



Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco

CLAUDILENE RIBEIRO CHAVES

Síntese, Silanização e Caracterização de Pontos
Quânticos de CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂ Para
Aplicações em Sistemas Biológicos

Tese de Doutorado



RECIFE
2011



Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco

CLAUDILENE RIBEIRO CHAVES

Síntese, Silanização e Caracterização de Pontos Quânticos de CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂ Para Aplicações em Sistemas Biológicos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais vinculado ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, como parte das exigências necessárias para obtenção de título de Doutor(a) em Ciência de Materiais.

Orientadora:

Dr.^a Patrícia Maria Albuquerque de Farias

Co-orientadores:

Dr.^a Beate Saegesser Santos

Dr.^a Adriana Fontes

Dr. Severino Alves Júnior



RECIFE
2011

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Chaves, Claudilene Ribeiro.

Síntese , silanização e caracterização de pontos quânticos de CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂ para aplicações em sistemas biológicos / Claudilene Ribeiro Chaves. - Recife: O Autor, 2011.
153 f.: fig. tab.

Orientador: Patrícia Maria Albuquerque de Farias.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais, 2011.

Inclui bibliografia e anexo.

1.Nanotecnologia. 2.Materiais nanoestruturados.
3.Fluorescência. 4.Marcadores biológicos. I.Farias, Patrícia Maria Albuquerque de (orientadora). II. Título.

620.5 (22.ed.)

FQ 2011-016



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

CLAUDILENE RIBEIRO CHAVES

“SÍNTESE, SILANIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PONTOS QUÂNTICOS DE CdTe/ CdS E CdS/ Cd(OH)₂ PARA APLICAÇÕES EM SISTEMAS BIOLÓGICOS”

A Banca composta pelos Professores: PATRÍCIA MARIA ALBUQUERQUE DE FARIAS (Presidente), do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE; GIOVANNIA ARAUJO DE LIMA PEREIRA, do Departamento de Química Fundamental da UFPE; RENATO EVANGELISTA DE ARAÚJO, do Departamento de Eletrônica e Sistemas da UFPE; GILBERTO FERNANDES DE SÁ, do Departamento de Química Fundamental da UFPE; e OSVALDO ANTONIO SERRA, do Departamento de Química da USP/Ribeirão Preto; considera a Tese da candidata:

APROVADA () EM EXIGÊNCIA () REPROVADA

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, em 25 de março de 2011.

Patrícia M. Farias
PROF^a PATRÍCIA MARIA ALBUQUERQUE DE FARIAS
PRESIDENTE E 1º EXAMINADOR

Giovanna Araujo de Lima Pereira
PROF^a GIOVANNIA ARAUJO DE LIMA PEREIRA
2º EXAMINADOR

Renato Evangelista de Araujo
PROF. RENATO EVANGELISTA DE ARAÚJO
3º EXAMINADOR

Gilberto Fernandes de Sá
PROF. GILBERTO FERNANDES DE SÁ
4º EXAMINADOR

Oswaldo Antonio Serra
PROF. OSVALDO ANTONIO SERRA
5º EXAMINADOR

Aos meus pais: *Maria das Dores* e *Mário Chaves* pelos grandes
exemplos e ensinamentos!

Aos meus irmãos pela amizade, companheirismo e carinho.

Aos meus tios (as) e primos (as) que sempre acreditaram em mim.

Às “verdadeiras” amizades!

Agradecimentos

“Se pudéssemos ter consciência do quanto nossa vida é efêmera, talvez pensássemos duas vezes antes de jogar fora as oportunidades que temos de ser e de fazer os outros felizes. Nos entristecemos por coisas pequenas... perdemos minutos, horas, dias, às vezes anos! Nos calamos quando deveríamos falar; falamos demais quando deveríamos ficar em silêncio. Não damos o abraço que tanto nossa alma pede porque algo em nós impede essa aproximação. Não damos um beijo carinhoso "porque não estamos acostumados com isso" e não dizemos que gostamos porque achamos que o outro sabe automaticamente o que sentimos ...E passa a noite, chega o dia, o sol nasce e adormece e continuamos os mesmos, fechados em nós. Reclamamos do que não temos, ou achamos que não temos suficiente. Cobramos, dos outros, da vida, de nós mesmos... e com isso, passamos pela vida, não vivemos! Até que, inesperadamente, acordamos e olhamos pra trás. Então, nos perguntamos: e agora?! Agora, hoje, ainda é tempo de reconstruir alguma coisa, de dar o abraço amigo, de dizer uma palavra carinhosa, de agradecer pelo que temos. Nunca se é velho demais ou jovem demais para amar, dizer uma palavra gentil ou fazer um gesto carinhoso. Não olhe para trás. O que passou, passou! O que perdemos, perdemos! Olhe para frente... Ainda é tempo de apreciar as flores que estão inteiras ao nosso redor. Ainda é tempo de voltar-se para dentro e agradecer pela vida, que mesmo efêmera, ainda está em nós.”

Agradeço a Deus a graça de viver e toda oportunidade de aprendizado!

À Prof^ª. Patrícia M. A. de Farias pela orientação, atenção, carinho e oportunidade.

À Prof^ª. Beate S. Santos pelos ensinamentos, exemplos, práticas, amizade e atenção.

À Prof^ª. Adriana Fontes pela amizade, incentivo, orientação, companheirismo e toda dedicação.

Ao Prof. Severino Alves Júnior pela co-orientação e disponibilidade.

À amiga Prof^ª. Giovannia Pereira por toda contribuição, amizade e carinho!

À Prof^ª. Regina Bressan pela amizade e oportunidade de trabalhar com materiais biológicos.

Ao CNPq pelo financiamento.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Materiais: coordenador, vice, secretários e colegas.

À “todos” os amigos e funcionário do Laboratório de Biofísica-Química Prof. Ricardo Ferreira!

Ao Departamento de Química Fundamental (DQF) e ao Departamento de Física (DF) da UFPE.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e ao amigo Diogo Burigo pelas belas imagens.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para finalização deste trabalho:

Aos novos amigos que me acolheram no Nordeste. Em especial, as amigas Cinthia, Patrícia e Glaucia Alves! Obrigada pela amizade, momentos de conforto, descontração, cuidado e carinho!

Aos meus pais: Maria das Dores e Mário Chaves pela educação, ensinamentos, incentivo, amor, confiança; por todos os momentos felizes desta caminhada... e meus irmãos pelo carinho, amizade e companheirismo. Obrigada a todos os meus familiares (tias, tios e primos) que mesmo distantes torceram e vibraram com minhas conquistas! Em especial, Neli Chaves e Geralda Chaves!

De tudo ficam três coisas:

*“A certeza de estarmos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminarmos...”*

Fernando Sabino

Resumo

Pontos quânticos (PQs ou QDs – *quantum dots*) são nanopartículas de semicondutores da ordem de 1 a 10 nm que apresentam propriedades óticas dependentes do tamanho devido a efeitos de confinamento quântico. Neste trabalho destacamos metodologias para síntese de PQs de sulfeto de cádmio (CdS/Cd(OH)₂) e telureto de cádmio (CdTe/CdS) que são materiais semicondutores tipo II-VI. Estes materiais vêm sendo utilizados como marcadores de células e tecidos devido às suas propriedades luminescentes na região do visível. Métodos de síntese coloidal das nanopartículas são baseados na redução química de sais ou na decomposição controlada de compostos organometálicos metaestáveis em soluções orgânicas. Para aplicações biológicas, a síntese em meio orgânico torna-se desvantajosa. Para a obtenção de PQs de CdS passivados com Cd(OH)₂ utilizamos duas metodologias diferentes quanto a fonte de enxofre: na primeira, utilizamos o gás sulfídrico (H₂S), metodologia já bem estabelecida no grupo. Mas, devido à toxicidade do H₂S e a falta de reprodutibilidade na quantificação do gás utilizado na síntese (pois o gás é incolor), realizamos novas sínteses utilizando a tioacetamida (C₂H₅NS), sólido cristalino branco, solúvel em água. Os resultados mostram que a tioacetamida pode ser utilizada para obter íons sulfeto, substituindo assim, o uso do H₂S. Também sintetizamos nanopartículas de CdTe passivadas com CdS utilizando diferentes estabilizantes. Todas as sínteses de CdTe foram realizadas em meio aquoso ou tampão salino fosfato trazendo ainda mais vantagens para aplicações biológicas. Sintetizamos PQs de CdTe com emissão no verde e no vermelho, dependendo das condições sintéticas e do estabilizador utilizado. Na tentativa de melhorar a estabilidade dos PQs de CdS/Cd(OH)₂ em meio aquoso e proteger a camada de passivação da ação do pH e enzimas (quando aplicados nos sistemas biológicos), recobrimos estes PQs com sílica (SiO₂) utilizando duas metodologias distintas: silicato de sódio e processo sol-gel. Por último, utilizamos PQs CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂ para marcações biológicas em culturas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, parasitas causadores da Doença de Chagas e Leishmaniose, respectivamente. Para estas marcações também conjugamos os PQs com poli(etileno glicol) e transferrina (proteína modelo para estudos da via endocítica em parasitas). Com estes resultados poderemos ampliar a aplicação destes nanomateriais tanto em novas tecnologias como no desenvolvimento de novos protocolos para marcação celular. Estudos e aplicações de PQs demonstram que essas partículas são eficazes como novas sondas luminescentes para finalidades diagnósticas.

Palavras-chaves: Pontos quânticos, sulfeto de cádmio (CdS), telureto de cádmio (CdTe), marcadores fluorescentes, silanização, sistemas biológicos.

Abstract

Quantum dots (QDs) are semiconductor nanoparticles ranging from 1 to 10 nm. They present size dependent optical properties due to the quantum confinement regimen. In this work we presented methodologies for synthesis of (CdS/Cd(OH)₂) and (CdTe/CdS) QDs. These materials have been used for labeling cells and tissues due to their luminescent properties in the visible region. Methodologies employed in QDs colloidal synthesis are mostly based in the chemical reduction of salts or in the controlled decomposition of organometallic compounds (which present metastable behavior in organic media). For biological purposes, the use of organic synthesis is disadvantageous. For obtaining CdS QDs passivated with Cd(OH)₂ we used two different methodologies based on in the sulfur ions source. First, we use hydrogen sulfide (H₂S), a methodology well established in the group. But due to the toxicity of H₂S and lack of reproducibility in the quantification of gas to be used in the synthesis (because the gas is colorless), we performed new syntheses using thioacetamide (C₂H₅NS), white crystalline solid, soluble in water. These results show that H₂S as well as thioacetamide can be used as source of sulfide ions. We also synthesized CdTe nanoparticles passivated with CdS using different stabilizers. All syntheses of CdTe were performed either in phosphate buffered saline or aqueous media bringing more advantages for biological applications. CdTe QDs present emission in green and red region. For improving the stability of QDs of CdS/Cd(OH)₂ in water and for protecting the passivation layer of the action of enzymes and pH (when applied in biological systems), these QDs were coated with silica by two methods: sodium silicate and sol-gel process. Finally, we used CdTe/CdS and CdS/Cd (OH)₂ QDs as luminescent labels of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* parasites that respectively are responsible to Chagas disease and Leishmaniasis. For this, we also conjugate the QDs with poly (ethylene glycol) and transferrin (protein model to study the endocytic pathway in parasites). With these results we can extend the application of nanomaterials not only for new technologies but also for the development of new protocols for cell and tissues using QDs as fluorescent labels. Studies and applications of QDs have shown that these nanoparticles are effective as new luminescent probes for diagnostic purposes.

Keywords: Quantum dots, cadmium sulphide (CdS), cadmium telluride (CdTe), fluorescent labeled, silanization, biological system.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Região proibida – <i>band gap</i> (E_g)	26
Figura 2.2: Orbital molecular	26
Figura 2.3: Rearranjo de orbitais de sistema poliatômico	27
Figura 2.4: Níveis de energia de acordo com o número de átomos conectados. Comparação dos níveis de energia desde um átomo até um material macroscópico	28
Figura 2.5: Ponto quântico <i>core-shell</i> : núcleo (E_g) e casca (E_g')	28
Figura 2.6: Esquema de formação de um éxciton. (h^+) representa o buraco gerado na banda de valência pela excitação do elétron (e^-)	29
Figura 2.7: Elementos da família VIA (calcogênios) e IIB (metais de transição) da tabela periódica constituintes dos pontos quânticos II-VI	30
Figura 2.8: Discretização dos níveis de energia	31
Figura 2.9: Tipos de confinamentos	32
Figura 2.10: Espectros de absorção (linhas contínuas) e emissão (linhas pontilhadas) de quantum dots de CdSe/ZnS de diferentes tamanhos	35
Figura 2.11: Dependência do espectro de emissão com diâmetro da partícula	35
Figura 2.12: Diagrama de LaMer	38
Figura 2.13: Nanopartícula: (a) sem camada de passivação e (b) com passivação	40
Figura 2.14: Esquema exemplificando a funcionalização	42
Figura 2.15: Tipos de Conjugação (eletrostática, hidrofóbicas ou covalente)	44
Figura 2.16: Tipos de funcionalização ou interações	45
Figura 3.1: Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes utilizados para obtenção de CdTe: (a) Ácido mercaptoacético (AMA), (b) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP) e (c) ácido mercaptosuccínico (AMS)	55
Figura 3.2: Esquema geral do procedimento experimental para obtenção de nanopartículas de CdTe/CdS	56
Figura 3.3: Tentativas para redução do telúrio e obtenção de PQs de CdTe/CdS.....	60
Figura 3.4: Suspensões de CdTe/CdS após intervalos de aquecimento	61
Figura 3.5: Espectro de absorção da suspensão de CdTe/CdS após aquecimento	61
Figura 3.6: Processo reacional de redução do Te^{1-} para Te^{2-} em meio aquoso	62
Figura 3.7: Fotografias da suspensão de CdTe (AMA) (a) e fluorescência da suspensão quando excitada com lâmpada UV (b)	62
Figura 3.8: Espectros de absorção e emissão da suspensão de CdTe/CdS com AMA	63

Figura 3.9: Difratoograma de Raios-x de PQs de CdTe/CdS com AMA	63
Figura 3.10: Microscopia eletrônica de transmissão de PQs de CdTe/CdS com AMA. (Esquerda) Barra = 5 nm (Direita) Barra = 2 nm	64
Figura 3.11: Redução do Te^{1-} para Te^{2-} (esquerda) e formação de PQs de CdTe/CdS em meio aquoso (direita)	65
Figura 3.12 Espectro de absorção e emissão de PQs de CdTe/CdS com AMP	66
Figura 3.13: Suspensão de CdTe/CdS com AMP, excitada com lâmpada UV	66
Figura 3.15: Difratoograma de Raios-X de PQs de CdTe/CdS com AMP	67
Figura 3.16: Espectro de absorção (em vermelho) e emissão (em preto) de PQs de CdTe/CdS com MAS	68
Figura 3.17: Suspensão de CdTe/CdS com AMS em água	68
Figura 3.18: Difratoograma de Raios-X de PQs de CdTe/CdS com MAS	69
Figura 3.19: Microscopia eletrônica de transmissão de pontos quânticos de CdTe/CdS com AMS. (Esquerda) Barra = 50 nm (Direita) Barra = 10 nm	69
Figura 3.20: Espectros de absorção e emissão de PQs de CdTe/CdS com AMS, diferentes tempos de aquecimento	70
Figura 3.21: PQs de CdTe/CdS com AMS em PBS	71
Figura 3.22: Espectro de excitação e emissão da suspensão de CdTe/CdS com AMS sintetizado em água e em PBS após 420 minutos de aquecimento	72
Figura 3.23: Espectros de absorção de suspensões de CdTe/CdS com AMS, sintetizadas em PBS após diferentes tempos de aquecimento	72
Figura 4.1: Síntese de nanopartículas de sulfeto de cádmio (CdS) utilizando o H_2S (fonte de íons S^{2-})	78
Figura 4.2: Espectros de absorção e segunda derivada de suspensões de CdS e CdS/Cd(OH) ₂	79
Figura 4.3: Espectro de excitação e emissão de CdS/Cd(OH) ₂ com H_2S	80
Figura 4.4: Difratoograma de Raios-X e MET de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ preparados utilizando-se H_2S como agente precursor	81
Figura 4.5: Esquema representativo: preparação de nanopartículas de sulfeto de cádmio (CdS) com $\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$ em meio aquoso	83
Figura 4.6: Quebra da tioacetamida de acordo com o pH	84
Figura 4.7: Difratoograma de Raios-X de PQs de CdS com $\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$	84
Figura 4.8: MET de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ com $\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$ (síntese por ultrassom)	85

Figura 4.9: Espectros de absorção eletrônica de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ utilizando a tioacetamida como agente precursor (síntese assistida por ultrassom)	86
Figura 4.10: Espectros de excitação e emissão de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ obtidas com a utilização da tioacetamida como agente precursor (síntese assistida por ultrassom), (razão molar Cd/S = 2)	87
Figura 4.11: Espectros de absorção eletrônica de suspensões de CdS/Cd(OH) ₂ obtidos utilizando a tioacetamida como fonte de S ²⁻ em síntese assistida por microondas	89
Figura 4.12: Espectros de emissão de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ com C ₂ H ₅ NS (síntese hidrotérmica assistida por microondas), para Cd/S = 1	90
Figura 4.13 Espectros de absorção eletrônica para suspensões de CdS/Cd(OH) ₂ obtidas pelas três metodologias otimizadas. Cd/S = 1 para síntese direta e assistida por microondas, Cd/S = 2 para síntese assistida por ultrassom	91
Figura 4.14: Espectros de emissão das sínteses otimizadas de CdS/Cd(OH) ₂ para (A) Cd/S = 1 (H ₂ S); (B) Cd/S = 1 (C ₂ H ₅ NS) Microondas e (C) Cd/S = 2 (C ₂ H ₅ NS) Ultrassom (λ _{exc} = 365 nm)	92
Figura 4.15: Etapa de recobrimento de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ com sílica (metodologia utilizando silicato de sódio)	93
Figura 4.16: Imagens de MET de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ , silanização utilizando NaSiO ₂ . (a) Barra = 100 nm, (b) barra = 20 nm e (c) barra = 10 nm	94
Figura 4.17: (a) Espectro de absorção e emissão (λ _{exc} = 365 nm) da suspensão controle de CdS/Cd(OH) ₂ , (b) espectro de absorção das diferentes alíquotas silanizadas (1) suspensão controle de CdS/Cd(OH) ₂ , (2) CdS/Cd(OH) ₂ + NaSiO ₂ (3) CdS/Cd(OH) ₂ + excesso NaSiO ₂	95
Figura 4.18: Espectros de emissão CdS/Cd(OH) ₂ antes (linha sólida) e após silanização (linha tracejada)	96
Figura 4.19: Mecanismo de catálise básica	99
Figura 4.20: Espectro de absorção de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ - silanização com TEOS ..	100
Figura 4.21: Espectro de emissão de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ - silanização com TEOS	100
Figura 4.22: Imagens por MET de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ após tentativa de silanização utilizando TEOS	101
Figura 4.23: Espectro de absorção da suspensão de CdS/Cd(OH) ₂ , controle e amostras submetidas a silanização (0,05mM; 0,5 mM; 1,0 mM e 2,5 mM de TEOS)	102
Figura 4.24: Espectro de emissão da suspensão de CdS/Cd(OH) ₂ , controle e amostras submetidas a silanização (0,05mM; 0,5 mM; 1,0 mM e 2,5 mM de TEOS)	102

Figura 4.25: Imagens por MET do revestimento de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ com diferentes concentrações de TEOS	103
Figura 5.1: Fotodegração em função do tempo: antígenos nucleares corados com <i>Alexa Fluor 488</i> e microtúbulos corados com <i>PQs 605-CdSe</i>	110
Figura 5.2: Esquema ilustrativo mostrando a versatilidade dos PQ quando comparados com os fluoróforos orgânicos convencionais	111
Figura 5.3: Espectros comparativos de absorção (ciano) e emissão (verde) típicos de PQs e moléculas orgânicas utilizados como marcadores fluorescentes	112
Figura 5.4: Ilustração exemplificando uma funcionalização de PQs a transferrina	113
Figura 5.5: Esquema de síntese, passivação e funcionalização da suspensão de CdS/Cd(OH) ₂ com PEG	114
Figura 5.6: Representação esquemática do ensaio de conjugação. A proteína conjugada ao PQs liga-se a placa de poliestireno	115
Figura 5.7: Espectros de excitação (preto) e emissão (vermelho) de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ funcionalizadas com PEG-1000. Intensidade máxima de emissão 350000	118
Figura 5.8: (a) Imagens por MET de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ funcionalizadas com PEG-1000 (barra=20nm); (b) zoom da imagem (a)	119
Figura 5.9: Espectro de emissão dos PQs e PQs conjugados a transferrina (Tf). Suspensão CdS/Cd(OH) ₂ (esquerda) e CdTe/CdS (AMA) (direita)	120
Figura 5.10: Marcação de <i>T. cruzi</i> com CdS/Cd(OH) ₂ com PEG-1000	121
Figura 5.11: Microscopia confocal: <i>L. amazonensis</i> marcada com CdTe/CdS (AMA)	122
Figura 5.12: Microscopia confocal: <i>L. amazonensis</i> marcada com CdTe/CdS (AMS)	122
Figura 5.13: Curva de crescimento do <i>T. cruzi</i>	123
Figura 5.14: Análise da toxicidade: <i>T. cruzi</i> (diferentes concentrações de PQs)	124

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Quantidades de reagentes para cada síntese de CdTe/CdS	58
Tabela 3.2: Valores de tamanho de PQs de CdTe/CdS	70
Tabela 3.3: Cálculo para obtenção do tamanho das partículas utilizando o primeiro máximo de absorção para cada tempo de aquecimento	71
Tabela 4.1: Condições experimentais para preparação de CdS utilizando a tioacetamida ...	83
Tabela 4.2: Precursores e quantidades utilizados na síntese hidrotérmica assistida por microondas	88
Tabela 4.3: Metodologias para silanização utilizando silicato de sódio (NaSiO ₂)	92
Tabela 4.4: Concentração molar de reagentes utilizados para revestimento de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ com camada de SiO ₂ segundo sequência 2	97
Tabela 5.1: Sistemas utilizados para ensaios de conjugação	115
Tabela 5.2: Resultados do fluoroimunoensaio em placas de poliestireno. O sinal alto para CdTe/CdS (AMA) com Tf mostra que os pontos quânticos foram conjugados a proteína. Além dos sistemas testados mostramos o sinal de fluorescência (unidades arbitrárias) para os poços	119

Lista de abreviaturas e siglas

PQs – Pontos Quânticos	TEOS - Tetraetilortossilicato
MFA – Microscopia de Força Atômica	MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
CdS – Sulfeto de Cádmio	DRX – Difração de Raios-X
ZnS – Sulfeto de Zinco	Hg – Mercúrio
TOPO - Óxido de trioctilfosfina	Xe – Xenônio
TOP – Trioctilfosfina	Cd ²⁺ – Íons Cádmio
Cd(OH) ₂ - Hidróxido de Cádmio	S ²⁻ – Íons Sulfeto
CdTe – Telureto de Cádmio	ppm – Parte Por Milhão
[NaPO ₃] ₉ – Polifosfato de Sódio	μL – Microlitro
C ₂ H ₅ NS – Tioacetamida	K _{ps} – Constante de Solubilidade
AMA – Ácido Mercaptoacético	UV – Ultra-Violeta
AMP – Ácido Mercaptopropiônico	
AMS - Ácido Mercaptosuccínico	
m – Metro	
nm – Nanômetro	
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	
CdSe – Seleneto de Cádmio	
ZnO – Óxido de Zinco	
BV – Banda de Valência	
BC – Banda de Condução	
eV – Eletronvolts	
E _g – Região proibida (<i>band gap</i>)	
QDs – Quantum Dots	
a _B – Raio de Bohr	
m* – Massa Efetiva	
μm – Micrômetro	
PAA – Poli(ácido acrílico)	
CIS – L-cisteína	
PEG – Poli(etilenoglicol)	
SiO ₂ – Sílica	
Na ₂ SiO ₃ – Silicato de Sódio	

Sumário

Resumo	06
Abstract.....	07
Lista de Figuras	08
Lista de Tabelas	12
Lista de abreviaturas e siglas	13
CAPÍTULO 1: Introdução Geral	16
1.1 Apresentação do trabalho.....	17
1.2 Objetivos	20
Referências	21
CAPÍTULO 2: Referencial bibliográfico.....	23
2.1 Nanotecnologia: por quê nano?	24
2.2 Nanocristais de semicondutores.....	25
2.3 Pontos quânticos (<i>quantum dots</i>)	28
2.3.1 Confinamento quântico em semicondutores	30
2.4 Propriedades óticas de semicondutores	34
2.5 Métodos de síntese de nanocristais de semicondutores	36
2.6 Estabilidade de suspensões coloidais de pontos quânticos	39
2.7 Passivação dos nanocristais	40
2.8 Funcionalização dos nanocristais.....	41
2.8.1 Silanização	45
2.9 Caracterizações dos nanocristais	46
2.9.1 Caracterizações estruturais	46
2.9.2 Caracterizações espectroscópicas	48
Referências	49
CAPÍTULO 3: Síntese, passivação e caracterização dos pontos quânticos de Telureto de Cádmio passivado com Sulfeto de Cádmio (CdTe/CdS)	53
3.1 Introdução	54
3.2 Procedimentos experimentais	55
3.2.1 Síntese de CdTe/CdS utilizando ácido mercaptoacético (AMA)	56
3.2.2 Síntese de CdTe/CdS utilizando ácido mercaptopropiônico (AMP)	56
3.2.3 Síntese de CdTe/CdS utilizando ácido mercaptosuccínico (AMS)	57
3.2.4 Caracterização estrutural das suspensões coloidais	58
3.2.5 Caracterização ótica das suspensões coloidais	59

3.3 Resultados e discussões	60
3.3.1 Pontos quânticos de CdTe/CdS com (AMA)	60
3.3.2 Pontos quânticos de CdTe/CdS com (AMP)	65
3.3.3 Pontos quânticos de CdTe/CdS com (AMS)	67
3.4 Conclusões	73
Referências	74
CAPÍTULO 4: Síntese, caracterização e silanização de pontos quânticos de sulfeto de cádmio, passivadas com hidróxido de cádmio CdS/Cd(OH)₂	75
4.1 Introdução	76
4.2 Pontos quânticos de CdS/Cd(OH) ₂ com gás sulfídrico	77
4.2.1 Procedimentos experimentais	75
4.2.2 Resultados e discussões	79
4.3 Pontos quânticos de CdS/Cd(OH) ₂ com tioacetamida	82
4.3.1 Síntese assistida por ultrassom	82
4.3.2 Síntese hidrotérmica assistida por microondas	88
4.3.3 Comparação dos processos sintéticos para a obtenção de PQs de CdS/Cd(OH) ₂	90
4.4 Silanização de PQs de CdS/Cd(OH) ₂ com H ₂ S	92
4.4.1 Silanização utilizando silicato de sódio (NaSiO ₂)	93
4.4.2 Silanização utilizado tetraetilortossilicato (TEOS)	96
4.5 Conclusões Gerais	105
Referências	106
CAPÍTULO 5: Aplicações dos pontos quânticos em marcação celular	108
5.1 Introdução	109
5.2 Procedimentos experimentais	114
5.2.1 Ensaio de Funcionalizações/conjugações	114
5.2.2 Ensaio de marcação biológica	116
5.2.3 Análise da toxicidade dos pontos quânticos	117
5.3 Resultados e discussões	118
5.3.1 Ensaio de Funcionalizações/conjugações	118
5.3.2 Ensaio de marcação biológica	120
5.3.3 Análise da toxicidade dos pontos quânticos	123
5.4 Conclusões	125
Referências	126
CAPÍTULO 6: Conclusões e Perspectivas	129

ANEXOS	133
ANEXO 1: Breve descrição sobre a Física do estado sólido	134
ANEXO 2: Cálculo para obtenção do tamanho das partículas segundo aproximação da massa efetiva	144
ANEXO 3: Limite de Tolerância para H ₂ S	145
ANEXO 4: Artigos publicados	146

1 Introdução Geral

1.1 Apresentação do trabalho

Recentemente, a nanociência e a nanotecnologia têm despertado grande interesse acadêmico e tecnológico. Trabalhos relacionando materiais em nanoescala poderão atingir novas tecnologias e ajudar no desenvolvimento e no uso de ferramentas para aplicações multidisciplinares.

Nos últimos anos a ênfase em nanocristais coloidais tem ganhado espaço devido ao ajuste do tamanho dos materiais e conseqüente controle de suas propriedades. Tal interesse se deve principalmente às propriedades físicas e químicas que os materiais em nanoescala (no intervalo de 1–100 nm) apresentam. As nanopartículas e/ou nanocristais podem apresentar propriedades diferentes daquelas observadas para os mesmos materiais na escala microscópica e/ou macroscópica. A literatura apresenta vários exemplos de propriedades afetadas pelo tamanho, como propriedades ópticas, magnéticas, ponto de fusão, calor específico, reatividade superficial, dentre outras [1,2]. Em tamanhos muito reduzidos (1–10 nm) alguns materiais tendem a apresentar uma discretização de suas propriedades com o aparecimento de efeitos quânticos que estão diretamente relacionados com o tipo de ligação química presente no nanocristal [3]. Correlações entre propriedades e tamanho de partículas são conhecidas desde 1857, quando M. Faraday demonstrou que as suspensões de nanopartículas de ouro coloidal sofriam espalhamento através do fenômeno de difração [4].

Sob circunstâncias ideais, os nanocristais também conhecidos como pontos quânticos (PQs), podem ter um elevado rendimento quântico, faixas estreitas de emissão podendo também fornecer diferentes emissões, dependendo dos respectivos tamanhos, usando um único comprimento de onda para excitação. Eles também apresentam várias vantagens em relação aos marcadores orgânicos, pois, além de serem altamente luminescentes, não sofrem fotodegradação, apresentam larga faixa de comprimentos de ondas para excitação, picos de fluorescência simétricos e emissão (fluorescência) em comprimentos de ondas ajustáveis pelo tamanho da partícula [5,6].

Os primeiros trabalhos que exploraram as características dos PQs para utilização como marcadores biológicos, foram publicados simultaneamente em 1998 [6,7]. Desde então, surgiram diversas aplicações dessa classe de materiais como biomarcadores.

Os estudos e aplicações de PQs os revelam eficazes como novas sondas luminescentes para finalidades de diagnóstico. O direcionamento bem sucedido da partícula para marcar um determinado tipo de biomolécula, inclui a habilidade de alcançar tecidos e

tipos específicos de células. Diversos autores mostraram marcações de células [7] e de tecidos inteiros através de modificações na superfície de diferentes PQs.

O recente desenvolvimento desses nanocristais de semicondutores levanta a possibilidade de sua utilização como sondas para Microscopia de Fluorescência, Microscopia Confocal e até para Microscopia de Força Atômica (MFA) [8]. Estudos vêm utilizando a MFA para visualizar PQs conjugados à estreptavidina para identificar moléculas específicas em membranas de eritrócitos humanos. Os PQs oferecem grande potencial como novos fluoróforos para imagens na biologia devido, também, à alta resistência à fotodegradação [9-11].

A síntese e preparação de nanopartículas de semicondutores têm tido um enorme desenvolvimento nas últimas duas décadas. Em 1982, Henglein publicou um dos primeiros trabalhos sobre o estudo e preparação das propriedades de nanocristais de semicondutores luminescentes do tipo II-VI. Neste trabalho eles descreveram a síntese e caracterização óptica de nanocristais de sulfeto de cádmio (CdS) e co-colóides de sulfeto de cádmio e zinco (CdS-ZnS) [12]. A partir daí, houve um crescimento considerável no número de trabalhos empregando técnicas de química coloidal para a obtenção de semicondutores do tipo III-V, II-IV, II-VI e I-VI [13-15].

Em 1988 Steigerwald *et al.* descreveu uma síntese por precipitação controlada (*arrested precipitation*) em solvente orgânico onde obteve um bom controle de tamanho, o recobrimento da superfície e isolamento dos clusters estabilizados [16]. A partir de então as sínteses usando solventes orgânicos têm sido amplamente exploradas, principalmente com o solvente óxido de trioctilfosfina (TOPO) e o estabilizante trioctilfosfina (TOP) [17]. Essa síntese ficou conhecida como TOP-TOPO. O maior problema com esse método é o fato de que a solução final não é aquosa e os PQs não podem ser utilizados diretamente nas células. Para utilização, estes são separados do solvente através de precipitação seguida de redispersão em meio aquoso. Além disso, a síntese em TOP-TOPO é realizada em altas temperaturas (300°C) e os organometálicos são usualmente caros e muito tóxicos. Os tensoativos utilizados nestes métodos eram hidrofóbicos dificultando sua posterior aplicação.

Através destas observações, conclui-se que a síntese diretamente em meio aquoso seria um método mais vantajoso para aplicação direta na biologia.

Diversos métodos têm sido propostos para a síntese aquosa, como o utilizado por Gaponik *et al.* (2002) [18]. Para essas sínteses, geralmente utilizam-se tióis, cadeias

carbônicas com um grupo funcional de enxofre, para a estabilização da reação e obtenção de PQs com superfície já ativa para ancorar proteínas.

Devido à grande repercussão do uso desses materiais como biomarcadores, estamos trabalhando para compreensão de novas sínteses de PQs, bem como no melhoramento das sínteses já desenvolvidas e em possíveis modificações de protocolos de marcação, com o objetivo de substituir os fluoróforos orgânicos por PQs.

O futuro de novas tecnologias depende principalmente do desenvolvimento de rotas de síntese reprodutíveis para processamento de materiais nanométricos, bem como de metodologias para controle específico do crescimento, tamanho e manipulação das nanoestruturas obtidas.

A síntese em meio aquoso e o uso de PQs luminescentes para substituir marcadores convencionais, por exemplo, é uma inovação relevante para este trabalho, juntamente com a capacidade de visualizar imagens com alto brilho e boa resolução.

Este trabalho está dividido em capítulos onde, em Referencial Bibliográfico (Capítulo II), daremos ênfase às propriedades dos PQs, nanocristais de semicondutores. O entendimento do confinamento quântico em partículas muito pequenas é a base da compreensão das propriedades que serão descritas posteriormente. No Capítulo II, introduziremos o conceito de semicondutores e confinamento quântico. Embora as principais rotas de síntese de nanopartículas de semicondutores seja conhecida há algumas décadas, novos avanços serão relatados na Seção 2.6.

No Capítulo III descrevemos as metodologias utilizadas para obtenção de PQs de telureto de cádmio (CdTe) com diferentes estabilizantes. No Capítulo IV destacamos metodologias experimentais para síntese de PQs de sulfeto de cádmio (CdS) passivadas com hidróxido de cádmio $\text{Cd}(\text{OH})_2$. Descrevemos uma nova metodologia para substituição do gás sulfídrico (fonte de enxofre na reação) juntamente com os métodos de caracterização utilizados, além de metodologias de silanização destas nanopartículas de modo a torná-las biocompatíveis.

No Capítulo V descrevemos o uso dos PQs nas ciências da vida. Nele, destacamos metodologias utilizadas para bioconjugação além de demonstrar algumas aplicações destes em sistemas biológicos. Através desta interdisciplinaridade e das conclusões descritas no Capítulo VI, observamos o aumento na capacidade de visualização, manipulação e posteriores diagnósticos na biologia [19-21].

1.2 Objetivos

Dentre os objetivos gerais deste trabalho, destacamos a obtenção e caracterização de nanopartículas luminescentes de semicondutores tipo II-VI, como sulfeto de cádmio (CdS) e telureto de cádmio (CdTe). Tais sistemas foram estabilizados com polifosfato de sódio $[\text{NaPO}_3]_9$ e compostos possuindo grupamentos alquil tióis, respectivamente. Todas as sínteses aqui descritas foram obtidas através de técnicas baseadas em química coloidal em meio aquoso para aplicações como biomarcadores.

Como objetivos específicos, destacamos:

- I. Síntese de PQs de sulfeto de cádmio (CdS) estabilizadas com polifosfato de sódio $[\text{NaPO}_3]_9$ e passivadas com hidróxido de cádmio $\text{Cd}(\text{OH})_2$ utilizando técnicas relativamente simples e de baixo custo.
- II. Utilização da tioacetamida ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$) como uma nova fonte de enxofre para síntese de PQs de CdS para substituição do gás sulfídrico.
- III. Síntese de PQs de telureto de cádmio (CdTe), passivadas com CdS e estabilizadas com ácido mercaptoacético (AMA), ácido mercaptopropiônico (AMP) e ácido mercaptosuccínico (AMS) sob atmosfera inerte.
- IV. Caracterizações espectroscópicas e estruturais das suspensões sintetizadas.
- V. Modificação química da superfície (funcionalização) através do revestimento dos PQs com sílica.
- VI. Desenvolvimento de novos protocolos para marcação de materiais biológicos.

Referências

- [1] WELLER, H. Quantized semiconductor particles: a novel state of matter for materials science. *Adv. Materials*: v. 5, p.88-95, 1993.
- [2] ALIVISATOS, A. P. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *J. Phys. Chem.*, v.100, p.13226-13239, 1996.
- [3] MULVANEY, P. Not all that's gold does glitter. *MRS Bulletin*, v. 26, p. 1009-1014, 2001.
- [4] FARADAY, M. *Philos. Trans. R. Soc.*, v. 147:145, 1857.
- [5] MURRAY, C. B.; NORRIS, D. J.; BEAWNDI, M. G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E=S,Se,Te) Semiconductor Nanocrystallites. *Journal of American Chemical Society*, v. 115, p. 8706, 1993.
- [6] PENG, X.; WICKHAM, J.; ALIVISATOS, A. P. *Journal of American Chemical Society*, v. 120, p. 5343-5344, 1998.
- [7] MEDINTZ, I. L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSUI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, v. 4, p. 435-446, 2005.
- [8] WANG, Y.; CHEN, Y.; CAI, J.; ZHONG, L. QD as a bifunctional cell-surface marker for both fluorescence and atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. Accepted 7 November, 2008.
- [9] DABBOUSI, B.O.; RODRIGUEZ-VIEJO, J.; MIKULEC, F.V.; HEINE, J.R.; MATTOUSSI, H., OBER, R.; JENSEN. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J. Phys. Chem.*, v. 101, p. 9463-9475, 1997.
- [10] CHAN, C.W.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, v. 281, p. 2016-2018, 1998.
- [11] WU, X.; LIU, H.; LIU, J. et al., Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, v. 21, p. 41-46, 2002.
- [12] ALFASSI, Z., BAHNEMANN, D.; HENGLEIN, A. J. Photochemistry of Colloidal Metal Sulfides. 3. Photoelectron Emission from CdS and CdS-ZnS Co-Colloids. *Journal of Physical Chemistry*, v. 86, p. 4656 (1982).
- [13] CHESTNOY, N.; HARRIS, T. D.; HULL, R.; BRUS, L. E. Luminescence and photophysics of cadmium sulfide semiconductor clusters: the nature of the emitting electronic state. *J. Phys. Chem.*, v. 90, p. 3393, 1986.
- [14] BARAL, S.; FOJTIK, A.; WELLER, H.; HENGLEIN, A. Intermediates of the Oxidation of Extremely Small Particles of CdS, ZnS, and Cd₃P₂ and Size Quantization Effects. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 108, p. 375, 1986.
- [15] SPANHEL, L.; HAASE, M.; WELLER, H.; HENGLEIN, A. Surface Modification and Stability of Strong Luminescing CdS Particles. *J. Am. Chem. Soc.*, v.109, p. 5649, 1987. SPANHEL, L.; WELLER, H.; HENGLEIN, A. Electron Injection from Illuminated CdS into Attached TiO₂ and ZnO Particles. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 109, p. 6632, 1987. SPANHEL, L.; HENGLEIN, A.; WELLER, H. Strong luminescing CdS and CdS-Ag₂S particles. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*; v. 91, p. 1359, 1987.

- [16] STEIGERWALD, S. M. L.; ALIVISATOS, A. P.; GIBSON, J. M.; HARRIS, T. D.; KORTAN, R.; MULLER, A. J.; THAYER, A. M.; DUNCAN, T. M.; DOUGLASS, D. C.; BRUS, L. E. Surface Derivatization and Isolation of Semiconductor Cluster Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 110, p. 3046, 1988.
- [17] BAWENDI, M. G.; KORTAN, M. L. et al. X-ray structural characterization of larger CdSe semiconductor clusters. *J. Chem. Phys.*, v. 91, p. 7282, 1989.
- [18] GAPONIK, N.; TALAPIN, D.; ROGACH, A. L.; HOPPE, K.; SHEVCHENKO, E. V.; KORNOWSKI, A.; EYCHMÜLLER, A.; WELLER, H. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. *J. Phys. Chem. B.*, v. 106, p. 7177, 2002.
- [19] ALIVISATOS, A. P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology*, v. 22, 2004.
- [20] BRUCHEZ, JR.; MORONE, M.; GIN, P.; WEISS, S.; ALIVISATOS, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological label. *Science*, v. 281, p. 2013-2016, 1998.
- [21] CHAN, W. C.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, v. 281, 1998.

2 Referencial Bibliográfico

2.1 Nanotecnologia: por quê nano?

A palavra *nano* é derivada do grego e significa “anão”. Em escala dimensional, nano refere-se a 10^{-9} m, um bilionésimo do metro. Para exemplificar, um cabelo humano tem um diâmetro de aproximadamente 10.000 nm. Diâmetros de átomos estão na ordem de 10^{-1} nm enquanto que fios ácido desoxirribonucléico (DNA) tem cerca de alguns nanômetros. Assim, nanotecnologia é um termo geral que se refere às técnicas e métodos de estudo, concepção e fabricação de dispositivos no nível dos átomos e moléculas.

A nanotecnologia envolve pesquisa e desenvolvimento de materiais em escalas de comprimento de 1 a 100 nm. Essa pesquisa se torna muito interessante e importante para a biologia uma vez que muitos sistemas biológicos têm estruturas moleculares em nanoescala [1].

Na década de 80 os estudos estavam focados nos aspectos sintéticos e estruturais dos materiais. Considerações teóricas foram limitadas a pequenas moléculas como *cluster* organometálicos [2]. A descoberta de novas propriedades eletrônicas de partículas nanométricas estimulou novos estudos e a combinação da física, química, ciências dos materiais, ciências biológicas, além de teorias que ajudaram para o avanço e nível de compreensão em nanociências.

A nanotecnologia se tornou uma palavra-chave por ser a tecnologia do próximo século. A nanociência e, conseqüentemente a nanotecnologia vão iniciar um impacto tecnológico uma vez que interessa a todos os aspectos da vida humana, desde materiais de construção até a medicina.

A nanotecnologia em ciências da vida tem como um de seus objetivos diagnosticar doenças de forma precisa, rápida e eficaz, oferecendo melhorias para os métodos de diagnósticos atualmente existentes. Neste sentido, diversos nanomateriais têm sido estudados e desenvolvidos para beneficiar as tecnologias biomédicas.

Um dos nanomateriais com elevado potencial para aplicação em nanomedicina é o ponto quântico ou *quantum dot*, que é uma nanopartícula de semicondutor. Essa nanopartícula é um material promissor para diagnóstico e para a compreensão da biologia celular, sendo utilizada tanto para a geração de imagens como para detecção de sinais por meio da fluorescência.

Medidas baseadas em fluorescência tem especificidade bioquímica e alta sensibilidade. Há um considerável interesse no emprego dos pontos quânticos como fluoróforos inorgânicos, devido ao fato deles apresentarem vantagens significativas em

relação aos marcadores fluorescentes usados convencionalmente. Para isso, há necessidade que estas nanopartículas sejam biocompatíveis para que sejam conjugadas adequadamente a moléculas biológicas, por meio de técnicas de bioconjugação.

2.2 Nanocristais de semicondutores

Os semicondutores são a essência da eletrônica moderna. Os transistores, diodos, as células fotovoltaicas, os detectores e os termistores são dispositivos construídos a partir de materiais semicondutores e podem ser empregados como elementos isolados de um circuito ou compondo os denominados circuitos integrados [3].

Os semicondutores são materiais bastante estudados devido principalmente às suas propriedades elétricas e óticas. Podem apresentar-se como compostos binários (CdS, CdTe, CdSe, ZnS, ZnO) ou materiais com a inclusão de certos tipos de elementos (como por exemplo, Si dopado com P ou B).

Os semicondutores são caracterizados por uma banda de valência (BV) cheia e uma banda de condução (BC) vazia, separadas por um *gap* (Figura 2.1) de energia relativamente pequeno, $E_g < 3$ eV. Devido ao *gap* estreito, à temperatura ambiente o número de elétrons na BC é apreciável, embora que muito menor que o número de elétrons livres em metais. Isto resulta numa condutividade intermediária entre a dos isolantes e dos metais. Esta é a razão do nome semicondutores. A concentração de elétrons na BC de um semicondutor puro varia exponencialmente com a temperatura, o que faz sua condutividade depender fortemente da temperatura [4].

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 (sem defeitos na 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 proibida (*band gap*) (E_g) (Figura 2.1) refere-se ao valor mínimo de energia que se deve fornecer para que um elétron situado na BV seja promovido para a BC [2].

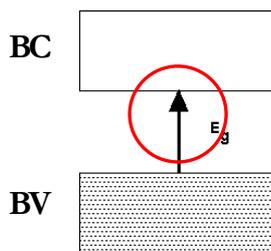


Figura 2.1: Região proibida – *band gap* (E_g)

Em geral, a natureza físico-química dos materiais se dá pela configuração eletrônica e dinâmica das moléculas que os compõe. Mas como são formadas as bandas de valência e condução em um material?

Toda molécula pode ser descrita como sendo formada por pelo menos uma estrutura de ligação entre seus átomos: o orbital molecular (Figura 2.2). Este orbital resulta da combinação entre dois orbitais atômicos que estão 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. 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.

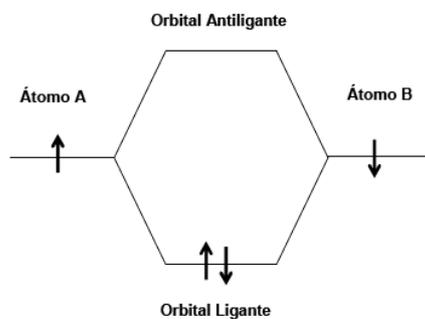


Figura 2.2: Orbital molecular.

Uma molécula possui como estrutura eletrônica, no mínimo, dois orbitais moleculares: um orbital ligante e um antiligante. Os elétrons compartilhados na ligação química encontram-se normalmente localizados no orbital ligante, região de menor energia que representa a configuração mais estável de uma molécula. Os elétrons localizam-se no orbital antiligante apenas sob a ação de uma perturbação externa ao ambiente eletrônico da molécula, resultando em um estado excitado.

Quando um dado material é formado pelo empacotamento de várias moléculas idênticas em uma rede ordenada temos a formação de um material cristalino [5] (Anexo 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” forçando um rearranjo das mesmas. Com esse rearranjo há uma distribuição da energia total em toda extensão da rede cristalina do material. Assim, 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 – banda de valência (BV) e a banda de maior energia, equivalente ao conjunto dos orbitais anti-ligantes, denominada banda de condução (BC) (Figura 2.3).

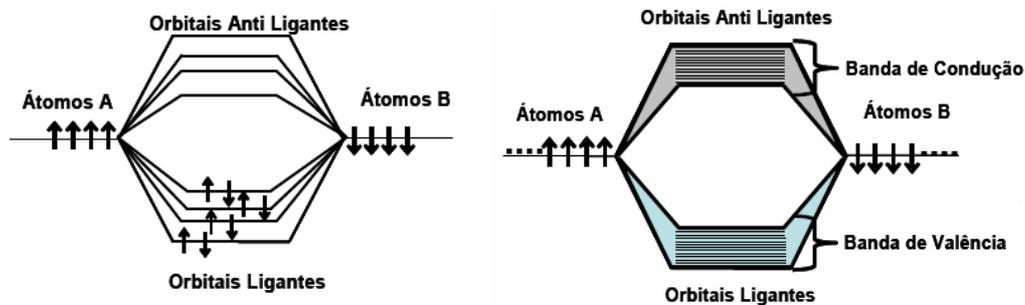


Figura 2.3: Rearranjo de orbitais de sistema poliatômico.

Os materiais em nanoescala frequentemente mostram um comportamento que é intermediário entre sólidos macroscópicos e sistemas atômicos/moleculares e essas novas propriedades só podem ser explicadas pela lei da mecânica quântica.

Na Figura 2.4 podemos caracterizar os níveis de energia de acordo com o número de átomos conectados. À medida que os átomos se aproximam, os níveis discretos de energia se fundem formando bandas de energia. Os nanocristais de semicondutores (pontos quânticos) são materiais que estão no intermédio entre sólidos macroscópicos e pequenas moléculas.

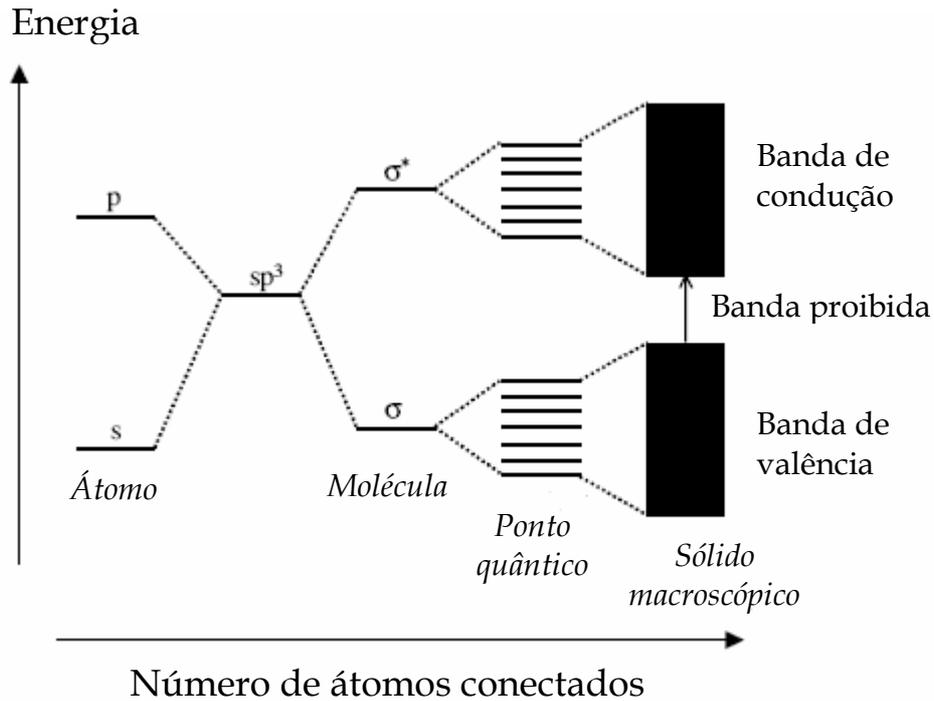


Figura 2.4: Níveis de energia de acordo com o número de átomos conectados. Comparação dos níveis de energia desde um átomo até um material macroscópico [5].

Em um semiconductor inorgânico, os elétrons na BC e os buracos da BV estão livres para se mover ao longo do cristal e seu movimento pode ser descrito de forma satisfatória por uma combinação linear de ondas planas, cujo comprimento de onda é geralmente da ordem de nanômetros. Isto significa que, sempre que o tamanho de um semiconductor sólido se torna comparável a estes comprimentos de onda, um portador livre confinado nesta estrutura vai se comportar como uma partícula em uma caixa de potencial.

2.3 Pontos quânticos (*quantum dots*)

Os pontos quânticos, do inglês *quantum dots (QDs)*, são nanopartículas fluorescentes de materiais semicondutores. O ponto quântico é formado por um núcleo (*core*) de um semiconductor com *gap* de energia (E_g), recoberto por uma casca (*shell*) de outro semiconductor de *gap* de energia (E_g'), maior que E_g (Figura 2.5).

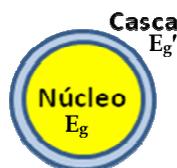


Figura 2.5: Ponto quântico *core-shell*: núcleo (E_g) e casca (E_g').

Uma propriedade interessante nos pontos quânticos é a sua interação com a radiação eletromagnética [6]. Quando um fóton de energia superior a E_g interage com um elétron na BV do semiconductor, este elétron migra para a BC, gerando uma vacância (um buraco virtual na camada de valência). Este buraco (b^+) possui carga igual a do elétron (e^-), mas de sinal oposto. O conjunto elétron-buraco é chamado de éxciton, que possui sua existência vinculada a forças colombianas fracas, formando um estado ligado (Figura 2.6).

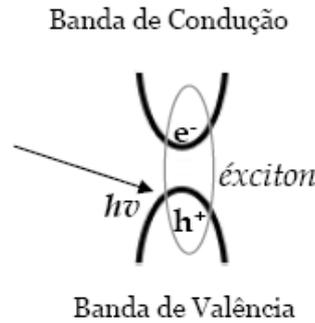


Figura 2.6: Esquema de formação de um éxciton. (b^+) representa o buraco gerado na banda de valência pela excitação do elétron (e^-).

Esta estrutura ligada (éxciton ligado) 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 (Equação 1.1).

$$a_B = \frac{4\pi\epsilon_0\epsilon_\infty\hbar^2}{m_0e^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) \quad (2.1)$$

Equação 1.1: Expressão utilizada para o cálculo do raio de Bohr onde: ϵ_0 é a constante dielétrica no vácuo; ϵ_∞ constante dielétrica do meio; m_e e m_h massas efetivas do elétron e do buraco no semiconductor e m_0 massa do elétron em repouso.

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 [7].

Em semicondutores macroscópicos o primeiro processo (forma não radiativa) é predominante sobre o segundo, devido à presença de defeitos intrínsecos na rede cristalina durante a formação do cristal.

Neste trabalho destacamos a síntese e uso de pontos quânticos do tipo II-VI, nanocristais de semicondutores formados pela combinação entre metais de transição da família IIB e calcogênios da família VIA (Figura 2.7). Este material possui tamanho menor do que o raio de Bohr (a_B) do semicondutor *bulk* e nesta escala, elétrons e buracos sofrem confinamento quântico nas três dimensões, modificando completamente as propriedades óticas do cristal.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
							H	He	Li		
		Be	B	C	N	O	F	Ne	Na		
		Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ar	K		
Metais de transição		Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	Rb	Ca
		Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	Cs	Ba
		Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	Fr	Ra
		Metais tipo B		Não metais			Metais tipo A				

Figura 2.7: Elementos da família VIA (calcogênios) e IIB (metais de transição) da tabela periódica constituintes dos pontos quânticos II-VI [3].

Para que um material seja considerado um ponto quântico ele deve apresentar tamanho menor do que o raio de Bohr (a_B) do semicondutor *bulk*, nessa situação a partícula se encontra em regime de confinamento quântico.

2.3.1 Confinamento quântico em semicondutores

As características físico-químicas de um semicondutor só variam com a redução do seu tamanho. Quando estes atingem dimensões nanométricas, encontram-se em regime de confinamento quântico. A partir daí, propriedades como temperatura de transição de fase, condutividade elétrica, absorção eletrônica tornam-se dependentes do tamanho do material.

Quando em dimensões macroscópicas (*bulk*) os materiais cristalinos possuem suas propriedades físicas e químicas determinadas principalmente pelos átomos que compõem o núcleo do cristal. Assim, no estado *bulk*, qualquer variação nas dimensões do cristal não interfere nas suas propriedades [7].

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 [2]. Sendo assim, estes “átomos de superfície” contribuem para a maior energia livre e determinam as variações termodinâmicas [7].

Segundo o modelo de orbitais moleculares, 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 aos orbitais moleculares (Figura 2.2 e 2.3). Assim, a redução do tamanho do ponto quântico resulta numa variação sistemática da densidade de ocupação de níveis eletrônicos de energia.

O confinamento quântico descreve sua mudança do quasi-contínuo de níveis de energia para um conjunto de níveis discretos, com a diminuição da dimensão das partículas (Figura 2.8).

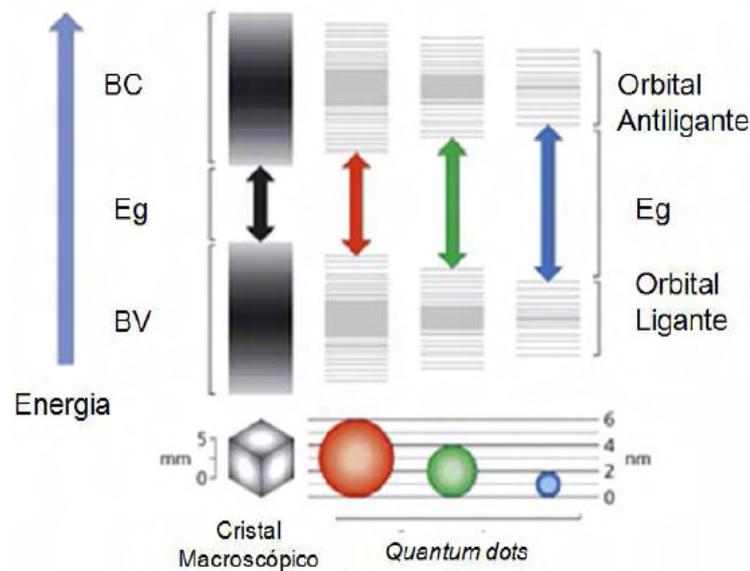


Figura 2.8: Discretização dos níveis de energia com a redução do tamanho das partículas.

O confinamento quântico é um fenômeno bastante importante para materiais semicondutores. No caso do semicondutor macroscópico (*bulk*), a densidade de estados que os elétrons podem ocupar varia de um modo contínuo. Quando se coloca barreira de potencial limitando o seu movimento em uma das direções da ordem de raios de Bohr dos portadores no material, verifica-se que ocorre uma mudança na densidade de estados de energia permitidos [8]. Limitando um dos lados deste cubo tridimensional, os elétrons ficam aprisionados em duas dimensões, e a densidade de estados eletrônicos se torna

quantizada, conforme Figura 2.9. Estes são chamados poços quânticos (*quantum well*). Se continuarmos limitando as dimensões, teremos então os chamados fios quânticos (*quantum rod*) (1-D) e os pontos quânticos (*quantum dot*) (0-D). A densidade de estados de pontos quânticos, diferentemente dos outros, é discreta e tem características similares a átomos por isso, são chamados de átomos artificiais.

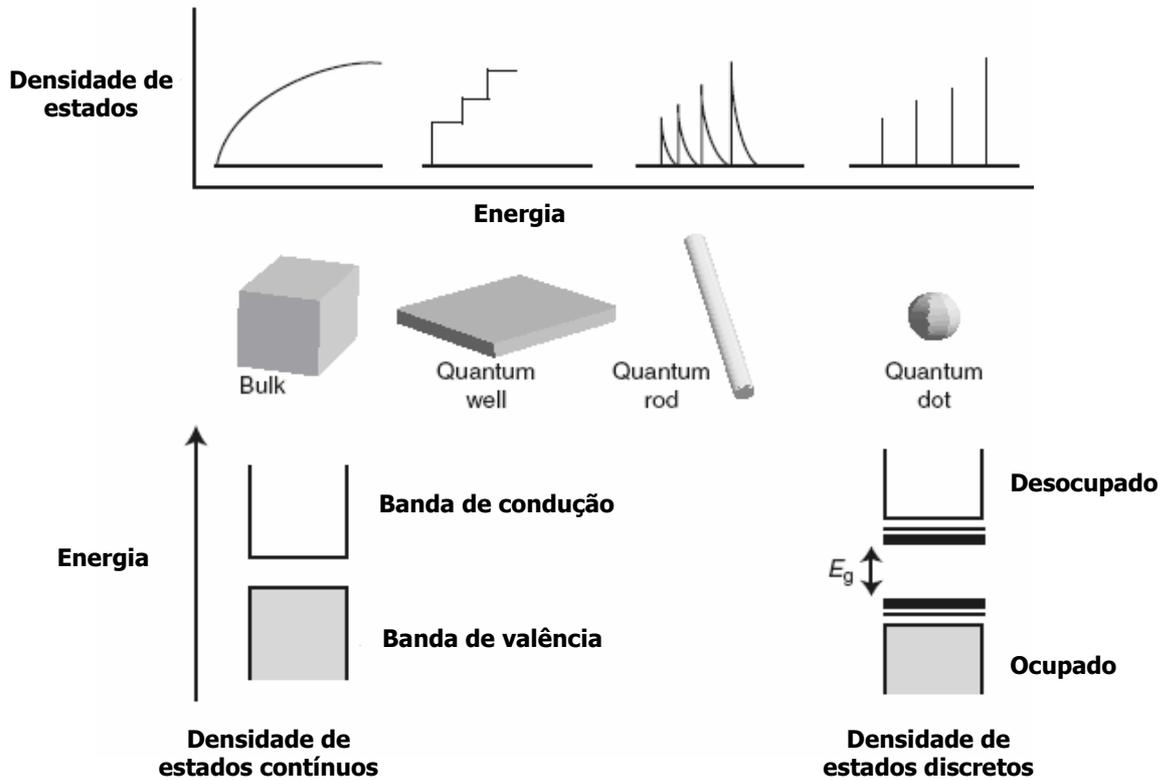


Figura 2.9: Tipos de confinamentos [9].

Em semicondutores, a excitação de elétrons da banda de valência (BV) para banda de condução (BC), separados pela banda proibida (*band gap*), resulta em largas bandas no espectro de absorção. À medida que as partículas diminuem de tamanho, a banda proibida aumenta, alterando as propriedades opto-eletrônicas do material. As dimensões reduzidas dessas nanoestruturas (comparáveis com as distâncias interatômicas) possibilitam o surgimento de novos fenômenos físicos de grande interesse para estudos, pesquisas e aplicações.

O confinamento quântico pode ser interpretado intuitivamente utilizando 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 (a energia é inversamente proporcional ao tamanho da caixa elevada ao quadrado) (Equação 2.2).

$$E_t = E_g + \frac{\hbar\pi^2}{2\mu a^2} \Rightarrow E_t - E_g = \frac{\hbar\pi^2}{2\mu a^2} \quad (2.2)$$

Equação 2.2: Equação que descreve a energia eletrônica do material confinado.

A Equação 2.2 se baseia no modelo físico simples, onde o primeiro termo é o valor da energia da banda proibida do material macroscópico e o segundo termo diz respeito à aproximação do confinamento ao modelo de partícula na caixa, dando a nova banda proibida uma dependência proporcional a $1/a^2$ em relação ao raio no material.

Fazendo analogia a um cristal de um semiconductor 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 da banda proibida, *band gap* (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.

Outro modelo utilizado para descrever o efeito de confinamento quântico é o modelo de massa efetiva [7,8] (Anexo1). Este modelo leva em consideração que os elétrons e os buracos formados no surgimento de éxcitons, possuem uma massa considerada diferente quando comparada ao material macroscópico (*bulk*). Esta diferença interpreta o comportamento do elétron quando perturbado por uma força externa como demonstra a fórmula da segunda Lei de Newton (2.3):

$$m^* \cdot a = F \quad (2.3)$$

Equação 2.3: Fórmula da segunda Lei de Newton. Massa efetiva (m^*) do elétron ou buraco quando perturbado por uma força externa.

Esta mudança de comportamento ocorre 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 macroscópico. Neste modelo, o cálculo da energia da banda proibida do material confinado pode ser realizado, utilizando a equação 2.2, onde substituímos (μ) (Anexo 2).

Com o efeito de confinamento quântico, todas as propriedades do semicondutor se modificam [10], algumas mais significativamente do que outras. As propriedades ópticas tais como absorção eletrônica e fotoluminescência, por exemplo, alteram drasticamente com a quantização de semicondutores [2,5].

A partir de valores obtidos por espectroscopia de absorção utilizaremos neste trabalho, a equação 2.2 para confirmar o tamanho das partículas sintetizadas.

2.4 Propriedades ópticas de semicondutores

As propriedades ópticas de partículas coloidais de semicondutores e suas alterações dependentes do tamanho foram observadas desde o começo do último século [11]. Em 1926 observou-se a mudança de cor de vidros contendo sulfeto de cádmio (CdS). Isso foi corretamente atribuído ao aumento das dimensões dos colóides após aquecimento. Em 1960 foi reportado a influência do tamanho de cristais de PbTe e PbSe na resposta espectral [12].

Um efeito interessante nas nanopartículas de semicondutores é o alargamento da faixa entre os estados eletrônicos ocupados e os estados desocupados. Isto afeta diretamente as propriedades ópticas dos pontos quânticos em comparação com a maioria dos materiais. A redução dos tamanhos nas três direções em pontos quânticos, além de modificar a densidade de estados, faz com que os portadores de carga sofram um confinamento quântico, aumentando a energia do *gap*. Com o decréscimo do tamanho da partícula o *gap* aumenta e pode-se observar que os espectros de absorção e luminescência dos semicondutores se deslocam para energias mais altas [13,14].

A Figura 2.10 mostra que pontos quânticos menores têm um espectro de absorção deslocado para comprimentos de onda mais curtos quando relacionados a pontos quânticos maiores e à maioria dos materiais. O máximo no espectro de absorção pode ser usado para estimar o tamanho médio durante a síntese do nanocristal.

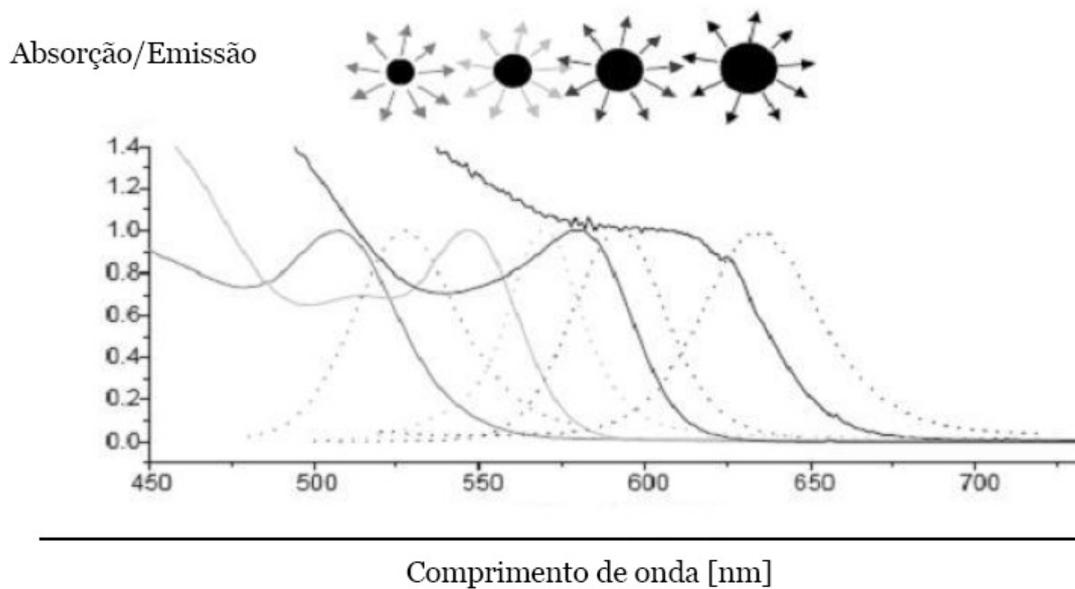


Figura 2.10: Espectros de absorção (linhas contínuas) e emissão (linhas pontilhadas) de quantum dots de CdSe/ZnS de diferentes tamanhos. Os picos de absorção de nanocristais com diâmetro de 2.3/4.0/3.8/4.6nm estão em 507/547/580/605nm. Os picos da fluorescência estão em 528/57/592/637nm [2].

A posição do pico da luminescência é dependente do tamanho médio do ponto quântico (Figura 2.11) e sua largura está correlacionada à distribuição de tamanho e principalmente à presença de defeitos nos nanocristais.

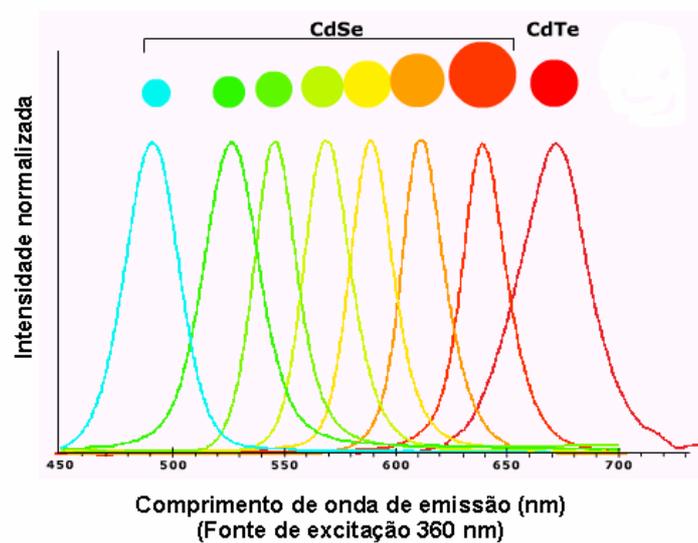


Figura 2.11: Dependência do espectro de emissão com diâmetro da partícula [15].

2.5 Métodos de síntese de nanocristais de semicondutores

Dentre as técnicas existentes para obtenção de nanopartículas metálicas e de semicondutores destacam-se dois métodos: o *bottom-up* e o *top-down*. Neste trabalho daremos ênfase às técnicas que se baseiam em química coloidal, técnicas *bottom-up*.

Os métodos de síntese química das nanopartículas estão baseados na redução química de sais, ou na decomposição controlada de compostos organometálicos metaestáveis em soluções orgânicas ou água. Estas reações são sempre feitas em conjunto com grande variedade de estabilizantes, que são usados para controlar o crescimento do núcleo inicial e evitar a coagulação ou aglomeração. Basicamente, estes processos são governados pelos mecanismos clássicos de nucleação e crescimento.

Dentre as vantagens da química coloidal destacamos: *i.* dispensa o uso de substratos para crescimento das nanoestruturas; *ii.* geração de uma quantidade mínima de resíduos; *iii.* possibilita uma alteração superficial para diferentes aplicações e *iv.* facilita para produção em larga escala com custo inferior às demais.

Um colóide é uma mistura de pelo menos duas substâncias em fases diferentes. A fase dispersa, que pode ser sólida, líquida ou gasosa, deve ser finamente dividida, com pelo menos uma das dimensões entre $10\ \mu\text{m}$ e $1\ \text{nm}$. A fase contínua, também pode ser sólida, líquida ou gasosa e é denominada meio de dispersão.

Os fatores que mais contribuem para a natureza global de um sistema coloidal são: as dimensões das partículas; a forma; as propriedades superficiais; interações partícula-partícula e interações partícula-solvente. Os princípios relacionados com os diferentes sistemas coloidais baseiam-se no tamanho e elevada relação área/volume de partículas. Como a área da superfície dispersa é elevada devido ao pequeno tamanho das partículas, as propriedades da interface entre as duas fases, dispersa e de dispersão, determinam o comportamento dos diferentes sistemas coloidais.

As diferentes interações entre a fase dispersa (partículas) e de dispersão (água) constituem um dos pontos críticos do *comportamento* e da *estabilidade* dos colóides. As propriedades físicas e químicas de ambas as fases controlam essas interações.

As interações entre partículas coloidais governam as propriedades dos colóides e dependem da distância de separação e da quantidade de partículas coloidais dispersas. As forças externas devido ao campo da gravidade ou ao cisalhamento também influenciam a interação e as colisões entre partículas. Essas forças de interação entre as superfícies das partículas coloidais advêm da natureza eletromagnética das interações entre a matéria. Nas dispersões coloidais aquosas podem haver: 1) interação repulsiva de duplas camadas de

cargas, 2) interação atrativa de Van der Waals, 3) interação estérica repulsiva de cadeias de polímeros adsorvidos nas partículas, 4) interação atrativa de polímeros, 5) interação de moléculas de solvente (solvatação) e 6) interação hidrofóbica[16].

As partículas coloidais adquirem cargas elétricas na superfície, quando expostas ao contato com solvente polar, por diferentes mecanismos, tais como: dissociação de grupos da superfície e adsorção ou dissolução de íons da superfície.

A carga da superfície da partícula influencia a distribuição dos íons da solução na vizinhança, atraindo e repelindo contra-íons e co-íons, respectivamente. Essa distribuição de íons desde a superfície da partícula até o interior da solução (meio de dispersão) gera diferentes potenciais [16].

O potencial da interface entre a superfície da partícula e o interior da solução do meio de dispersão diminui mais rapidamente à medida que aumenta a força iônica, porque a dupla camada de cargas que se forma ao redor da partícula é comprimida em direção à superfície pela concentração de íons da solução. Portanto, as propriedades elétricas dos colóides são governadas pelas interações repulsivas Coulombianas. No entanto, essa energia de repulsão entre as partículas não garante a estabilidade das partículas dispersas. Por isso na prática, dispersões coloidais podem agregar-se e os agregados sedimentam-se rapidamente [17].

Geralmente as dispersões coloidais são termodinamicamente instáveis, devido à sua elevada energia livre de superfície e constituem sistemas irreversíveis, que não podem ser reconstituídos facilmente após a separação das fases. Sendo instáveis em colóides, coagulação e aglomeração são os caminhos nos quais as nanopartículas tendem a reduzir a alta área superficial. Na ausência de impedimentos extrínsecos, a partícula não-protetida tende à coagulação, basicamente pela ação de forças de van der Waals. Para prevenir o processo de coagulação, a superfície necessita ser estabilizada eletrostaticamente ou por estabilização estérica.

Para a obtenção de uma suspensão coloidal estável deve-se observar 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 [7]. Para a minimização da dispersão de tamanho das nanopartículas numa suspensão, técnicas como a precipitação seletiva, cromatografia por exclusão e a eletroforese em gel podem ser aplicadas [18].

A síntese coloidal de nanopartículas de semicondutores ocorre por reações que permitam controlar a nucleação e crescimento. O precursor é uma molécula ou um complexo que contém um ou mais átomos necessários para o crescimento do nanocristal. Uma vez que os precursores são introduzidos na reação eles se decompõem, dando forma a uma nova espécie reativa (os monômeros). Estes irão causar a nucleação e o crescimento dos nanocristais. A energia necessária para decomposição dos precursores é fornecida pelo líquido na reação, por colisões térmicas ou por uma reação química entre o meio líquido e os precursores, ou por uma combinação destes dois mecanismos [19,20].

O diagrama de *LaMer* (Figura 2.12), ilustra o processo de nucleação e subsequente crescimento. Quando a concentração do soluto aumenta em função do tempo, nenhuma nucleação ocorreria mesmo acima da solubilidade de equilíbrio. A nucleação ocorre somente quando a supersaturação atinge um certo valor que corresponde à barreira de energia para o começo da nucleação. Após a nucleação inicial, a concentração do soluto diminui e a variação da energia livre de *Gibbs* por unidade de volume também diminuiu [19].

Quando a concentração decresce até ultrapassar a energia crítica, a nucleação cessa, porém o sistema evolui até que a concentração do soluto atinja o equilíbrio [17]. Para tal, os núcleos preexistentes agregam material da fase líquida, dando início à fase de crescimento da partícula.

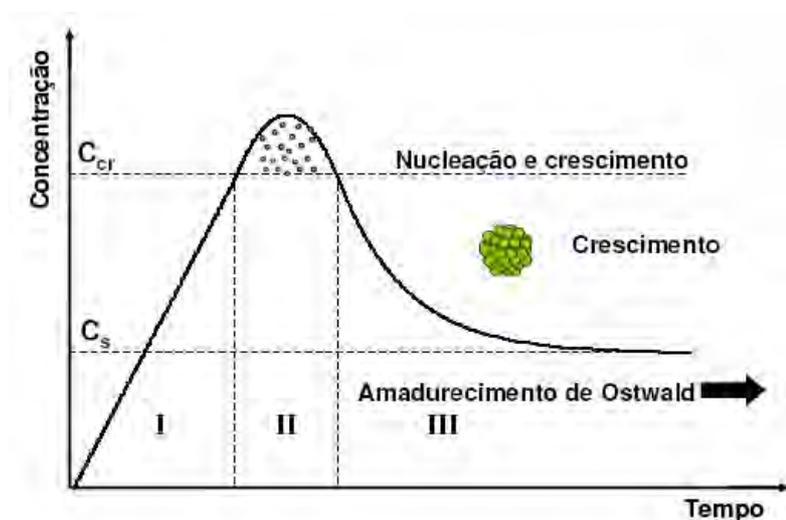


Figura 2.12: Diagrama de LaMer: Estágio (I) a concentração de soluto é aumentada pela lenta decomposição dos compostos, formando complexos, como precursores dos precipitados. Durante este estágio não há precipitação. Quando a concentração do soluto atinge C_{cr} inicia-se o estágio de nucleação (II). Neste estágio, a C continua aumentando por um tempo e depois começa a cair como consequência do consumo de soluto pela nucleação. Quando C atinge C_{cr} novamente, a nucleação chega ao fim. O estágio de crescimento (III) prossegue até que a concentração de soluto atinja o nível de saturação (C_s) [21].

O Diagrama mostra a relação entre as taxas de nucleação e crescimento do soluto [22]. Apesar do processo de crescimento não poder ocorrer sem nenhum núcleo, a taxa de crescimento é positiva para concentrações maiores do que a do equilíbrio. Portanto, a partir do momento que há núcleos formados, o crescimento ocorre simultaneamente à nucleação. Acima da concentração mínima para nucleação os dois processos são inseparáveis, porém ocorrem em velocidades diferentes.

Para as sínteses de nanopartículas com distribuição de tamanhos uniforme, seria ideal se todos os núcleos se formassem ao mesmo tempo e com o mesmo tamanho. Para que isso ocorra é desejável que o período de nucleação ocorra num intervalo muito curto de tempo. Na prática isso é obtido aumentando abruptamente a concentração do soluto a um patamar de alta supersaturação e, logo a seguir, diminuindo-a para abaixo do patamar de nucleação.

2.6 Estabilidade de suspensões coloidais de pontos quânticos

Um parâmetro chave no crescimento controlado dos nanocristais é a presença de surfactante (tensoativo) ou estabilizante. Este pode ser adsorvido dinamicamente à superfície do ponto quântico, sendo capaz de fornecer acesso para a adição de unidades monoméricas. Ele também deve impedir a agregação dos nanocristais.

A escolha do estabilizante varia em cada caso. Uma molécula que se ligue fortemente à superfície do ponto quântico não seria apropriada, porque impediria o crescimento do nanocristal. Por outro lado, uma molécula de coordenação renderia partículas grandes ou agregadas. Dentre alguns exemplos de surfactantes/estabilizantes incluem: alquil tióis, fosfinas, fosfatos, fosfonatos, amidas ou aminas, ácidos carboxílicos e compostos aromáticos contendo nitrogênio. Este revestimento permite uma grande flexibilidade e pode ser trocado por moléculas orgânicas ou grupos funcionais com polaridade diferente.

2.7 Passivação dos nanocristais

A redução do volume da partícula resulta num aumento da relação área superficial/volume aumentando assim, a contribuição de efeitos de superfície [23]. A superfície possui um grande número de defeitos resultantes da interrupção da rede cristalina e da maior energia livre dos átomos ali localizados (impurezas, vacâncias, defeitos cristalográficos, etc.), os quais podem agir como centros de decaimento não radiativo, resultando no decréscimo da eficiência da emissão de luz pelas nanopartículas [7]. Uma maneira de contornar esses problemas é crescer uma "casca" (camada de passivação) de umas poucas camadas de átomos de um material com um E_g maior que o "núcleo". Esse processo da formação da "casca" é denominado passivação e as partículas resultantes apresentam uma estrutura física do tipo *core/shell* (núcleo/casca) (Figura 2.5).

Quando uma camada de um material é depositada sobre outro material, as propriedades eletrônicas e óticas são alteradas, principalmente nas interfaces, com relação às propriedades do material macroscópico. Isto se deve as diferenças nas afinidades eletrônicas, função trabalho e energia da banda proibida [7].

Através da passivação (Figura 2.13), podemos alterar a estrutura externa das partículas "passivando as ligações químicas não balanceadas". Com isso, novos estados energéticos podem ser criados, promovendo transições radiativas eficientes.

Para passivação, geralmente utiliza-se uma camada de um outro semiconductor de *band gap* maior sobre a partícula original [7, 24].

Na Figura 2.13 podemos observar que possíveis defeitos levam a formação de níveis intermediários entre a banda de valência e a banda de condução e ao invés do elétron ir diretamente da banda de condução para a banda de valência, ele vai perdendo energia aos poucos nesses níveis intermediários levando a uma baixa eficiência de luminescência.

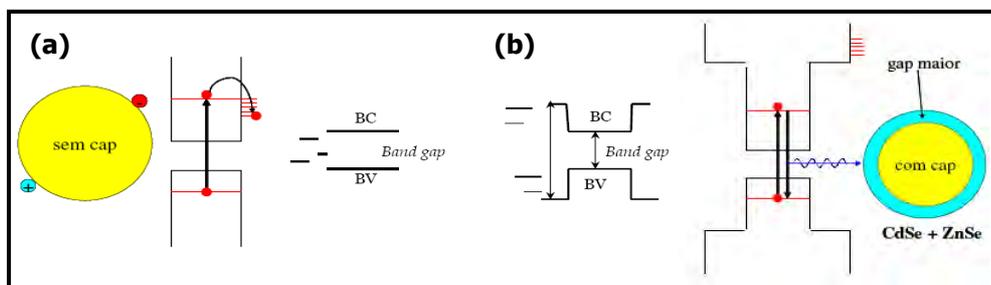


Figura 2.13: Nanopartícula: (a) sem camada de passivação e (b) com passivação.

Para nanopartículas de sulfeto de cádmio (CdS), a passivação com hidróxido de cádmio, Cd(OH)₂, tem se mostrado eficiente no sentido de aumentar significativamente a intensidade da emissão [7]. A natureza da luminescência observada nas suspensões de CdS antes da passivação é explicada em termos da recombinação excitônica em defeitos de superfície relacionados à vacância de íons enxofre nas ligações terminais de CdS do cristal ou radicais SH.

Mesmo não sendo um semicondutor, à medida que a camada de Cd(OH)₂ se forma, os defeitos profundos são substituídos por defeitos mais rasos, formados a partir das ligações Cd-OH, melhorando a estabilidade das partículas em solução.

Além do aumento da eficiência de luminescência nos pontos quânticos, a formação da casca tem outra função importante: evitar processos de transferência de energia do ponto quântico para moléculas vizinhas.

É importante destacar que após a passivação não há precipitação das partículas em solução. Tal processo preserva a estabilidade das partículas em meio aquoso [7,25].

2.8 Funcionalização dos nanocristais

Nos tópicos anteriores descrevemos a formação da nanopartícula, composta por um núcleo que determina a emissão do material; a casca, camada de passivação que está relacionada a intensidade da emissão além da fotoestabilidade. Neste item, destacamos o uso de um funcionalizante, camada mais externa que determina a estabilidade química e o grau de funcionalidade em relação à marcação do sistema biológico de interesse.

Para que um material semicondutor nanoestruturado possa ser efetivamente utilizado como material biocompatível, faz-se necessário que pesquisas sejam direcionadas para prover melhorias aos processos de bioconjugação, dentre elas: (1) obtenção de pontos quânticos reprodutíveis, (2) desenvolvimento de técnicas de conjugação flexíveis e, (3) aplicação de novos métodos para a caracterização do bioconjugado.

O último problema a ser enfrentado para marcação fluorescente usando pontos quânticos é a funcionalização dos mesmos, para que se liguem especificamente a determinadas proteínas.

A funcionalização é caracterizada pela modificação química da superfície para manter uma fotoestabilidade elevada, alta luminescência e, principalmente, baixa toxicidade. Ela nos proporciona condições ótimas para marcações em materiais biológicos e permite o monitoramento através da luminescência das nanopartículas. Com a funcionalização, os

pontos quânticos se tornam mais biocompatíveis causando aos sistemas biológicos o mínimo de alterações fisiológicas.

A seguir (Figura 2.14), mostramos esquematicamente o papel do funcionalizante.

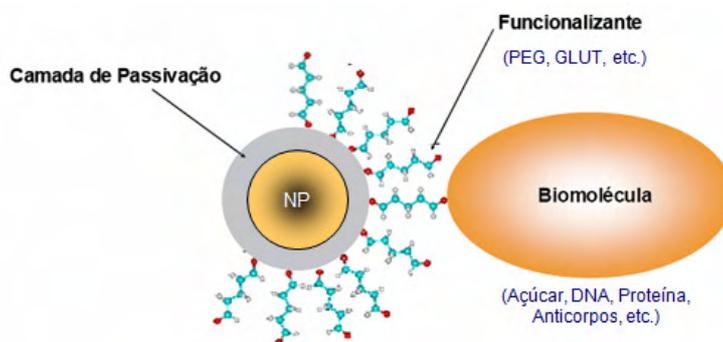


Figura 2.14: Esquema exemplificando a funcionalização.

Para obtenção de resultados confiáveis é necessário estudar de que forma as nanopartículas serão acopladas ao material biológico. Através da modificação química da superfície das nanopartículas, podemos facilitar a entrada do marcador e a especificidade da marcação. Através da funcionalização também podemos observar possíveis alterações fisiológicas e destacar resultados interessantes na biologia.

Na funcionalização são utilizados ligantes como grupos tiol (-SH), carboxil (-COOH), biotina [26], DNA [27], etc. É importante destacar que, em muitos casos, as funções das moléculas alvo não mudam significativamente quando marcadas com pontos quânticos [28].

Outro método é o revestimento com sílica através de grupos silanos. Em 2005, foi demonstrado que o revestimento com sílica deixa o ponto quântico extremamente estável na solução [29]. Também foram descritos recentemente o revestimento do ponto quântico com polímeros anfífilos como o octilamina modificado com poli(ácido acrílico)(PAA)[29,30]. A utilização da sílica também é interessante para garantir que a passivação com $\text{Cd}(\text{OH})_2$ seja menos lábil [32]. Em determinadas condições essa camada pode ser dissolvida (diminuindo a luminescência e liberando Cd^{2+} para o meio gerando problemas citotóxicos).

O processo de funcionalização pode ser dividido em funcionalizações simples ou complexas. Na funcionalização simples, utiliza-se apenas um tipo de agente funcionalizante para a modificação da superfície das nanopartículas. Já na complexa, utilizamos mais de um tipo de agente funcionalizante. Neste, destacam-se pequenos peptídeos até proteínas como a albumina, ou imunoglobulinas [33].

Na funcionalização simples, geramos nanopartículas com pouca especificidade de acoplamento com estruturas biológicas, pois os grupamentos funcionais inseridos na superfície das nanopartículas podem se complexar com outros grupamentos funcionais presentes em mais de um tipo de biomoléculas. Este é o caso do agente funcionalizante glutaraldeído [34-36].

O glutaraldeído é uma molécula orgânica que possui dois grupamentos funcionais tipo aldeído e que pode se ligar às aminas primárias presentes nas biomoléculas (proteínas, ácido nucléico, etc) [37]. Reações entre aldeídos e aminas primárias podem gerar as bases de *Schiff* que, após redução, resultam em aminas secundárias estáveis.

Outro funcionalizante destacado é o ácido mercaptoacético (AMA), reagindo com íons Cd^{+2} na superfície das nanopartículas de CdTe/CdS, através do grupo tiol e introduzindo o grupamento carboxilato na superfície das nanopartículas. Este grupamento pode reagir com as aminas primárias resultando em aminas relativamente estáveis. Agentes estabilizantes como o AMA, ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), L-cisteína (CIS) e ácido mercaptosuccínico (AMS) também vêm sendo bastante destacados [38, 39].

É importante destacar que os funcionalizantes não podem interferir nas propriedades espectroscópicas e estabilidade coloidal do sistema.

O recobrimento das nanopartículas com polímeros vem sendo muito destacado através do crescimento de cadeias poliméricas sobre sua superfície. A força da ligação química entre a nanopartícula e a cobertura de polímero torna o nanomaterial muito mais estável, podendo ser submetido a processos industriais sem perder suas propriedades características. Um polímero bastante utilizado para bioconjugações é o poli(etilenoglicol) (PEG) [40].

A capacidade de colocar diferentes tipos de grupos químicos em conjunto sobre uma superfície amplia enormemente os possíveis usos das nanopartículas semicondutoras.

Para bioconjugação, vários tipos de interação eletrostática, hidrofóbicas e ligações covalentes têm sido desenvolvidos para a união de nanopartículas em biomoléculas (Figura 2.15) [41]. A adsorção também é uma conjugação destacada [42].

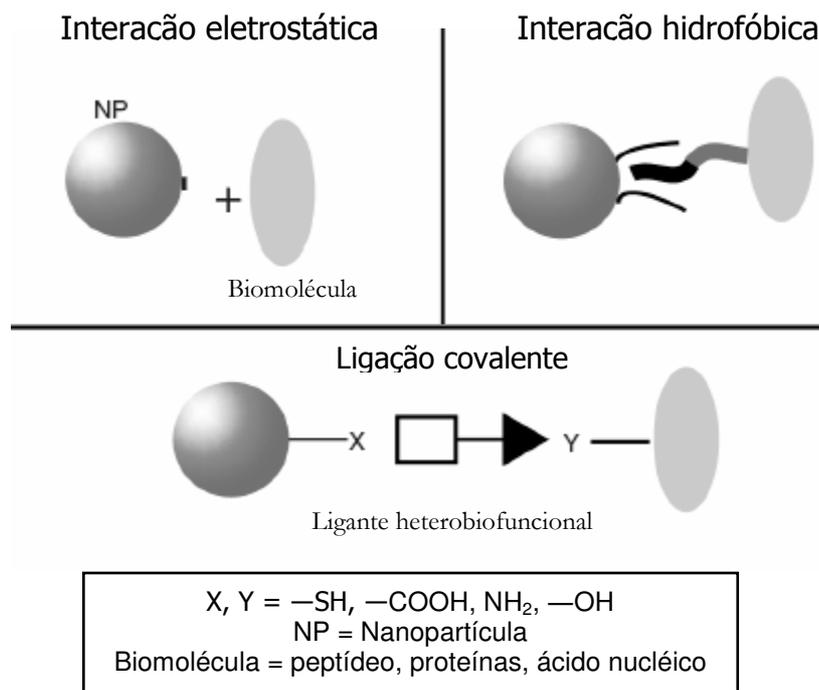


Figura 2.15: Tipos de Conjugação (eletrostática, hidrofóbicas ou covalente)[1].

As interações eletrostáticas dependem de interações entre as moléculas de cargas opostas como, por exemplo, um peptídeo carregado positivamente e uma nanopartícula com carga negativa, revestidos com polímeros. As interações hidrofóbicas são um tipo de interação molecular onde, compostos apolares sofrem consequências das ações dinâmicas dos compostos polares. Isso significa que, os compostos polares (hidrofílicos, que interagem com água) interagem entre si e, como os apolares não tem qualquer tipo de interação, eles são forçados a ficar numa condição que "atrapalhe menos" a interação dos compostos polares. Finalmente, a conjugação covalente destaca o uso de ligantes bifuncionais para anexar biomoléculas às nanopartículas. Assim, há possibilidade de conjugar as nanopartículas com peptídeos, carboidratos, ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e polímeros.

Além das interações destacadas acima também podemos citar o recobrimento das nanopartículas com sílica, processo conhecido como silanização (Figura 2.16).

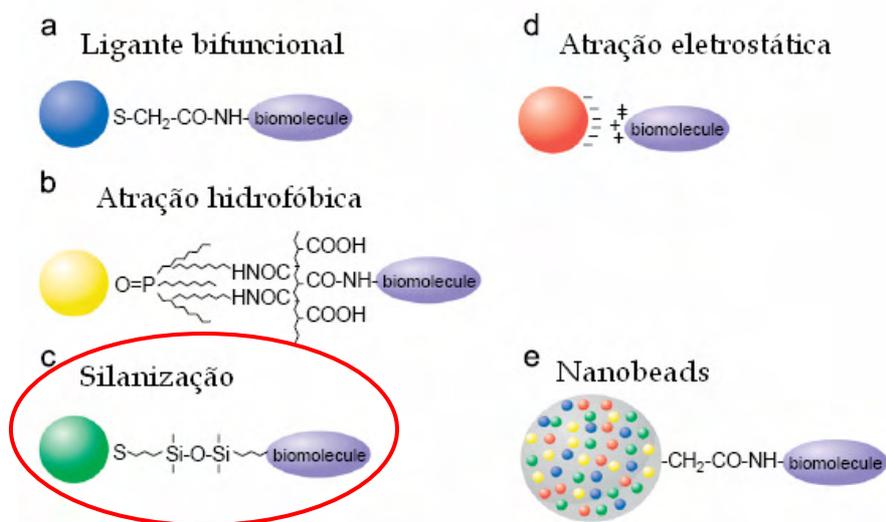


Figura 2.16: Tipos de funcionalização ou interações [43].

2.8.1 Silanização

O processo de silanização consiste basicamente no revestimento do material com uma capa de sílica amorfa, conferindo à partícula uma melhor estabilidade.

Os primeiros trabalhos destacando a silanização de partículas começaram em 1950 quando sua primeira patente foi publicada [44]. Nela, são descritos processos de crescimento de camadas homogêneas de SiO_2 num núcleo de material sólido de constituição diferente, incluindo processos de silanização em núcleos micrométricos e nanométricos em solução aquosa.

Os métodos propostos na patente consistiam basicamente na imersão dos núcleos em solução rica em sílica (adicionando silicato de sódio (NaSiO_2), à solução) e, através de mudanças no pH, modificavam a solubilidade da sílica ao meio obrigando-a precipitar. Uma fração do precipitado aderiu ao núcleo imerso. Este método mostrou-se pouco eficiente uma vez que a superfície das nanopartículas tem pouca afinidade eletrostática com a sílica, pois não formam uma camada passivante de óxido em solução, impossibilitando a formação de uma camada de SiO_2 diretamente na superfície dos pontos quânticos. Além disto, os estabilizantes estéricos adsorvidos na superfície do nanocrystal conferem ainda mais aversão ao crescimento da camada de sílica. Isto exigiu outra estratégia para a silanização de nanopartículas coloidais.

No começo da década de 1990, Ohmori e Matijevic usaram a hidrólise de alcanosilanos para encapar óxidos metálicos[40]. Em 1994 o grupo de Philipse usou a

combinação dos procedimentos de Iler e Ohmori para silanizar bastonetes de magnetita [45] e beomita [46].

Um grande passo na melhora deste processo foi proposto em 1998 por Liz-Marzán et. al [47]. Até então, não se conseguia encapar com eficiência superfícies vitreofílicas com sílica. Neste método, a silanização é feita através de uma molécula bifuncional, com uma das extremidades aderindo ao nanocristal, deixando a outra extremidade (que possui um grupo funcional silano) ancorada no ponto quântico, tornando sua superfície propícia ao crescimento de SiO₂.

2.9 Caracterizações dos nanocristais

O conhecimento detalhado da nanoestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, a previsão das propriedades e do comportamento dos mesmos. Tal conhecimento, sempre dependeu da disponibilidade e do aperfeiçoamento das técnicas experimentais. É importante destacar que uma caracterização nanoestrutural desejável envolve a determinação da estrutura cristalina, composição química, quantidade, tamanho, forma e distribuição das fases.

As espécies presentes na nanoestrutura apresentam características bastante diferenciadas e exigem um número relativamente grande de técnicas complementares para a sua caracterização. A determinação da estrutura cristalina normalmente envolve a utilização de técnicas de difração de Raios-x. Enquanto que a quantidade, tamanho, morfologia e distribuição das fases e defeitos cristalinos são estudados com auxílio de microscopias, como a microscopia eletrônica de transmissão (MET), por exemplo.

Neste trabalho destacaremos especificamente a caracterização estrutural das amostras pela técnica de difração de raios-X e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

2.9.1 Caracterizações estruturais

- Difração de Raios-X

A difratometria de Raios-X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. É comumente utilizada na engenharia, ciência de materiais, engenharias metalúrgica, química e de minas.

Ao atingirem o material os Raios-X podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons dos átomos. Se os átomos que geram o espalhamento estiverem arranjados de maneira sistemática, como em uma estrutura cristalina (Anexo 1), pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicos e que os efeitos de difração dos Raios-X podem ser observados em vários ângulos. As condições para que ocorra difração de Raios-X vão depender da diferença de caminho percorrido pelos Raios-X e o comprimento de onda da radiação incidente.

Com a utilização desta técnica podemos identificar os planos de difração, suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos (elétrons) ao longo de cada plano cristalino. Estas são características específicas e únicas de cada substância cristalina, da mesma forma que o padrão difratométrico por ela gerado. Além destes dados também podemos calcular o tamanho médio das partículas sintetizadas a partir da fórmula de Sherrer (2.4):

$$0,9 \cdot \lambda = d \cdot B \cdot \cos\theta \quad (2.4)$$

Onde: d = diâmetro das nanopartículas em nanômetros (nm); λ = comprimento de onda utilizado pelo equipamento ($\lambda = 1,542 \text{ \AA}$); B = largura de linha a meia altura do pico de difração de maior intensidade; θ = ângulo de incidência do feixe de raio-X no pico mais intenso.

É importante destacar que os resultados obtidos através desse método devem ser confrontados com outras caracterizações.

- **Microscopia eletrônica de transmissão**

Para obtenção de imagens das nanopartículas de semicondutores utilizamos a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Esta técnica permite a obtenção de imagens com alta resolução. Através das imagens obtidas podemos observar a forma, tamanho, arranjo e cristalinidade do material estudado.

A importância do conhecimento e das análises quantitativas da microestrutura tem levado a um contínuo desenvolvimento das técnicas experimentais, particularmente da microscopia, cujos aumentos máximos possíveis têm crescido e as resoluções melhorado continuamente.

O microscópio eletrônico de transmissão consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe em uma coluna de vácuo. A

maioria dos equipamentos utilizados no estudo de materiais (metálicos, cerâmicos e poliméricos) dispõe de tensão de aceleração de até 200 kV. Já os MET utilizados em biologia (materiais orgânicos naturais) em geral operam na faixa de 60 a 80 kV.

Durante a visualização, a amostra provoca o espalhamento dos elétrons para fora do campo e a imagem final pode ser visualizada numa tela fluorescente. A intensidade do espalhamento depende da espessura do objeto em estudo. O contraste nas imagens formadas em MET tem diversas origens, tais como diferença de espessura, diferença de densidade ou de coeficiente de absorção de elétrons (contraste de massa). Substâncias orgânicas são relativamente transparentes a elétrons e mostram pouco contraste em relação ao suporte. Para sólidos cristalinos a transparência a elétrons depende das condições de difração que diferem conforme a direção. Quando um feixe de elétrons passa por uma lâmina de material cristalino, somente aqueles planos quase paralelos ao feixe incidente contribuem para a figura de difração.

2.9.2 Caracterizações espectroscópicas

Os métodos experimentais em espectroscopia oferecem contribuições notáveis para o estado da arte da física atômica e molecular, da química e da biologia molecular. Muito do nosso atual conhecimento acerca da estrutura da matéria é baseado em investigações espectroscópicas. Informações sobre a estrutura molecular e sobre a interação de moléculas com seus vizinhos podem ser derivadas de diversos modos a partir dos espectros de emissão e/ou absorção gerados quando a radiação interage com os átomos e/ou moléculas da matéria.

Para espectroscopia de absorção clássica as fontes de radiação são incoerentes e possuem uma banda de emissão bastante larga (geralmente utiliza-se lâmpadas de Hg, Xe, etc). Para realização das medidas, a radiação emitida pela lâmpada passa pela amostra e é focalizada na entrada de um espectrofotômetro. A intensidade da luz transmitida é medida em função do comprimento de onda. O espectro de absorção é obtido por comparação da intensidade da luz transmitida com a intensidade de um feixe de referência.

Referências

- [1] VO-DINH, T. *Nanotechnology in biology and medicine : methods, devices, and applications*. Taylor & Francis Group, LLC, 2006.
- [2] SCHMID, G (Ed.). *Nanoparticles From Theory to Application*. Weinheim, WILEY VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- [3] ROMANO, R. Monografia: Estrutura e modelos de ligação química para semicondutores III-V E II-VII. Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP, 2003.
- [4] REZENDE, S. M. *Materiais e dispositivos eletrônicos*. São Paulo: Editora Livraria da Física: São Paulo, 2ª ed. 2004.
- [5] MORRINSON, M. A.; ESTLE, T. L.; LANE, N. F. *Quantum States of Atoms, Molecules, and Solids*. Nova Jersey, Prentice-Hall, 1976.
- [6] GAPONENKO, S. V. *Optical properties of semiconductor nanocrystals*. Cambridge, Cambridge University Press, 1998.
- [7] SANTOS, B. S. *Obtenção de nanopartículas de CdS em sistemas amorfos e a investigação de suas propriedades óptico não-lineares em meio aquoso*. 2002. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 2002.
- [8] BRUS, L. E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *J. Chem. Phys.*, v. 80, p. 4403, 1984.
- [9] AGRAWAL, A.; XING, Y.; GAO, X.; NIE, S. *Nanotechnology in biology and medicine: Methods, Devices, and Applications*. Taylor & Francis Group, LLC, 2007.
- [10] VOSSMEYER, T.; KATSIKAS, L.; GIERSIG, M., POPOVIC, I. G.; DIESNER, K.; CHEMSEDDINE, A.; EYCHMÜLLER, A.; WELLER, H. J. WELLER. CdS Nanoclusters: synthesis, characterization, size dependent oscillator strength, temperature shift of the excitônica transition energy, and reversible absorbance shift. *Phys. Chem.*, v. 98, p.7665, 1994.
- [11] <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2007-0626-203806/c1.pdf> - Quantum dots, conducting polymers and electrochemical gating. JAECKEL, G. Ueber einige neuzeitliche Absorptionsglaesser. *Z. Tech. Phys.*, v. 6, p. 301-304, 1926.
- [12] REDÍGOLO, M. L. *Caracterização óptica de pontos quânticos de CdTe em matriz vítrea*. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física Gleb Wataglin, Departamento de Eletrônica quântica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- [13] NOZIK, A. J.; WILLIAMS, F.; NENADOVIC, M. T.; RAJH, T.; MIEIE, O. I. Size quantization in small semiconductor particles. *J. Phys. Chem.*, v. 89, p. 397-399, 1985.
- [14] REDÍGOLO, M. L.; ARELLANO, W. A.; BARBOSA, L. C.; BRITO-CRUZ, C. H.; CÉSAR, C. L.; PAULA, A. M. Temperature dependence of the absorption spectra in CdTe-doped-glasses. *Semicond. Sci. Tech.*, v. 14, p.58-63, 1999.
- [15] ZHOU, M.; GLOSH, I. Quantum dots and Peptides: A Bright Future Together. *Biopolymers - Peptide Science*, v. 22, p. 325-339, 2006.

- [16] JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides, *Química Nova na Escola*, v. 9, p. 9-13, 1999.
- [17] SHAW, D. J. *Introdução a Química dos Colóides e de Superfície*. Tradução: Juergen Heinrich Maar. São Paulo: Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo, 1975.
- [18] EYCHÜLLER, A. Structure and Photophysics of Semiconductor Nanocrystals *J. Phys. Chem. B.*, v. 104, p. 6514, 2000.
- [19] TALAPIN, D. V.; ROGACH, A. L.; SHEVCHENKO, E. V.; KORNOWSKI, A.; HAASE, M.; WELLER, H. Dynamic distribution of growth rates within the ensembles of colloidal II-VI and III-V semiconductor nanocrystals as a factor governing their photoluminescence efficiency. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 124, p. 5782-5790, 2002.
- [20] MURRAY, C. B. D.; NORRIS, J.; BAWENDI, M. G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E=S,Se,Te) Semiconductor Nanocrystallites. *Journal of American Chemical Society*. v. 115, p. 8706, 1993.
- [21] LAMER, V. K. *Ind. Eng. Chem.*, v. 44, p. 1270, 1952.
- [22] HAUTA, M.; DELMON, B. Preparation of homodisperse solids. *J. Chem. Phys.*, v. 83, p. 859, 1986.
- [23] GOODWIN, J. *Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers: An Introduction*. Interfacial Dynamics Corporation Portland, Oregon, USA. John Wiley & Sons Inc., 2004.
- [24] HINES, M. A.; GUYOT-SIONNEST, P. Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals. *J. Phys. Chem.*, v.100, p. 468, 1996.
- [25] CHAVES, C. R. *Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: aplicações biológicas*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais), Programa de Pós-graduação e Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- [26] BRUCHEZ, M. JR.; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S.; ALIVISATOS, A. P. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science*, v. 281, 1998.
- [27] DUBERTRET, B.; SKOURIDES, P.; NORRIS, D. J.; NOIREAUX, V.; BRIVANLOU, A. H.; LIBCHABER, A. In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science*, v. 298, p. 1759 – 1762, 2002.
- [28] ZHANG, P.; ZHAO, X. Quantum dynamics of a driven double quantum dot. *Physics Letters*, v. 271, p. 419-428, 2000.
- [29] ZHOU, X.; KOBAYASHI, Y.; ROMANYUK, V.; OCHUCHI, N.; TAKEDA, M.; TSUNEKAWA, S.; KASUYA, A. Preparation of silica encapsulated CdSe quantum dots in aqueous solution with the improved optical properties. *Applied Surface Science*, v. 242, p. 281-286, 2005.
- [30] PELLEGRINO, T.; MANNA, L.; KUDERA, S.; LIEDL, T.; KOKTYSH, D.; ROGACH, A.L.; KELLER, S.; RÄDLER, J.; NATILE, G.; PARAK, W. J. Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals. *Nano Lett.*, v. 4, p. 703–707, 2004.
- [31] PETRUSKA, A. M.; BARTKO, A. P.; KLIMOV, V. I. An Amphiphilic Approach to Nanocrystal Quantum Dot–Titania Nanocomposites. *Am. Chem. Soc.*, v. 126, p. 714-715, 2004.

- [32] WOLLCOTT, A.; GERION, D.; VISCONTE, M.; SUN, J.; SCHWARZBERG, A.; CHEN, S.; ZHANG, J. Silica-coated CdTe quantumdots funcionalized with thiols for bioconjugation to IgG proteins. *J. Phys. Chem. B*, v. 110, p. 5779-5789, 2006.
- [33] FARIAS, P.M.A.; SANTOS, B.S.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R. C.; BARJAS-CASTRO, M. L.; CASTRO, V.; LIMA, P. R. M.; FONTES, A.; CESAR, C. L. Core-shell CdS/Cd(OH)₂ quantum dots: synthesis and bioconjugation to target red cells antigens. *Journal of microscopy*, v. 209, p.103 - 108, 2005.
- [34] KIERNAN, A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy Today*: v. 1, p. 8-12, 2000.
- [35] MARGEL,S.; ZISBLATT, S.; REMBAUM, A. Polyglutaraldehyde: a new reagent for coupling proteins to microspheres and for labeling cell-surface receptors. II. Simplified labeling method by means of non-magnetic and magnetic polyglutaraldehyde microspheres. *J. Immunol. Methods*, v. 28, p. 341, 1979.
- [36] HERMANSON, G. T. *Bioconjugate techniques*. San Diego, Academic Press, 1996.
- [37] WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaldehyde. *Trends in a analytical*, v. 13, 1994.
- [38] GAPONIK, N.; TALAPIN, D.; ROGACH, A. L.; HOPPE, K.; SHEVCHENKO, E. V.; KORNOWSKI, A.; EYCHMÜLLER, A.; WELLER, H.. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes *J. Phys. Chem. B*, v. 106, p. 7177, 2002.
- [39] MURASE, N.; GAPONIK, N.; WELLER, H. Effect of chemical composition on luminescence of thiol-stabilized CdTe nanocrystals. *Nanoscale Res Lett*, v. 2, p. 230–234, 2007.
- [40] PARAK, W.J.; GERION, D.; ZANCHET, D., WOERZ, A.S; PELLEGRINO, T., MICHEEL, C.; WILLIAMS, S. C.; SEITZ, M.; BRUEHL, R. E.; BRYANT, Z.; BUSTAMANTE, C.; BERTOZZI, C. R.; ALIVISATOS, A. P. *Chem Mater*, v. 14, p. 2113–2119, 2002.
- [41] PARAK, W. J.; GERION, D.; PELLEGRINO, T.; ZANCHET, D.; MICHEEL, C.; WILLIAMS, S. C.; BOUDREAU, R.; LE GROS, M. A.; LARABELL, C. A.; ALIVISATOS, A. P. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*, v. 14, p. 15-27, 2003.
- [42] MAHTAB, R.; HARDEN, H. H.; MURPHY, C.J. Temperature- and salt-dependent binding of long DNA to protein-sized quantum dots: thermodynamics of inorganic protein – DNA interactions. *J. Am. Chem.*, v. 122, p. 14-17, 2000.
- [43] JAMIESON, A.; T.; BAKHSHIA, R.; PETROVAA, D.; POCOCCA R.; IMANIB, MO.; SEIFALIAN, A. M. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, v. 28, p. 4717–4732, 2007.
- [44] ALEJANDRO-ARELLANO, M.; UNG, T.; BLANCO, A.; MULVANEY, P.; LIZ-MARZÁN, L. M.. Silica-coated metals and semiconductors: Stabilization and nanostructuring. *Pure Appl. Chem.*, v. 72, 257, 2000.

[45] PHILIPSE, A. P.; VAN BRUGGEN, M. P. B.; PATHMAMANO HARAN, C. Magnetic silica dispersions: preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core. *Langmuir*, v. 10, p. 92-99, 1994.

[46] PHILIPSE, A. P.; NECHIFOR, A. M.; PATMAMANO HARAN, C. Isotropic and Birefringent Dispersions of Surface Modified Silica Rods with a Boehmite-Needle Core. *Langmuir*: v.10, p. 4451, 1994.

[47] CORREA DUARTE, M. A.; GIERSIGB, M.; LIZ-MARZÁN, L. M. Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by silica coating procedure. *Chemical Physics Letters*, v. 286, p. 497-501, 1998.

3.1 Introdução

Pontos quânticos de alta qualidade (por exemplo, CdSe/ZnS) foram inicialmente preparados a temperaturas elevadas em solventes orgânicos como TOP/TOPO (trioctilfosfina/óxido de trioctilfosfina) e hexadecil amina [1,2]. Como resultado do emprego de metodologias de síntese em solventes orgânicos, as nanopartículas apresentam-se revestidas por ligantes orgânicos e redispersáveis apenas em solventes hidrofóbicos (como por exemplo, clorofórmio e tolueno).

Com o objetivo de aplicação dessas nanopartículas de semicondutores como marcadores fluorescentes em sistemas biológicos, descrevemos a seguir o desenvolvimento de metodologias experimentais para síntese das mesmas em meio aquoso.

Neste trabalho utilizamos compostos que apresentam grupamento tiol [3] como estabilizantes e precursores da passivação das nanopartículas de semicondutores em meio aquoso. Os tióis são compostos orgânicos que contêm o grupamento $-SH$, são ácidos, reagem com bases e alguns metais formando compostos semelhante a sais. Trabalhos recentes destacam a utilização de pequenas moléculas contendo grupamento $-SH$ como ótimos estabilizantes de nanopartículas de CdTe [4,5]. Melhorias de sínteses em meio aquoso vem sendo relatadas por diferentes grupos. Dentre elas, destacam-se as sínteses hidrotermais [6], irradiação por microondas [7,8], variações nas concentrações dos reagentes e pH, além das alterações de estabilizantes. A escolha criteriosa da quantidade de estabilizante permite um melhoramento na eficiência da fotoluminescência de nanocristais de CdTe [5].

Neste Capítulo destacamos a formação de PQs de CdTe através da reação entre Telúrio reduzido (Te^{2-}) e uma solução aquosa contendo cádmio em sua forma oxidada (Cd^{2+}), além do agente estabilizante (que contém grupamentos tióis). Também destacamos a etapa de passivação das nanopartículas, processo caracterizado pela formação de monocamadas de CdS em sua superfície, resultando em partículas tipo core-shell CdTe/CdS. Tal processo reduz a quantidade de defeitos superficiais e contribui para intensificação da fluorescência. Além de descrever as metodologias para síntese dos PQs de CdTe/CdS, também destacamos os métodos utilizados para caracterização das suspensões coloidais obtidas. Os resultados das caracterizações estão descritos na Seção 3.3.

3.2 Procedimentos experimentais

Para obtenção de PQs de CdTe/CdS, utilizamos protocolos de síntese em meio aquoso a partir da modificação de sínteses descritas na literatura utilizando três diferentes agentes estabilizantes (Figura 3.1): ácido mercaptoacético (AMA) ou ácido tioglicólico, ácido 3-mercaptopropiônico (AMP) e ácido mercaptosuccínico (AMS), todos da *Sigma Aldrich*. Todas as sínteses foram preparadas com água deionizada sob atmosfera inerte de Argônio (*White Martins*).

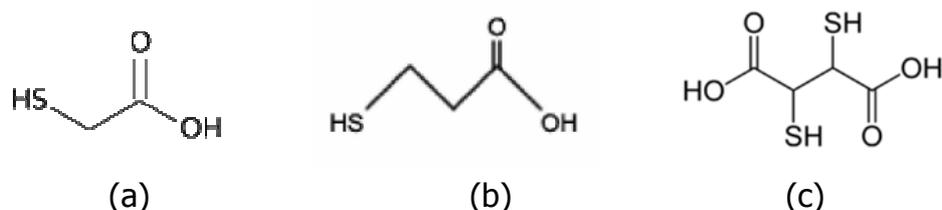


Figura 3.1: Fórmulas estruturais dos agentes estabilizantes utilizados para obtenção de CdTe: (a) Ácido mercaptoacético (AMA), (b) ácido 3-mercaptopropiônico (AMP) e (c) ácido mercaptosuccínico (AMS).

Para obtenção dos PQs de CdTe/CdS inicialmente destacou-se a desprotonação dos grupamentos sulfidrilas dos estabilizantes alterando o pH da solução com NaOH para 10,5; valor acima do pK_{SH} dos estabilizantes. Esse ajuste garante uma maior concentração da forma ionizada no meio reacional. Os grupamentos resultantes da desprotonação das sulfidrilas possuem alta afinidade pelo Cd^{2+} que irá interagir com os íons que apresentam ligações não compartilhadas na superfície das nanopartículas.

Todas as reações para obtenção de PQs de CdTe/CdS foram realizadas sob atmosfera inerte. A ausência de O_2 foi imprescindível para redução do telúrio e manutenção de seu número de oxidação (Nox). O processo de redução do telúrio metálico Te^0 para Te^{1-} foi visualizado pela mudança da coloração acinzentada para coloração violeta. A posterior ausência de coloração do meio evidencia a completa redução para Te^{2-} .

Os PQs relatados neste capítulo, apresentam estrutura do tipo núcleo-casca (core-shell), sendo o núcleo constituído por CdTe e a casca por CdS (passivante). O procedimento utilizado para síntese do núcleo de CdTe é dividido em duas etapas (Figura 3.2): preparação da solução de cádmio/agente estabilizante, ($Cd^{2+}/-SH$) e redução do telúrio utilizando boridreto de sódio ($NaBH_4$) como agente redutor.

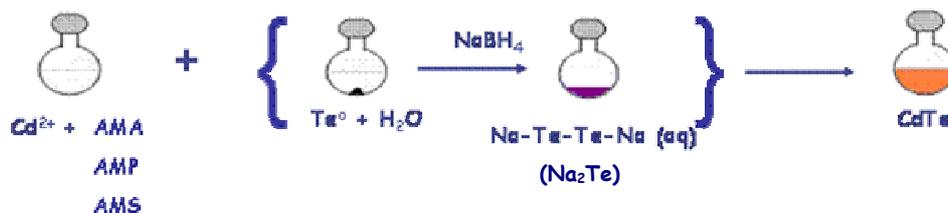


Figura 3.2: Esquema geral para obtenção de PQs de CdTe/CdS.

3.2.1 Síntese de PQs de CdTe/CdS utilizando ácido mercaptoacético (AMA)

Para preparação da solução Cd^{2+} /AMA adiciona-se 1,2 mL de solução de ácido mercaptoacético (AMA) (4,9%). Em seguida, o pH é elevado para 10,5 para desprotonação do AMA. Após ajuste do pH e sob agitação, adicionamos 20 mL de solução de perclorato de cádmio $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ a 0,01 M (sintetizado previamente a partir do ataque de ácido perclórico (HClO_4) ao precursor óxido de cádmio (CdO) - 99,95%, *Alfa Aesar*). A solução formada de Cd^{2+} /AMA é aquecida lentamente até a temperatura final de 80°C.

A segunda etapa se caracteriza pela redução do telúrio. Utilizamos aproximadamente 0,013 g de telúrio metálico (Te^0) (99,8%, *Aldrich*) com 200 μL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) à 2 M. Em seguida, sob agitação e atmosfera inerte adicionamos 0,017 g do agente redutor, boridreto de sódio (NaBH_4) (98%, *Sigma-Aldrich*) dissolvido em 2,0 mL de água deionizada.

Após mistura da solução Cd^{2+} /AMA com telúrio reduzido (Te^2), aquecemos a suspensão para acelerar o crescimento das partículas. Retiramos alíquotas após os seguintes tempos: 15 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h. Novas sínteses foram realizadas para melhoramento no protocolo para redução do telúrio. A proporção de Cd: Te: AMA foi de 2:1:1.

3.2.2 Síntese de PQs de CdTe/CdS utilizando ácido mercaptopropiônico (AMP)

Nesta Seção destacamos a síntese de PQs de CdTe utilizando o ácido mercaptopropiônico (AMP).

Para preparação da solução Cd^{2+} /AMP adiciona-se 1,2 mL de solução AMP (a 4,9% e pH 2,4). Elevou-se o pH para 10,5 para adição de 20 mL de solução de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$

(0,01M e pH 5,2). Deixa-se então a solução sob agitação e aquecimento até temperatura final de aproximadamente 80°C.

Para obtenção do telúrio reduzido (Te^{2-}), precursor na formação dos pontos quânticos, solubiliza-se 0,013 g de telúrio metálico (Te^0) em 100 μL de NaOH a 2 M. A partir desse ponto todas as reações se processam em atmosfera inerte de argônio. A ausência de O_2 é imprescindível para a redução do Telúrio, que foi realizada através da adição de 0,144 g de Boridreto de Sódio (NaBH_4) previamente solubilizado em 2,0 mL de água. Em seguida, a temperatura foi lentamente elevada a 80°C, até redução total do metal. Esse processo ocorre num intervalo de aproximadamente uma hora, e é evidenciado pelo aparecimento de coloração violeta, característica do telúrio Te^{1-} . Em seguida, a coloração transparente caracteriza a redução Te^{1-} para Te^{2-} .

Para obtenção dos PQs adicionamos a solução de $\text{Cd}^{2+}/\text{AMP}$ à solução com telúrio reduzido (Te^{2-}). A reação continua sob agitação e aquecimento (80°C \pm 10°C) durante 7 horas. Uma vez obtidos através deste procedimento de síntese os PQs já se encontram passivados com CdS e funcionalizados com AMP. Os grupamentos carboxílicos terminais do AMP permitirão interações com cadeias de proteínas, necessitando para isso, apenas o ajuste do pH da suspensão final. Assim, os PQs obtidos já estarão adequados para utilização em sistemas biológicos. Também utilizamos uma proporção de Cd: Te: AMP de 2:1:1.

3.2.3 Síntese de PQs de CdTe/CdS utilizando ácido mercaptosuccínico (AMS)

Esta síntese se caracteriza por ser realizada em meio aquoso e em tampão fosfato também conhecido como PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Além da mudança do estabilizante, a utilização de PBS foi realizada para elevar a osmolaridade da suspensão para futuras aplicações em sistemas biológicos. A síntese de PQs com AMS para aplicações na biologia foi recentemente descrita por Ying *et. al* [9], que utilizou uma adaptação da metodologia descrita por Bao *et. at* (2006)[10]. Nessa síntese além do funcionalizante ser diferente foi proposta uma metodologia utilizando diluição em PBS (Tampão Fosfato Salino) para que a quantidade de sais fosse aumentada para testar se haveria uma melhor bioconjugação dos PQs às proteínas.

A metodologia de síntese para o AMS foi semelhante a do AMP (Seção 3.2.2), diferenciando apenas na quantidade de reagente e na adição de PBS ao final da síntese:

0,032 g AMS dissolvidos em 5 mL de H₂O, 20 mL de solução de Cd(ClO₄)₂ a 0,01 M, 80 mL de PBS, 0,013 g de Telúrio em pó (Te⁰), 100 µL de NaOH a 2 M e Boridreto de Sódio (NaBH₄) solubilizado em aproximadamente 2,0 mL de água. A reação continua então sob agitação e aquecimento (90°C ± 10°C) durante 10 horas. A proporção de Cd: Te: AMS utilizada foi de 2:1:2,4. Nessa síntese, as nanopartículas já são automaticamente passivadas com CdS e funcionalizadas com AMS.

Resumindo as sínteses descritas na Seção 3.2 com os diferentes estabilizantes temos (Tabela 3.1):

Tabela 3.1: Quantidades de reagentes para cada síntese de CdTe/CdS.

	Volume e massa Estabilizante	Volume (mL) de Cd(ClO ₄) ₂	Massa (g) de Telúrio	Massa (g) de NaBH ₄
CdTe (AMA)	1,2 mL	20	0,013	0,017
CdTe (AMP)	1,2 mL	20	0,013	0,144
CdTe (AMS)	0,032 g	20	0,013	0,144

3.2.4 Caracterização estrutural das suspensões coloidais

Nesta Seção descrevemos as técnicas utilizadas para caracterização das nanopartículas sintetizadas. Essas técnicas foram utilizadas para caracterização dos PQs de CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂, que será detalhado no próximo Capítulo (Capítulo 4). Dentre a caracterização estrutural damos ênfase à difração de Raios-X e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Difração de Raios-X - As caracterizações estruturais das nanopartículas foram realizadas através de análises de padrões de difração de Raios-X de pó (DRX), no Departamento de Física da UFPE. Difrátogramas de Raios-X foram obtidos entre 2θ = 10 e 60°. A análise foi realizada através de um difratômetro *Siemens Nixdorf D5000*, utilizando radiação Cu-Kα (λ= 1,542Å), voltagem de 40 KV e corrente de 40 mV. Para realização deste experimento foi necessário precipitar as suspensões de CdTe/CdS. Para facilitar a centrifugação utilizamos isopropanol, retiramos o sobrenadante e o ressuspendemos com um pouco de acetona. Depositamos o material em uma lâmina e deixamos secar para obtenção do pó. A atribuição dos picos observados foi feita utilizando banco de dados JCPDS.

Microscopia eletrônica de transmissão - As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS). Para obtenção das imagens utilizamos o equipamento da *TEM FEI-Tecnai* do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), com micro-sonda operado com energia de 200 kV e microscópio de alta resolução 300 kV (JEOL 3010 URP, resolução de até 1,7 Å) no laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS). As amostras utilizadas na MET devem ter espessuras extremamente finas (500 a 5000 Å). Para realização das medidas, uma pequena fração do material foi depositada em filme de *formvar* e filme de carbono apoiados em pequenas grades de níquel e cobre. Antes da preparação das grades diluímos a suspensão de CdTe/CdS em água deionizada (diluição 1:5) e a deixamos por 15 minutos no ultra-som para redispersão. Após pingarmos uma pequena gota (aproximadamente 12 µL) nas grades deixamos estas secar a temperatura ambiente durante 24 horas em dessecador.

3.2.5 Caracterização ótica das suspensões coloidais

As propriedades óticas das suspensões coloidais foram analisadas por espectroscopia de absorção no espectrofotômetro *Ocean Optics* (modelo HR4000), usando água como referência, no laboratório de Biofísica Química Prof. Ricardo Ferreira. Espectros de excitação e emissão eletrônicas foram obtidos no espectrofluorímetro PC1 da ISS. Para efeito de comparação entre as preparações os parâmetros do equipamento foram mantidos constantes, ou seja, comprimento de onda (λ) de excitação em 365 nm, fendas de excitação: 1 mm; 1 mm; e de emissão 1 mm; 1 mm; voltagem (lâmpada de xenônio)= 15 V. Este equipamento foi utilizado no laboratório de Polímeros Não-Convencionais, no Departamento de Física (DF)/UFPE.

3.3 Resultados e Discussões

Nas seções a seguir mostramos os resultados das caracterizações das suspensões de PQs de CdTe/CdS com os diferentes estabilizantes.

3.3.1 Pontos quânticos de CdTe/CdS com (AMA)

Esforços foram empreendidos para aperfeiçoar a preparação de CdTe/CdS com AMA. Estes experimentos foram importantes para melhor compreender a química envolvida na formação das nanopartículas. Através de diferentes tentativas observamos a importância da ausência de O₂ para obtenção de suspensões homogêneas, estáveis e de boa qualidade óptica.

A seguir, mostramos fotografias (Figura 3.3) das primeiras tentativas para obtenção de PQs de CdTe/CdS. Para redução do telúrio foi necessário usar atmosfera de nitrogênio. Pela coloração da suspensão e presença de alguns aglomerados acreditamos que a redução do telúrio não foi completa. Mesmo com uma montagem simples e incompleta obtivemos suspensões onde foram caracterizadas a presença de nanocristais de CdTe fluorescentes.



Figura 3.3: Tentativas para redução do telúrio e obtenção de PQs de CdTe/CdS.

Através deste primeiro experimento foi possível observar algumas características óticas interessantes após diferentes tempos de aquecimento (15 min., 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h). Utilizando uma lâmpada de UV com comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc.} = 365$ nm) observamos diferentes colorações juntamente com suas características fluorescentes (Figura 3.4).

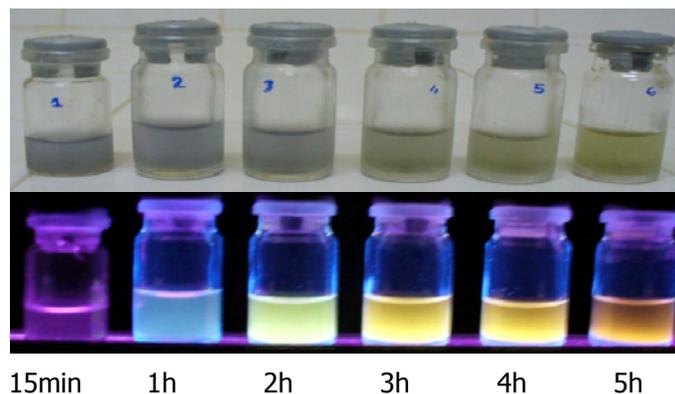


Figura 3.4: Aspecto das suspensões de PQs de CdTe/CdS sob luz visível e excitação em $\lambda = 365$ nm, preparadas em diferentes intervalos de aquecimento.

Visualizando os espectros (Figura 3.5) das suspensões de CdTe/CdS com diferentes tempos de aquecimento, observamos intensa absorção do material na região ultravioleta. O aquecimento das suspensões ocasiona um deslocamento no comprimento de onda de absorção para o visível evidenciando o crescimento das partículas formadas.

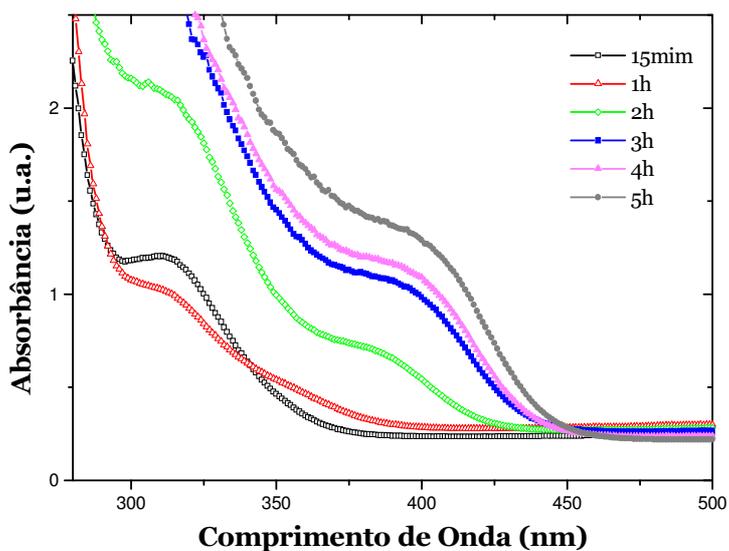


Figura 3.5: Espectro de absorção de PQs de CdTe/CdS após aquecimento.

Através destas primeiras tentativas e após aquisição de sistema de argônio conseguimos uma completa redução do telúrio. Fotografias desta etapa podem ser visualizadas na Figura 3.6.

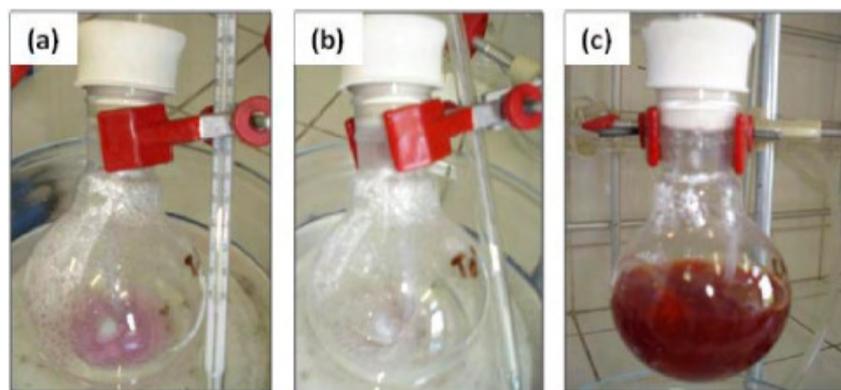


Figura 3.6: Fotografias do processo reacional de redução do Te^{1-} para Te^{2-} em meio aquoso. O complexo Na-Te-Te-Na apresenta uma coloração violeta (a) enquanto que o sal Na_2Te é incolor (b). O resultado final da síntese demonstra uma coloração castanha, típica para nanocristais de CdTe (c).

Utilizando uma lâmpada de UV ($\lambda_{\text{exc.}} = 365\text{nm}$) observamos a fluorescência da suspensão (Figura 3.7).

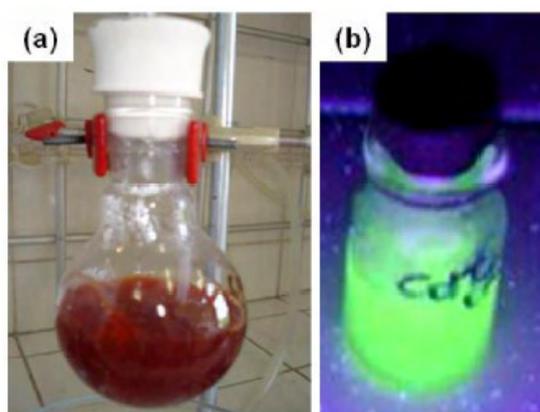


Figura 3.7: Fotografias da suspensão de CdTe (AMA) (a) e fluorescência da suspensão quando excitada com lâmpada UV (b).

Após aquisição do sistema de argônio e melhor entendimento da metodologia para redução do telúrio obtivemos novas suspensões para melhores caracterizações. Através do espectro de absorção (Figura 3.8) utilizamos a posição do primeiro máximo ($\lambda = 470\text{ nm}$) para calcular o tamanho da partícula. Considerando uma aproximação da massa efetiva, utilizamos a Equação 2.2 para verificar o tamanho das partículas. Através dessa equação obtivemos um tamanho de aproximadamente 2,0 nm. Comparando com outras metodologias verificamos que as partículas sintetizadas estão com tamanhos de acordo com os da literatura de 2,0 a 2,5 nm [4,12].

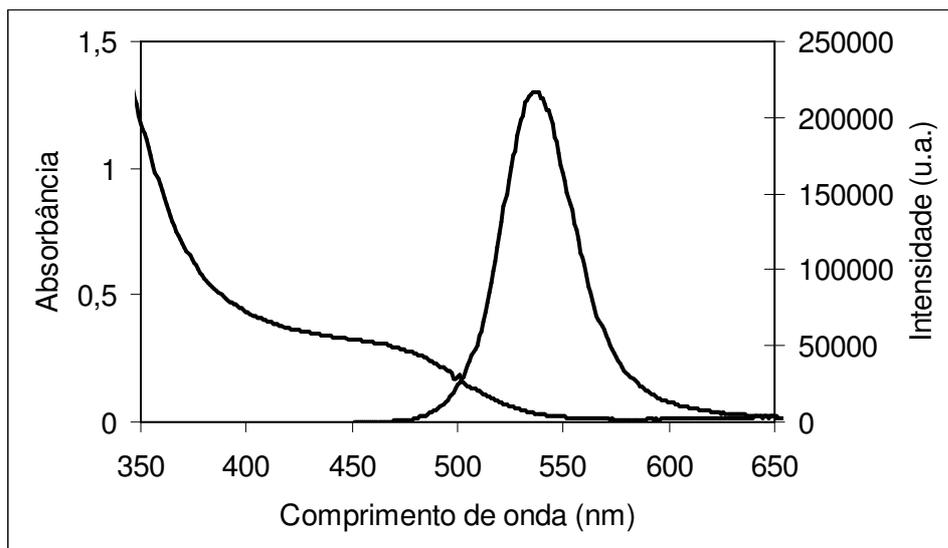


Figura 3.8: Espectros de absorção e emissão de PQs de CdTe/CdS com AMA ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$)

No espectro de emissão, também na Figura 3.8, verificamos uma intensidade máxima em aproximadamente $\lambda = 538 \text{ nm}$ o que corresponde à emissão na região verde do espectro eletromagnético. Para as suspensões de CdTe/CdS o espectro de emissão foi obtido excitando a mostra em 365 nm.

Através do difratograma de Raios-X (Figura 3.9) observamos um alargamento dos picos, indicando um regime de dimensão nanométrico. 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.

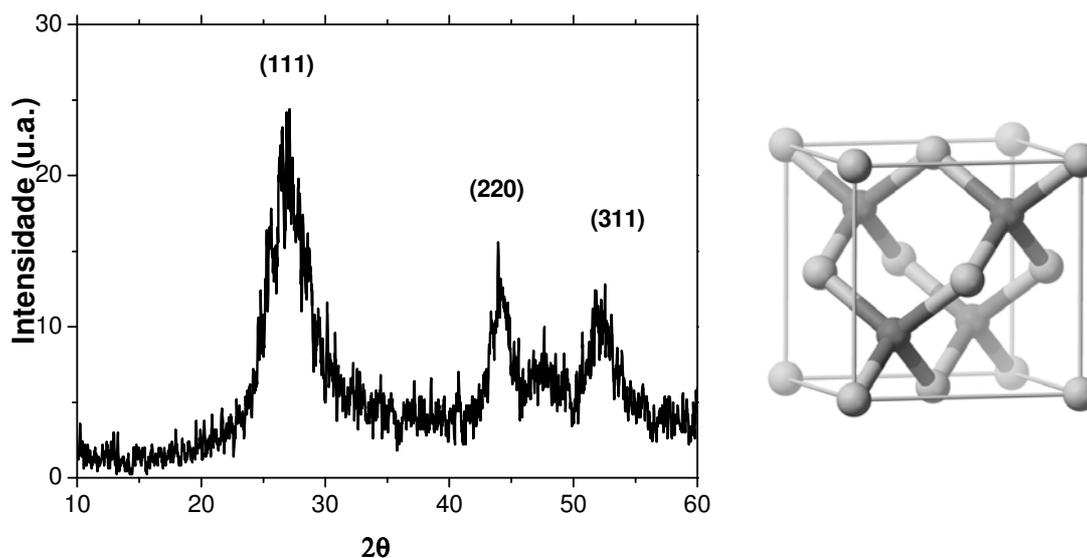


Figura 3.9: Difratograma de Raios-X de pó de PQs de CdTe/CdS com AMA.

O pico máximo foi visualizado na região de $2\theta = 26,74^\circ$, caracterizando o plano (111). Através da observação dos picos mais intensos no difratograma destacamos a presença de um sistema cristalino cúbico, tipo blenda de zinco. Este dado se encontra em concordância com a literatura e com os padrões disponibilizados pela biblioteca JCPDS [11,13].

Também utilizamos a equação de Scherrer (Equação 2.4) para estimava do tamanho das partículas. Substituindo os valores na fórmula temos:

- Para a largura do pico de difração mais intenso a meia altura (β), foi encontrado um valor de $3,58^\circ$. Para ser empregado na equação, o valor encontrado deve ser convertido em Radianos. Após conversão encontramos $0,0628$ Rad.
- O ângulo do pico mais intenso, apresentou um valor de $2\theta=26,74^\circ$. Portanto o valor de θ , corresponde a $26,74^\circ/2= 13,37^\circ$. Em seguida calculou-se o Cosseno do valor de θ encontrado ($13,37^\circ$), tendo como resultado $\text{Cos}\theta=0,9723$.
- Por fim, os valores obtidos foram inseridos na equação de Scherrer.
$$d(\text{Å}) = (0,9 \times 1,5406) / (0,0628 \times 0,9723) = 22,72 \text{ Å}$$

Convertendo o valor encontrado em nanômetros, temos um diâmetro médio de $2,3$ nm, confirmando assim o regime de confinamento quântico.

A Figura 3.10 destacamos uma imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de CdTe. Observamos partículas na faixa de 3 a 5 nm e presença de alguns planos atômicos.

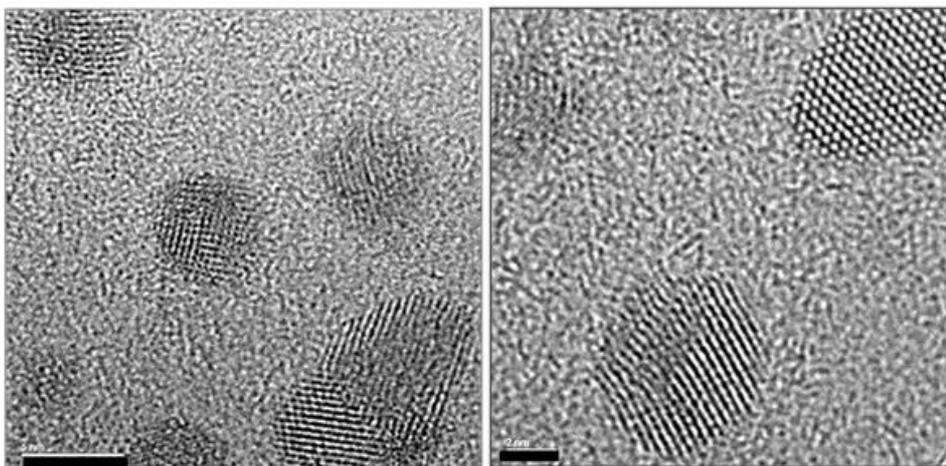


Figura 3.10: Microscopia eletrônica de transmissão de PQs de CdTe/CdS com AMA. (Esquerda) Barra = 5 nm (Direita) Barra = 2 nm.

Através da junção das técnicas de caracterização (espectros de absorção, difração de Raios-X e MET) foi possível confirmar o regime nanométrico das partículas obtidas (2 - 3 nm). Com a obtenção das imagens de MET foi possível identificar a presença de planos cristalinos.

A utilização do AMA neste trabalho será importante para posteriores estudos de eficiência da fluorescência em suspensões de CdTe/CdS com diferentes tióis. A quantidade desses surfactantes nas reações também devem ser investigadas, pois eles afetam a estrutura das nanopartículas alterando assim suas características.

3.3.2 Pontos quânticos de CdTe/CdS com (AMP)

Nesta seção destacamos os resultados para a síntese de CdTe/CdS utilizando o ácido mercaptopropiônico (AMP). Como descrito anteriormente optamos pelo AMP devido à boa estabilidade da suspensão para aplicações biológicas.

A redução do telúrio foi à mesma para a síntese com AMA. Obtivemos inicialmente uma solução violeta e depois incolor (Figura 3.11). Ao adicioná-la na solução contendo Cd^{2+} /AMP também observamos uma coloração castanha.

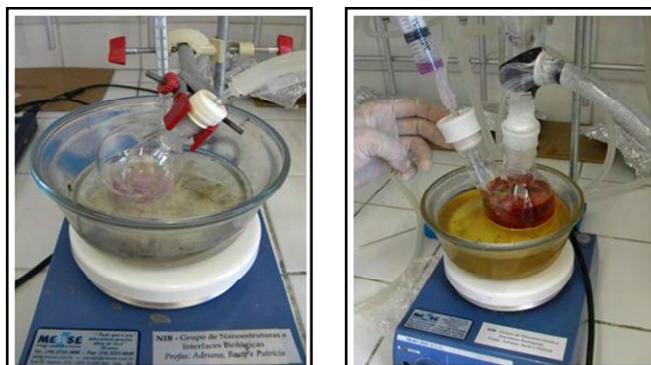


Figura 3.11: Redução do Te^{1-} para Te^{2-} (esquerda) e formação de PQs de CdTe/CdS em meio aquoso (direita).

As suspensões foram analisadas por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis. A Figura 3.12 mostra o padrão de absorção e emissão da suspensão de CdTe/CdS com AMP em meio aquoso. Utilizando a aproximação da massa efetiva (Equação 2.2) e considerando a posição do primeiro máximo de absorção em 486 nm obtivemos um valor aproximadamente de 2,1 nm. Esse resultado apresenta valor próximo com o trabalho descrito por Roghach, 2007[4] onde as nanopartículas apresentam 2,6 nm e

coincide também com os cálculos empíricos descritos por Dagtepe (2007) [12] onde as partículas apresentam também 2,6 nm.

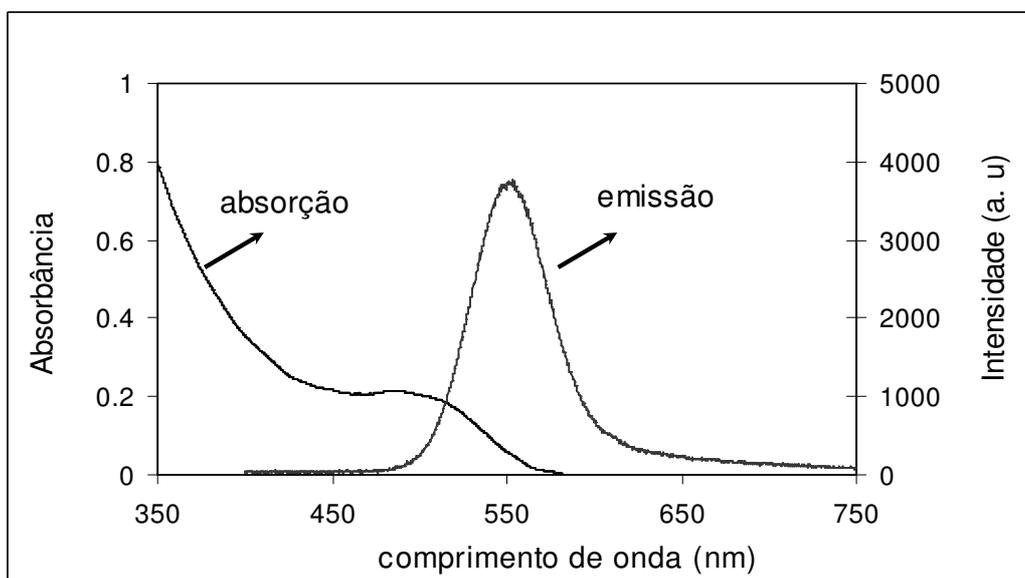


Figura 3.12 Espectro de absorção e emissão de PQs de CdTe/CdS com AMP ($\lambda_{exc}=365$ nm).

Na Figura 3.13, podemos observar a emissão da suspensão quando excitada com lâmpada de ultravioleta com comprimento de onda em 365 nm.

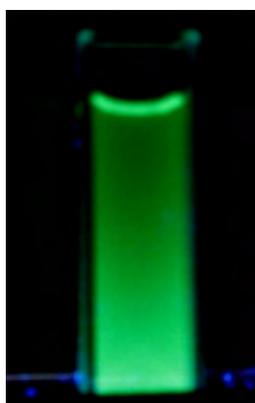


Figura 3.13: PQs de CdTe/CdS com AMP ($\lambda_{exc}=365$ nm).

Através difratograma de Raios-X de pó (Figura 3.14) observamos a cristalinidade do material e também confirmamos através da comparação da posição dos picos com dados de referência que as nanopartículas pertencem a estrutura cúbica, tipo blenda de zinco. Para o CdTe/CdS com AMP o pico de maior intensidade foi visualizado na região $2\theta = 24^\circ$.

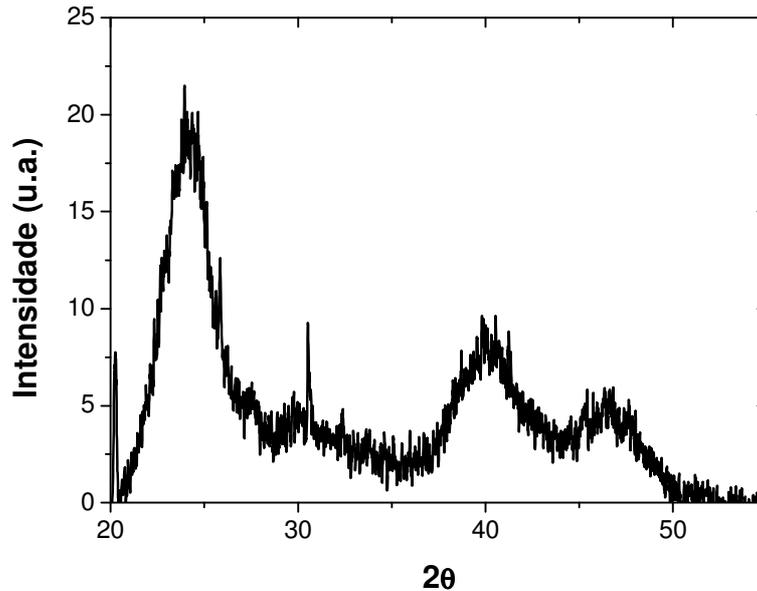


Figura 3.15: Difratoograma de Raios-X de CdTe/CdS com AMP.

Através do difratograma foi possível estimar o tamanho médio das partículas obtidas. Assim como demonstrado para a amostra com AMA utilizamos a equação de Scherrer (Equação 2.4) para estimava do tamanho das partículas. Substituindo os valores na fórmula encontramos um tamanho médio de aproximadamente 2,6 nm:

- Para a largura do pico de difração mais intenso a meia altura (β) encontrada foi de 3° igual a 0,052631 Rad.
- O ângulo do pico mais intenso apresentou um valor de $2\theta=4^\circ$. Portanto $24^\circ/2= 12^\circ$ e $\text{Cos } \theta = 0,978$.
- Inserindo na equação de Scherrer obtemos:

$$d(\text{\AA}) = (0,9 \times 1,5406) / (0,052631 \times 0,978) = 26 \text{\AA} = 2,6 \text{ nm}.$$

A caracterização estrutural e ótica confirmaram o tamanho nanométrico para a amostra de CdTe/CdS com AMP.

3.3.3 Pontos quânticos de CdTe/CdS com (AMS)

A Figura 3.16 mostra o padrão de absorção e emissão da suspensão de CdTe/CdS agora com AMS. Utilizando como referência o primeiro máximo de absorção em 597 nm essas nanopartículas apresentam aproximadamente um diâmetro de 3,0 nm pelo calculo da aproximação da massa efetiva. Segundo caracterizações descritas por Roghach (2007), essas

partículas possuem aproximadamente 3,5 nm [4]. Segundo Dagtepe (2007) as partículas também possuem 3,5 nm [12].

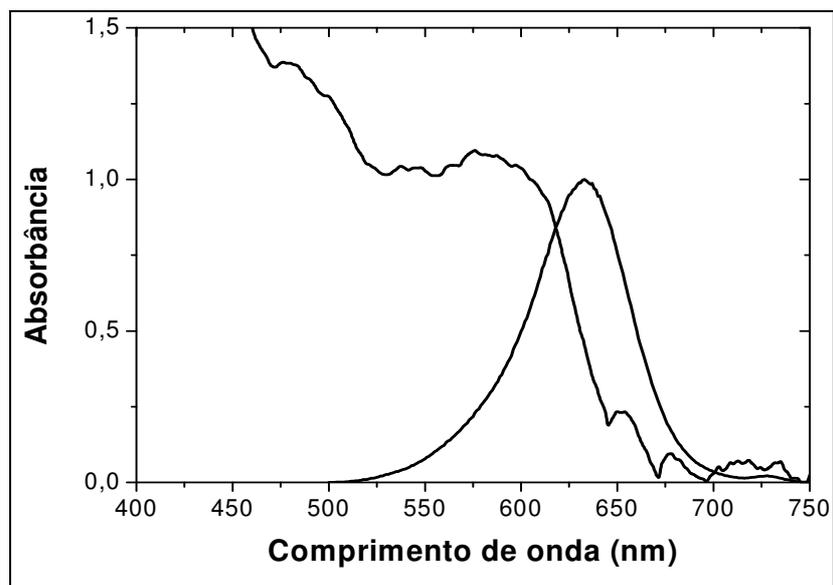


Figura 3.16: Espectro de absorção e emissão de PQs de CdTe/CdS – AMS ($\lambda_{exc} = 365$ nm).

Utilizando o AMS como estabilizante foi possível obter suspensões estáveis e pontos quânticos que apresentassem variado espectro de emissão (Figura 3.17). Obtivemos melhores intensidades na região de 633 nm quando excitada com $\lambda = 365$ nm.



Figura 3.17: PQs de CdTe/CdS estabilizados com AMS preparados em água.

De acordo com o difratograma (Figura 3.18) obtido para o CdTe/CdS com AMS o pico de maior intensidade foi visualizado na região $2\theta = 23,8^\circ$. Portanto $23,8^\circ/2 = 11,9^\circ$ e $\cos \theta = 0,9785$.

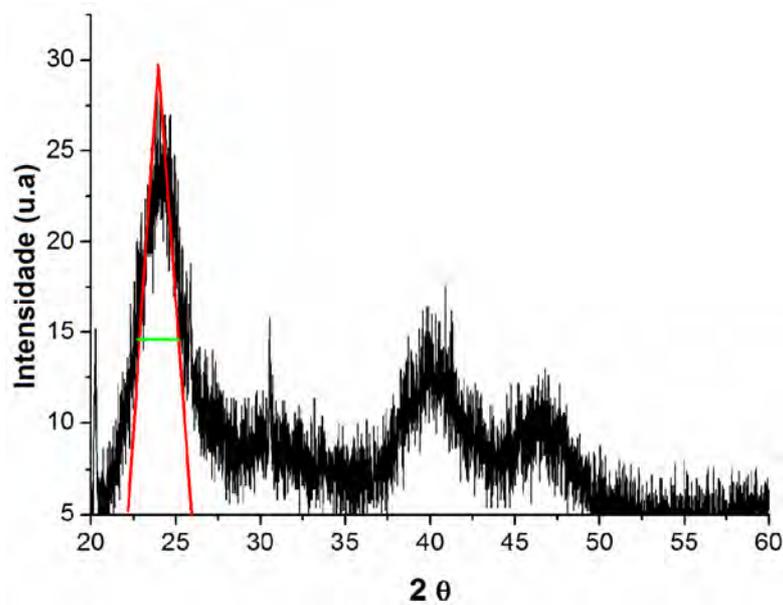


Figura 3.18: Difratoograma de Raios-X de CdTe/CdS com AMS.

- Para a largura do pico de difração mais intenso a meia altura (β) encontrada foi de $2,3^\circ$ igual a $0,04035$ Rad.
- Inserindo na equação de Scherrer obtemos:

$$d(\text{\AA}) = (0,9 \times 1,5406) / (0,04035 \times 0,9785) = 35 \text{\AA} = 3,5 \text{ nm}.$$

Para complementação dos resultados obtivemos imagens por MET (Figura 3.19).

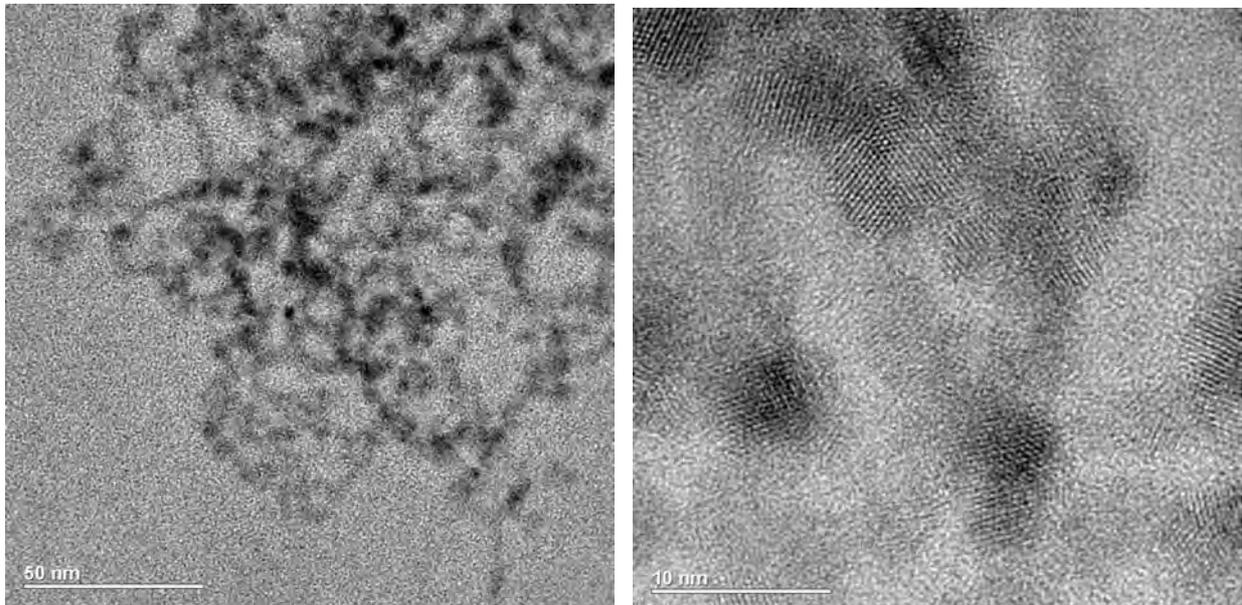


Figura 3.19: Microscopia eletrônica de transmissão de pontos quânticos de CdTe/CdS com AMS. (Esquerda) Barra = 50 nm (Direita) Barra = 10 nm.

Apesar das imagens não se apresentarem muito nítidas é possível identificar a presença de alguns planos atômicos. O conjunto dessas caracterizações (ópticas e estruturais) confirmam então, o tamanho nanométrico para as amostras de CdTe/CdS funcionalizados com o AMS.

A seguir, apresentamos resumidamente (Tabela 3.2) os valores encontrados através das técnicas de espectroscopia de absorção e difração de Raios-X. Para comparação apresentamos também alguns valores encontrados na literatura [4,12].

Tabela 3.2: Valores de tamanho de PQs de CdTe/CdS (em nanômetros) preparados com diferentes estabilizantes em meio aquoso:

	CdTe/CdS (AMA)	CdTe/CdS (AMP)	CdTe/CdS (AMS)
Aproximação da massa efetiva segundo espectro de absorção	2,0	2,1	3,0
Difração de Raios-X	2,3	2,6	3,5
Rogach, 2007 [4]	2,5	2,6	3,5
Dagtepe, 2007 [12]	2,5	2,6	3,5

Para melhor compreensão da cinética de crescimento dos PQs de CdTe/CdS com AMS obtivemos espectros de absorção e emissão destacando diferentes tempos de aquecimento (Figura 3.20).

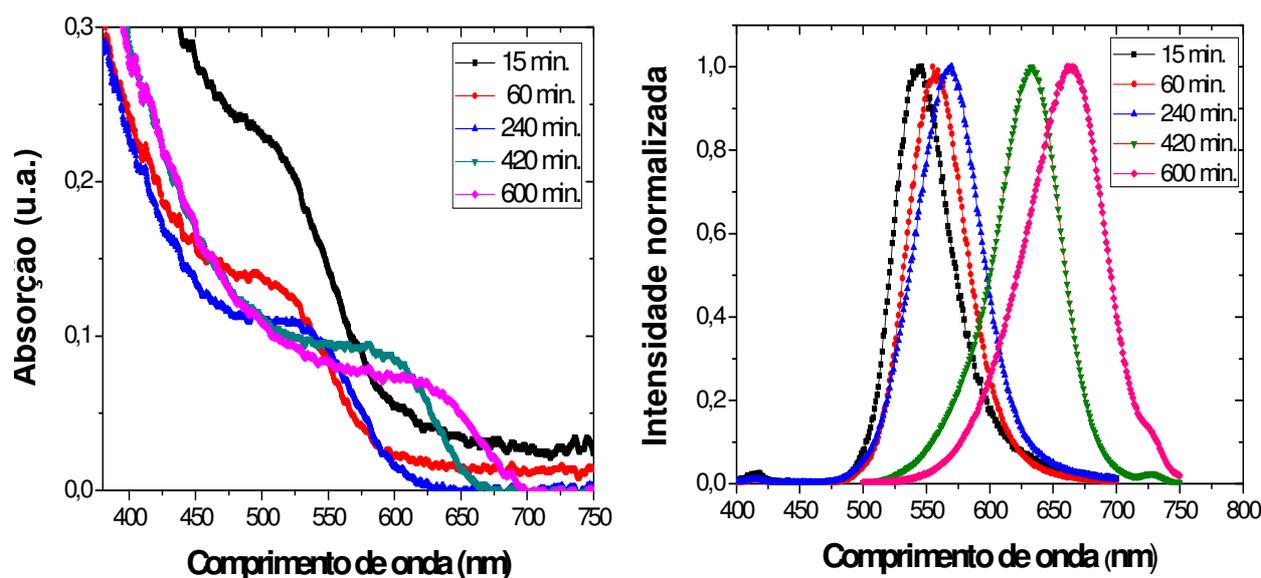


Figura 3.20: Espectros de absorção e emissão de PQs de CdTe/CdS com AMS, diferentes tempos de aquecimento.

Através da Equação 2.2 estimamos os valores do tamanho das partículas preparadas com diferentes tempos de aquecimento apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Cálculo para obtenção do tamanho das partículas utilizando o primeiro máximo de absorção para cada tempo de aquecimento das suspensões de CdTe em meio aquoso.

Tempo de aquecimento da suspensão (min.)	Valor do primeiro máximo no espectro de absorção (nm)	Energia de transição - E_t (eV)	Raio das partículas segundo aproximação da massa efetiva (nm)*
15	492	2,50	2,05
60	498	2,48	2,09
240	527	2,35	2,25
420	590	2,10	2,66
600	620	2,00	2,91

*Calculada utilizando a Equação 2.2

Através dos valores obtidos é possível acompanhar o crescimento das partículas de acordo com o tempo de aquecimento da suspensão. Também podemos observar a relação entre a energia de transição e o tamanho das partículas obtidas. Quanto maior o tamanho da partícula menor a energia de transição.

As partículas sintetizadas em PBS apresentam características óticas semelhantes às sínteses realizadas em meio aquoso (Figura 3.21).

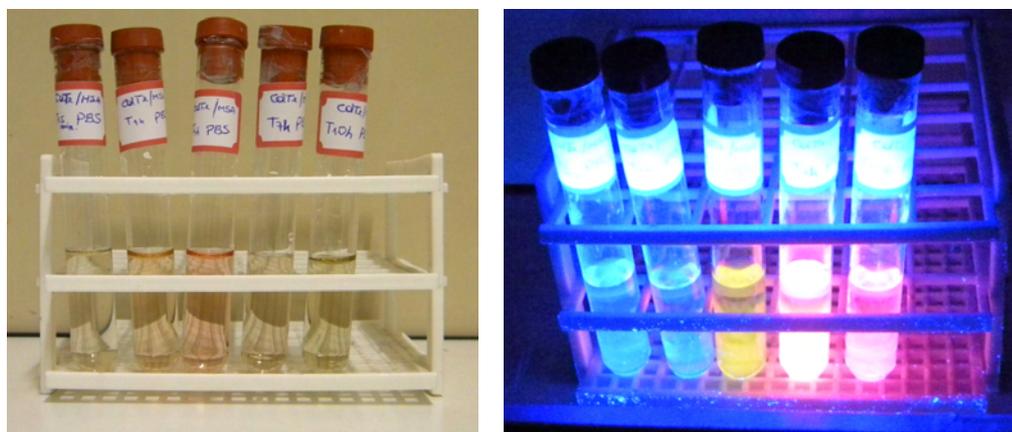


Figura 3.21: PQs de CdTe/CdS com MAS sintetizadas com PBS.

Utilizando como referência o primeiro máximo de absorção em 595 nm as partículas sintetizadas em PBS apresentam aproximadamente um diâmetro de 3,0 nm pelo cálculo da aproximação da massa efetiva. Segundo caracterizações descritas por Roghach e Dagtepe (2007), essas partículas possuem aproximadamente 3,5 nm [4,12]. Para estas amostras também observamos uma melhor emissão em 633 nm após 420 minutos de aquecimento (Figura 3.22). Na Figura 3.22 apresentamos espectros de excitação e emissão

das sínteses realizadas em água e PBS. Nos espectros de excitação observa-se três picos característicos dos níveis que mais contribuem para a fluorescência.

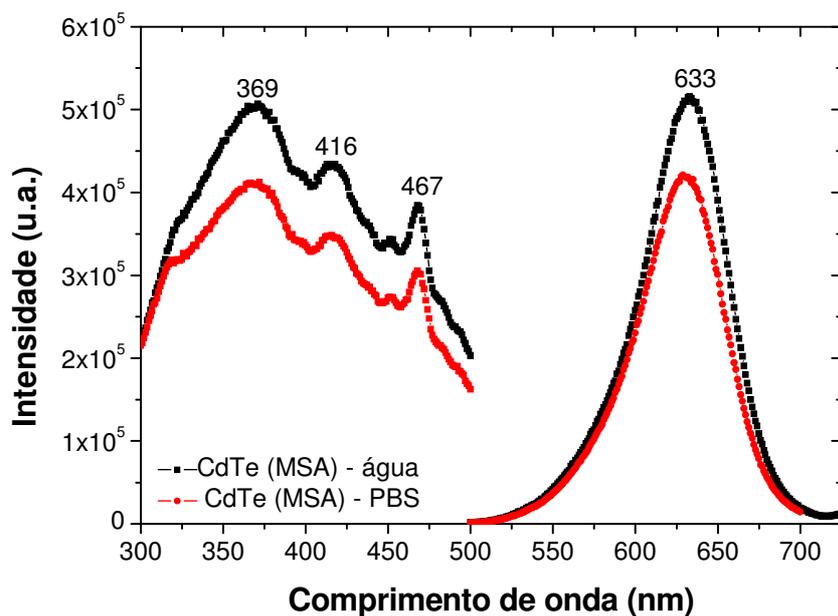


Figura 3.22: Espectros de excitação e emissão de PQs de CdTe/CdS com AMS sintetizado em água (pontilhado negro) e em PBS (pontilhado vermelho) após 420 minutos de aquecimento.

Observando os espectros de absorção (Figura 3.23) também confirmamos o crescimento das partículas a medida que aumentamos o tempo de aquecimento das suspensões.

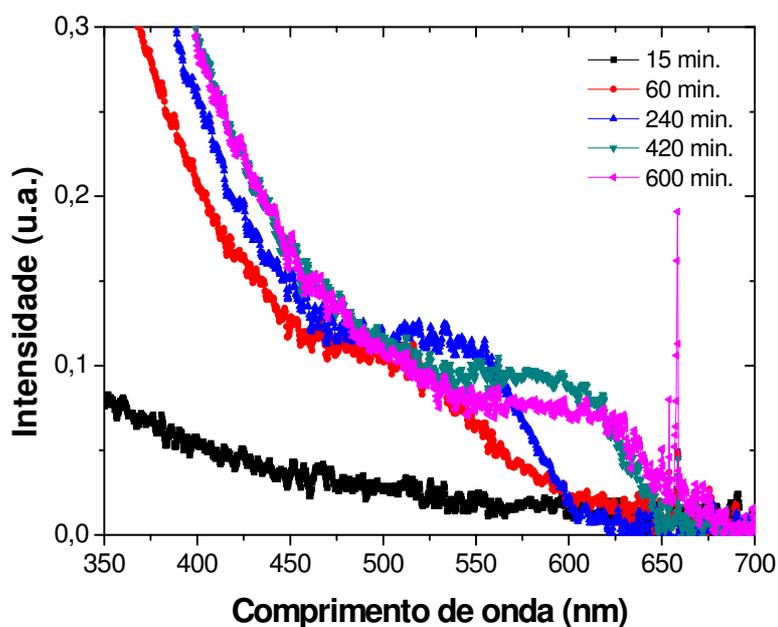


Figura 3.23: Espectros de absorção de suspensões de CdTe/CdS com AMS, sintetizadas em PBS após diferentes tempos de aquecimento.

Através dos valores obtidos (primeiro máximo no espectro de absorção) é possível acompanhar o crescimento das partículas de acordo com o tempo de aquecimento da suspensão. Os valores obtidos com estes espectros estão bem próximos dos apresentados na Tabela 3.3 onde podemos observar a relação entre a energia de transição e o tamanho das partículas obtidas.

3.4 Conclusões

Os estudos realizados sobre as metodologias de redução do telúrio e de obtenção de PQs de CdTe/CdS mostraram que é viável a síntese desses nanocristais diretamente em meio aquoso, empregando metodologias simples e de baixo custo. Os PQs obtidos mostraram propriedades estruturais e espectroscópicas semelhante aos materiais descritos na literatura, justificando a dedicação de esforços futuros para a melhoria das metodologias empregadas.

Pelas caracterizações espectroscópicas foi possível estimar o tamanho médio das partículas. Verificamos que todas se encontram no regime de confinamento quântico possuindo diâmetros entre 2 e 5 nm. Através dos espectros de absorção também foi possível calcular a energia de transição (E_t) para diferentes amostras. Essas energias estão de acordo com os valores encontrados na literatura. Os dados obtidos pela espectroscopia de absorção eletrônica indicam fortemente que os métodos de síntese empregados produziram pontos quânticos com tamanhos médios bem próximos.

Através da utilização de diferentes estabilizantes além da síntese em tampão fosfato, novos estudos podem ser propostos para medidas de eficiência da fluorescência além da utilização desses PQs para diferentes aplicações. Sínteses realizadas em tampão fosfato facilitam futuras aplicações, devido à osmolaridade e melhor ajuste do pH do meio.

Utilizando o estabilizante AMS observamos a facilidade para variação do tamanho das partículas por aquecimento, o que possibilitou a obtenção de espectros de emissão do verde até o vermelho (500-700 nm). Obtivemos suspensões com boa fluorescência e bastante estáveis para aplicações biológicas.

Referências

- [1] MURRAY, C. B.; NORRIS, D. J.; BEAWNDI, M. G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E=S,Se,Te) Semiconductor Nanocrystallites. *Journal of American Chemical Society*. v. 115, p. 8706, 1993.
- [2] PARAK, W. J.; GERION, D.; PELLEGRINO, T.; ZANCHET, D.; MICHEEL, C.; WILLIAMS, S. C.; BOUDREAU, R.; GROS, M. A. LE; LARABELL, C. A.; ALIVISATOS, A. P. Biological applications of colloidal nanocrystals, *Nanotechnology*, v. 14, p. 15-27, 2003.
- [3] GAPONIK, N.; TALAPIN, D.; ROGACH, A. L.; HOPPE, K.; SHEVCHENKO, E. V.; KORNOWSKI, A.; EYCHMÜLLER, A.; WELLER, H. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes *J. Phys. Chem. B*; v. 106, p. 7177, 2002.
- [4] ROGACH, A. L.; FRANZL, T.; KLAR, T. A.; FELDMANN, J.; GAPONIK, N.; LESNYAK, V.; SHAVEL, A.; EYCHMÜLLER, A.; RAKOVICH, Y. P.; DONEGAN, J. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: satate-of-the-art. *J. Phys. Chem.*, v. 111, p. 14628-14637, 2007.
- [5] MURASE, N.; GAPONIK, N.; WELLER, H. Effect of chemical composition on luminescence of thiol-stabilized CdTe nanocrystals. *Nanoscale Res Lett*, v. 2, p. 230–234, 2007.
- [6] GUO, J.; YANG, W.; WANG, C. Systematic Study of the Photoluminescence Dependence of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals on the Reaction Conditions. *J. Phys. Chem. B*, v. 109, p. 17467, 2005.
- [7] LI, L.; QIAN, H.; REN, J. Rapid synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals in the aqueous phase by microwave irradiation with controllable temperature. *Chem. Commun.*, p. 528–530, 2005.
- [8] BILECKA, I.; NIEDERBERGER, M. Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis. *Nanoscale*, v. 2, p. 1358-1374, 2010.
- [9] YING, E.; LI, D.; GUO, S.; DONG, S., WANG, J. Synthesis and bio-imaging application of highly luminescent mercaptosuccínico acid-coates CdTe nanocrystals. *PLos one*, v. 3, p. 1-7, 2008.
- [10] BAO, H. B.; WANG, E. K.; DONG, S. J. One-plot synthesis of CdTe nanocrystals and shape control of luminescent CdTe-cystine nanocomposites. *Small* 2, p. 872-878, 2006.
- [11] Cartão de identificação do JCPDS, N° 75 -2086.
- [12] DAGTEPE, P.; CHIKAN, V.; JASINSKI, J.; LEPPERT, V. J. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. *J. Phys. Chem. C*, v. 111, p. 14977-14983, 2007.
- [13] TALAPIN, D. V.; HAUBOLD, S.; ROGACH, A. L.; KORNOWSKI, A.; HAASE, M.; WELLER, H. *J. Phys. Chem. B*:105, p. 2260, 2001.

4 Síntese, caracterização e silanização de pontos quânticos de CdS, passivados com Cd(OH)₂

4.1 Introdução

Muitas das investigações relacionadas à produção e/ou utilização de nanoestruturas têm sido direcionadas ao estudo do comportamento de suas propriedades (por exemplo óticas e elétricas) em função da escala de tamanho das mesmas. Com relação a nanopartículas de semicondutores tem sido demonstrado que, quando o raio da partícula se aproxima do raio de Bohr do éxciton, a banda proibida ou *band gap* de energia aumenta, e os estados eletrônicos que formam as bandas de valência e de condução aumentam seu grau de discretização. Além dos efeitos quânticos, a modificação química da superfície também tem um grande efeito sobre as propriedades óticas e elétricas dos materiais.

Neste Capítulo destacamos a formação de pontos quânticos (PQs) de sulfeto de cádmio (CdS) através da reação em fase aquosa entre íons cádmio (Cd²⁺) e íons sulfeto (S²⁻) contendo agente estabilizante, posteriormente passivadas com hidróxido de cádmio, Cd(OH)₂. Existem dois problemas básicos inerentes ao processo de formação das partículas que afetam suas propriedades óticas:

1) *Dificuldade de fonte controlada de S²⁻*: para a obtenção deste material foi utilizada uma metodologia já descrita na literatura, bem como, uma nova metodologia onde o gás sulfídrico (H₂S) (fonte de enxofre na reação) é substituído pela tioacetamida (C₂H₅NS). O motivo pelo qual se buscam fontes de enxofre alternativas ao H₂S, é devido principalmente à praticidade, segurança e melhor reprodutibilidade dos resultados. O gás sulfídrico (H₂S) é um gás incolor e a baixas concentrações (1ppm/hora) possui mau cheiro e inibe o olfato em elevadas concentrações (250 ppm/hora). Os efeitos da intoxicação com H₂S são sérios, similar aos do monóxido de carbono, podendo causar danos permanentes no sistema nervoso além de asfixia [1] (ver Anexo 2). O H₂S também forma uma mistura explosiva com o ar. A nível de uso deste gás em sínteses, sua difícil manipulação e coleta, dificulta a maior reprodutibilidade na síntese de PQs, devido ao difícil controle de número de mols (S²⁻) disponível para a reação.

2) *Dificuldade na conservação de suas propriedades fluorescentes em meio aquoso*: devido ao problema da camada de Cd(OH)₂ ser lábil quando em contato com diversas classes de compostos. Um exemplo disso é quando utilizamos o CdS/Cd(OH)₂ em aplicações biológicas: como o pH do meio encontra-se geralmente em torno de 7,0 essa camada pode ser dissolvida. Além da diminuição da fluorescência pode haver liberação Cd²⁺ para o meio gerando

processos citotóxicos. Por isso, neste Capítulo daremos destaque ao processo de recobrimento de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com sílica.

Outra vantagem no recobrimento das partículas é o melhoramento da estabilidade de colóides [2] pois, a partir daí, é possível adicionar grupos funcionais que conferem maior repulsão eletrostática entre as partículas devido à existência de cargas adicionais que são dependentes de valores de pH do meio. Dentre os métodos para a estabilização coloidal está a deposição de uma casca homogênea de um material inorgânico, como a sílica, por exemplo. Essa “casca” apresenta uma dupla função: oferece melhoria da estabilidade coloidal em água além de controlar a distância entre os núcleos das partículas dependendo de sua espessura [3]. Os métodos mais comuns para tal revestimento são feitos em três etapas: (1) modificação da superfície de partículas para torná-las vitreofílicas usando silanos como agentes de acoplamento, (2) deposição lenta de sílica em água utilizando silicato de sódio e (3) crescimento da camada de sílica através do método sol-gel utilizando alcóxidos de silício [4]. Além do aumento da estabilidade físico-química e ótica, através da silanização, é possível deixar as nanopartículas mais biocompatíveis, a partir da ligação de grupos funcionais específicos direcionando estas para marcações mais específicas. Portanto, isolar os nanocristais com uma capa estável e eficiente é um objetivo primordial para aplicação de PQs em sistemas biológicos.

4.2 Pontos quânticos de CdS/Cd(OH)₂ com gás sulfídrico

4.2.1 Procedimentos experimentais:

- Síntese de pontos quânticos de CdS

Para a obtenção das PQs de CdS com finalidade de silanização, utilizamos a metodologia desenvolvida por Santos 2002 [5], que baseia-se na precipitação de nanopartículas de CdS na presença de polifosfato de sódio [Na(PO₃)₂]_n, segundo método descrito por Weller e colaboradores [5].

Em uma síntese típica, 95,5 mL de água deionizada foram adicionados 2,0 mL de uma solução a 0,0051 g/mL do estabilizante polifosfato de sódio [Na(PO₃)₂]_n (*Sigma Aldrich*), e 2,5 mL de uma solução 0,01 M de perclorato de cádmio Cd(ClO₄)₂. O perclorato de cádmio foi

preparado através do óxido de cádmio (CdO) 99,95% (*Alfa AESAR*), juntamente com o ácido perclórico HClO₄ (*Sigma Aldrich*). Segundo Santos 2002, o estudo quimiométrico aplicado para otimização da síntese de nanopartículas de CdS, mostrou que para a obtenção de nanocristais com diâmetro em torno de 7,0 nm o pH ideal da solução de [Na(PO₃)₉] e Cd(ClO₄)₂ deve estar 8,5. O próximo passo, para a formação da nanopartícula, se caracteriza pela adição da fonte de enxofre que nesta seção é o gás sulfídrico H₂S.

Assim, após o ajuste do pH da solução [(CdClO₄)₂ + Na(PO₃)₉] para 8,5 o sistema foi vedado e com auxílio de uma seringa injetou-se 750 µL de H₂S (*White Martins*, 98%) na solução, o equivalente a $2,5 \times 10^{-5}$ mols de S²⁻. A razão molar inicial entre os íons Cd²⁺ e S²⁻ foi de Cd/S=1:1. A solução resultante foi agitada continuamente durante 10 minutos. Durante esta agitação observamos a mudança da coloração do sistema de incolor para amarelo. Essa coloração evidencia a formação das nanopartículas de sulfeto de cádmio (CdS) (Figura 4.1).

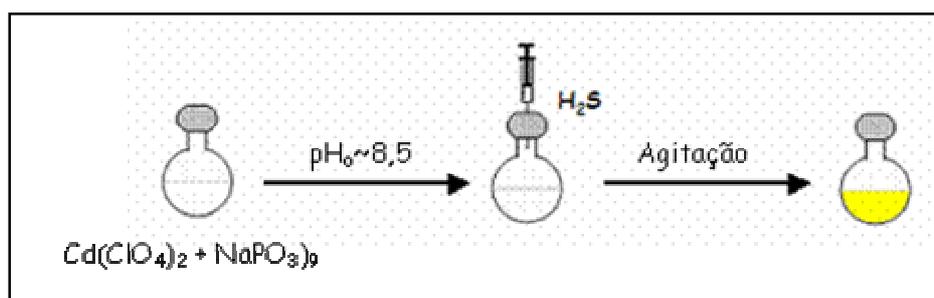


Figura 4.1: Representação esquemática da síntese de PQs de sulfeto de cádmio (CdS) utilizando o H₂S (fonte de íons S²⁻).

A suspensão foi mantida à temperatura de aproximadamente 10°C até a passivação que será descrita no próximo item. Segundo Santos (2002), temperaturas mais baixas parecem retardar o crescimento das nanopartículas. Isso pode ser explicado analisando a variação do K_{ps} (constante de solubilidade) do CdS, que é diretamente proporcional à temperatura, e portanto diminui com a diminuição da temperatura [5].

- **Passivação de pontos quânticos de CdS com Cd(OH)₂**

A passivação é realizada aproximadamente após 24 horas de preparação das nanopartículas de CdS. Para isso, o pH da suspensão é novamente ajustado com solução de NaOH (1M), elevando-o a 10,5. Em seguida, adiciona-se lentamente a solução de perclorato de cádmio Cd(ClO₄)₂ a 0,01 M, sob agitação constante. A adição lenta do Cd(ClO₄)₂ garante

homogeneização dos constituintes e evita a formação de grandes aglomerados de hidróxido de cádmio na superfície da partícula [5]. A passivação pode ser instantaneamente confirmada através do uso de uma lâmpada de luz UV que evidencia fluorescência característica na região do verde.

4.2.2 Resultados e Discussões

Os PQs de CdS/Cd(OH)₂ sintetizados com H₂S foram caracterizados espectroscopicamente através de medidas de absorção, excitação e emissão (Capítulo 3, Seção 3.4.3). Tal caracterização, foi realizada antes e após sua passivação. Também apresentamos resultados de caracterizações estruturais por medidas de Difração de Raios-X (DRX) e imagens por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Através destas técnicas verificamos o tamanho e morfologia das partículas obtidas. Todos os equipamentos e técnicas utilizadas estão descritos no Capítulo 3, Seção 3.2.4).

A Figura 4.2 destaca espectros de absorção de PQs de CdS/Cd(OH)₂ antes e após passivação. Segundo Vossmeier (1994) [6], o tamanho da partícula pode ser relacionado diretamente com o valor do primeiro máximo de absorção (definido como o de menor energia) [6]. Em 476 nm foi descrito um tamanho de aproximadamente 9,6 nm e um *band gap* de 2,6 eV. Os espectros obtidos apresentam absorções em torno de 471 nm (antes da passivação) e 478 nm (após passivação), valores próximos aos descritos na literatura [5].

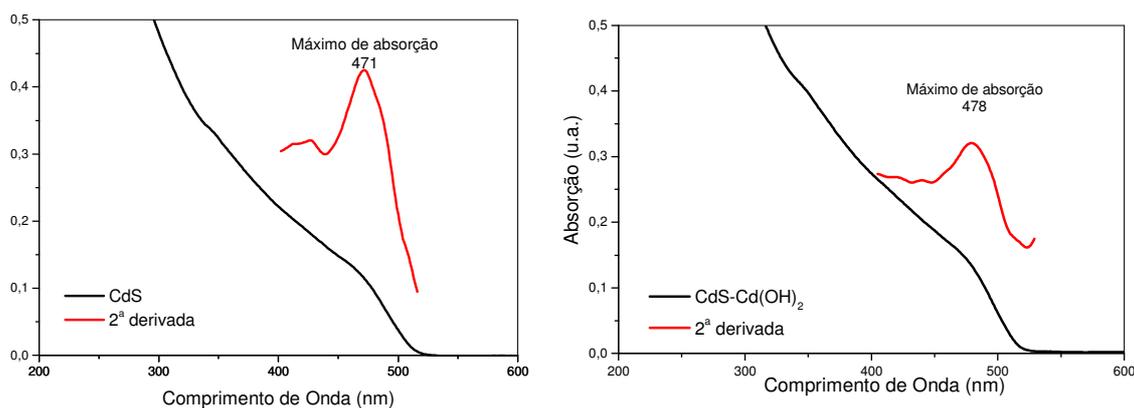


Figura 4.2: Espectros de absorção e segunda derivada de suspensões de CdS (máx. de absorção, $\lambda = 471$ nm, esquerda) e CdS/Cd(OH)₂ (máx. de absorção, $\lambda = 478$ nm, direita).

Na Figura 4.3 observamos que a emissão das nanopartículas sintetizadas apresentam um comprimento de onda máximo em 496 nm, o que corresponde a emissão na região visível

do espectro eletromagnético. Spanhel e colaboradores (1987) [7], reportaram que o valor do pH inicial no processo de síntese de suspensões de CdS é um fator determinante para o comprimento de onda de emissão [5,7]. Para obtenção do espectro de emissão utilizamos uma excitação em 365 nm. Utilizando o valor de pH inicial em torno de 8,5 observamos uma banda de emissão na região de 500 nm.

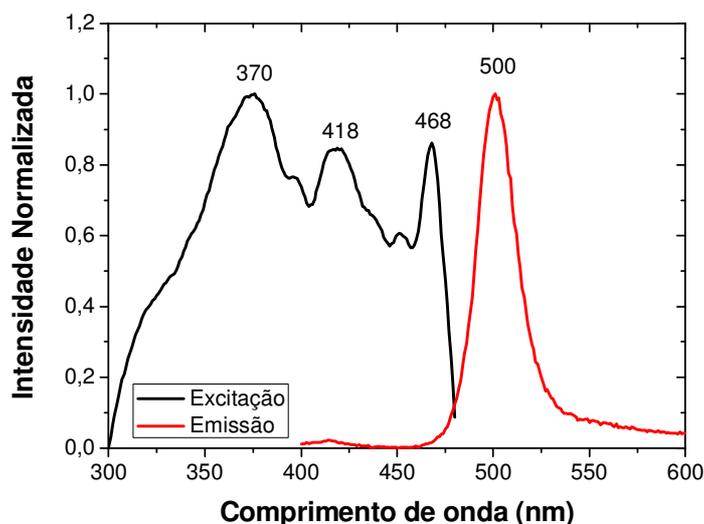


Figura 4.3: Espectro de emissão (esquerda) e excitação (direita) de CdS/Cd(OH)₂ com H₂S.

O espectro de emissão apresenta um valor máximo no comprimento de onda $\lambda = 500$ nm com largura de banda igual a 25 nm. Esta banda é característica do processo de fluorescência devido à recombinação excitônica [5]. O espectro de excitação (Figura 4.3) mostra uma banda estruturada com três máximos (370, 418 e 468 nm). Através deste espectro podemos inferir os máximos de excitação que mais contribuem para a emissão das nanopartículas de CdS/Cd(OH)₂ e observamos que estes máximos contribuem de forma similar para o processo excitônico nas nanopartículas de CdS.

Na Figura 4.4 mostramos o difratograma de Raios-X das nanopartículas de CdS, onde observamos a presença de picos característicos aos planos cristalinos constituintes da fase cúbica do CdS. O alargamento dos picos deve-se a presença de alguns materiais amorfos na suspensão (como polifosfato de sódio, por exemplo)[5]. A determinação dos picos foi realizada através da utilização do banco de dados da biblioteca JCPDS [8].

Para identificação dos planos cristalinos, também podemos converter o ângulo (2θ) dos picos mais intensos, encontrados no difratograma para distância (em Angstroms) e utilizar a

Equação de Sherrer (Equação 2.4, Capítulo 2) para estimava do tamanho das partículas. Utilizando a equação estimamos que os PQs de CdS/Cd(OH)₂ com H₂S possuem um diâmetro médio de 7,5 nm.

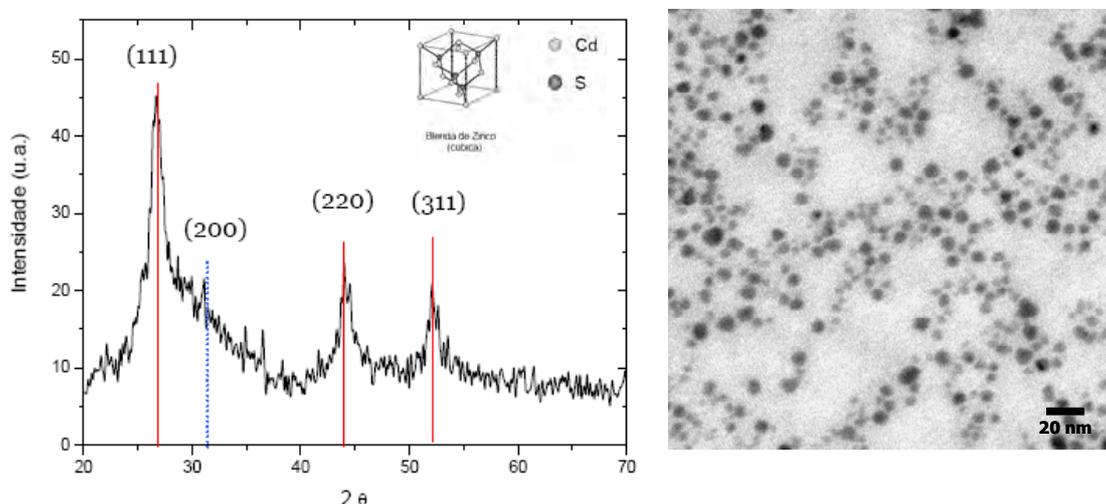


Figura 4.4: Difratoograma de Raios-X e MET de PQs de CdS/Cd(OH)₂ preparados utilizando-se H₂S como agente precursor.

De acordo com os dados do JCPDS, os picos mais intensos correspondem ao CdS com célula unitária do retículo cristalino cúbico tipo blenda de zinco [8]. Vale ressaltar que embora bastante comum, o sistema cúbico não é o único sistema cristalino no qual o CdS cristaliza-se. Dependendo das condições experimentais de preparação, também pode-se obter partículas de CdS do tipo wurtzita (sistema cristalino hexagonal). Segundo Santos (2002), a síntese dos nanocristais de CdS através da precipitação a temperatura ambiente resulta em partículas com estrutura cúbica, tipo blenda de zinco, enquanto que o CdS macrocristalino pode apresentar os dois tipos de estrutura [5,9].

Por MET (Figura 4.4) observamos a morfologia das nanopartículas de CdS/Cd(OH)₂ sintetizadas com H₂S. Através da imagem observamos um conjunto de partículas elétrondensas com diâmetro médio 8,0 nm. Santos (2002) observou que o material aglomerado ao redor das partículas é essencialmente amorfo devido à presença da camada de passivação de Cd(OH)₂ na superfície das partículas de CdS [5].

4.3 Pontos quânticos de CdS/Cd(OH)₂ com tioacetamida

A primeira etapa desta síntese segue procedimento similar ao descrito para a síntese de PQs de CdS com H₂S (Seção 4.2.1), tendo como diferença principal a substituição do H₂S pela tioacetamida (C₂H₅NS), precursor do íon sulfeto.

Numa síntese representativa foram misturados água deionizada, uma solução a 0,0051 g/mL do estabilizante polifosfato de sódio [(NaPO₃)₉] (Sigma Aldrich), e solução 0,01 M de perclorato de cádmio Cd(ClO₄)₂. O pH deste sistema foi ajustado para 8,5. Num outro sistema uma solução aquosa de tioacetamida (C₂H₅NS) foi acrescida de NaOH (1M). Esta solução foi levada aos processos de (1) sonicação a temperatura ambiente ou (2) síntese hidrotérmica assistida por microondas. Esses dois métodos foram escolhidos para melhorar a quebra da tioacetamida disponibilizando assim, uma maior quantidade de íons S²⁻ necessária para a formação dos PQs. Após completar ambos processos independentes, a solução contendo sulfeto (S²⁻) foi adicionada à solução contendo íons Cd²⁺. Após formação dos PQs de CdS, a passivação também foi feita utilizando Cd(OH)₂ assim como descrita na síntese de PQs de CdS com H₂S (seção 4.2.1).

4.3.1 Síntese assistida por ultrassom

- Procedimento Experimental

A primeira etapa desta síntese também segue procedimento similar ao descrito para a síntese de PQs de CdS com H₂S (Seção 4.2.1). Misturados água deionizada, polifosfato de sódio [(NaPO₃)₉] e solução 0,01 M de perclorato de cádmio Cd(ClO₄)₂ nas proporções descritas na Tabela 4.1. O pH deste sistema foi ajustado para 8,5. Em um outro sistema uma solução aquosa contendo 2,5x10⁻⁵ mol de tioacetamida foi acrescida de 30 µL de NaOH 1M. Esta solução foi levada aos processos de sonicação por 30 min a temperatura ambiente. Logo em seguida, adicionamos a solução de tioacetamida (com pH 8,5 e 10,5) à solução de precursores de Cd²⁺ e o conjunto resultante foi levado novamente ao ultrassom por 60 minutos (Figura 4.5). Após este procedimento observamos a mudança da coloração da solução de incolor para amarelo evidenciando a formação de partículas.

Tabela 4.1: Condições experimentais para preparação de CdS utilizando a tioacetamida (reação assistida por ultrassom).

Síntese (1)	Síntese (2)	Síntese (3)
Cd/S = 1	Cd/S = 2	Cd/S = 3
47,75 mL de H ₂ O ultra pura 1,0 mL de Na(PO ₃) ₉ 1,25 mL de Cd(ClO ₄) ₂ pH inicial - 8,5 ou 10,5	46,50 mL de H ₂ O ultra pura 1,0 mL de Na(PO ₃) ₉ 2,50 mL de Cd(ClO ₄) ₂ pH inicial - 8,5 ou 10,5	45,25 mL de H ₂ O ultra pura 1,0 mL de Na(PO ₃) ₉ 3,75 mL de Cd(ClO ₄) ₂ pH inicial - 8,5 ou 10,5

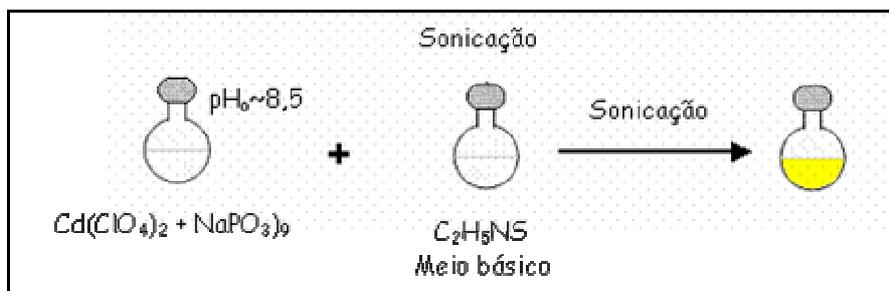


Figura 4.5: Representação esquemática síntese de PQs de sulfeto de cádmio (CdS) com C₂H₅NS em meio aquoso.

Num intervalo de tempo de 24 horas após a preparação das suspensões contendo as partículas de CdS os sistemas foram levados ao mesmo processo de passivação superficial descrito na Seção 4.2.1 Os sistemas foram caracterizados através de análise estrutural e espectroscópica.

• Resultados e Discussões

A forma como os íons sulfeto estão disponíveis em solução a partir da quebra da molécula da tioacetamida é dependente do pH do meio. A seguir mostramos as reações de quebra da C₂H₅NS em meio aquoso ácido e básico (Figura 4.6).

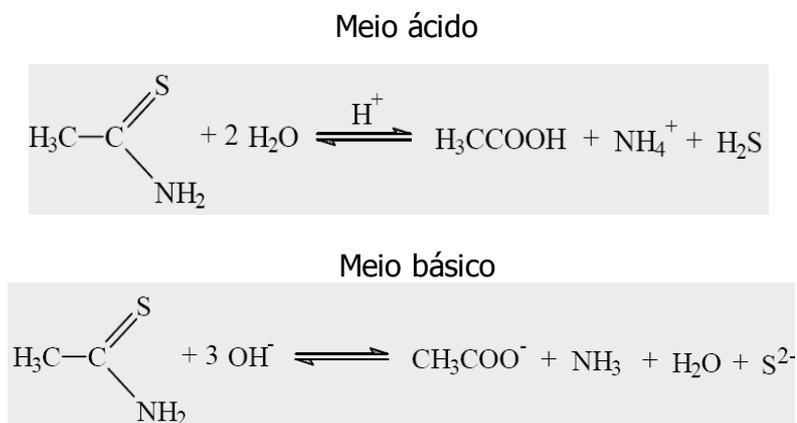


Figura 4.6: Quebra da tioacetamida de acordo com o pH [10,11].

Ressaltamos que todos os processos sintéticos descritos nesta Seção foram realizados em pH básico onde, de acordo com o mecanismo demonstrado na Figura 4.6, resulta como produto da reação íons S²⁻ em solução.

Um difratograma representativo das amostras de CdS/Cd(OH)₂ sintetizadas com C₂H₅NS está representado na Figura 4.7. Analisando os difratogramas verificamos a presença dos três principais planos (111), (220) e (311) referentes à estrutura cúbica tipo blenda de zinco de CdS. Convertendo os valores do ângulo (2θ) dos picos mais intensos encontrados no difratograma, calculamos através da equação de Sherrer (Equação 2.4) um diâmetro médio igual a 2,7 nm.

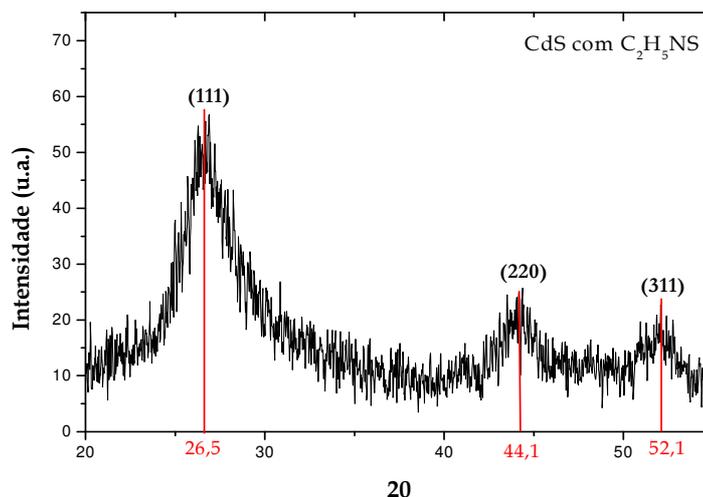


Figura 4.7: Difratograma de Raios-X de PQs de CdS com C₂H₅NS.

Através das imagens de MET apresentadas na Figuras 4.8, observamos que as partículas apresentam dimensões entre 2-3 nm, mas que sua aglomeração não permitiu uma análise estatística.

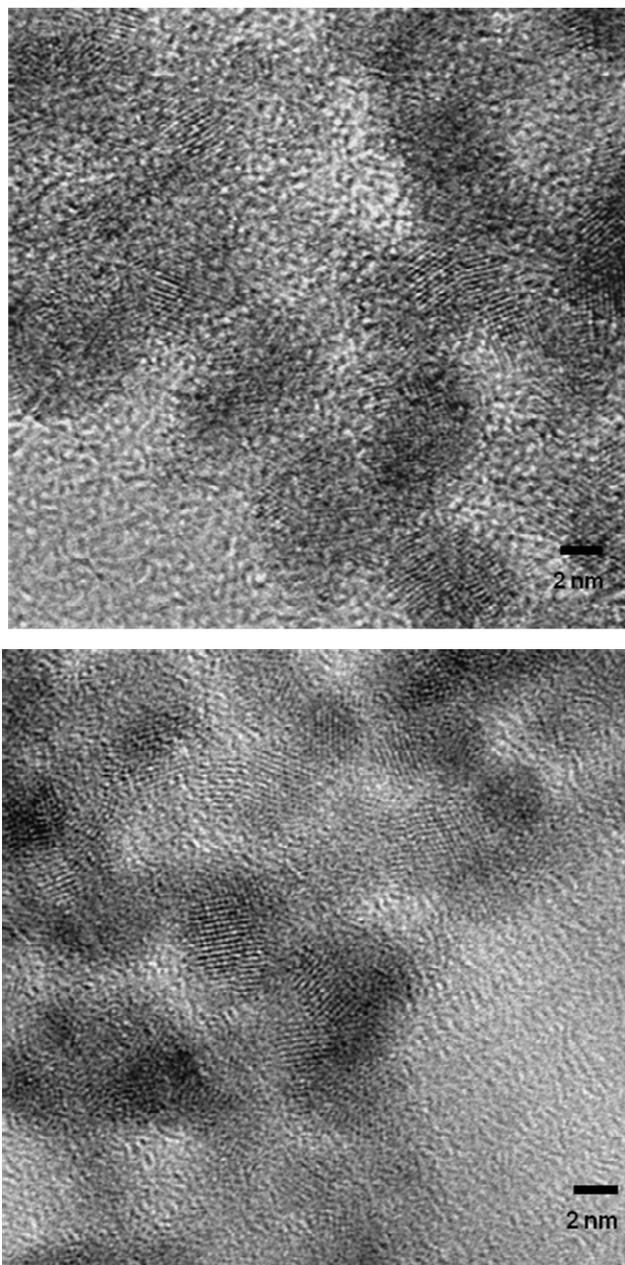


Figura 4.8: Imagem MET de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com C₂H₅NS (síntese assistida por ultrassom).

A análise dos espectros de absorção das suspensões de CdS/Cd(OH)₂ preparadas com diferentes proporções Cd/S (Figura 4.9) evidencia que os nanocristais de CdS obtidos para as sínteses com Cd/S = 1 e 2 encontram-se na região de confinamento quântico. A suspensão

com relação Cd/S = 3 demonstra comportamento de espalhamento devido a sistema turvo. Esta turbidez pode ser relacionada à interação do excesso de íons Cd²⁺ e as cadeias de ânions polifosfato. Este tipo de interação já foi evidenciado em estudos anteriores utilizando ressonância Magnética Nuclear de ³¹P e pode levar a formação de estruturas supramoleculares tipo gel, desestabilizando o meio coloidal [5].

Para a relação Cd/S = 1 observamos que o primeiro máximo de absorção encontra-se em $\lambda = 420$ nm o que segundo a Equação 2.2 equivale a nanocristais com tamanho $d = 3$ nm, concordando tanto com a estimativa obtida através de DRX como nas imagens por MET. A dimensão dessas nanopartículas indica que elas se encontram dentro do regime de confinamento quântico forte, lembrando que o raio de Bohr do éxciton (Anexo 2) para o CdS tipo blenda de zinco é 2,6 nm [12].

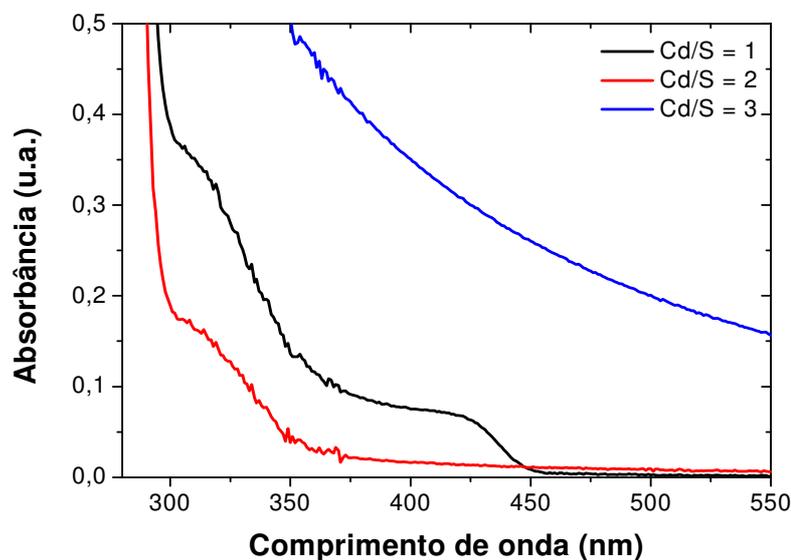


Figura 4.9: Espectros de absorção eletrônica de PQs de CdS/Cd(OH)₂ utilizando a tioacetamida como agente precursor (síntese assistida por ultrassom). Espectros de três razões Cd/S.

De uma forma geral observamos que durante a reação entre a solução contendo a tioacetamida/S²⁻ e a solução com Cd²⁺ ocorre a formação de um sistema amarelo claro semelhante à coloração da suspensão de CdS observada na Seção 4.2.1. A diferença visual entre os sistemas contendo razões Cd/S diferentes mostrou que o desenvolvimento da coloração amarela foi mais intensa e mais rápida para as soluções com concentrações maiores de Cd²⁺. Através dessa observação sugerimos que a cinética de formação dos nanocristais é alterada com a disponibilidade dos precursores em solução. Como consequência, tanto o

tamanho, como a distribuição de tamanhos das nanopartículas obtidas podem ser descritas pela cinética da reação, que por sua vez é relacionada às condições da síntese. Com relação ao pH inicial nas sínteses (8,5 e 10,5) observamos que este fator não é tão relevante quanto a relação Cd/S para a síntese utilizando essa metodologia.

As suspensões obtidas utilizando ultrassom apresentam emissão após o processo de passivação. Inicialmente obtivemos espectros de emissão muito largos para a razão molar Cd/S = 1 e a partir do aumento desta relação os espectros apresentaram-se estreitos e mais intensos. A Figura 4.10 apresenta os espectros de emissão e de excitação do sistema resultante da relação Cd/S = 2 evidenciando um máximo de emissão em $\lambda = 458$ nm, com largura de banda de 30 nm. Esse máximo está relacionado à recombinação excitônica, enquanto que a banda larga acima de 500 nm está associada à presença de defeitos superficiais nos nanocristais de CdS. A emissão destes defeitos está mais proeminente sugerindo que a camada de passivação não está sendo efetiva. Um fato também importante é que as partículas no presente sistema estão numa faixa de tamanho em torno $d = 3$ nm, enquanto que as obtidas anteriormente (Seção 4.2.1) apresentam um diâmetro médio $d = 7,5$ nm. À medida que o tamanho das partículas diminui, aumenta a contribuição dos átomos da superfície, e portanto, a presença dos defeitos.

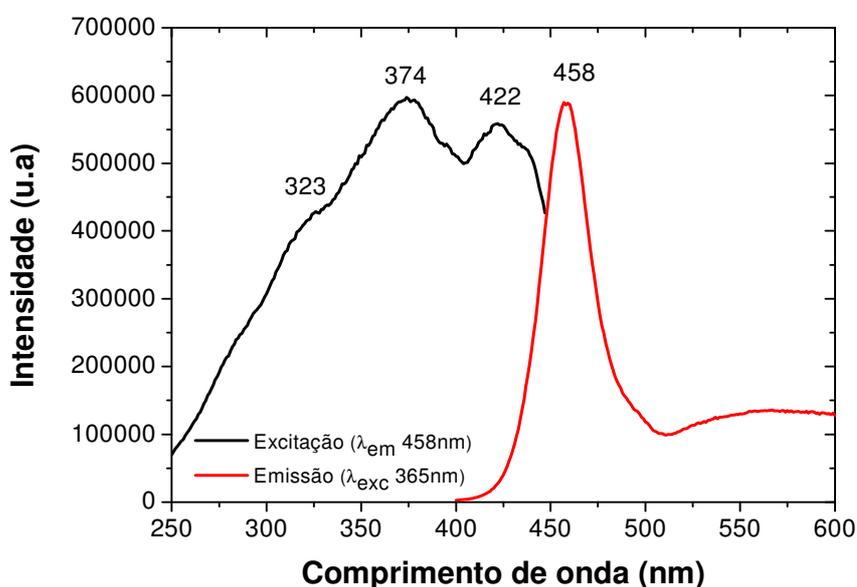


Figura 4.10: Espectros de excitação e emissão de PQs de CdS/Cd(OH)₂ obtidas com a utilização da tioacetamida como agente precursor (síntese assistida por ultrassom), (razão molar Cd/S = 2).

4.3.2 Síntese hidrotérmica assistida por microondas

Ainda na tentativa de melhorar a quebra da tioacetamida e obter PQs de melhor qualidade, destacamos a utilização da síntese hidrotérmica assistida por microondas. Esta metodologia se destaca por uma síntese mais rápida e com aquecimento mais uniforme quando comparada as sínteses hidrotérmicas preparadas em fornos convencionais [13]. Considerando que a quebra da tioacetamida deve ocorrer em meio básico, escolhemos o pH 10,5 para a realização das sínteses, variando-se apenas a relação Cd/S.

- **Procedimento Experimental**

A síntese hidrotérmica assistida por microondas (*CEM Discover system*) foi realizada no Laboratório BSTR do Departamento de Química Fundamental da UFPE, sob a orientação do Prof. Severino Alves Júnior. Inicialmente colocamos a solução (pH 10,5) contendo 0,001 g/mL de C₂H₅NS no reator e deixamos sob aquecimento (120 °C) por 10 minutos. Em seguida adicionamos 1,0 mL desta na solução de [Cd(ClO₄)₂ + Na(PO₃)₉] (valores descritos na Tabela 4.2) sob aquecimento (80°C) por mais 10 minutos.

Tabela 4.2: Precursores e quantidades utilizados na síntese hidrotérmica assistida por microondas.

Síntese (1)	Síntese (2)	Síntese (3)
Cd/S = 1	Cd/S = 2	Cd/S = 3
6,25 mL de H ₂ O ultra pura 1,0 mL de Na(PO ₃) ₉ 1,25 mL de Cd(ClO ₄) ₂ pH inicial 10,5	4,375 mL de H ₂ O ultra pura 1,0 mL de Na(PO ₃) ₉ 1,87 mL de Cd(ClO ₄) ₂ pH inicial 10,5	2,50 mL de H ₂ O ultra pura 1,0 mL de Na(PO ₃) ₉ 2,50 mL de Cd(ClO ₄) ₂ pH inicial 10,5

- **Resultados e Discussões**

Inicialmente, uma evidência do melhor rendimento da quebra da tioacetamida neste método é a exalação de odor característico de composto contendo enxofre. Após 10 minutos de reação entre o meio contendo a tioacetamida e o Cd²⁺ foram obtidos sistemas de coloração amarelo clara, coloração característica da formação de partículas de CdS.

Os espectros de absorção dos sistemas variando-se a relação Cd/S encontram-se dispostos na Figura 4.11. Observamos novamente que a relação Cd/S = 3 utilizada resultou em espalhamento de luz, provavelmente devido à turvação do sistema. Sugerimos que esta turvação, como já discutida na Seção 4.3.1, refere-se à formação de estrutura ramificada supramolecular entre as cadeias de polifosfato de sódio e o excesso de Cd²⁺ livre na solução. De fato, ao tentar efetuar as sínteses a temperaturas acima de 80°C os sistemas resultaram em formações gelificadas amarelo-turvas irreversíveis.

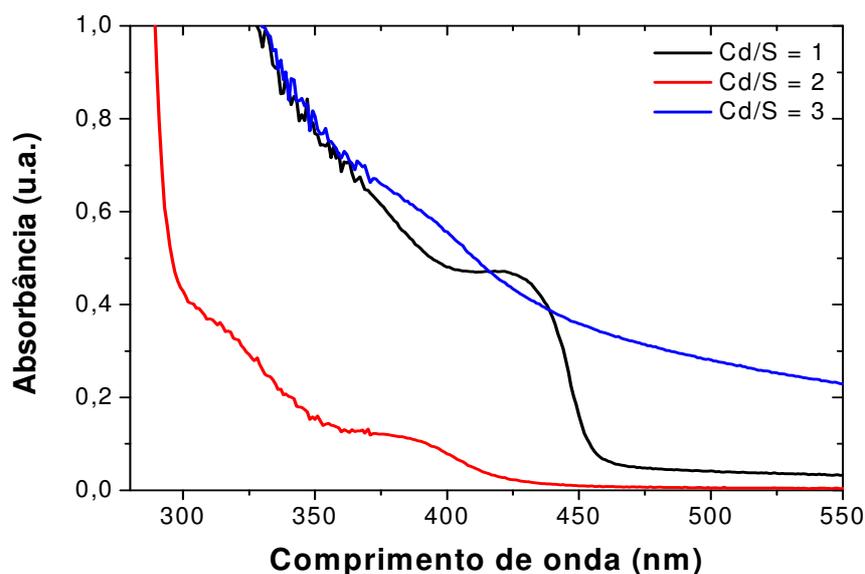


Figura 4.11: Espectros de absorção eletrônica de suspensões de CdS/Cd(OH)₂ obtidos utilizando a tioacetamida como fonte de S²⁻ em síntese assistida por microondas.

Já os sistemas com relação Cd/S = 1 e 2 observamos o espectro típico de sistemas de CdS nanoestruturados, com estimativas de tamanho $d = 3$ e $2,2$ nm, respectivamente. Essa diferença é esperada, pois com o aumento da oferta de íons Cd²⁺ em solução a velocidade de formação de nanoestruturas de CdS no meio é acelerada, resultando numa população com tamanho menor de partículas. Se observarmos atentamente o espectro de absorção eletrônica para a relação Cd/S = 3 vemos que seu primeiro máximo (estimado em aproximadamente 380 nm) encontra-se em concordância com o valor de máximo observado para Cd/S = 2. Este fato mostra que as partículas também cresceram rapidamente, mas que o excesso de Cd²⁺ foi complexado aos ânions polifosfato.

Na Figura 4.12 mostramos os espectros de emissão e excitação correspondentes à suspensão de CdS/Cd(OH)₂ com máximo em 453 nm (recombinação excitônica) e largura de banda equivalente a 30 nm. A intensidade deste sistema mostrou-se similar ao do sistema obtido para a síntese Cd/S = 1 assistida por ultrassom, mas com uma banda larga relacionada aos defeitos de superfície bem menos pronunciada do que na síntese anterior.

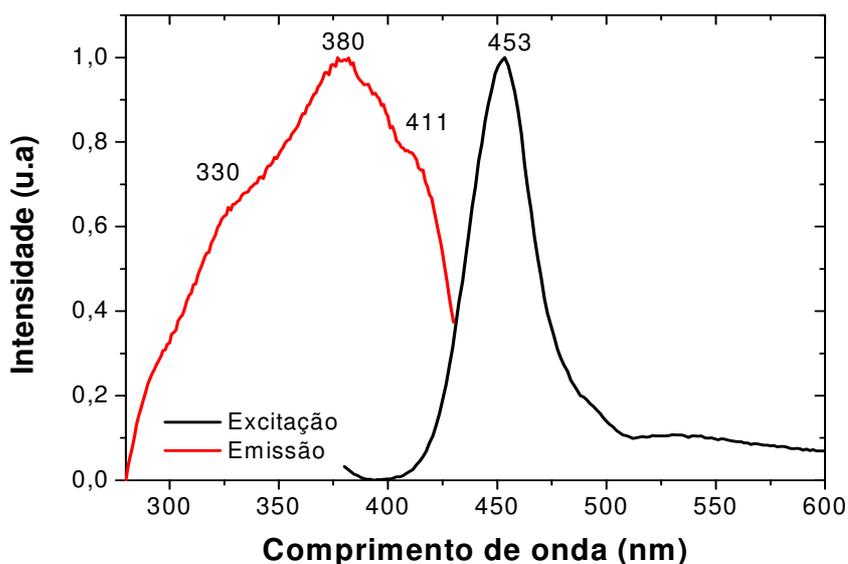


Figura 4.12: Espectros de emissão de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com C₂H₅NS (síntese hidrotérmica assistida por microondas), para Cd/S = 1.

Através dessa metodologia confirmamos algumas vantagens da síntese hidrotérmica assistida por microondas como rapidez no processo para obtenção de íons S²⁻ em solução. Com a utilização do microondas foi possível sintetizar PQs fluorescentes de CdS com razão molar de Cd/S = 1 utilizando a tioacetamida para obtenção de sulfeto.

4.3.3 Comparação dos processos sintéticos para a obtenção de PQs de CdS/Cd(OH)₂

De uma forma geral observamos uma diferença fundamental entre o método sintético tendo o H₂S como precursor e os métodos envolvendo a tioacetamida: o tamanho final dos nanocristais estimado para as sínteses usando a tioacetamida é bem menor, resultando em partículas dentro do regime de confinamento quântico forte (Figura 4.13). Adicionalmente,

observa-se qualitativamente, que o primeiro máximo de absorção está mais definido nestes sistemas, o que sugere uma menor distribuição de tamanhos das nanopartículas obtidas, principalmente utilizando a síntese assistida por microondas.

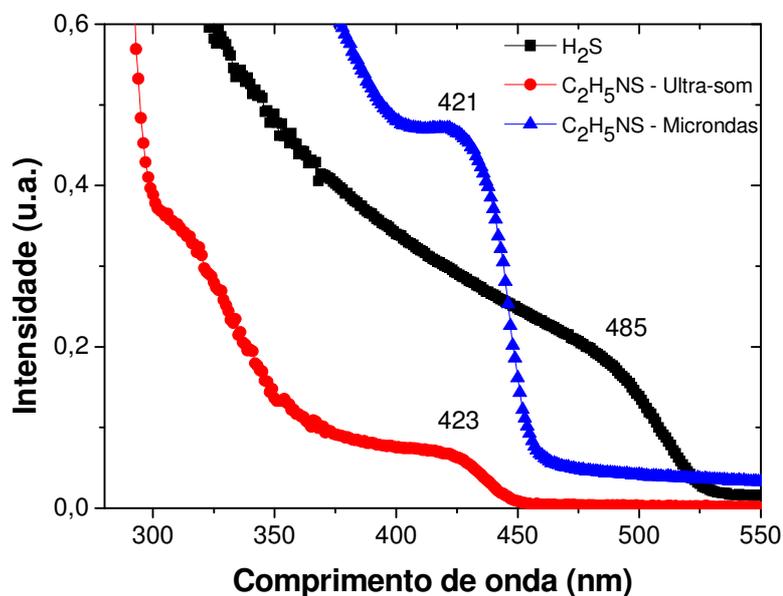


Figura 4.13 Espectros de absorção eletrônica para suspensões de CdS/Cd(OH)₂ obtidas pelas três metodologias otimizadas. Cd/S = 1 para síntese direta e assistida por microondas, Cd/S = 2 para síntese assistida por ultrassom.

Nos espectros de emissão (Figura 4.14) observamos um deslocamento dos picos para regiões de maior energia, com banda de emissão máxima centrada na região do azul (453 e 458 nm para síntese hidrotérmica e via ultrassom, respectivamente). A emissão dos PQs de CdS/Cd(OH)₂ obtidos com H₂S encontra-se na região do verde, com $\lambda = 500$ nm.

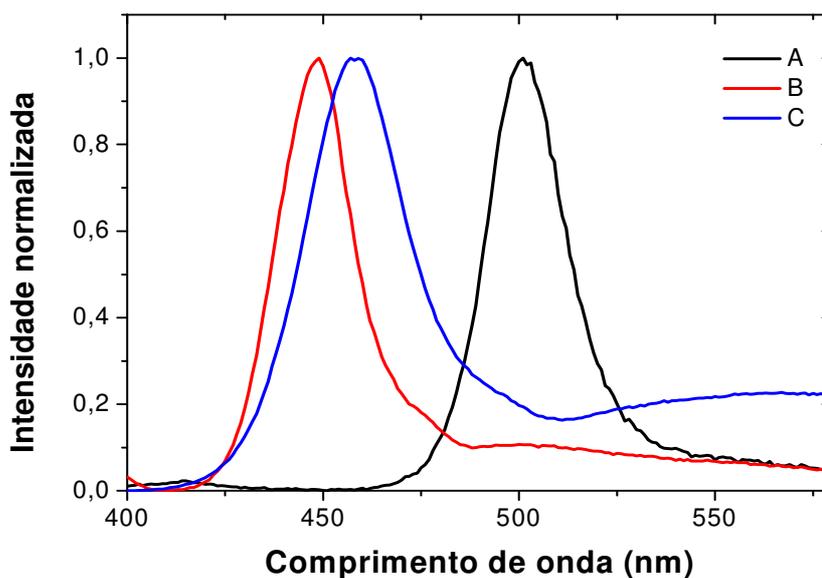


Figura 4.14: Espectros de emissão das sínteses otimizadas de CdS/Cd(OH)₂ para (A) Cd/S = 1 (H₂S); (B) Cd/S = 1 (C₂H₅NS) Microondas e (C) Cd/S = 2 (C₂H₅NS) Ultrassom ($\lambda_{exc} = 365$ nm).

Através da síntese hidrotérmica assistida por microondas obtivemos PQs com largo espectro para excitação e emissões em torno de 460 nm. Com a utilização da C₂H₅NS foi possível sintetizar partículas com aproximadamente 3,0 nm de diâmetro, evidenciando o regime de confinamento quântico forte. Demonstramos que a síntese hidrotérmica é a via mais rápida e efetiva para obtenção de PQs de CdS/Cd(OH)₂ utilizando a C₂H₅NS como fonte de enxofre. Os resultados mostram que é possível utilizar fontes mais seguras para obtenção de S²⁻ além do melhoramento na reprodutibilidade das sínteses.

4.4 Silanização de pontos quânticos de CdS/Cd(OH)₂ com H₂S

Para tentativas de silanização utilizamos a suspensão de PQs de CdS/Cd(OH)₂ sintetizada com H₂S. Optamos pelo uso desta suspensão devido a maior experiência e padronização da metodologia já obtida anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Nesta Seção daremos ênfase ao recobrimento dos PQs com SiO₂, material extremamente estável que propicia excelente isolamento do meio, evitando liberação de componentes citotóxicos para futuras aplicações [14]. Vários métodos foram propostos para revestimento de PQs com sílica

pois além de utilizá-los como marcadores biológicos o revestimento das partículas propicia melhor estabilidade em meio aquoso [15,16]. Neste trabalho realizamos testes para revestimento de PQs utilizando silicato de sódio (NaSiO₂) e alcóxidos como o tetraetilortossilicato (TEOS).

4.4.1 Silanização utilizando silicato de sódio (NaSiO₂)

- **Procedimento Experimental**

Para recobrimento de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com sílica utilizamos inicialmente as metodologias sugeridas por Wolcott et. al [17] e Almeida (2008) [4]. Inicialmente, ajustamos o pH da suspensão de PQs de CdS/Cd(OH)₂ para aproximadamente 9,0. Em 4,0 mL dessa suspensão adicionamos 40 µL de silicato de sódio (NaSiO₂) e deixamos sob agitação constante (Figura 4.15).

O crescimento da casca só é concretizado com a adição de etanol na suspensão. O etanol muda a constante dielétrica do meio deixando a sílica insolúvel causando sua precipitação ao redor da partícula (que funciona como um agente nucleador). Para essa metodologia utilizamos diferentes quantidades de etanol: 200, 400, 600 e 800 µL.

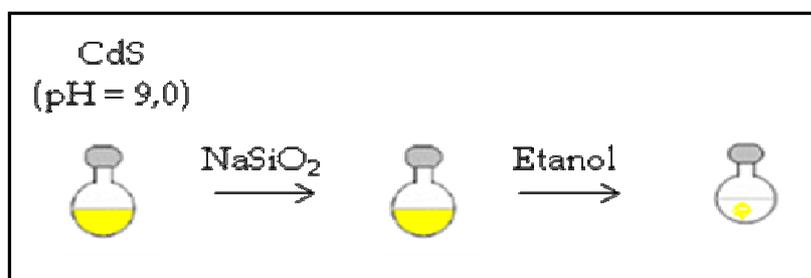


Figura 4.15: Etapa de recobrimento de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com sílica (metodologia utilizando silicato de sódio)

Para retirada do etanol, centrifugamos a suspensão por 5 minutos a 5.000 rpm, retiramos o sobrenadante e ressuspendemos o precipitado com água deionizada.

Além da amostra controle (CdS/Cd(OH)₂), separamos alíquotas para pequenas modificações da metodologia (Tabela 4.3). Em uma alíquota (A1) adicionamos somente NaSiO₂. Na alíquota (A2) além de NaSiO₂ adicionamos o etanol. Em (A3) adicionamos um

excesso de NaSiO₂ e em (A4) deixamos a suspensão em pH fisiológico (~7.5) visando futuras aplicações.

Tabela 4.3 : Condições e quantidades de reagentes da metodologia empregada para silanização utilizando silicato de sódio (NaSiO₂).

Controle	40mL (CdS/CdOH) ₂
A1	40mL (CdS/CdOH) ₂ + 40 µL NaSiO ₂
A2	40mL (CdS/CdOH) ₂ + 40 µL NaSiO ₂ + ETANOL
A3	40mL (CdS/CdOH) ₂ + 100 µL NaSiO ₂
A4	40mL (CdS/CdOH) ₂ + 40 µL NaSiO ₂ , pH fisiológico

Em seguida foi necessário fazer uma diálise utilizando água deionizada e pH em torno de 11,0. Dentro de uma membrana de diálise submergimos a suspensão de nanopartículas na tentativa de retirar o excesso de NaSiO₂.

• Resultados e Discussões

Hidrólise de silicatos de sódio é controlada pelo pH do meio e pela concentração de silício. Si(OH)₄ mononuclear é predominante em solução com pH abaixo de 7,0. Em pH maior, espécies aniônicas e polinucleares são formadas [17].

Na Figura 4.16, mostramos imagens de PQs de CdS/Cd(OH)₂ onde realizamos tentativas de silanização. Uma evidência da formação da casca de SiO₂ é que no momento da varredura tivemos mais dificuldade de visualizar os planos atômicos do que nas amostras de CdS/Cd(OH)₂ sem sílica. Acreditamos que a capa amorfa de sílica impeça de ver detalhes da partícula.

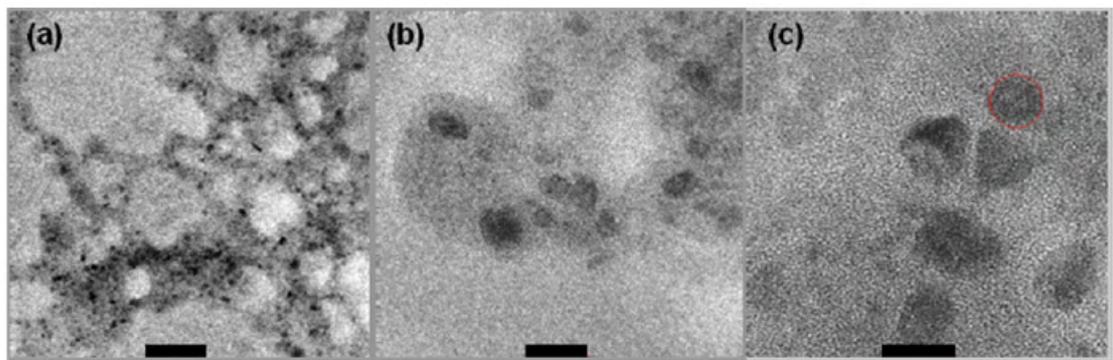


Figura 4.16: Imagens de MET de PQs de CdS/Cd(OH)₂, silanização utilizando NaSiO₂. (a) Barra = 100 nm, (b) barra = 20 nm e (c) barra = 10 nm.

Pela Figura 4.16 (a) podemos observar uma camada de um material menos elétron denso revestindo os PQs de CdS/Cd(OH)₂. Nas imagens (b) e (c) observamos maiores detalhes do material obtido. Os nanocristais se caracterizam na imagem por serem mais elétrons densos. Todas as imagens mostram uma aglomeração das partículas, ocasionada pelo processo de secagem durante a preparação da amostra para imagem por MET [18].

Espectros de absorção e emissão das suspensões de CdS/Cd(OH)₂ antes do processo de silanização (controle) Figura 4.17 (a), e após tentativas de recobrimento utilizando NaSiO₂, Figura 4.17 (b) são mostradas. As suspensões obtidas têm aparência transparente e mostraram uma estabilidade temporal superior a cinco meses, sem sinais de coalescência ou degradação química dos pontos quânticos.

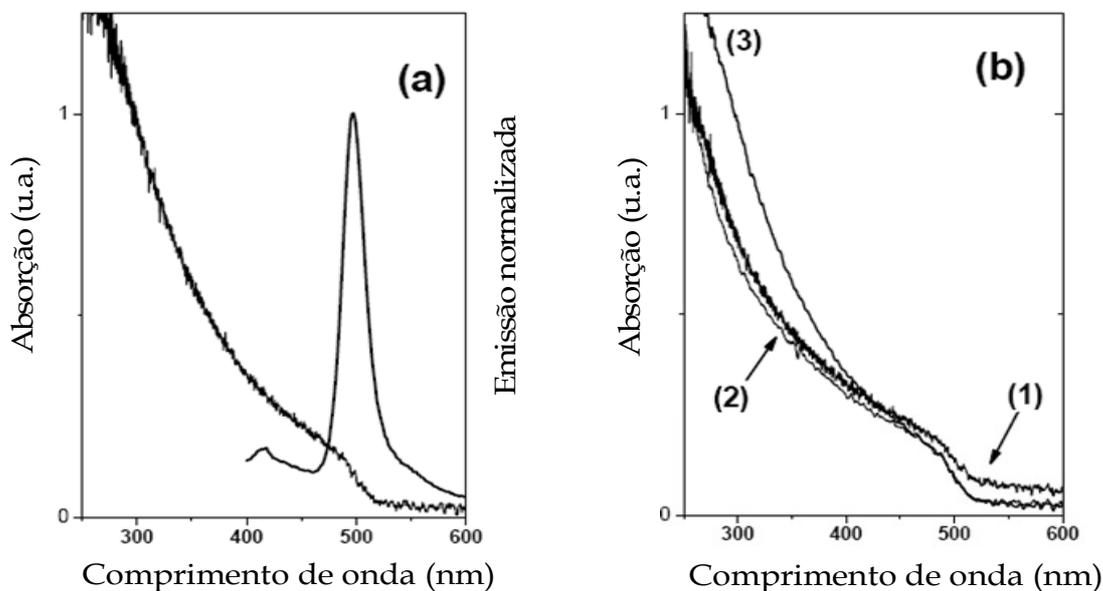


Figura 4.17: (a) Espectro de absorção e emissão ($\lambda_{exc} = 365$ nm) da suspensão controle de CdS/Cd(OH)₂, (b) espectro de absorção das diferentes alíquotas silanizadas (1) suspensão controle de CdS/Cd(OH)₂, (2) CdS/Cd(OH)₂ + NaSiO₂ (3) CdS/Cd(OH)₂ + excesso NaSiO₂.

Observamos que a deposição da sílica não afetou o tamanho médio do núcleo do CdS que apresentou-se com cerca de 6 nm ($d = 6 \pm 1,2$ nm), segundo posição do primeiro pico máximo máxima ($\lambda_{max} = 468$ nm) observado nos espectros de absorção.

Os espectros de emissão da mesma amostra antes e após o processo de silanização são mostrados na Figura 4.18.

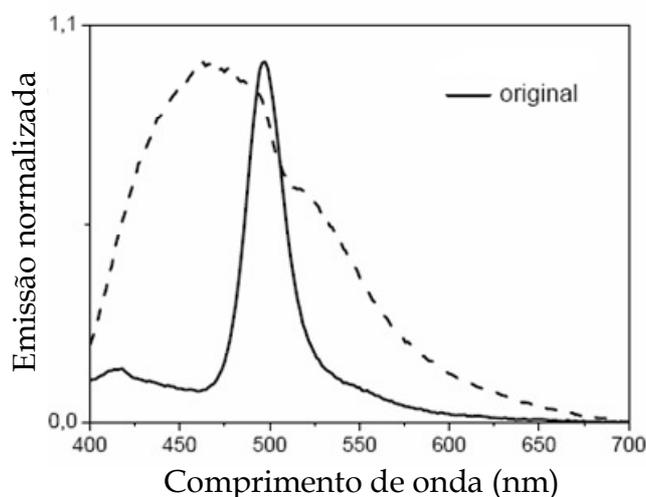


Figura 4.18: Espectros de emissão CdS/Cd(OH)₂ antes (linha sólida) e após silanização (linha tracejada), $\lambda_{exc} = 365$ nm.

Antes da silanização as amostras apresentaram maior pico de emissão em 496 nm com uma largura de banda média = 50 nm. Foi possível notar que após o processo de silanização, a largura de banda do espectro sofreu um aumento (largura média = 200 nm) e o pico máximo de emissão deslocou-se mais para o azul ($\lambda_{max} = 465$ nm). O aumento na largura da banda de emissão pode ser explicada como uma interferência química da sílica sobre o passivante Cd(OH)₂. O revestimento não homogêneo de sílica poderia resultar na modificação dessa camada de passivação, inserindo armadilhas no sistema.

4.4.2 Silanização utilizado tetraetilortossilicato (TEOS)

- Procedimento Experimental

O procedimento de síntese sol-gel adotado desta vez na tentativa de revestimento de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com sílica baseou-se no método proposto por Stöber *et al.* [19].

Para revestimento dos PQs de CdS/Cd(OH)₂ utilizamos um método e variamos a sequência de adição dos reagentes. A metodologia utilizada foi a seguinte:

- Sequência 1: na suspensão de CdS/Cd(OH)₂ adicionamos etanol (EtOH), hidróxido de amônio (NH₄OH) e por último o tetraetilortossilicato (TEOS). O intervalo para adição

dos reagentes foi de 15 minutos. Esse sistema ficou sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente (25°C). Em seguida retiramos o EtOH por rotaevaporação.

- Sequência 2: em um balão contendo etanol (EtOH) adicionamos a suspensão de CdS/Cd(OH)₂. Em seguida adicionamos o TEOS e por último, o hidróxido de amônio (NH₄OH). Esse sistema também ficou sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente (25°C). Através de rotaevaporação retiramos o EtOH.

Para observação da formação da casca de SiO₂ sobre os PQs de CdS/Cd(OH)₂, utilizamos diferentes concentrações de TEOS, descritas na Tabela 4.4:

Tabela 4.4: Concentração molar de reagentes utilizados para revestimento de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com camada de SiO₂ segundo sequência 2.

Concentração de EtOH (M)	Concentração de TEOS (mM)	Concentração de H ₂ O (M)	Concentração de NH ₄ OH (M)
14,5	0,05	10,9	0,6
13,4	0,5	10,9	0,6
13,4	1,0	10,9	0,6
13,4	2,5	10,9	0,6

• Resultados e Discussões

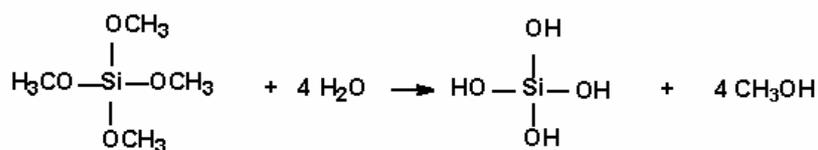
Os precursores organoalcoxissilanos possuem fórmula geral Si(OR)₄, onde R é um radical orgânico, sendo na maioria das vezes um grupo metila ou etila. Os principais precursores para síntese de sílica coloidal consistem em um átomo de silício cercado por vários ligantes reativos. Neste trabalho realizamos tentativas para deposição de sílica sobre os PQs de CdS/Cd(OH)₂ através da hidrólise e condensação de tetraetilortosilicato (TEOS). As concentrações de água, amônia e TEOS são fatores importantes que regulam tamanho e distribuição das partículas na reação sol-gel de alcóxidos [5, 20].

Para as sínteses com organoalcoxissilano como precursores há a necessidade de se usar um agente homogeneizante como o etanol, uma vez que água e organoalcoxissilano são imiscíveis. Um catalisador ácido ou básico também deve ser utilizado para acelerar o processo de

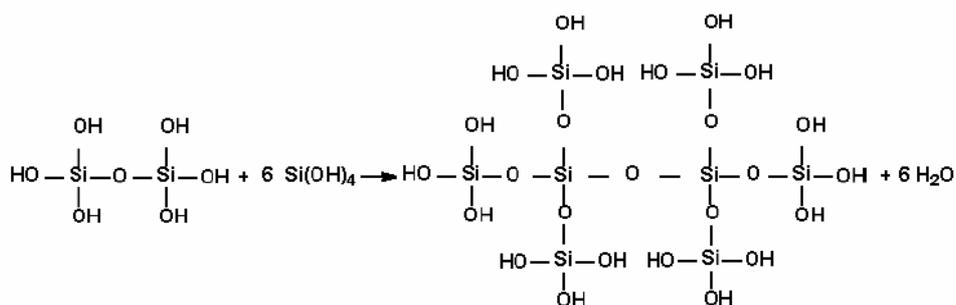
hidrólise, sendo que em ambos os casos a reação acontece com ataque nucleofílico do oxigênio da água ao átomo de silício [21].

As principais etapas envolvidas na transformação de um precursor molecular num óxido inorgânico, através do processo sol-gel, podem ser sumarizadas nas etapas de hidrólise (a) e condensação (b) do precursor.

(a) Hidrólise do precursor, levando a formação de ligação Si—OH:



(b) Condensação das espécies Si—OH, levando a formação de ligações (—Si—O—Si—):



A hidrólise (etapa a) é realizada via uma adição nucleofílica da água ao metal, pois a alta eletronegatividade do grupo alcóxido faz com que o átomo metálico seja susceptível a ataques nucleofílicos. A condensação (etapa b) das espécies M-OH, leva à formação de ligações Si-O-Si. A água e o álcool, obtidos como produtos da reação, permanecem nos poros da rede. Esta etapa é um processo complexo, que pode ser conduzido por dois mecanismos distintos, de acordo com as condições experimentais.

A ocorrência de vários estágios de hidrólise e condensação resulta na formação de uma rede MO_n. Quando existe um número suficiente de ligações M-O-M em uma determinada região, ocorre a formação, por efeito cooperativo, de partículas coloidais ou cadeias poliméricas lineares dispersas no líquido (sol), com a superfície repleta de grupamentos OH.

Essas etapas de condensação podem ser catalisadas por bases ou ácidos. Neste trabalho utilizamos hidróxido de amônia (NH₄OH) como catalisador.

A hidrólise, quando realizada por meio de catálise básica, procede muito mais lentamente que a hidrólise ácida. Embora a hidrólise seja lenta, ela tende a ser completa e irreversível [22]. Os átomos de oxigênio do grupamento alcóxido tendem a repelir-se do grupo nucleofílico, OH⁻. Sob as condições básicas é típico que ocorra a dissociação da água para produzir ânions OH⁻ em uma primeira etapa rápida. O ânion OH⁻ é então mais propenso ao ataque ao átomo de silício. Um mecanismo tipo SN₂ tem sido proposto no qual o OH⁻ substitui o grupamento OR com inversão do tetraedro de silício, como na Figura 4.19.

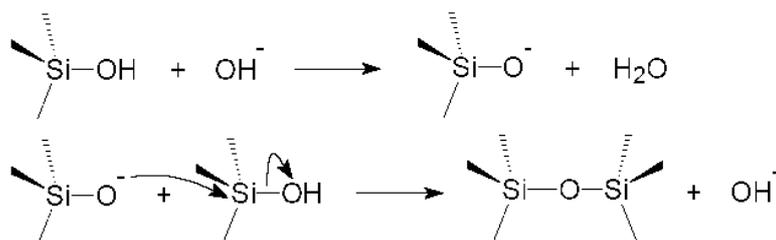


Figura 4.19: Mecanismo de catálise básica.

Na primeira tentativa para o revestimento seguimos a seguinte seqüência:

- Sequência 1: Na suspensão de CdS/Cd(OH)₂ adicionamos etanol (EtOH), hidróxido de amônio (NH₄OH) e por último o tetraetilortosilicato (TEOS). (O intervalo para adição dos reagentes foi de 15 minutos). Esse sistema ficou sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente (25°C). Após retirada do EtOH por rotaevaporação e processo de diálise observamos visualmente que não houve fotodegradação da amostra. Em seguida obtivemos espectros de absorção e emissão das amostras, Figura 4.20 e Figura 4.21. Através do espectro de absorção observamos que não houve alteração da posição do primeiro máximo do pico de absorção ($\lambda \sim 470$ nm) da amostra controle para a amostra silanizada após rotaevaporação.

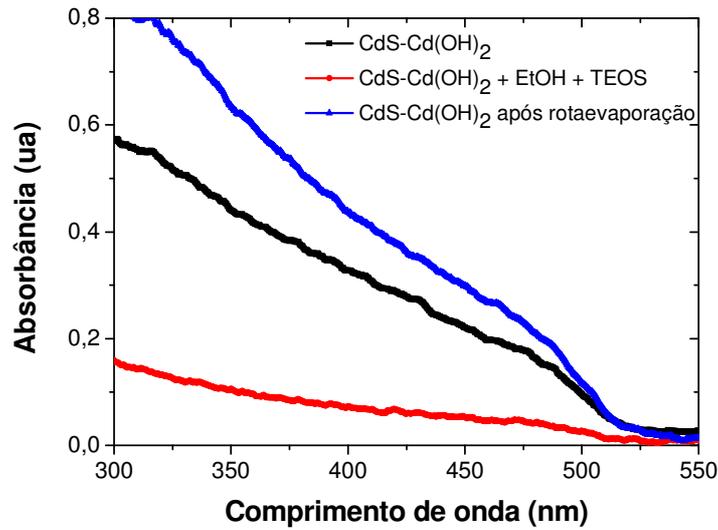


Figura 4.20: Espectro de absorção de PQs de CdS/Cd(OH)₂ - silanização utilizando TEOS.

Através dos espectros de emissão (Figura 4.21) observamos que não houve deslocamento no comprimento de onda ($\lambda = 500$ nm) da amostra silanizada após rotaevaporação, mas observamos uma queda na intensidade da emissão. Não observamos emissão na amostra submetida à diálise. Acreditamos que a camada de passivação foi perdida devido à alteração do pH do meio indicando que o recobrimento com sílica não foi tão eficiente.

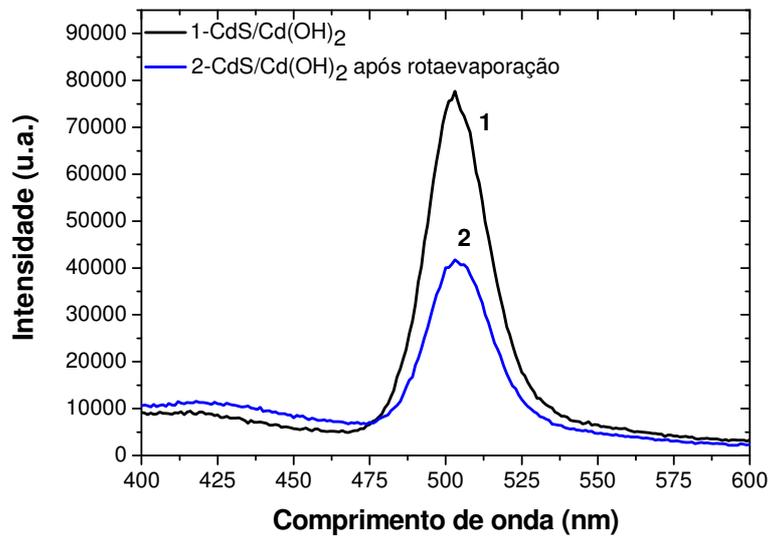


Figura 4.21: Espectro de emissão de PQs de CdS/Cd(OH)₂ - silanização utilizando TEOS.

Obtivemos imagens por MET (Figura 4.22) para verificar a presença da camada de sílica sobre os PQs, mas não foi possível evidenciar a formação homogênea e efetiva da camada de sílica à volta dos PQs. O equipamento utilizado para obtenção das imagens não possibilitou o mapeamento elementar das amostras. Através das imagens foi possível observar que a metodologia utilizada para revestimento não alterou a estrutura das partículas.

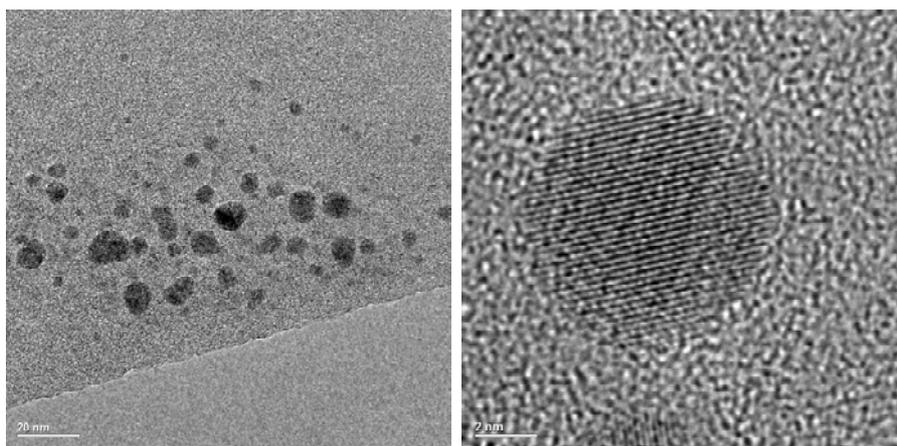


Figura 4.22: Imagens por MET de PQs de CdS/Cd(OH)₂ após tentativa de silanização utilizando TEOS.

Realizamos novas tentativas alterando a ordem de adição dos reagentes.

- Sequência 2: Em um balão contendo etanol (EtOH) adicionamos a suspensão de CdS/Cd(OH)₂. Em seguida adicionamos o TEOS (diferentes concentrações) e por último, o hidróxido de amônio (NH₄OH). Esse sistema também ficou sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente (25°C). Através de roataevaporação retiramos o excesso de EtOH.

Obtivemos espectros de absorção (Figura 4.23) e verificamos que não há deslocamento no primeiro máximo de absorção (480 nm) das nanopartículas após processo de silanização. Isso indica que as partículas continuam apresentando as mesmas características da suspensão original de CdS/Cd(OH)₂. Através destes espectros calculamos (Equação 2.2) que as nanopartícula apresentam diâmetros em torno de 7-9 nm.

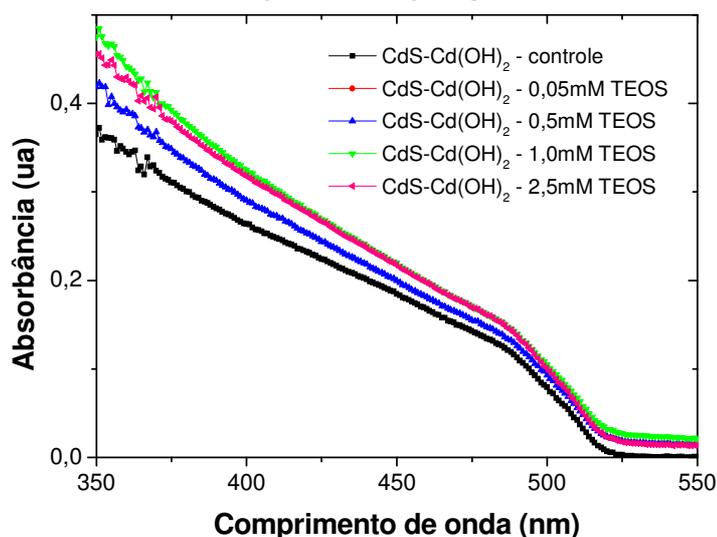


Figura 4.23: Espectro de absorção da suspensão de CdS/Cd(OH)₂, controle e amostras submetidas a silanização (0,05mM; 0,5 mM; 1,0 mM e 2,5 mM de TEOS).

Após silanização foi possível observar a emissão de PQs silanizados (Figura 4.24). Através do espectro observamos que houve uma queda significativa da intensidade da fluorescência original do CdS/Cd(OH)₂, além do surgimento de duas novas bandas, uma na região do azul (400-470 nm) e outra iniciando em 575 nm e se dirigindo à região do vermelho. A banda de menor energia pode estar relacionada a defeitos superficiais do CdS, porém a banda de maior energia que aparece nas amostras silanizadas sugere algum processo decorrente da matriz de sílica.

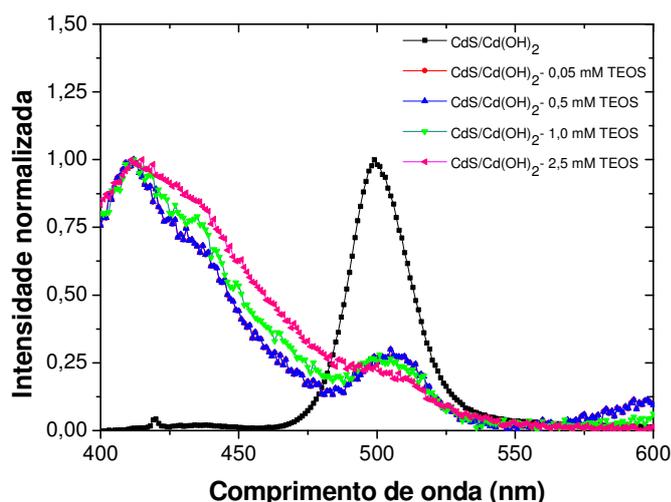
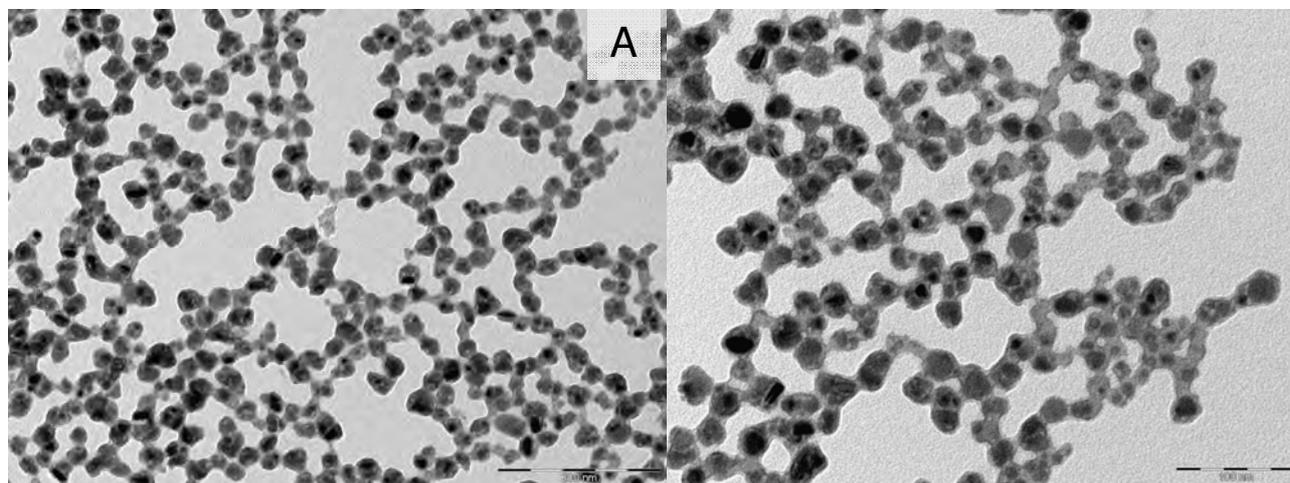


Figura 4.24: Espectro de emissão da suspensão de CdS/Cd(OH)₂, controle e amostras submetidas a silanização (0,05mM; 0,5 mM; 1,0 mM e 2,5 mM de TEOS).

Na Figura 4.25 observamos imagens obtidas por MET do revestimento dos PQs com sílica. A partir das imagens, é possível observar a formação da camada de sílica à volta dos PQs. Observa-se que com diferentes quantidades de TEOS há formação de diferentes arranjos sobre a grade. Na imagem com 0,05 mM de TEOS (Figura 4.25 A) observa-se nanopartículas mais isoladas e com fina camada de revestimento. Todas as áreas visualizadas da grade apresentam o mesmo padrão apresentado abaixo. Para as amostras contendo 0,5 e 1,0 mM de TEOS (Figura 4.25 B e C), observamos regiões que possuem aglomerados de PQs e partes isoladas de sílica que não depositaram apropriadamente na superfície das nanopartículas. Aparentemente, podemos dizer que houve algum evento intermédio durante o processo de silanização que induziu a desestabilização do sistema coloidal resultando numa deposição heterogênea da sílica sobre os PQs luminescentes. Já as amostras que continham 2,5 mM de TEOS (Figura 4.25 D) apresentaram, da mesma forma que para as amostras com 0,05 mM de TEOS, uma melhor homogeneidade e uniformidade da amostra como um todo. Observamos também nestas amostras com maior concentração de TEOS adicionada, uma camada bastante espessa de sílica além de múltiplos PQs numa única partícula de sílica. Além da concentração de PQs presentes no sistema coloidal, a relação direta entre a força iônica presente no sistema pós-adição dos reagentes requeridos para o processo de silanização pode determinar uma maior ou menor repulsão eletrostática entre os PQs resultando numa proximidade ideal para obtenção de sistemas PQs/sílica onde haja pelo menos uma nanopartícula (ou o menor número possível delas) revestida com sílica. Para cada sistema a ser revestido com sílica precisa-se obter uma razão ideal destes reagentes e solventes (NH₄OH, etanol, TEOS e água) de modo a otimização do processo de silanização e evitar grandes alterações nas propriedades físicas e óticas, no nosso caso, do material em questão.



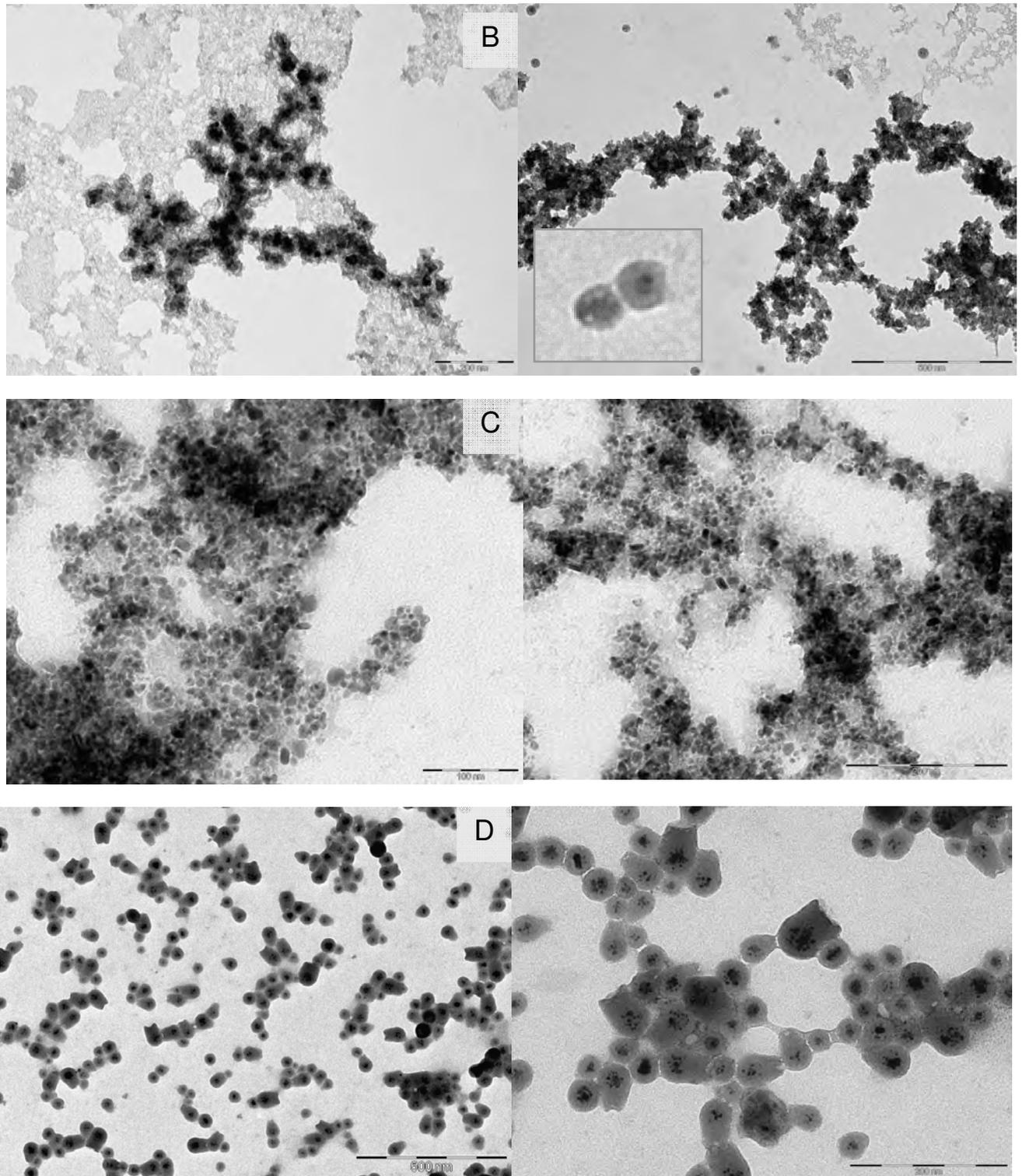


Figura 4.25: Imagens por MET do revestimento de PQs de CdS/Cd(OH)₂ com diferentes concentrações de TEOS (A - 0,05 mM; B - 0,5 mM; C - 1,0 mM e D - 2,5 mM).

4.5 Conclusões Gerais

Através deste trabalho concluímos que é possível obter PQs de CdS/Cd(OH)₂ utilizando a tioacetamida (C₂H₅NS) como fonte de enxofre. Observamos que em meio básico (pH 10,5) temos maior disponibilidade de enxofre e que a metodologia utilizando ultrassom não é tão eficiente para quebra da tioacetamida. Utilizando síntese hidrotérmica assistida por microondas observou-se que quando submetidas à radiação microondas as substâncias polares se aquecem. Este aquecimento no forno é volumétrico e o calor é gerado no próprio material a ser aquecido. Através desta técnica destacamos as seguintes vantagens: (i) rapidez no processo, devido ao aquecimento mais efetivo do material e (ii) síntese mais uniforme obtida através do melhor controle da temperatura de aquecimento. Neste capítulo mostramos que é possível substituir o gás sulfídrico por tioacetamida para síntese de PQs de CdS/Cd(OH)₂.

Sintetizamos e caracterizamos PQs de CdS/Cd(OH)₂ com H₂S para posterior revestimento com sílica. Apresentamos os resultados de silanização por metodologias utilizando silicato de sódio e TEOS, juntamente com os resultados da variação de TEOS para formação da camada de sílica sobre PQs de CdS/Cd(OH)₂. Neste trabalho, sugerimos o revestimento dos PQs devido ao uso destes em aplicações biológicas. Um fator primordial para tal aplicação é o fato de trabalharmos com telúrio e cádmio, substâncias prejudiciais aos organismos. Através destas observações vimos a necessidade de melhoramento do recobrimento dos PQs, pois além da tentativa de melhorar a fluorescência, no caso do CdS que é passivado com Cd(OH)₂ ele evita a liberação de íons tóxicos para o meio onde será aplicado. Obtivemos bons resultados nos revestimentos pelo método sol-gel com TEOS, utilizando a NH₄OH como catalisador na presença de PQs de CdS/Cd(OH)₂. Para melhoramento no revestimento dos PQs, foi necessário adicionar o NH₄OH na suspensão após adição do TEOS e etanol. O método utilizado não necessita de agentes de acoplamento e é mais efetivo do que a metodologia utilizando silicato de sódio. Novos testes precisam ser realizados para melhor controle da espessura da camada de sílica sobre PQs de CdS/Cd(OH)₂. Para isso, torna-se necessário a otimização da razão ideal de reagentes e solventes além da concentração de TEOS.

Referências

- [1] www.higieneocupacional.com.br/download/gas-sulfidrico
- [2] CHEN, C.; TAKEZAKO, T.; YAMAMOTO, K.; SERIZAWA, T.; AKASHI, M. *Colloids Surf. A*, v. 169, p. 35-45, 2000.
- [3] WANG, H.; NAKAMURA, H.; YAO, H.; MAEDA, H.; ABE, E. Effect of solvents on the preparation of silica-coated magnetic particles. *Chem. Lett.*, v. 11, p. 1168-1169, 2001.
- [4] ALMEIDA, D. B. *Pontos quânticos coloidais de semicondutores II-VI encapsados com SiO₂*. Dissertação (Mestrado em Física), Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- [5] SANTOS, B. S. *Obtenção de nanopartículas de CdS em sistemas amorfos e a investigação de suas propriedades óptico não-lineares em meio aquoso*. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.
- [6] VOSSMEYER, T.; KATSIKAS, L.; GIENIG, T. M.; POPOVIC, I. G.; DIESNER, K.; CHEMSEDDINE, A.; EYCHMILLER, A.; WELLER, H. CdS Nanoclusters: synthesis, characterization, size dependent oscillator strength, temperature shift of the excitônica transition energy and reversible absorbance shift. *Journal Physics Chemical*, v. 98, 1994.
- [7] SPANHEL, L.; HAASE, M.; WELLER, H.; HENGLEIN, A. Charge Carrier dynamics in colloidal semiconductors. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 109, 1987.
- [8] Cartão de identificação do JCPDS, N° 75 - 2086.
- [9] FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; CESAR, C. L.; MENEZES, F. D.; LONGO, R. L.; FERREIRA, R. C. CdS nanoparticles - Structural and Energetical Correlations. *Materials Chemistry and Physics*: v. 89, p. 21-27, 2004.
- [10] CARDOSO, C. A. *Química geral e analítica: Análise de Cátions e Ânions*. Ministério da Educação e do desporto, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Medianeira - PR, 2000.
- [11] http://www2.iq.usp.br/docente/shps/Disciplinas/Graduacao/QFL2241/Coloquio5 Metais_de_transicao.pdf
- [12] REYNOSO, V. C. S. *Controle do Crescimento de Nanoestruturas Semicondutoras do Tipo CdTe e CdTeS em Matriz Vítrea Borossilicato*. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.
- [13] RAO, K. J.; VAIDHYANATHAN, B.; GANGULI, M.; RAMACRISSHNAN, A. Synthesis of inorganic solids using microwaves. *Chemistry of Materials*, v. 11, n. 4, p. 882-895, 1999.
- [14] RZIGALINSKI, B.A.; STROBL, J.S. Cadmium-containing nanoparticles: perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 238, p. 280–288, 2009.
- [15] BAKALOVA, R.; ZHELEV, Z.; AOKI, I.; OHBA, H.; IMAI, Y.; KANNO, I. Silica-shelled single quantum dot micelles as imaging probes with dual or multimodality. *Anal Chem*. v. 78, p. 5925–5932, 2006.

[16] DARBANDI, M.; THOMANN, R.; NANN, T. Hollow silica nanospheres: in situ, semi-in situ, and two-step synthesis. *Chem Mater*, v. 19, p. 1700–1703, 2007.

[17] WOLCOTT, A.; GERION, D.; VISCONTE, M.; SUN, J.; SCHWARTZBERG, A.; CHEN, S.; ZHANG, J. Silica-coated CdTe quantum dots funcionalized whit for bioconjugation to IgG proteins. *J. Phys. Chem. B*, v. 110, p. 5779-5789, 2006.

[18] CHAVES, C. R.; ALMEIDA, D. B.; CESAR, C. L.; FONTES, A.; SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A. *Silica capped CdS/Cd(OH)₂ quantum dots for biological applications*. Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications , edited by Marek Osinski, Wolfgang J. Parak, Thomas M. Jovin, Kenji Yamamoto, Proc. of SPIE, v. 7575, p. 7575-04, 2010.

[19] STÖBER W, FINK A, BOHN E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.*, v. 26, p. 62–69, 1968.

[20] MINE,E.; YAMADA, A.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, M.; LIZ-MARZÁN, L. M. Direct coating of gold nanoparticles with silica by a seeded polymerization technique. *Journal of colloidal and interface science*, v. 264, p. 385-390, 2003.

[21] VANSANT, E.F.; VAN DER VOORT, P.; VRANCKEN, K.C. *Characterization and Chemical modification of the silica surface*, Elsevier, Amsterdam, 1995.

[22] YING, J. Y.; BENZINGE, J. B.; NAVROTSKY, A. Structural evolution of alcoxide silica-gels to glass – effect of catalyst pH. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 76, p. 2571, 1993.

5 Aplicações dos pontos quânticos em marcação celular

5.1 Introdução

Em biologia celular tem sido uma prática a utilização de marcadores fluorescentes tais como corantes orgânicos, compostos de coordenação de íons lantanídeos e proteínas recombinantes fluorescentes, etc. [1]. Os fluoróforos orgânicos são usados como marcadores moleculares para identificar compartimentos estruturais, moléculas ou organelas. Estes fluoróforos podem ser ligados (conjugados) ao alvo de forma direta ou indireta através da conjugação com anticorpos e outras moléculas que se ligam secundariamente ao alvo. O fluoróforo DAPI (*4'6-diamidino-2-phenylindole*), por exemplo, tem afinidade por moléculas de DNA, sendo comumente empregado para marcação em núcleos celulares.

Embora sejam amplamente utilizados na marcação de estruturas celulares, tecidos e organismos, algumas limitações desses fluoróforos devem ser levadas em consideração. Uma reação fotoquímica irreversível comum aos fluoróforos é o esmaecimento da fluorescência (*photobleaching*) ou fotodegradação, causada pela destruição fotoquímica do fluoróforo fazendo com que estes percam de modo irreversível sua fluorescência, logo após terem sido excitadas ou após poucos minutos, dependendo da intensidade da fonte de excitação [2,3]. Desta forma, as amostras marcadas com tais corantes precisam ser mantidas em ambientes escuros e a seção de microscopia precisa ser realizada rapidamente, dificultando o monitoramento de todo um processo celular. Além da fotodegradação (Figura 5.1), outras desvantagens envolvidas nestes tipos de marcação são: alta toxicidade e morte celular com utilização de UV [4,5]. As proteínas fluorescentes como, por exemplo, a GFP (*Green Fluorescent Protein*) aparentemente não são tóxicas, mas podem causar a indução de processos celulares indesejados, além de ser uma técnica laboriosa.

Devido às desvantagens no uso de fluoróforos convencionais, várias pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento e reprodutibilidade na síntese de pontos quânticos (PQs) para uso em biodetecção e bioimagem [6,7]. Os PQs representam uma nova classe de fluoróforos que estão ganhando reconhecimento como resultado de suas propriedades fotofísicas [6]. Devido aos efeitos de confinamento quântico estes materiais apresentam propriedades óticas e eletrônicas interessantes pois, de acordo com o tamanho em que são sintetizados, os PQs podem emitir em diferentes comprimento de onda substituindo mais de um marcador orgânico (Figura 5.2) [8]. Imagens multicolores podem ser obtidas com o mesmo material quando este apresenta diferentes diâmetros [9]. Ao contrário da maioria dos corantes convencionais os quais apresentam um estreito espectro de absorção, os PQs apresentam como vantagem adicional o fato de que um único laser

pode excitar a luminescência em diferentes comprimentos de onda enquanto, cada corante orgânico precisa ser excitado num comprimento de onda único e bem definido [3, 6-7] (Figura 5.3).

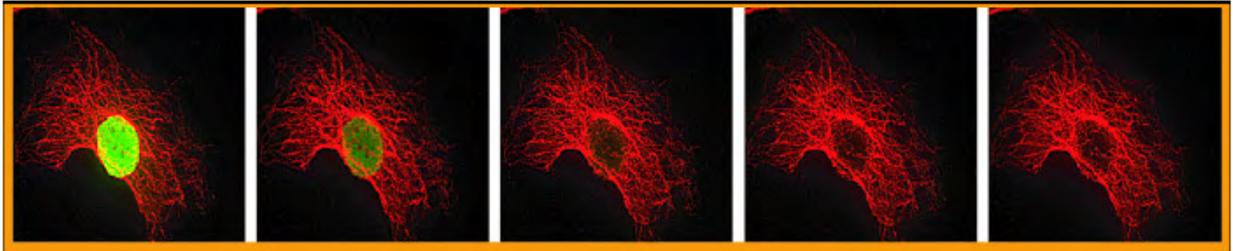


Figura 5.1: Fotodegradação em função do tempo: antígenos nucleares corados com Alexa Fluor 488 e microtúbulos corados com QD 605- CdSe (Tempos observados: 0s, 20s, 60s, 120s e 180s) [4].

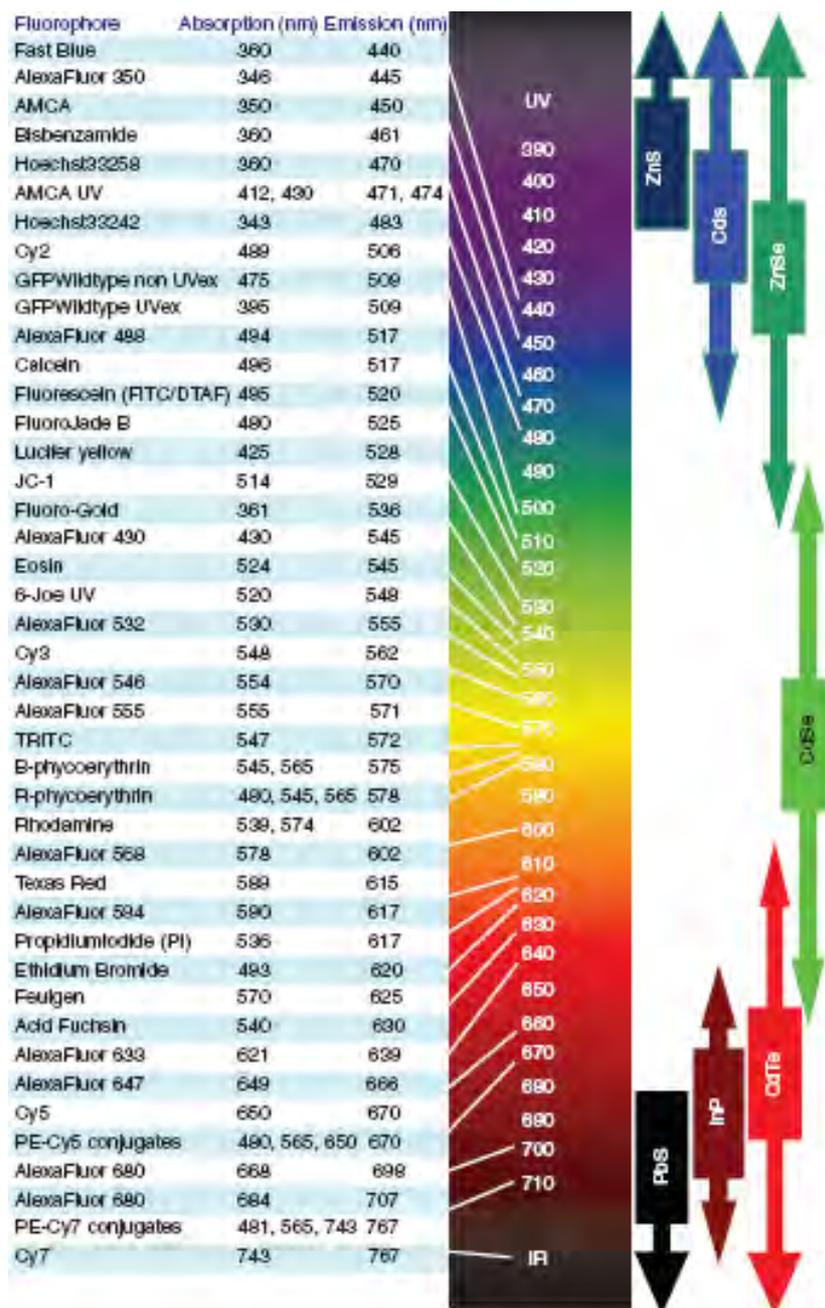


Figura 5.2: Esquema ilustrativo mostrando a versatilidade dos PQ quando comparados com os fluoróforos orgânicos convencionais. Observa-se que PQs de mesma constituição e tamanhos distintos podem substituir diferentes fluoróforos [6].

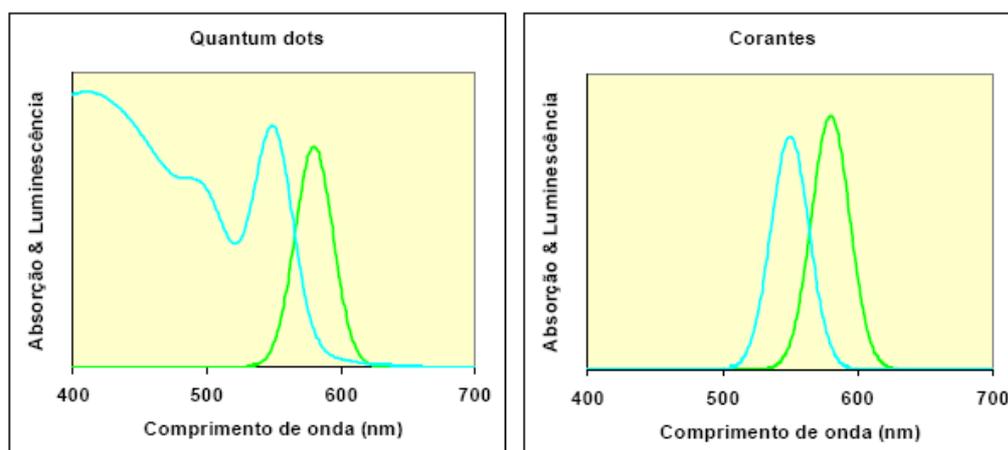


Figura 5.3: Espectros comparativos de absorção (ciano) e emissão (verde) típicos de PQs e moléculas orgânicas utilizados como marcadores fluorescentes [7].

Os estudos e aplicações de PQs revelam sua eficácia como novas sondas luminescentes para finalidades diagnósticas [6], possibilitando a aquisição em tempo real de um único receptor da superfície celular, além do desenvolvimento de modelos não invasivos para detecção de pequenos tumores [10]. Outro destaque é a aplicação dos PQs em células vivas e tecidos [11]. Dependendo do ligante anexado aos pontos quânticos, eles podem ser injetados em células pela técnica de micro injeção. Uma vez no interior das células, os PQs podem agir como repórter da reação bioquímica [12]. Estudos mostram que culturas de células marcadas com PQs continuam mantendo suas funções, permanecendo viáveis para análise por períodos de tempo prolongados [10,13-17]. Com isso, os PQs podem ser ferramentas importantes na investigação de metástases e têm sido propostos como veículos para administração de medicamentos que possam iniciar certas reações químicas fotoativadas [18].

A marcação bem sucedida de um determinado alvo depende do correto direcionamento do marcador. Desta forma, surge um grande interesse na correta funcionalização dos PQs para que eles possam escapar dos filtros biológicos [19]. A funcionalização deve proporcionar condições ótimas para marcações, além de possibilitar o monitoramento do evento ou sistema investigado. Com a funcionalização, os PQs tornam-se mais biocompatíveis, diminuindo alterações fisiológicas e possíveis danos aos sistemas biológicos [6,20]. Várias estratégias têm sido exploradas para utilização e entrega de PQs em células vivas [21]. A proteína transferrina possui múltiplas tarefas e é conhecida por ser responsável pelo transporte e carreamento do ferro no plasma e no líquido extracelular para suprir as necessidades das células [22]. Neste caso, a transferrina serve como ferramenta para estudos e monitoramento da endocitose dos PQs pelas células,

constituindo-se num sistema modelo para investigação de processos endocíticos mediados por receptor (Figura 5.4) [23,24]. A transferrina contém 679 resíduos de aminoácidos e tem um peso molecular de 79 KD [25].

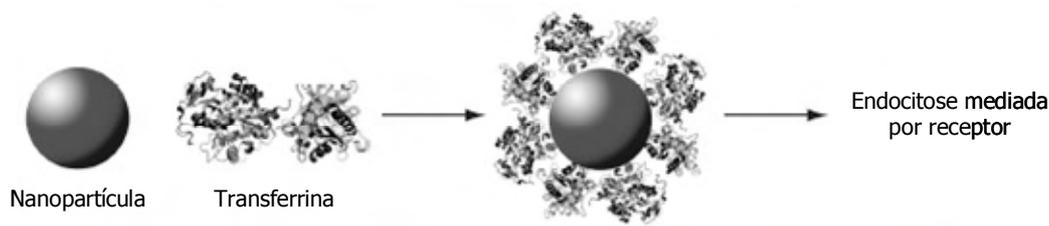


Figura 5.4: Ilustração exemplificando uma funcionalização de PQs a transferrina.

A utilização de traçadores que podem ser observados no microscópio eletrônico de transmissão (como é o caso de proteínas associadas à nanopartículas de PQs) possibilita estudos sobre endocitoses além do monitoramento sobre o destino final do material endocitado em culturas de parasitas como, por exemplo em *Trypanosoma cruzi* [26].

A entrega bem sucedida de PQs necessita da funcionalização com biomoléculas mas ocasiona um aumento de seu diâmetro. Esta característica pode tornar a entrega mais difícil e muitas vezes, pode influenciar na toxicidade [27]. Os potenciais efeitos tóxicos dos PQs também se tornaram um tema de considerável importância e discussão. Com efeito, a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* é provavelmente um fator chave para determinar o uso de PQs como sondas para obtenção de imagens pois podem afetar o crescimento e viabilidade celular [28,29]. Estudos destacam que o grau de citotoxicidade pode ser dependente de uma série de fatores, incluindo tamanho, dose, superfície química, e revestimento [28,30]. Mesmo não induzindo alterações significativas na fisiologia celular, a utilização de PQs podem produzir alterações sutis na viabilidade celular afetando na qualidade dos resultados [31].

Os tripanosomatídeos são protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e compreendem um grande número de espécies que infectam um variado espectro de hospedeiros. O estudo da biologia celular nos tripanosomatídeos é importante para a compreensão de seu processo evolutivo. Tais estudos concentram-se em espécies de interesse médico e econômico como: *T. cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas), espécies do gênero *Leishmania* entre outros. Estes protozoários são responsáveis por doenças de grande impacto em muitos países da América Latina [32,33]. Os tripanosomatídeos possuem uma morfologia muito variável não só entre as espécies, mas também entre diferentes fases de desenvolvimento. São classificados de acordo com a morfologia da célula, posição do cinetoplasto e do sistema flagelar em relação ao núcleo [34].

Neste Capítulo destacamos a funcionalização dos PQs sintetizados e descrevemos algumas metodologias para marcação de materiais biológicos. Nos ensaios de marcação biológica, utilizamos PQs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizados com polietileno-glicol (PEG) para marcar parasitas como *T. cruzi*. Também utilizamos PQs de CdTe/CdS para marcação de *Leishmanias amazonensis*. Estas marcações se tornam interessantes para estudar a biologia celular dos parasitas, além da possibilidade de investigá-los quando em células hospedeiras. Também estudamos a toxicidade dos PQs CdS/Cd(OH)₂ nos ensaios de marcações em culturas de células de *T. cruzi*. Apesar da existência de trabalhos e interesses relacionando a utilização de drogas para morte do parasita, neste capítulo damos ênfase na viabilidade celular frente a agentes tóxicos. Um dos objetivos dos ensaios de marcações se caracteriza pelo estudo da via endocítica dos parasitas por isso, testes foram realizados para verificar se a quantidade de PQs utilizados nas marcações influenciam no metabolismo do parasita.

5.2 Procedimentos experimentais

5.2.1 Ensaios de Funcionalizações/conjugações

Poli(etileno glicol) - Após verificar a luminescência das nanopartículas de CdS/Cd(OH)₂ (síntese descrita no Capítulo 4), preparamos uma solução com poli(etileno glicol) (PEG) de diferentes massas molares: PEG-1.000; PEG-1.450; PEG-1.500 (*Sigma Aldrich*). Para obtenção de nanopartículas de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizadas com PEG utilizamos 1400 µL CdS/Cd(OH)₂ e 100 µL de PEG-1.000 (concentração = 0,0025 g/mL) em pH fisiológico. A Figura 5.5, mostra o esquema realizado para síntese, passivação e funcionalização de nanopartículas de CdS/Cd(OH)₂ com PEG.

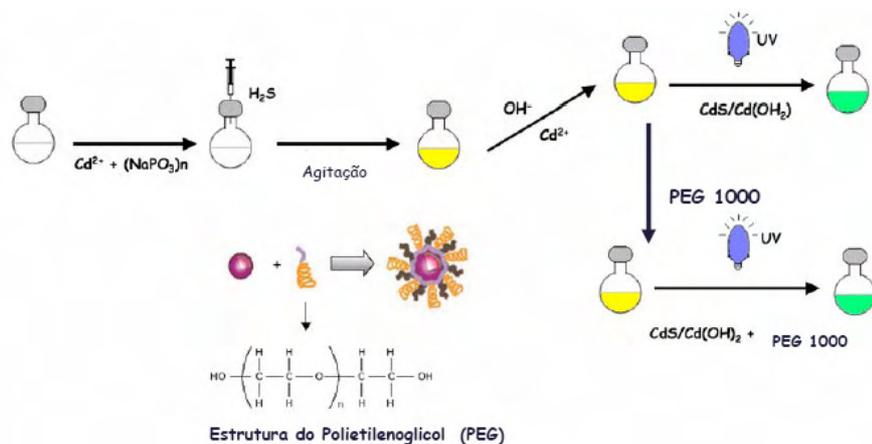


Figura 5.5: Esquema de síntese, passivação e funcionalização da suspensão de CdS/Cd(OH)₂ com PEG.

Transferrina – Os PQs (CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)_2) foram conjugadas com transferrina (Tf) durante 15 horas à temperatura ambiente, sob agitação. As suspensões controle (PQs) também foram mantidas em temperatura ambiente. A conjugação dos PQs com moléculas orgânicas foram analisadas através de fluoroimunoensaio no equipamento *Wallac 1420* (software VICTOR² HR4000) em placas de poliestireno (Perkin Elmer) *Optiplat*, com 96 poços (representação esquemática na Figura 5.6).



Figura 5.6: Representação esquemática do ensaio de conjugação. A proteína conjugada ao PQs liga-se a placa de poliestireno.

Após 15 horas da junção PQs–transferrina, revestimos a placa com papel alumínio e a deixamos em banho térmico por duas horas a 37°C. Ao retirar do banho térmico a placa foi lavada por três vezes com PBS filtrado. Os experimentos foram realizados em triplicata. Na Tabela 5.1 listamos as amostras que utilizamos para os ensaios de conjugação (funcionalização). No Poço I adicionamos somente proteína (Transferrina 0,01g/mL); nos poços II e III adicionamos os PQs (CdS/Cd(OH)_2 e CdTe/CdS); no poço IV utilizamos PQs de CdS/Cd(OH)_2 com glutaraldeído 0,1% e transferrina e, finalmente CdTe/CdS (sintetizado com AMA) mais transferrina.

Tabela 5.1: Sistemas utilizados para ensaios de conjugação.

Poço	Sistemas
I	Transferrina (Tf) 0,01 g/mL
II	CdS/Cd(OH)_2
III	CdTe/CdS (AMA) 76,2 μL + 123,8 μL H_2O
IV	CdS/Cd(OH)_2 + Glut. + Tf
V	CdTe/CdS (AMA) + Tf

A incubação foi realizada por duas horas à 37°C. Os resultados são obtidos devido à afinidade das proteínas pelo poliestireno, fazendo com que as mesmas fiquem aderidas à placa após incubação. Assim, quando não há conjugação PQs–proteína, não há sinal de fluorescência, pois os PQs sozinhos não se aderem à placa. Quando há conjugação temos sinal. Para excitação dos poços utilizamos o filtro F355, que permite a passagem de uma banda total de 31 nm em torno do máximo. Já para a leitura (coleta), foi utilizado o filtro de emissão F535 que permite a passagem de uma banda total de 25 nm em torno do máximo.

5.2.2 Ensaio de marcação biológica

Cultivo dos parasitas – Diferentes parasitas podem ser cultivados em meios de cultura distintos. Em face dos requisitos nutricionais e fisiológicos distintos de células, determinados meios de cultura são mais apropriados para o isolamento e/ou cultivo de uma ou outra forma de parasita. Para cultivo de *Trypanosoma cruzi* (formas epimastigotas) foi utilizado o meio *Liver Infusion Tryptose (LIT)* acrescido de diferentes concentrações de soro bovino fetal (SBF) e para *Leishmania amazonensis* foi utilizado o meio RPMI (Instituto Roswell Park Memorial) também com soro fetal. Dentre os vários meios de cultura atualmente disponíveis, o meio LIT proporciona um bom crescimento para a grande maioria das amostras de *T. cruzi*. Ensaio de marcações também destacam a utilização da solução Hank's para visualização da fluorescência de PQs por microscopia confocal [34].

Marcação de *T. cruzi* com PQs - Para a marcação das células, foram adicionados a microtubos (Eppendorf, USA) $3,5 \times 10^{12}$ de PQs, equivalente a 350 µL suspensão de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizadas com PEG-1000. As células foram centrifugadas para retirada do meio e ressuspensas em solução Hank's. A cada microtubo foram adicionados 250 µL de células ($0,5 \times 10^6$ células) e as amostras foram então incubadas por 30 minutos a 28°C. As amostras foram observadas por microscopia confocal a laser, utilizando o microscópio *Leica SPII-AOBS*, localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) no comprimento de excitação de 458 nm.

Marcação de *L. amazonensis* com PQs - Para aplicação dos PQs de CdTe/CdS sintetizadas com AMA realizamos primeiramente sucessivas lavagens com isopropanol (solvente que modifica a constante dielétrica do meio) para minimizar a dispersão de tamanho das partículas. Também foi necessário abaixar o pH da suspensão coloidal para

7,0 (pH fisiológico). Para obtenção das imagens utilizamos 250µL de células ($2,0 \times 10^5$ células/mL) e 350 µL da suspensão com PQs de CdTe/CdS (10^{16} partículas/mL). O tempo de incubação foi de aproximadamente 30 minutos. Após tempo de incubação centrifugamos (10 rpm) o material por duas vezes e o ressuspendemos com 500 µL de solução Hank's.

Para aplicações dos PQs de CdTe/CdS com AMS inicialmente ajustamos o pH para 8,0. Utilizamos 100 µL do meio com células ($2,0 \times 10^5$ células/mL) e 300 µL da suspensão com PQs ($\sim 10^{16}$ partículas/mL). Deixamos o sistema incubando por 1 hora e 30 minutos a 25°C. Para realização da análise, colocou-se 20 µL da amostra em placa de cultivo (*MatTek*). As amostras foram observadas por microscopia confocal a laser, utilizando o microscópio *Leica SPII-AOBS*, localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) no comprimento de excitação de 488 nm.

5.2.3 Análise da toxicidade dos pontos quânticos

Curva de crescimento – Antes da incubação com PQs, obtivemos curvas de crescimento dos parasitas para avaliação do crescimento destes em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). O crescimento dos parasitas, mantidos à 37°C, foi avaliado por contagem de alíquotas de 10 µL de cultura diluída (1:10) em meio LIT. A contagem foi feita em câmara hemocitométrica de *Neubauer* utilizando um microscópio óptico comum (aumento de 400 X). Com a média aritmética das contagens, calculamos o número de parasitas contidos em 1,0 mL de cultura.

$$\mathbf{N^\circ \text{ de parasitas} = \text{média dos 4 quadrantes} \times \text{inverso da diluição da amostra} \times 10^4}$$

Antes da incubação filtramos a suspensão contendo PQs. Para análise da toxicidade dos PQs mantivemos fixa a quantidade de células $2,0 \times 10^6$ /mL por poços e variamos a quantidade de nanopartículas de CdS/Cd(OH)₂ (a) $0,5 \times 10^{13}$; (b) $2,5 \times 10^{12}$; (c) $2,5 \times 10^{11}$; (d) $2,5 \times 10^9$; (e) $2,5 \times 10^7$. Observamos o crescimento das células e realizamos contagens a cada 24 horas durante quatro dias.

5.3 Resultados e discussões

5.3.1 Ensaios de Funcionalizações/conjugações

Poli(etileno glicol) – Espectros de emissão e excitação (Figura 5.7) foram obtidos para verificar a influência do PEG na suspensão com PQs. Os picos máximos para excitação encontram-se nos seguintes comprimentos de onda: 358, 398 e 465 nm. A emissão máxima se destaca em 506 nm. O uso do PEG-1000 (0,0025 g/mL) como funcionalizante foi importante para o aumento da intensidade de emissão de 80000 para 350000. Esse aumento da intensidade de emissão, pode caracterizar a adsorção do PEG aos PQs, indicando que o polímero esteja realmente protegendo os PQs de CdS/Cd(OH)₂.

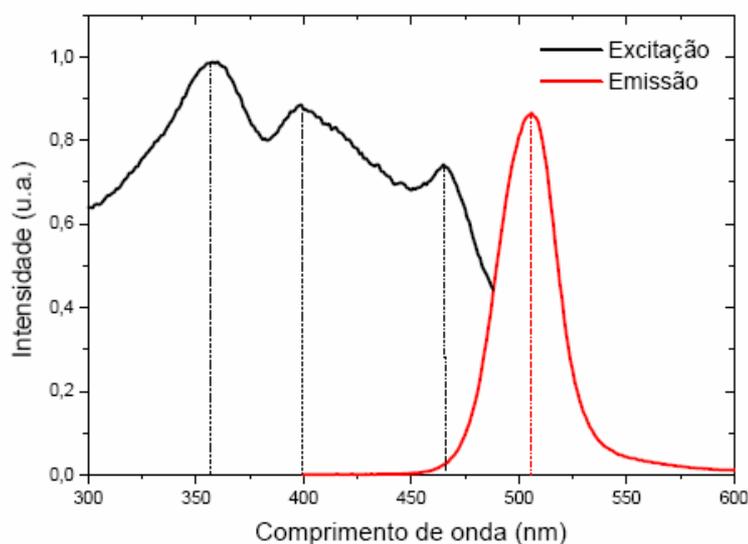


Figura 5.7: Espectros de excitação (preto) e emissão (vermelho) de PQs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizadas com PEG-1000. Intensidade máxima de emissão 350000.

Imagens por MET foram obtidas para visualizarmos o arranjo do polímero em torno das partículas (Figura 5.8). Através das imagens foi possível observar o arranjo formado pelos PQs envolvidos por um filme fino caracterizando uma camada de polímero (PEG). Observa-se que a presença do PEG deixa as partículas mais aglomeradas após processo de secagem.

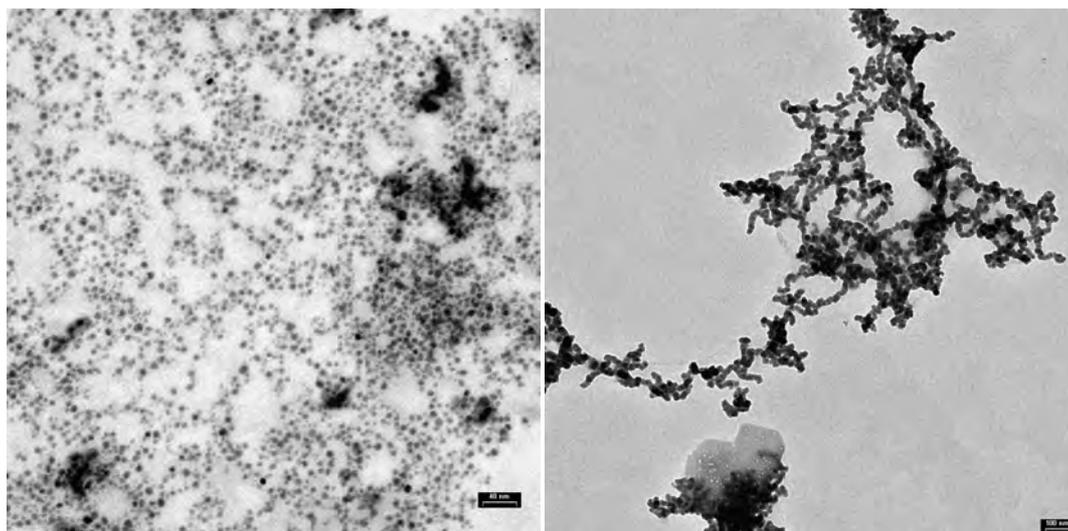


Figura 5.8: Imagens por MET de PQs de CdS/Cd(OH)₂ barra = 40 nm, (esquerda) e (b) PQs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizadas com PEG-1000, barra =100 nm (direita).

Transferrina – Quando há ligação dos PQs a proteínas observa-se um aumento da intensidade da fluorescência por fluoroimunoensaio (*Wallac 1420*). Isso indica que mesmo após o processo de lavagem as proteínas mantêm-se ligadas na placa e o sinal detectado durante a leitura está relacionado à fluorescência do PQ. Na Tabela 5.2 mostramos os resultados da leitura para cada poço seguido da média das três leituras. Resultados obtidos demonstram sucesso na bioconjugação do PQ de CdTe/CdS (AMA) com a Transferrina (V).

Tabela 5.2: Resultados do fluoroimunoensaio em placas de poliestireno. O sinal alto para CdTe/CdS (AMA) com Tf mostra que os pontos quânticos foram conjugados a proteína. Além dos sistemas testados mostramos o sinal de fluorescência (unidades arbitrárias) para os poços.

	Sistemas	Poço 1	Poço 2	Poço 3	Média
I	Transferrina (Tf)	418	443	430	430,3
II	CdS/Cd(OH) ₂	349	365	404	372,6
III	CdTe/CdS (AMA)	402	414	415	410,3
IV	CdS/Cd(OH) ₂ + Glut. +(Tf)	421	422	474	439,0
V	CdTe/CdS (AMA) + (Tf)	1270	1332	1416	1339,3

Para verificar a influência da transferrina nas suspensões de PQs de CdS/Cd(OH)₂ e CdTe/CdS obtivemos espectros de emissão (Figura 5.9).

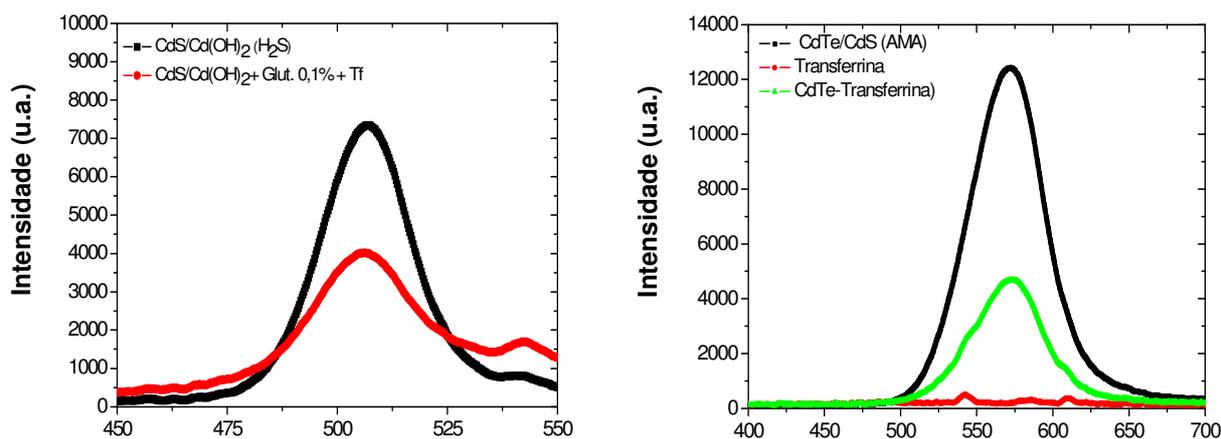


Figura 5.9: Espectro de emissão dos PQs CdS/Cd(OH)₂ (esquerda) e CdTe/CdS (AMA) (direita) e PQs após contato com transferrina (Tf).

A conjugação do PQs de CdTe/CdS (AMA) com a Transferrina foi realizada com sucesso. Observamos uma queda na intensidade da fluorescência para as duas suspensões de PQs, provavelmente devido ao ajuste do pH. Apesar disso, a fluorescência após conjugação pode ainda ser detectada pelas microscopias de fluorescência e confocal. Após tentativas de conjugação as amostras com PQs continuaram estáveis para aplicações. Com estes resultados confirmamos que a presença da transferrina não influencia significativamente a intensidade de emissão dos PQs. Com isso, destacamos a potencialidade de marcações celulares utilizando PQs via endocitose mediada por receptores de transferrina [35]. A conjugação utilizando CdS/Cd(OH)₂ não foi efetiva utilizando o protocolo proposto.

5.3.2 Ensaios de marcação biológica

Marcação de *T. cruzi* com PQs - Através destes ensaios foi possível observar uma marcação das células com PQs de CdS/Cd(OH)₂. Observamos uma marcação inespecífica do núcleo e bolsa flagelar (Figura 5.10). Imagens de formas epimastigotas obtidas por microscopia confocal e MET, mostram que os PQs entram na célula na região da bolsa flagelar e preferencialmente em toda extensão do citóstoma. A marcação desta última estrutura é bastante interessante sob o ponto de vista da biologia celular do parasita. Sabe-se que o citóstoma é uma invaginação da membrana plasmática, onde se dá a endocitose mediada por receptor de proteínas, moléculas efetoras e nutrientes. Embora não se saiba o que levou os PQs serem preferencialmente concentrados nesta região bastante especializadas, é possível que grupamentos fosfatos estejam envolvidos na interação PQ e citóstoma levando a um sequestro deste traçador nesta estrutura [34, 36].

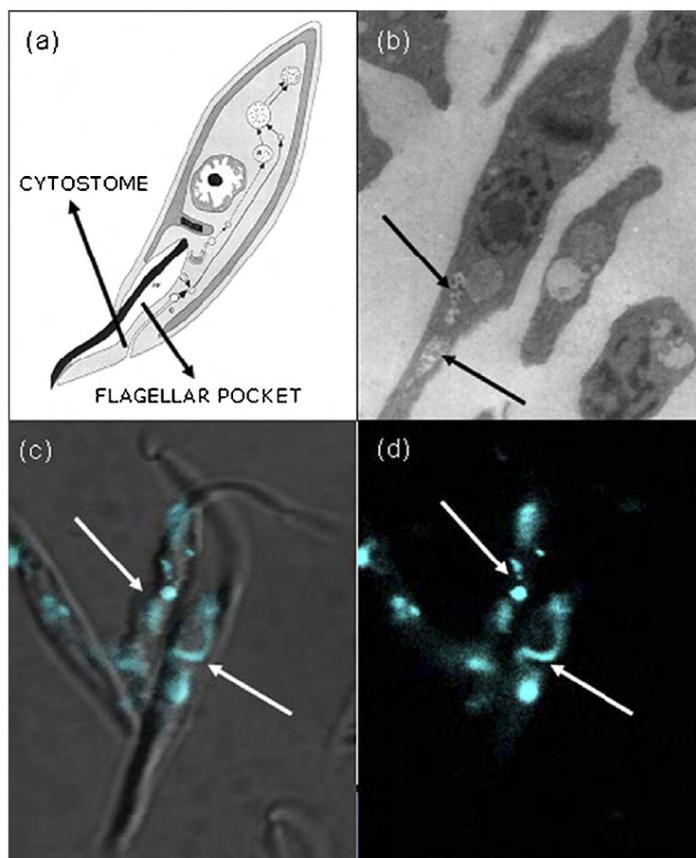


Figura 5.10: Marcação de *T. cruzi* com CdS/Cd(OH)₂ com PEG-1000 [34].

Através de MET observamos a presença dos PQs de CdS/Cd(OH)₂ com PEG nos reservosomos, os quais constituem compartimentos pré-lisosomais onde se concentram os nutrientes endocitados pelo parasita [37, 38]. Nossos resultados mostram que os PQs podem ser utilizados eficientemente como traçadores da via endocítica nestes parasitas e para complementação de estudos envolvendo processos de diferenciação celular deste [37]. Vários autores têm demonstrado a absorção de PQs através da endocitose. Como essas partículas não são degradadas elas se alojam em alguns compartimentos específicos. Também podem se ligar à superfície celular inespecificamente via interação eletrostática ou especificamente se estiverem conjugadas a proteínas [19].

Marcação de *L. amazonensis* com PQs – Ao contrário da marcação bastante específica encontrada em *T. cruzi*, a incubação de *Leishmania amazonensis* com CdTe/CdS (AMA) mostrou uma forte marcação do núcleo (Figura 5.11). Verificamos que as amostras de CdTe/CdS são compatíveis com as fontes de excitação e filtros existentes no microscópio confocal.

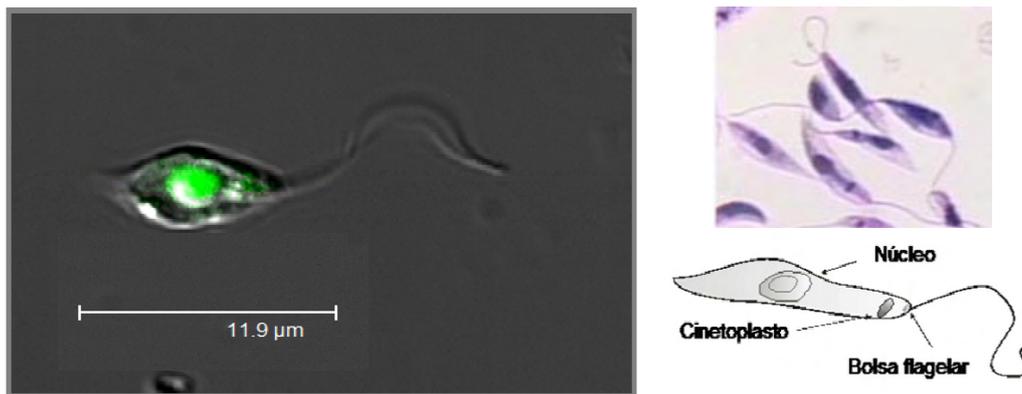


Figura 5.11: Microscopia confocal: *L. amazonensis* marcada com PQs CdTe/CdS (AMA).

Através dos resultados sugerimos que os grupamentos de ácidos carboxílicos, oriundos do emprego de ácidos alquiltióis como agentes funcionalizantes (presentes na superfície dos PQs), foram os responsáveis pela interação inespecífica com proteínas presentes nas células. O perfil de emissão apresentado na imagem (Figura 5.11) coincide com a localização do núcleo do parasita. Durante os experimentos as células continuam vivas, íntegras e com bastante movimentação. Novos experimentos serão realizados para melhor compreensão da biologia celular dos parasitas, bem como as possíveis rotas de internalização e interação dos PQs-parasitas.

Já nas imagens de *L. amazonensis* utilizando as novas suspensões de PQs de CdTe/CdS com AMS sintetizadas em PBS (Figura 5.12), observamos uma marcação diferenciada quando comparada com PQs de CdTe/CdS sintetizados com AMA, provavelmente devido ao fato do fosfato servir de nutriente para a célula. Os PQs se concentram na região do núcleo e na base de inserção do flagelo, correspondendo a bolsa flagelar. A Figura 5.11 apresenta melhor qualidade que a 5.12, pois a primeira feita por microscopia confocal e a segunda por microscopia de fluorescência convencional.



Figura 5.12: Microscopia de fluorescência convencional: *L. amazonensis* marcada com PQs CdTe/CdS (AMS) sintetizado em PBS.

5.3.3 Análise da toxicidade dos pontos quânticos

Com o intuito de verificarmos a influência dos PQs no crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*, os parasitas na fase log de crescimento foram incubados com diferentes concentrações dos PQs. Através de uma curva padrão de crescimento (Figura 5.13) observamos um crescimento rápido dos parasitas nas primeiras 48 horas de cultivo seguida de uma fase de declínio que se estende até as 96 horas de cultivo.

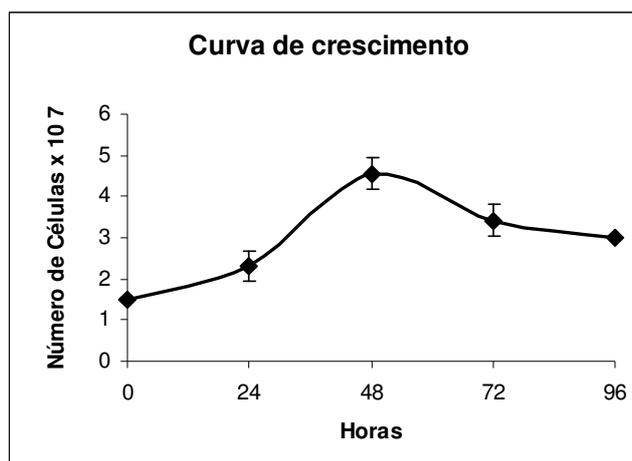


Figura 5.13: Curva de crescimento do *T. cruzi*.

Para verificar a influência dos PQs no crescimento das células obtivemos novas curvas apresentadas na Figura 5.14. Nossos resultados demonstraram que incubação com baixas concentrações de PQs ($2,5 \times 10^7$; $2,5 \times 10^9$) não afeta o crescimento dos parasitas quando comparado ao controle. Nas concentrações de ($2,5 \times 10^{11}$; $0,5 \times 10^{12}$; $0,5 \times 10^{13}$), no entanto há uma inibição significativa do crescimento. Esta inibição é mais pronunciada a partir das 48 horas de cultivo, que corresponderia a fase log de crescimento. Durante a obtenção das imagens por microscopia confocal verificamos que a quantidade de PQs de CdS/Cd(OH)₂ ($3,5 \times 10^{12}$) utilizada para marcação das células não alterou a integridade das mesmas. Vale salientar que nas imagens tínhamos PQs revestidos com PEG e que o tempo de incubação das células foi bem menor comparado aos estudos de toxicidade.

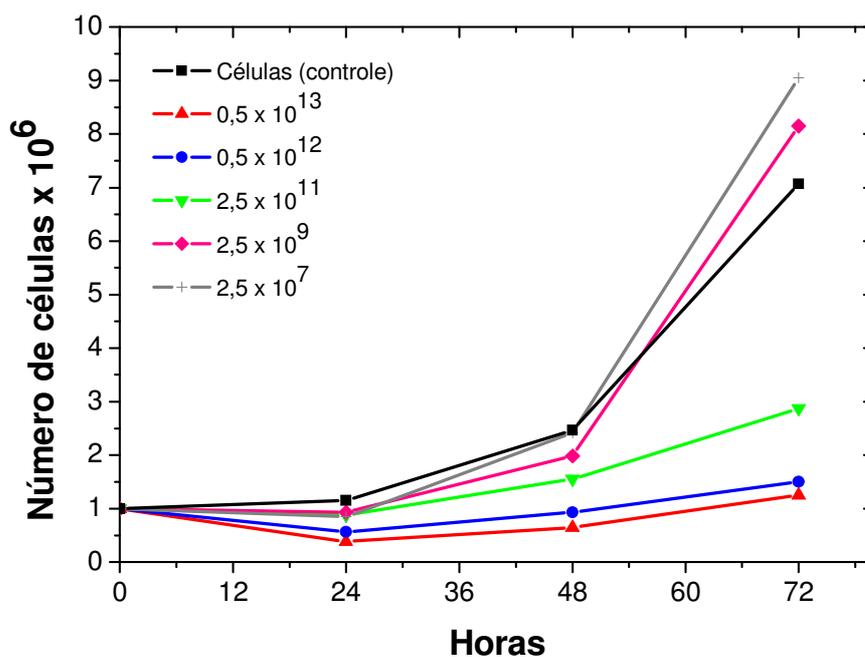


Figura 5.14: Análise da toxicidade: *T. cruzi* em contato com diferentes concentrações de PQs. Poço (1) $0,5 \times 10^{13}$; (2) $0,5 \times 10^{12}$; (3) $2,5 \times 10^{11}$; (4) $2,5 \times 10^9$ e (5) $2,5 \times 10^7$.

Com estes resultados sugerimos que tentativas de marcações seja realizadas com concentrações de PQs na faixa de $(2,5 \times 10^7 - 2,5 \times 10^9)$, para que estes não afetem o metabolismo da célula de interesse. Trabalhos destacam que PQs podem ser tóxicos para alguns tipos celulares pois metais existentes no núcleo da partícula podem interagir com as células, gerar radicais livres, causando estresse oxidativo. Através das análises de toxicidade descritas aqui, verificamos que o parasita *T. cruzi* é imune aos efeitos tóxicos dos PQs em concentrações menores que $2,5 \times 10^9$.

5.4 Conclusões

Obtivemos sucesso na conjugação dos PQs CdS/Cd(OH)₂ ao PEG-1000. Após conjugação observamos um aumento da intensidade de emissão da suspensão (80000 para 350000). Esse aumento da intensidade de emissão, pode caracterizar a adsorção do PEG aos PQs, protegendo a camada de Cd(OH)₂ que é lábil quando há alterações do meio.

A conjugação do PQs de CdTe/CdS (AMA) com a transferrina foi caracterizada com sucesso por fluoroimunoensaio. Através dos espectros de emissão observamos uma queda na intensidade da fluorescência para as duas suspensões de PQs após conjugação. Apesar disso, a fluorescência apresentada após conjugação pode ainda ser detectada pelas microscopias de fluorescência e confocal. Após conjugação as amostras com PQs continuaram estáveis para aplicações. Com estes resultados confirmamos que a presença da transferrina não influencia significativamente a intensidade de emissão dos PQs. Com isso, destacamos a potencialidade de marcações celulares utilizando PQs como marcadores de via endocítica mediada por receptores de transferrina.

Obtivemos sucesso nas marcações utilizando PQs sintetizados em meio aquoso e em solução fosfato. Observamos que após incubação com PQs, as células continuaram viáveis para análise por microscopia confocal. Com estes resultados destacamos a vantagem de um método de detecção sensível e fotoestável para acompanhar estudo de células vivas utilizando a fluorescência dos PQs. As marcações biológicas realizadas demonstraram a viabilidade de utilização dos PQs de CdTe/CdS sintetizadas tanto com AMA como AMS, inicialmente sem funcionalização, como bons marcadores biológicos.

Mostramos que PQs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizados com PEG-1000 podem ser novos marcadores da via endocítica do *T. cruzi*, via que é bastante seletiva e que não internaliza todo tipo de material. Também observamos que os PQs CdS/Cd(OH)₂ não apresentou efeito tóxico para o desenvolvimento das células quando em baixas concentrações ($2,5 \times 10^7$ – $2,5 \times 10^9$). Após 72 horas de incubação com PQs, observamos células íntregas, com bastante movimentação e ainda em processo de divisão celular.

Referências

- [1] WANG, F.; TAN, W.B.; ZHANG, Y.; FAN, X. P.; WANG, M. Q. Luminescent nanomaterials for biological labelling. *Nanotechnology*, v. 17, p. 1-13, 2006.
- [2] HAN, M. Y. GAO, X. H.; SU JZ, NIE S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol.* v. 19, 2001.
- [3] ALIVISATOS, A. P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, v. 271, p. 933-937, 1996.
- [4] ALIVISATOS, P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nature Biotechnology*, v. 22, p.47-42, 2004.
- [5] MEDINTZ, L.; UYEDA, H. T.; GOLDMAN, E. R.; MATTOUSSUI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*, v. 4, p. 435-446, 2005.
- [6] JAMIESON, T.; BAKHSHI, R.; PETROVA, D.; POCOCK, R.; IMANI, MO; SEIFALIAN, A. M. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, v. 28, p. 4717-4732, 2007.
- [7] CHAN, W. C. W.; MAXWELL, D. J.; GAO, X. H.; BAILEY, R. E.; HAN, M. Y.; NIE, S. M. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol*, v.13, 2002.
- [8] SUKHANOVA, A.; NABIE, I. Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools. *Expert Opin. Med. Diagn.*, v. 2, 2008.
- [9] SCHMID, G (Ed.). *Nanoparticles From Theory to Application*. Weinheim, WILEY VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- [10] GOLDMAN, E. R.; BALIGHIAN, E. D.; MATTOUSSI, H.; KUNO, M. K.; MAURO, J. M.; TRAN, P. T.; ANDERSON, G.P. Avidin: A natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *J Am. Chem. Soc.*, v. 124, p. 6378-6382, 2002.
- [11] SMITH. A. M.; GAO X.; NIE, S..Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging. *Photochemistry and Photobiology*, v. 80, 2004.
- [12] ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum dots as cellular probes. *Annual Review of Biomedical Engineering.*: v. 7, p. 55-76, 2005.
- [13] DAHAN, M.; LEVI, S.; LUCCARDINI, C.; ROSTAING, P.; RIVEAU, B.; TRILLER, A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science*, v. 302, 2003, p. 442-445.
- [14] GAO, X.; CUI, Y.; LEVENSON, R. M.; CHUNG, L.W.; NIE, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnol.*, v. 22, p. 969-976, 2004.
- [15] CHAVES, C. R.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; GALEMBECK, A.; FONTES. Application of core-shell pegylated CdS/Cd(OH)₂ quantum dots as biolabels of Trypanosoma cruzi parasites. *Applied Surface Science*, 2008.

- [16] PELLEGRINO, T.; PARAK, W. J.; BOUDREAU, R.; LE GROS, M. A.; GERION, D.; ALIVISATOS, A. P.; LARABELL, C. A. Quantum dot-based cell motility assay. *Differentiation*, v. 71, p. 542–548, 2003.
- [17] PARAK, W. J.; BOUDREAU, R.; LE GROS, M.; GERION, D.; ZANCHET, D.; MICHELL, C. M.; WILLIAMS, S. C.; ALIVISATOS, A. P.; LARABELL, C.. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Advanced Materials*, v. 14, 2002.
- [18] www.in-pharmatechnologist.com
- [19] HANAKI, K.; MOMO, A.; OKU, T.; KOMOTO, A.; MAENOSONO, S.; YAMAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, K. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 302, p. 496–501, 2003.
- [20] DUBERTRET, B.; SKOURIDES, P.; NORRIS, D. J.; NOIREAUX, V.; BRIVANLOU, A. H.; LIBCHABER, A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, v. 298, p. 1759-1762, 2002.
- [21] STEPHENS, D.J.; PEPPERKOK, R. The many ways to cross the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 98, p. 4295–4298, 2001
- [22] KLOEPFER, J. A.; MIELKE, R. E.; WONG, M. S.; NEALSON, K. H.; STUCKY, G.; NADEAU, J. L. Quantum Dots as Strain- and Metabolism-Specific Microbiological Labels. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p. 4205–4213, 2003.
- [23] DERFUS, A. M.; WARREN, C. W. C.; BHATIA, S. N. Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking. *Adv Mater*, v. 16, p. 961–966, 2004.
- [24] MARSH, E.W. et al., Multivalent transferrin is retained in the endocytic recycling pathway of CHO cells: A model of oligomeric protein sorting. *J. Cell Biol.*, v. 129, p. 1509, 1995.
- [25] GOMME, P. T.; MCCANN, K. B. Transferrin, structure, function and potential therapeutic actions. *Drug discovery today*, v. 10, p. 267-273, 2005.
- [26] FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Estudo dos reservosomos e da via endocítica durante o processo de diferenciação de *Trypanosoma cruzi*. *Tese de doutorado*. Fundação Oswaldo cruz: Rio de Janeiro, junho, 2000.
- [27] WENG, J. F.; REN, J. C. Luminescent quantum dots: a very attractive and promising tool in biomedicine. *Curr Med Chem.*, v. 13, p. 897-909, 2006.
- [28] LOVRIC, J.; BAZZI, H. S.; CUIE, Y.; FORTIN, G. R.A.; WINNIK, F. M.; MAYSINGER, D. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J. Mol. Med.*, v. 83, 377-385, 2005.
- [29] CHEN, F. Q.; GERION, D. Fluorescent CdSe/ZnS nanocrystal-peptide conjugates for long-term, nontoxic imaging and nuclear targeting in living cells. *Nano Lett.*, v. 4, p. 1827–1832, 2004.
- [30] SHIOHARA, A.; HOSHINO, A.; HANAKI, K.; SUZUKI, K.; YAMAMOTO K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. *Microbiol Immunol.*, v. 48, p. 669-675, 2004.
- [31] ZHANG, T.T.; STILWELL, J. L.; GERION, D.; DING, L. H., ELBOUDWAREJ, O.; COOKE, P. A. Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements. *Nano Lett.*, v. 6, p. 800-808, 2006.

- [32] BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; NETO, M. B. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2000).
- [33] DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 603-612, 2002.
- [34] CHAVES, C. R. *Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: aplicações biológicas*. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, UFPE, Recife, 2006.
- [35] XU, G.; YONG, KEN-TYE; ROY, I.; MAHAJAN, S. D.; DING, H.; SCHWARTZ, S. A.; PRASAD, P. N. Bioconjugated Quantum Rods as Targeted Probes for Efficient Transmigration Across an in Vitro Blood-Brain Barrier. *Bioconjugate Chem.*, 2008.
- [36] FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ROSA, D. S.; GOMES, T. M.; NAKASAWA, M. Reservosome: na endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. *Parasitology*, v. 129, p. 431-438, 2004.
- [37] CORREA, J. R.; ATELLA, G. C.; BATISTA, M. M.; SOARES, M.J. Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clatrin-dependent endocytosis. *Experimental Parasitology*, v. 119, p. 58-66, 2008.

6 Conclusões e Perspectivas

6.1 Conclusões e Perspectivas

Através das sínteses obtivemos pontos quânticos de CdTe/CdS com diferentes estabilizantes (AMA, AMP e AMS) com emissão do verde ao vermelho (500 – 700 nm) dependendo do estabilizante. Estudos aqui descritos sobre as metodologias de redução do telúrio e de obtenção de PQs de CdTe/CdS mostram que é viável sua síntese diretamente em meio aquoso, empregando métodos simples e de baixo custo. Os PQs obtidos mostraram propriedades estruturais e espectroscópicas semelhante aos descritos na literatura, justificando a dedicação de esforços futuros para a melhoria das metodologias empregadas.

Obtivemos sucesso nas sínteses de PQs de CdTe/CdS (AMS) em PBS. Resultados destacam que não há alterações significativas em suas propriedades óticas, o que facilitou a marcação de células.

Neste trabalho mostramos que é possível utilizar fontes mais seguras para obtenção de sulfeto além do melhoramento na reprodutibilidade das sínteses. Evidenciamos, por exemplo, sucesso nas sínteses de PQs de CdS, seguidas da passivação com Cd(OH)₂ com substituição do gás sulfídrico pela tioacetamida como fonte de íons sulfeto. Com o uso da síntese hidrotérmica assistida por microondas aprimoramos a metodologia e obtivemos PQs com largo espectro para excitação e estreito espectro de emissão com máximo em torno de 460 nm. Concluímos que com tioacetamida obtivemos partículas bem menores ($d \sim 3,0$ nm) quando comparadas às sínteses com gás sulfídrico ($d \sim 7,5$ nm).

Nossos resultados na tentativa de silanização dos PQs de CdS/Cd(OH)₂ foram bastante satisfatórios. Pelo nosso conhecimento, as metodologia aplicadas para o CdS/Cd(OH)₂ ainda não estão descritas na literatura. Os espectros de absorção revelam inicialmente que não houve alterações drásticas nas propriedades óticas do material quando silanizados com silicato de sódio. Nos espectros de emissão observamos um deslocamento do valor máximo de 496 nm para 468 nm e um alargamento do espectro para o CdS/Cd(OH)₂ puro e CdS/Cd(OH)₂ silanizado. Através de novas metodologias utilizando TEOS foi possível recobrir os PQs. Os resultados obtidos neste trabalho mostram a possibilidade de revestir PQs de CdS/Cd(OH)₂ evitando possíveis e indesejáveis interações com o meio de dispersão. Novos trabalhos serão realizados para melhoramento de suas propriedades óticas e funcionalização superficial para posteriores aplicações biológicas. Os resultados obtidos abriram perspectivas como silanizar PQs de CdSe/CdS melhorando sua fluorescência além do melhoramento na funcionalização de PQs de CdTe/CdS. A funcionalização e bioconjugação ainda constituem os maiores desafios para aplicações mais

efetivas de PQs em Ciências da Vida. A silanização, por exemplo, pode ser uma alternativa eficiente para recobrimento da superfície dos PQs para ancorar biomoléculas.

Os bons resultados obtidos com a síntese de PQs de CdTe/CdS (AMA) nos levaram a analisar a interação destes PQs com *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. As marcações biológicas realizadas demonstraram a viabilidade de utilização dos PQs de CdTe/CdS, inicialmente sem funcionalização, como bons marcadores biológicos. Imagens de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com as amostras de CdTe/CdS (AMS) em PBS foram obtidas na faixa de emissão correspondente ao vermelho com sucesso através de microscopia confocal. Também observamos uma intensa marcação no núcleo destes parasitas utilizando amostras de CdTe/CdS sintetizadas com AMP. Utilizando PQs de CdS/Cd(OH)₂ funcionalizados com PEG-1000, marcamos a via endocítica em parasitas como *T. cruzi*. Através dos testes de citotoxicidade verificamos que as células continuam íntegras quando incubadas com diferentes concentrações de PQs de CdS/Cd(OH)₂. Estes resultados explicam em parte porque os PQs interagem de forma distinta com estes parasitas. Já é conhecido na literatura que protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* não realizam endocitose clássica, mas sim enzimas digestivas são secretadas na bolsa flagelar e os nutrientes e outras moléculas são interiorizados através de difusão. Por outro lado, formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* possuem intensa atividade endocítica realizada tanto pela bolsa flagelar (pinocitose de fase fluida) como pelo citóstoma (endocitose mediada por receptor). Estas diferenças encontradas entre os dois gêneros de tripanosomatídeos podem explicar os diferentes padrões de marcação encontrados. Assim, nossos resultados refletem a necessidade de um conhecimento prévio do sistema biológico a ser estudado bem como de sua interação com os PQs. Tal interação se torna um ponto interessante devido ao tamanho dos PQs, que pode ajudar no entendimento de processos químicos e metabólicos de células vivas. Com o uso corantes convencionais isso não seria possível, pois estes, passam por difusão pela membrana celular.

Mostramos que PQs de CdS/Cd(OH)₂ podem ser novos marcadores da via endocítica do *T. cruzi*, via que é bastante seletiva e que não internaliza todo tipo de material. Em geral para marcar a via endocítica se usa nanopartículas de prata associadas à transferrina e a análise é feita por microscopia eletrônica. Nesse caso apenas os PQs com PEG foram suficientes para visualização desta via. Além de fluorescentes, os PQs são eletrodensos, permitindo comprovar a via de entrada destes marcadores.

Diante desses resultados, fica claro a potencial de aplicação de PQs sintetizados em meio aquoso como marcadores e/ou traçadores da via endocítica em parasitas. A

padronização e o aprimoramento das metodologias de síntese, passivação e bioconjugação permitirão o pleno uso destes nanomateriais em diversas áreas que vão da ciências da vida à química e física, com o benefício adicional do baixo custo de produção em relação a PQs sintetizados em meio orgânico e maior fotoestabilidade do que procedimentos realizados com fluoróforos orgânicos.

Anexos

Anexo 1: Breve descrição sobre a física do estado sólido

A Física do estado sólido é o ramo da física que trata da matéria agregada espacialmente em sua forma cristalina. Ela destaca-se pelo estudo da matéria rígida. Dizemos que um sólido é cristalino se o conhecimento das posições de uma fração pequena do número total de átomos que constituem o sólido, definindo uma célula básica permite a reconstituição das posições dos demais átomos constituintes, através da repetição dessa célula básica nas três direções espaciais.

A forma externa regular dos cristais induziu os primeiros observadores a acreditar que eles eram formados pela repetição uniforme de blocos constituintes elementares. Quando um cristal cresce em um ambiente mantido em condições físicas constantes, sua forma permanece imutável durante o crescimento, como se blocos constituintes elementares estivessem sendo empilhados continuamente.

Em uma primeira aproximação, os sólidos cristalinos podem ser vistos como materiais constituídos pela repetição infinita de uma mesma estrutura elementar. Na teoria dos sólidos cristalinos isto é chamado de aproximação do sólido perfeito. Muitas propriedades dos sólidos podem ser estudadas dentro dessa aproximação. Imperfeições da rede cristalina, tais como impurezas, vacâncias, deslocamentos etc, podem ser abordadas com pequenas correções a esta aproximação. A periodicidade dos átomos facilita a modelagem matemática das propriedades elétricas, magnéticas, ópticas e mecânicas dos sólidos^[1].

1.1 Estruturas dos sólidos

O conceito de rede de Bravais é um dos mais fundamentais na descrição de sólidos cristalinos e é usado para especificar o arranjo periódico no qual unidades elementares do cristal estão dispostas. A rede de Bravais descreve apenas a estrutura geométrica subjacente, representando cada unidade. Ela é uma rede infinita de pontos discretos com um arranjo e orientação que parece exatamente o mesmo visto de qualquer ponto ^[2].

¹ KITTEL, C. *Introdução a Física do Estado Sólido*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois, 5ª ed. 1978.

² ROMANO R. Monografia: *Estrutura e modelos de ligação química para semicondutores III-V E II-VII*. Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP, 2003.

A rede de Bravais é uma rede cristalina periódica perfeita. Ela é uma abstração matemática, constituída de pontos obtidos pela translação repetitiva dos pontos da célula unitária (Figura 1), definida por três vetores unitários a , b e c .

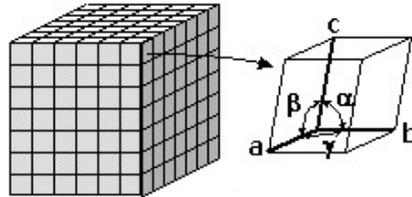


Figura 1: Esquema de célula unitária e seus vetores a , b e c [2].

Embora o número de estruturas cristalinas seja muito grande, podemos reduzi-las a 14 tipos básicos de redes em três dimensões. Estas redes são agrupadas em sete sistemas de acordo com o tipo da célula unitária (triclínico, monoclinico, ortorrômbico, tetragonal, cúbico, trigonal e hexagonal). Na Figura 1 está indicado as relações entre os ângulos α , β , γ e entre os comprimentos a , b , c das arestas da célula [3].

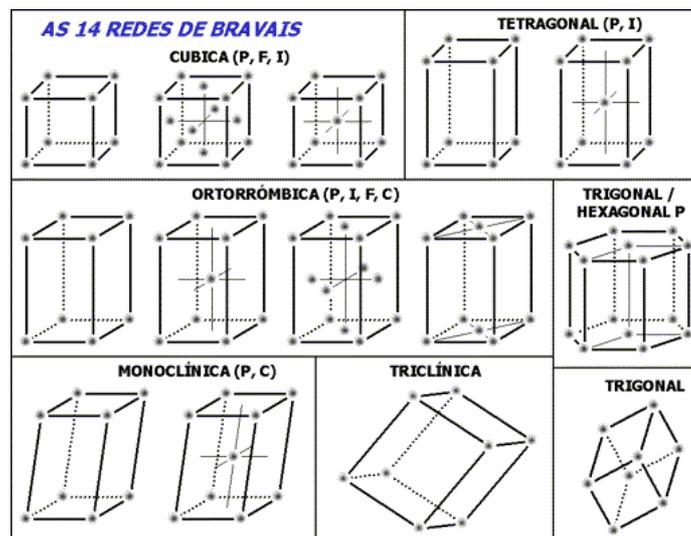


Figura 2: Células unitárias das 14 redes cristalinas básicas [3].

As redes cristalinas mostradas na Figura 2 são chamadas células convencionais. Elas são mais fáceis de serem visualizadas, mas não são necessariamente as menores que reproduzem a rede pela translação repetitiva. As menores células unitárias que reproduzem a rede são chamadas de células primitivas [1].

³ REZENDE, S. M. *Materiais e dispositivos eletrônicos*. São Paulo: Editora Livraria da Física: São Paulo, 2^a ed. 2004.

Um mesmo arranjo cristalino pode ser representado através de inúmeras células unitárias para uma rede 2D. Existem diferentes formas de obter células primitivas contendo somente um ponto da rede. Porém existe uma representação na qual a célula unitária possui o menor volume e com simetria igual ao da rede de Bravais. Esta célula unitária especial é chamada célula de Wigner-Seitz, (Figura 3). Este conceito é necessário para compreensão da formação de bandas em sólidos.

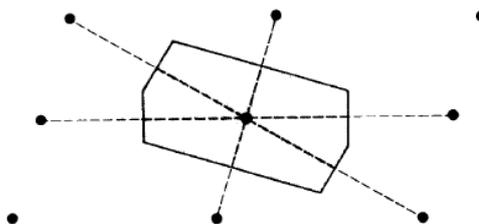


Figura 3 Célula de Wigner-Seitz para uma rede de Bravais bidimensional. A sua construção é feita da seguinte maneira: as linhas tracejadas ligam os próximos vizinhos e são cortadas ao meio na perpendicular formando assim os seis lados da célula^[4].

A células de Wigner-Seitz é uma construção geométrica que auxilia no estudo de materiais cristalinos em física de estado sólido. A célula primitiva de Wigner-Seitz é mais utilizada e a mais comum das células primitivas que tem a simetria completa da rede de Bravais.

1.2 Estrutura eletrônica

As propriedades eletrônicas, ópticas, magnéticas ou de superfície de um sólido são conseqüência da distribuição espacial dos seus elétrons. A mecânica quântica possibilita o cálculo das propriedades de qualquer molécula ou cristal a partir da equação de Schrödinger. No entanto, uma solução exata para sistemas multieletrônicos é inimaginável em virtude das dificuldades matemáticas impostas até mesmo aos mais capacitados recursos computacionais existentes. Para permitir a previsão de propriedades eletrônicas em sólidos são necessários modelos aproximados que reduzam a complexidade matemática da equação de Schrödinger. As aproximações usadas em física do estado sólido podem ser divididas em duas abordagens básicas: tratar os elétrons do sólido como ondas planas ou a partir dos orbitais atômicos de átomos isolados [2].

⁴ ASHCROFT, N. W.; MERMIN N. D. *Solid State Physics*. HRW International Editions, 1976.

Para melhor descrever estas aproximações vamos introduzir dois conceitos básicos: o elétron livre e o átomo de hidrogênio.

- O elétron livre

O estado de um elétron, ou de qualquer partícula é caracterizado por uma função de onda complexa $\Psi(r)$, que representa a probabilidade de encontrar o elétron em uma posição r . A evolução desta função de onda em um sistema físico é determinada por uma equação diferencial proposta por Schrödinger. A equação de Schrödinger exprime que a energia total de uma partícula, através de uma hamiltoniana que emprega os análogos quânticos do operador momento e operador energia atuando sobre a função de onda.

Para um elétron livre, isto é um elétron que não está sujeito a uma energia potencial ou a uma energia potencial constante, a equação de Schrödinger fornece para este elétron a função de uma onda plana (1):

$$\Psi = e^{i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} \quad (1)$$

Com energia dada por (2):

$$E = \hbar^2/2m k^2 \quad (2)$$

Onde \hbar é a constante de Planck e m a massa do elétron. Portanto, a energia é proporcional ao quadrado do módulo do vetor de onda \mathbf{k} (Figura 4) [4].

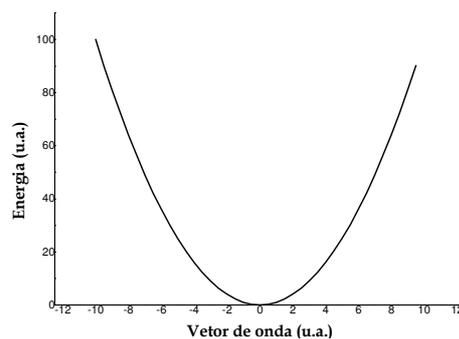


Figura 4: Energia do elétron livre em função do módulo vetor de onda.

O vetor de onda \mathbf{k} é um vetor no espaço recíproco. Desta forma, as superfícies isoenergéticas no modelo de elétrons livres são esferas centradas na origem e cujo raio ao quadrado, dado por $|\mathbf{k}|^2$, é proporcional à energia (Figura 5).

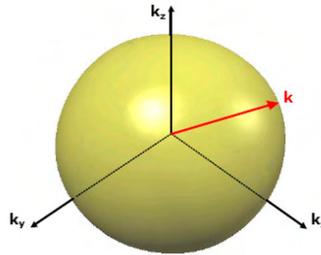


Figura 5: Superfície esférica no espaço recíproco formada por todos os possíveis vetores de onda (\mathbf{k}) [2].

• Átomo de hidrogênio

Uma das aplicações simples mais importantes da mecânica quântica é no átomo de hidrogênio. Devido a sua estrutura atômica relativamente simples, consistindo somente de um próton e um elétron, o átomo de hidrogênio pode ser resolvido exatamente pela equação de Schrödinger. Nesta seção vamos resumir as suas principais características.

O que se busca são soluções da equação de Schrödinger de um elétron sujeito a um potencial tipo lei de Coulomb gerado por um núcleo de Z prótons.

$$V(r) = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{Ze^2}{r} \quad (3)$$

Onde e é carga elementar e r a distância ao centro do núcleo.

A energia do n -ésimo nível é dada por (4):

$$E_n = -\left(\frac{Z^2\hbar^2}{2\mu a_\mu^2}\right) \frac{1}{n^2} \quad (4)$$

Onde μ é a massa reduzida do átomo dada por (5):

$$\mu = \frac{m_N m_e}{m_N + m_e} \quad (5)$$

onde m_N é massa do núcleo e m_e a massa do elétron. Na prática como a massa do núcleo é muito maior que a massa do elétron a massa reduzida é essencialmente igual à massa do elétron. O raio médio do átomo é dada por a_μ .

$$a_\mu = \frac{4\pi\epsilon_0\hbar^2}{\mu e^2} = \frac{m_e}{\mu} a_0 \quad (6)$$

Onde a_0 é o raio de Bohr.

1.3 Formação de bandas de energia

- Modelo baseado no elétron livre

No modelo do elétron livre, os orbitais atômicos são ignorados. Os elétrons, representados por suas funções de onda, movem-se livremente através do sólido experimentando um potencial eletrostático constante, por todo o seu volume. Este potencial é o termo de primeira ordem que considera os núcleos atômicos assim como os elétrons ligados a eles em suas camadas mais profundas. Para prevenir que os elétrons deixem o sólido, barreiras de potencial são impostas nas regiões superficiais dos mesmos [5].

A estrutura de bandas de um cristal pode ser descrita em uma primeira aproximação pelo modelo do elétron quase livre para o qual os elétrons das bandas são tratados como perturbados por um potencial periódico dos núcleos iônicos. Normalmente a estrutura de bandas pode ser explicada com este modelo. Ele responde a quase todas as questões qualitativas sobre o comportamento dos elétrons nos sólidos.

Agora temos um elétron representado por uma função de onda periódica que está sujeito ao potencial da rede cristalina que também é periódico. A Figura 6 mostra esquematicamente a situação que estamos discutindo para uma rede unidimensional.

⁵ SCHMID G. (Ed.). *Nanoparticles From Theory to Application*. Weinheim, WILEY VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.

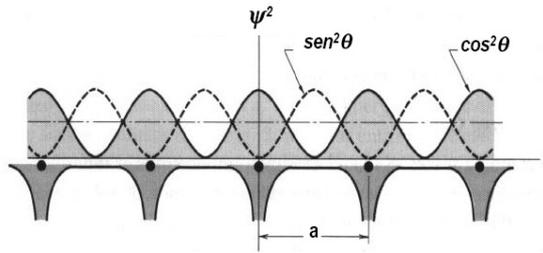


Figura 6: Representação esquemática do elétron livre sujeito a um potencial periódico cristalino unidimensional. Na parte superior da figura está mostrada a função de onda do elétron quase livre como funções de seno e cosseno. Na parte inferior o potencial cristalino com parâmetro de rede (a) [2].

A interação do elétron com potencial periódico dá origem a estados de energia proibidos. A separação entre um nível permitido e outro é chamado de *gap* de energia (Figura 7). Fisicamente, pode-se explicar a origem dos estados de energia proibidos em função da difração de Bragg. As funções com \mathbf{k} múltiplos de $\pm \pi / a$ satisfazem a condição de Bragg e, uma vez continuamente difratadas no sólido, não são propagadas pelo cristal.

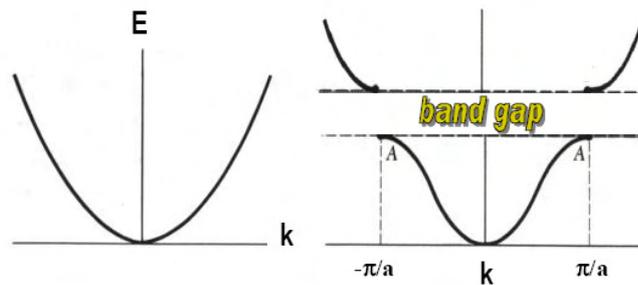


Figura 7: Curva Energia do elétron (\mathbf{k}) para o modelo de elétrons livres (esquerda) e elétron sob potencial periódico fraco (direita) mostrando a formação do gap de energia [2].

Para cada ponto da rede recíproca temos a função parabólica da energia do elétron livre. Estes níveis de energia se sobrepõem uns aos outros como mostrado na figura seguinte.

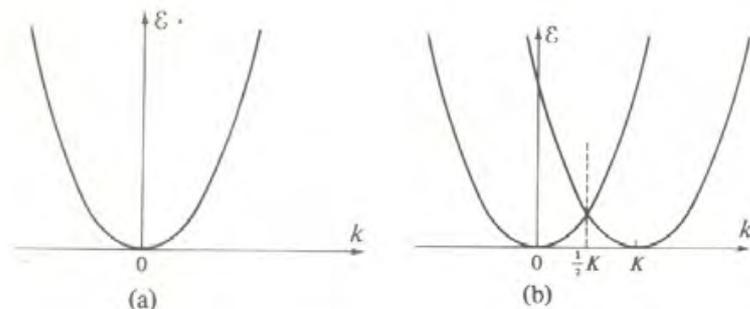


Figura 8 Superposição dos níveis de energia do elétron livre e cada ponto da rede recíproca [4].

A superposição dos níveis e a formação de *gaps* de energia dão origem a estrutura de banda no modelo do elétron quase livre. Como na rede recíproca essa banda de energia se repete exatamente para cada célula unitária podemos nos referir somente a célula central que é a Zona de Brillouin mencionada anteriormente. A Figura 9 ilustra o processo.

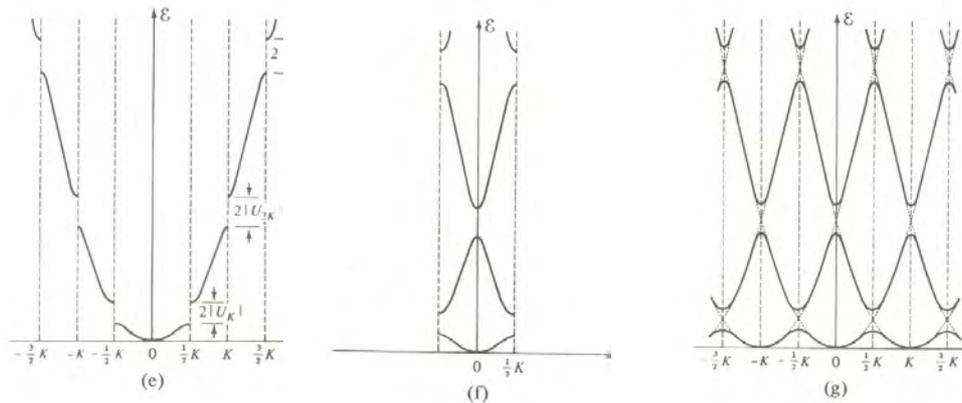


Figura 9: Formação das bandas de energia e *gaps* na rede recíproca [4].

A Figura 9 mostra a formação de bandas em uma rede unidimensional. Na rede tridimensional os parâmetros de rede não são necessariamente iguais. As bandas proibidas podem surgir para diferentes valores de \mathbf{k} .

O modelo de elétron quase livre é evidentemente uma aproximação bastante forte, como então se comparam as bandas simplificadas da Figura 9 com estruturas de bandas reais calculadas por modelos mais sofisticados?

Na Figura 10 mostramos um exemplo de bandas de energia para dois tipos de semicondutores comuns. Primeiro notamos a assimetria da estrutura de banda devido ao fato de se tratar de uma rede tridimensional. Próximo ao centro da zona de Brillouin notamos que as bandas são essencialmente parabólicas como no modelo do elétron quase livre.

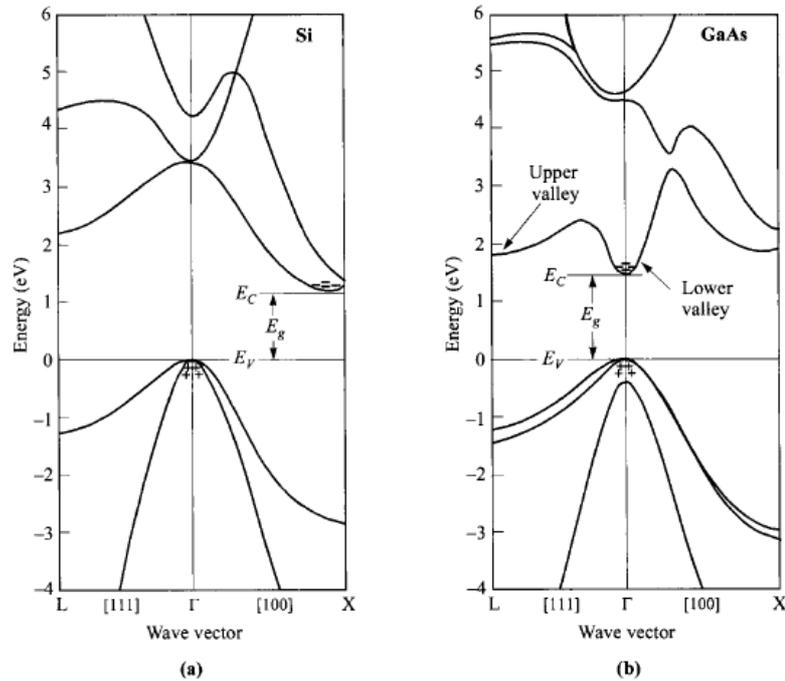


Figura 10: Bandas essencialmente parabólicas como no modelo do elétron quase livre próximo ao centro da zona de Brillouin [6].

- Modelo baseado no átomo isolado

Uma maneira alternativa de mostrar a formação de bandas de energia é através do conceito de átomo isolados. O modelo parte do princípio de que o sólido é formado a partir de um átomo isolado, para o qual as funções de onda (soluções da equação de Schrödinger) correspondem a séries de níveis discretos de energia [1]. Ao trazermos um átomo isolado para perto do outro, os níveis de energia de cada um são perturbados levemente pela presença do vizinho. E os níveis de energia destes átomos, que separados por uma grande distância eram iguais sofrem um pequeno deslocamento diferenciando-se entre si. Se aproximarmos um grande número de átomos, teremos um grande número de níveis próximos uns dos outros, formando uma banda de energia quase contínua [3].

Para uma distância infinita, os níveis de energia de estados equivalente coincidem e são iguais aos de um átomo isolado. À medida que a distância diminui, os níveis se separam devido à interação com os vizinhos, dando origem à várias bandas de energia (Figura 11).

⁶ SZE, S. M.; KWOK, K. NG. Physics of Semiconductor Devices. John Wiley & Sons, Inc. 3a ed. 2007.

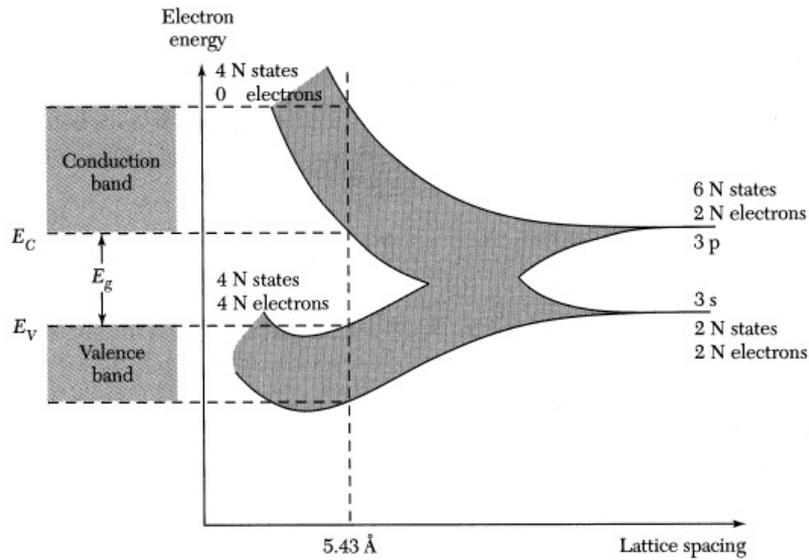


Figura 11: Formação de bandas por átomos isolados [6].

O efeito do potencial periódico sobre a distribuição energética dos elétrons livres é a separação dos estados energéticos em bandas permitidas e proibidas. Nos tópicos anteriores vimos que é a natureza ondulatória dos elétrons nos cristais que dá origem às bandas de energia.

Na Tabela 1 destacamos exemplos de alguns materiais semicondutores juntamente com valores de energia da banda proibida e Raio de Bohr do éxciton.

Material	Classificação na Tabela periódica	Energia (eV) <i>band gap</i>	Energia (nm) <i>band gap</i>	Raio Bohr Exciton (nm)	Energia ligação Exciton (nm)
CdS	II-VI	2.42	512	2.8	29
CdSe	II-VI	1.76	705	4.9	16
GaN	III-V	3.42	360	2.8	
GaP	III-V	2.26	550	10-6.5	13-20
InP	III-V	1.35	920	11.3	5.1
GaAs	III-V	1.42	870	12.5	5
AlAs	III-V	2.16	570	4.2	17
Si	IV	1.11	1150	4.3	15
Ge	IV	0.66	1880	25	3.6

Anexo 2

Detalhes da equação utilizada para cálculo do raio (a) e energia de transição (E_t) para as nanopartículas de CdTe/CdS e CdS/Cd(OH)₂:

Onde:

$$E_t = E_g + \frac{\hbar\pi^2}{2\mu a^2} \Rightarrow E_t - E_g = \frac{\hbar\pi^2}{2\mu a^2}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*}$$

$$\frac{1}{a^2} = \frac{2\mu(E_t - E_g)}{\hbar^2\pi^2}$$

$$\hbar = \frac{h}{2\pi} \Rightarrow \hbar\pi = \frac{h}{2}$$

$$\frac{1}{a} = \frac{\sqrt{2\mu(E_t - E_g)}}{\hbar\pi}$$

$$E_t = \frac{hc}{\lambda} \sim \frac{1240}{\lambda(nm)} (eV)$$

$$a = \frac{h}{2\sqrt{2\mu(E_t - E_g)}}$$

Propriedades do CdTe e CdS para o material macroscópico.

PROPRIEDADES	CdTe	CdS
Massa efetiva do elétron	$m_e = 0.11m_0$	$m_e = 0.2m_0$
Massa efetiva do buraco	$m_h = 0.35m_0$	$m_h = 0.7m_0$
Constante Dielétrica	$\epsilon = 10.9$	$\epsilon = 8.9$
Raio do Bohr do éxciton	$r_{ex} = 74 \text{ \AA}$	$r_{ex} = 30 \text{ \AA}$
Raio do Bohr do elétron	$r_e = 53 \text{ \AA}$	$r_e = 24 \text{ \AA}$
Raio do Bohr do buraco	$r_h = 17 \text{ \AA}$	$r_h = 7 \text{ \AA}$
Energia do Gap	$E_g = 1.49 \text{ eV}$	$E_g = 2.4 \text{ eV}$

Anexo 3: Limite de Tolerância para H₂S

Tabela Comparativa (Limite de Tolerância conforme NR-15)

NOME COMUM	FÓRMULA QUÍMICA	LIMITE DE TOLERÂNCIA PARA 08h TRABALHO	LIMITE PERIGOSO	CONCENTRAÇÃO LETAL
CIANETO DE HIDROGÊNIO	HCN	10ppm	150ppm/1hora	300ppm
SULFETO DE HIDROGÊNIO	H ₂ S	8ppm	250ppm/1hora	600ppm
DIÓXIDO DE ENXÔFRE	SO ₂	4ppm		1000ppm
MONÓXIDO DE CARBONO	CO	39ppm	450ppm/1hora	1000ppm
CORO	Cl ₂	0,8ppm	4ppm/1hora	1000ppm
DIÓXIDO DE CARBONO	CO ₂	3900ppm	5% (*)	10 (*)

%=10.000ppm

CONCENTRAÇÃO DE H ₂ S (PPM)	EFEITO NOS SERES HUMANOS
0,3 a 1,0	Detectável pela maioria das pessoas pelo sentido do paladar, mais que pelo odor
3 a 5	Facilmente detectável. Odor moderado
8	Inicia o processo de irritação dos olhos. Nível de exposição permissível para 8 horas de exposição
20 a 39	Odor forte e desagradável, mas não intolerável. Provoca tosse e imediata irritação dos olhos. Máxima concentração permissível para curto período de exposição (10 min por turno de 8 horas)
50	Pronunciada irritação dos olhos, garganta e pulmões, mas é possível respirar por alguns minutos
100	Tosse, irritação dos olhos, perda do olfato após 2 a 5 minutos de exposição
200	Inflamação dos olhos e irritação no sistema respiratório, após uma hora de exposição
500	Perda da consciência e possível morte em 30 minutos a uma hora
700 a 1000	Inconsciência imediata, paralisação da respiração e morte. Poderá resultar danos cerebrais permanentes.
1000 a 2000	Inconsciência instantânea, com parada respiratória e morte em poucos minutos. A morte poderá ocorrer mesmo se houver remoção para ambiente não contaminado.

Anexo 4: Artigos Publicados

Applied Surface Science xxx (2008) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc



Application of core–shell PEGylated CdS/Cd(OH)₂ quantum dots as biolabels of *Trypanosoma cruzi* parasites

C.R. Chaves^a, P.M.A. Farias^{a,b}, B.S. Santos^c, R.C.B.Q. Figueiredo^d, F.D. de Menezes^e, R.C. Ferreira^e, C.L. Cesar^f, A. Galembeck^e, A. Fontes^{b,*}

^a PPG Ciências de Materiais, CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

^b Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

^c Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

^d Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

^e Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-901, Brazil

^f Departamento de Eletrônica Quântica, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária, Campinas-SP 13083-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online xxx

PACS:

81.74.Ta

87.64.-t

87.83.+a

Keywords:

Quantum dots

Fluorescence

Parasites

Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

Semiconductor quantum dots are a promising class of materials in the labeling of biological systems. In the present study we show the marking pattern of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) live parasites using PEGylated CdS/Cd(OH)₂ fluorescent nanocrystals. The analysis obtained by confocal fluorescence microscopy and transmission electron microscopy indicates that only the endocytic paths of parasites were labeled. The parasites were alive after the incubation with the CdS/Cd(OH)₂-PEG suspension. Labeling the *T. cruzi* with quantum dots can help to better understand the endocytosis process and also the cellular differentiation.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fluorescence provides an important tool for the investigation of basic physical properties of biological structures. The high sensitivity of fluorescence, combined with the advances in analytical techniques, permits the detection of ultra-small quantities of specific species present in the biological systems. By using fluorescence microscopy, the precise location of intracellular components labeled with specific fluorophores can be monitored. There is a large number of chemical species which have been used to generate fluorescence, such as organic molecules, fluorescent proteins, metal chelators, chemi- and bioluminescent agents. All of these fluorophores present one or more of the following disadvantages: lack of brightness, broad emission bands, high photobleaching rate and high cytotoxicity.

Fluorescent semiconductor quantum dots (QDs) are a promising class of materials in the labeling of biological systems.

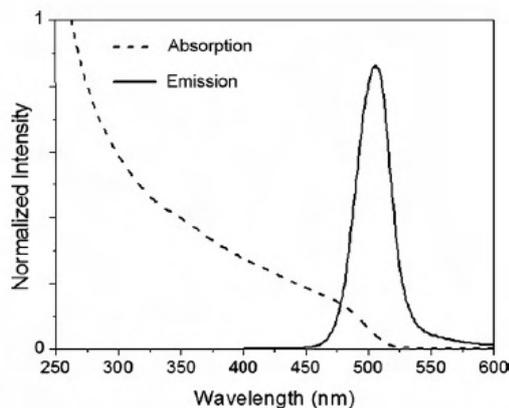


Fig. 1. Absorption and emission spectra of the CdS/Cd(OH)₂ QDs with 6 ± 1.2 nm diameter and $\lambda_{exc} = 400$ nm.

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21268535; fax: +55 81 21268560.
E-mail address: adriana.fontes@pesquisador.cnpq.br (A. Fontes).

Compared to organic fluorophores, QDs have an exceptional resistance to photodegradation, narrower luminescence spectrum with high quantum yield, broader absorption bands, larger effective Stokes shifts and higher absorption coefficients (as exemplified in Fig. 1, for CdS/Cd(OH)₂ QDs used in this work). Moreover, the QDs also show a low cytotoxicity considering the timescale generally used in the experiments. In fact, the organic dyes are very toxic to living cells and may induce the formation of free radicals during its use in photoexcitation experiments. These side molecules interfere with the normal metabolic cell functions in a short period of time. On the other hand, the QDs which contain Cd²⁺ (a heavy metal ion) will interfere with the cell metabolism when the nanoparticle eventually dissolves under enzymatic processes, which is a slow process well above the timescale used in these experiments. The highly active QDs's chemical surface also allows them to be manipulated to target specific molecules (e.g., proteins, peptides, organic and inorganic polymers, DNA, carbohydrates) in a biological system. The first biological applications

using QDs were reported in 1998 [1,2]. Since then, they have been successfully used mainly for bioimaging (using conventional or confocal fluorescence microscopy) to study cellular biology and also for optical diagnostics [3–5].

Moreover, the QDs also show a low cytotoxicity considering the. Recently some of us have reported the labeling of *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) live parasites using CdS/Cd(OH)₂ nanoparticles functionalized with polyphosphate anions and/or glutaraldehyde molecules [6]. We were able to evidenciate distinct parts of their body (the nucleus, the kinetoplast, the flagellar pocket and the cytoplasm) by a dual fluorescence emission process not yet fully understood. This observed emission pattern may suggest that the cadmium hydroxide passivation layer at physiological pH is not sufficient to preserve the expected exciton recombination processes. We believe that this labile passivation layer allows two competing processes promoting either trap deactivation emission or inducing energy transfer processes to nearby biomolecules. In another study (unpublished data) the

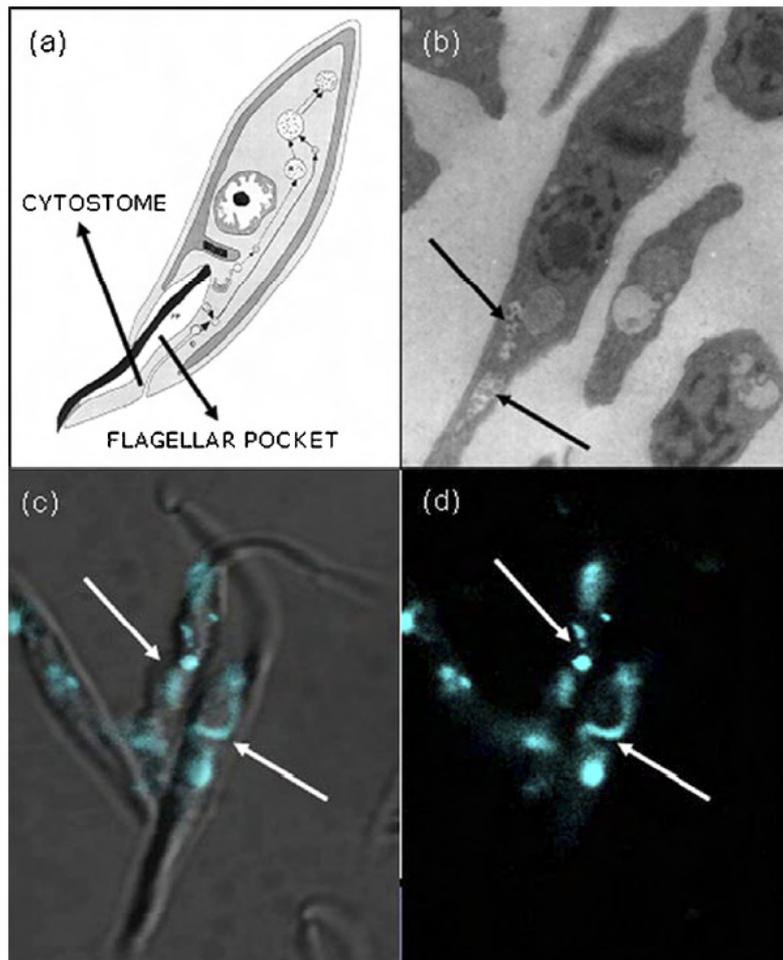


Fig. 2. (a) *T. cruzi* and its organelles. (b) TEM of *T. cruzi* parasites also labeled with CdS/Cd(OH)₂-PEG QDs. (c) Fluorescence microscopy combined with optical microscopy of *T. cruzi* parasites labeled with CdS/Cd(OH)₂-PEG QDs. (d) Fluorescence microscopy image of the labeled parasites. The $\lambda_{exc} = 458$ nm. The arrows show the cytotome and the flagellar pocket.

same QDs functionalized with glutaraldehyde molecules were used to label *T. cruzi* live parasites and a similar dual marking pattern was observed. In order to verify if this process still occurs after coating the nanoparticle's surface with poly(ethylene glycol) (PEG), we applied PEGylated CdS/Cd(OH)₂ QDs to analyse the marking pattern of *T. cruzi* live parasites. PEG is a water-soluble biocompatible polymer which possesses a low degradation rate and is commonly used to prevent the close contact of nanometric drug carrier systems to enzymes and other molecules present in the biological systems. Both *T. cruzi* and *L. amazonensis* are parasites of considerable importance in biology because they are responsible for incurable and severe diseases that infect many people in some countries of Latin America [7,8]. All evolutive forms of *T. cruzi* are capable of internalizing (or uptaking) macromolecules by endocytosis. Labeling the *T. cruzi* parasites with fluorescent QDs can help to understand the endocytosis and the cellular differentiation processes.

2. Experimental details

The nanoparticles (6 ± 1.2 nm diameter) were prepared in colloidal aqueous medium [9] adapting the procedure described by Vossmeier et al. [10]. In a typical procedure Cd(ClO)₄ and H₂S were used as the chemical precursors and sodium polyphosphate as the stabilizing agent. These nanoparticles showed a maximum in fluorescence at 506 nm with a FWHM = 50 nm. The characterization of the QDs was performed by X-ray diffraction, UV–vis spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM).

In a second step the nanoparticles were functionalized with PEG-1000 (0.0025 g/mL) in physiological medium. The PEGylation of the particles is believed to decrease the cytotoxicity of the QDs allowing *in vitro* analysis of live parasites for longer time periods. The live epimastigote *T. cruzi* parasites were incubated at room temperature with the colloidal CdS/Cd(OH)₂-PEG QDs suspension (ca. 10⁶ nanoparticles per parasite) for 180 min using Hank's solution (Invitrogen—which contains mainly potassium chloride, monobasic potassium phosphate, sodium chloride, dibasic sodium phosphate and D-glucose). The Hank's solution has physiological pH (7.5) and can keep the parasites alive. The analysis of the microorganisms was done by confocal fluorescence microscopy and TEM.

3. Results and discussion

A schematic diagram of the parasite is shown in Fig. 2(a). Fig. 2(c) shows an image of fluorescence microscopy combined with optical microscopy of *T. cruzi* parasites labeled with CdS/Cd(OH)₂-PEG QDs. Fig. 2(b) shows a TEM of *T. cruzi* parasites also labeled with these QDs. Fig. 2(d) shows only the fluorescence microscopy image of the labeled parasites. The arrows show the cystostome and the flagellar pocket.

The fluorescent analysis obtained by confocal microscopy as well as the TEM images indicate that only the flagellar pocket, the cystostome and the microtubule-supported funnel that leads to the

cystostome were labeled. These parts of the cell are specialized in the endocytosis (cell feeding) process in these parasites. This evidences that the internalization or uptake of the QDs is occurring by endocytosis. The fluorescent pattern (Fig. 2(c) and (d)) and the TEM image (Fig. 2(b)) shows that highly marking occurred at the end of the cystostome, suggesting that the nanoparticles ended up sealed into vacuoles. The images of the marked systems preserve the fluorescence emission wavelength of the original QDs suggesting that the presence of PEG at the surface of the QDs efficiently prevents competing deactivation processes.

4. Summary

The CdS QDs were successfully synthesized in aqueous medium and passivated with Cd(OH)₂. The functionalization using PEG-1000 was biocompatible and the parasites showed no signs of damage after the incubation with the CdS/Cd(OH)₂-PEG suspension. The analysis obtained by confocal microscopy and TEM indicates that only the endocytic path of parasites was labeled. Labeling the *T. cruzi* with fluorescent QDs can lead to a better comprehension of the endocytic process as well as clarify the cellular differentiation mechanism. The study of the fundamental biological processes of the *T. cruzi* parasites is important to the comprehension of the severe Chagas disease. Moreover, the images preserve the original fluorescence emission wavelength suggesting that the PEG layer protects the QDs from competing deactivation processes. The chemical and optical stability of this inorganic-organic ensemble inside the biological system shows its great potential as functional fluorescent nanoprobe.

Acknowledgements

The authors are thankful for the financial support received during the development of this work from CNPq, CAPES, Renami and Philips Corp.

References

- [1] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Science* 281 (1998) 2013.
- [2] W.C.W. Chan, S. Nie, *Science* 281 (1998) 2016.
- [3] F.F. Michalet, L.A. Pinaud, J.M. Bentolila, S. Tsay, J. Doose, J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, *Science* 307 (2005) 538.
- [4] B. Ballou, B.C. Lagerholm, L.A. Ernst, M.P. Bruchez, A.S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.* 15 (2004) 79.
- [5] P.M.A. Farias, B.S. Santos, F.D. Menezes, C.L. Cesar, A. Fontes, P.R.M. Lima, M.L. Barjas-Castro, V. Castro, R. Ferreira, *J. Microsc.* 219 (2005) 103.
- [6] B.S. Santos, P.M.A. Farias, F.D. Menezes, R. Ferreira, S. Giorgio, M.C. Bosetto, E.A. Mariano, A.A. Thomaz, A. Fontes, C.L. Cesar, *Proc. SPIE* 6097 (2006) 06.
- [7] J.C. Dias, A.C. Silveira, C.J. Schofield, The impact of Chagas disease control in Latin America: a review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97 (2002).
- [8] Z. Brener, Z.A. Andrade, M.B. Neto, *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.
- [9] D. Petrov, B.S. Santos, G.A.L. Pereira, C. de M. Donegá, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 5325.
- [10] T. Vossmeier, L. Katsikas, M. Giersig, I.G. Popovic, K. Diesner, A. Chemseddine, A. Eychmüller, H. Weller, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 7665.

Silica capped CdS/Cd(OH)₂ quantum dots for biological applications

C. R. Chaves^{*a,b}, D. B. Almeida^c, C. L. Cesar^c, A. Fontes^{a,d},
B. S. Santos^{a,e}, P. M. A. Farias^{a,b}.

^aNanoestruturas e Interfaces Biológicas Research Group, UFPE, 50740-120, Recife, PE, Brazil;

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências de Materiais, CCEN, UFPE, 50740-120, Recife, PE, Brazil;

^cInstituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil;

^dPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UFPE, 50740-120, Recife, PE, Brazil;

^eDept. Ciências Farmacêuticas, UFPE, 50740-120, Recife, PE, Brazil.

ABSTRACT

In the last few years, quantum confinement effects in semiconductor nanocrystals (quantum dots - QDs) have attracted a significant amount of interest due to their new optical properties and also because of their potential applications in biological systems. In this work, cadmium sulphide (CdS) nanoparticles were synthesized in aqueous medium and passivated with Cd(OH)₂. Polyphosphate ions were used in order to avoid particle aggregation. After the passivation step, CdS/Cd(OH)₂ quantum dots were coated with silica. Silica coating has been extensively investigated concerning its properties in biocompatibilizing QDs to biological systems. Silica coated core-shell CdS/Cd(OH)₂ water soluble QDs optical properties were studied by absorption, excitation and emission spectroscopies, while their morphological characterization was carried out by transmission electron microscopy.

Keywords: Nanocrystals, quantum dots, silica, biological systems.

1. INTRODUCTION

Nanoparticles of fluorescent semiconductor, quantum dots (QDs), are a promising class of materials in the labeling of biological systems. They have been increasingly used in biolabeling recently as their advantages over molecular fluorophores have become clear. In comparison with organic dyes and fluorescent proteins, QDs offer several unique advantages such as size and composition tunable emission from ultraviolet to infrared wavelengths, large absorption coefficients across a wide spectral range, and very high levels of brightness and photostability^{1,2}. Fluorescence provides an important tool for the investigation of basic physical properties of biological structures. The high sensitivity of fluorescence, combined with the advances in measurement techniques, permits detection of ultra small quantities of specific species present in the biological system. There is a great number of compounds used to generate fluorescence, such as organic molecules, fluorescent proteins, metal chelators, chemi- and bioluminescent agents but all of these fluorophores present one or more of the following disadvantages: lack of brightness, broad emission bands and high photobleaching rate. In spite of QDs advantages over conventional biolabels, the presence of elements such as cadmium, tellurium and selenium is still a concern and so efforts are being made in order to prevent the release of these substances in the biological media.

One solution proposed for more than two decades is silica coating. SiO₂, a biocompatible material is extremely stable and resistant in biological media, providing a good isolation between the quantum dot surface and the surrounding media³⁻⁷. Silica coating was primarily used to solubilize hydrophobic QDs. Later on the idea of encapsulating the QDs in

* *chavesechaves@gmail.com; phone 55 81 21267818*

a rigid matrix reflected the need for an improvement of their photostability and their chemical resistance to oxidation, by hindering direct chemical interactions with the biological medium. Another advantage of silica coating is that it allows further surface modification with carboxyl, thiol, amine groups and biocompatible polymeric species so that targeting biomolecules may be attached to the particles' surface.

Several procedures are described in the literature for nanoparticle's silanization process, including the Stöber based process⁸⁻¹⁰, the reverse microemulsion based method^{11,12} the surfactant templated mesoporous silica coating⁵. All these procedures depend on several steps which that seem to be difficult to control and hinder a large scale production.

In this work we report the production of silica coated core/shell CdS/Cd(OH)₂ QDs for biological applications that applies a rather easy water/ethanol synthetical procedure. In the quantum dot formation step a cadmium hydroxide shell is formed and this passivation layer should act as a surface nucleating agent, enabling the silanization process directly in the quantum dot without the need of any further surface preparation. The silanized CdS QDs (5-7 nm) were characterized by optical spectroscopies (absorption, excitation and emission) and by transmission electronic microscopy showing good emission properties potentializing its use as biocompatible fluorescent probes.

2. METHODOLOGY

The CdS/Cd(OH)₂ nanoparticles ($d = 6 \pm 1.2$ nm) were prepared in colloidal aqueous medium¹³ adapting the procedure described by Vossmeier et al¹⁴. In a typical procedure Cd(ClO)₄ and H₂S were used as chemical precursors. Due to the intrinsic thermodynamical instability of colloidal suspensions, a stabilizing agent (sodium polyphosphate) was added to the reacting system. Subsequent surface passivation with Cd(OH)₂ was carried out to improve luminescence. The silica coating methodology is adapted from procedures in the literature that mention the use of sodium silicate (NaSiO₂) as a silica coating precursor⁴. In a representative procedure we added 40 μL NaSiO₂ to 4 mL of the QDs original suspension. The final pH was 9. The system was stirred for 48 h at room temperature. After this period 600 μL of Ethanol was added to the system. Ethanol provides favorable conditions for silica precipitation. The resulting silica capped QDs were repeatedly centrifuged and rinsed with water in order to remove non reacted precursors and ethanol molecules. Figure 1 schematically illustrates the main steps involved in the synthesis of silica capped QDs.

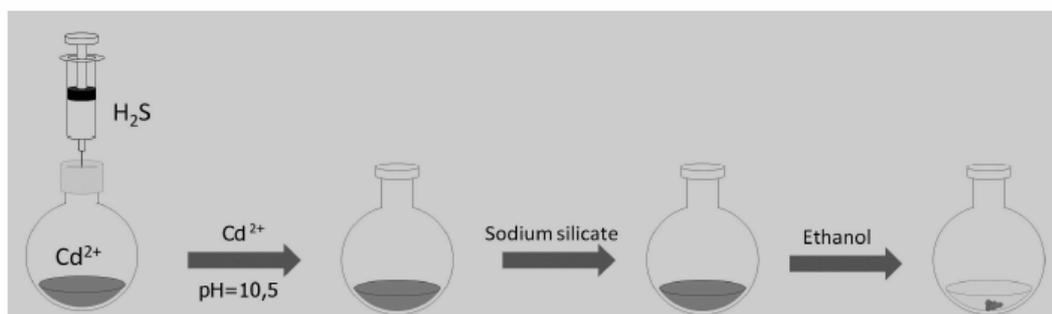


Figure 1. Illustration of CdS/Cd(OH)₂ nanocrystals synthesis and silanization process.

Absorption spectra were obtained by a HR 4000 High-Resolution Spectrometer (Ocean Optics, Florida, USA) which uses a Deuterium source. Emission spectra were obtained in a PC1 Photon Counting Spectrofluorometer (ISS, Illinois, USA) with resolution of 1.0 nm and a 300 W Xe lamp. For the structural characterization we used High Resolution Transmission Electronic Microscopy (HRTEM JEM 3010 URP) of 300kV. The samples were prepared by the deposition of the QD suspension in a carbon coated polymeric film.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The suspensions prepared are transparent in appearance and showed a temporal stability greater than 5 months without signs of coalescence or chemical degradation of the QDS. Absorption and emission spectra of CdS/Cd(OH)₂ QDs before the silanization process (control) are shown in Figure 2(a) while several aliquots of the silanized samples are shown in Figure 2(b). The size of the CdS particles was characterized previously to be around 6 nm ($d = 6 \pm 1.2$ nm). It can be observed that the original absorption threshold and first maximum peak ($\lambda_{\text{max}} = 468$ nm) are in the same position after the silica coating indicating that silanization procedure does not affect the CdS core mean size.

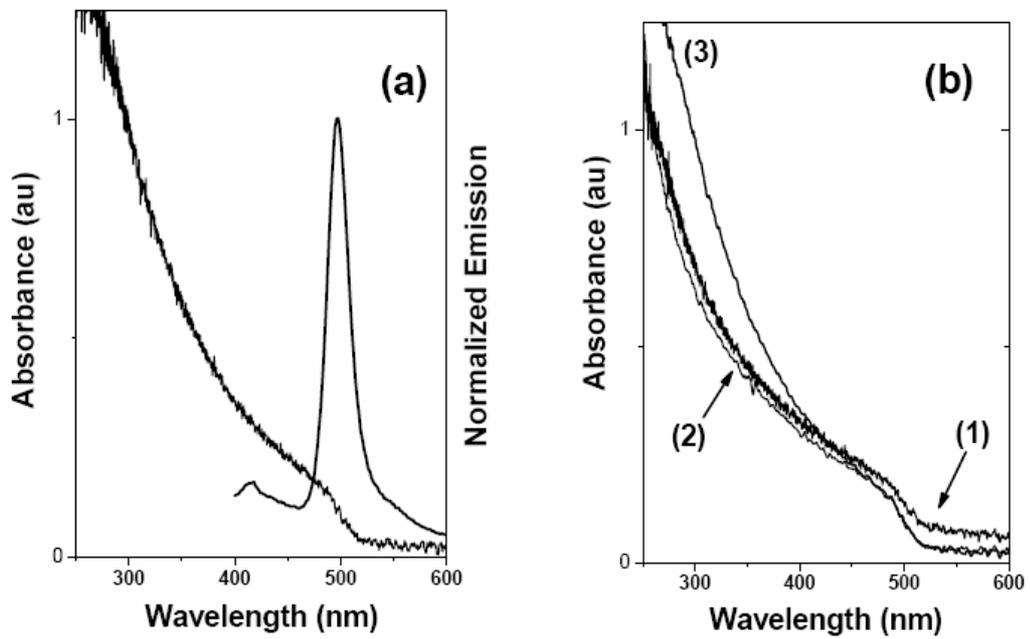


Figure 2. (a) Absorption and emission spectra ($\lambda_{\text{exc}}=365$ nm) of the CdS/Cd(OH)₂ control suspension. (b) Absorption spectra of different silanized aliquots (1) CdS/Cd(OH)₂ suspension; (2) CdS/Cd(OH)₂ + NaSiO₂ and (3) CdS/Cd(OH)₂ + excess NaSiO₂.

Emission spectra of the same sample before and after the silanization process are shown in Figure 3. Prior to the silanization the samples presented the highest emission peak at 496 nm with a FWHM = 50 nm as shown in Figure 2(a). It can be noticed that after the silanization process, the spectrum is broadened showing more than one peak with a

FWHM = 200 nm and the maximum peak ($\lambda_{max} = 465$ nm) is blue shifted. The broadening may be explained as a chemical interference of the silanization layer on the $\text{Cd}(\text{OH})_2$ passivation shell, causing an increased trap emission. As the synthetical procedure used for the preparation of the CdS nanocrystals renders a size dispersion of 15-20% this may cause different silica shell thickness for the same NaSiO_2 amount added to the systems. Moreover, we have to take into account the possibility of non-homogeneous coating of the silica shell, which could result in the overall modification of the $\text{Cd}(\text{OH})_2$ shell, resulting in the surface local depassivation.

The blue region of the emission spectrum may be associated to higher order excited bands of the CdS QDs that for an unknown reason could have been favored during the silanization process; since their size remain the same it excludes the possibility of a stronger quantum confinement effect, that would result in higher energy emission profile. The sketch of Figure 3 shows the main possible energy deactivation processes that may occur in the CdS particles, including the hypothesis pointed out. One point that must be emphasized is that in a qualitative way the emission intensity of the silanized QDs is greater than the bare QDs for the same concentration. This means that the overall energy output is increased, although not yet fully understood.

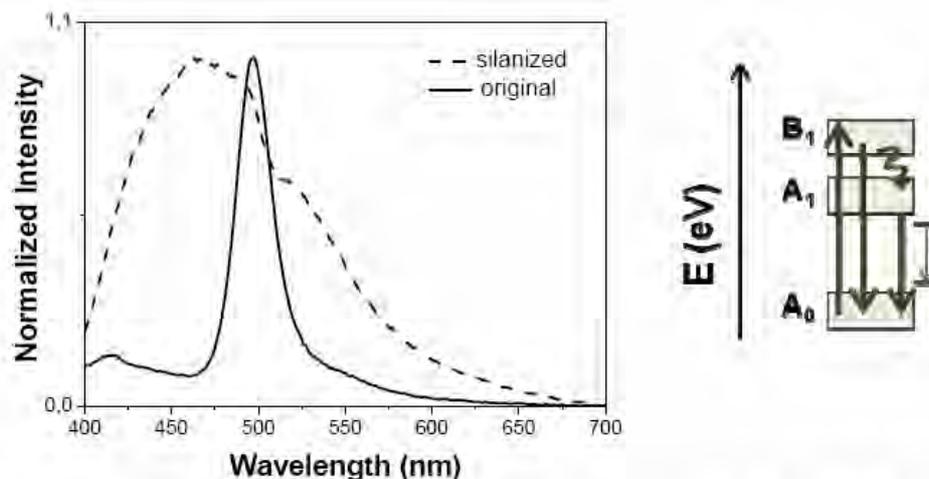


Figure 3. CdS/ $\text{Cd}(\text{OH})_2$ emission spectra prior to (solid line) and after (dashed line) silanization. $\lambda_{exc} = 365$ nm. The sketch depicts several possible decay processes for the energy deactivation arising from excitation to the two lowest energy bands (A_1 and B_1) of the silanized CdS/ $\text{Cd}(\text{OH})_2$ particles.

Figure 4 shows transmission electron microscopy (TEM) images for CdS/ $\text{Cd}(\text{OH})_2$ silanized nanocrystals. Figure 4 (a) shows several QDs in a thick silica layer (bar = 100 nm) and Figure (b e c) shows details of the nanoparticles (bar = 20 and 10 nm, respectively).

The nanocrystals are ascribed to be the more electron dense regions of the TEM images. All the images show agglomeration of the particles which is probably due by the drying process during the sample preparation for TEM. Moreover, it seems that, nevertheless the rinsing step, there is still a great excess of either unbound silica in the suspension or associated to the particles. The correct QD- NaSiO_2 ratio will be estimated with the optimization of the synthetical procedure described in this work.

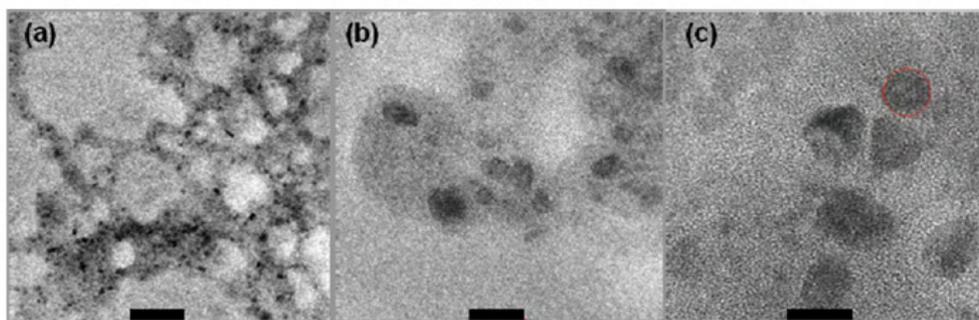


Figure 4. TEM images of CdS/Cd(OH)₂-silicized QDs. (a) Bar = 100 nm); (b) Bar = 20 nm and (c) Bar = 10 nm.

4. CONCLUSIONS

Highly fluorescent core-shell CdS/Cd(OH)₂ QDs were synthesized in aqueous medium and successfully silicized without using surface priming to oxide layer passivation. Our further efforts will be concentrated in improving QDs silicization by changing synthesis parameters such as ethanol optimal volume, as well as stoichiometric QD:silica ratio. Briefly, we presented and discussed a simple synthetic route for the obtention of CdS/Cd(OH)₂/SiO₂ QDs, that exhibit essential properties required for potential biological applications, such as high emission intensity, water solubility and biocompatibility.

REFERENCES

- [1] Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM; Doose S, Li JJ.; Sundaresan G, Wu AM; Gambhir SS, Weiss S, *Science* 307, 538–544 (2005).
- [2] Alivisatos AP, Gu WW, Larabell C, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 7, 55–76 (2005).
- [3] Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP, *Science* 281, 2013-2016 (1998).
- [4] Wolcott A, Gerion D, Visconte M, Sun J., Schwartzberg A.; Chen S, Zhang JZ, *J. Phys. Chem. B*, 110, 5779 (2006).
- [5] Hu X, Zrazhevskiy, P Gao X, *Ann. Biomed. Eng.* 37, 1960-1966 (2009).
- [6] Selvan ST, Patra PK, Ang CY, Ying JY, *Adv. Mater.* 17, 1620 (2005).
- [7] Alejandro-Arellano M, Ung T, Blanco A, Mulvaney P, Liz-Marzán LM, *Pure Appl. Chem.* 72(1-2) 257-267 (2000).
- [8] Stöber W, Fink A, Bohn E, *J. Colloid Interface Sci.* 26, 62 (1968).
- [9] Correa -Duarte, MA, Giersig, M., Liz-Marzán, LM, *Chem. Phys. Let.* 286 497-501 (1998).
- [10] Rogach AL, Nagesha D, Ostrander JW, Giersig M, Kotov NA, *Chem. Mater.* 12, 2676 (2000).
- [11] Yang Y, Jing L, Yu X, Yan D, Gao M, *Chem. Mater.* 19, 4123-4128 (2007).
- [12] Han R, Yu, M, Zheng Q, Wang L, Yuankai H, Sha Y, *Langmuir* 25(20) 12250-12255 (2009).
- [13] Petrov D, Santos BS, Pereira GAL, Donegá C de M, *J. Phys. Chem. B* 106, 5325 (2002).
- [14] Vossmeier T, Katsikas L, Giersig M, Popovic IG, Diesner K, Chemseddine A, Eychmüller A, Weller H, *J. Phys. Chem.* 98, 7665 (1994).