasers.

b) qualificação do principal problema a ser abordado

A terapia gênica é uma abordagem terapêutica que pode, teoricamente, ser usada para o tratamento e prevenção de qualquer doença. Trata-se de uma técnica baseada na transfecção de genes terapêuticos para substituir ou silenciar genes defeituosos através da indução de morte celular seletiva nos casos de tratamento de câncer e outras doenças[1].

Ela tem o potencial de revolucionar a medicina moderna e direcionar as terapias futuras para muitas doenças como câncer, doenças cardíacas, diabetes, artrite e desordens neurológicas. Porém o progresso dessa terapia depende da eficiência da transfecção do gene. Ácidos nucléicos livres estão propensos à rápida eliminação, degradação enzimática e baixa permeabilidade celular, sendo necessário um carreador que transporte o DNA para dentro das células vivas. Esse transportador é denominado vetor.

Diferentes vetores têm sido investigados para o transporte dos ácidos nucléicos. A maioria deles é baseado em vírus, que são micro-organismos especializados em invadir células e nelas introduzir seu material genético. Enquanto esses sistemas apresentam alta

eficiência na transfecção, seu envelope proteico viral ainda traz dúvidas na questão de segurança, pois mesmo após o conteúdo genômico ser removido, ele ainda pode ser imunogênico, ou em alguns casos, integrar-se a uma região ativa do genoma com subsequente risco de expressão gênica indesejável[2].

Um vetor não-viral sintético na forma de nanopartícula orgânica ou inorgânica poderia oferecer uma alternativa atraente. Esse vetor não-viral idealmente deveria ter as seguintes características: ser não citotóxico ou imunogênico, apresentar alta biocompatibilidade e biodegradação, forte complexação com o gene e alta capacidade de transporte, proteção do gene, armazenamento e estabilidade biológica, alta especificidade com a célula alvo, internalização celular, sendo essa usualmente por endocitose, onde após fundir-se com um endossoma (vesícula revestida por uma membrana dupla) ocorre posteriormente a ruptura do endossoma liberando assim o DNA no núcleo. Nestas condições ocorre a expressão do gene em RNA, a partir do qual pode-se gerar novas proteínas de interesse. Esse vetor ideal ainda não está disponível e os carreadores existentes sofrem tanto de efeitos adversos inaceitáveis quanto de eficiência de transfecção inadequada.

Lipossomas, polímeros catiônicos, quitosana, nanotubos de carbono, entre outros, têm sido estudados como candidatos a vetores não-virais devido a sua habilidade de se ligar a membrana celular carreada negativamente e ser internalizado através da endocitose. Porém, além da citotoxicidade, esses carreadores não apresentam expressão genética satisfatória nos modelos *in vivo*[3,4,5]. A razão principal para essa ineficiência na transfecção é a baixa liberação endossomal e consequentemente quantidade insuficiente dos genes transportados chegam ao núcleo.

Uma transfecção eficiente é alcançada quando o vetor gênico efetivamente facilita a estabilidade química e física do DNA no espaço extracelular, a adesão celular, o escape do DNA do endossoma, e o transporte citoplasmático para o núcleo, onde ocorrerá a transcrição gênica. Dificuldades em quaisquer uma dessas etapas resulta na perda de material genético e, como consequência, em baixa expressão gênica.

Vetores de fosfatos de cálcio (CaP), como a hidroxiapatita (HA) e o beta fosfato tricálcico (β-TCP) podem superar essas dificuldades. Ao contrário de outros vetores não virais, o uso de compostos adicionais para romper a membrana endossômica não é necessário no caso do CaP. Uma vez dentro da célula, o vetor CaP carregando o gene começa a se dissolver devido ao ambiente ácido do compartimento endossômico. Isso liberará Ca^{2+} que provocará a ruptura da membrana do endossoma devido ao

desbalanceamento osmótico, permitindo a passagem do DNA para o espaço citoplasmático[6].

A liberação de íons Ca^{2+} não apenas permite o escape do endossoma, como também aumenta a estabilidade do material genético no citosol da célula hospedeira, protegendo-o de qualquer degradação. E mais, a presença de excesso de cálcio exógeno no citoplasma abre os canais do complexo de poro nuclear (NPCs) permitindo que o complexo gene-Ca^{2+} atravesse facilmente o envelope nuclear, e uma vez no núcleo, possa ocorrer a transfecção gênica[6].

Biocompatibilidade, solubilidade celular, fácil manuseamento, capacidade de adsorção e transporte de cadeias de DNA de diferentes tamanhos são outras vantagens dos CaPs[6].

Embora as nanopartículas de CaP sejam muito promissoras na terapia gênica, essas partículas ainda não são amplamente implementadas como vetores gênicos, devido aos seguintes problemas: heterogeneidade das partículas, formação de agregados e aglomerados, baixa estabilidade e dispersão. Além disso, as nanopartículas de HA/β-TCP produzidas, normalmente apresentam grande discrepância em tamanho, forma, carga superficial e cristalinidade, provavelmente devido a sensibilidade da formação de HA no processo de síntese que inclui variáveis como temperatura, pH, concentrações iônicas de cálcio e fósforo, taxa e modo de adição dos precursores e presença de dopantes [3,7,8].Como dito anteriormente, essas propriedades morfológicas e fisicoquímicas são fundamentais na determinação da transfecção. Partículas heterogênicas apresentam eficiência de transfecção inconsistente e pode levar a efeitos imprevisíveis no corpo e por isso são inapropriadas para o uso como vetores. A disparidade no tamanho das partículas produzidas é ainda mais exacerbada com a agregação das partículas, o que produz aglomerados com larga distribuição de tamanhos e morfologias irregulares[5,9], prejudicando a estabilidade de armazenamento.

Diferentes sistemas têm sido desenvolvidos para estabilizar as partículas de CaP, o que pode ser obtido com dopagem com diferentes íons que alteram a carga e tamanho da partícula, recobrimento com polímeros, amino-ácidos ou DNA, etc[10].

- Fosfatos de Cálcio

A estrutura dos fosfatos de cálcio permite substituições catiônicas e aniônicas: Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o Mg^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, entre outros, e

lantanídeos (Ln) como Eu^{2+}, Eu^{3+}, Gd^{3+}, Yb^{3+}, Tm^{3+}, Er^{3+}, Tb^{3+} e etc; Os grupos PO_4^{2-} podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos e; nas hidroxiapatitas os grupos OH^- por CO_3^{2-}, F^-, Br^- e Cl^- [11, 12, 13]. Essas substituições catiônicas têm como propósito alterar as características do material aproveitando as melhorias individuais ou concomitantemente (nos casos de co-dopagem) que cada íon promove no biomaterial. Elas podem ocorrer em um ou nos dois sítios catiônicos não equivalentes da HA: CaI e CaII. Os cátions do sítio I apresentam simetria trigonal (C_3) formada por nove átomos de oxigênio que coordenam o sítio catiônico, enquanto que os cálcios do sítio II estão coordenados a 6 átomos de oxigênio e ao íon OH^-, apresentando simetria local (Cs)[14].

A incorporação do Mg^{2+} nas partículas de fosfato de cálcio causa significante inibição no crescimento da partícula, resultando em partículas na escala nanométrica o que contribui notavelmente para a incorporação celular do DNA e sua subsequente expressão do transgene, e dependendo da quantidade de Mg^{2+} substituindo o Ca^{2+} essa eficiência pode aumentar em até 100 vezes, quando comparado com os fosfatos sem adição de Mg^{2+} [2,15,16]. No β-TCP, o Mg, além de torná-lo mais estável, torna-o também mais resistente a dissolução, hidrólise e na transformação para HA na presença de água sob condições fisiológicas[17].

A dopagem com íons lantanídeos oferece a vantagem de tornar o CaP luminescente, ou seja, um biomaterial com propriedades fluorescentes que permitem o acompanhamento do mesmo através da sua emissão, em qualquer ambiente em que ele esteja, desde a sua interação com o meio biológico ou com o tecido ósseo, o imageamento da CaP luminescente *in vitro* e *in vivo*, monitoramento da liberação de drogas controladas, a adsorção/dessorção de DNA, proteínas e etc.

O Ln^{3+} mais estudado no caso das hidroxiapatitas é o Eu^{3+}, que apresenta a configuração $4f^6$ em vários ligantes levando a uma intensa emissão no vermelho (590-625nm) devido às várias transições $^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$, J = 0-4 (especialmente J=1 e 2). Outra característica interessante da luminescência do Eu^{3+} é que sua estrutura de níveis energéticos é relativamente simples, especialmente a ^7F_j, permitindo a determinação da simetria microscópica em torno do sítio[14]. E, as linhas de emissão não-degenerada $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ são importantes nesse contexto por revelarem a presença de sítios não equivalentes na matriz hospedeira da hidroxiapatita[14] (para maiores informações vide 19).

Além disso, a luminescência do Ln^{3+} permite o estudo da dissolução do CaP dopado, monitorando-o tanto no biomaterial, quanto em meio aquoso, livre ou complexado, pois o tempo de vida e a intensidade de emissão de um fluoróforo refletem

o ambiente físico e químico onde ele está, como valores de pH, concentração de cátions, de oxigênio, e a transferência de energia[18]. Sabe-se que os íons em diferentes posições catiônicas na estrutura da hidroxiapatita e β-TCP, livres no meio aquoso ou complexado com alguma outra molécula devem exibir tempos de vida e intensidade de fluorescência distintos [18,19].

Embora quimicamente os lantanídeos sejam muito parecidos (o que facilita a síntese dos nanomateriais), cada um deles apresenta uma característica particular[20], seja ela espectroscópica (absorção e emissão em diferentes comprimentos de onda, como por exemplo Eu^{2+} apresenta emissão no azul, enquanto o Eu^{3+}, no vermelho; Tb^{3+}, no verde; Dy^{3+}, no amarelo; Sm^{3+}, no laranja, Tm^{3+}, no azul; Er^{3+}, no verde, etc)[21,22,23,24,25], paramagnética (Gd^{3+}, Ho^{3+}, Dy^{3+}, Nd^{3+})[26,27,28,29], termoluminescente (Tb^{3+}, Gd^{3+}, Dy^{3+}, Pr^{3+})[30,31,32] e radioativa (Sm-153, Ho-166 e Dy-165)[33,34]. A escolha do(s) Ln(s) dopante(s) no Fosfato de Cálcio possibilita o desenvolvimento de nanoestruturas multifuncionais[35,36,37], os chamados biomateriais teranósticos ("tera" de terapia e "nósticos" de diagnósticos).

Muitos esforços têm sido realizados para conciliar as estratégias terapêuticas e diagnósticas em uma única partícula tudo-em-um, trazendo vantagens sobre às abordagens tratadas separadamente[38]. Agentes teranósticos têm surgido como uma poderosa modalidade multifuncional que possibilitaria o imageamento e o tratamento molecular, administração de fármacos, entrega e liberação controlada de drogas, fotossensibilizadores ou genes (no caso de terapia gênica) diretamente no alvo, permitindo o tratamento de diversas doenças, bem como o seu diagnóstico precoce. A versatilidade destas estruturas baseadas em nanomateriais advém da possibilidade de incorporação de diferentes características, como acima mencionadas (fluorescência, radioatividade, propriedades magnéticas e etc), dependendo do Ln^{3+} dopante, bem como da complexação/adsorção de vários tipos de moléculas na superfície dessas nanopartículas.

Como as propriedades dos fosfatos de cálcio dependem de seus constituintes, muitos estudos têm focado no efeito de substituições catiônicas ou aniônicas simples[39,40,41] preferencialmente na estrutura da HA, porém ainda faltam estudos que investiguem a co-dopagem iônica na estrutura da HA e principalmente no β-TCP, que deve ser melhor explorado após a recente comprovação da eficiência de luminescência do β-TCP em relação a HA[42]. A co-substituição de dois ou mais íons diferentes pelo balanceamento dos raios atômicos e/ou valência, oferece a possibilidade de implementar

qualidades provenientes da substituição dos diversos íons em um único material. A diferença de raio atômico entre os íons causa uma distorção na rede cristalina, sendo que tanto o Mg^{2+} quanto os Ln^{3+} têm raios menores que o Ca^{2+}, o que leva a uma diminuição no tamanho da partícula. No caso de diferentes valências, como é o caso dos Ln^{3+} que vão substituir o Ca^{2+}, isso pode trazer alterações na carga da partícula.

A carga superficial afeta a afinidade de ligação com o gene, incorporação celular e estabilidade coloidal. Com cargas positivas aumenta-se a interação com os genes carregados negativamente e com a membrana celular. De fato, as nanopartículas carregadas positivamente exibem maior adesão celular, e interessantemente, aumentam a biocompatibilidade, em relação às neutras ou às carregadas negativamente[43].

A morfologia, composição e cristalinidade da partícula também afetam a interação celular e a dissolução do biomaterial para a liberação dos genes para a entrada no núcleo[44,45].

Existe, portanto, uma necessidade de desenvolver nanopartículas homogêneas e monodispersas de uma forma rápida, eficiente e de baixo custo que possa ser facilmente produzida em larga escala, e que principalmente apresentem as características idealmente requeridas para serem usadas como um vetor não viral eficiente em terapia gênica. A transfecção celular é impedida por várias barreiras físicas e biológicas, que precisam ser transpostas por esse vetor, para que o mesmo consiga entregar o conteúdo genético de forma eficiente e segura ao núcleo da célula alvo. Nesse contexto, os fosfatos de cálcio puros e dopados com lantanídeos e/ou magnésio apresentam propriedades como: partículas homogêneas e não agregadas, de tamanho nanométrico (entre 20 e 200nm), cristalinas e mesoporosas, e carregadas positivamente, em condições que permitam a complexação dos genes terapêuticos ao vetor CaP, tornando-os vetores não-virais ideais para a transcrição gênica. Além disso, dependendo do íon dopante, esse biomaterial teranóstico, além de transportar o gene, ele ainda poderá apresentar características fluorescentes, paramagnéticas, termoluminescentes e/ou radioativas.

Adicionalmente, as vantagens dos fosfatos dopados com terras raras podem ser exploradas na área de lasers randômicos, ou lasers de emissão aleatória, que são tecnologias simples, pois não necessitam de cavidades ópticas ressonantes para promover a amplificação do ganho, através de emissão estimulada. No laser randômico, ocorrem processos de espalhamentos múltiplos da luz através do meio aleatório (devido a presença de partículas espalhadoras) que promove a realimentação óptica. A propagação da luz em um meio espalhador é aleatória, ou seja, o caminho percorrido pelos fótons espalhados é

governado pelas leis da probabilidade/difusão[46]. Fatores que podem influenciar no fenômeno de emissão aleatória estão relacionados à densidade de espalhadores, tamanho das partículas, intensidade de bombeamento, entre outras.

Materiais inorgânicos vêm sendo estudados tanto no desenvolvimento de lasers randômicos quando para a geração de luz por processos ópticos não-lineares, tais como segundo-harmônico e soma-de-frequências, em um único material cristalino. Essas novas fontes de luz laser usando meios desordenados abrem novas perspectivas de emissão desde o violeta ao infravermelho.

Pós cristalinos de fosfatos de cálcio dopados com os diferentes lantanídeos podem ser excelentes candidatos a essas aplicações supracitadas, uma vez que apresentam propriedades ópticas não-lineares e amplo espectro óptico, do ultravioleta ao infravermelho, dependendo do íon dopante.

c) objetivos a serem alcançados

Objetivo Geral

O objetivo principal do projeto é o estudo de nanopartículas de fosfato de cálcio dopadas com lantanídeos e/ou magnésio para aplicação como vetores não-virais na terapia gênica. A síntese dos nanomateriais teranósticos compreenderá a dopagem com os diferentes Ln^{3+}, afim de se verificar as distintas características que cada íon proporciona ao fosfato de cálcio e escolher aquela que melhores resultados apresentar.

Pretende-se obter as condições ideais para o transporte bem-sucedido dos ácidos nucléicos ao seu destino. Com essas nanopartículas fluorescentes de até 200nm serão realizados os ensaios *in vitro* para avaliar a citotoxicidade e a eficiência da transcrição gênica.

Os fosfatos de cálcio dopados com lantanídeos também serão testados para a obtenção de lasers randômicos com múltiplas emissões.

Além de ser um projeto inovador e multidisciplinar, ele envolve várias técnicas de produção e caracterização tanto dos materiais quanto moleculares, com a finalidade de gerar um produto de alta tecnologia, que possa vir a contribuir com o desenvolvimento da terapia gênica *in vitro* e *in vivo*, e na área de aplicação em lasers.

- Objetivos Específicos

- Síntese dos fosfatos de cálcio dopados com Ln^{3+} e/ou magnésio;
- Caracterização dos fosfatos de cálcio dopados com os diferentes íons;
- Avaliação e determinação da nanopartícula Ln-CaP que apresenta as melhores características para os testes *in vitro*;
- Estudo da interação das nanopartículas de fosfato de cálcio puras e dopada com o Ln^{3+} e/ou Magnésio com as células, *in vitro*.
- A complexação de DNA plasmídico (pDNA) nas nanopartículas de Ln-Mg-HA e Ln-Mg-βTCP e a determinação da eficiência da complexação, estabilidade e liberação do DNA das nanopartículas de CaP;
- Determinação da citotoxicidade e eficiência da transfecção do complexo Ln-Mg-CaP/DNA;
- Avaliação dos fosfatos de cálcio dopados com diferentes lantanídeos para aplicação como lasers randômicos.

d) Centros de pesquisa participantes

1) CCTM – Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais
   Responsável: Flávia Rodrigues de Oliveira Silva
2) CB – Centro de Biotecnologia
   Responsável: Maria Helena Bellini Marumo
3) CLA – Centro de Laser e Aplicações
   Responsável: Niklaus Ursus Wetter

e) metodologia a ser empregada

A síntese e a caracterização das nanopartículas de fosfato de cálcio dopadas com os lantanídeos e magnésio serão realizadas no CCTM. No CLA, será verificada a possibilidade desses fosfatos de cálcio dopados quanto à sua aplicabilidade em lasers randômicos, bem como algumas caracterizações espectroscópicas. E, no CB serão realizados os testes *in vitro*: teste de citotoxicidade dos fosfatos de cálcio, complexação do DNA, transfecção *in vitro*, e interação celular, como descritos a seguir:

- Síntese dos Fosfatos de Cálcio

A síntese dos fosfatos de cálcio será realizada pelo método de precipitação, onde o ácido ortofosfórico é adicionado gota a gota (aproximadamente 8 mL/min, utilizando-se uma bomba dosadora para isso) em uma suspensão de hidróxido de cálcio com hidróxido de magnésio e nitrato de lantanídeo sob agitação constante em banho ultrassônico.

As sínteses por co-precipitação são baseadas na fórmula $Ca_{(10-X-Y)}Ln_XMg_Y(PO_4)_6(OH)_2$ para hidroxiapatita e $Ca_{(9-X-Y)}Ln_XMg_Y(PO_4)_6$ para beta-fosfato tricálcico. A concentração do lantanídeo será de 3% para a HA e de 6% para o β-TCP.

Após 24 horas, para que ocorra o envelhecimento, a solução será centrifugada a 15000 rpm por 5 minutos para a obtenção das nanopartículas. As mesmas serão ressuspendidas em álcool etílico PA, centrifugadas novamente a 15000 rpm, e então os pós serão secos em estufa por 24h, a 60°C, desaglomerado e tratado termicamente em diferentes temperaturas entre 900°C e 1000°C por diferentes períodos de tempo.

Até o presente momento, obteve-se os fosfatos de cálcio puros e dopados com Európio (para maiores informações vide ref19) e Magnésio apresentados nas figuras 1-5.

Nota-se pelas figuras 1, 2 e 4, que os CaP dopados com Európio e com Magnésio parecem ter as características anteriormente descritas, requeridas para serem usados como promissores e eficientes vetores não virais, para terapia gênica.

Será feito um estudo relacionando os co-dopantes, tamanho e carga de partícula e a presença de mesoporos com a complexação do DNA para a máxima eficiência na transcrição gênica.

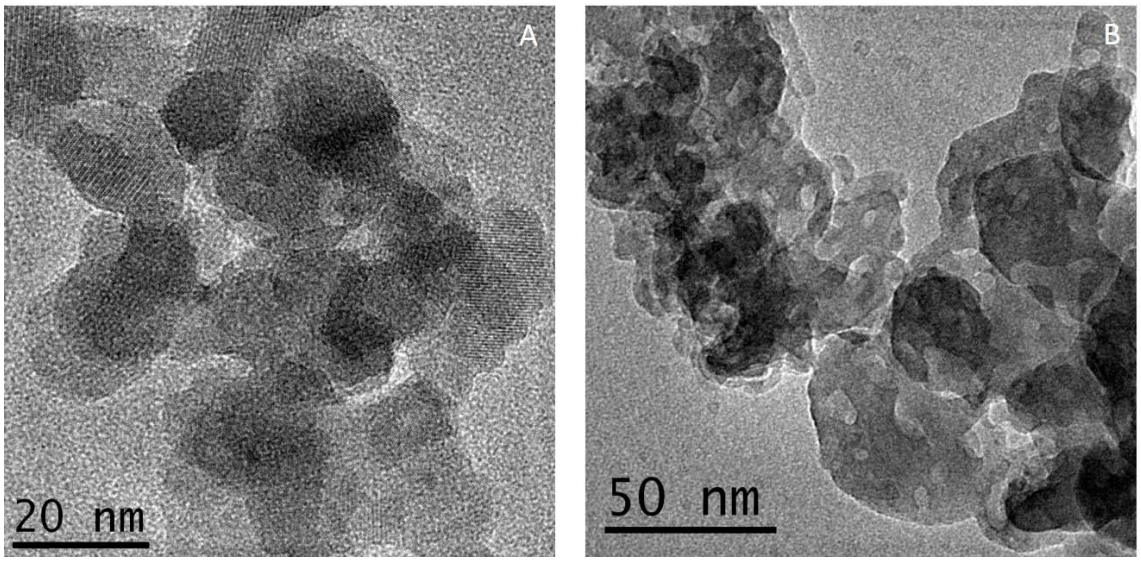

Figura 1 – Amostras de beta-fosfato de cálcio como-sintetizadas (A) e após tratamento térmico em forno micro-ondas adaptado para a formação de mesoporos (B).

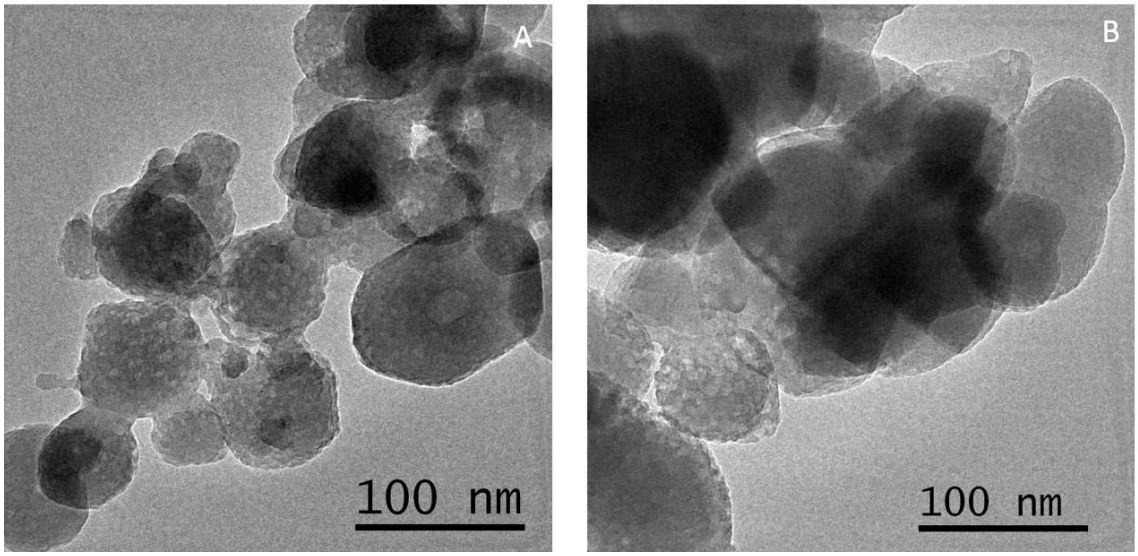

Figura 2 – A) β-TCP:Eu tratadas termicamente por 30 segundos a 1000°C em forno micro-ondas e B) 950ºC por 3 min.

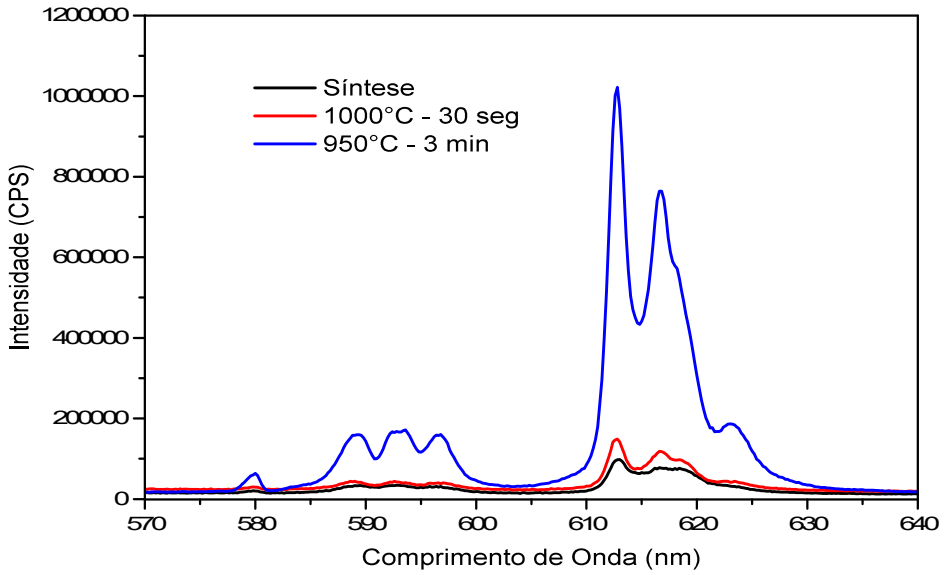

Figura 3 – Comparação da intensidade de emissão do β-TCP:Eu como-sintetizado (sem tratamento térmico) e tratados termicamente por 30 segundos a 1000°C e 950ºC por 3 min.

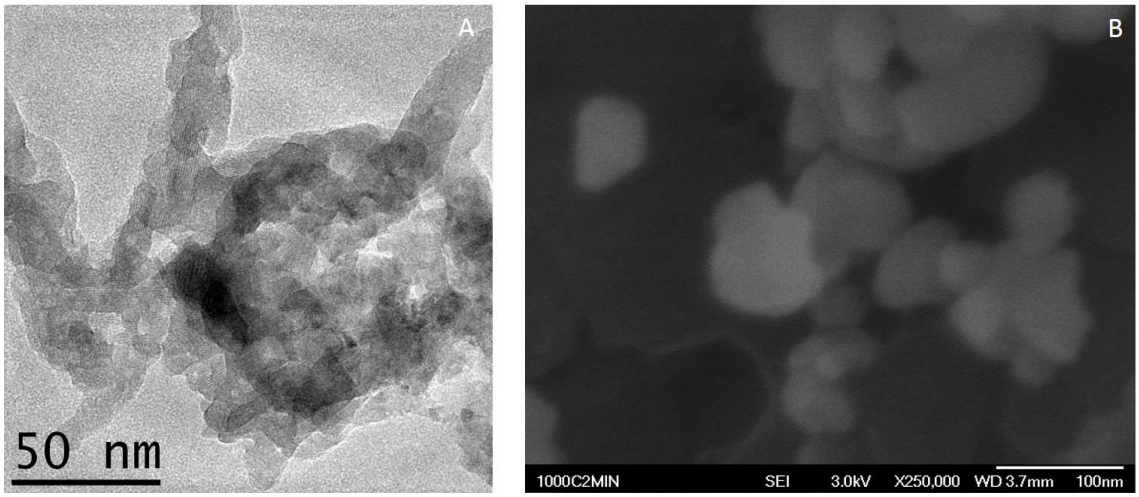

Figura 4 – HA:Eu antes (A) e após o tratamento térmico a 1000° C (B).

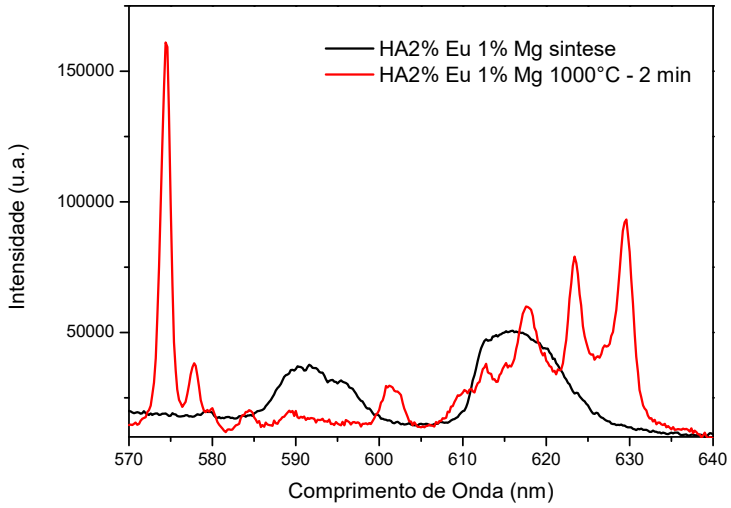

Figura 5 – Espectro de emissão da amostra HAEuMg como sintetizada e tratada termicamente a 1000◦C por 2 minutos

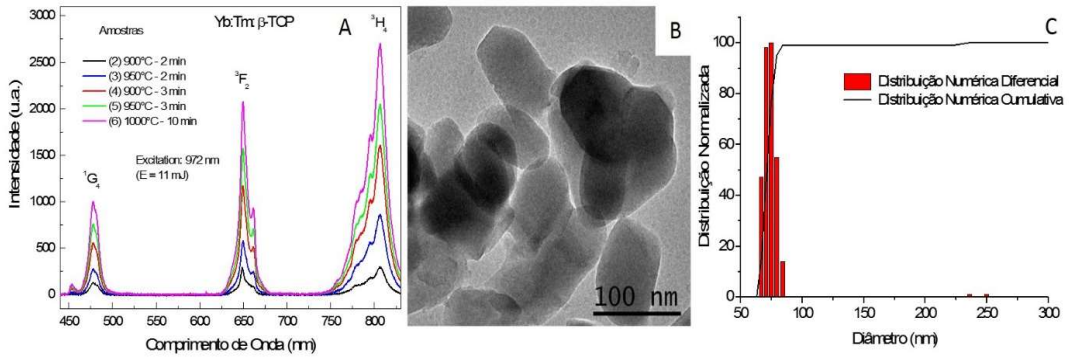

Figura 6 – Em A) é mostrada a emissão dos fosfatos de cálcio dopados com Yb e Tm, em B) a micrografia da amostra tratada a 900°C por 3 minutos em C) o esquema de níveis de energia através do processo de conversão ascendente (upconversion) de luminescência.

A Figura 6 representa a amostra de beta-fosfato tricálcico dopado com 5,5%Yb e 0,5%Tm, onde em A) é mostrada a emissão das nanopartículas para os diferentes tratamentos térmicos, em B) a micrografia da amostra tratada a 900°C por 3 minutos e em C) a distribuição dos tamanhos das partículas dessa amostra, obtidos por DSL, comprovando que amostras inferiores à 100nm podem produzir uma eficiente emissão no visível: azul (480nm), vermelho (650nm) e no infravermelho (800nm), sendo muito promissores para aplicações *in vivo*.

- Caracterização dos fosfatos de cálcio

Para a caracterização dos biomateriais, serão realizadas as seguintes análises:

- Difração de Raio X (DRX) no difratômetro Rigaku, modelo Multiflex, com radiação Cukα (λ=0,1542nm).
- Microscopia eletrônica de Varredura: FEG – JEOL (CCTM)
- Microscopia eletrônica de Transmissão: JEOL (CCTM)
- Espectroscopia de Fluorescência: Cary Eclipse (CB)
- Espectroscopia de Absorção: Cary 5000 (CLA)

- Ensaio de citotoxicidade (CB)

A citotoxicidade das nanopartículas CaP será avaliada por MTS, seguindo as instruções do fabricante. De forma resumida: $5x10^3$ células serão plaqueadas em cada poço da placa de 96 poços com 100µL de meio de cultura. Após 24h o meio de cultura será substituído por um novo, ao qual serão adicionadas as soluções de nanopartículas em diferentes concentrações (20µg, 100 µg e 200 µg por mL meio)[47]. A placa permanecerá 24h em estufa com 5% CO_2 a 37ºC. Após esse período, o meio de cultura contendo as nanopartículas será retirado, e à cada poço será adicionado 100µL de meio RPMI e 20µL do reagente do kit MTS. A placa será incubada novamente na estufa por 2h, protegida de luz e por fim, analisada no espectrofotômetro a 490nm.

- Obtenção e purificação do pDNA

Para a transfecção in vitro será utilizado um DNA plasmidial (pDNA) que contenha o gene do GFP (da Origene), que será usado como marcador fluorescente para a avaliação da eficiência da transfecção.

Para a obtenção de grandes quantidades do pDNA, serão utilizadas bactérias E. coli da linhagem DH5α competente (Subcloning Efficiency DH5α competente cells, 18265-017, Invitrogen, NY, EUA) para a transformação bacteriana por choque térmico. Para tal, 5µL de pDNA (10ng) serão adicionados a 50µL da solução das bactérias DH5α previamente descongeladas e homogeneizadas suavemente, e incubadas em gelo por 30 minutos. Transcorrido esse tempo, o tubo contendo o material ficará por 1 a 2 minutos em banho maria seco a 42°C, para que ocorra o choque térmico, que tem como objetivo desestabilizar as membranas da parece celular. Depois, o tubo retorna ao gelo por 2 minutos. Feito isso, são adicionados 950µL de meio LB (Luria Bertani) estéril e as bactérias são mantidas por 1 hora a 37°C, com agitação de 225rpm. Por fim, as bactérias são semeadas nas placas contendo o meio LB ágar com ampicilina (100µg/mL), e incubadas a 37°C por 16h, em estufa microbiológica.

Após esse período de incubação, é selecionada de 1 a 5 colônias isoladas para a preparação do inóculo em 00mL de meio LB caldo com 100µg/mL de antibiótico ampicilina e novamente incubados a 37°C por 16h, sob agitação constante de 170 rpm.

Para a extração do DNA das bactérias transformadas, será utilizado o kit Nucleobond Xtra Midi da Macherey Nagel, seguindo-se as instruções do fabricante.

A quantificação do pDNA obtido será realizado no Nanodrop (adquirido nesse projeto) e por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo será avaliado a integridade do mesmo.

- Preparação e detecção da complexação do Ln-Mg-CaP com o pDNA (CB)

Para a complexação dos fosfatos de cálcio com o pDNA, as nanopartículas serão dispersas em água, ultrassonicada (utilizando-se o sonicador adquirido nesse projeto) por 1 minuto, e então serão adicionadas diferentes concentrações de pDNA (de 1:1 até 200:1) em água milliq autoclavada. O complexo CaP-DNA será incubado a 4°C por diferentes períodos de tempo (de 1 a 30 minutos) e então centrifugados a 15.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante será avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e pelo nanodrop. Quando ocorrer a saturação dos CaP, o excesso de pDNA permanecerá livre na solução e será visualizado no gel.

Determinada a melhor concentração e tempo de complexação do pDNA às nanopartículas, esses serão usados como protocolo para a transfecção *in vitro*.

O complexo formado também será avaliado por microscopia de transmissão. Resultados preliminares mostraram que o DNA, dependendo (provavelmente) da sua concentração, podem tanto ficar entre as partículas (de forma condensada – pontos escuros arredondados na Figura 7.A) como ao redor delas, formando aglomerados em torno de 100nm, conforme ilustra a Figura 7.B.

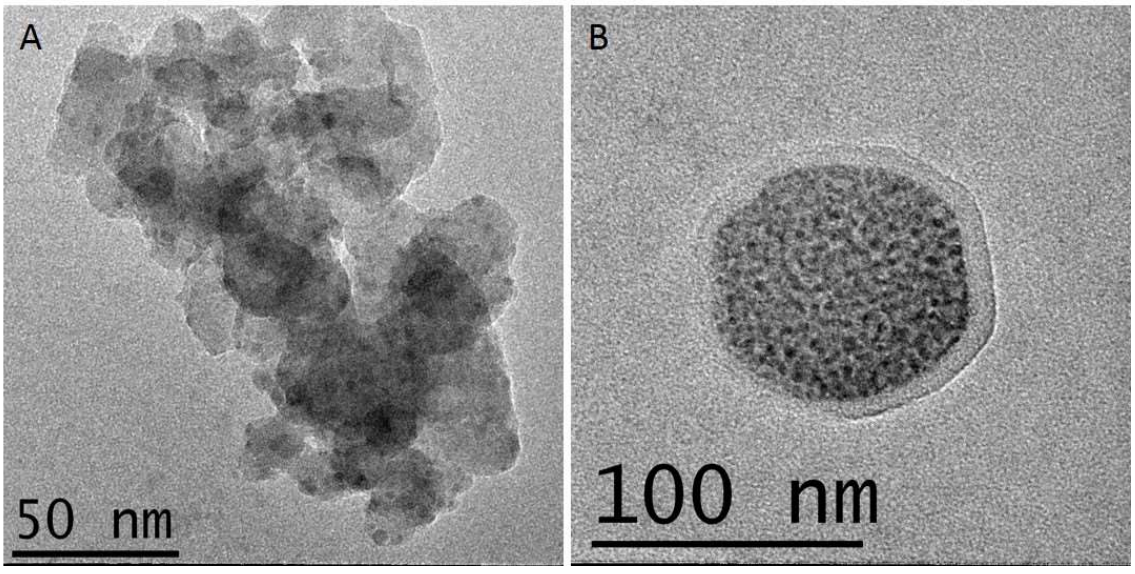

Figura 7 – Complexação de pDNA com fosfatos de cálcio, em diferentes concentrações. Em A) observa-se pontos escuros representando o pDNA complexado em

sua forma condensada, enquanto que em B) é observado também uma camada orgânica (pDNA) recobrindo as nanopartículas que se aglomeraram, estabilizando o pDNA complexado.

Os fosfatos de cálcio complexados com o pDNA serão avaliados também por microscopia de força atômica (AFM Bruker - CCTM) para análise da condensação do DNA pela partícula.

- Transfecção in Vitro (CB)

O complexo Mg-CaP-DNA na melhor proporção encontrada no item anterior será testado em células renais humanas 786-0 afim de se verificar a eficiência de transfecção do pDNA. Nessa etapa, para fins de comparação, o procedimento será realizado com reagente comercial Lipofectamina 3000, paralelamente.

No dia anterior a transfecção, $3x10^5$ células serão plaqueadas em placa de 6 poços com meio RMPI. No dia da transfecção, as células receberão as nanopartículas complexadas com o DNA na melhor concentração encontrada ou Lipofectamina 3000 e incubadas a 37°C em estufa com 5% CO_2 por 24h e 48h. Após esse período, o meio contendo o composto será retirado, as células receberão novo meio RPMI. Transcorridos mais 24h, as célula serão tripsinizadas e replaqueadas em chamber de 4 ou 8 poços. O restante será centrifugado e ressuspendido em PBS para analise por citometria de fluxo.

As chambers serão incubadas por 24h na estufa, e o meio será retirado, as células lavadas com PBS e adicionado o DAPI para coloração dos núcleos. Montadas as laminas as mesmas serão analisadas por microscopia de fluorescência e confocal. Verificado a necessidade de ajustes para a obtenção de imagens da fluorescência do GFP e DAPI nas células, o protocolo de preparação das laminas será aprimorado.

A eficiência dos CaPs como vetores não virais será determinada pelo número total de células/número de células com emissão do GFP.

A partir dos resultados obtidos será avaliada a necessidade de outras técnicas para inferir a eficiência dos vetores Ln-Mg-HA e Ln-Mg-βTCP na transfecção do pDNA.

- Aplicação em Lasers

Esse estudo compreenderá testes com diferentes nanopartículas, tanto em relação à dopagem, quanto ao tamanho da nanopartícula, pois tamanhos diversos influenciam no espalhamento da luz no material, o que pode contribuir para o aumento na intensidade da emissão e consequentemente na eficiência dos nanocristais como lasers randômicos. Além disso, também serão analisadas as gerações de luz por processos ópticos não-lineares, tais como segundo-harmônico e soma-de-frequências, para a obtenção de múltiplas emissões em um único material cristal.

Para tal, os pós serão compactados em um suporte adaptado, que ficará girando continuamente, durante a incidência do laser de bombeamento, que poderá ser um OPO ou laser Diodo, dependendo do comprimento de excitação (que depende do lantanídeo dopante) e da intensidade de bombeamento para que ocorra o estreitamento da banda de emissão. As emissões serão coletadas por fibra óptica e analisadas em espectrômetro da Ocean Optics.

f) principais contribuições científicas ou tecnológicas

Pelo método de co-precipitação de fosfatos de cálcio co-dopados com lantanídeos e/ou magnésio espera-se obter nanopartículas com as características ideais para a aplicação como vetores não-virais, sendo esse um passo extremamente importante para o aumento da eficiência na transcrição gênica e a disseminação do uso dessa técnica promissora na medicina. Além disso, por se tratar de materiais luminescentes, isso permitirá o monitoramento do vetor não-viral durante a transcrição gênica *in vitro*.

E, futuramente esses resultados podem ser estendidos a aplicações *in vivo*: nesse caso, dopando os fosfatos de cálcio com Yb^{3+} e Tm^{3+}, por exemplo, para se obter materiais luminescentes com excitação no IR (972nm) e emissão no visível (azul em ~480nm, vermelho ~650nm e IR próximo 790nm), região ideal para aplicação *in vivo*, devido à alta penetração tecidual de energia nesse comprimento de onda (para maiores informações ref 48). Isso possibilitará o acompanhamento da transcrição gênica em animais e humanos. Essas propriedades fazem desse biomaterial um vetor muito promissor para terapia gênica. E, essa nanopartícula ainda têm potencial para ser usada em terapia fotodinâmica (PDT) devido à sua faixa de emissão, que coincide com a faixa de absorção de diversos fotossensibilizadores utilizados em PDT, tendo a vantagem de ser excitada na região do infravermelho (a chamada janela biológica).

Acredita-se que com os diferentes dopantes permitirá a funcionalização das nanopartículas, não somente quanto à complexação do pDNA e a avaliação da transcrição gênica *in vitro*, para terapia gênica, mas também para a obtenção de nanomateriais teranósticos multifuncionais, com propriedades magnéticas, fluorescentes, termoluminescentes e/ou radioativas, ou seja, abrirá uma vasta gama de aplicações biomédicas como : agentes de contrastes para exame de imagem e ressonância magnética; terapia fotodinâmica e termodinâmica; diagnóstico por tomografia por emissão de pósitrons e radioterapia; entre outras. Além disso, há diversas aplicações ambientais como adsorvedores de metais pesados e dosimetros termoluminescentes.

Outra contribuição bastante promissora diz respeito ao desenvolvimento de novos materiais luminescentes para aplicação como lasers randômicos. E aqui, mais uma vez, vale ressaltar a importância da síntese com diferentes lantanídeos afim de se obter lasers randômicos nos mais diversos comprimentos de onda, tanto no visível, quanto no infravermelho, podendo vir a gerar novos produtos tecnológicos para o IPEN.

Adicionalmente, a presente proposta é uma grande oportunidade para o fortalecimento de parcerias entre os centros no IPEN.

g) orçamento detalhado

h) cronograma físico

Item	Especificação	Período			
		1° Semestre	2° Semestre	3° Semestre	4° Semestre
1	Revisão Bibliográfica	X	X	X	X
2	Síntese dos Fosfatos de Cálcio	X	X	X	
3	Caracterização dos Fosfatos de Cálcio	X	X	X	
4	Cultura Celular: ensaio citotoxicidade		X	X	
5	Complexação dos CaPs com pDNA		X	X	X
6	Caracterização dos CaPs-pDNA		X	X	X
7	Testes de Transfeção in vitro		X	X	X
8	Testes de aplicações em Lasers		X	X	X
9	Participação em Congressos		X		X
10	Redação de Artigos Científicos		X	X	X
11	Relatório Científico				X

i) identificação dos demais participantes do projeto

Nome	Título	Função	Instituição	Atuação
Flávia Rodrigues de Oliveira Silva	Doutor	Coordenadora	IPEN	Coordenação, gestão de recursos e participação em todas as atividades: síntese dos biomateriais e caracterização por fluorescência e microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura, transmissão e força atômica. Realização dos testes in vitro, análise e interpretação dos resultados. Realização dos testes para laser.
Maria Helena Bellini Marumo	Doutor	Pesquisadora	IPEN	Atividades relacionadas aos testes in vitro: de citotoxidade e de transcrição gênica; Análise e interpretação dos resultados.
Ana Helena de Almeida Bressiani	Doutor	Pesquisadora	IPEN	Colaboração nas análises e interpretação dos resultados das sínteses e das caracterizações dos nanomateriais.
Walter Kenji Yoshito	Doutor	Pesquisador	IPEN	Atividades relacionadas principalmente à dispersão dos biomateriais, em solução, bem como análise e interpretação dos resultados.
Nelson Batista de Lima	Doutor	Pesquisador	IPEN	Caracterização dos biomateriais por Difração de Raio-X; e análise e interpretação dos resultados.
Niklaus Ursus Wetter	Doutor	Pesquisador	IPEN	Atividades relacionadas aos testes com os nanomateriais para aplicações em lasers.

j) disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto, estimativa dos recursos financeiros de outras fontes, se pertinente e anuência

Este projeto será desenvolvido no Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM) em parceria com o Centro de Biotecnologia (CB) e com o Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), que disponibilizam infraestrutura e apoio técnico para a execução do projeto, tais como:

-Laboratório de Biomateriais (Bio 1 e Bio 2 – Prédio 4 – CCTM);

-Fornos para a calcinação e sinterização das amostras, nas diferentes temperaturas e tempos de processamento;

- Equipamentos para a caracterização das amostras (CCTM):

Difratômetro de Raio X;

Microscópios Eletrônicos de Varredura e de Transmissão;

Microscópio de Fluorescência;

Microscópio de Força Atômica;

- Laboratório de Cultura Celular (CB)

- Laboratório de Biologia Molecular (CB)

- Equipamento Fluorímetro (CB)

- Laboratório de Lasers (CLA)

Os bens de capital solicitados nessa proposta para as sínteses dos materiais ficarão alocados no laboratório de biomateriais, prédio 4, do CCTM, sob responsabilidade da proponente. Esse laboratório receberá uma centrifuga de alta rotação para a síntese dos nanomateriais, além do módulo de fibra óptica que será utilizado no fluorímetro alocado no CB, para caracterização da Fluorescência dos fosfatos de cálcio dopados com os diferentes lantanídeos, via projeto FAPESP Institucional. Nesse projeto também foi contemplada uma bolsa de pesquisa no exterior para a proponente, cujo o objetivo é o estudo dessas nanopartículas (objeto de estudo do presente projeto) em células vivas, utilizando-se para tal um microscópio de alta resolução STED, na Universidade de New South Wales (UNSW) na Austrália, em colaboração com o Prof. Dr. Pall Thordarson.

k) Produção previstas:

Congressos nacionais e internacionais: 3

Artigos em revistas ou periódicos nacionais e internacionais: 3

Orientação de Iniciação Científica: 1

l) Disponibilização para o mercado/sociedade

A viabilidade da geração de novas tecnologias e depósito de patentes será discutido com o NIT, se julgado pertinente.

m) lista de referências bibliograficas

[1] Linden, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. v.24, n.70, p. 31-69, 2010 accesso em 16 /12/2015. Disponível em : <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300004&lng=en&nrm=iso>.

[2] Elisabeth V Giger, Stabilization of calcium phosphate nanoparticles for transfection with nucleic acid drugs, tese, 2012.

[3] Do T N T, Lee W H, Loo C Y, Zavgorodniy A, Rohanizadeh R, Hydroxyapatite nanoparticles as vectors for gene delivery. Therapeutic Delivery (2012) 3(5)

[4] Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomat* 29(24–25), 3477–3496 (2008).

[5] Lacerda L, Raffa S, Prato M, Bianco A, Kostarelos K. Cell-penetrating CNTs for delivery of therapeutics. *Nano Today* 2(6), 38–43 (2007).

[6] Maitra, A. Calcium phosphate nanoparticles: second-generation nonviral vectors in gene therapy. Expert Ver Mol Dtagn 5(6), 2005.

[7] Kumar R, Prakash KH, Cheang P, Khor KA. Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir* 20(13), 5196–5200 (2004).

[8] Uskokovic V, Uskokovic DP. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater*. 96(1), 152–191 (2011).

[9] Bisht S, Bhakta G, Mitra S, Maitra A. pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: highly efficient non-viral vector for gene delivery. *Int. J. Pharm.* 288(1), 157–168 (2005)

[10] Welzel, T.; Radtke, I.; Meyer-Zaika, W.; Heumann, R.; Epple, M. Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2213– 2217.

[11] Hench, L. L.; Wilson, J. Introduction to Bioceramics. T ed., Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.

[12] Kottaisamy M., Jagannathan R., et al, Eu2+ luminescence in M5(PO4)3X apatites, M is Ca2+, Sr2+a nd Ba2+, and X is F-, CI-, Br- and OH-, J. Phys. D: Appl. Phys. 27 (1994) 2210-2215.

[13] Ribeiro, C., Bressiani, A. H. A., Processamento e Caracterização de Cerâmicas à Base de Hidroxiapatita e Fosfato-tricálcico. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

[14] Jagannathan R., Kottaisamy M., Eu^{3+} luminescence: a spectral probe in $M_5(PO_4)_3X$ apatites (M = Ca or Sr; X = F^-, Cl^-, Br^- or OH^-), J. Phys.: Condens Mater 7 (1995) 8453-8346.

[15] Chowdhury, E. H.; Kunou, M.; Nagaoka, M.; Kundu, A. K.; Hoshiba, T.; Akaike, T. High-efficiency gene delivery for expression in mammalian cells by nanoprecipitates of Ca-Mg phosphate. *Gene* **2004**, *341*, 77–82.

[16] Chowdhury E.H., Kunou M, Nagaoka M, Kundu A.K., Hoshiba T, Akaike T. High-efficiency gene delivery for expression in mammalian cells by nanoprecipitates of Ca–Mg phosphate. Gene 341 (2004) 77–82

[17] Lee D, Sfeir C, Kumta P N. Novel in-situ synthesis and characterization of nanostructured magnesium substituted β-tricalcium phosphate (β-TCMP), , Materials Science and Engineering C 29 (2009) 69–77.

[18] Selvin, P. R. Principles and biophysical applications of lanthanides-based probes. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 31 (2002) 275-302.

[19] Silva F R O, Lima N B, Bressiani A H A, Courrol L C, Gomes L. Synthesis, characterization and luminescence properties of Eu3+-doped hydroxyapatite nanocrystal and the thermal treatment effects. Optical Materials 47 (2015) 135–142

[20] Bunzil JC (2006) Benefiting from the unique properties of lanthanide ions. Acc Chem Res 39:53–61

[21] Li C, Quan Z, Yang J, Lin J (2007) Highly uniform and monodisperse β-NaYF4:Ln3+(Ln=Eu, Tb, Yb/Er, and Yb/Tm) hexagonal microprism crystals: hydrothermal synthesis and luminescent properties. Inorg Chem 46:6329–6337

[22] Feng Z, Li Y, Huang Y, Seo HJ (2011) Luminescence properties of Eu2+ and Eu3+ doped calcium- deficient hydroxyapatite prepared in air. J Alloys Comp 509:7087–7092

[23] Hui J, Zhang X, Zhang Z, Wang S, Tao L, Wei Y, Wang X (2012) Fluoridated HAp : Ln3+ (Ln=Eu or Tb) nanoparticles for cell imaging. Nanoscale 4:6967–6970

[24] de Araujo T S, Macedo Z S, de Oliveira P A S C, Valerio M E G (2007) Production and Characterization of pure and Cr3+- doped hydroxyapatite for biomedical applications as fluorescent probes. 42: 2236–2243

[25] Cheng F, Sun K, ZhaoY LY, Xin Q, Sun X (2014) Synthesis and characterization of HA/YVO4: Yb3+, Er3+ up-conversion luminescent nano-rods. Ceram Int 40:1139–11334

[26] Li Y, Ooi CP, Cheang PHN (2009) Synthesis and characterisation of neodymium (III) and gadolinium (III)- substituted hydroxyapatite as biomaterials. Int Appl Ceram Technol 4:501–512

[27] Liu M, Liu H, Sun S, Li X, Zhou Y, Hou Z, Lin J (2014) Multifunctional hydroxyapatite/Na(Y/Gd)F4:Yb3+, Er3+ composite fibres for drug delivery and dual model imaging. Langmuir 30: 1176–1182

[28] Chen F, Huang P, Zhu Y, Wu J, Zhang C, Cui D (2011) The photoluminescence, drug delivery and imaging properties of multifunctional Eu3+/Gd3+ dual-doped hydroxyapatite nanorods. Biomaterials 32:9031–9039

[29] Chen F, Huang P, Zhu Y, Wu J, Cui D (2012) Multifunctional Eu3+/Gd3+ dual-doped calcium phosphate vesicle-like nanospheres for sustained drug release and imaging. Biomaterials 33: 6447–6455

[30] Mokoena PP, Nagpure IM, Kumar V, Kroon RE, et al (2014) Enhanced UVB emission and analysis of chemical states of Ca5(PO4)3OH: Gd3+, Pr3+ phosphor prepared by co-precipitation. J Phys Chem Solids 75:998–1003

[31] Liu Z, Wang Q, Yao S, Yang L, Yu S, Feng X, Li F (2014) Synthesis and characterization of Tb3+/Gd3+ dual-doped multifunctional hydroxyapatite nanaoparticle. Ceram Int 40:2613– 2617

[32] Nakashima, K., Takami M, Ohta M, Yasue T, Yamauchi J, Thermoluminescence mechanism of dysprosium-doped B tricalcium phosphate phosphor. Journal of Luminescence 111:1-2, 113-120 (2005).

[33] Ashokan A, Gowd GS, Somasundaram VH, Bhupathi A, et al (2013) Multifunctional calcium phosphate nanocontrast agent for combined nuclear, magnetic and near-infrared in vivo imaging. Biomaterials 34:7143–7157

[34] Le Van So, Pham Ngoc Dien, Truong Hong Nghia, Nguyen Thi Thu, Nguyen Cong Duc, Vo Thji Cam Hoa, & Bui Van Cuong (2004). Studies on the preparation of ferric-hydroxide macro aggregate and hydroxyapatite particles labelled with Sm-153, Ho-166 and/or Dy-165 for radiation synovectomy (VAEC-AR--03). Dang Thi Hong (Ed.). Viet Nam.

[35] Eliseeva SV, Bunzil JG (2009) Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. Chem Soc Rev 39:189–227

[36] Zhang Y, Wei W, Das GK, Tan TTY (2014) Engineering lanthanide-based materials for nanomedicine. J Photochem Photobiol C 20:71–96

[37] Victor SP, Paul W, Jayabalan M, Sharma CP (2014) Supramolecular hydroxyapatite complexes as theranostic nearinfrared luminescent drug carriers. Cryst Eng Comm 16:9033– 9042

[38] Chen G, Qiu H, Prasad PN, Chen X (2014) Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry and applications in theranostics. Chem Rev 114:5161–5214

[39] de Lima I.R., Alves G.G., Soriano C.A., et al, Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite: an in vitro multiparametric study on biocompatibility. J. Biomed Mater Res A.98 (2011) 351–358.

[40] Constantini L.V., Iconaru S., Ciobanu C.S., Europium doped hydroxyapatite for applications in environmental field. Romanian Reports in Physics, 64 (2012) 788-794.

[41] Aina V., Lusvardi G., Annaz B., et al. Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties. J Mater Sci: Mater Med (2012) 23:2867–2879.

[42] Silva FRO, Lima NB, Guilhen SN, Courrol LC, Bressiani AHA, Evaluation of europium-doped HA/B-TCP ratio fluorescence in biphasic calcium phosphate nanocomposites controlled by the pH value during the synthesis. Journal of Luminescence 180 (2016) 177-182.

[43] Chen L, Mccrate JM, Lee JC-M, Li H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnol.* 22(10), 105708 (2011).

[44] Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD *et al.* The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105(33), 11613–11618 (2008).

[45] Daculsi G, Bouler JM, Legeros RZ. Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int. Rev. Cytol.* 172, 129–191 (1997).

[46] Dominguez, K.C.T. Emissão laser em meios espalhadores com ganho: Estudos experimentais em soluções etanóicas e aquosas. Tese de doutoramento. Universidade Federal de Paraíba, 2009.

[47] Zhan yan-zhong, Huang Yan-yan, Shu jun, Shu Shai-hong, Li Shi-you and Zhou ke-chao, Characteristics of functionalized nano-hydroxtapatite and internalization by human epithelial cell, Nanoscale Research Letters, 6: 600 (2011).

[48] Silva F.R.O., Lima N.B., Yoshito, W. K., Bressiani A.H.A., Development of novel upconversion luminescent nanoparticle of Ytterbium/Thulium-doped beta tricalcium phosphate. Journal of Luminescence 187 (2017) 240-246.