



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

Síntese e Caracterização de Nanocristais Luminescentes Baseados em Semicondutores II- VI para Fins de Aplicação como Biomarcadores

Frederico Duarte de Menezes

Recife-PE Brasil

Agosto / 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Síntese e Caracterização de Nanocristais Luminescentes Baseados em Semicondutores II- VI para Fins de Aplicação como Biomarcadores

Frederico Duarte de Menezes*

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da UFPE como parte
dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos
Prof. Dr. Severino Alves Júnior

***Bolsista CNPq**

Recife-PE Brasil

Agosto / 2006

Menezes, Frederico Duarte de
Síntese e caracterização de nanocristais luminescentes baseados em semicondutores II-VI para fins de aplicação como biomarcadores / Frederico Duarte de Menezes. – Recife : O Autor, 2006.

Xiv, 100 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Química Fundamental, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Química inorgânica 2. Química de colóides 3. Semicondutores. 4. Nanopartículas I. Título.

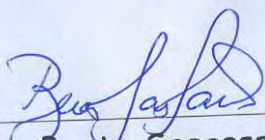
546

CDD (22.ed.)

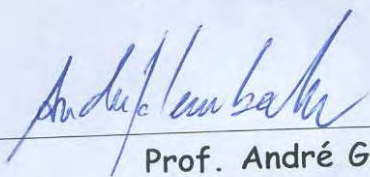
**UFPE
FQ-2007-001**

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

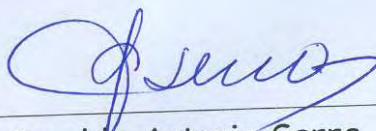
Aprovada:



Profa. Beate Saegesser Santos
Departamento de Farmácia da UFPE
(Presidente da Banca)



Prof. André Galembeck
Departamento de Química Fundamental da UFPE



Prof. Osvaldo Antonio Serra
Departamento de Química - FFCLRP
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

"Síntese e Caracterização de Nanocristais Luminescentes Baseados em Semicondutores II-VI, para fins de Aplicação como Biomarcadores"

por

FREDERICO DUARTE DE MENEZES

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
01 de setembro de 2006

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, pela constante força de vontade dada a mim para que eu pudesse superar minhas dificuldades.

À minha mãe e ao meu irmão, Nilza e Fábio, as pessoas que são mais importantes da minha vida. Obrigado pelo apoio e carinho incomensuráveis.

À minha namorada, companheira e futura esposa, Juliana, pela atenção, carinho, dedicação e paciência comigo, pois sei que não é fácil me aturar de vez em quando. Obrigado por fazer parte da minha vida.

À minha cunhada Alessandra e minha sobrinha e afilhada Beatriz, que agora fazem parte da família. E a todos os meus familiares.

Aos meus amigos de faculdade: Rafael, Curinga, Castro, Pequeno, Robson, Rogério, Mônica, Ana, Wagner, André Câmara, Eduardo Zobi e a turma do PET, que sempre estão por aí pra dar uma força. Valeu pessoal.

Aos meus amigos do Aikidô.

Aos colegas de laboratório: Débora, Fernanda, Sidicléia, Luiz, Rodrigo, Edwin, Ingrid, Cauêh, Aluizio e Denise, por me aturarem diariamente.

Aos meus amigos que posso contar a qualquer hora: Hugo, Claudilene, Júlio, Márcio, Marcelo e Daniel.

Aos meus orientadores, Beate e Júnior, e co-orientadores, Patrícia e Ricardo Ferreira, pelo conhecimento passado e a oportunidade de desenvolver este trabalho. Um agradecimento especial à professora Beate pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento das nossas pesquisas e ao professor Severino Júnior pela atenção e consideração ofertadas.

Ao meu grande amigo mineiro Wendel, pela hospitalidade e parceria em alguns dos trabalhos desenvolvidos. Sucesso no futuro, meu amigo.

As professoras Ivone e Valdênia, pela amizade e trabalhos desenvolvidos.

Ao Professor Fernando Galembeck e ao Dr. Carlos A. P. Leite, pelas microscopias eletrônicas obtidas dos materiais estudados.

À CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que, peço desculpas neste momento, não tenham sido citados aqui, pela falta de neurônios que me assola neste momento.

Obrigado a todos vocês!

RESUMO

Neste trabalho, apresentam-se metodologias de síntese de nanocristais luminescentes de semicondutores do tipo II-VI (CdS/Cd(OH)_2 e CdTe/CdS). As metodologias empregadas para a obtenção de suspensões de nanocristais em meio aquoso, baseadas em química coloidal, resultaram em partículas com tamanho médio de 8,5 nm para o sistema CdS/Cd(OH)_2 e 3,8 nm para o sistema CdTe/CdS . Estes materiais foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas (absorção, emissão e excitação eletrônica) e através de microscopia eletrônica de transmissão e difração de raios-X para a elucidação das propriedades ópticas e estruturais.

Os nanocristais de CdS/Cd(OH)_2 foram modificadas quimicamente para sua aplicação em sistemas biológicos através da incorporação em sua superfície do agente funcionalizante glutaraldeído e dos funcionalizantes compostos glutaraldeído/anti-A, glutaraldeído/concanavalina-A. Estes sistemas foram caracterizados através de espectroscopia eletrônica de absorção, emissão e excitação e por microscopia eletrônica de transmissão.

Por fim, descrevem-se protocolos de utilização destes nanocristais modificados como marcadores luminescentes de três sistemas biológicos: (i) hemácias de tipos sanguíneos A^+ e O^+ , (ii) parasitas do tipo *Leishmania amazonensis* e (iii) cortes histológicos de tecido mamário humano saudável e um de seus respectivos tumores (Fibroadenoma). Observou-se a marcação bem sucedida nos três sistemas e discutiu-se os diferentes perfis de marcação obtidos sugerindo-se algumas possibilidades para os processos de luminescência.

Palavras-chaves: nanocristais, nanopartículas, pontos quânticos, marcadores fluorescentes, biomarcadores, funcionalização, semicondutores, confinamento quântico.

ABSTRACT

In this work we present synthetic procedures in aqueous medium for the obtention of luminescent II-VI (CdS/Cd(OH)_2 and CdTe/CdS) semiconductor nanocrystals. These methodologies, based on colloidal chemistry, resulted in particles with a size average of 8,5 nm for the CdS/Cd(OH)_2 system and 3,8 nm for the CdTe/CdS system. The optical properties of these materials were characterized using electronic absorption, emission and excitation spectroscopies while the structural properties were characterized by transmission electronic microscopy and X-ray powder diffraction.

The CdS/Cd(OH)_2 nanocrystals were chemically modified (by using either one of the following functionalizers: glutaraldehyde, glutaraldehyde/Anti-A or glutaraldehyde/Concanavalin-A) for their application in biolabelling. These systems were characterized by electronic absorption, emission and excitation spectroscopy and by transmission electronic microscopy.

Finally, we describe the experimental procedures used to conjugate the modified CdS/Cd(OH)_2 nanocrystals in three different biological systems: (i) A^+ and O^+ type red blood cells, (ii) *Leishmania amazonensis* parasites in the promastigote form and (iii) histological sections of human mammary healthy tissues and Fibroadenoma tissues (a benign type of tumor). We discuss the different marking patterns observed for the biological samples in terms of different possible processes of luminescence.

Keywords: nanocrystals, nanoparticles, quantum dots, fluorescent labels, biolabels, functionalization, semiconductors, quantum confinement.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Nanocristais de semicondutores.....	01
1.1 Introdução	01
1.1.1 Semicondutores.....	01
1.1.2 Confinamento Quântico	07
1.2 Breve histórico sobre nanocristais de semicondutores	10
1.3 Motivação: aplicações biológicas de NCs de semicondutores	10
1.4 Colóides	12
1.5 Objetivos	15
1.6 Apresentação da dissertação	16
1.7 Referências.....	17
 Capítulo 2 – Síntese e Caracterização de suspensões coloidais de CdS e CdS/Cd(OH) ₂	 19
2.1 Introdução	19
2.1.1 Estabilização de NCs: utilização do Polifosfato	20
2.2 NCs de CdS e CdS/Cd(OH) ₂	22
2.3 Procedimentos experimentais	24
2.3.1 Metodologia de síntese do CdS e CdS/Cd(OH) ₂	24
2.3.2 Estudo da influência da concentração do polifosfato da síntese de NCs de CdS.....	 25
2.3.3 Caracterização espectroscópica e estrutural dos NCs de CdS e CdS/Cd(OH) ₂	26
2.4 Resultados e discussão	29
2.4.1 Sistemas CdS e CdS/Cd(OH) ₂	29
2.4.1.1 Caracterização estrutural dos NCs de CdS e CdS/Cd(OH) ₂	29
2.4.1.2 Caracterização espectroscópica	31
2.4.2 Estudo da influência da concentração do polifosfato na síntese de NCs de CdS.....	 34
2.5 Referências.....	41
 Capítulo 3 – Síntese e Caracterização das suspensões coloidais de CdTe	 42
3.1 Introdução	42
3.1.1 Tióis: ótimos estabilizantes para meio aquoso	43

3.2	Procedimentos experimentais	45
3.2.1	Reagentes utilizados	45
3.2.2	Processos de redução do telúrio.....	45
3.2.2.1	Método de Redução 1: Processo de redução por congelamento.....	46
3.2.2.2	Método de Redução 2: Processo de redução por titulação de ácido.....	46
3.2.2.3	Método de Redução 3: Processo de redução por aquecimento.....	46
3.2.2.4	Método de Redução 4: Processo de redução por aquecimento, em meio alcalino e fotoassistida	47
3.3	Síntese de NCs de CdTe	48
3.3.1	Método de Síntese 1.....	48
3.3.2	Método de Síntese 2.....	48
3.4	Estudo do efeito da concentração de NCs nas propriedades espectroscópicas das suspensões obtidas.....	49
3.5	Precipitação seletiva das suspensões de NCs preparadas	50
3.6	Caracterização espectroscópica e estrutural dos NCs de CdTe	51
3.7	Resultados e discussão.....	52
3.7.1	Processos de redução do telúrio.....	52
3.7.2	Síntese de NCs de CdTe	52
3.7.3	Caracterização estrutural dos NCs de CdTe	54
3.7.4	Caracterização espectroscópica	57
3.7.5	Estudo do efeito da concentração de NCs nas propriedades espectroscópicas das suspensões obtidas.....	59
3.7.6	Precipitação seletiva das suspensões de NCs preparadas	61
3.8	Referências.....	62

Capítulo 4 – Funcionalização de nanocristais de CdS/Cd(OH) ₂ para aplicações em marcação biológica		63
4.1	Introdução	63
4.2	Glutaraldeído: um bom funcionalizante?.....	65
4.3	Anticorpos e Lectinas: biomoléculas direcionadoras	67
4.4	Procedimentos experimentais	70
4.4.1	Funcionalização de NCs de CdS/Cd(OH) ₂	70
4.4.1.1	Funcionalização com glutaraldeído	70
4.4.1.2	Funcionalização com glutaraldeído/Anticorpo.....	70

4.4.1.3	Funcionalização com glutaraldeído/Concanavalina-A	70
4.4.2	Caracterização das suspensões funcionalizadas.....	71
4.5	Resultados e discussão	72
4.5.1	Sistema funcionalizado com glutaraldeído	72
4.5.1.1	Caracterização estrutural.....	72
4.5.1.2	Caracterização espectroscópica	74
4.5.2	Sistema funcionalizado com glutaraldeído/Anticorpo.....	74
4.5.3	Sistema funcionalizado com glutaraldeído/Concanavalina-A	76
4.6	Referências.....	78
Capítulo 5 - Aplicação de NCs de CdS/Cd(OH) ₂ como sondas luminescentes para estudos em sistemas biológicos		79
5.1	Marcação dos sistemas biológicos	79
5.2	Sistemas biológicos estudados	81
5.2.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	81
5.2.1.1	Introdução	81
5.2.1.2	Marcação das leishmanias	82
5.2.1.3	Resultados e discussão	83
5.3.2	Hemácias.....	86
5.3.2.1	Introdução	86
5.3.2.2	Marcação de hemácias	86
5.3.2.3	Resultados e discussão.....	87
5.3.3	Carcinogênese e a presença de carboidratos nas membranas celulares.....	91
5.3.3.1	Introdução	91
5.3.3.2	Marcação de fibroadenomas	92
5.3.3.3	Resultados e discussão.....	93
5.4	Referências.....	96
Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas		97
Anexos		99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Esquema de formação de orbitais moleculares, ligante e antiligante, entre dois átomos quaisquer A e B.	02
Figura 1.2 - Formação das bandas de valência e de condução pelo rearranjo dos orbitais de um sistema poliatômico com n estruturas AB.....	03
Figura 1.3 - Esquema de formação de um éxciton. h^+ representa o buraco gerado na Banda de valência, pela excitação do elétron e^-	06
Figura 2. 1 – Representação esquemática de uma cadeia de polifosfato	20
Figura 2. 2 - A: Esquema de uma nanocrystal de CdS com a ilustração de um possível defeito em sua estrutura cristalina. B: Diagrama ilustrativo da banda de valência (BV) e de condução (BC) do CdS, separadas por um gap energético.....	22
Figura 2. 3 – Esquema geral de passivação de uma nanocrystal de CdS por uma camada de Cd(OH) ₂	23
Figura 2. 4 – Esquema geral do processo de síntese dos NCs de CdS, em meio aquoso, incluindo a etapa de passivação.....	25
Figura 2. 5 – Difratoograma de raio-x de pó de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH) ₂	29
Figura 2. 6 – Micrografia de MET em campo claro de uma amostra de NCs de CdS .	30
Figura 2. 7 – Espectros de Absorção com suas segundas derivadas (em vermelho), exibindo o primeiro máximo de absorção tanto para o CdS, quanto para o CdS/Cd(OH) ₂	31
Figura 2. 8 – Espectros de excitação e emissão de uma suspensão de NCs de CdS/Cd(OH) ₂	32
Figura 2. 9 – Possível mecanismo de decaimento radiativo dos NCs, corroborado pela presença das três bandas existentes no respectivo espectro de excitação	33

Figura 2. 10 – Espectros de absorção eletrônica de suspensões de NCs de CdS obtidas com diferentes concentrações de polifosfato	34
Figura 2. 11 – Micrografia de amostra de NCs de CdS sintetizadas com 0,11 mM da solução de PP	35
Figura 2. 12 – Micrografia de amostra de NCs de CdS sintetizadas com 0,28 mM da solução de PP	36
Figura 2. 13 – Micrografia de amostra de NCs de CdS sintetizadas com 0,39 mM da solução de PP	37
Figura 2. 14 – Micrografia de amostra de NCs de CdS sintetizadas com 0,50 mM da solução de PP	38
Figura 2. 15 – Micrografia de amostra de NCs de CdS sintetizadas com 0,72 mM da solução de PP	39
Figura 3.1- Coloração do composto Na-Te-Te-Na(aq), formado pela redução do Te^0	47
Figura 3.2 – Suspensão de NCs de CdTe recém preparada, apresentando coloração castanha característica do semicondutor.....	49
Figura 3.3 - Difratoograma de raio-x de pó de uma amostra de NCs de CdTe	54
Figura 3.4 – Micrografias de MET em campo claro de uma amostra de NCs de CdTe/CdS.....	55
Figura 3.5 – Micrografias de MET em campo escuro, referente a Figura 3.4.....	56
Figura 3.6 – Espectros de Absorção eletrônica de suspensões de NCs de CdTe obtidas pelo Método 1 (a) e Método 2 (b) de síntese de NCs	57
Figura 3.7 - Espectros de emissão e excitação (vermelho) eletrônica de suspensões de NCs de CdTe obtidas pelo Método 1 (a) e Método 2 (b) de síntese de NCs	58
Figura 3.8 – Espectros de emissão referentes à diferentes diluições feitas em uma suspensão de NCs de CdTe obtidas pelo Método 2 de síntese	59

Figura 3.9 – Espectros de excitação das diferentes diluições feitas em uma suspensão De NCs de CdTe obtidas pelo Método 2 de síntese.....	60
Figura 3.10 – Espectros de emissão de uma suspensão de NCs de CdTe e das frações de NCs obtidas pelo processo de precipitação seletiva.....	61
Figura 4.1 – Esquema geral da conjugação de NC a uma biomolécula por intermédio de uma molécula funcionalizante	64
Figura 4.2 – Estrutura geral do glutaraldeído	65
Figura 4.3 – Ligação entre grupamentos amino de proteínas com os grupamentos aldeído da forma polimérico do glutaraldeído	66
Figura 4.4 – Esquema geral da polimerização do glutaraldeído em meio alcalino	67
Figura 4.5 – Estruturas funcionais de um anticorpo	68
Figura 4.6 – Micrografia de campo claro de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH) ₂ funcionalizada com glutaraldeído	72
Figura 4.7 – Micrografia de baixa energia (20eV) de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH) ₂ funcionalizada com glutaraldeído.....	73
Figura 4.8 – Espectros de emissão de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH) ₂ com e sem a funcionalização com glutaraldeído	74
Figura 4.9 – Evolução temporal dos espectros de emissão de uma amostra de NCs funcionalizada com glutaraldeído (CdS/Cd(OH) ₂ /glut) e com glutaraldeído/Anti-A (CdS/Cd(OH) ₂ /glut/Anti-A)	75
Figura 4.10 – Evolução temporal das bandas de emissão geradas pela excitação em 337, 488 e 543 nm.....	76
Figura 5.1 – Esquema representativo de uma leishmania na forma promastigota.....	82
Figura 5.2 - Micrografias obtidas da luminescência do parasita, após marcação com os NCs funcionalizados com glutaraldeído	83

Figura 5.3 - Micrografias obtidas da luminescência do parasita, após marcação com os NCs não funcionalizados	84
Figura 5.4 – Perfil tridimensional de marcação de <i>Leishmania amazonensis</i> com NCs de CdS/Cd(OH) ₂	85
Figura 5.5 – Descrição esquemática da conjugação de CdS/Cd(OH) ₂ -Glut-Anti-A à membrana de hemácias, através de reação específica antígeno-anticorpo	87
Figura 5.6 – Micrografias obtidas da luminescência das hemácias A ⁺ , após marcação com os NCs/glut/Anti-A	88
Figura 5.7 - Micrografias obtidas da luminescência das hemácias O ⁺ , após marcação com os NCs/glut/Anti-A	89
Figura 5.8 – Mapas de intensidade de hemácias A ⁺ (a) e O ⁺ (b) mostrando a diferença entre as intensidades das emissões exibidas	89
Figura 5.9 – Esquema representando o processo de marcação dos tecidos	93
Figura 5.10 – Imagem típica de um corte de tecido de Fibroadenoma marcado com CdS/Cd(OH) ₂ /glut/ConA e tratado com Azul de Evans obtida através de microscopia confocal sob excitação dual em 488 e 543 nm	94
Figura 5.11 – Cortes de fibroadenomas de tecidos mamários	94
Figura 5.12 – Cortes de tecido mama saudável (a) e de fibroadenoma (b) tratados com AE e marcados com NCs/glut/ConA	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Valores de band gap de alguns semicondutores do tipo II-VI	04
Tabela 2.1 - Concentrações de $[(\text{NaPO}_3)_n]$ utilizadas para a preparação de suspensões de NCs de CdS	25
Tabela 2.2 – Dados relativos às micrografias exibidas nas Figuras 2.11 à 2.15.....	39
Tabela 3.1 – pKa de alguns tiois utilizados como estabilizantes na síntese de NCs de semicondutores do tipo II-VI	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

eV	Elétron Volts
CdS	Sulfeto de Cádmio
Cd(OH) ₂	Hidróxido de Cádmio
CdTe	Telureto de Cádmio
CdSe	Seleneto de Cádmio
ZnO	Óxido de Zinco
ZnS	Sulfeto de Zinco
ZnTe	Telureto de Zinco
PP	Polifosfato
a _B	raio de Bohr
E _g	<i>band gap</i>
NCs	Nanocristais
Cd(ClO ₄) ₂	Perclorato de Cádmio
[NaPO ₃] _n	Polifosfato de Sódio
DRX	Difração de raio-X
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TOPO	Trioctilfosfinóxido
TOP	Trioctilfosfina
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
AMA	Ácido mercaptoacético
Glut	Glutaraldeído
ConA	Concanavalina-A
Anti-A	Anticorpo contra hemácias tipo A

Capítulo 1 – Nanocristais de semicondutores

1.1 – Introdução

1.1.1 – Semicondutores

A natureza físico-química dos materiais em geral se dá pela configuração eletrônica e dinâmica das moléculas que os compõe. Portanto, para que se possa chegar a uma compreensão mais profunda das propriedades e, conseqüentemente, de possíveis aplicações dos diversos materiais existentes, assim como de novos materiais a serem desenvolvidos, faz-se necessário o entendimento de como suas moléculas são formadas e, como e quais são as interações intermoleculares existentes nestes materiais.

Toda molécula existente pode ser descrita como sendo formada por pelo menos uma estrutura de ligação entre seus átomos: o orbital molecular. O orbital molecular resulta da combinação entre dois orbitais atômicos que estejam relacionados a elétrons de spins opostos, pertencentes aos átomos formadores da molécula. Esta combinação se dá de tal forma que as energias individuais dos elétrons envolvidos na formação da molécula sofrem uma redistribuição, resultando em uma estrutura que corresponde a “mistura” entre os respectivos orbitais atômicos destes elétrons.

O orbital molecular deve ser interpretado como uma nova função de onda, resultante da combinação entre as funções de onda dos seus elétrons participantes e cujo operador hamiltoniano deve levar em consideração duas novas perturbações que contribuem para a energia final deste orbital: a repulsão entre os elétrons localizados no orbital molecular e as atrações entre os elétrons de um átomo e o núcleo do outro átomo. Este novo orbital, que descreve o compartilhamento entre os elétrons dos átomos envolvidos, é a estrutura responsável pelas novas propriedades físicas e químicas da molécula formada.

Uma molécula possui como estrutura eletrônica, no mínimo, dois orbitais moleculares: um orbital ligante, de menor energia, e um orbital antiligante, de maior energia. Os elétrons compartilhados na ligação química encontram-se normalmente localizados no orbital ligante, pois esta é uma região de menor energia e representa a configuração mais estável de uma molécula, localizando-se no orbital antiligante

apenas sob a ação de uma perturbação externa ao ambiente eletrônico da molécula, resultando em um estado excitado desta [1,2] (Figura 1.1).

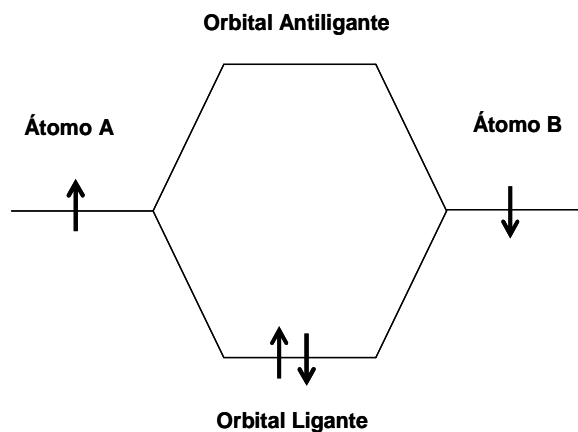


Figura 1.1 – Esquema de formação de orbitais moleculares, ligante e antiligante, entre dois átomos quaisquer A e B.

Quando um dado material é formado pelo empacotamento de várias moléculas idênticas em uma rede ordenada e esta rede passa a ser estável devido às forças de coesão entre as moléculas, temos a formação de um material cristalino [1]. O empacotamento das moléculas resulta em uma perturbação mútua entre os orbitais de uma dada molécula com os orbitais das moléculas vizinhas. Esta perturbação resulta em uma nova “mistura” destes orbitais, forçando-os a se rearranjarem energeticamente. Este rearranjo resulta na distribuição da energia total em toda extensão da rede cristalina do material. Com isso, surge uma nova estrutura eletrônica, não mais referente às moléculas individuais, mas sim ao material cristalino como um todo. Esta nova estrutura eletrônica, chamada de banda, assemelha-se aos orbitais moleculares precursores. A banda de menor energia, equivalente ao conjunto dos orbitais ligantes, denomina-se de banda de valência (BV) e a banda de maior energia, equivalente ao conjunto dos orbitais anti-ligantes, denomina-se banda de condução (BC) (Figura 1.2).

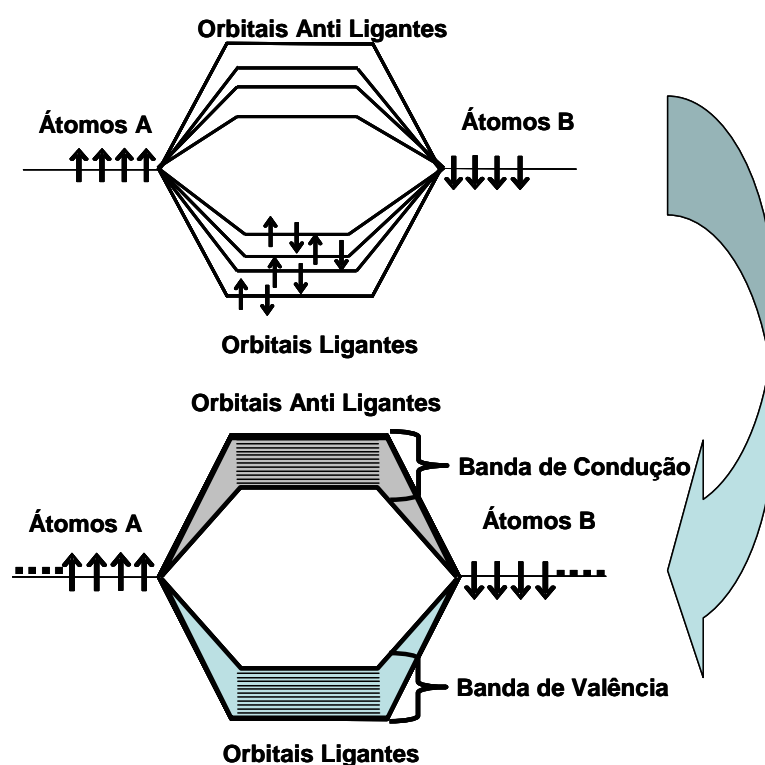


Figura 1.2 – Formação das bandas de valência e condução pelo rearranjo dos orbitais de um sistema poliatômico com n estruturas AB.

Quando localizados na BV os elétrons de um material cristalino encontram-se sob efeito atrativo dos núcleos ao seu redor, tendo pouca mobilidade de translação na rede cristalina. Por outro lado, quando promovidos para a BC, estes elétrons encontram-se com uma mobilidade maior, permitindo, por exemplo, sua orientação em um fluxo ordenado. Em um material cristalino ideal, isto é, sem defeitos em sua rede cristalina, estas bandas são separadas entre si, do ponto de vista energético, por uma região onde nenhum elétron de valência do material pode transitar. Esta região chamada de *band gap* (E_g) refere-se ao valor mínimo de energia que se deve fornecer para um elétron situado na BV para que este seja promovido para a BC [1,2]. Esta é uma das várias aproximações que se utilizam para a descrição da natureza de vários materiais semicondutores existentes.

Quando o valor energético de E_g é alto, acima de 4eV aproximadamente, há uma grande dificuldade de se promover elétrons da banda de valência para a banda de condução, sendo esta a propriedade característica dos materiais dielétricos, como o óxido de silício, por exemplo, cujo valor da banda proibida é da ordem de 8eV. Por

outro lado, há materiais formados exclusivamente por átomos de metais de transição como ferro, platina ou prata, por exemplo, cujos valores de E_g são nulos ou muito próximos de zero, permitindo que, termodinamicamente, haja uma população considerável de elétrons ocupando a banda de condução. Isto decorre da interpenetração entre as BVs e as BCs, em muitos casos não existindo *band gap*, ou sendo este desprezível. Nestes casos, os elétrons migram facilmente de uma banda para outra, sendo esta a característica principal dos materiais condutores. Por fim há uma classe de materiais cujas características encontram-se na fronteira entre os materiais isolantes e os materiais condutores. Nesta classe, os valores de E_g variam entre 0 e 4eV aproximadamente (Tabela 1.1) e sob certas condições, como temperaturas elevadas ou interação com radiação externa, a promoção de elétrons para a BC torna-se facilitada. A esta classe, de compostos denomina-se semicondutores.

Tabela 1.1 – Valores de band gap de alguns semicondutores do tipo II-VI

<i>Semicondutor</i>	<i>Band gap (eV)</i>
CdTe	1.60 ^a
CdSe	1.84 ^a
CdS	2.5 ^b
ZnSe	2.82 ^a
ZnO	3.4 ^b
ZnS	3.68 ^b

^a Gaponenko [3].

^b [4].

Os semicondutores são materiais bastante utilizados nas mais diversas áreas, devido principalmente às suas propriedades elétricas e ópticas. Podem ser das mais diversas naturezas como compostos binários (ZnS, ZnO, CdTe, entre outros) e materiais com a inclusão de certos tipos de elementos, isto é, dopados (Si dopado com P ou B, por exemplo), dentre outros. Para os nossos estudos, estamos interessados na família de semicondutores formados pela combinação entre metais de transição da família II B, como zinco e cádmio, e calcogenetos da família VI A. Daí o nome dado a esta família de compostos: semicondutores do tipo II-VI.

A estrutura de bandas dos semicondutores cristalinos é determinada pela simetria da rede cristalina. Para cada tipo de simetria, pode-se correlacionar uma

representação mínima da estrutura cristalina, que se repete periodicamente em toda rede do cristal. Esta representação mínima é conhecida como zona de *Brillouin*, existindo diferentes zonas para diferentes simetrias. Dentro de uma zona de *Brillouin*, existe associado um conjunto de vetores \mathbf{k} , através do qual se translada de uma zona para outra idêntica na rede cristalina, passando-se por diferentes pontos com simetrias diferentes na rede. Supondo-se agora que um elétron translade pela rede cristalina através de um destes vetores, este irá sofrer perturbações de diferentes valores energéticos, sendo estas perturbações também periódicas. As combinações de todas as perturbações que um dado elétron possa sofrer, para um dado conjunto de vetores \mathbf{k} resultam nas estruturas de bandas de cada tipo de semicondutor que seja representado por uma dada zona de *Brillouin*. Dependendo das estruturas das bandas geradas, o valor do *band gap* de um semicondutor será referente ao intervalo entre o valor máximo de energia da banda de valência permitido para um elétron e o valor mínimo permitido da banda de condução. Se estes valores estiverem correlacionados a um mesmo vetor \mathbf{k} de deslocamento, dizemos que o semicondutor é do tipo **gap direto** e, caso contrário, se estes valores correspondem a vetores \mathbf{k} diferentes, dizemos que o semicondutor é do tipo **gap indireto**. No nosso caso, os semicondutores do tipo II-VI são todos de *gap* direto.

Uma propriedade interessante nos semicondutores, e que também ocorre em metais, é a sua forma de interação com a radiação eletromagnética [3]. Quando um fóton de energia superior a E_g interage com um elétron na BV do semicondutor, este elétron migra para a BC, gerando uma vacância, isto é, um buraco virtual na camada de valência. Este buraco (h^+) possui carga igual a do elétron, mas de sinal oposto. O conjunto elétron-buraco é chamado de éxciton, que possui sua existência vinculada a forças coulômbianas fracas, formando um estado ligado (Figura 1.3).

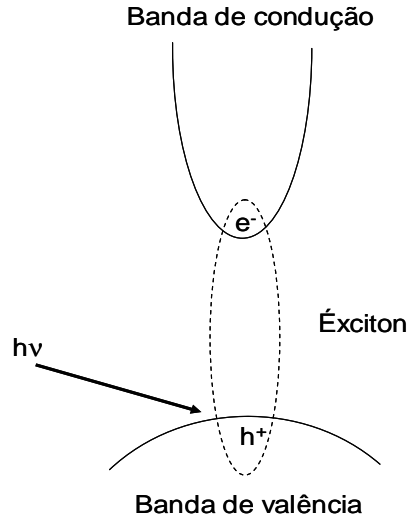


Figura 1.3 – Esquema de formação de um éxciton. h^+ representa o buraco gerado na banda de valência, pela excitação do elétron e^- .

A esta estrutura ligada denomina-se éxciton ligado e este se comporta como uma espécie independente, apresentando um conjunto de níveis de energia distintos do semiconductor que podem ser descritos como uma interação tipo átomo de hidrogênio, possuindo o primeiro nível excitado um pouco abaixo - $<0,1$ eV - da BC do semiconductor. Assim como o átomo de hidrogênio, o éxciton ligado possui um raio associado denominado raio de Bohr do éxciton [3,5] (Equação 1.1).

$$a_B = \frac{4\pi\epsilon_0\epsilon_\infty\hbar^2}{m_0e^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) \quad (1.1)$$

Na Equação 1.1, ϵ_∞ é a constante dielétrica do meio onde se encontra o semiconductor, e m_e^* e m_h^* são, respectivamente, as massas efetivas do elétron e do buraco do éxciton e m_0 é a massa padrão do elétron.

O éxciton formado possui uma vida muito curta (nanossegundos) e o processo de decaimento energético para a BV é denominado de recombinação excitônica. Duas formas de perda do excesso de energia são possíveis: uma forma não radiativa, onde a energia pode ser dissipada na própria rede cristalina através da geração de vibrações específicas na rede (fônons) e/ou através da emissão de fótons com energia menor do que os fótons de excitação [3]. Em semicondutores macroscópicos o primeiro

processo é predominante sobre o segundo, devido à presença de defeitos intrínsecos na rede cristalina durante a formação do cristal.

1.1.2 – Confinamento Quântico

Quando se encontram em dimensões macroscópicas (também descritos como *bulk*) os materiais cristalinos possuem suas propriedades físicas e químicas determinadas principalmente pelos átomos que compõem o núcleo do cristal, sendo os átomos da superfície de menor importância para a determinação destas propriedades. Em um material no estado *bulk*, qualquer variação nas dimensões do cristal não interfere nas suas propriedades [1,2].

Entretanto, quando o número de átomos de um cristal se reduz a algumas dezenas de milhares, seus átomos de superfície passam a fazer parte de uma fração significativa do material, participando efetivamente em suas propriedades físicas [6]. Segundo o modelo de orbitais moleculares descrito na seção anterior, a redução drástica do número de átomos no cristal reduz a sobreposição dos seus orbitais moleculares, fazendo com que o rearranjo energético destes seja menor, resultando numa configuração de bandas de valência e de condução mais semelhantes à orbitais moleculares. Neste caso, o cristal obtido possui propriedades intermediárias entre o material *bulk* e os íons que o constituem. Este fenômeno é conhecido como **Confinamento Quântico** [2,6], sendo bastante importante para materiais semicondutores.

Quando as dimensões de um semicondutor se reduzem de tal forma que os seus valores sejam próximos ou menores do que as dimensões do raio de Bohr do seu éxciton, os elétrons de valência tornam-se confinados à superfície do cristal, quando excitados por um fóton. Isto ocorre porque o material não mais se comporta como uma rede cristalina, onde os elétrons podem migrar em qualquer direção sofrendo perturbações mínimas dos núcleos dos átomos. Neste estado, os elétrons se comportam como se percebessem as “bordas” do cristal, tornando-se mais atraídos pelos núcleos próximos [2,3]. Isto faz com que as energias vinculadas às funções de onda que descrevem o deslocamento de cada elétron se aproximem dos valores atômicos, mais altos do que as energias envolvidas no cristal.

Este confinamento pode ser interpretado de forma simples utilizando-se o modelo de partícula na caixa. Segundo este modelo, um elétron encontra-se confinado dentro de uma caixa virtual, onde as funções de onda do elétron se restringem ao interior da caixa, não permitindo ao elétron que se desloque para além das limitações de suas paredes. Quanto menor forem as dimensões da caixa, maior a separação energética entre os diferentes níveis associados cada um a uma função de onda. Fazendo-se uma analogia ao cristal de um semicondutor e definindo as BVs e BCs por funções de onda quaisquer, quando as dimensões do cristal se reduzem a poucos nanômetros, há um distanciamento energético entre as bandas, que se reflete no aumento do valor energético de seu E_g . Além disso, ocorre uma discretização das BV e da BC que, em outras palavras, é a diminuição dos intervalos energéticos que determinam as bandas, podendo ocorrer o surgimento de novas bandas durante o processo de quantização [3].

Outro modelo bastante utilizado para descrever o efeito de confinamento quântico é o modelo de massa efetiva [2,3,7]. Este modelo leva em consideração para os cálculos dos níveis energéticos do cristal que os elétrons, e os buracos formados no surgimento de éxcitons, possuem uma massa considerada diferente do que os elétrons e buracos no *bulk*. Esta diferença nas massas não deve ser interpretada como uma mudança na quantidade de matéria do elétron, mas sim como o elétron se comporta quando perturbado por uma força externa. Isto é ilustrado pela clássica fórmula da segunda Lei de Newton [3]:

$$m^* \cdot a = F \quad (1.2)$$

Esta mudança de comportamento ocorre pois, nas dimensões reduzidas do cristal nanométrico, um elétron ou um buraco pode possuir uma massa efetiva (m^*) maior ou menor do que quando se encontravam no material *bulk*. Neste modelo, o cálculo da energia do *band gap* do material confinado pode ser realizado, utilizando-se a seguinte fórmula [5]:

$$E = E_g + \frac{\pi^2 \hbar^2}{2m_0 R^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_\infty R} \quad (1.3)$$

Na Equação 1.3, o primeiro termo é o valor da energia do *band gap* do *bulk*; o segundo termo diz respeito a aproximação do confinamento ao modelo de partícula na caixa, dando ao novo *band gap* uma dependência proporcional a $1/R^2$ em relação ao raio no material e o terceiro termo diz respeito às interações coulômbicas do material, tendo uma dependência proporcional a $1/R$. Esta é uma fórmula bastante útil nos cálculos envolvendo semicondutores sob efeito de confinamento fraco, porém, sofrendo consideráveis desvios nos resultados para materiais sob confinamento forte.

Podemos ter dois tipos de confinamento quântico em um material: o confinamento fraco e o forte [3]. O confinamento fraco ocorre quando o raio do material nanométrico está muito próximo do valor do seu respectivo raio de Bohr do éxciton, ou seja, $r \cong a_B$. Neste caso, a variação do raio do material contribui com sob um fator de $1/R^2$ para a variação do *band gap*. Por outro lado, quando o raio do material é muito menor do que a_B temos o confinamento forte, que contribui sob um fator de $1/R^3$ para a variação do *band gap* do material [8].

Com o efeito de confinamento quântico, todas as propriedades do semicondutor se modificam, algumas mais significativamente do que outras. As propriedades ópticas tais como absorção eletrônica e fotoluminescência [2,3,5-8], por exemplo, alteram-se drasticamente com a quantização de semicondutores. Com o aumento do confinamento quântico, elétrons excitados com alta energia decaem por recombinação excitônica emitindo fótons que podem ter energias em praticamente qualquer região do espectro visível, até mesmo no infravermelho. Contrastando com o *bulk*, onde o processo de relaxação ocorre praticamente pela geração de fônons no cristal, o processo de fotoluminescência em semicondutores de dimensões no regime de confinamento quântico encontra-se bastante pronunciado.

1.2 – Breve histórico sobre nanocristais de semicondutores

Em 1982 [9] foi publicado um dos primeiros trabalhos sobre preparação e estudos das propriedades de nanocristais (NCs) luminescentes de semicondutores (*quantum dots*) tipo II-VI, onde Henglein e colaboradores descrevem a síntese e caracterização óptica de NCs de sulfeto de cádmio (CdS) e co-colóides de sulfeto de cádmio e zinco (CdS-ZnS). A partir desta data, houve um crescimento considerável no número de trabalhos publicados nos quais são descritas as mais diversas metodologias empregando-se técnicas conhecidas de química coloidal para a obtenção de semicondutores de banda direta em combinações do tipo III-V, II-IV, II-VI e I-VI. Dos sistemas mais investigados, em termos de preparação e caracterização, citam-se TiO₂, CdS, CdSe, Cd(Se,S), CdTe, PbS e ZnS [10-12]. Foram relatadas também, em menor escala, a síntese de nanopartículas de ZnO, AgI, AgBr, HgI₂, PbSe, ZnTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, CuCl, CuBr [13-16] e mais recentemente, tentativas com GaAs [17,18]. Nestes trabalhos pode-se observar ainda estudos detalhados sobre: cálculo de interações entre elétrons e buracos, dependentes do tamanho do cristal [7]; processos de fotoluminescência nos NCs [19]; processos de fotodegradação dos NCs [20]; variação das condições experimentais sobre as propriedades dos NCs [21]; elaboração de novas metodologias de obtenção destes materiais [22-26]; e métodos de separação de NCs por seleção de tamanho [27].

1.3 – Motivação: aplicações de NCs de semicondutores como biomarcadores

Desde as primeiras publicações que descreveram a utilização dos NCs como marcadores biológicos com propriedades singulares em 1998 [28,29], uma grande quantidade de artigos vêm sendo publicados anualmente descrevendo o uso de NCs como sondas luminescentes nos mais diversos sistemas biológicos. Muitos destes trabalhos descrevem a simples modificação de protocolos de marcação já bem descritos, apenas substituindo o fluoróforo orgânico classicamente utilizado pelos NCs luminescentes, resultando em melhoras na sensibilidade e especificidade destes protocolos. Alguns estudos ainda mostram que quando funcionalizados com biomoléculas como albumina [30] ou polietilenoglicol [31], por exemplo, os NCs

diminuem sua citotoxicidade, permitindo que estes sejam utilizados para estudos de processos metabólicos sem interferência química no sistema em estudo.

Os NCs de semicondutores vem sendo cada vez mais utilizados como marcadores luminescentes para estudos de sistemas biológicos vivos *in vitro* e até mesmo alguns estudos *in vivo* [31]. Isto se deve principalmente às seguintes vantagens em relação aos fluoróforos orgânicos comumente utilizados para estes tipos de estudos:

- Largo espectro de excitação, em relação aos fluoróforos orgânicos, possibilitando uma maior opção de comprimentos de onda para a promoção da luminescência dos NCs.
- Maior fotoestabilidade, permitindo que os sistemas biológicos possam ser excitados por períodos longos sem ocorrer fotoescurecimento.
- Diversas possibilidades de conjugação a biomoléculas, sem que a fotoluminescência seja significativamente suprimida, permitindo o desenvolvimento de protocolos para estudos de vários sistemas biológicos.
- Possuem estreitas bandas de emissão, em comparação aos fluoróforos orgânicos, possibilitando estudos com marcações múltiplas em sistemas biológicos, utilizando NCs com emissões em diferentes comprimentos de onda, sem que haja sobreposição considerável das bandas.
- Fotoluminescência com alto deslocamento de Stokes, o que praticamente dispensa a utilização de filtros para eliminar a interferência da radiação de excitação.
- Tempos de decaimento na ordem de centenas de nanosegundos, possibilitando detecção resolvida no tempo suprimindo a autofluorescência existente na maioria dos sistemas biológicos [28].

Há também as vantagens dos NCs luminescentes em relação aos marcadores radiológicos, ainda muito utilizados em algumas áreas de diagnósticos clínicos, como o baixo risco de contaminação e danos causados no manuseio dos NCs e o elevado tempo de utilização e armazenamento dos NCs, para aplicações posteriores.

1.4 – Colóides

Um colóide pode ser definido como um sistema formado por partículas ou macromoléculas cujas dimensões estejam dentro da faixa de alguns nanômetros (10^{-9} m) até alguns micrômetros (10^{-6} m), dispersas em um meio homogêneo no qual não sejam solúveis, formando um sistema heterogêneo, mas que possui um aspecto visual homogêneo. Devido a esta característica, muitas vezes os colóides recebem o adjetivo de sistemas “micro-heterogêneos” [32].

O que distingue os sistemas coloidais de outros sistemas dispersos são, dentre outras características, as seguintes propriedades:

- É capaz de espalhar um feixe de luz ordenado, devido à interação entre os fótons incidentes e as partículas formadoras da fase dispersa deste colóide (Efeito Tyndall);
- As partículas dispersas (partículas coloidais) possuem um baixo coeficiente de difusão no meio dispersante;
- Esta mistura possui uma baixíssima pressão osmótica;
- É passível de sofrer um processo de diálise, pelo qual selecionadas impurezas podem ser retiradas da mistura;
- E, finalmente, esta mistura é um sistema termodinamicamente metaestável, ou seja, sua estabilidade quanto à manutenção da sua homogeneidade só ocorre sob certas condições de temperatura e de impurezas e íons dissolvidos na fase dispersante.

As propriedades das partículas coloidais como tamanho, formato, flexibilidade e distribuição de cargas elétricas na superfície são os principais fatores que determinam a natureza de um sistema coloidal, podendo este ser dividido basicamente em dois subgrupos:

- Dispersões coloidais: sistemas termodinamicamente instáveis, devido à alta energia livre de superfície das partículas coloidais e irreversível, pois não é possível ressuspender o sistema após a separação das fases dispersa e dispersante;
- Soluções verdadeiras de macromoléculas: sistemas termodinamicamente estáveis e de fácil reconstituição após a separação das fases formadoras.

Em um sistema coloidal disperso, as partículas existentes possuem um tamanho médio suficientemente grande para que haja a formação de uma superfície de separação entre estas e a fase dispersante, sendo o estudo destas interfaces um dos grandes temas de pesquisas em química coloidal. Os elevados valores da relação “área superficial/volume” das partículas faz com que propriedades desta interface, como dupla camada elétrica e adsorção tenham uma grande contribuição na manutenção da estabilidade do sistema coloidal, visto que alterações que ocorrem nos valores destas propriedades alteram o equilíbrio metaestável entre repulsão e atração das partículas coloidais entre si, acelerando ou retardando o processo natural de separação de fases do sistema através da coalescência e precipitação das partículas coloidais.

Sabe-se que as partículas coloidais não se encontram estáticas no meio, mas sim sob movimento desordenado, conhecido como movimento “browniano”, podendo participar de colisões e subseqüentes processos de agregação. A estabilidade de um colóide diz respeito à velocidade com que as partículas da fase dispersa se agregam, formando partículas maiores que conseqüentemente irão precipitar, desfazendo o colóide. Dentre os fatores mais importantes que controlam a taxa de colisões entre as partículas e sua agregação temos a temperatura, que atua diretamente na velocidade com que as partículas coloidais se deslocam na fase dispersa. Outro fator importante que determina a estabilidade coloidal é presença de eletrólitos dissolvidos na fase dispersa. A importância deste fator reside na natureza elétrica de um colóide.

As partículas formadoras da fase dispersa normalmente são carregadas eletrostaticamente, com as cargas distribuídas sobre a sua superfície. Neste caso, partículas com cargas de sinais iguais geram colóides mais estáveis, visto que a repulsão eletrostática entre as partículas diminui a aproximação entre partículas vizinhas, diminuindo a velocidade com que estas se agregam. Por outro lado, partículas com cargas de sentido oposto tendem a se agregar mais rapidamente por atração eletrostática, resultando em uma rápida desestabilização do colóide. Com isso, pode-se deduzir que eletrólitos dissolvidos na fase dispersante de um colóide podem agir no desequilíbrio das cargas das partículas coloidais, induzindo sua agregação e a destruição do respectivo colóide. Para reduzir a ação destes eletrólitos, normalmente utilizam-se compostos químicos denominados estabilizantes, que se agregam quimicamente ou fisicamente na superfície das partículas coloidais, promovendo um

aumento na carga eletrostática das partículas, o que minimiza a ação dos eletrólitos interferentes e aumentando a estabilidade coloidal.

Infelizmente, o processo de desestabilização de um colóide é um processo termodinamicamente favorável, isto é, por melhores que sejam as condições em que um colóide se encontre, fatalmente ocorrerá a agregação de suas partículas com conseqüente precipitação do colóide. Um processo interessante que contribui para a desestabilização de um colóide é denominado “envelhecimento” coloidal. Por este processo, as partículas vão se tornando cada vez maiores com o decorrer do tempo, chegando a ponto do colóide não mais conseguir manter a sua homogeneidade, ocorrendo a precipitação da fase dispersa.

Um modelo cinético interessante que descreve o envelhecimento coloidal, e muito aplicado para vários sistemas estudados, é o chamado modelo de “envelhecimento de Ostwald” [33]. Segundo este modelo, partículas pequenas dissolvem-se, difundindo-se para a superfície de partículas maiores, aumentando gradativamente o número e o tamanho das partículas maiores, contribuindo para a desestabilização do colóide. Este modelo baseia-se no efeito Kelvin, que diz que quanto menor o raio de uma partícula dispersa em um meio, maior a sua solubilidade e maior a sua velocidade de dissolução no dispersante[32]. Ainda sobre o modelo de Ostwald, para todo sistema composto por partículas dispersas, existe um valor particular de raio para as partículas denominado de **raio crítico**. Partículas com dimensões menores que o raio crítico tendem a se dissolver e partículas com raio maior do que o raio crítico tendem a crescer no meio, direcionando o processo de envelhecimento. Como é inviável experimentalmente obter-se um colóide totalmente monodisperso, fica claro a espontaneidade do processo de envelhecimento dos colóides, segundo o modelo de Ostwald.

1.5 – Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho é a obtenção e caracterização de NCs luminescentes de materiais semicondutores II-VI através de técnicas baseadas em química coloidal, com o intuito final de aplicação destes NCs como marcadores biológicos.

Para tanto, deseja-se atingir as seguintes metas:

- Obtenção de suspensões de NCs de CdS, CdS/Cd(OH)₂ e CdTe dentro do regime de confinamento quântico destes materiais, em meio aquoso, utilizando-se técnicas simples e de baixo custo;
- Controle dos parâmetros de síntese dos NCs, com o intuito de se controlar quimicamente seu tamanho e, conseqüentemente, sua fotoluminescência (região do espectro visível e alta intensidade de luminescência);
- Caracterização das suspensões obtidas, objetivando-se a avaliação estrutural e espectroscópica dos NCs sintetizados;
- Modificação química da superfície dos NCs, com o intuito de utilizá-los posteriormente para marcação de sistemas biológicos;
- Realização de experimentos de marcação biológica, envolvendo os NCs e três sistemas biológicos: células sanguíneas, parasitas do tipo *Leishmania amazonensis* e cortes histológicos de tecidos tumorais.

1.6 – Apresentação da dissertação

Os trabalhos desenvolvidos nesta dissertação encontram-se distribuídos em quatro capítulos, da seguinte forma:

- Capítulo 2: Trata da síntese e caracterização estrutural e espectroscópica de suspensões coloidais de NCs de CdS e CdS/Cd(OH)₂. Além disso, neste capítulo ainda descreve-se como a concentração do estabilizante escolhido na preparação dos NCs interfere na síntese destes cristais;
- Capítulo 3: Trata da síntese e caracterização estrutural e espectroscópica de suspensões coloidais de NCs de CdTe . Descrevem-se diferentes metodologias utilizadas na obtenção do precursor telureto (Te⁻²), necessário para a síntese dos NCs, assim como as metodologias utilizadas para a obtenção de NCs luminescentes de CdTe;
- Capítulo 4: Neste capítulo descrevem-se metodologias simples de funcionalização dos NCs obtidos pela metodologia descrita no Capítulo 2, com o intuito de posterior aplicação para marcação de sistemas biológicos. Neste capítulo ainda descreve-se as observações realizadas a respeito das caracterizações espectroscópicas dos NCs funcionalizados;
- Capítulo 5: Este capítulo mostra algumas aplicações de marcação biológica utilizando os NCs funcionalizados pelas metodologias descritas no Capítulo 4. Ainda descreve-se o comportamento dos NCs quando conjugados com os diferentes sistemas biológicos, no que diz respeito a modificações em sua fotoluminescência.

1.7 - Referências

- 1 Morrison, M. A., Estle, T. L., Lane, N. F. Quantum States of Atoms, Molecules, and Solids. Nova Jersey, Prentice-Hall, 1976.
- 2 Schmid, G (Ed.). Nanoparticles From Theory to Application. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- 3 Gaponenko, S. V. "Optical properties of semiconductor nanocrystals". Cambridge, Cambridge University Press, 1998.
- 4 [http:// www.semiconductors.co.uk](http://www.semiconductors.co.uk). Acessado em 10/06/06
- 5 Santos, B. S. *Tese de Doutorado*. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2002.
- 6 Alivisatos, A. P. *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 13226.
- 7 Brus, L. E. *J. Chem. Phys.* 80 : 9 (1984) 4403.
- 8 Vossmeier, T., Katsikas, L., Giersig, M., Popovic, I. G., Diesner, K., Chemseddine, A., Eychmüller, A., Weller, H. *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 7665.
- 9 Alfassi, Z., Bahnemann, D., Henglein, A. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 4656.
- 10 Hines, M. A., Guyot-Sionnest, P., *J. Phys. Chem.* 102 (1998) 3655.
- 11 Brus, L. E., *Appl. Phys. A*, 53 (1991) 465.
- 12 Hoyer, P., Weller, H. *Chem. Phys. Letters*, 221 (1994) 379.
- 13 Spanhel, L., Weller, H., Henglein, A., *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 6632
- 14 Spanhel, L., Henglein, A., Weller, H., *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 91 (1987) 1359.
- 15 Henglein, A., Gutierrez, M., Weller, H., Fojtik, A., Jirkovsky, J. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, 93 (1989) 593.
- 16 Weller, H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32 (1993) 41.
- 17 Kamat, P. V., Ford, W. E. *Chem. Phys. Letters*, 135 : 4,5 (1987) 421.
- 18 Rajh, T., Vucemilovic, M. I., Dimitrijevic, N. M., Micic, O. I., Nozik, A. J., *Chem. Phys. Letters*, 143 : 3 (1988) 305.
- 19 Chestnoy, N., Harris, T. D., Hull, R., Brus, L. E. *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 3393.
- 20 Baral, S., Fojtik, A., Weller, H., Henglein, A. *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 375.
- 21 Spanhel, L., Haase, M., Weller, H., Henglein, A. *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5649.
- 22 Rogach, A. L., Katsokas, L., Kornowski, A., Su, D., Weller, H. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 100 (1996) 1772.

- 23 Kapitonov, A. M., Stupak, A. P., Gaponenko, S. V., Petrov, E. P., Rogach, A. L., Eychmüller, A. *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 10109.
- 24 Murray, C. B., Norris, D. J., Bawendi, M.G. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 8706
- 25 Green, M., O'Brien, P. *Chem. Commun.* (1999) 2235.
- 26 Gaponik, N., Talapin, D. V., Rogach, A. L., Hoppe, K., Shevchenko, E. V., Kornowski, A., Eychmüller, A., Weller, H. *J. Phys. Chem. B.* 106 (2002) 7177.
- 27 Eychmüller, A., Katsikas, L., Weller, H. *Langmuir.* 6 (1990) 1605.
- 28 Bruchez, M., Jr., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A.P. *Science* 281 (1998) 2013
- 29 Chan, W.C.W., Nie, S. *Science* 281 (1998) 2016.
- 30 Lovric, J., Bazzi, H.S., Cuie, Y., Fortin, G. R. A., Winnik, F. M., Maysinger, D., J. Mol. Med. 83 (2005) 377.
- 31 Akerman, M.E., Chan, C.W., Laakkonen, P., Bhatia, S.N., Ruoslahti, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(20) (2002) 12617.
- 32 Shaw, D. J. Introduction to Colloid and Surface Chemistry. Butterworth-Heinemann : UK, 1992.
- 32 Voiutskii, S. S. Colloid chemistry. Moscow: Mir, 1978.
- 33 Finsy, R. *Langmuir.* 20 (2004) 2975.

Capítulo 2 – Síntese e Caracterização de suspensões coloidais de CdS e CdS/Cd(OH)₂ :

2.1 - Introdução

As várias técnicas existentes para a obtenção de nanocristais (NCs) de metais e semicondutores [1-5] podem ser classificadas como pertencentes a dois grupos de métodos: i) *bottom-up* e ii) *top-down*. As técnicas aqui mencionadas baseiam-se em química coloidal, portanto, técnicas *bottom-up* de obtenção de NCs. A escolha da química coloidal deve-se aqui se as suas vantagens, tais como:

1. Dispensa o uso de suportes ou substratos para obtenção e crescimento das nanoestruturas, diferente de métodos como os baseados em processos de eletrodeposição [6] e de deposição por vapor ou plasma.
2. Gera uma quantidade mínima de resíduos, diferindo neste aspecto, de métodos como os que utilizam fotocorrosão controlada de cristais macroscópicos para a geração de NCs, onde boa parte do precursor é descartada ao final do processo.
3. Flexibiliza a obtenção de nanopartículas com propriedades ópticas e eletrônicas distintas ajustando-se poucos parâmetros de síntese (por exemplo: quantidade de estabilizante, quantidade e proporção entre os precursores dos NCs e pH do meio).
4. Possibilita alteração da superfície dos cristais para aplicações direcionadas, tais como marcação biológica.
5. Possibilitam produção em larga escala, a custo inferior as demais técnicas [1].

Para a obtenção de uma suspensão coloidal estável de NCs, devem ser observados os vários fatores envolvidos na sua preparação, como: concentração dos precursores da fase dispersa, tipo e quantidade de estabilizante utilizado, tempo de reação, pH do meio e temperatura. Estes fatores influenciam, particularmente, no tamanho médio, cristalinidade e dispersão de tamanho dos NCs. Para a minimização da dispersão de tamanho dos NCs numa suspensão, técnicas como a precipitação seletiva, cromatografia por exclusão e a eletroforese em gel [7] podem ser aplicadas.

Conforme mencionado no Capítulo 1, o modelo cinético mais aceito para explicar o crescimento temporal de NCs é o chamado “envelhecimento de Ostwald”. Neste modelo, partículas com menor diâmetro se dissolvem e seus íons se difundem preferencialmente para a superfície das partículas maiores, aumentando o diâmetro destas e, conseqüentemente, aumentando também o diâmetro médio das partículas remanescentes. Isso ocorre de forma mais lenta ou mais rápida, dependendo da dispersão de tamanho das partículas presentes em um dado sistema, da concentração dos íons e da temperatura. Por isso, foram realizados estudos dos fatores que interferem na cinética de formação dos NCs e na sua estabilidade.

2.1.1 – Estabilização de NCs: utilização do Polifosfato

O poliânion polifosfato (PP) foi o agente escolhido para a estabilização das suspensões coloidais de NCs de CdS e CdS/Cd(OH)₂ em meio aquoso [8]. O PP é um polímero inorgânico constituído de algumas poucas à milhares de unidades do monômero PO₃⁻, constituindo um poliânion de cadeia rígida (Figura 2.1).

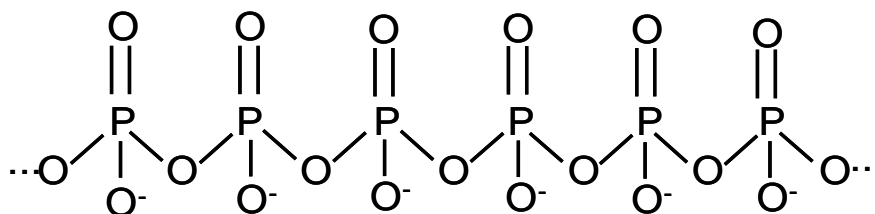
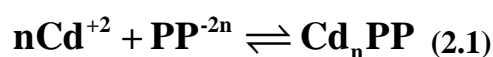


Figura 2. 1 – Representação esquemática de uma cadeia de polifosfato

O PP já foi utilizado como estabilizante para suspensões aquosas de NCs de CdS, ZnS, dentre outros semicondutores, e isto se deve pois suas cadeias recobrem a superfície dos NCs, resultando numa camada protetora com carga superficial negativa, o que dificulta a aproximação e conseqüente coalescência dos NCs.

Isto só é possível devido à forte interação eletrostática entre as cadeias de PP e os cátions de cádmio presentes na superfície dos NCs [9]:



Conforme será abordado em seção posterior, a concentração de PP utilizada na síntese de suspensões coloidais de CdS interfere de forma significativa na cinética de formação dos NCs, com conseqüente alteração da sua distribuição de tamanho.

2.2 - NCs de CdS e CdS/Cd(OH)₂ :

O sulfeto de cádmio (CdS) é um semicondutor binário do tipo II-VI, de *band gap* direto, com $E_g = 2,5$ eV (aproximadamente 495 nm). Foi um dos primeiros semicondutores a serem utilizados para os estudos sobre confinamento quântico [10].

Este semicondutor foi escolhido como sistema principal de estudo no presente trabalho, pois a metodologia de obtenção de NCs em meio aquoso é simples, estabelecida na literatura [11,12] e encontra-se implantada no grupo de pesquisa. Além disso, sob certas condições de síntese, seus NCs possuem luminescência na região visível do espectro, quando excitadas na região do UV. Como as aplicações que se desejam para os NCs depende de suas propriedades ópticas, este método é bastante atrativo pois garante a produção de NCs com boa qualidade que permitem a utilização destes como possíveis marcadores biológicos fluorescentes.

Para as aplicações onde a luminescência dos NCs é utilizada, fazem-se necessárias pequenas modificações nos processos de síntese das suspensões coloidais de NCs de CdS, de forma a minimizar o surgimento de níveis eletrônicos entre as camadas de valência e de condução do semicondutor, normalmente resultantes de defeitos na estrutura cristalina dos NCs (internos e/ou na superfície dos cristais). Estes níveis acarretam vias não radiativas de desativação do elétron-buraco diminuindo ou mesmo suprimindo completamente a luminescência dos NCs [11](Figura 2.2).

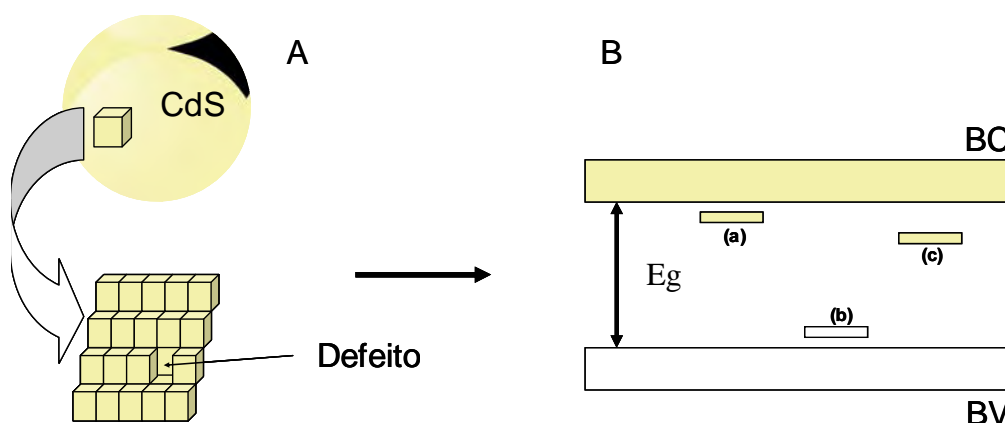


Figura 2. 2 - A : Esquema de um nanocristal de CdS com a ilustração de um possível defeito em sua estrutura cristalina. B : Diagrama ilustrativo da banda de valência (BV) e de condução (BC) do CdS, separadas por um gap energético. (a) e (c) representam níveis eletrônicos gerados por defeitos, interferindo na BC e (b) representa o nível eletrônico gerado por um defeito, interferindo na BV.

Ao processo de eliminação desses defeitos denomina-se passivação. Este processo resume-se no recobrimento dos nanocristais (núcleos) obtidos, com uma camada de outro semiconductor (casca), cuja diferença energética possui um valor maior do que o *gap* do nanocristal original (núcleo), o que acarreta na aniquilação dos níveis eletrônicos dos defeitos dos NCs. A Figura 2.3 ilustra de forma simples o processo de passivação.

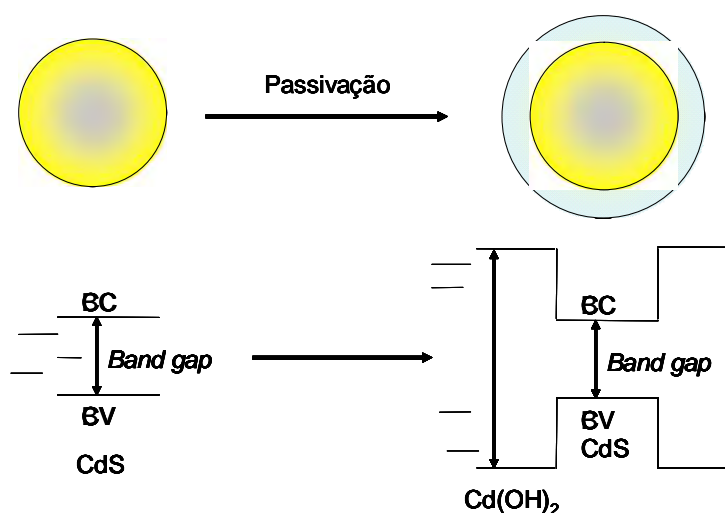


Figura 2. 3 – Esquema geral de passivação de uma nanocristal de CdS por uma camada de Cd(OH)₂.

No caso do CdS, deposita-se ao final da síntese dos NCs uma camada de hidróxido de cádmio (Cd(OH)₂), cujo *gap* entre a banda de valência e a banda de condução é maior do que o *gap* do CdS. Esta camada de passivação é obtida simplesmente pela precipitação do Cd(OH)₂, em meio básico, sobre a superfície dos NCs.

Observa-se na literatura que outros semicondutores com *gap* maior do que o do CdS também podem ser utilizados no processo de passivação. Dentre os semicondutores utilizados em processos de passivação cita-se o sulfeto de zinco (ZnS) [13].

2.3 – Procedimentos experimentais:

2.3.1 - Metodologia de síntese do CdS e CdS/Cd(OH)₂:

O processo que se utilizou neste trabalho é apenas uma adaptação do método original desenvolvido por Weller e colaboradores [11]. Utilizou-se como precursores dos NCs o perclorato de cádmio ($\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$) e o gás sulfídrico (H_2S); água desionizada foi utilizada como fase dispersante; e o polifosfato de sódio ($(\text{NaPO}_3)_n$) foi utilizado como estabilizante da suspensão coloidal.

Para a síntese do CdS/Cd(OH)₂, preparou-se de uma solução contendo 96 mL de água desionizada, 2,5 mL de uma solução 0,01M de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (Sigma-Aldrich) e 2,0 mL de uma solução 0,0051g/mL de PP ($(\text{NaPO}_3)_n$) (Sigma-Aldrich), onde $n=9$ para o lote utilizado. O pH da solução final foi ajustado, utilizando-se uma solução 0,1M de NaOH, para o valor de 8,5, valor necessário para que as NCs possuam uma luminescência com o comprimento próximo de 500 nm após a sua passivação.

Após o ajuste do pH, o sistema foi vedado com um *septum* de borracha. Finalmente, injetou-se na solução, de forma rápida, 750 μL de H_2S (White Martins, 98%), equivalente a $2,5 \times 10^{-5}$ mols de S^{-2} , com o auxílio de uma seringa específica para gases. A proporção final entre os íons Cd^{+2} e S^{-2} foi de $\text{Cd}/\text{S}=1$. O balão foi então agitado de forma vigorosa por 10 minutos, tempo no qual pode-se observar a mudança de coloração da solução, de incolor para amarelo, evidenciando a formação do produto, CdS.

Após 24 horas da preparação da suspensão de NCs de CdS realizou-se a passivação da suspensão coloidal. Para isto, ajustou-se novamente o pH da suspensão com uma solução 0,1M de NaOH, para o valor de 10,5, e adicionou-se lentamente 6 mL da solução 0,01M de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (Figura 2.4). A adição lenta do $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ nesta etapa é crucial para que se evite a formação de aglomerados de hidróxido de cádmio isolados que possam vir ocasionar a precipitação da suspensão.

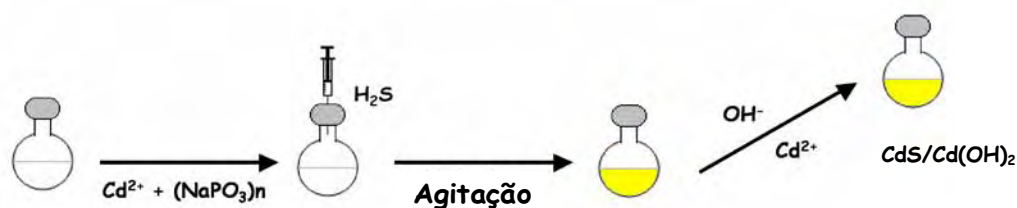


Figura 2. 4 – Esquema geral do processo de síntese dos NCs de CdS em meio aquoso, incluindo a etapa de passivação.

2.3.2 – Estudo da influência da concentração do polifosfato na síntese de NCs de CdS:

Além da síntese de NCs luminescentes, buscou-se observar como a concentração do estabilizante interfere na cinética de formação do colóide, principalmente no que diz respeito ao tamanho dos NCs obtidos. Este interesse justifica-se nas observações preliminares sobre o efeito do PP na síntese de NCs da CdS, realizados por Santos em sua tese de doutorado [12].

Para isso, preparou-se cinco amostras de CdS 1/1, como descrito na seção anterior, mas variando-se apenas a concentração de PP ($[(\text{NaPO}_3)_n]$) em cada suspensão preparada, conforme a Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Concentrações de $[(\text{NaPO}_3)_n]$ utilizadas para a preparação de suspensões de NCs de CdS.

AMOSTRA	Volume de $[(\text{NaPO}_3)_n]$ 0,0051 g/mL	Concentração final de Fosfato (PO_3^-)
1	2 mL	0,001M
2	5 mL	0,0025M
3	7 mL	0,0035M
4	9 mL	0,0045M
5	13 mL	0,0065M

2.3.3 – Caracterização espectroscópica e estrutural dos NCs de CdS e CdS/Cd(OH)₂:

Antes e após a passivação realizou-se a caracterização do processo de síntese por espectroscopia de absorção UV/Visível, para a verificação da qualidade da suspensão coloidal, isto é, para verificar-se a ausência total de partículas ou contaminantes fora do regime coloidal, além de confirmar se o tamanho das partículas recém sintetizadas encontravam-se no regime de confinamento quântico. Para isso, utilizou-se um espectrofotômetro de absorção da marca Perkin-Elmer modelo Lambda 6, com resolução de 0,5 nm. A região analisada foi entre 190 até 900 nm.

Após a passivação da suspensão, realizou-se a caracterização espectroscópica (espectroscopia de emissão e excitação) das suspensões de CdS/Cd(OH)₂ obtidas, utilizando-se para isso um espectrofluorímetro ISS K2, com resolução de 1,0 nm e lâmpada de Xenônio de 300 W como fonte de excitação.

A caracterização estrutural dos NCs foi realizada através da análise por difração de Raios-X de pó (DRX) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de amostras das suspensões obtidas.

A análise por DRX nos dá informações a respeito da cristalinidade do material obtido e sua estrutura cristalina. No presente estudo, as amostras para análise por DRX foram preparadas através da desestabilização parcial do colóide, utilizando-se frações de isopropanol absoluto, de tal forma que estas pudessem ser precipitadas seletivamente por tamanho, através de centrifugação. Para isso, seguiu-se o seguinte procedimento:

- Coletou-se aproximadamente 40 mL de suspensão de CdS recém preparada e adicionou-se isopropanol absoluto, até o surgimento de uma leve turvação da suspensão;
- Para acelerar a desestabilização do colóide, manteve-se a suspensão turva sob refrigeração a 0°C, por 6 horas;
- Em seguida, centrifugou-se a amostra a 4.500 rpm, durante 10 minutos;
- Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se a fase sólida com acetona;
- O precipitado, disperso na acetona, foi gotejado lentamente sobre um suporte de vidro, obtendo-se uma amostra representativa para a análise por DRX.

O equipamento utilizado para a obtenção dos difratogramas foi um difratômetro Siemens Nixford D5000 digital (com biblioteca cristalográfica), com radiação incidente $K\alpha_{(Cu)} = 1,542 \text{ \AA}$. Para o cálculo do tamanho médio das partículas sintetizadas, a partir do difratograma de raio-x obtido, utilizou-se a fórmula de Scherrer [12]:

$$0,9 \cdot \lambda = d \cdot B \cdot \cos \theta \quad (2.2)$$

onde:

d = diâmetro médio das nanocristais (em nm);

λ = comprimento de onda utilizado pelo equipamento ($\lambda = 0,1542 \text{ nm}$);

B = largura de linha a meia altura do pico de difração de maior intensidade (em radianos)

θ = ângulo de incidência do feixe de raio-x no pico mais intenso no difratograma.

O sistema cristalino do material obtido foi verificado com o auxílio do programa computacional Maud [16].

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para obter-se informações a respeito do tamanho médio e dispersão de tamanho das partículas, assim como informações sobre sua morfologia.

A preparação das amostras para microscopia foi realizada segundo o seguinte protocolo:

- Diluição de uma pequena quantidade de amostra em água ultrapura e sonicação por 3 minutos, com a finalidade de diminuir o número de possíveis aglomerados de nanoestruturas;
- Deposição e secagem de uma gota da amostra diluída sobre uma pequena grade de cobre recoberta por um filme polimérico de *parlódio* e por um filme fino de carbono, em torno de 5 nm;

Para obtenção das imagens utilizou-se um microscópio modelo Carl Zeiss CEM 908, com microsonda, operado com energia de 80kV. Foram coletadas imagens de campo claro (cc ou *bright field*). Este tipo de imagem é obtido através da difração de um feixe de elétrons pelos núcleos dos átomos contidos na amostra analisada. A difração ocorre para todas as direções o que representa um processo de colisão elástica, servindo para os estudos sobre a morfologia do material analisado.

A análise da dispersão de tamanho e morfologia dos NCs, foi realizada analisando-se as micrografias obtidas com o programa computacional Scion [16].

2.4 – Resultados e discussão:

2.4.1- Sistemas CdS e CdS/Cd(OH)₂:

2.4.1.1 – Caracterização estrutural dos NCs de CdS e CdS/Cd(OH)₂:

A Figura 2.5 mostra o difratograma da suspensão de NCs de CdS/Cd(OH)₂.

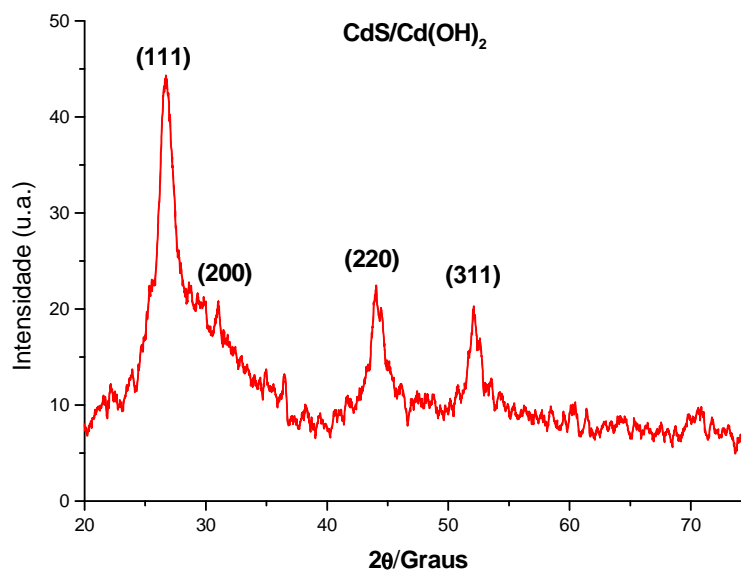


Figura 2. 5 – Difratograma de raio-x de pó de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH)₂.

Pode-se observar a presença de picos alargados no difratograma. Isto ocorre devido ao regime de tamanho nanométrico das partículas analisadas. Partículas muito pequenas possuem poucos planos cristalinos que contribuem para interferir com os feixes de raios-x incidentes em suas superfícies, o que resulta no alargamento dos picos referentes a estes poucos planos detectáveis. Utilizando-se a equação de Scherrer (Seção 2.3) estimou-se que os NCs analisados possuem um diâmetro médio de 8,5nm, o que demonstra que os cristais obtidos encontram-se em regime nanométrico. Os picos mais intensos exibidos no difratograma representam o sistema cristalino cúbico (blenda de zinco), em concordância com trabalhos já relatados sobre NCs de CdS estabilizados com polifosfato [14].

Vale ressaltar que embora bastante comum, o sistema cúbico não é o único sistema cristalino que pode estar presente em NCs de CdS. Dependendo do tipo de

estabilizante utilizado, o sistema hexagonal (wurtzita) também pode ser observado em suspensões de NCs de CdS [14].

A Figura 2.6 mostra a micrografia de MET de uma amostra de NCs de CdS, exibindo também o histograma que representa a distribuição dos NCs em relação às suas dimensões (em nm).

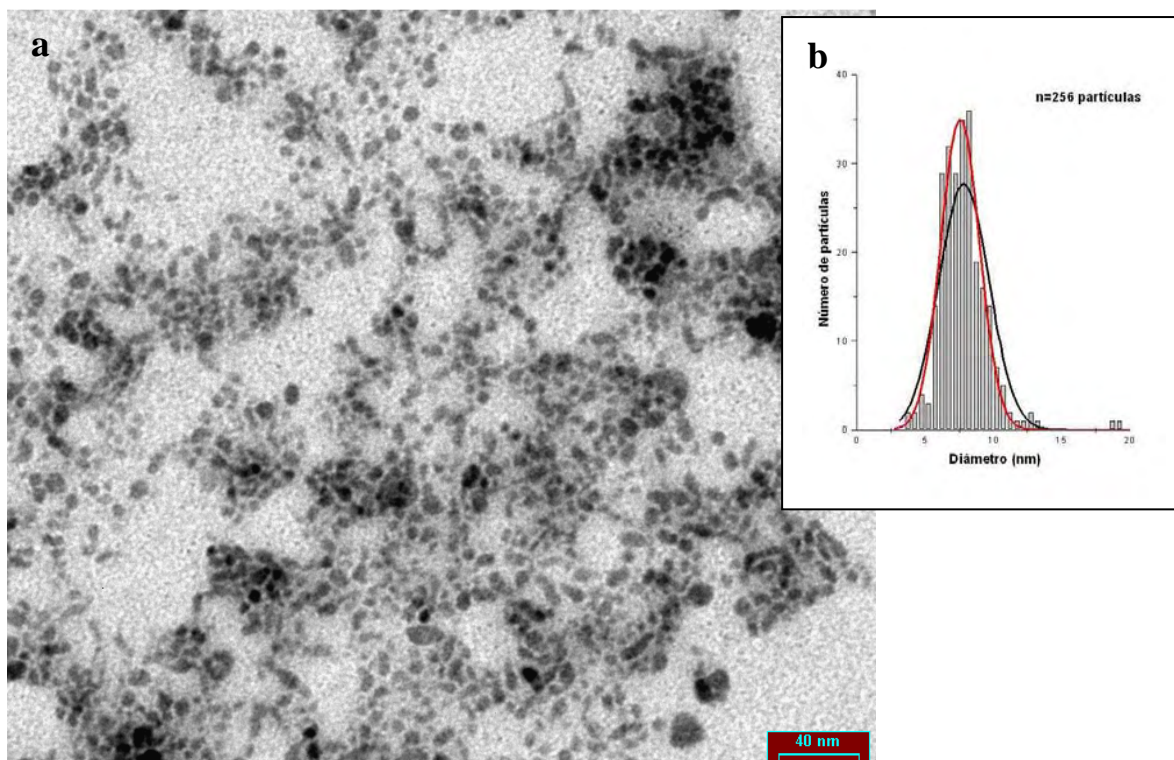


Figura 2. 6 – Micrografia de MET em campo claro de uma amostra de NCs de CdS (a barra de escala da micrografia equivale a 40nm) (a) . Histograma de distribuição de tamanho dos NCs na micrografia (b). Distribuição dos tamanhos segundo análise Gaussiana (curva vermelha) e *lognormal* (curva em negrito).

De acordo com a distribuição *lognormal* realizada sobre o histograma da Figura 2.5, as NCs analisadas na micrografia têm um diâmetro médio de $D = 7,8 \pm 1,8$ nm. Este valor encontra-se de em concordância com os resultados obtidos pelo DRX, assim como os resultados obtidos pelas análises espectroscópicas (descritos logo abaixo). A dispersão dos tamanhos possui um valor de 23,5%.

A distribuição *lognormal* é aplicada neste caso, pois leva em consideração as populações de partículas existentes com grandes diâmetros. Estas partículas, embora possam parecer estatisticamente desprezíveis, podem influenciar consideravelmente no processo de crescimento dos NCs, segundo o modelo de “envelhecimento de Ostwald”.

2.4.1.2 – Caracterização espectroscópica:

A Figura 2.7 mostra espectros de absorção e segunda derivada representativos dos sistemas CdS e CdS/Cd(OH)₂, sintetizados segundo metodologia relatada na Seção 2.2.1.

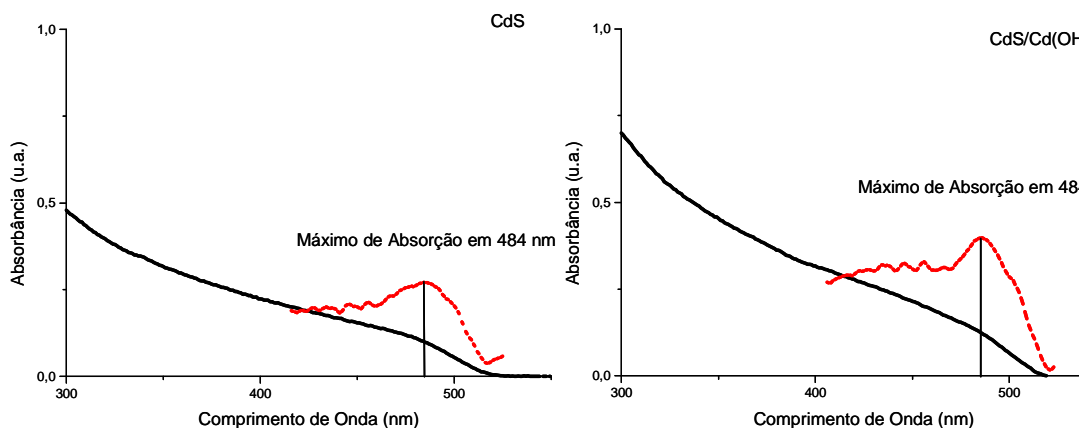


Figura 2. 7 – Espectros de Absorção com suas segundas derivadas (em vermelho), exibindo o primeiro máximo de absorção tanto para o CdS, quanto para o CdS/Cd(OH)₂

Como pode ser visto, comparando-se os espectros, o processo de passivação não alterou o tamanho dos NCs de CdS, o que pode ser comprovado pelos valores dos primeiros máximos de absorbância dos dois sistemas. O valor de 484 nm para o primeiro máximo de absorbância indica que as NCs obtidas possuem o seu *band gap* com o valor de aproximadamente 2,55 eV. Este valor é maior do que o *band gap* do semicondutor CdS em dimensões macroscópicas (*bulk*), cujo valor é de 2,50 eV [17]. A diferença entre os “gaps” dos NCs e do *bulk* é de apenas 0,05 eV, indicando que os NCs encontram-se em regime de confinamento quântico fraco [19].

Como também pode ser visto nos espectros na Figura 2.7, as bandas de absorção das amostras analisadas apresentam-se consideravelmente alargadas. Este alargamento deve-se principalmente à distribuição de tamanho dos NCs obtidas pelo processo de síntese, cujo resultado são partículas com diferentes diâmetros e conseqüentemente, diferenças de alguns décimos nos valores energéticos do *band gap* entre si.

A Figura 2.8 mostra os espectros de excitação e emissão de uma suspensão de NCs de CdS/Cd(OH)₂, cujo tamanho médio é 8,5 nm.

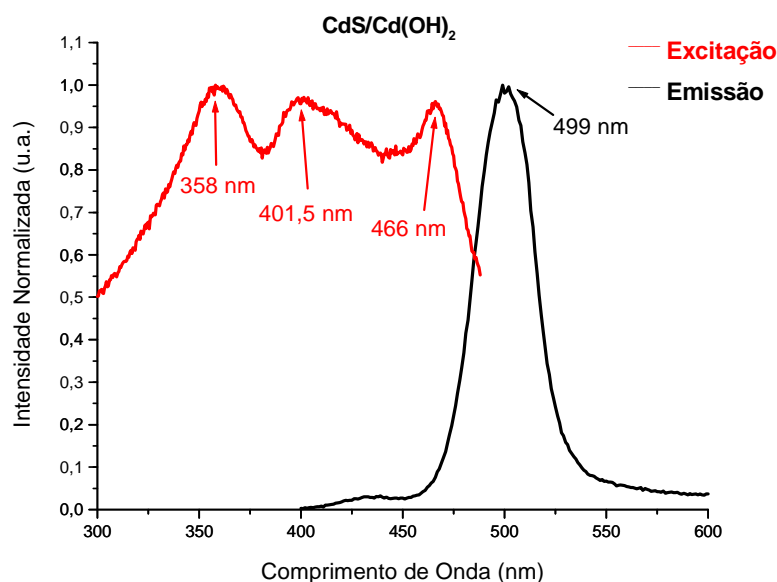


Figura 2. 8 – Espectros de excitação e emissão de uma suspensão de NCs de CdS/Cd(OH)₂.

Como pode ser observado no espectro acima, a emissão dos NCs sintetizados, apresenta um máximo em $\lambda=499$ nm, o que corresponde a emissão na região visível do espectro eletromagnético. Spanhel e colaboradores [11] reportaram o valor do pH inicial no processo de síntese dos NCs de CdS como fator determinante para o comprimento de onda de emissão de suspensões de CdS/Cd(OH)₂.

O valor de pH inicial igual a 8,5 que foi utilizado nos experimentos descritos, tende a resultar em suspensões de NCs com banda de emissão centralizada em torno de 500 nm. Valores altos de pH inicial (entre 8.8 e 9.2) tendem a produzir NCs cuja emissão tende para valores energéticos maiores. Isto ocorre devido ao fato de que para valores de pH inicial altos, os NCs obtidos apresentam diâmetro médio menor (em torno de 4 nm [11]), o que significa que os mesmos encontram-se em regime de confinamento forte, deslocando suas emissões para regiões de energia mais elevadas. Isto é importante pois possibilita a aplicação desses NCs como marcadores biológicos, como será discutido nos Capítulos 5 e 6, pois os fótons emitidos pelos cristais não possuem energia suficiente para gerar danos nos sistemas biológicos estudados.

O espectro de excitação mostra uma banda estruturada com três máximos que se estende de 300 à 480 nm. Pode-se inferir que cada máximo de excitação está correlacionado com uma banda de condução dos NCs de CdS/Cd(OH)₂. Cada uma atua no processo de recombinação excitônica, de forma equivalente, dos NCs, visto que o comprimento de onda referente a cada pico, corresponde ao máximo observado em $\lambda = 499$ nm.

O que se sugere (Figura 2.9), observando-se o espectro de excitação da suspensão, é que os NCs obtidos possuem uma estrutura de eletrônica formada por três bandas de condução, localizadas em 2,66; 3,08 e 3,46 eV. Assim, sugere-se que o processo de decaimento das transições excitônicas ocorre da seguinte forma: as bandas de maior energia possuem um decaimento não radiativo para a banda menos energética, sendo esta a única a possuir um decaimento radiativo para a banda de valência, participando efetivamente no processo de fotoluminescência.

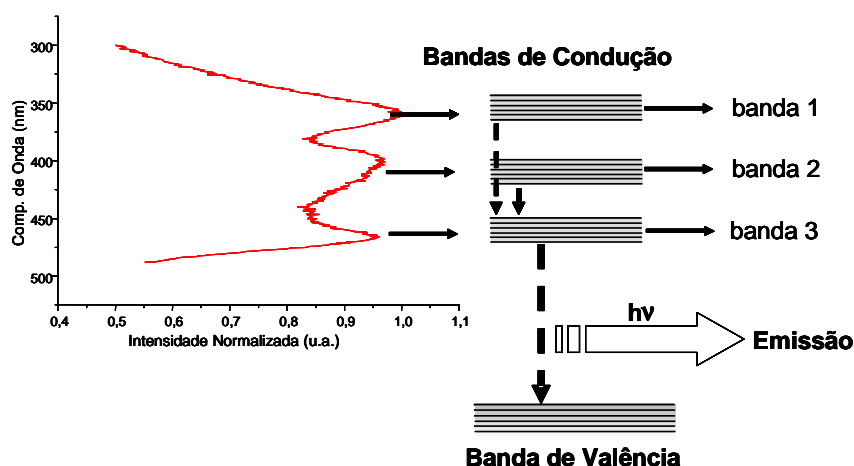


Figura 2. 9 – Possível mecanismo de decaimento radiativo dos NCs, corroborado pela presença das três bandas existentes no respectivo espectro de excitação.

Em um experimento visando a averiguação da fotoestabilidade dos NCs sob excitação por longos períodos de tempo, visando futuras aplicações biológicas, uma suspensão recém preparada foi irradiada em $\lambda=337$ nm continuamente durante uma hora. Observou-se que o máximo de emissão permaneceu constante, o que evidencia a fotoestabilidade dos NCs nessas condições.

2.4.2 – Estudo da influência da concentração do polifosfato na síntese de NCs de CdS:

A Figura 2.10 mostra os espectros de absorção eletrônica de cinco suspensões de NCs de CdS obtidas com diferentes concentrações do estabilizante polifosfato.

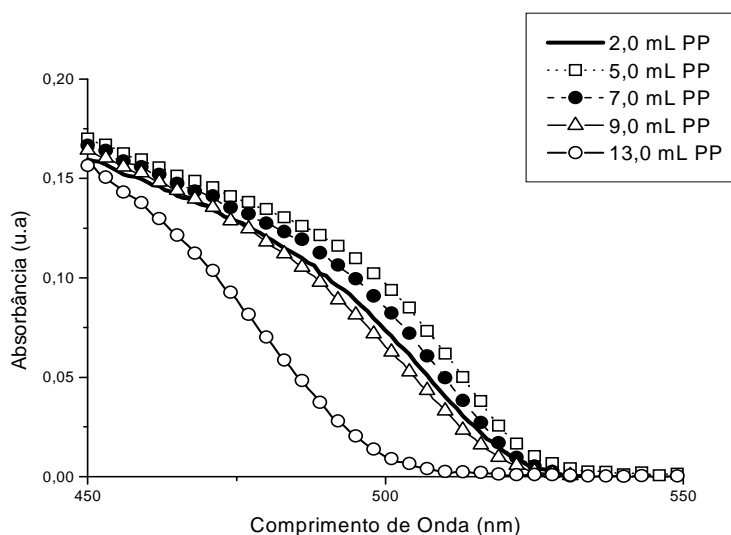


Figura 2. 10 – Espectros de absorção eletrônica de suspensões de NCs de CdS obtidas com diferentes concentrações de polifosfato.

Como pode ser observado, há uma pequena variação entre as posições das bandas de absorção das suspensões obtidas com diferentes concentrações do PP. Estes deslocamentos podem estar correlacionados à variação do tamanho médio dos NCs sintetizados, ocasionada pelas taxas de nucleação dos sistemas que são modificadas pela maior ou menor presença do agente estabilizante. Este tipo de fenômeno, o qual um parâmetro de síntese interfere diretamente no tamanho final dos NCs sintetizados, já foi relatado para o caso da variação do pH inicial das suspensões e da razão entre os íons formadores do semicondutor dos NCs [11] e para outro estabilizante como o 1-tioglicerol [19]. Vale ressaltar que nos espectros acima, as amostras preparadas com 9,0 e 13,0 mL de solução 0,0051g/mL de PP não apresentam deslocamento de suas bandas de absorção para regiões de alta energia, mas sim um processo de alargamento da banda, sugerindo um aumento na dispersão dos tamanhos dos NCs, o que pode erroneamente induzir a idéia de que estas bandas estão se deslocando para regiões mais energéticas.

As Figuras 2.11 a 2.15 mostram as micrografias obtidas para suspensões com diferentes concentrações de PP.

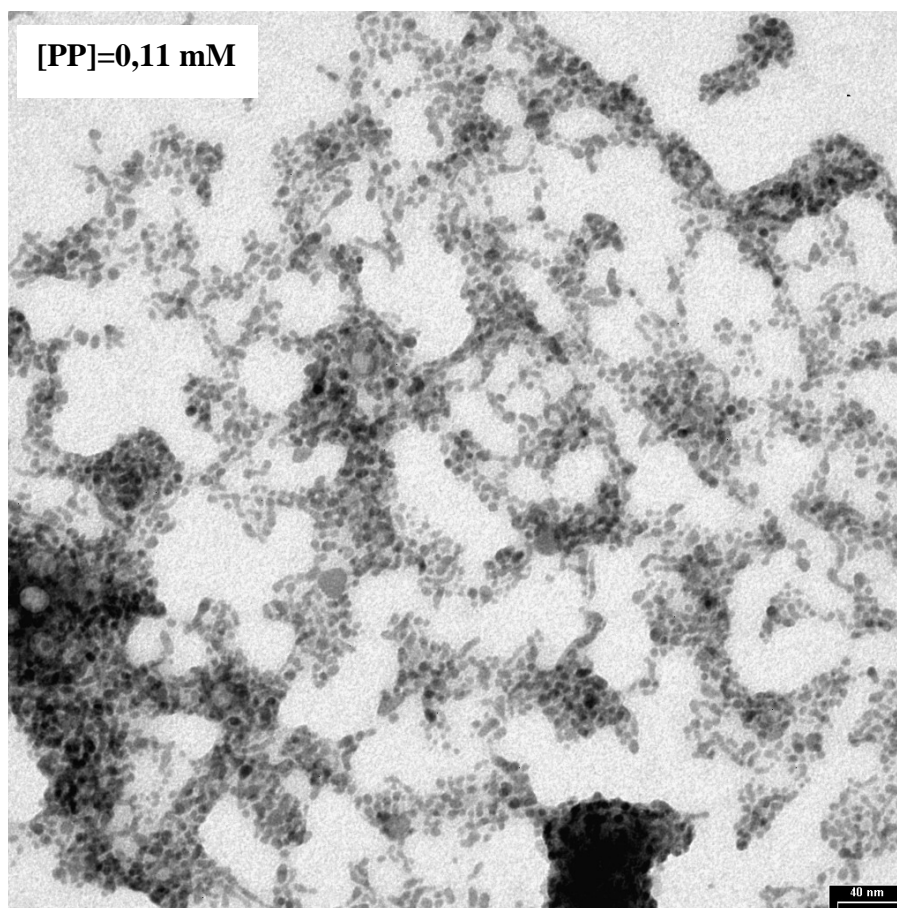


Figura 2.11 - Micrografia de amostra de NCs de CdS, sintetizadas com 0,11mM da solução de PP. (a barra de escala das micrografias equivale a 40nm).

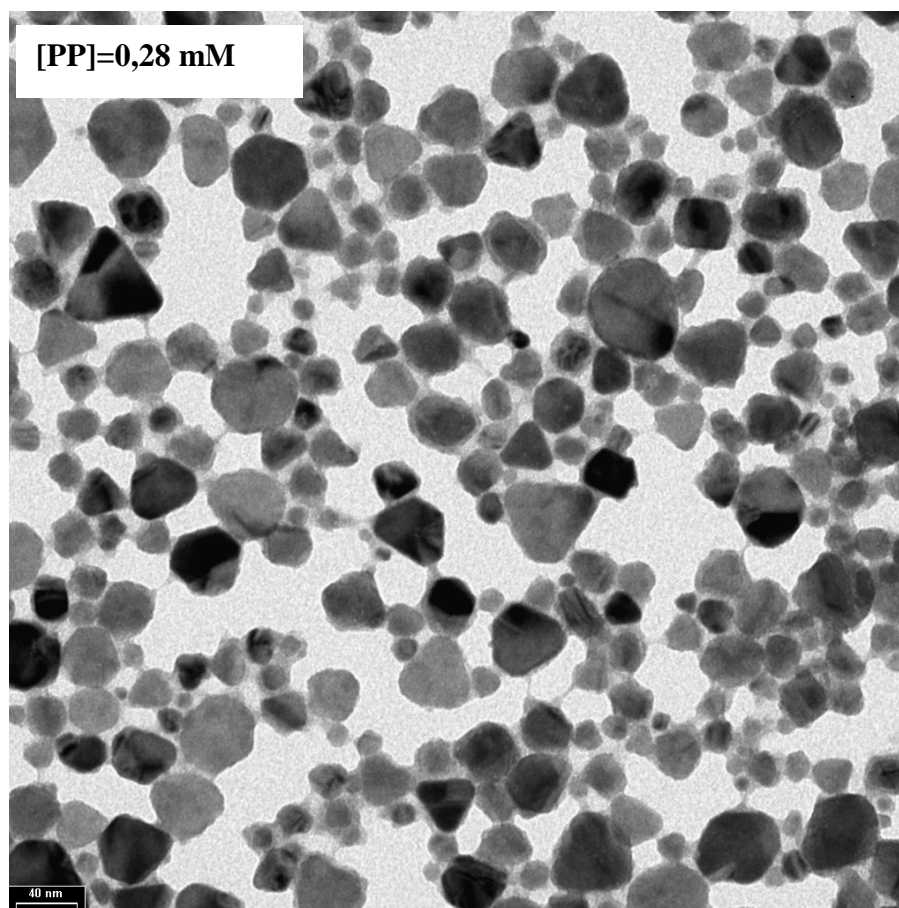


Figura 2.12 - Micrografia de amostra de NCs de CdS, sintetizadas com 0,28 mM da solução de PP. (a barra de escala das micrografias equivale a 40nm).

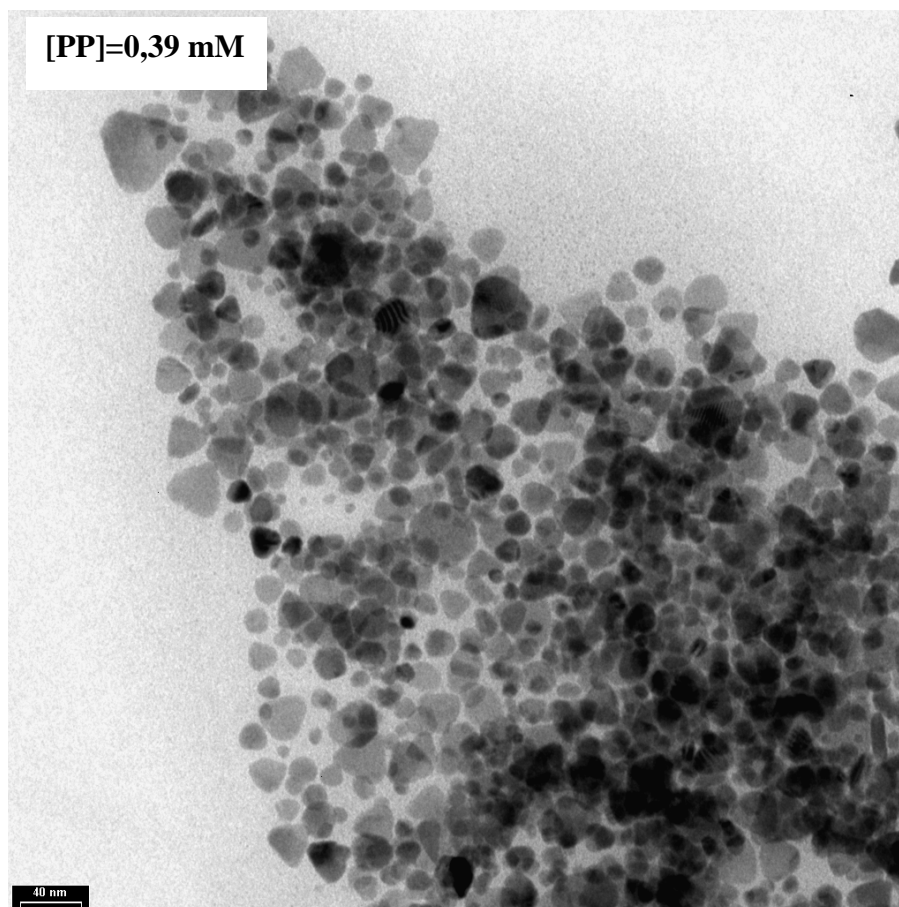


Figura 2.13 - Micrografia de amostra de NCs de CdS, sintetizadas com 0,39 mM da solução de PP. (a barra de escala das micrografias equivale a 40nm).

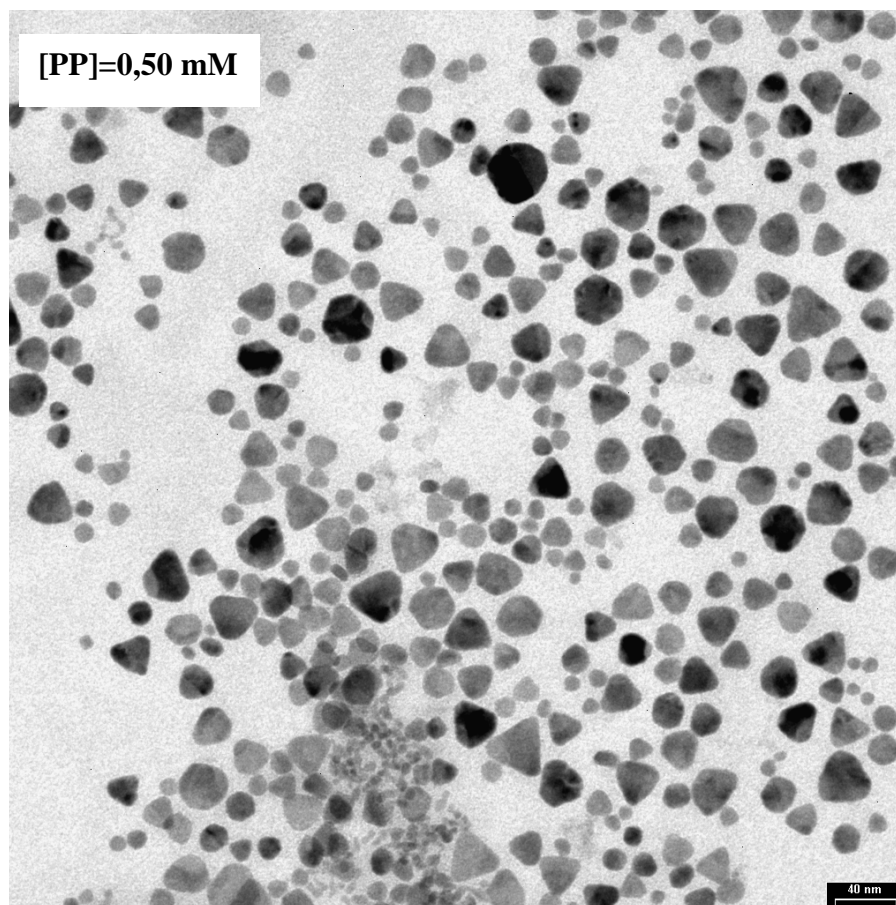


Figura 2.14 - Micrografia de amostra de NCs de CdS, sintetizadas com 0,50 mM da solução de PP. (a barra de escala das micrografias equivale a 40nm).

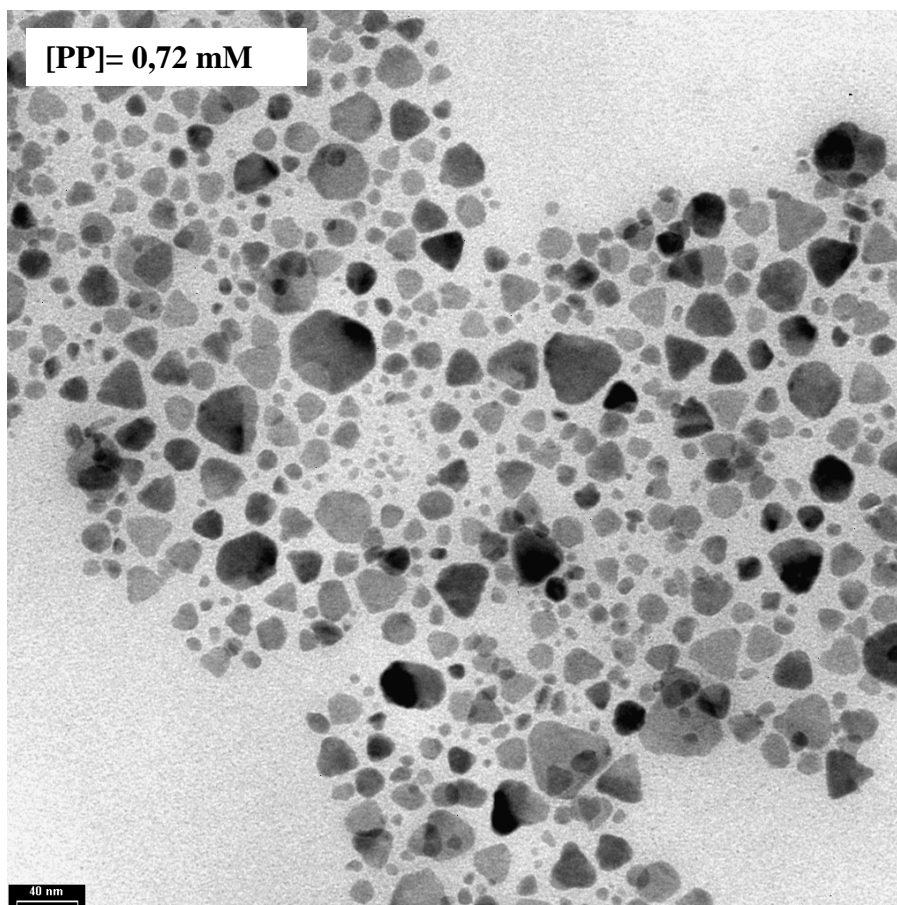


Figura 2. 15 – Micrografia de amostra de NCs de CdS, sintetizadas com 0,72 mM da solução de PP. (a barra de escala das micrografias equivale a 40nm).

A Tabela 2.2 exibe o tamanho médio e a dispersão de tamanho dos NCs para as micrografias ilustradas nas Figuras 2.11 e 2.12.

Tabela 2.2 – Dados relativos às micrografias exibidas nas Figuras 2.11 e 2.12.

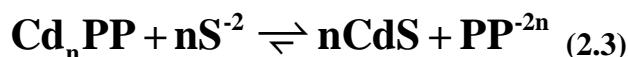
<i>Razão Cd/P</i>	<i>Diâmetro(nm)</i>	<i>Dispersão de tamanho (%)</i>
0,25	7,8	23,50
0,10	27,0	43,83
0,07	20,8	38,94
0,06	20,6	36,47
0,04	23,0	37,83

Como pode ser visto pelos resultados ilustrados acima, o efeito da concentração de PP na síntese dos NCs é aparentemente não-linear, visto que as variações dos

tamanhos médios e de suas dispersões não seguem um comportamento crescente ou decrescente, para os experimentos realizados. Porém, a importância da participação do estabilizante PP na formação de uma suspensão de NCs com distribuição homogênea de tamanhos, dentro das condições experimentais utilizadas, foi aqui comprovada.

A seguinte explicação é proposta para as observações feitas sobre este experimento:

- Há um equilíbrio nas interações entre as cadeias de PP e os íons Cd^{+2} , antes da adição do H_2S ao meio, exemplificado na Equação 2.1.
- No momento da adição do H_2S no meio, este equilíbrio sofre forte interferência da presença dos íon S^{-2} , que começam a competir com os poliânions de PP pela interação com os íons Cd^{+2} (Equação 2.3).



- O equilíbrio mostrado na equação acima mantém-se deslocado para a esquerda, quando há uma elevação na quantidade de PP presente. Isto ocorre, pois com uma maior quantidade de PP no meio, há um aumento na repulsão eletrostática entre as cadeias, resultando em uma expansão do sistema supramolecular formado entre as cadeias de PP interagindo com os íons Cd^{+2} . Esta expansão resulta em uma maior barreira estérica e eletrostática dificultando a complexação dos íons S^{-2} com os íons Cd^{+2} , acarretando um aumento no tempo de nucleação. Isto leva à formação lenta de centros de cristalização dos NCs, aumentando a dispersão final dos tamanhos das partículas formadas [20].

2.5 – Referências:

1. Masala, O., e Seshadri, R. *Annu. Rev. Mater. Res.* 34 (2004) 41.
2. Pillai, V., Kumar, P., Hou, M. J., Ayyub, P., e Shah, D. O. *Adv. In Coll. and Interf. Sci.* 55 (1995) 241.
3. Chen, D., e Wu, S. *Chem. Mater.* 12 (2000) 1354.
4. Pickett, N. L., Lawson, S., Thomas, W. G., Riddell, F. G., Foster, D. F., Cole-Hamilton, D. J., e Fryer, J. R. *J. Mater. Chem.* 8 (1998) 2769.
5. Menezes, F. D., Brasil Jr., A. G., Moreira, W. L., Barbosa, L. C., Cesar, C. L., Ferreira, R. de C., de Farias, P. M. A., e Santos, B. S. *Microelec. J.* 36 (2005) 989.
6. Penner, R. M. *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 78.
7. Eychmüller, A. *J. Phys. Chem. B.* 104 (2000) 6514.
8. Baral, S., Fojtik, A., Weller, H., e Henglein, A. *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 375.
9. Weller, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32 (1993) 41.
10. Alfassi, Z., Bahnemann, D., Henglein, A. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 4656.
11. Spanhel, L., Haase, M., Weller, H., e Henglein, A. *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5649.
12. Santos, B. S. *Tese de Doutorado*. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2002.
13. Hines, M. A., Guyot-Sionnest, P. *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 468.
14. Vossmeier, T., Katsikas, L., Giersig, M., Popovic, I. G., Diesner, K., Chemseddine, A., Eychmüller, A., e Weller, H. *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 7665.
15. Lutterotti L., Matthies S., Wenk, H. R. *Proc. of the Twelfth International Conference on Textures of Materials (ICOTOM-12)*. 1 (1999) 1599.
16. http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm. Acessado em 20/04/06.
17. <http://www.semiconductors.co.uk>. Acessado em 10/06/06.
18. Gaponenko, S. V. “Optical properties of semiconductor nanocrystals”. Cambridge, Cambridge University Press, 1998.
19. Zhang, Z. H., Chin, W. S., Vittal, J. J. *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 18569.
20. Schmid, G (Ed.). *Nanoparticles From Theory to Application*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.

Capítulo 3 – Síntese e Caracterização das suspensões coloidais de CdTe:

3.1 Introdução

Diferentemente dos nanocristais de CdS, descritos no Capítulo 2, cujos primeiros estudos datam da década de 80 [1-3], a síntese de nanocristais de telureto de cádmio (CdTe) por via coloidal só começou a ser reportada na literatura por volta da década de 90 [4,5,11]. Isto se deveu principalmente à dificuldade de obtenção de nanopartículas de CdTe com boa estabilidade coloidal e fotoluminescência com intensidade apreciável para fins de aplicações.

O principal fator que dificulta a preparação dos nanocristais de CdTe é a obtenção de fontes estáveis de íons Te^{-2} . Isto se deve à reatividade do metal telúrio ao oxigênio da atmosfera o qual forma rapidamente seu respectivo óxido TeO que, por sua vez, dificulta sua redução à forma Te^{-2} . Assim, todas as rotas de obtenção do íon Te^{-2} utilizadas até hoje utilizam sistemas com atmosfera inerte [7-9], como forma de evitar a oxidação do íon obtido. Além disso, algumas dessas rotas utilizam precursores do íon Te^{-2} perigosos, cujo manuseio incorreto pode levar a acidentes graves. Como exemplo, tem-se o sal Al_2Te_3 que quando posto para reagir com ácido sulfúrico produz o hidreto de telúrio (H_2Te), que pode ser então borbulhado em uma solução contendo o precursor metálico divalente (Cd^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , etc.) para a formação do semiconductor desejado [6].

Além disso, uma das vias de síntese mais utilizadas atualmente baseia-se na obtenção dos nanocristais luminescentes de CdTe em meio orgânico, utilizando os reagentes trioctilfosfina (TOP) e trioctilfosfinóxido (TOPO) [10,11]. Estes reagentes são utilizados para a criação de ambientes micelares inversos para a formação dos nanocristais. Isto dificulta consideravelmente sua utilização em aplicações biológicas, pois o meio aquoso diminui consideravelmente a estabilidade dos NCs obtidos em meio orgânico. Por fim, o fator crucial que dificulta a utilização destes métodos de síntese de NCs de CdTe por vários laboratórios de pesquisa é o alto custo envolvido para a aquisição dos reagentes utilizados no processo de síntese.

Felizmente, novos processos de redução de Te modificados de métodos descritos na literatura [6-8,12] (Seção 3.2), possibilitaram a síntese coloidal de NCs de CdTe com alta luminescência diretamente em meio aquoso, com um custo bem mais baixo do que os processos citados no parágrafo anterior. O processo mais utilizado neste caso é o que utiliza o borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor do Te^0 e moléculas contendo o grupo tiol, como o ácido mercaptoacético, por exemplo, como agentes estabilizantes dos NCs sintetizados.

Outra vantagem na obtenção dos nanocristais de CdTe por estas vias é a possibilidade de se aplicar o método de precipitação seletiva, não somente separando populações de nanopartículas com tamanhos médios diferentes, mas também purificando os resíduos e diminuindo a dispersão de tamanhos. A menor dispersão de tamanhos resulta em espectros de emissão com larguras de bandas mais estreitas [6].

3.1.1 – Tióis: ótimos estabilizantes para meio aquoso.

A utilização de pequenas moléculas orgânicas contendo grupamentos SH vem sendo reportada crescentemente na literatura como ótimos estabilizantes para NCs de CdTe sintetizados em meio aquoso. Isto se deve a algumas propriedades interessantes dos tióis. O pKa dos grupamentos SH destas moléculas, onde se incluem o ácido mercaptoacético e o mercaptoetanol dentre tantas outras, encontra-se normalmente acima de 8,0 (Tabela 3.1), valor no qual o pH do meio tende a gerar NCs com diâmetros pequenos e com baixa dispersão de tamanho. Além disso, os grupamentos resultantes da desprotonação das sulfidrilas possuem uma alta afinidade por íons como Cd^{+2} e Zn^{+2} , formadores de semicondutores do tipo II-VI. Isto garante uma baixa dissociação da camada de estabilizante formada nas superfícies dos NCs.

Tabela 3.1 – pKa de alguns tiois utilizados como estabilizantes na síntese de NCs de semicondutores do tipo II-VI.

<i>Estabilizante</i>	<i>pK_{SH}</i>
Mercaptoetilamina (HSCH ₂ CH ₂ NH ₂) (MEA)	8.27 ^a
Ácido Mercaptoacético (HSCH ₂ COOH) (AMA)	10.05 ^b
Ácido 3-Mercaptopropiônico (HSCH ₂ CH ₂ COOH) (AMP)	10.20 ^b
2-Mercaptoetanol (HSCH ₂ CH ₂ OH) (MOH)	9.43 ^a

^a Nosaka e colaboradores [13].^b Zhang e colaboradores [8].

Além disso, sabe-se que suspensões de NCs produzidas com um pequeno excesso de tiois, em condições alcalinas, produzem a hidrólise parcial destes grupamentos, resultando na incorporação dos átomos de enxofre na interface dos NCs com o meio. No caso de NCs de CdTe, por exemplo, esta hidrólise parcial é capaz de contribuir significativamente no aumento da luminescência dos cristais, visto que uma camada de CdS forma-se na superfície dos NCs [12] e como o *band gap* do CdS é maior do que o *band gap* do CdTe ($E_{gCdS} = 2,50$ eV e $E_{gCdTe} = 1,47$ eV [14]), este processo pode ser interpretado como uma passivação dos NCs.

3.2 – Procedimentos experimentais:

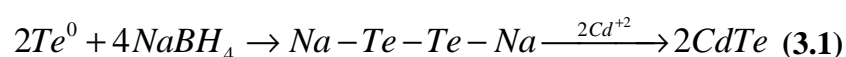
3.2.1 – Reagentes utilizados:

Em todos os experimentos descritos nesta seção, utilizaram-se os seguintes reagentes:

- Telúrio metálico em pó 99% (Across);
- Ácido mercaptoacético (AMA) 97% (Sigma/Aldrich);
- Borohidreto de sódio 98% (Sigma/Aldrich);
- Argônio (White Martins);
- Nitrogênio (White Martins);
- Água ultra-pura deionizada.

3.2.2 – Processos de redução do telúrio:

Para a síntese dos NCs luminescentes de CdTe (Equação 3.1), alguns processos de redução do telúrio metálico, em meio aquoso, foram testados para a obtenção da fonte de Te^{-2} :



Isto se fez necessário para a escolha, dentre os métodos testados, daquele que renderia uma fonte de íons Te^{-2} de forma mais prática e com maior rendimento. Vale ressaltar que várias são as metodologias existentes para a redução do telúrio em meio orgânico. Entretanto, o enfoque deste trabalho reside na redução em meio aquoso, como uma forma de simplificar o processo de síntese dos NCs de CdTe. As metodologias apresentadas a seguir são todas adaptações de processos descritos na literatura [6-8,12]. Porém, cada processo sofreu pequenas modificações na tentativa de um maior rendimento na obtenção dos íons Te^{-2} .

3.2.2.1 - Método de Redução 1: Processo de redução por congelamento (adaptado de Zhang e colaboradores [6]):

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionou-se aproximadamente 10 mL de água, 0,0128 g (0,1 mmol) de Te^0 em pó e colocou-se o sistema sob agitação em banho de gelo. Quando a temperatura do sistema atingiu 4°C adicionou-se o agente redutor borohidreto de sódio (NaBH_4) (0,2 mmol). Manteve-se o sistema sob agitação e banho de gelo durante 30 minutos e, em seguida, congelou-se a mistura durante 24 horas. Após o congelamento, manteve-se a mistura sob refrigeração a 4°C para que este descongelasse de forma lenta. Toda a reação ocorreu em atmosfera ambiente. Após o descongelamento total, pode-se observar uma solução violeta formada, correspondendo ao composto ditelureto de sódio (Na-Te-Te-Na) [5].

3.2.2.2 – Método de Redução 2: Processo de redução por titulação de ácido:

Em um balão de fundo redondo de 15mL, pesou-se 0,0032g (0,025 mmol) de Te^0 em pó. Em seguida, adicionou-se ao balão aproximadamente 0,01g (0,26 mmol) de NaBH_4 . Em seguida, adicionou-se cerca de 500 μL de uma solução de NaOH 1M ao balão e homogeneizou-se a mistura. Por fim, gotejou-se na mistura, sob agitação, uma solução de ácido perclórico (HClO_4) 0,1M, até resultar em uma solução violeta, correspondendo à formação do composto ditelureto de sódio.

3.2.2.3 – Método de Redução 3: Processo de redução por aquecimento[5]:

Em um balão de fundo redondo de 100mL, adicionou-se aproximadamente 5mL de água, 0,0128g (0,1 mmol) de Te^0 em pó e colocou-se o sistema sob agitação e aquecimento. Vedou-se o balão com a ajuda de um *septum* de borracha. Todo o processo foi realizado sob atmosfera inerte, utilizando-se fluxo de Argônio. Quando a temperatura do sistema alcançou o valor de 80°C, adicionou-se ao balão, com a ajuda de uma seringa, o agente redutor NaBH_4 (0,2 mmol) recém dissolvido em aproximadamente 2mL de água. Após uma hora de agitação e ainda sob aquecimento a

80°C, pode-se observar a formação de uma solução violeta, correspondendo ao composto ditelureto de sódio.

3.2.2.4 – Método de Redução 4: Processo de redução por aquecimento, em meio alcalino e fotoassistida (adaptação do Método de Redução 3):

Em um balão de fundo redondo de 100mL, adicionou-se aproximadamente 5mL de água, 0,0064g (0,05 mmol) de Te^0 em pó, 350 μL de uma solução 2M de NaOH. Vedou-se o balão com a ajuda de um *septum* de borracha. Todo o processo foi realizado sob atmosfera inerte, utilizando-se um fluxo de Nitrogênio. Colocou-se o sistema sob agitação e aquecimento. Quando a temperatura do sistema alcançou o valor de 80°C, manteve-se o sistema a esta temperatura por 20 minutos. Em seguida, ainda sob aquecimento, adicionou-se ao balão, com a ajuda de uma seringa, o agente redutor NaBH_4 (0,1 mmol) dissolvido em aproximadamente 2mL de água. Neste momento, irradiou-se o sistema com uma lâmpada de tungstênio de 100 Watts e manteve-se a irradiação durante o restante do processo. Uma hora após a adição do agente redutor, observou-se a formação de uma solução violeta escura, correspondente à formação do composto ditelureto de sódio (Figura 3.1).



Figura 3.1- Coloração do composto Na-Te-Te-Na(aq), formado pela redução do Te^0 .

3.3 – Síntese de NCs de CdTe:

Como será abordado na Seção 3.3.1, todos os métodos de redução do telúrio tiveram êxito. Entretanto, apenas os métodos 3 e 4 resultaram em um rendimento capaz de prover reprodutibilidade nas sínteses dos NCs de CdTe. Para estes métodos, descreve-se a seguir as metodologias de síntese de NCs utilizadas.

3.3.1 – Método de Síntese 1.

Esta metodologia utiliza o método 3 de redução do telúrio (Seção 3.2.2.3).

Em um balão de fundo redondo de 100mL, adicionou-se 0,2 mmol de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (20 mL de uma solução 0,01 M de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$). Em seguida, adicionou-se 20 mL de água e 1,2 mL de uma solução 4,9 % de AMA. Neste momento a solução tornou-se turva, devido à insolubilidade parcial do complexo formado entre o Cd^{+2} e o AMA. Elevou-se o pH da mistura até o valor de 11,5, tornando-se a solução límpida novamente e completou-se o volume da solução para 80mL. Esta solução é injetada no balão no qual reduziu-se o telúrio metálico, com o auxílio de uma seringa. Exatamente após a injeção da solução de Cd^{+2} -AMA no balão contendo Te^{-2} , pode-se observar uma mudança de coloração da solução no balão, para um tom castanho, indicando a formação dos NCs de CdTe (Figura 3.2). Manteve-se o sistema ainda sob agitação por aproximadamente 20 minutos, antes da retirada do *septum* deste. A razão final Cd/Te foi de 2/1.

3.3.2 – Método de Síntese 2.

Esta metodologia utiliza o método 4 de redução do telúrio (Seção 3.2.2.4).

Em um balão de fundo redondo de 100mL, adicionou-se 0,2 mmol de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (20 mL de uma solução 0,01 M de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$). Em seguida, adicionou-se 20 mL de água e 1,5 mL de uma solução 4,9 % de AMA. Neste momento a solução tornou-se turva, devido à insolubilidade parcial do complexo Cd^{+2} -AMA formado. Elevou-se o pH da mistura até o valor de 10,5, tornando-se a solução límpida novamente. Esta solução é injetada no balão no qual reduziu-se o telúrio metálico, com o auxílio de uma seringa. Exatamente após a injeção da solução de Cd^{+2} -AMA no balão contendo Te^{-2} , pode-se observar uma mudança de coloração da solução no balão, para um tom

castanho, indicando a formação dos NCs de CdTe (Figura 3.2). Manteve-se o sistema ainda sob agitação por aproximadamente 20 minutos, antes da retirada do *septum*. A razão final Cd/Te foi de 4/1.



Figura 3.2 – Suspensão de NCs de CdTe recém preparada, apresentando coloração castanha característica do semiconductor.

3.4 – Estudo do efeito da concentração de NCs nas propriedades espectroscópicas das suspensões obtidas:

Como será melhor discutido na Seção 3.5.4, observou-se que a concentração de NCs numa suspensão coloidal pode interferir consideravelmente no rendimento de sua fotoluminescência. Para a avaliação desta inferência, realizou-se a evolução espectroscópica (emissão e excitação eletrônica) de uma suspensão de NCs de CdTe obtida pelo Método 2 para diferentes concentrações.

Preparou-se suspensões de NCs, a partir da suspensão original, seguindo os fatores de diluição: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64. Em seguida, realizou-se a caracterização espectroscópica de cada suspensão preparada, quanto as suas bandas de emissão e excitação eletrônica, e comparou-se os resultados obtidos com os dados referentes à suspensão original.

3.5 – Precipitação seletiva das suspensões de NCs preparadas.

Com o intuito de se isolar populações de NCs com uma distribuição de tamanhos homogênea, realizou-se o processo de precipitação seletiva [6,15] dos NCs nas suspensões recém preparadas. Neste processo utiliza-se um não solvente, neste estudo o isopropanol [6], para desestabilizar parcialmente a suspensão coloidal de NCs, permitindo que NCs com tamanhos médios próximos sejam separados dos demais a partir de centrifugação da suspensão. Em seguida, as partículas precipitadas podem ser resuspensas em água, resultando em uma suspensão de NCs com dispersão de tamanho reduzida.

O procedimento empregado neste processo foi o seguinte:

- Coletou-se 20 mL de uma suspensão de NCs luminescentes de CdTe recém preparada;
- Gotejou-se, sob agitação constante, isopropanol até a turvação da suspensão;
- Em seguida, centrifugou-se a suspensão, a 3500 rpm por 10 minutos;
- Retirou-se o sobrenadante e suspendeu-se o precipitado em 10 mL de água;
- Repetiu-se este procedimento até que nenhum precipitado fosse mais formado após centrifugação.

3.6 – Caracterização espectroscópica e estrutural dos NCs de CdTe:

As descrições das técnicas de caracterização, assim como as especificações dos equipamentos utilizados para as caracterizações dos NCs sintetizados são as mesmas descritas na Seção 2.3.3 do Capítulo 2.

Sucintamente, realizou-se a caracterização espectroscópica através de espectroscopia de absorção UV/Visível, para a verificação da qualidade da suspensão coloidal, assim como espectroscopia de emissão e excitação das suspensões de CdTe obtidas, para a verificação das propriedades ópticas dos sistemas. Realizaram-se também caracterizações estruturais, por meio de DRX de pó obtido por precipitação seletiva dos NCs e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de amostras das suspensões obtidas.

3.7 – Resultados e discussão:

3.7.1 – Processos de redução do telúrio:

Os resultados obtidos nos diferentes processos de redução do Te^0 mostraram que todas as metodologias foram capazes de gerar íons Te^{-2} a partir da utilização do borohidreto de sódio como agente redutor. Entretanto, apenas os Métodos de Redução 3 e 4 mostraram-se capazes de reduzir o telúrio metálico com um rendimento capaz de gerar reprodutibilidade na síntese dos NCs de CdTe. Os Métodos de Redução 1 e 2 resultaram na produção de uma grande quantidade de resíduo do agente redutor, que se agregava com a parte do telúrio ainda não reduzido, diminuindo o rendimento da produção de Te^{-2} e impedindo uma boa reprodutibilidade na síntese de NCs de CdTe. Utilizou-se o meio alcalino para a redução do Te^0 no Método de Redução 4 como um recurso para tornar o meio aprótico, aumentando a atividade do NaBH_4 no processo de redução do metal. Por fim, observando-se os resultados das tentativas de redução do telúrio no decorrer deste trabalho, constatou-se que as reduções realizadas na presença de luz ocorreram mais rapidamente e com um rendimento maior do que as reduções realizadas sob iluminação fraca. Esta observação, de que a luz catalisa de alguma forma o processo de redução, foi o que induziu a introdução da irradiação direta de luz durante o processo de redução, com a finalidade de melhorar o processo.

3.7.2 – Síntese de NCs de CdTe :

O Método 1 de síntese, embora satisfatório, ainda produziu uma pequena quantidade de resíduo da síntese, o que pode corresponder a parte do telúrio metálico que tenha se associado aos resíduos do agente redutor, precipitando como um aglomerado escuro no fundo do balão. Por outro lado, o Método 2 de síntese não exibiu nenhum resíduo visível, indicando fortemente que o rendimento da síntese de NCs foi maior do o obtido pelo Método 1.

Os métodos de síntese de NCs utilizados neste trabalho resultaram em suspensões estáveis, com uma fotoluminescência conservada por um tempo superior a 6 meses, quando armazenadas sob refrigeração na ausência de luz.

Observou-se que nos dois métodos empregados, a coloração das suspensões obtidas variou com o tempo quando os sistemas foram mantidos sob aquecimento. As suspensões se apresentaram inicialmente com coloração castanho escuro, que se tornou mais claro com o decorrer do aquecimento. Paralelamente, foi observado que a fotoluminescência das suspensões só começou a ser detectada após um certo intervalo de tempo (superior a quinze minutos) do aquecimento dos sistemas. Sugere-se que estes fenômenos devem estar correlacionados ao processo de hidrólise parcial dos grupos tióis das moléculas de AMA utilizadas como estabilizantes dos NCs. Com o pH alcalino das suspensões preparadas combinado com o aquecimento destas, parte das moléculas de AMA sofrem hidrólise, permitindo que o átomo de enxofre desprendido durante este processo reaja com íons Cd^{+2} presentes na superfície dos NCs, formando uma fina camada de CdS sobre estes. Esta camada atua passivando-os e permitindo que exibam uma fotoluminescência detectável. Esta justificativa é corroborada por observações prévias descritas na literatura [6,15] para sistemas de NCs de CdTe obtidos por métodos de síntese semelhantes. Com isto, tem-se um forte indício de que os NCs obtidos são de natureza heterogênea, sendo compostos de um núcleo de CdTe e uma “casca” de CdS.

3.7.3 - Caracterização estrutural dos NCs de CdTe:

A Figura 3.3 mostra um difratograma representativo de NCs de CdTe obtidas pelo Método 2 de síntese (Seção 3.3.2).

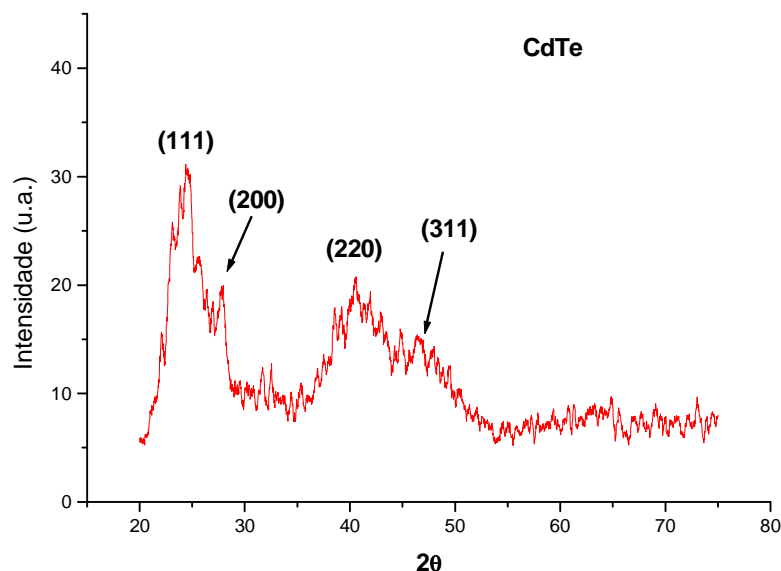


Figura 3.3 - Difratograma de raio-x de pó de uma amostra de NCs de CdTe.

A análise do difratograma acima revelou que o diâmetro médio dos NCs obtidos é $d=3,8$ nm, a partir de cálculo utilizando a equação de Scherrer (ver Seção 2.3 do Capítulo 2), o que se encontra em boa concordância com dados da literatura [9]. O sistema cristalino dos NCs é o cúbico (blenda de zinco), exibido pelos picos mais intensos do difratograma. Este dado também se encontra em concordância com a literatura [9,15]. Por fim, observa-se que o difratograma obtido não apresenta picos detectáveis correspondendo à presença de CdS, o que sugere que este semicondutor se apresenta em pequena quantidade nos NCs de CdTe.

Na Figura 3.4 pode-se observar uma micrografia de MET de campo claro de uma amostra de NCs de CdTe/CdS. Embora não se tenha uma boa resolução dos NCs presentes na micrografia de campo claro, a micrografia de campo escuro (Figura 3.5) revela a presença de inúmeras estruturas com planos cristalinos. Tendo em vista o tamanho médio de 3,8 nm dos NCs, calculado através do difratograma de raio-X, acredita-se que as pequenas estruturas cristalinas observadas sejam os NCs de

CdTe/CdS preparados. A resolução obtida nas micrografias não permitiu as medidas de tamanho médio dos NCs observados, assim como a dispersão destes NCs.

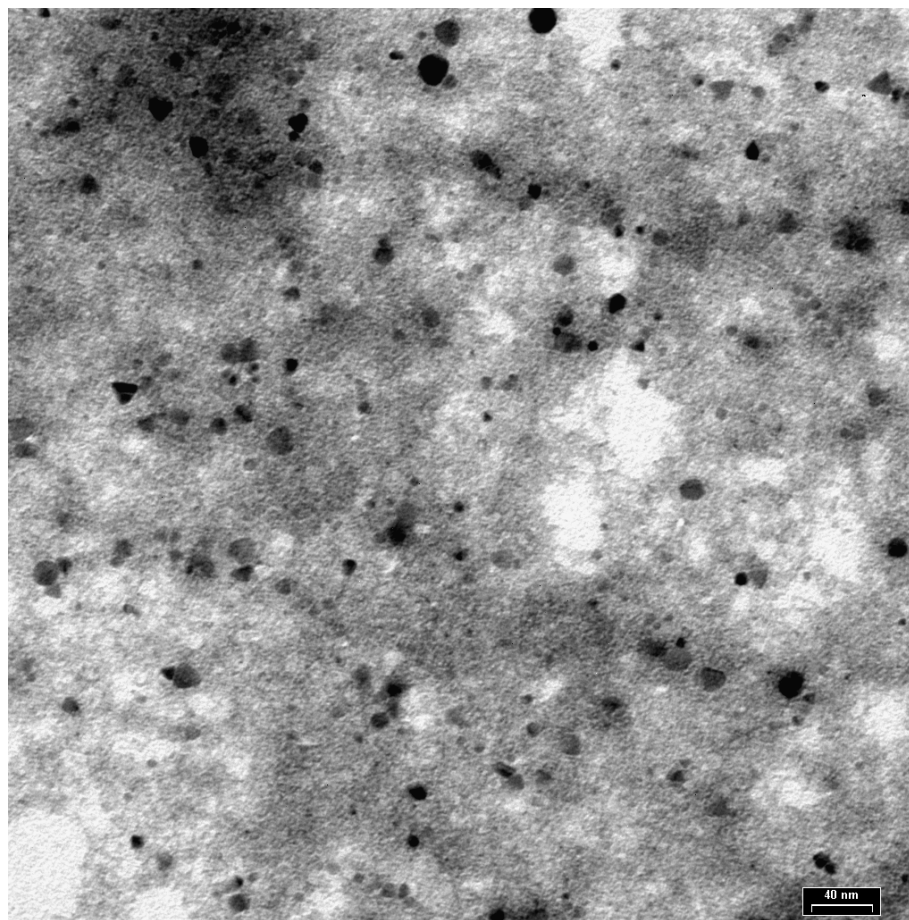


Figura 3.4 – Micrografia de MET em campo claro de uma amostra de NCs de CdTe/CdS. A barra de escala equivale a 40 nm.

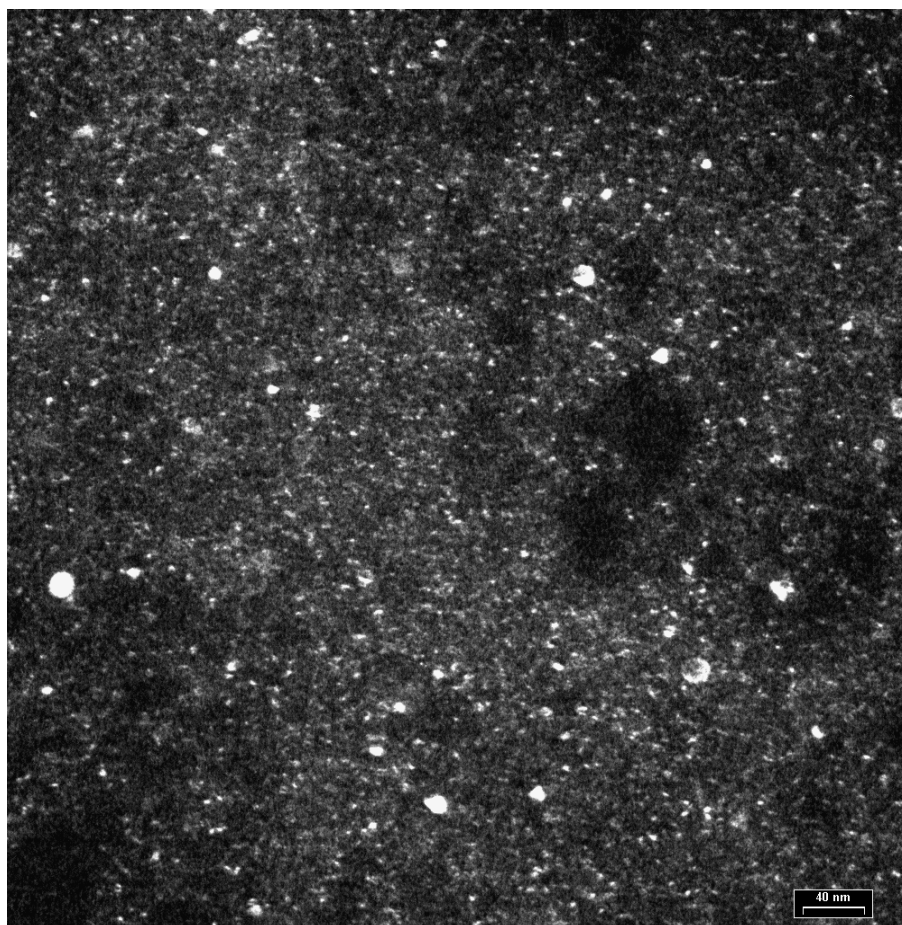


Figura 3.5 – Micrografia de MET em campo escuro, referente a Figura 3.4. A barra de escala equivale a 40 nm.

3.7.4 - Caracterização espectroscópica:

A Figura 3.6 exibe os espectros de absorbância, com suas respectivas segundas derivadas, obtidos pelas metodologias de síntese descritas na Seção 3.3.

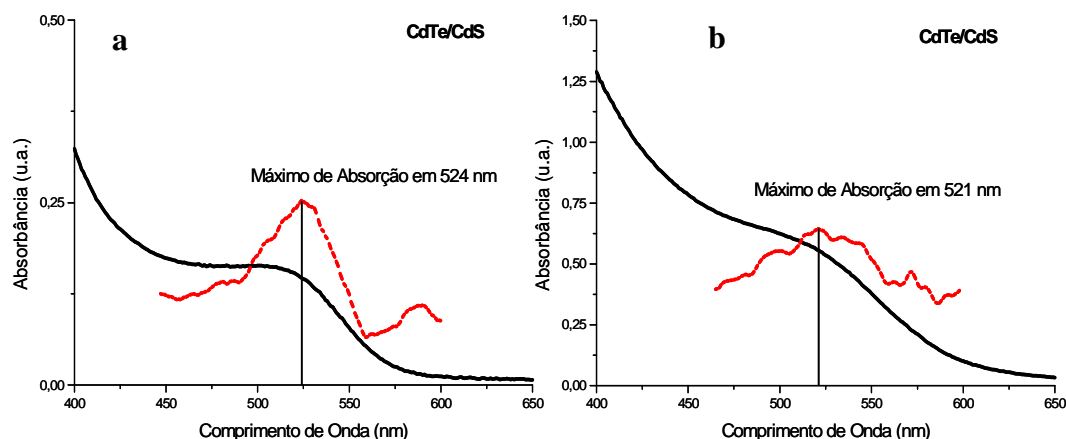


Figura 3.6 – Espectros de Absorção eletrônica de suspensões de NCs de CdTe obtidas pelo Método 1 (a) e Método 2 (b) de síntese de NCs.

Como se pode observar nos espectros acima, as suspensões de NCs de CdTe obtidas pelas metodologias de síntese empregadas evidenciam a primeira banda de absorção praticamente na mesma região espectral, com os máximos das bandas diferindo em apenas 3 nm. Os valores dos *band gaps* dos NCs relativos aos espectros acima são: $E_g = 2,36$ eV para os NCs relativos ao Método 1 de síntese e $E_g = 2,38$ para os NCs relativos ao Método 2 de síntese. Pode-se correlacionar os *band gaps* obtidos com os tamanhos médios dos NCs. Neste caso, os dados obtidos pela espectroscopia de absorção eletrônica indicam fortemente que os métodos de síntese empregados, com as condições iniciais descritas, produziram NCs com tamanhos médios muito próximos entre si. Entretanto, observa-se claramente uma diferença nas magnitudes das absorbâncias das amostras analisadas na Figura 3.5. Uma explicação plausível para este fato é que o Método 2 de síntese foi capaz de produzir uma maior quantidade de NCs do que o Método 1. Este fato é corroborado pelas observações feitas na Seção 3.7.2.

A Figura 3.7 exibe os espectros de emissão e excitação das suspensões de NCs obtidas pelos métodos de síntese descritos. Os espectros de emissão referem-se a uma excitação em 337 nm.

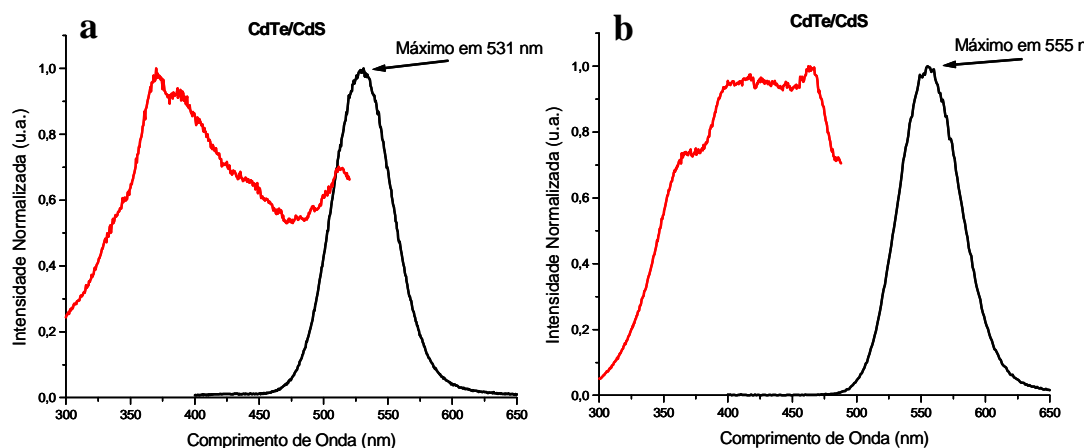


Figura 3.7 - Espectros de emissão e excitação (vermelho) eletrônica de suspensões de NCs de CdTe obtidas pelo Método 1 (a) e Método 2 (b) de síntese de NCs.

Os máximos de emissão das bandas exibidas nos espectros acima indicam que os NCs devem possuir tamanhos médios levemente diferentes entre si, o que justifica os máximos de emissões diferentes. Além disso, pode-se verificar nos espectros que, embora os NCs obtidos pelo Método 1 de síntese possuam um *band gap* menor do que os NCs obtidos pelo Método 2 (valores calculados a partir dos espectros de absorção eletrônica), estes apresentam uma banda de emissão em região de maior energia do que a outra suspensão analisada. Uma provável explicação para este fato é que os NCs obtidos pelo Método 2 de síntese possuem mais defeitos em sua estrutura cristalina, fazendo com que parte da energia liberada pela recombinação excitônica destes NCs seja dissipada nestes defeitos e a energia restante seja finalmente liberada na forma de fótons de menor energia.

Os espectros exibidos na Figura 3.7 mostram ainda que os espectros de excitação das duas amostras diferem claramente entre si, embora se tratem apenas de NCs com absorbâncias e emissões levemente diferentes. Como já dito anteriormente, supõe-se que o Método 2 de síntese produziu uma concentração maior de NCs do que o Método 1. Suspeitando-se da presença de algum tipo de interação entre os NCs, capaz de alterar os processos envolvidos na absorção e posterior emissão de fótons, prosseguiu-se com a avaliação das mudanças espectrais da suspensão obtida pelo Método 2.

3.7.5 - Estudo do efeito da concentração de NCs nas propriedades espectroscópicas das suspensões obtidas:

A Figuras 3.8 e 3.9 exibem a evolução dos espectros de emissão e excitação eletrônica, respectivamente, com a diluição da suspensão de NCs.

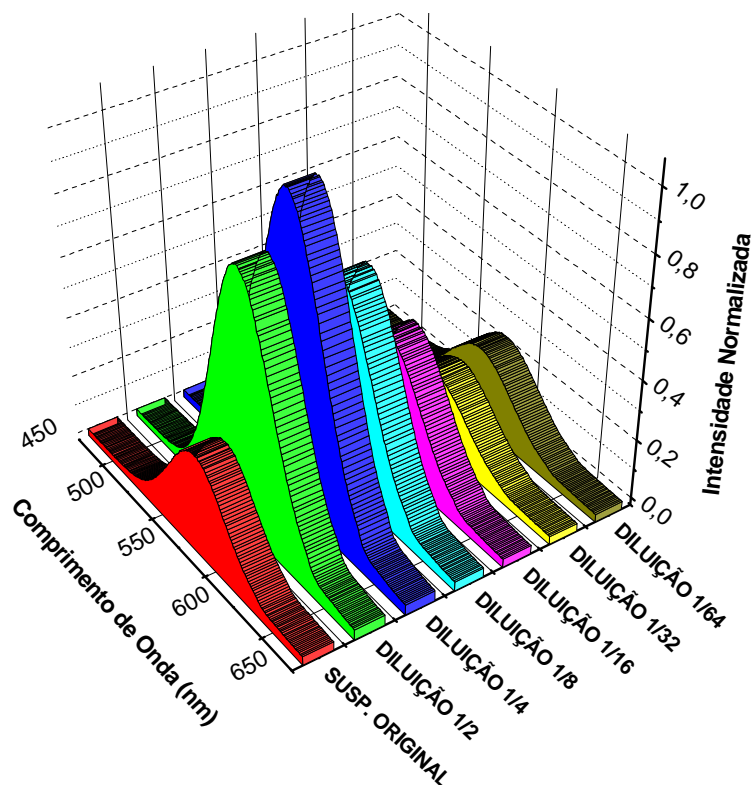


Figura 3.8 – Espectros de emissão referentes à diferentes diluições feitas em uma suspensão de NCs de CdTe obtidas pelo Método 2 de síntese.

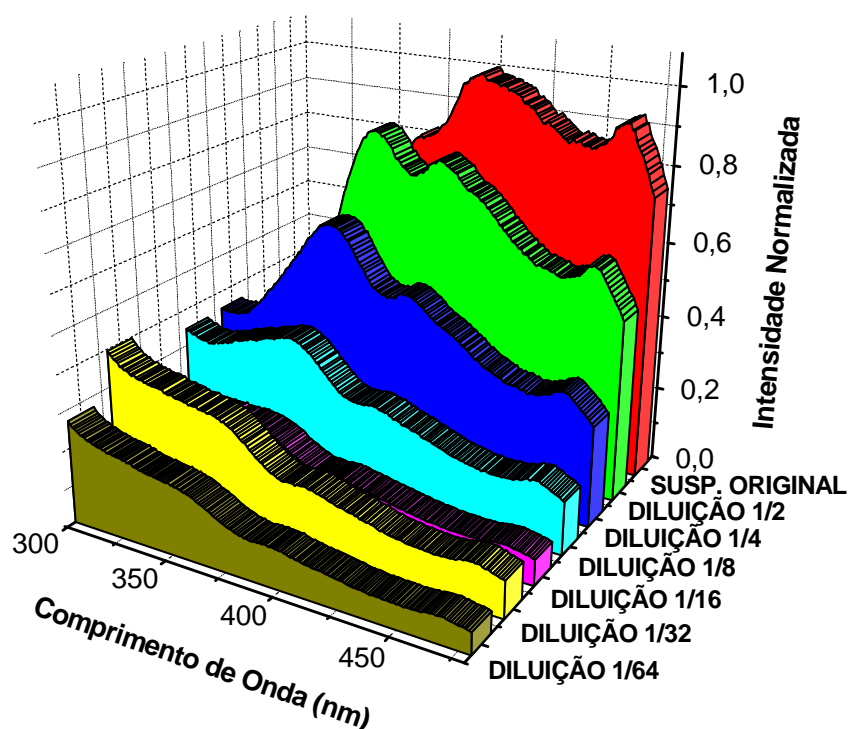


Figura 3.9 – Espectros de excitação das diferentes diluições feitas em uma suspensão de NCs de CdTe obtidas pelo Método 2 de síntese.

Como se pode observar, não há uma correlação linear entre as diluições realizadas e os respectivos espectros de emissão e excitação obtidos. Observa-se que a emissão inicialmente aumenta consideravelmente com o aumento das diluições, decrescendo após as diluições preparadas segundo os fatores 1/16, 1/32 e 1/64. As intensidades obtidas nos espectros de excitação aparentemente obedeceram a uma sequência decrescente de valores, com o aumento das diluições. Entretanto, as intensidades relativas dos máximos locais de excitação da amostra com concentração original mostraram-se diferentes dos máximos de excitação das amostras diluídas. Estas observações corroboram ainda mais com a proposição de que há um nítido fenômeno que correlaciona as propriedades espectroscópicas das suspensões de NCs de CdTe obtidas, com as suas elevadas concentrações de NCs. Uma explicação plausível para as observações feitas acima é que há um efeito de auto supressão da luminescência dos NCs, devido a alta concentração destes na suspensão original. Para uma elucidação completa, um estudo espectroscópico mais aprofundado se faz necessário. A não linearidade observada para o comportamento da fotoluminescência pode ser o resultado de um somatório deste processo dependente da concentração da amostra, somado a outras propriedades do sistema, como o índice de refração.

3.7.6 - Precipitação seletiva das suspensões de NCs preparadas

A Figura 3.10 exibe os espectros de emissão de uma suspensão de NCs de CdTe e das frações de NCs obtidas pelo processo de precipitação seletiva.

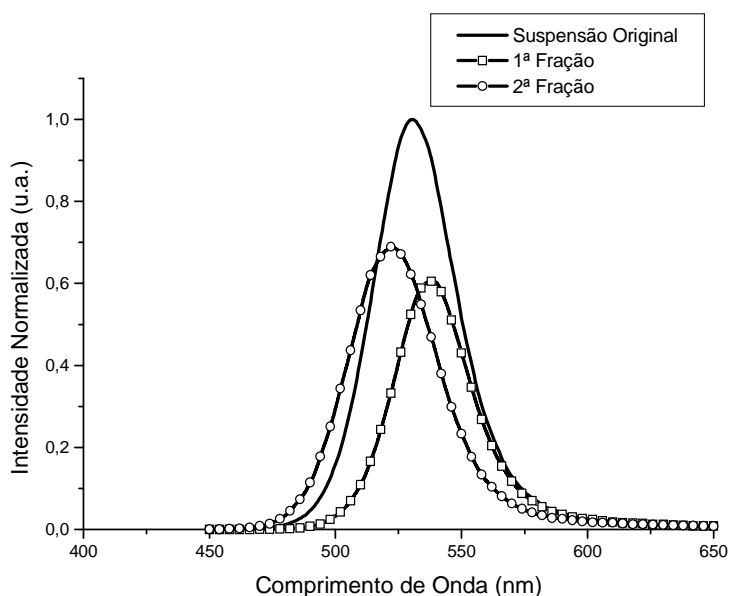


Figura 3.10 – Espectros de emissão de uma suspensão de NCs de CdTe e das frações de NCs obtidas pelo processo de precipitação seletiva.

Como se pode observar na Figura 3.10, o processo de precipitação seletiva separou duas populações de NCs que, pela posição dos máximos das respectivas bandas de emissão, tratam-se de partículas com tamanhos médios levemente diferentes. Além disso, observa-se que a emissão da suspensão original situa-se em uma região entre as bandas de emissão das frações obtidas, o que indica que a emissão da amostra original deve tratar-se da combinação das emissões das frações obtidas. Estes resultados encontram-se em concordância com experimentos semelhantes já descritos na literatura [6,15].

3.8 – Referências:

1. Henglein, A. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 2291.
2. Alfassi, Z., Bahnemann, D., Henglein, A. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 4656.
3. Rossetti, R., Brus, L. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 4470.
4. Rogach, A. L., Katsokas, L., Kornowski, A., Su, D., Weller, H. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 100 (1996) 1772.
5. Kapitonov, A. M., Stupak, A. P., Gaponenko, S. V., Petrov, E. P., Rogach, A. L., Eychmüller, A. *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 10109.
6. Gaponik, N., Talapin, D. V., Rogach, A. L., Hoppe, K., Shevchenko, E. V., Kornowski, A., Eychmüller, A., Weller, H. *J. Phys. Chem. B.* 106 (2002) 7177.
7. Goodman, M. M., Jr., F. F. K. *Organometallics*, 2 (1983) 1106.
8. Zhang, H., Zhou, Z., Yang, B., Gao, M. *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 8.
9. Talapin, D. V., Haubold, S., Rogach, A. L., Kornowski, A., Haase, M., Weller, H. *J. Phys. Chem. B.* 105 (2001) 2260.
10. Boyle, T. J., Bunge, S. D., Alam, T. M., Holland, G. P., Headley, T. J., Avilucea, G. *Inorg. Chem.* 44 (2005) 1309.
11. Murray, C. B., Norris, D. J., Bawendi, M.G. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 8706.
12. Zhang, H., Yang, B. *Thin Solid Films.* 418 (2002) 169.
13. Nosaka, Y., Ohta, N., Fukuyama, T., Fujii, N. *J. Colloid Interface Sci.* 155 (1993) 23.
14. [http:// www.semiconductors.co.uk](http://www.semiconductors.co.uk). Acessado em 10/06/06.
15. Rogach, A. L. *Mater. Sci. Eng. B.* 69-70 (2000) 435.
16. Talapin, D. V. *Tese de Doutorado*. Hamburg, University of Hamburg, 2002.

Capítulo 4 – Funcionalização de nanocristais de CdS/Cd(OH)₂ para aplicações em marcação biológica:

4.1 - Introdução

Como já brevemente descrito no Capítulo 1, uma das áreas mais promissoras para aplicação de NCs luminescentes de semicondutores é a biotecnologia [1], como marcadores fluorescentes de sistemas biológicos [2-6], com o intuito de se estudar os processos bioquímicos produzidos por esses sistemas. Estes processos biológicos podem ser monitorados, por exemplo, mediante análise da luminescência dos NCs acopladas a diferentes componentes biológicos (proteínas citoplasmáticas, cadeias de DNA ou RNA, etc.) do sistema, assim como pela análise das modificações espectrais dos NCs, em diferentes condições biológicas [6-8]. Estes estudos vem sendo cada vez mais desenvolvidos, devido a suas respostas rápidas, muitas em tempo real, sobre os processos bioquímicos monitorados, principalmente *in vitro*, em sistemas vivos de interesse biotecnológicos, na área de diagnósticos clínicos [9] e no desenvolvimento de novas terapêuticas.

Como definido por Medintz e colaboradores [6] estruturas híbridas inorgânicas-biológicas são produzidas mediante conjugação de nanoestruturas, como nanopartículas, por exemplo, a biomoléculas de interesse como DNA, proteínas, etc. O material resultante destas conjugações possui propriedades de ambos os elementos formadores: propriedades espectroscópicas das nanoestruturas e funcionalidades biológicas das biomoléculas. Estas estruturas híbridas podem então ser utilizadas para o monitoramento de sistemas biológicos, focando-se processos específicos que possam interagir com as biomoléculas dos híbridos. O ponto chave para o sucesso na obtenção destas estruturas híbridas é o processo de associação destas estruturas inorgânicas com as biomoléculas. Este é o foco de estudo do que se chamamos de funcionalização.

Dá-se o nome de funcionalização [6] à modificação química da superfície dos NCs com o intuito de acoplá-las a sistemas biológicos e/ou torná-las mais biocompatíveis, isto é, capazes de serem inseridas nos sistemas biológicos causando-lhes o mínimo de alterações fisiológicas.

O processo de funcionalização normalmente é realizado empregando-se pequenas moléculas orgânicas, os funcionalizantes, capazes de formar ligações químicas com a superfície dos NCs, introduzindo-lhes novos grupos funcionais superficiais, que podem então se complexar com diferentes componentes biológicos (Figura 4.1). Entretanto, podemos ainda utilizar moléculas mais complexas para a funcionalização dos NCs, como é o caso de pequenos peptídeos até proteínas como a albumina ou imunoglobulinas. Vale ressaltar que tais funcionalizantes devem ser escolhidos de tal forma que não sejam capazes de suprimir a luminescência dos NCs e que não destruam a estabilidade coloidal dos NCs.

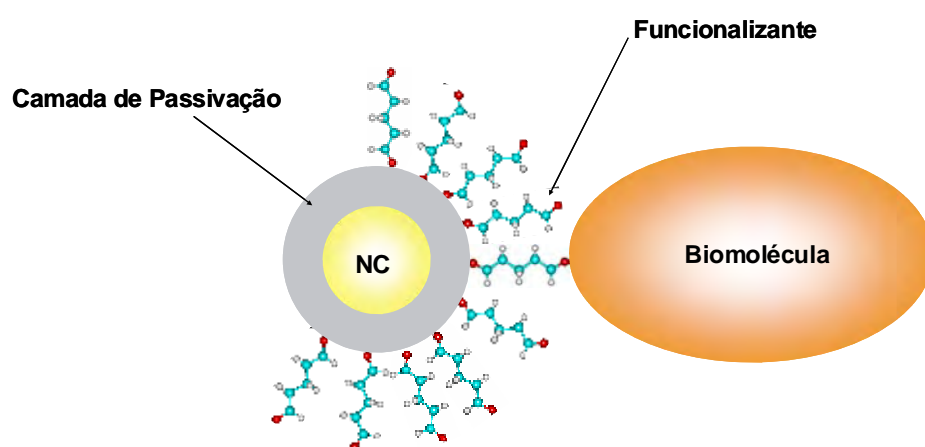


Figura 4.1 – Esquema geral da conjugação de NC a uma biomolécula por intermédio de uma molécula funcionalizante.

O processo de funcionalização pode ser dividido em funcionalizações simples, onde utiliza-se apenas um tipo de agente funcionalizante para a modificação da superfície dos NCs, ou funcionalizações complexas, onde utilizamos mais de um tipo de agente funcionalizante, sendo neste caso o processo realizado em pelo menos duas etapas.

No primeiro caso geramos NCs com pouca especificidade de acoplamento com estruturas biológicas, isto é, os grupamentos funcionais inseridos na superfície dos NCs podem se complexar com outros grupamentos funcionais presentes em mais de um tipo de biomoléculas. Este é o caso do agente funcionalizante glutaraldeído [11-13] (Seção 4.2). Outro funcionalizante bastante eficiente para esse caso é o ácido mercaptoacético, já descrito no Capítulo 3 como estabilizante de NCs de CdTe, que pode reagir com íons Cd^{+2} na superfície dos NCs, tanto de CdS/Cd(OH)₂ quanto de CdTe, através do seu grupamento tiol e introduzindo o grupamento carboxilato na superfície dos NCs. O

grupamento carboxilato introduzido pode reagir com aminas primárias resultando em uma amida relativamente estável.

No segundo caso, como exemplo de funcionalização complexa, temos a associação dos NCs com imunoglobulinas. Imunoglobulinas são proteínas especializadas produzidas pelo sistema imunológico de mamíferos, capazes de reconhecer e combater agentes patógenos ao organismo.

Por fim, deve-se salientar que os agentes funcionalizantes, simples ou complexos, devem interferir o mínimo possível nas propriedades espectroscópicas dos NCs, isto é, a luminescência deve sofrer o mínimo de interferência, de tal forma a manter uma luminescência residual detectável, quando os NCs forem inseridos nos sistemas biológicos. Além disso, nas funcionalizações complexas envolvendo biomoléculas, deve-se ter em mente que as funções biológicas das biomoléculas não devem ser alteradas completamente pelo processo de funcionalização, pois isto aniquilaria a especificidade que se procura com este tipo de tratamento. O conceito de função biológica utilizado neste caso diz respeito ao modo como as biomoléculas interagem com os sistemas biológicos. A conformação de uma enzima, por exemplo, é o que determina a sua função como catalisadora de uma certa reação bioquímica. Caso esta conformação, chamada de conformação ativa, seja alterada por alguma modificação química feita na molécula, a enzima fatalmente pode perder a sua funcionalidade quanto a sua atividade catalítica.

4.2 – Glutaraldeído: um bom funcionalizante?

O glutaraldeído é uma molécula bidentada com dois grupamentos aldeído em suas extremidades [11] (Figura 4.2). É um excelente agente fixador de estruturas celulares sendo, por isso, largamente utilizado na preparação convencional de tecidos para análises por microscopia.

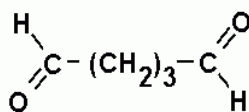


Figura 4.2 – Estrutura geral do glutaraldeído

A sua ação fixadora, superior ao do formaldeído, por exemplo, deve-se a sua capacidade de gerar ligações cruzadas entre estruturas protéicas celulares, preservando a conformação da célula após sua fixação [11,13]. Este tipo de grupamento, presente tanto na forma monomérica quanto na forma polimérica do glutaraldeído, pode se ligar a aminas primárias presentes em diferentes biomoléculas, como proteínas dos mais diversos tipos (Figura 4.3), assim como em outras estruturas como os ácidos nucléicos. A reação entre o grupamento aldeído e uma amina primária gera uma estrutura lábil conhecida como base de Schiff, que após redução por borohidreto de sódio, por exemplo, resulta em uma amina secundária estável [11,13]. Após a ligação com os grupamentos NH₂ de aminoácidos formadores das proteínas, o glutaraldeído insolubiliza estas estruturas, podendo estas sofrer processos de coloração histoquímica sem que percam muita definição de sua conformação.

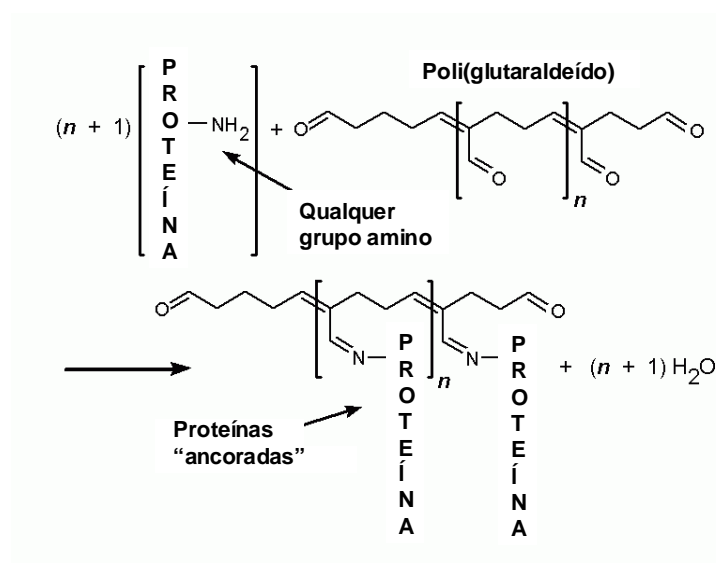


Figura 4.3 – Ligação entre grupamentos amino de proteínas com os grupamentos aldeído da forma polimérico do glutaraldeído.
Adaptado de [11].

Também já é conhecida a capacidade do glutaraldeído de se polimerizar, gerando o poliglutaraldeído, em meio alcalino (Figura 4.4). Isto é de grande importância para aplicações nas quais se deseja imobilizar estruturas biológicas em suportes sólidos, para aplicações como cromatografias por afinidade, ou para aplicações na área de imuno histoquímica [13].

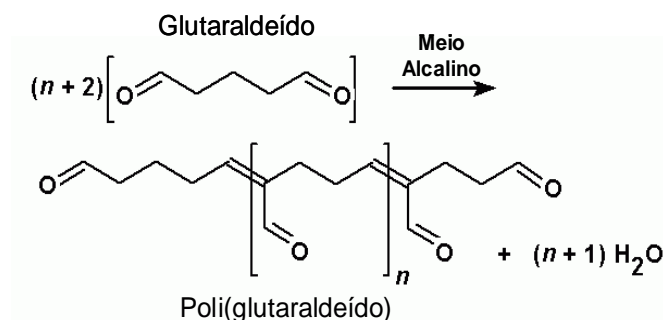


Figura 4.4 – Esquema geral da polimerização do glutaraldeído em meio alcalino. Adaptado de [11].

Estas propriedades podem ser combinadas na produção de híbridos inorgânico-biológicos para estudos de sistemas biológicos. Sabendo-se da capacidade de conjugação do glutaraldeído a proteínas e outras estruturas que possuam grupamentos amino, o glutaraldeído pode ser então utilizado como agente funcionalizante inespecífico, permitindo a ligação de NCs, por exemplo, a qualquer estrutura protéica; ou como agente intercalante entre NCs e biomoléculas capazes de se ligar especificamente a certas estruturas biológicas.

Para este tipo de finalidade, o glutaraldeído deve ser utilizado em concentrações abaixo de 1% [11], para evitar que algum excesso de glutaraldeído venha a interferir nos experimentos, fazendo ligações indesejáveis, ou inativando as biomoléculas. Neste trabalho utilizou-se o glutaraldeído como funcionalizante dos NCs de CdS/Cd(OH)₂, para marcações biológicas inespecíficas, assim como intermediário para a funcionalização dos NCs com biomoléculas para marcações específicas, como anticorpo contra hemácias tipo A e lectina do tipo Concanavalina-A.

4.3 – Anticorpos e Lectinas: biomoléculas direcionadoras.

Dentre as biomoléculas de escolha para a obtenção de sistemas híbridos para marcação biológica, os anticorpos são as moléculas preferidas dentre a maioria dos pesquisadores [4,9,13-14,20]. Anticorpos são moléculas responsáveis pelo reconhecimento de corpos estranhos, antígenos, no organismo de mamíferos. São constituídos de porções básicas: uma porção constituída de duas cadeias polipeptídicas curtas, chamadas de cadeias leves (L); e por outra porção constituída por duas cadeias longas de polipeptídios chamadas de cadeias pesadas (H). As cadeias L se ligam às cadeias H por pontes dissulfeto, assim como as cadeias H se ligam entre si por este

mesmo tipo de ligação [15]. Como ilustrado na Figura 4.5, os anticorpos podem ser divididos em suas estruturas funcionais: a porção chamada Fab, responsável pela ligação efetiva com os antígenos e, também é a porção que possui uma elevada variabilidade de composição peptídica, o que confere uma especificidade inigualável no reconhecimento antigênico; e a outra porção, chamada Fc, que possui uma menor variabilidade peptídica e que é responsável pelas diferentes finalidades biológicas dos anticorpos [15].



Figura 4.5 – Estruturas funcionais de um anticorpo

Alguns tipos de anticorpos são produzidos para o reconhecimento de antígenos específicos e esta peculiaridade é que fez com que estas biomoléculas possibilitassem um grande avanço nas áreas de imunologia e biologia celular. Atualmente, há indústrias especializadas na produção sob encomenda de anticorpos monoclonais para um dado antígeno de interesse. Devido a todas essas propriedades brevemente descritas, os anticorpos são utilizados como agentes funcionalizantes para a criação de sistemas híbridos com uma alta especificidade biológica, permitindo estudos de processos biológicos através da marcação individual de biomoléculas participantes de tais processos.

Outra classe de biomoléculas que também vem sendo amplamente utilizada na marcação biológica são as lectinas. Lectinas são proteínas produzidas por vegetais, que são capazes de reconhecer especificamente resíduos de açúcares (resíduos glicídicos) presentes em diferentes estruturas biológicas [16-17]. Embora possuam uma especificidade semelhante aos anticorpos, as lectinas não são produzidas pelo sistema

imunológico, como são os anticorpos. As lectinas conhecidas possuem, no mínimo, dois locais de reconhecimento de açúcares e, por esta característica, são capazes de aglutinar hemácias e outras células, através da formação de redes de ligação tridimensionais. Por estas propriedades, as lectinas vem sendo utilizadas para o estudo de perfil de açúcares presentes na superfície de tecidos e correlacionar estes perfis com alterações patológicas, como transformações tumorais de células. Uma lectina muito utilizada para este tipo de estudo é a Concanavalina-A, capaz de se ligar a resíduos de α -manose e glicose presente nas superfícies celulares.

4.4 – Procedimentos experimentais:

4.4.1 – Funcionalização de NCs de CdS/Cd(OH)₂:

4.4.1.1 – Funcionalização com glutaraldeído:

Em um erlenmeyer de 100mL adicionou-se 10mL de uma suspensão recém passivada (ver Capítulo 2 para maiores detalhes) de NCs de CdS/Cd(OH)₂. Ajustou-se o pH da suspensão para um valor de pH 8,0 com a utilização de soluções de 0,1 M de HClO₄ e NaOH. Mantendo a suspensão sob agitação, à temperatura ambiente, adicionou-se lentamente 100μL de uma solução aquosa 0,1% de glutaraldeído. Manteve-se o sistema sob agitação por aproximadamente 30 minutos.

4.4.1.2 – Funcionalização com glutaraldeído/Anticorpo:

Iniciou-se o procedimento como descrito na Seção 4.4.1.1. Em seguida, adicionou-se 10μL de anticorpo monoclonal (DiaMed AS, Cressier s/ Morat, Switzerland) contra eritrócitos do tipo sanguíneo A (Anti-A) a 100μL de suspensão funcionalizada com glutaraldeído,. A suspensão foi então encubada a uma temperatura de 37°C por cinco horas, em tampão do tipo PBS, com pH igual a 7,2.

4.4.1.3 – Funcionalização com glutaraldeído/Concanavalina-A:

Iniciou-se o procedimento como descrito na Seção 4.4.1.1. Em seguida, coletou-se 200μL da suspensão funcionalizada com glutaraldeído e a esta alíquota adicionou-se 600μL de tampão do tipo PBS, com pH aproximadamente igual a 7,0. A esta suspensão tamponada, adicionou-se 200μL de uma solução 1mg/mL de Concanavalina-A (Sigma). A reação de funcionalização ocorreu durante 24 horas. Após este tempo, a suspensão foi mantida congelada até utilização.

4.4.2 – Caracterização das suspensões funcionalizadas:

Tendo em vista que as aplicações as quais se destinam os NCs funcionalizados baseiam-se na fotoluminescência destas partículas, caracterizou-se os sistemas funcionalizados quanto às alterações em sua luminescência, comparando-se com as suspensões originais, sem funcionalização. Além disso, para os NCs funcionalizados apenas com glutaraldeído, realizou-se uma caracterização estrutural através de MET, com o objetivo de se avaliar possíveis alterações nos NCs. Nesta caracterização, realizou-se a coleta de imagens de campo claro e imagens obtidas com feixe de elétrons de baixa energia. As micrografias de baixa energia são bastante utilizadas para a verificação de material orgânico presente nas amostras analisadas. Para obtenção das imagens utilizou-se um microscópio modelo Carl Zeiss CEM 908, com microsonda, operado com energia de 80kV. As imagens de baixa energia foram obtidas com feixe de elétrons com energia de 20eV.

As caracterizações espectroscópicas foram realizadas utilizando-se um espectrofluorímetro ISS K2, com resolução de 1,0 nm e lâmpada de Xenônio de 300W como fonte de excitação.

4.5 – Resultados e discussão:

4.5.1 – Sistema funcionalizado com glutaraldeído:

4.5.1.1 – Caracterização estrutural:

A Figura 4.6 exibe uma micrografia de campo claro e a Figura 4.7 outra com feixe de elétrons de baixa energia, dos NCs funcionalizados com glutaraldeído.

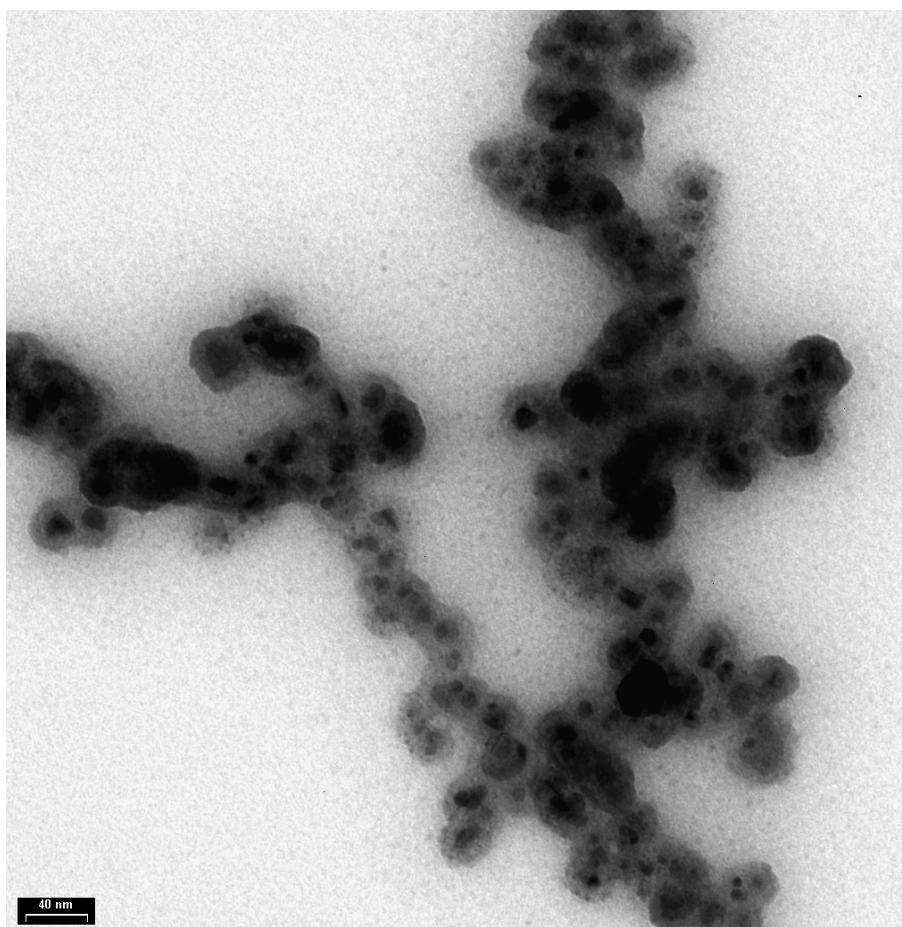


Figura 4.6 – Micrografia de campo claro de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizada com glutaraldeído. A barra de escala equivale a 40nm.

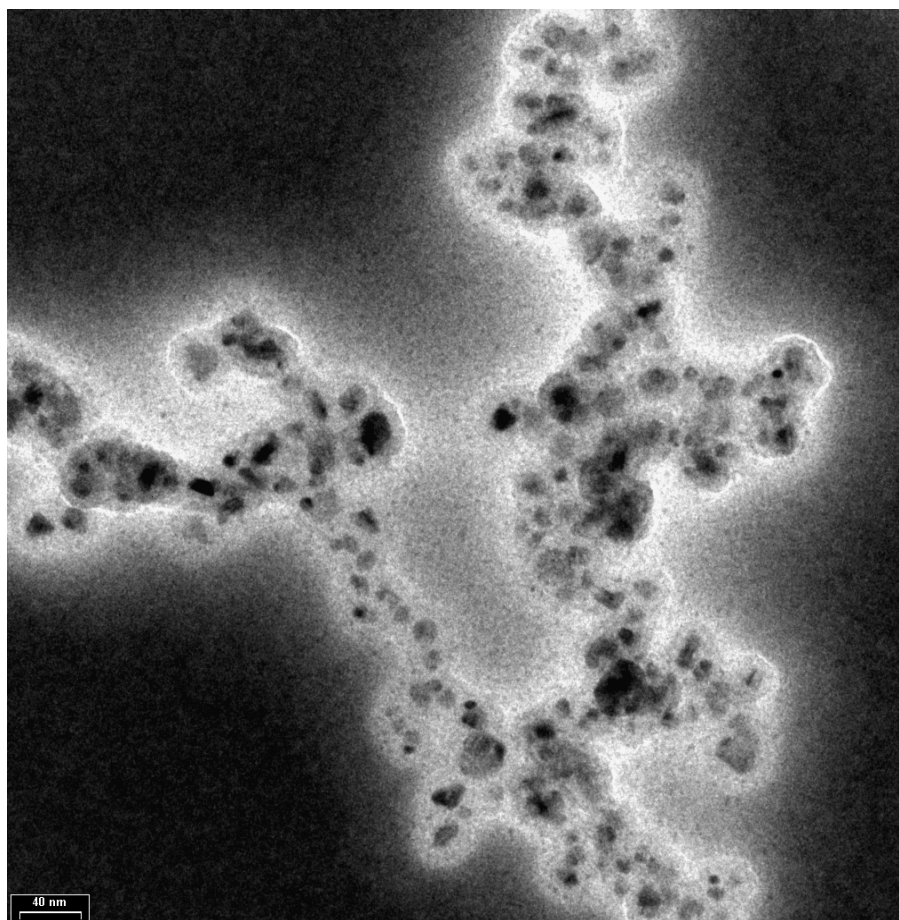


Figura 4.7 – Micrografia de baixa energia (20eV) de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizada com glutaraldeído. A barra de escala equivale a 40nm.

Observando-se as micrografias acima, constata-se a presença de uma camada de material pouco eletrondenso, com espessura uniforme, recobrindo todos os NCs exibidos. Esta camada de recobrimento se apresenta de forma diferente e em quantidade superior a camada do estabilizante polifosfato utilizado na síntese dos NCs (ver micrografias do Capítulo 2 para melhor comparação). Isto sugere que este recobrimento observado seja composto de poliglutaraldeído produzido durante o processo de funcionalização. Esta hipótese é corroborada pelas condições nas quais a funcionalização foi realizada (meio alcalino) que são bastante favoráveis à polimerização do glutaraldeído. As observações feitas acima indicam satisfatoriamente que a metodologia utilizada foi favorável para o processo sugerido de funcionalização dos NCs.

4.5.1.2 – Caracterização espectroscópica:

A Figura 4.8 exibe os espectros de emissão de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizados com glutaraldeído e não funcionalizados.

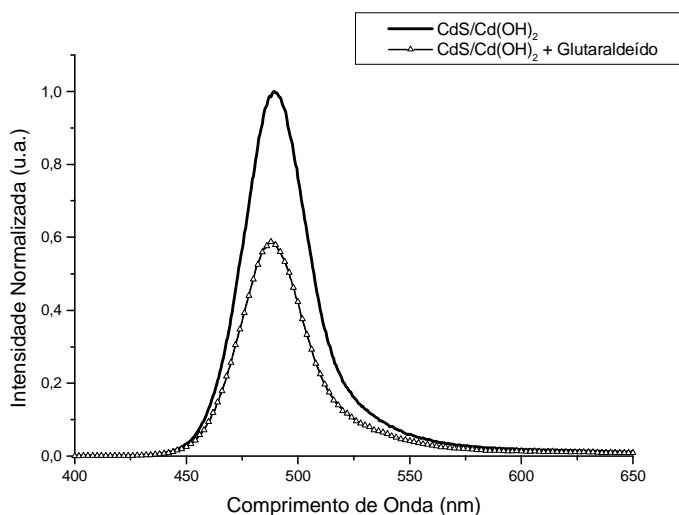


Figura 4.8 – Espectros de emissão de uma amostra de NCs de CdS/Cd(OH)₂ com e sem a funcionalização com glutaraldeído.

Como se pode observar nos espectros acima, o processo de funcionalização com o glutaraldeído não altera o perfil de banda de emissão dos NCs funcionalizados, embora resulte em uma diminuição considerável na intensidade da emissão destes. Atribui-se a diminuição na intensidade da emissão dos NCs à diminuição do pH da suspensão após a adição do glutaraldeído que pode ocasionar a corrosão parcial da camada de passivação dos NCs, interferindo diretamente na eficiência do processo de fotoluminescência [18].

4.5.2 – Sistema funcionalizado com glutaraldeído/Anticorpo:

A Figura 4.9 exibe os espectros de emissão de duas amostras de NCs de CdS/Cd(OH)₂: uma funcionalizada apenas com glutaraldeído e outra com o conjugado glutaraldeído/Anti-A (para o conjugado, a figura mostra espectros obtidos em diferentes intervalos de tempo).

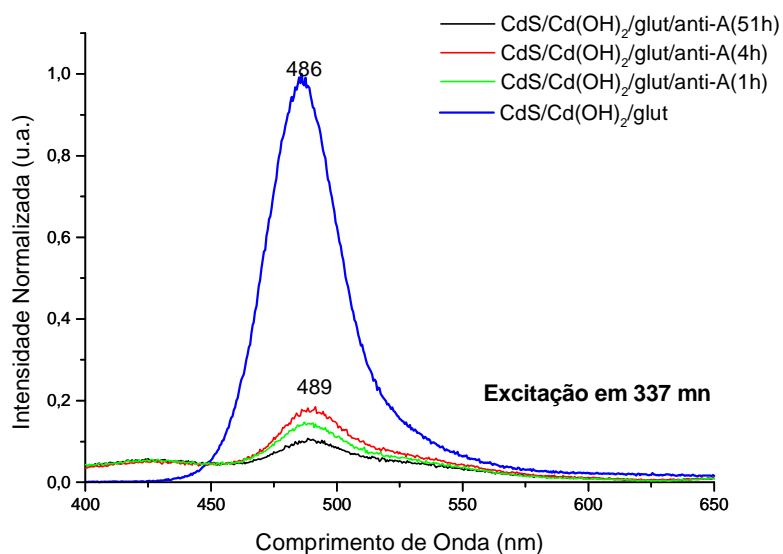


Figura 4.9 – Evolução temporal dos espectros de emissão de uma amostra de NCs funcionalizada com glutaraldeído (CdS/Cd(OH)₂/glut) e com glutaraldeído/Anti-A (CdS/Cd(OH)₂/glut/Anti-A).

Como já observado nos NCs funcionalizados com glutaraldeído, há uma diminuição da luminescência dos NCs após a funcionalização com glutaraldeído/Anti-A. Além disso, com o decorrer do tempo, observa-se que a emissão da suspensão de NCs também sofre alterações na sua intensidade, indicando que o processo de conjugação dos anticorpos à camada de glutaraldeído não se encerra nas primeiras horas de incubação, mas continua se desenvolvendo no decorrer de várias horas.

Além da alteração do pH do meio após a funcionalização, como já discutido na Seção 4.5.1, a diminuição da luminescência dos NCs também pode estar relacionada a processos não-radiativos de transferência de energia, dos NCs para as moléculas de Anti-A. Uma explicação possível deste fenômeno é a geração de novos estados eletrônicos, não presentes nos NCs nem nos anticorpos mas sim no sistema conjugado, alterando os processos de recombinação excitônica nos NCs. Os espectros de emissão apresentados na Figura 4.10 reforçam estes indícios. Com o intuito de verificar as alterações espectrais possivelmente advindas da interação NC-glut-Anti-A variou-se a região de excitação do conjugado e observou-se que ao ser excitado em torno de $\lambda=488$ nm surgiu uma segunda banda de emissão no verde e, quando excitada em $\lambda=543$ nm surge uma banda de discreta intensidade na região do vermelho, com máximo em torno de 660 nm. A Figura 4.9 apresenta o espectro da suspensão sob excitação em 488 e a

evolução temporal desta banda. Observa-se que, enquanto a banda de emissão sob excitação em 337 nm diminui com o passar do tempo, a banda na região de energia mais baixa aumenta em intensidade com o tempo, corroborando que a dinâmica do processo de funcionalização continua mesmo após sete dias decorridos desde o momento inicial de incubação.

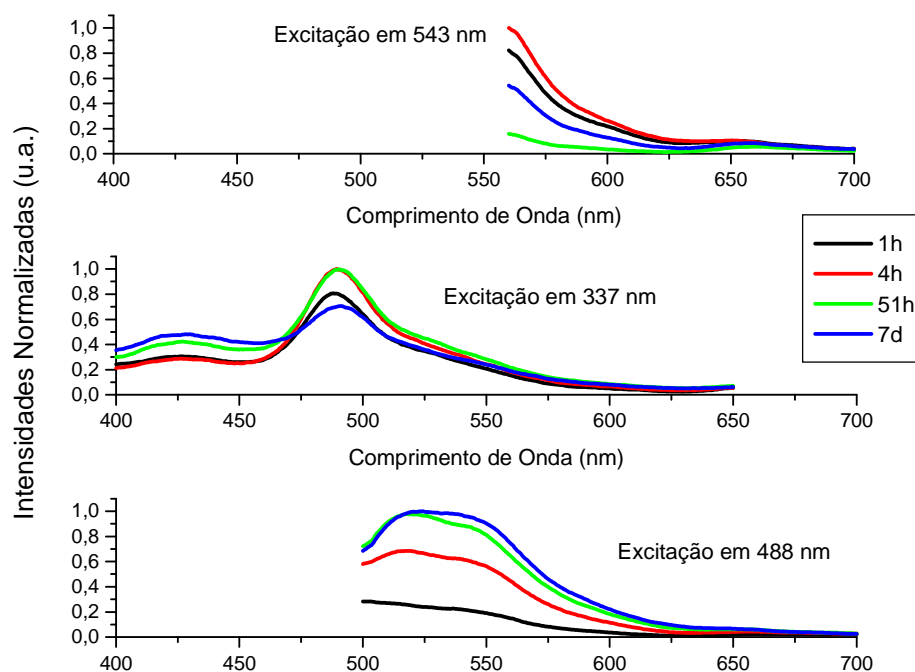


Figura 4.10 – Evolução temporal das bandas de emissão geradas pela excitação em 337, 488 e 543 nm.

Este conjunto de observações sugere que há processos de transferência de energia entre os NCs e as moléculas de anticorpos, podendo estes processos se estenderem aos sistemas biológicos que serão monitorados utilizando estes NCs funcionalizados [19]. Se este for realmente o caso, então este fenômeno não deve se restringir apenas aos anticorpos, mas também a outras proteínas que possam vir a serem utilizadas para a funcionalização dos NCs.

4.5.3 – Sistema funcionalizado com glutaraldeído/Concanavalina-A:

Não foi possível a caracterização espectroscópica dos sistemas funcionalizados com a Concanavalina-A. Devido à pequena quantidade de lectina disponível para a

funcionalização, a quantidade de material funcionalizado, no que diz respeito a concentração final de NCs possui luminescência com intensidade inferior à sensibilidade do espectrofluorímetro utilizado. Já se tem como perspectiva deste trabalho a tentativa de caracterização espectroscópica deste sistema funcionalizado em um aparelho de maior sensibilidade e inclusive utilizando-se a técnica de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) que detecta a fluorescência de biomoléculas em volumes da ordem de nanolitros.

4.6 – Referências

1. Fortina, P., Kricka, L. J., Surrey, S., Grodzinski, P. *Trends Biotechnol.* 23: 4 (2005) 168.
2. Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A. P. *Science.* 281 (1998) 2013.
3. Chan, W. C. W., Nie, S. *Science.* 281 (1998) 2016.
4. Penn, S. G., He, L., Natan, M. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 609.
5. Rosi, N. L., Mirkin, C. A. *Chem. Rev.* 105 (2005) 1547.
6. Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., Mattoussi H. *Nature materials.* 4 (2005), 435-446.
7. Medintz, I. L., Konnert, J. H., Clapp, A. R., Stanish, I., Twigg, M. E., Mattoussi, H., Mauro, J. M., Deschamps, J. R. *PNAS.* 101 : 26 (2004) 9612.
8. Vu, T. Q., Maddipati, R., Blute, T. A., Nehilla, B. J., Nusblat, L., Desai, T. A. *Nano Lett.* 5 : 4 (2005) 603.
9. Seydack, M. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2454.
10. Jain, K. K. *Clin. Chim. Acta.* 358 (2005) 37.
11. Kiernan, J. A. *Microscopy Today.* 00-1 (2000) 8.
12. Margel, S., Zisblatt, S., Rembaum, A. *J. Immunol. Methods.* 28 (1979) 341.
13. Hermanson, G. T. Bioconjugate techniques. San Diego, Academic Press, 1996.
14. Goldman, E. R., Clapp, A. R., Anderson, G. P., Uyeda, H. T., Mauro, J. M., Medintz, I. L., Mattoussi, H. *Anal. Chem.* 76 (2004) 684.
15. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. Kuby Immunology. 4^a Ed., Nova York, 2000.
16. Shanon, N., Lis, H. *Glycobiology.* 14 : 11 (2004) 53.
17. Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Jose, R., Fukuoka, S., Nagase, T., Ishikawa, M., Baba, Y. *Chem. Commun.* 15 (2005) 1980.
18. Spanhel, L., Haase, M., Weller, H., e Henglein, A. *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5649.
19. Kumar, A., Neigi, D. P. S. J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 134 (2000) 199.

Capítulo 5 – Aplicação de NCs de CdS/Cd(OH)₂ como sondas luminescentes para estudos em sistemas biológicos:

5.1 - Marcação dos sistemas biológicos:

Nos estudos de marcação biológica, utilizou-se os NCs de CdS/Cd(OH)₂ não funcionalizados e funcionalizados descritos no Capítulo 4. Os sistemas biológicos escolhidos para estes estudos foram:

- Parasitas do tipo *Leishmania amazonensis*: a partir da utilização de NCs sem funcionalização e funcionalizados com glutaraldeído, objetivou-se a marcação dos parasitas para posterior uso em infecção de células hospedeiras.
- Hemácias de tipos sanguíneos diferentes: a partir da utilização de NCs funcionalizados com anticorpo Anti-A, tentou-se verificar a expressão diferenciada dos antígenos do grupo sanguíneo tipo A⁺ e O⁺.
- Fibroadenomas: a partir da utilização de NCs funcionalizados com Concanavalina-A, tentou-se verificar expressões diferenciadas de glicose e manose neste tipo de tumor mamário, comparando-se com tecido mamário saudável.

Todos os trabalhos descritos a seguir foram realizados sob colaboração com os seguintes centros de pesquisa e seus respectivos pesquisadores:

- Centro de Hematologia, Transfusão e Hemoterapia, Campinas-SP. Colaboradores: Vagner Castro, Maria de Lourdes Barjas-Castro e Paulo R. Moura Lima.
- Departamento de Parasitologia, UNICAMP. Colaboradores: Selma Giorgio, Diana C. Ayres e Maira C. Bosetto.
- Departamento de Eletrônica Quântica, UNICAMP. Colaboradores: Carlos Lenz César, Adriana Fontes e André A. de Thomas.
- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE. Colaborador: Eduardo I. C. Beltrão.
- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ. Colaboradora: Regina Célia B. Q. Figueiredo.

Os sistemas biológicos marcados com os NCs luminescentes foram caracterizados através da geração de imagens destes sistemas após as marcações. Para isto, utilizou-se os seguintes equipamentos:

- Microscópio confocal modelo LSM 510 da Carl Zeiss, utilizando-se uma objetiva de imersão a base de água, com um aumento de 63x e uma abertura numérica de 1.2. Utilizou-se como comprimentos de onda de excitação do laser os valores $\lambda = 488$ e 543 nm. Este equipamento foi utilizado para os estudos com as hemácias e com as leishmanias.
- Microscópio confocal modelo TSC SP2 AOBS da Leica, utilizando-se uma objetiva de imersão a base de óleo, com um aumento de 40x e uma abertura numérica de 1.2. Utilizou-se como comprimentos de onda de excitação do laser os valores $\lambda = 488$ e 543 nm. Este equipamento foi utilizado para o estudo com o fibroadenoma.

Em ambos equipamentos, as micrografias foram coletadas utilizando-se dois canais emissão: canal 1 correspondendo a emissão no vermelho (com filtro para coleta em 560-750 nm) e canal 2 correspondendo a emissão no verde (com filtro para coleta em 500-560 nm).

5.2 – Sistemas biológicos estudados:

5.2.1 – *Leishmania amazonensis*

5.2.1.1 – Introdução

A leishmaniose é uma parasitose comum em países de clima tropical. No Brasil, apresenta-se como uma doença endêmica em praticamente todo território nacional. É causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitido para os seus hospedeiros por um vetor, normalmente um mosquito flebótomo, isto é, que se alimenta de sangue [1].

No Brasil as leishmanioses apresentam-se na forma tegumentar e mucotegumentar (LT) e visceral (LV). As formas tegumentares no Brasil caracterizam-se pela diversidade das apresentações clínicas e das espécies causadoras da doença (seis diferentes espécies descritas). Algumas destas espécies causam síndromes associadas a fenômenos imunopatogênicos, como por exemplo, a forma difusa causada por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e a forma mucosa causada pela *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. A *Leishmania* visceral é causada essencialmente por uma única espécie, a *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* [2].

Os parasitas da leishmaniose apresentam duas formas durante o seu ciclo de vida: a forma infectante, ou promastigota, na qual se apresentam quando alojados dentro do seu vetor; e a forma de proliferação no seu hospedeiro, chamada de amastigota. Em mamíferos, a forma amastigota é como este parasita se prolifera dentro das células de defesa conhecidas como macrófagos. A forma promastigota apresenta a característica interessante da locomoção do parasita por meio de um flagelo frontal, permitindo a migração dos parasitas do local de entrada no hospedeiro, até a entrada nos macrófagos, quando passam para a forma amastigota. O movimento deste flagelo se dá pelo consumo de energia produzida por uma estrutura conhecida como cinetoplasto, localizado próximo do flagelo (Figura 5.1).

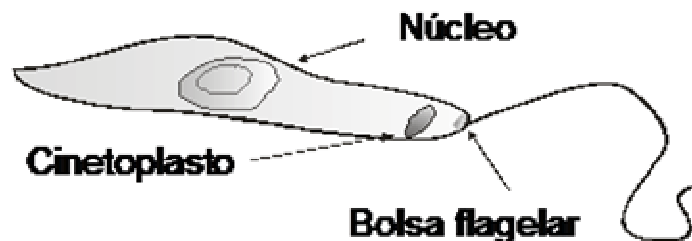


Figura 5.1 – Esquema representativo de uma leishmania na forma promastigota.

Um dos focos de pesquisa na área das leishmanioses é a forma de sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos. Estes parasitas conseguem sobreviver e proliferar exatamente no local onde os macrófagos realizam a destruição de corpúsculos estranhos: dentro de vacúolos conhecidos como fagolisossomos, onde as condições extremas como baixo pH e a presença de enzimas com alto poder catalítico, conhecidas como enzimas lisossomais [3]. O correto entendimento deste mecanismo de sobrevivência é o que permite o desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses.

Dentre as metodologias descritas na literatura no estudo da infecção dos macrófagos citam-se várias que utilizam sondas fluorescentes, como por exemplo a GFP (Green Fluorescent Protein) [3]. A marcação dos promastigotas amplifica a capacidade de detecção e monitoramento do processo invasivo quando estes são incubados com células hospedeiras. Nesta pesquisa objetivou-se a obtenção de um protocolo de marcação dos NCs de CdS/Cd(OH)₂ em promastigotas de *Leishmania amazonensis* que resultasse numa intensidade de luminescência detectável por técnicas de microscopia de fluorescência e ao mesmo tempo que mantivesse vivos os parasitas.

5.3.1.2 - Marcação das leishmanias

Uma alíquota de 300µL de NCs, recém preparada, foi adicionada a 100µL de suspensão de parasitas em meio de cultura RPMI (Sigma), contendo 10% de soro bovino fetal, com aproximadamente 10⁴ parasitas vivos (*Leishmania amazonensis*). Este material foi incubado durante 18h a uma temperatura de 26°C. Por fim, os parasitas foram lavados com uma solução de soro fisiológico 0,9% e então centrifugados para a montagem das lâminas para microscopia. Para os NCs funcionalizados com glutaraldeído (CdS/Cd(OH)₂-Glut) utilizou-se o mesmo procedimento descrito.

5.3.1.3 – Resultados e discussão

Após o período de incubação com os NCs a maioria dos parasitas encontrava-se viva, mantendo sua integridade celular, evidenciando a baixa toxicidade do material durante seu uso.

As Figuras 5.2(a-c) exibem as micrografias coletadas da amostra de parasitas conjugados a (CdS/Cd(OH)₂-Glut).

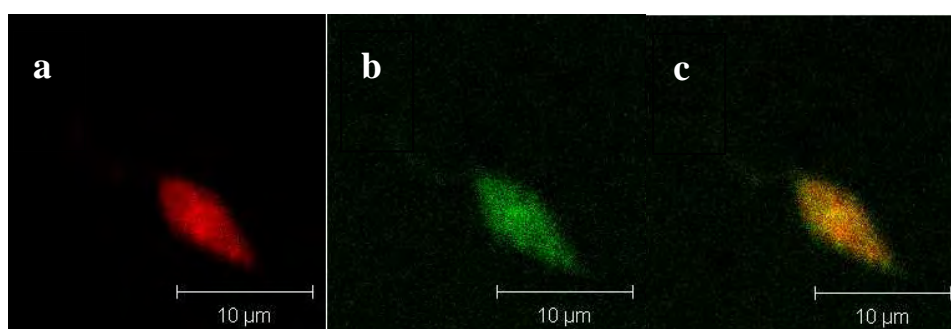


Figura 5.2 - Micrografias obtidas da luminescência do parasita, após marcação com os NCs funcionalizados com glutaraldeído. Micrografia da emissão coletada pelo canal 1 de filtro (a) e com excitação em 543 nm, coletada no canal 2 de filtro (b) e com excitação em 488. Sobreposição das duas micrografias (c).

Observa-se nas imagens da Figura 5.2 os parasitas marcados apresentaram emissão em duas regiões espectrais: emissão de fluorescência verde própria dos NCs utilizados; e uma emissão na região 560-750 nm (descrita na imagem pela pseudocolor vermelha).

A natureza desta segunda emissão ainda está sendo elucidada. Sugerem-se, no entanto, duas hipóteses possíveis. A primeira delas assume algum tipo de processo de transferência de energia entre os NCs e a biomolécula na qual houve a conjugação, provavelmente uma proteína. A segunda leva em conta que a dispersão de tamanhos dos NCs pode gerar populações de partículas que apresentam emissão detectável nesta faixa de comprimento de onda. O espectro de emissão característico destes NCs em suspensão demonstra uma banda que se estende até a região do vermelho (Figura 2.8, Seção 2.4.1.2 do Capítulo 2).

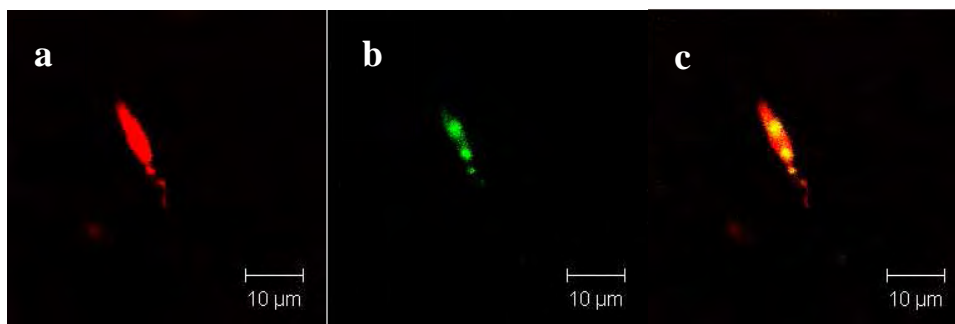


Figura 5.3 - Micrografias obtidas da luminescência do parasita, após marcação com os NCs não funcionalizados. Micrografia da emissão coletada pelo canal 1 de filtro (a) e com excitação em 543 nm, coletada no canal 2 de filtro (b) e com excitação em 488. Sobreposição das duas micrografias (c).

As micrografias da Figura 5.3 representam parasitas conjugados a NCs de CdS/Cd(OH)₂ não-funcionalizados. Pode-se observar que, comparando-se as Figuras 5.2 e 5.3, observa-se uma grande diferença no padrão de marcação. Os parasitas marcados com NCs/glutaraldeído apresentam luminescência dual que se distribui uniformemente, enquanto que os parasitas marcados com NCs não funcionalizados exibem emissão diferenciada ao longo dos promastigotas. Observa-se que a emissão de maior energia encontra-se localizada em três estruturas circulares no eixo central do parasita. Estas estruturas correspondem a três organelas importantes do parasita: o núcleo, o cinetoplasto e a bolsa flagelar [4]. Elas assemelham-se por possuírem uma membrana envoltória, permitindo que apenas pequenas moléculas ultrapassem esta barreira, migrando para o interior das organelas. São também regiões de alto consumo energético e produção de DNA, que traduz-se num alto consumo de unidades contendo grupos fosfato.

A possível explicação para a diferenciação de emissões descrita no parágrafo anterior é que os NCs funcionalizados com glutaraldeído ligam-se a estruturas protéicas na membrana celular dos parasitas e do seu citoplasma inespecificamente, resultando em uma emissão homogênea de todo o parasita. Por outro lado, os NCs não funcionalizados conseguem se difundir com maior facilidade no citoplasma dos parasitas, e aqueles com menor tamanho, tendo em vista a dispersão de tamanho dos NCs, conseguem penetrar através de poros existentes nas membranas das três organelas descritas, resultando em uma compartimentalização destes NCs menores e gerando emissões localizadas. Mais ainda. A superfície dos NCs rica em polifosfato (material estabilizante) pode se constituir num fator atrativo para sua entrada nas três referidas

micro-regiões do parasita[5]. A análise do perfil de emissão tridimensional dos parasitas (Figura 5.4) confirma a marcação diferenciada de estruturas internas e citoplasma.

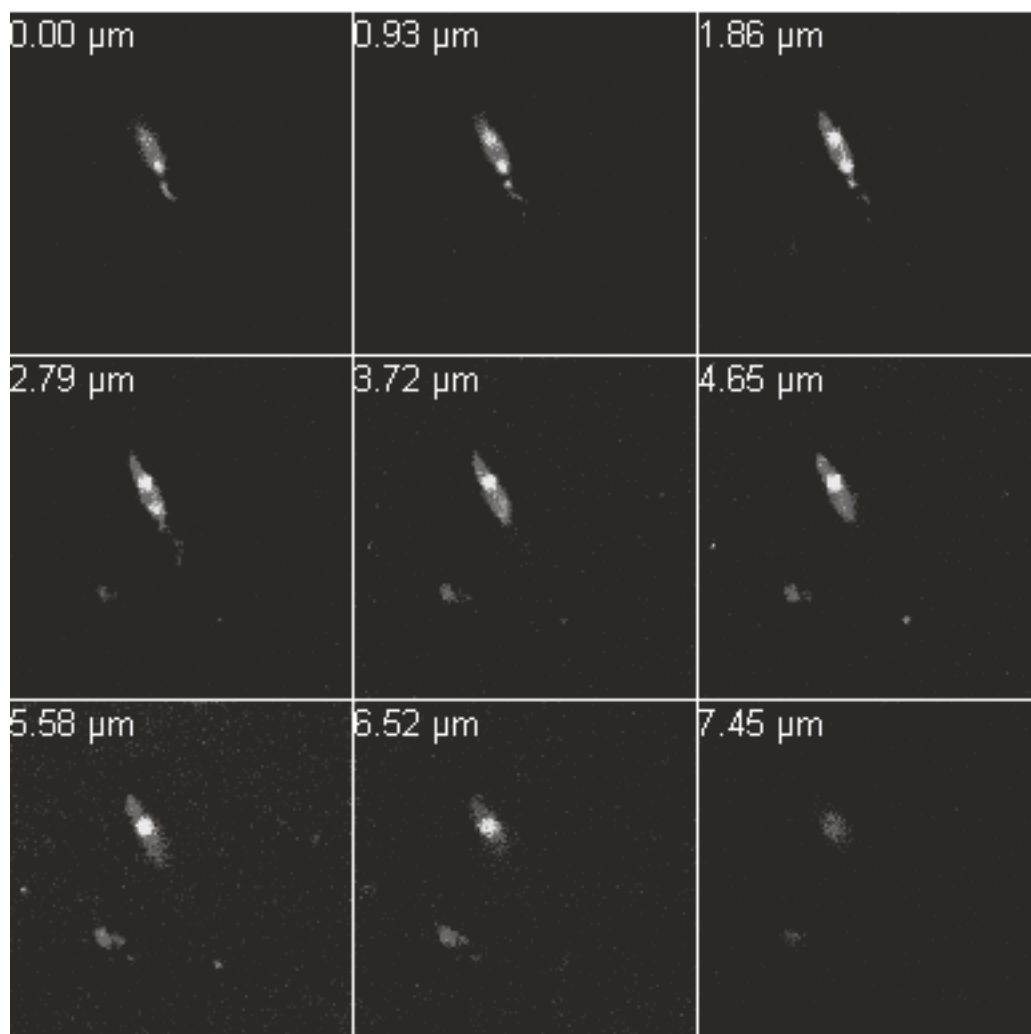


Figura 5.4 – Perfil tridimensional de marcação de *Leishmania amazonensis* com NCs de CdS/Cd(OH)₂.

5.3.2 – Hemácias

5.3.2.1 - Introdução

Hemácias, ou eritrócitos, são células responsáveis pela manutenção dos processos respiratórios dos animais superiores. É uma célula altamente especializada que não possui núcleo, tendo o seu tempo de vida estimado em 120 dias. As trocas gasosas realizadas pelas hemácias são feitas graças a presença de uma proteína conhecida como hemoglobina, capaz de se ligar tanto a moléculas de oxigênio quanto a moléculas de dióxido de carbono.

Na superfície das hemácias de alguns tipos de indivíduos existem glicoproteínas que exibem para o meio extracelular, resíduos de carboidratos. Esta apresentação destes resíduos auxilia no reconhecimento das hemácias pelo sistema imunológico do indivíduo. Estes resíduos de carboidratos são os responsáveis pela determinação dos tipos sanguíneos, segundo o sistema de classificação conhecido como sistema ABO, onde as hemácias do tipo A exibem resíduos de carboidratos diferentes das hemácias do tipo B e as hemácias do tipo O não apresenta nenhum destes tipos de resíduos. As hemácias do tipo AB apresentam resíduos tanto do tipo A quanto do tipo B [6].

Esta diferença entre os tipos de hemácias é o que determina se uma dada pessoa pode ou não receber uma transfusão sanguínea de uma amostra de sangue de outra pessoa. Pessoas com tipos sanguíneos diferentes geralmente apresentam incompatibilidades de transfusão, o que pode se apresentar, por exemplo, como a formação de grandes coágulos sanguíneos dentro dos vasos de uma pessoa que recebeu uma transfusão de um tipo sanguíneo incompatível. Esta coagulação é realizada pelo sistema imunológico do indivíduo transfusionado, que reconhece as hemácias de outro tipo sanguíneo como corpos estranhos, atacando-as e promovendo a sua coagulação [6].

5.3.2.2 – Marcação de hemácias

A partir de amostras de sangue coletadas de doadores, de grupos sanguíneos A⁺ e O⁺, preparou-se novas amostras diluídas, com um hematócrito final de 5%, isto é, do volume final das amostras diluídas, 5% correspondem ao volume ocupado pelas hemácias. Estas diluições foram realizadas com solução de soro fisiológico a 0,9%.

Em seguida, para cada tipo sanguíneo utilizado, coletou-se 10µL de amostra e incubou-se com 90µL de suspensão de NCs funcionalizados com anticorpo

(CdS/Cd(OH)₂/glut/Anti-A) e completou-se o volume da mistura com 400µL de tampão de fosfato (PBS). O material foi agitado levemente e levado ao banho térmico a 37°C por 30 minutos. Logo em seguida, o volume do material foi completado com PBS para cerca de 1 mL e levado para centrifugar por 2x30s a 3400 rpm. Formou-se o botão de sangue e o sobrenadante foi descartado. Colocou-se mais cerca de 1 mL de PBS e o sangue foi redispersado, centrifugando-se novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 50µL, nos quais foi redispersado o sangue. Para a preparação da lâmina, foi pipetada uma alíquota de 10µL do material, na hora da visualização com microscópio.

5.3.2.3 – Resultados e discussão

O esquema geral da conjugação está descrito na Figura 5.5. As hemácias mantiveram sua forma original, mantendo sua integridade, como pode ser observado nas imagens de contraste das Figuras 5.6(c) e 5.7(c).

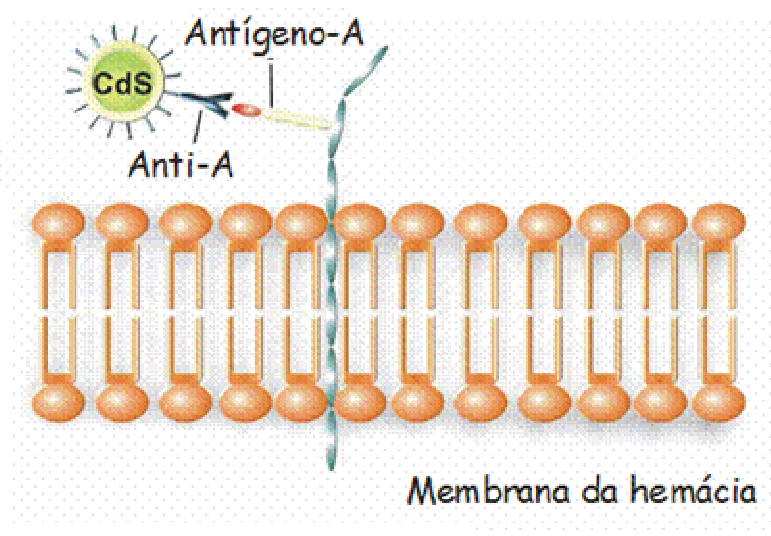


Figura 5.5 – Descrição esquemática da conjugação de CdS/Cd(OH)₂-Glut-Anti-A à membrana de hemácias, através de reação específica antígeno-anticorpo.

A análise das micrografias das hemácias A⁺ marcadas demonstra emissão dual de alta intensidade distribuída de maneira uniforme sobre a superfície das hemácias. Apresentam emissão na região do verde (500-560nm) e vermelho (560-750nm) sob excitação em 488 e 543 nm, respectivamente.

As hemácias tipo O⁺ também apresentaram emissão dual semelhante à observada para as hemácias A⁺ (Figura 5.7). Analisando-se os respectivos mapas de intensidade apresentadas na Figura 5.8 (obtidos de imagens nas mesmas condições experimentais de captura), no entanto fica claro que a emissão observada para hemácias tipo O⁺ é bem menos intensa.

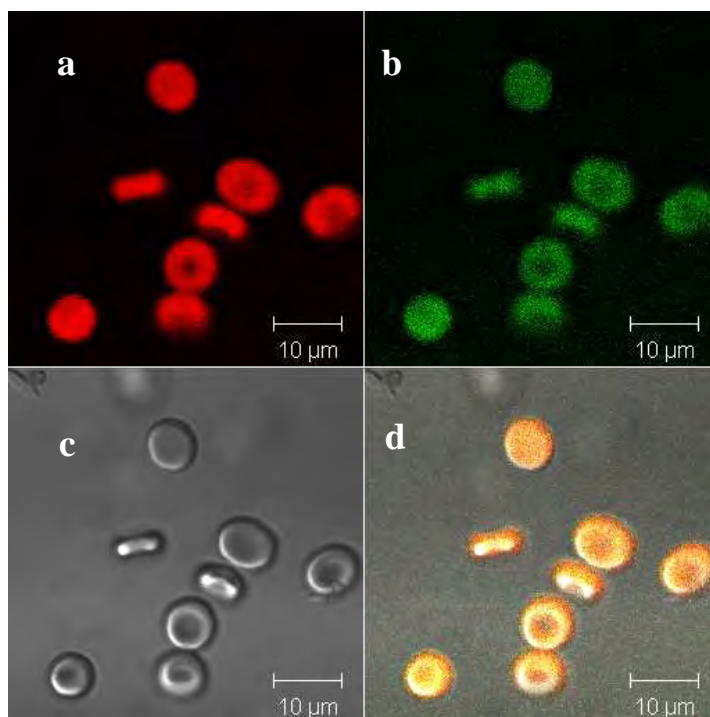


Figura 5.6 – Micrografias obtidas da luminescência das hemácias A⁺, após marcação com os NCs/glut/Anti-A. Micrografia da emissão coletada pelo canal 1 de filtro (a) e com excitação em 543 nm, coletada no canal 2 de filtro (b) e com excitação em 488. Micrografia de contraste de fase (c) e superposição de todas as micrografias (d).

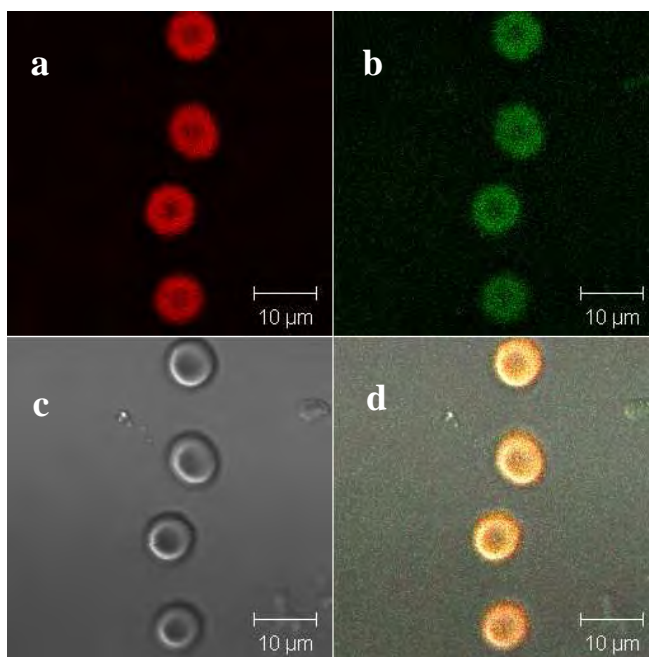


Figura 5.7 - Micrografias obtidas da luminescência das hemácias O⁺, após marcação com os NCs/glut/Anti-A. Micrografia da emissão coletada pelo canal 1 de filtro (a) e com excitação em 543 nm, coletada no canal 2 de filtro (b) e com excitação em 488. Micrografia de contraste de fase (c) e superposição de todas as micrografias (d).

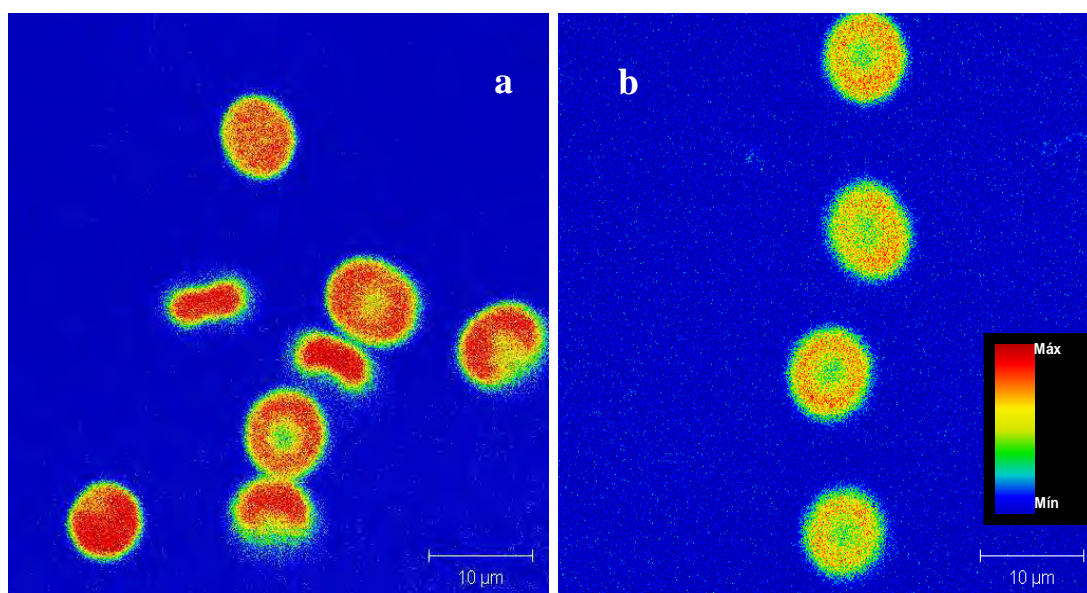


Figura 5.8 – Mapas de intensidade de hemácias A⁺ (a) e O⁺ (b) mostrando a diferença entre as intensidades das emissões exibidas.

Como descrito no Capítulo 4 (Seção 4.4.1.2) para a marcação direcionada das hemácias A⁺ utilizou-se a reação antígeno-anticorpo com a associação dos NCs ao Anti-

A. Baseado nisto existem duas considerações a se fazer com relação aos perfis de marcação obtidos nas hemácias A⁺ e O⁺. A primeira relaciona-se à marcação dos eritrócitos O⁺ e a segunda tange a emissão dual observada nos eritrócitos.

Como as hemácias tipo O⁺ não possuem antígenos A em sua superfície, outro processo deve estar sendo favorecido na associação entre os NCs e a membrana. Voltando ao protocolo desenvolvido para as marcações, percebe-se que pode existir uma quantidade residual de NCs-Glut na suspensão preparada que não se ligou ao Anti-A e que mantém-se ativa para associação direta aos resíduos amina de proteínas presentes na membrana citoplasmática. Estas espécies podem inclusive fazer parte do equilíbrio de conjugação descrito para a reação de conjugação. Um processo relativamente lento de associação de NC-Glut às moléculas de Anti-A nas condições experimentais utilizadas foi de fato observado através de espectroscopia de emissão destes sistemas (Figura 4.9 Seção 4.5.2, Capítulo 4). Para garantir que todos os NCs a serem utilizados na marcação sejam associados ao Anti-A, o processo de bioconjugação precisa ser otimizado.

Ainda levando em consideração os espectros de emissão dos conjugados, observa-se que, com o passar do tempo, surge uma banda larga de emissão no verde e outra bem menos intensa na região do vermelho que não existem no conjugado CdS/Cd(OH)₂-Glut. Esta mudança espectral, que foi sugerida no Capítulo 4 como sendo advinda de processos envolvendo transferência de energia entre o CdS/Cd(OH)₂ e o Anti-A mediado pelo glutaraldeído, pode ser a responsável pelo padrão de emissão observado nas hemácias A⁺. Por outro lado, um processo de mesma natureza pode também ser utilizado para explicar o padrão observado para a emissão dos eritrócitos O⁺ [7].

5.3.3 – Carcinogênese e a presença de carboidratos nas membranas celulares

5.3.3.1 – Introdução

Carcinogênese é o termo utilizado para designar os complexos processos de transformação que uma célula saudável sofre, tendo como resultado uma célula com elevada capacidade de proliferação e que é capaz de invadir o espaço de outras células, passando a agir como um organismo invasor. A esta célula pode-se denominar de célula tumoral e o conjunto ou aglomerado destas células denomina-se tumor. A capacidade de invasão do tumor em um dado tecido e sua velocidade de proliferação é o que determina sua malignidade ou benignidade [8].

Um dos tumores comuns em mulheres adultas é o chamado fibroadenoma. Este tumor é constituído por dois tipos de células: células fibrosas de sustentação e células glandulares. É formado dentro do tecido de sustentação da mama, conhecido como estroma, resultando em massas tumorais bem delimitadas com uma cápsula fibrosa em torno do tumor. É um tumor benigno, não se desenvolvendo de forma muito invasiva para os tecidos a sua volta [8].

Dentre os tipos de tumores existentes, sabe-se que alguns possuem uma super expressão de resíduos de carboidratos, isto é, apresentam estes carboidratos em quantidades superiores às células normais. Esta super expressão pode ser resultado da produção elevada de enzimas conhecidas como glicosil transferases, por mudanças ocorridas na organização da membrana das células tumorais ou pela apresentação de resíduos de carboidratos que normalmente encontram-se “mascarados” nas células. Há várias evidências de que esta super expressão de carboidratos na superfície das células tumorais possui um papel fundamental no processo de progressão e de metástase dos tumores, servindo como moléculas de adesão entre as próprias células tumorais, assim como ancoras entre os tumores e tecidos saudáveis [8,9].

Como já mencionado no Capítulo 4, as lectinas possuem diversas aplicabilidades na área de marcação biológica, devido a sua capacidade de se ligar especificamente a resíduos de carboidratos presentes em diversas estruturas celulares. Devido a esta característica particular das lectinas, estas biomoléculas são utilizadas nas pesquisas de imunohistoquímica, para a compreensão do processo de transformação tumoral, mediante acompanhamento das mudanças de expressão de carboidratos na superfície das membranas celulares [9-12]. Dentre as lectinas utilizadas para este tipo de

aplicação, a Concanavalina-A é bastante utilizada para reconhecimento de resíduos de glicose e manose situados na membrana celular de tecidos saudáveis e seus respectivos tecidos tumorais, com o intuito de se estudar a diferença no perfil destes carboidratos.

5.3.3.2 – Marcação de fibroadenomas

Amostras parafinizadas de tecido mamário saudável e de fibroadenoma foram obtidas no Banco de tecidos do laboratório de Patologia do LIKA – UFPE.

Inicialmente, cortes dos tecidos foram desparafinizados, utilizando-se para isso soluções de xilol e soluções de álcool a concentrações variadas (70%-100%). Os cortes foram imersos sequencialmente nestas soluções até que estivessem totalmente desparafinizados e rehidratados. Após a desparafinização, os cortes foram tratados com uma solução de tripsina a 0,1% por 2 minutos a 35°C, para a retirada de parte do colágeno que envolve os tecidos, e então foram encubados com a suspensão de NCs/glutaraldeído/Concanavalina-A (NCs/glut/ConA), durante um período de 2 horas a 35°C. Esta incubação foi realizada ainda com a adição de uma solução 5mg/100mL do composto conhecido como Azul de Evans (AE), utilizado para a supressão da auto fluorescência dos tecidos [13]. Realizou-se o mesmo procedimento com NCs não funcionalizados, com o intuito de se avaliar a emissão dos cortes por marcação não específicas dos NCs.

5.3.3.3 – Resultados e discussão

A Figura 5.9 representa o esquema de conjugação específica realizada nos tecidos de Fibroadenoma e normal.

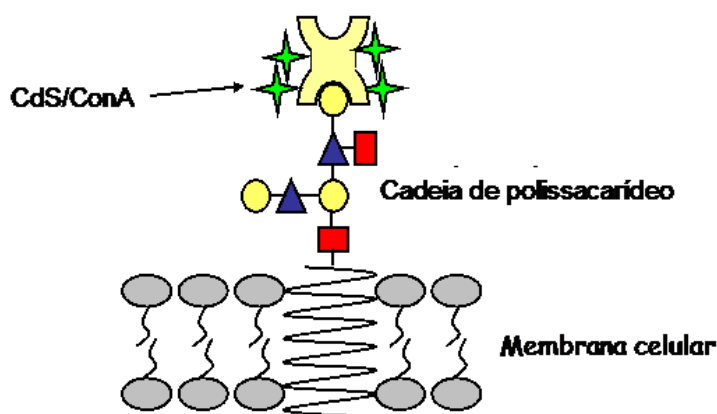


Figura 5.9 – Esquema representando o processo de marcação dos tecidos. As formas geométricas descritas na cadeia de polissacarídeo representam os carboidratos.

A Figura 5.10 mostra uma imagem típica obtida dos tecidos marcados com CdS/Cd(OH)₂/glut/ConA e tratados com Azul de Evans obtida através de microscopia confocal. Ela resulta da superposição de dois canais de excitação (488 e 543 nm) e mostra regiões pontuais e difusas de emissão na região verde (grupos de células) superpostas a uma região de emissão no vermelho. Esta última região é caracterizada por fibras de colágeno, ricas em espécies que causam a autofluorescência do tecido, como por exemplo, o triptófano. O Azul de Evans atua no sentido de deslocar a fluorescência para regiões de menor energia [13] possibilitando a visualização de fluoróforos emitindo no azul e no verde.

Com o intuito de verificar as contribuições de fluorescência na região de maior energia, das espécies no tecido marcado e não marcado, realizou-se a análise comparativa das contribuições coletadas na região espectral 500-560nm, mostradas nas Figuras 5.11 e 5.12.

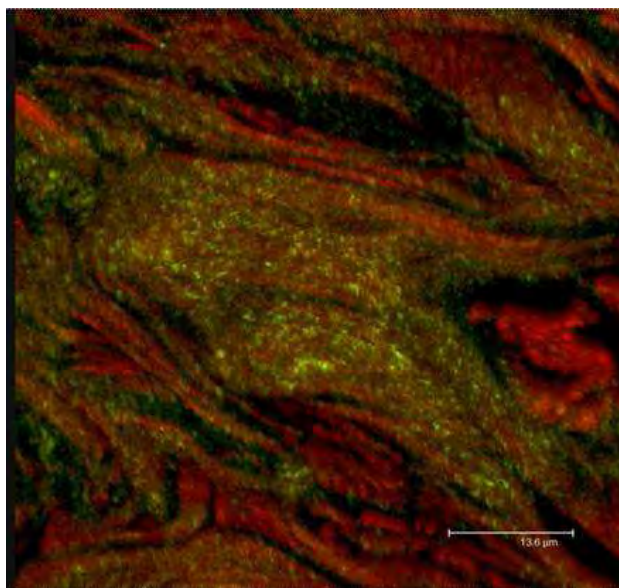


Figura 5.10 – Imagem típica de um corte de tecido de Fibroadenoma marcado com CdS/Cd(OH)₂/glut/ConA e tratado com Azul de Evans obtida através de microscopia confocal sob excitação dual em 488 e 543 nm.

A Figura 5.10 exibe as micrografias obtidas dos cortes de fibroadenoma tratados com AE e seus respectivos mapas de intensidade. As micrografias correspondem aos

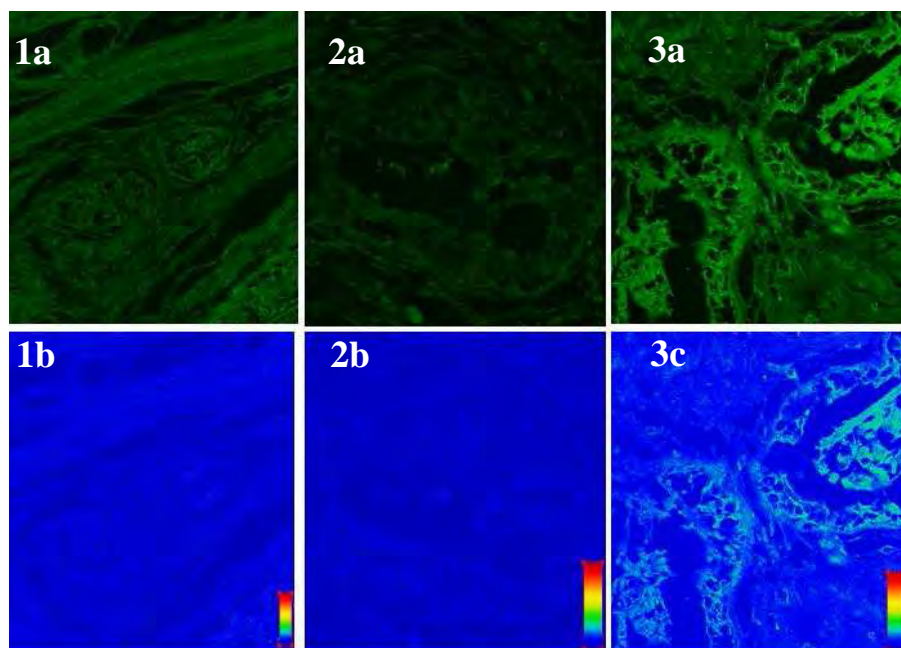


Figura 5.11 – Cortes de fibroadenomas de tecidos mamários. Corte tratado apenas com AE (1a); Corte marcado com NCs não funcionalizados e AE (2a); Corte marcado com NCs/glut/ConA e AE (3a). 1b, 2b e 3b são os respectivos mapas de intensidade.

cortes não marcados e marcados com os NCs e NCs/glut/ConA.

A partir da análise dos mapas de intensidade das três micrografias, observa-se que os cortes que foram tratados apenas com AE e AE/NCs (1a-1b e 2a-2b) não

apresentaram luminescência significativa, mostrando que os NCs não funcionalizados não promovem uma marcação de intensidade apreciável nos tecidos analisados. Entretanto, o corte marcado com NCs/glut/ConA exibe uma luminescência localizada mais intensa, o que sugere-se tratar dos sítios ricos em resíduos de manose e/ou glicose capazes de serem reconhecidos pelas lectinas na superfície dos NCs. Esta diferenciação é um indício de que a ConA direcionou a marcação dos NCs em locais selecionados nos cortes de fibroadenoma.

A Figura 5.12 exibe as micrografias de um corte de tecido saudável de mama e um corte de fibroadenoma, ambos tratados com AE e marcados com NCs/glut/ConA. Pode-se observar claramente que o tecido saudável possui uma luminescência inferior ao tecido tumoral. Uma explicação para esta emissão inferior é a diferença entre a expressão de carboidratos entre os tecidos analisados, sendo esta maior no fibroadenoma, o que pode resultar em uma maior marcação dos tecido tumoral pelos NCs funcionalizados com a Concanavalina-A [14].

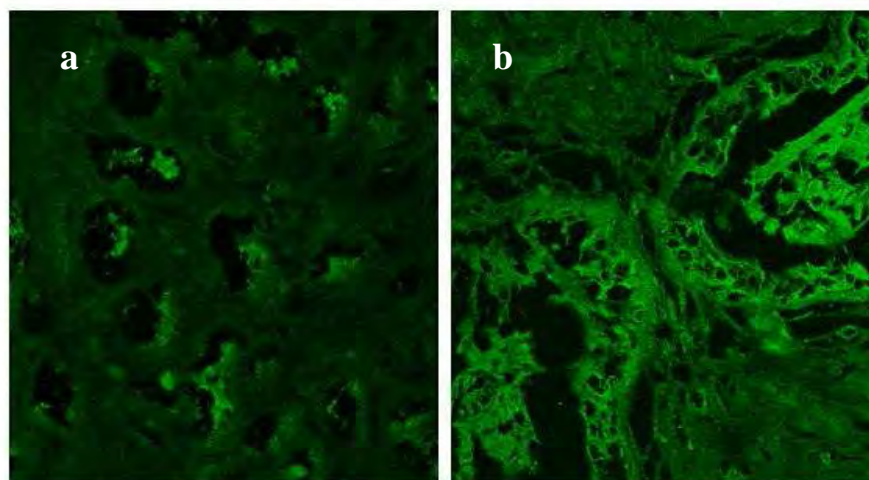


Figura 5.12 – Cortes de tecido mama saudável (a) e de fibroadenoma (b) tratados com AE e marcados com NCs/glut/ConA. Imagens coletadas na faixa entre 500-560nm.

5.4 – Referências

1. Hommel, M. J. *Infec.* 39 (1999) 101.
2. *Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento da Co-infecção Leishmania-HIV*, Série A – Normas e Manuais Técnicos, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Programa Nacional de DST e Aids, Editora MS, Brasília, 2004.
3. Rodrigues, N. E., Gaur, U., Wilson, M. E. *Cell. Microbiol.* 8 : 7 (2006) 1106.
4. Desjeux, P. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.* 27 (2004) 305
5. Santos, B. S., Farias, P. M. A., Menezes, F. D., Ferreira, R. C., Giorgio, S., Bosetto, M. C., Ayres, D. C., Fontes, A., Cesar, C. L., Lima, P. R. M., Mariano, E. A. L., Thomaz, A. A. *Spie*, 6097 (2006) 06
6. Daniels, G. Human Blood Groups. Londres, Blackwell Science, 2002.
7. Farias, P. M. A., Santos, B. S., Menezes, F. D., Cesar, C. L., Fontes, A., Lima, P. R. M., Castro, M. L. B., Castro, V., Ferreira, R. C. *Journal of Microscopy.* 219 : 3 (2005) 103.
8. Franks, L. M., Teich, N. M. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. 3ª Ed., Nova York, Oxford University Press Inc., 2001.
9. Ono, M., Hakomori, S. *Glycoconjugate J.* 20 (2004) 71.
10. Sharon, N., Lis, H. *Glycobiology.* 14: 11 (2004) 53.
11. Beltrão, E. I C., Medeiros, P. L., Rodrigues, O. G., Silva, J. F., Valença, M. M., Coelho, L. C. B B., Carvalho Jr., L. B. *Eur. J. Histochem.* 47 (2003) 139.
12. Zhivko Zhelev, Hideki Ohba, Rumiana Bakalova, Rajan Jose, Satoshi Fukuoka, Toshimi Nagase, Mitsuru Ishikawa and Yoshinobu Baba. *Chemical Communications.* 15 (2005) 1980.
13. Brookner, C. K., Follen, M., Boiko, I., Galvan, J. Thomsen, S., Malpica, A., Suzuki, S., Lotan, R., Richards-Kortum, R. *Photochemistry and Photobiology*, 71:6 (2000) 730.
14. Santos, B. S., Farias, P. M. A., Menezes, F. D., Ferreira, R. C., Junior, S. A., Figueiredo, R. C. B. Q., Beltrão, E. I. C. *Spie.* 6096 (2006) 1J

Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas

Como conclusões deste trabalho, pode-se afirmar que:

- Os processos empregados para a funcionalização dos NCs de CdS/Cd(OH)_2 mostraram-se satisfatórios para a utilização desse material como marcador luminescente para os sistemas biológicos estudados;
- Estudos ainda precisam ser realizados para a diminuição da dispersão de tamanho dos NCs de CdS sintetizados pela metodologia descrita;
- Há uma necessidade de se utilizar técnicas mais sensíveis e que trabalhem com pequenos volumes de amostras, para a correta avaliação da fotoluminescência dos NCs funcionalizados, visto que para o caso estudado dos NCs funcionalizados com Concanavalina-A não foi possível a caracterização espectroscópica dos cristais funcionalizados;
- As marcações biológicas realizadas demonstraram a viabilidade de utilização dos NCs funcionalizados como marcadores biológicos, embora o comportamento das emissões observadas para cada sistema biológico estudado mostrou-se nitidamente diferente dos NCs isolados, o que requer estudos mais aprofundados sobre os processos físicos envolvidos nas alterações espectroscópicas dos NCs, quando estes encontram-se conjugados a sistemas biológicos.
- Os estudos realizados sobre as metodologias de redução do telúrio e de obtenção de NCs luminescentes de CdTe mostraram que é viável a síntese desses nanocristais diretamente em meio aquoso, empregando-se métodos simples e de baixo custo. Os NCs obtidos mostraram propriedades estruturais e espectroscópicas semelhante aos materiais descritos na literatura, justificando a dedicação de esforços futuros para a melhoria das metodologias empregadas;
- Como perspectivas, tem-se os estudos de aplicação dos NCs de CdTe obtidos pelas metodologias desenvolvidas neste trabalho, para fins de marcação biológica, além do melhoramento das metodologias de obtenção dos dois tipos de NCs estudados neste trabalho (CdS/Cd(OH)_2 e CdTe/CdS) com o intuito de se obter populações de NCs com tamanhos médios menos dispersos, podendo-se ainda empregar métodos de precipitação seletiva para esta finalidade. Ainda

como perspectiva, tem-se a realização de caracterizações mais adequadas para os estudos dos processos envolvidos na fotoluminescência dos NCs conjugados a sistemas biológicos, sendo a medição do tempo de decaimento da fotoluminescência uma das técnicas a serem empregadas.

ANEXOS

Artigos publicados referentes aos trabalhos desenvolvidos durante a dissertação:

1. **FARIAS**, Patrícia Maria Albuquerque de ; **SANTOS**, B. S. ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; FERREIRA, Ricardo de Carvalho ; CARVALHO, H. F. ; OLIVEIRA, F. J. M. ; ROMÃO, Luciana ; AMARAL, Jane C O F ; MOURA NETO, Vivaldo ; FONTES, Adriana ; CESAR, Carlos Lenz . Application of colloidal semiconductor quantum dots as fluorescent labels for diagnosis of brain glial cancer. *Spie*, v. 6096, p. 60961, 2006.
2. **SANTOS**, B. S. ; FARIAS, Patrícia Maria Albuquerque de ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; FERREIRA, Ricardo de Carvalho ; ALVES JUNIOR, Severino ; FIGUEIREDO, Regina C B Q ; BELTRÃO, Eduardo I C . Lectin functionalized quantum dots for recognition of mammary tumours. *Spie*, v. 6096, p. 1J, 2006.
3. **SANTOS**, B. S. ; FARIAS, Patrícia Maria Albuquerque de ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; FERREIRA, Ricardo de Carvalho ; GIORGIO, Selma ; BOSETTO, Maira Cegatti ; AYRES, Diana Copi ; FONTES, Adriana ; CESAR, Carlos Lenz ; LIMA, Paulo Roberto Moura ; MARIANO, Erick Antônio Leite ; THOMAZ, André Alexandre de . Molecular Differentiation of Leishmania Protozoarium using CdS Quantum Dots as Biolabels. *Spie*, v. 6097, p. 06, 2006.
4. **FARIAS**, Patrícia Maria Albuquerque de ; **SANTOS**, B. S. ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; FERREIRA, Ricardo de Carvalho ; BRASIL JÚNIOR, Aluízio Gonçalves ; VIEIRA, A. A. S. ; SILVA, D. C. N. ; LIMA, L. B. ; ALMEIDA, D. ; FONTES, Adriana ; BARBOSA, Luis Carlos ; CESAR, Carlos Lenz . Monitoring activity of living cells marked with colloidal semiconductor quantum dots. *Spie*, v. 6088, p. 0G, 2006.
5. **FARIAS**, Patrícia Maria Albuquerque de ; **SANTOS**, B. S. ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; CESAR, Carlos Lenz ; FONTES, Adriana ; LIMA, Paulo Roberto Moura ; CASTRO, Maria de Lourdes Barjas ; CASTRO, Vagner ; FERREIRA, Ricardo de Carvalho . Core-shell CdS/Cd(OH)₂ quantum dots: synthesis and

- bioconjugation to target red cells antigens. *Journal of Microscopy-Oxford*, Londres, v. 219, n. 3, p. 103-108, 2005.
6. **FARIAS**, Patrícia Maria Albuquerque de ; **SANTOS**, B. S. ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; **FERREIRA**, Ricardo de Carvalho ; **FONTES**, Adriana ; **CASTRO**, Maria de Lourdes Barjas ; **CASTRO**, Vagner ; **LIMA**, Paulo Roberto Moura ; **CESAR**, Carlos Lenz . High fluorescent and stable semiconductor quantum dots for red blood cells labeling. *Spie*, San Jose, v. 5704, p. 265-270, 2005.
 7. **MOREIRA**, Wendel Lopes ; **FONTES**, Adriana ; **THOMAZ**, André Alexandre de ; **NEVES**, Antônio A R ; **BARBOSA**, Luis Carlos ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; **FARIAS**, Patrícia Maria Albuquerque de ; **SANTOS**, B. S. ; **CESAR**, Carlos Lenz . Synthesis and characterization of CdTe nanocrystals for applications as Biolabels. *Spie*, v. 5704, p. 36-40, 2005.
 8. **FARIAS**, Patrícia Maria Albuquerque de ; **SANTOS**, B. S. ; **MENEZES**, Frederico Duarte de ; **FERREIRA**, Ricardo ; **CASTRO**, Maria de Lourdes Barjas ; **CASTRO**, Vagner ; **LIMA**, Paulo Roberto Moura ; **FONTES**, Adriana ; **CESAR**, Carlos Lenz . Investigation of Blood Red Cells Antigens with Highly Fluorescent and Stable Semiconductor Quantum Dots. *Journal of Biomedical Optics*, New York, v. 10, n. 4, p. 44023-44026, 2005.
 9. **MENEZES**, Frederico Duarte de ; **BRASIL JÚNIOR**, Aluízio Gonçalves ; **MOREIRA**, Wendel Lopes ; **BARBOSA**, Luis Carlos ; **CESAR**, Carlos Lenz ; **FERREIRA**, Ricardo ; **FARIAS**, Patrícia Maria Albuquerque de ; **SANTOS**, B. S. . CdTe/CdS core shell quantum dots for photonic applications. *Microelectronics Journal*, Londres, v. 36, p. 989-991, 2005.