

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

**ANA VALÉRIA SANTOS DE LOURENÇO**

**Partículas de sílica funcionalizadas contendo  
complexos de TR<sup>3+</sup> para aplicação como  
marcadores em ensaios biológicos**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
14/07/2010

ANA VALÉRIA SANTOS DE LOURENÇO

**Partículas de sílica funcionalizadas contendo  
complexos de TR<sup>3+</sup> para aplicação como  
marcadores em ensaios biológicos**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Química (Química  
Inorgânica)*

*Orientador: Prof. Dr. Hermi Felinto de Brito*

São Paulo  
2010

Ana Valéria Santos de Lourenço

Partículas de sílica funcionalizadas contendo complexos de TR<sup>3+</sup> para aplicação como marcadores em ensaios biológicos

*Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química (Química Inorgânica)*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## *in memorian*

*Ao meu inesquecível pai, Hotônio  
com amor e carinho muito especial,  
não se faz presente fisicamente, mas está em meu coração.  
Pai, esse êxito também se faz seu,  
aprendi muito com você!  
Obrigada por sempre ter dedicado sua vida por mim.  
Até um dia...*

*“...As pessoas com quem você mais se importa na vida  
são tomadas de você muito depressa,  
por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos  
com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos”*

*William Shakespeare*

## **Dedicatória**

*Minha mãe Carmen,  
minha heroína, minha encorajadora.  
Obrigada por esta conquista e por toda minha vida,*

*Meu filho Gabriel,  
você faz parte dos meus sonhos e de minha vida...  
muito bom poder dividir minhas conquistas com você  
e me fazer acreditar que tudo é possível*

*À minha querida irmã Andréia,  
nem tenho palavras para agradecer o apoio e força que sempre me dá.  
Obrigada pelo exemplo de vida e por estar sempre ao meu lado.*

*Ao meu irmão Adriano, cunhada Patrícia,  
sobrinhos Beatriz e Miguel, que acreditaram em mim.  
Mesmo longe fisicamente, sempre os senti bem perto.  
Não esquecendo, também a sobrinha Isabella.*

*Ao Júlio,  
que tem colocado muito mais amor e felicidade em minha vida,  
deixando os meus dias muito mais coloridos*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, presença constante em minha vida.

Ao Prof. Dr. Hermi Felinto de Brito pela orientação, valiosa contribuição na minha formação acadêmica, incentivo e principalmente pela confiança no desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Felinto pelas discussões e contribuições, além da amizade.

À Prof. Dra. Wanda de Oliveira pelas contribuições preciosas na minha formação.

Ao Prof. Dr. Oscar Malta pelas grandes contribuições para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Magnus Gidlung pela colaboração, apoio e valiosas discussões. À Prof. Dra. Hiro Goto, por permitir o uso de equipamentos de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Nunes pela atenção e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ercules Teotonio pela amizade e incentivo.

Às Profa. Dra. Liane Rossi e Denise de Oliveira pelas contribuições apresentadas no exame de qualificação.

Aos amigos do laboratório: Cláudia, Alessandra, Kátia, Kai, Gerson, José, Tiago, Ivan, Heliomar, Roberval, Marco e Ernesto pela amizade e incentivo diário. E, ao Lucas, que ajudou na obtenção das micrografias eletrônicas, e também pelos nossos almoços revigorantes. Lucas e Kai, obrigada pela força na elaboração da tese!

À Gabriela Tonini, Andréia, Eduardo e Francisco pela amizade e auxílio com os antígenos e anticorpos.

Às técnicas Audrey e Elaine pelo suporte e amizade. À técnica Adriana (Central Analítica) pela obtenção das micrografias eletrônicas.

À Ellen, Jacinete, Paula, Edison do IPEN pela amizade e ajuda.

À grande amiga Cláudia Akemi, por me ajudar a superar cada obstáculo e pela grande amizade e cumplicidade.

À amiga Fernanda Bombonato que dispôs de suas horas de trabalho para me ajudar em sínteses orgânicas.

Às minhas amigas Cristiane Vila, Ana Paula, Renata, Fábia, Vivian, Karina, Marli pelo carinho e compreensão. À Melissa e Andrea (minha afilhada!!) pela amizade e caminhada acadêmica...

A minha família, meu porto seguro, que incentivaram esta minha jornada e sempre estiveram interessados. Vocês foram essenciais em todos os momentos.

Ao Instituto de Química (IQ-USP) pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

Ao apoio financeiro cedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Rede de Nanotecnologia Molecular e de Interfaces RENAMI e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanotecnologia para Marcadores Integrados inctINAMI.

*"Ninguém é tão ignorante que não tenha algo a ensinar;*

*e ninguém é tão sábio que não tenha algo a aprender."*

*Blaise Pascal*

## RESUMO

Lourenço, A.V.S. **Partículas de sílica amino-funcionalizadas contendo complexos de TR<sup>3+</sup> para aplicação como marcadores em ensaios biológicos.** 2010. 210p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho apresenta o processo para obtenção de partículas de sílica amino-funcionalizadas contendo complexos de TR<sup>3+</sup> utilizando os métodos de Stöber e por micro-ondas. Os espectros de absorção no infravermelho das partículas TR-BTC-Si preparadas pelo método de micro-ondas exibiram bandas de absorção atribuídas aos modos vibracionais dos complexos TR-BTC e da rede de sílica, indicando a incorporação destes complexos na matriz SiO<sub>2</sub>. Por outro lado, os complexos Eu-(β-dicetonatos) preparados pelo método Stöber mostraram apenas as bandas atribuídas à estrutura da rede de sílica, devido à dupla camada de revestimento de sílica. As morfologias das partículas de sílica amino-funcionalizadas contendo complexos de TR<sup>3+</sup> foram visualizadas usando a técnica MEV. As diferenças nas morfologias entre o complexo precursor e o material amino-funcionalizado pode ser atribuído a presença da sílica na superfície do material. Além do mais, o método da ninidrina indicou a presença de grupos amina (-NH<sub>2</sub>) na superfície destes materiais. Os espectros de emissão dos materiais funcionalizados com os complexos de Eu<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup> apresentaram as bandas de emissão da transição intraconfiguracional dos íons Eu<sup>3+</sup> (<sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>J</sub>, J = 0-6) e Tb<sup>3+</sup> (<sup>5</sup>D<sub>4</sub>→<sup>7</sup>F<sub>J</sub>, J = 6-0), exibindo cores características de emissão vermelha e verde, respectivamente. É observado um decréscimo nos valores dos parâmetros Ω<sub>2</sub> dos materiais Eu-(β-dicetonato)-Si e Eu-BTC-Si comparados com os respectivos complexos, devido a diminuição da intensidade da transição <sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>2</sub>, indicando um maior caráter centrossimétrico. Conseqüentemente, os íons Eu<sup>3+</sup> nos materiais com sílica estão em um ambiente químico menos polarizável do que nos complexos, sugerindo uma menor contribuição do mecanismo de

acoplamento dinâmico. Os altos valores dos  $\Omega_4$  para os sistemas com sílica Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e Eu-BTC-Si comparados com os valores de  $\Omega_2$  reflete a intensidade extremamente alta da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$  observada nos espectros de emissão. Este resultado corrobora com o maior caráter centrossimétrico e evidencia a incorporação dos complexos de Eu<sup>3+</sup> na rede de sílica. Foi realizado um fluoroimunoensaio usando os compostos amino-funcionalizados, que mostraram uma luminescência e propriedades físico-químicas eficientes para atuarem como marcadores biológicos. O marcador óptico foi conjugado com o anticorpo anti-oxLDL, que se liga a um suporte específico com o antígeno oxLDL. Portanto, estes materiais são candidatos promissores para conjugação molecular em clínicas de diagnóstico.

**Palavras-chave:** Terras raras; sílica; fotoluminescência; lipoproteína de baixa densidade; ensaios biológicos; marcadores luminescentes.

## ABSTRACT

Lourenço, A.V.S. **Amino-functionalized silica particles containing RE<sup>3+</sup> complexes for application as label in biological assays.** 2010. 210p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

This work presents the process to obtain amino-functionalized silica particles containing complexes of trivalent rare earth ions (RE<sup>3+</sup>) using Stöber and microwave methods. Infrared spectra of the TR-BTC-Si particles prepared by microwave method exhibited absorption bands assigned to the vibrational modes of the TR-BTC complexes and silica network, indicating that the complexes have been incorporated in the SiO<sub>2</sub> matrix. However, due to double coating of the silica network, the IR spectra of the Eu-(β-diketonates) complexes prepared by Stöber method showed only bands assigned to the silica structure. The morphologies of the amino-functionalized silica particles containing RE<sup>3+</sup> complexes were examined using SEM technique. The difference in morphology between the complex precursor and amino-functionalized material can be attributed to the silica network on the material surface. Besides, the ninhydrin method confirmed the presence of amine groups (-NH<sub>2</sub>) in the functionalized materials. The emission spectra of the functionalized materials containing Eu<sup>3+</sup> and Tb<sup>3+</sup> complexes showed the emission bands originated from the intraconfigurational transitions of the Eu<sup>3+</sup> (<sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>J</sub>, J = 0-4) and Tb<sup>3+</sup> (<sup>5</sup>D<sub>4</sub>→<sup>7</sup>F<sub>J</sub>, J = 6-0), exhibiting red and green color emission, respectively. It is observed decreasing values of experimental intensity parameters ( $\Omega_2$ ) of the Eu-(β-diketonate)-Si and Eu-BTC-Si materials when compared with the complex precursors, owing to the decreased intensity of the <sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>2</sub> transition, indicating a higher centrosymmetric character. As a result, the Eu<sup>3+</sup> ions in silica materials are located in a chemical environment less polarizable than in the complexes, suggesting a smaller contribution of dynamic coupling mechanism. On the other

hand, an abnormally high intensity of the  $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$  transition was observed, which is reflected by the high values of  $\Omega_4$  of the silica systems, Eu-( $\beta$ -diketonate)-Si and Eu-BTC-Si, compared with the  $\Omega_2$  ones. These spectroscopic data corroborate with a higher centrosymmetric character, indicating the incorporation of the Eu<sup>3+</sup> complexes in the silica network. A fluoroimmunoassay was developed using the amino-functionalized compounds that exhibit efficient luminescence and physical and chemical properties suitable for optical label. The biolabel was then chemically conjugated to anti-oxLDL antibody, which is linked in a specific support with oxLDL antigen. The result showed that it is a promising candidate for molecular conjugation in clinical diagnosis.

**Keywords:** Rare earths; silica; photoluminescence; low density lipoprotein; biological assays; luminescence markers.

## LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1.1. Diagrama de níveis de energia ilustrando os possíveis processos de transferência de energia intramolecular de compostos de coordenação de íons terras raras. As setas pontilhadas representam transferência de energia e as setas onduladas representam decaimentos não-radiativos. . . . .</p> <p>Figura 1.2. Equilibrio ceto-enólico de <math>\beta</math>-dicetonas, onde R é o grupo substituinte. . . . .</p> <p>Figura 1.3. a) Fórmulas estruturais dos ânions <math>\beta</math>-dicetonatos: acetilacetonato (ACAC) e tenoiltrifluoroacetônato (TTA) e b) anel quelato de seis membros dos complexos TR-(<math>\beta</math>-dicetonatos)<sub>n</sub> . . . . .</p> <p>Figura 1.4. Fórmulas estruturais dos ácidos H<sub>3</sub>BTC (H<sub>3</sub>EMA = ácido 1,2,3-benzenotricarboxílico, H<sub>3</sub>TLA = ácido 1,2,4-benzenotricarboxílico e H<sub>3</sub>TMA = ácido 1,3,5-benzenotricarboxílico) . . . . .</p> <p>Figura 1.5. Modos de coordenação dos complexos [TR(BTC)(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]: a) monodentada, b) bidentada tipo quelante e c) bidentada tipo ponte. . . . .</p> <p>Figura 1.6. Representação de partículas de sílica funcionalizadas com diferentes grupos, como amina, carboxila, aldeído, epóxi e tiol . . . . .</p> <p>Figura 1.7. Níveis de estrutura da proteína. . . . .</p> <p>Figura 1.8. Representação da estrutura geral de anticorpo. A região variável determina a especificidade do anticorpo. . . . .</p> <p>Figura 1.9. Ilustração das interações entre o anticorpo e o antígeno. . . . .</p> <p>Figura 1.10. Representação esquemática da LDL. . . . .</p> <p>Figura 1.11. Princípio de fluorimetria resolvida no tempo com excitação pulsada janela de contagem com retardo. . . . .</p> <p>Figura 3.1. Fluxograma da síntese dos complexos [TR(BTC)(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>] . . . . .</p> <p>Figura 3.2. Fluxograma da síntese do complexo [Eu(ACAC)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]. . . . .</p> <p>Figura 3.3. Fluxograma da síntese dos complexos [Eu(TTA)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]. . . . .</p> <p>Figura 3.4. a) Esquema da preparação de partículas de sílica incorporando o complexo <math>\beta</math>-dicetonato de Eu<sup>3+</sup> pelo método Stöber e b) amino-funcionalização das partículas. . . . .</p>	<p>39</p> <p>42</p> <p>43</p> <p>44</p> <p>44</p> <p>46</p> <p>48</p> <p>50</p> <p>51</p> <p>54</p> <p>58</p> <p>71</p> <p>72</p> <p>73</p> <p>75</p>
---	---

Figura 3.5.	Esquema da preparação de partículas funcionalizadas utilizando o método micro-ondas .....	76
Figura 3.6.	Esquema representativo da reação do marcador luminescente com a proteína BSA.....	79
Figura 3.7.	Esquema representativo da clivagem ácida do produto da reação do marcador luminescente com a proteína BSA.....	79
Figura 3.8.	Esquema representativo da reação do marcador luminescente com o glutaraldeído .....	83
Figura 3.9.	Esquema representativo da conjugação da partícula Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si-Glut com o anticorpo anti-oxLDL (Ac) .....	84
Figura 3.10.	Esquema representativo da sensibilização da placa com o antígeno oxLDL e bloqueio dos sítios remanescentes.....	85
Figura 3.11.	Esquema representativo da reação do antígeno com o anticorpo marcado.....	86
Figura 4.1.	Representação esquemática do processo para a preparação de partículas de sílica incorporando o complexo Eu-( $\beta$ -dicetonato) ( $[Eu(ACAC)_3(H_2O)_3]$ e $[Eu(TTA)_3(H_2O)_2]$ ), utilizando o método Stöber	94
Figura 4.2.	Representação esquemática da amino-funcionalização das partículas de sílica contendo o complexo Eu-( $\beta$ -dicetonato) ( $[Eu(ACAC)_3(H_2O)_3]$ e $[Eu(TTA)_3(H_2O)_2]$ ), utilizando o método Stöber.....	95
Figura 4.3.	Representação esquemática do processo para a preparação de partículas de sílica aminofuncionalizadas incorporando o complexo TR-BTC ( $[TR(EMA)(H_2O)_2]$ , $[TR(TLA)(H_2O)_4]$ e $[TR(TMA)(H_2O)_n]$ , sendo n = 6 para o íon $Eu^{3+}$ e 0 para o íon $Tb^{3+}$ , utilizando o método micro-ondas.	97
Figura 4.4.	Espectros de absorção na região do infravermelho do a) complexo Eu-ACAC, b) da partícula de sílica incorporando o complexo Eu-ACAC, c) da partícula de sílica amino-funcionalizada incorporando o complexo Eu-ACAC e d) da partícula de sílica, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	98

Figura 4.5.	Espectros de absorção na região do infravermelho do a) complexo Eu-TTA e da b) partícula de sílica amino-funcionalizada incorporando o complexo Eu-TTA, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	99
Figura 4.6.	Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Eu-EMA e b) da partícula Eu-EMA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	102
Figura 4.7.	Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Eu-TLA e b) da partícula Eu-TLA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	102
Figura 4.8.	Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Eu-TMA e b) da partícula Eu-TMA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	103
Figura 4.9.	Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Tb-EMA e b) da partícula Tb-EMA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	103
Figura 4.10.	Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Tb-TLA e b) da partícula Tb-TLA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	104
Figura 4.11.	Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Tb-TMA e b) da partícula Tb-TMA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.....	104
Figura 4.12.	Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-ACAC e b) do material Eu-ACAC-Si.....	106
Figura 4.13.	Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-TTA e b) material Eu-TTA-Si.....	106
Figura 4.14.	Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-EMA e b) material Eu-EMA-Si.....	108
Figura 4.15.	Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si.....	108

Figura 4.16. Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-TMA e b) material Eu-TMA-Si. ....	109
Figura 4.17. Difratogramas de raios X do a) complexo Tb-EMA e b) material Tb-EMA-Si. ....	109
Figura 4.18. Difratogramas de raios X do a) complexo Tb-TLA e b) material Tb-TLA-Si. ....	110
Figura 4.19. Difratogramas de raios X do a) complexo Tb-TMA e b) material Tb-TMA-Si. ....	110
Figura 4.20. Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-ACAC, b) partícula Si-Stm e do c) material Eu-ACAC-Si. ....	112
Figura 4.21. Curva termogravimétrica do a) complexo Eu-TTA, b) partícula Si-Stm e c) do material Eu-TTA-Si. ....	112
Figura 4.22. Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-EMA e b) material Eu-EMA-Si. ....	114
Figura 4.23. Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si. ....	115
Figura 4.24. Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-TMA e b) material Eu-TMA-Si. ....	115
Figura 4.25. Curvas termogravimétricas do a) complexo Tb-EMA e b) material Tb-EMA-Si. ....	116
Figura 4.26. Curvas termogravimétricas do a) complexo Tb-TLA e b) material Tb-TLA-Si. ....	117
Figura 4.27. Curvas termogravimétricas do a) complexo Tb-TMA e b) material Tb-TMA-Si. ....	117
Figura 4.28. Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-ACAC e do c) e d) partícula Eu-ACAC-Si. ....	119
Figura 4.29. Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-TTA e do c) e d) partícula Eu-TTA-Si. ....	120
Figura 4.30. Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-EMA e do c) e d) partícula Eu-EMA-Si. ....	121

Figura 4.31. Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-TLA e do c) e d) partícula Eu-TLA-Si. ....	122
Figura 4.32. Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-TMA e do c) e d) partícula Eu-TMA-Si. ....	123
Figura 4.33. Micrografia eletrônica de varredura do a) e b) complexo Tb-EMA e c) e d) partícula Tb-EMA-Si. ....	124
Figura 4.34. Micrografia eletrônica de varredura do a) e b) complexo Tb-TLA e c) e d) partícula Tb-TLA-Si. ....	125
Figura 4.35. Micrografia eletrônica de varredura do a) e b) complexo Tb-TMA e c) e d) partícula Tb-TMA-Si. ....	126
Figura 4.36. Estrutura molecular da ninidrina. ....	127
Figura 4.37. Reação da superfície da partícula amino-funcionalizada com a ninidrina. ....	128
Figura 4.38. Estrutura molecular do glutaraldeído. ....	129
Figura 4.39. Reação da partícula de sílica amino-funcionalizada com o glutaraldeído. ....	129
Figura 4.40. Esquema simplificado do processo de emissão de raios X induzidos pela colisão de partículas carregadas. ....	131
Figura 4.41. Espectros PIXE das amostras a) Eu-ACAC-Si, b) Eu-EMA-Si, c) Eu-TLA-Si e d) Eu-TMA-Si. ....	133
Figura 5.1. Espectros de excitação do a) complexo Eu-ACAC e b) material Eu-ACAC-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ . ....	143
Figura 5.2. Espectros de excitação do a) complexo Eu-TTA e b) material Eu-TTA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ . ....	144
Figura 5.3. Espectros de emissão do a) complexo Eu-ACAC e b) material Eu-ACAC-Si. Os espectros foram registrados a 77 K, sob excitação na transição $^7F_0 \rightarrow ^5L_6$ do íon Eu <sup>3+</sup> em $\lambda \cong 393$ nm. ....	146

Figura 5.4. Espectros de emissão do a) complexo Eu-TTA com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 396,8$ nm e b) material Eu-TTA-Si com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 393$ nm, ambos registrados a 77 K.....	147
Figura 5.5. Espectros de emissão do Eu-TTA-Si com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 393$ nm e com excitação monitorada na banda do ligante TTA a $\lambda = 353,6$ nm, registrados a 77 K.....	148
Figura 5.6. Espectros de excitação do a) complexo Eu-EMA e b) material Eu-EMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ .....	149
Figura 5.7. Espectros de excitação do a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ .....	150
Figura 5.8. Espectros de excitação do a) complexo Eu-TMA e b) material Eu-TMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ .....	151
Figura 5.9. Espectros de emissão do a) complexo Eu-EMA com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 394$ nm e b) material Eu-EMA-Si com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 395$ nm, ambos registrados a 77 K.....	152
Figura 5.10. Espectros de emissão do a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si, com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 393,8$ nm, ambos registrados a 77 K.....	153
Figura 5.11. Espectros de emissão do a) complexo Eu-TMA com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 393,2$ nm e b) material Eu-TMA-Si com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> a $\lambda = 395$ nm, ambos registrados a 77 K.....	154
Figura 5.12. Espectros de emissão dos sistemas a) Eu-EMA-Si, b) Eu-TLA-Si e c) Eu-TMA-Si, com excitação monitorada no íon Eu <sup>3+</sup> e na banda do ligante BTC, registrados a 77 K.....	155

Figura 5.13. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_0$ do íon Eu $^{3+}$ para a) complexo Eu-ACAC e b) material Eu-ACAC-Si, registrados a 298 K.....	157
Figura 5.14. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_0$ do íon Eu $^{3+}$ para a) complexo Eu-TTA e b) material Eu-TTA-Si, registrados a 298 K.....	157
Figura 5.15. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_0$ do íon Eu $^{3+}$ para a) complexo Eu-EMA e b) material Eu-EMA-Si, registrados a 298 K.....	158
Figura 5.16. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_0$ do íon Eu $^{3+}$ para a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si, registrados a 298 K.....	158
Figura 5.17. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_0$ do íon Eu $^{3+}$ para a) complexo Eu-TMA e b) material Eu-TMA-Si, registrados a 298 K.....	158
Figura 5.18. Espectros de excitação do complexo a) Tb-EMA e b) do material Tb-EMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ do íon a 545 nm.....	164
Figura 5.19. Espectros de excitação do complexo a) Tb-TLA e b) do material do Tb-TLA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ do íon Tb $^{3+}$ .....	165
Figura 5.20. Espectro de excitação do complexo a) Tb-TMA e b) do material Tb-TMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ do íon Tb $^{3+}$ .....	166
Figura 5.21. Espectro de emissão do complexo a) Tb-EMA e b) do material Tb-EMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição $^7F_6 \rightarrow ^5G_6$ do íon Tb $^{3+}$ . A figura inserida mostra o espectro ampliado na região de 640 nm a 690 nm do complexo Tb-EMA.....	167
Figura 5.22. Espectro de emissão do complexo a) Tb-TLA e b) do material Tb-TLA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição $^7F_6 \rightarrow ^5G_6$ .	168

Figura 5.23. Espectro de emissão do complexo a) Tb-TMA e b) do material Tb-TMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição $^7F_6 \rightarrow ^5G_6$ . . . . .	169
Figura 5.24. Espectros de emissão dos sistemas a) Tb-EMA-Si, b) Tb-TLA-Si e c) Tb-TMA-Si, com excitação monitorada no íon $Tb^{3+}$ e na banda do ligante BTC, registrados a 77 K. . . . .	170
Figura 5.25. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_4$ do íon $Tb^{3+}$ para a) complexo Tb-EMA e b) do material Tb-EMA-Si, registrados a 298 K. . . . .	171
Figura 5.26. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_4$ do íon $Tb^{3+}$ para a) complexo Tb-TLA e b) do material Tb-TLA-Si, registrados a 298 K. . . . .	172
Figura 5.27. Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor $^5D_4$ do íon $Tb^{3+}$ para a) complexo Tb-TMA e b) do material Tb-TMA-Si, registrados a 298 K. . . . .	172
Figura 6.1. Estrutura da proteína BSA – albumina de soro bovino. . . . .	180
Figura 6.2. Esquema representativo da imobilização da proteína BSA na partícula Eu-ACAC-Si utilizando glutaraldeído como espaçador. . . . .	181
Figura 6.3. Fórmula estrutural do ácido bicinconílico – BCA. . . . .	182
Figura 6.4. Esquema da reação para a identificação de proteínas, com a formação do complexo BCA- $Cu^+$ , de coloração roxa. . . . .	183
Figura 6.5. Fotografia da placa de poliestireno de 96 poços do ensaio para identificação da proteína BSA. Os sobrenadantes são identificados pelos círculos vermelhos, as 1ª águas de lavagem são identificadas pelos círculos azuis e as dispersões de partículas são identificados pelos retângulos brancos. A foto ampliada refere-se apenas a fileira (E), onde estão as dispersões das partículas. . . . .	184
Figura 6.6. Estrutura da enzima peroxidase de raiz forte – HRP. . . . .	186
Figura 6.7. Estrutura molecular do TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). . . . .	188
Figura 6.8. Esquema representativo da imobilização do anticorpo anti-oxLDL na partícula Eu-(β-dicetonato)-Si utilizando glutaraldeído como espaçador.	189

Figura 6.9.	Esquema representativo da redução das bases de Schiff do conjugado partícula-Glut-anti-oxLDL . . . . .	190
Figura 6.10.	Esquema representativo da imobilização da enzima HRP com o antígeno oxLDL, utilizando o espaçador glutaraldeído, e NaBH <sub>4</sub> para estabilizar as bases de Schiff . . . . .	190
Figura 6.11.	Esquema representativo da conjugação do anticorpo anti-oxLDL com o antígeno oxLDL, utilizando os sistemas oxLDL-Glut-HRP e anti-oxLDL-Glut-Eu-(β-dicetonato)-Si . . . . .	191
Figura 6.12.	Relação entre a densidade óptica (D.O.) e a concentração da enzima HRP . . . . .	192
Figura 6.13.	a) Representação da concentração da enzima HRP (U mL <sup>-1</sup> ) quantificada no sobrenadante e no sistema Eu-ACAC-Si-Glut-Ac-Ag-Glut-HRP e b) representação da concentração da enzima HRP (U mL <sup>-1</sup> ) quantificada nas três primeiras águas de lavagem . . . . .	194
Figura 6.14.	Quantificação da concentração de HRP imobilizada em função da concentração de enzima adicionada ([HRP] = 20, 50, 100, 200 e 370 U mL <sup>-1</sup> ) para o sistema utilizando o marcador Eu-ACAC-Si . . . . .	195
Figura 6.15.	Quantificação da concentração de HRP imobilizada em função da concentração de enzima adicionada ([HRP] = 20, 50, 100, 200 e 370 U mL <sup>-1</sup> ) para o sistema utilizando o marcador Eu-TTA-Si . . . . .	196
Figura 6.16.	Valores da concentração de HRP presente nas partículas Eu-ACAC-Si e Eu-TTA-Si, variando a concentração de HRP ([HRP] = 20, 50, 100, 200 e 370 U mL <sup>-1</sup> ) . . . . .	196
Figura 6.17.	Quantificação da enzima HRP em diferentes tempos de imobilização na reação para a) (Eu-ACAC-Si)-Glut-anti-oxLDL e HRP-Glut-oxLDL e b) (Eu-TTA-Si)-Glut-anti-oxLDL e HRP-Glut-oxLDL . . . . .	198
Figura 6.18.	Fotografia do fluorímetro Victor <sup>2</sup> D da Perkin Elmer . . . . .	201

Figura 6.19. Curva de calibração do imunoensaio utilizando o marcador luminescente Eu-ACAC-Si, na reação Ac-Ag. A concentração do anticorpo anti-oxLDL ligado a partícula variou de  $25 \cdot 10^{-6}$  a  $25 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>, mantendo fixa a concentração dos抗ígenos LDL e oxLDL em  $25 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>.....

202

Figura 6.20. Curva de calibração do imunoensaio utilizando o marcador luminescente Eu-ACAC-Si, na reação Ac-Ag. A concentração do抗ígeno oxLDL variou de  $25 \cdot 10^{-6}$  a  $25 \cdot 10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>, enquanto manteve-se fixa a concentração do anticorpo anti-oxLDL ligado a partícula, a)  $25 \cdot 10^{-3}$ , b)  $25 \cdot 10^{-4}$ , c)  $25 \cdot 10^{-5}$  e d)  $25 \cdot 10^{-6}$  mg mL<sup>-1</sup>.....

203

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Propriedades luminescentes dos íons terras raras trivalentes . . . . .	37
Tabela 1.2.	Energias (em $\text{cm}^{-1}$ ) dos estados $T_1$ dos complexos $[\text{Gd(ACAC)}_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ , $[\text{Gd(TTA)}_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ e $[\text{Gd(BTC)}(\text{H}_2\text{O})_n]$ (BTC = EMA, TLA e TMA), a 77 K, resolvido no tempo. . . . .	41
Tabela 3.1.	Substâncias químicas utilizadas na parte experimental. . . . .	69
Tabela 4.1.	Porcentagens de C, H e dos íons $\text{TR}^{3+}$ dos complexos sintetizado . . . . .	93
Tabela 4.2.	Atribuição das freqüências ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos principais modos vibracionais das ligações presentes nos materiais Eu-ACAC, Eu-TTA, Eu-ACAC-Si, Eu-TTA-Si, Eu-ACAC-Stm e Si-Stm. . . . .	100
Tabela 4.3.	Atribuição das freqüências ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos principais modos vibracionais dos complexos TR-BTC e dos materiais TR-BTC-Si . . . . .	105
Tabela 4.4.	Perda de massa dos complexos Eu-ACAC e Eu-TTA e dos materiais Eu-ACAC-Si e Eu-TTA-Si . . . . .	113
Tabela 4.5.	Perda de massa dos complexos Eu-BTC e dos materiais Eu-BTC-Si . . .	116
Tabela 4.6.	Perda de massa dos complexos Tb-BTC e dos materiais Tb-BTC-Si . .	118
Tabela 4.7.	Concentração de aminas primárias das partículas de sílica amino- funcionalizadas antes e após a reação com o glutaraldeído, em $\text{nmol mg}^{-1}$ , determinadas pelo método colorimétrico utilizando ninidrina. A coluna 3 apresenta a percentagem de $\text{NH}_2$ disponível para interação com o espaçador Glut. . . . .	130
Tabela 4.8.	Relação Si/Eu obtida através do espectro PIXE, após cálculos matemáticos. . . . .	134
Tabela 5.1.	Valores de tempos de vida $\tau$ (ms) dos complexos Eu-( $\beta$ -dicetonatos) e Eu-BTC e das partículas Eu-( $\beta$ -dicetonatos)-Si e Eu-BTC-Si obtidos a partir das curvas de decaimento de luminescência do nível emissor $^5\text{D}_0$ registradas a 298 K. Nota-se que as curvas de decaimento ajustadas para comportamento bi-exponencial apresentam $\tau_1$ e $\tau_2$ e tempo de vida médio ( $\tau_{\text{médio}}$ ). . . . .	159
Tabela 5.2.	Parâmetros de intensidade experimentais $\Omega_\lambda(10^{-20} \text{ cm}^{-2})$ , tempos de vida $\tau$ (ms), coeficiente de emissão radiativa $A_{\text{rad}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ), coeficiente de emissão não radiativa $A_{\text{nrad}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ), e eficiência quântica $\eta$ (%) para os complexos: Eu-( $\beta$ -dicetonatos) e Eu-BTC, e para os materiais: Eu-( $\beta$ - dicetonatos)-Si e Eu-BTC-Si. $R_{02}$ = a razão entre a intensidade das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0 / ^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ . . . . .	163

Tabela 5.3.	Tempos de vida $\tau$ (ms) dos complexos Tb-BTC e das partículas Tb-BTC-Si calculadas a partir das curvas de decaimento registradas a 298 K. A excitação foi monitorada na transição $^7F_6 \rightarrow ^5G_6$ e emissão na transição $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ .	173
Tabela 6.1.	Ensaio de identificação da presença de proteína BSA por meio do <i>kit</i> de dosagem BCA, na placa de poliestireno de 96 poços. A presença de BSA foi confirmada pelo desenvolvimento da cor roxa nas amostras contidas nos poços.	185
Tabela 6.2.	Unidades de enzima (U) quantificadas no sobrenadante e águas de lavagem, utilizando o marcador luminescente Eu-ACAC-Si.	193
Tabela 6.3.	Quantificação da concentração da enzima HRP ( $U\text{ mL}^{-1}$ ), variando a concentração da enzima na reação entre Eu- $\beta$ -dicetonato-Si-Glut-Ac e o Ag-Glut-HRP.	197
Tabela 6.4.	Quantificação da concentração da enzima HRP ( $U\text{ mL}^{-1}$ ) em função do tempo de reação entre (Eu- $\beta$ -dicetonato-Si)-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP, com concentração inicial de HRP $173,6\text{ U mL}^{-1}$	199

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TR	Terra rara
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
anti-oxLDL	Auto-anticorpo anti-LDL oxidada
Ag	Antígeno
Ac	Anticorpo
HRP	Peroxidase de raiz forte
BSA	Albumina de soro bovino
ACAC	Acetilacetonato
TTA	Tenoiltrifluoroacetonato
BTC	Benzenotricarboxilato
EMA	1,2,3-Benzenotricarboxilato
TLA	1,2,4-Benzenotricarboxilato
TMA	1,3,5-Benzenotricarboxilato
Glut	Glutaraldeído
TEOS	Tetraetilortosilicato
APTES	Aminopropiltrióxilosilano
TG	Termogravimetria
BCA	Ácido bicinconínico
PBS	Tampão de fosfato salino
$\Omega_\lambda$	Parâmetro de intensidade
$\eta$	Eficiência quântica de emissão
$\tau$	Tempo de vida do nível de emissor

## SUMÁRIO

Resumo.....	9
Abstract.....	11
Lista de Figuras.....	13
Lista de Tabelas.....	23
Lista de abreviaturas e siglas.....	25
Sumário.....	26
<b>1. Introdução .....</b>	<b>31</b>
1.1. Espectroscopia eletrônica de terras raras.....	34
1.1.1. Luminescência de terras raras.....	36
1.1.1.1. Fosforescência de complexos de Gd <sup>3+</sup> .....	40
1.2. Compostos de coordenação de terras raras.....	42
1.2.1. Complexos de β-dicetonatos de TR <sup>3+</sup> .....	42
1.2.2. Complexos benzenotricarboxilatos de TR <sup>3+</sup> .....	43
1.3. Complexos de TR <sup>3+</sup> incorporados na rede de sílica.....	45
1.4. Considerações gerais sobre proteínas e enzimas.....	47
1.5. Imunologia.....	49
1.5.1. Doença arterial coronariana.....	51
1.5.1.1. Lipoproteína de baixa densidade (LDL).....	53
1.5.2. Imunoensaios.....	56
Referências.....	59
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>67</b>
<b>3. Parte experimental.....</b>	<b>69</b>
3.1. Reagentes e solventes.....	69
3.2. Síntese dos complexos de terras raras.....	70
3.2.1. Síntese dos benzenotricarboxilatos de terras raras.....	70
3.2.2. Síntese dos β-dicetonatos de europio.....	71
3.2.2.1. Síntese do acetilacetônato de europio.....	71
3.2.2.2. Síntese do 2-tenoiltrifluoroacetônato de europio.....	73
3.3. Preparação das partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporando complexos luminescentes.....	74
3.3.1. Preparação e funcionalização das partículas de Eu-(β-dicetonatos)-Si – Método Stöber.....	74
3.3.2. Funcionalização das partículas de TR-BTC-Si – Método utilizando micro-ondas.....	75

3.4. Determinação de aminas primárias – método da ninidrina. ....	76
3.4.1. Curva de calibração do método colorimétrico. ....	77
3.4.1.1. Quantificação de aminas nas partículas. ....	77
3.5. Detecção colorimétrica de proteínas e enzimas. ....	78
3.5.1. Detecção de BSA conjugada com a partícula luminescente Eu-ACAC-Si utilizando o kit de dosagem de proteínas BCA. ....	78
3.5.1.1. Reação da partícula com BSA. ....	78
3.5.1.2. Detecção colorimétrica utilizando o <i>kit</i> BCA <sup>TM</sup> Protein Assay (Pierce) ....	80
3.5.2. Detecção de <i>horseradish peroxidase</i> utilizando TMB. ....	80
3.5.2.1. Reação da enzima HRP com o antígeno oxLDL. ....	81
3.5.2.2. Reação da partícula com o anticorpo anti-oxLDL. ....	81
3.5.2.3. Reação da HRP-Glut-oxLDL com Eu-(β-dicetonato)-Si-Glut-anti- oxLDL. ....	82
3.5.2.4. Detecção colorimétrica utilizando o substrato TMB. ....	82
3.6. Desenvolvimento do imunoensaio para determinar o antígeno oxLDL e LDL. ....	82
3.6.1. Reação da partícula com o espaçador glutaraldeído. ....	83
3.6.2. Reação com o anticorpo anti-oxLDL. ....	84
3.6.3. Sensibilização das placas com os抗ígenos oxLDL e LDL. ....	84
3.6.4. Determinação da concentração de anticorpo no sistema com Eu-(β- dicetonato)-Si-Glut-Ac. ....	85
3.7. Materiais e Métodos. ....	86
3.7.1. Titulação complexométrica. ....	86
3.7.2. Análise elementar de carbono e hidrogênio (CHN). ....	87
3.7.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV). ....	87
3.7.4. Difratometria de raios X pelo método do pó (DRX). ....	87
3.7.5. Análise Térmica. ....	87
3.7.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). ....	88
3.7.7. Emissão de Raios X induzida por partículas carregadas (PIXE). ....	88
3.7.8. Espectroscopia de luminescência. ....	88
3.7.9. Leitura de placas de 96 poços - imunoensaio. ....	89
Referências. ....	90
<b>4. Caracterização</b> ....	93
4.1. Síntese dos complexos de terras raras. ....	93
4.2. Preparação das partículas contendo os complexos de TR incorporados na sílica amino-funcionalizada. ....	94

4.2.1. Partículas de sílica amino-funcionalizadas com o complexo Eu-( $\beta$ -dicetonato): método Stöber . . . . .	94
4.2.2. Partículas de sílica amino-funcionalizadas com o complexo TR-BTC: método micro-ondas . . . . .	96
4.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho . . . . .	97
4.3.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho: partículas de sílica amino-funcionalizadas contendo complexos de TR: método Stöber . . . . .	97
4.3.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho: partículas de sílica amino-funcionalizadas contendo complexos de TR: método micro-ondas . . . . .	100
4.4. Difratometria de raios X . . . . .	105
4.4.1. Difratometria de raios X dos complexos Eu-( $\beta$ -dicetonato) e das partículas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si: método Stöber . . . . .	105
4.4.2. Difratometria de raios X dos complexos TR-BTC e das partículas TR-BTC-Si: método micro-ondas . . . . .	107
4.5. Análise Térmica . . . . .	111
4.5.1. Termogravimetria dos complexos Eu-( $\beta$ -dicetonato) e das partículas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si: método Stöber . . . . .	111
4.5.2. Termogravimetria dos complexos TR-BTC e das partículas TR-BTC-Si: método micro-ondas . . . . .	114
4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) . . . . .	118
4.7. Determinação de aminas primárias – método da ninidrina . . . . .	127
4.8. Emissão de raios X induzida por partículas carregadas (PIXE) . . . . .	131
Referências . . . . .	135
<b>5. Investigação da fotoluminescência de marcadores ópticos para ensaios biológicos . . . . .</b>	<b>140</b>
5.1. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Eu-( $\beta$ -dicetonatos) e Eu-BTC . . . . .	142
5.1.1. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Eu-( $\beta$ -dicetonatos), preparadas pelo método Stöber . . . . .	142
5.1.2. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Eu-BTC, preparadas pelo método micro-ondas . . . . .	149
5.1.3. Tempo de vida da luminescência do nível emissor $^5D_0$ ( $Eu^{3+}$ ) . . . . .	156
5.1.4. Parâmetros de intensidade experimentais . . . . .	160
5.2. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Tb-BTC, preparadas pelo método micro-ondas . . . . .	164
5.2.1. Tempo de vida de luminescência do nível emissor $^5D_4$ ( $Tb^{3+}$ ) . . . . .	171

Referências . . . . .	174
<b>6. Bioensaios com marcadores luminescentes à base de terras raras . . . . .</b>	179
6.1. Detecção colorimétrica de proteínas e enzimas . . . . .	179
6.1.1. Detecção de BSA conjugada com a partícula luminescente Eu-ACAC-Si utilizando o <i>kit</i> “comercial” de dosagem de proteína BCA . . . . .	179
6.1.2. Detecção de HRP – <i>horseradish peroxidase</i> – conjugado com o antígeno oxLDL em reação com a partícula Eu-(β-dicetonato)-Si conjugada com o anticorpo anti-oxLDL, utilizando TMB . . . . .	186
6.1.2.1. Quantificação da enzima na conjugação entre os sistemas Eu- ACAC-Si-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP . . . . .	187
6.1.2.2. Quantificação da enzima na conjugação dos sistemas Eu-(β- dicetonato)-Si-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP, variando a concentração de HRP . . . . .	194
6.1.2.3. Estudo da conjugação entre os sistemas Eu-(β-dicetonato)-Si-Glut- anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP em função do tempo . . . . .	198
6.2 Desenvolvimento do imunoensaio, para determinar o antígeno oxLDL e LDI utilizando marcador luminescente à base de terra rara . . . . .	200
Referências . . . . .	204
<b>7. Conclusão . . . . .</b>	207
7.1. Perpectivas futuras . . . . .	210
<i>Curriculum Vitae</i> . . . . .	Anexo I

# Capítulo 1

## Introdução

---

## 1. Introdução

Nas últimas décadas, as terras raras conquistaram novos campos de aplicação tecnológica. Atualmente, estes elementos contam com vários tipos de aplicações, tais como: catalisadores (no tratamento de emissões automotivas e no craqueamento do petróleo) [1]; materiais magnéticos; materiais luminescentes em amplificadores para comunicação óptica, componentes de dispositivos conversores de luz, marcadores luminescentes para bioensaios, eletroluminescência, triboluminescência e mesmo em materiais laser etc.[2-4].

As propriedades fotoluminescentes dos compostos de terras raras têm fascinado inúmeros pesquisadores, devido as suas características bandas finas de absorção e emissão. Íons terras raras trivalentes ( $\text{TR}^{3+}$ ) formam compostos com vários tipos de entidades químicas, emitindo eficientemente nas regiões espectrais: ultravioleta próximo ( $\text{Ce}^{3+}$  e  $\text{Gd}^{3+}$ ), visível (azul,  $\text{Tm}^{3+}$ ; verde,  $\text{Tb}^{3+}$  e  $\text{Er}^{3+}$ ; amarelo,  $\text{Dy}^{3+}$ ; laranja,  $\text{Sm}^{3+}$  e vermelho,  $\text{Eu}^{3+}$ ), e no infravermelho próximo ( $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$  e  $\text{Yb}^{3+}$ ) [2,5].

As terras raras (TR) compreendem de 17 elementos da tabela periódica, que envolve tanto a “série do lantâncio” que varia do elemento lantâncio ao lutécio - La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Re, Tm, Yb e Lu ( $Z = 57\text{--}71$ ) como também os elementos Y ( $Z = 39$ ) e o Sc ( $Z = 21$ ) [6]. Os estados de oxidação mais comuns dos íons terras raras são +2, +3 e +4, contudo o estado +3 é o predominante. No entanto, a configuração eletrônica dos íons terras raras trivalentes ( $\text{TR}^{3+}$ ) é representada por  $[\text{Xe}]4f^N$ , que apresenta um aumento gradual no número de elétrons N com o número atômico, variando de 0 a 14, do íon  $\text{La}^{3+}$  ( $4f^0$ ) ao  $\text{Lu}^{3+}$  ( $4f^0$ ).

Uma característica dos elementos lantanídeos ( $\text{Ln} = \text{Ce}$  ao  $\text{Lu}$ ) é a ocorrência da “contração lantanídica”, devido ao aumento da carga nuclear efetiva e, consequentemente, uma diminuição uniforme no tamanho com o aumento do número atômico [6]. Devido à esta

---

## Capítulo 1 - Introdução

particularidade, as propriedades químicas e físicas dos lantanídeos são semelhantes. Portanto, a dificuldade de separação desses elementos rotulou-se a denominação “rara”, embora a maioria das TRs seja abundante. Por exemplo, os elementos Tm e Lu são as terras raras menos abundantes na crosta terrestre com 0,5 e 0,8 ppm, respectivamente, porém, são mais abundantes do que a Ag (0,07 ppm) e o Bi (0,008 ppm) [7]. Por outro lado, o elemento Pm é um caso especial porque dentre as terras raras não ocorre na natureza e, portanto, é recuperado a partir dos subprodutos ou rejeitos da fissão de combustíveis nucleares.

Uma propriedade importante dos íons  $\text{TR}^{3+}$  é que a subcamada  $4f^N$  apresenta menor extensão de distribuição radial comparado com as subcamadas  $5s^2$  e  $5p^6$  [8]. Desta forma, os elétrons  $4f^N$  encontram-se protegidos do ambiente químico devido ao eficiente efeito de blindagem exercido pelas subcamadas  $5s^2$  e  $5p^6$ . Em particular, os espectros dos compostos contendo íons terras raras no estado sólido, ou em solução, retêm o seu caráter atômico que pode agir como sondas espectroscópicas por apresentarem bandas de emissão e absorção extremamente finas e, portanto, diferem dos metais de transição d [8,9].

Nas últimas duas décadas, a técnica de bioensaios com luminescência resolvida no tempo tem utilizado complexos de  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  em diagnósticos clínicos [10-14]. O enorme sucesso da utilização de marcadores à base de TR é a alta sensibilidade, seletividade, tempo de resposta rápida, flexibilidade e simplicidade na execução [15,16]. Recentes avanços neste campo estão no desenvolvimento de partículas incorporando complexos de TR, tais como partículas de latex, sílica, zircônia, titanato etc. [17], que combina as características ópticas dos complexos e propriedades das matrizes inorgânicas. Partículas de sílica possuem como propriedades a alta resistência, fácil dispersão em água, biocompatibilidade e atotoxicidade. Além do mais, a superfície das partículas de sílica pode ser facilmente modificada para conjugar com biomoléculas, como proteínas, peptídeos, açúcares, anticorpos etc. [10,18].

A marcação de biomoléculas com materiais luminescentes que apresentam atividades específicas tem aumentado consideravelmente, constituindo processos em escala nanométrica. A biologia molecular tem proporcionado enormes avanços em reconhecimento molecular e manipulação genética. Sensores químicos luminescentes para uso em análises quantitativas podem ser projetados com sensibilidade para detectar quantidades em escala nanomolar de espécies químicas.

Neste trabalho foram preparados marcadores luminescentes à base de íons terras raras ( $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ ), revestindo complexos com sílica aminofuncionalizada por meio de dois métodos diferentes: Stöber e micro-ondas. O estudo das propriedades fotoluminescentes destes marcadores foi baseado nas eficiências quânticas de emissão experimental ( $\eta$ ), tempos de vida dos estados emissores ( $\tau$ ), estrutura dos níveis de energia e parâmetros de intensidade ( $\Omega_\lambda$ ). Estes marcadores ópticos foram empregados em ensaios para a detecção e quantificação do antígeno lipoproteína de baixa densidade oxidada (*oxidized low density lipoprotein* - oxLDL), um dos principais responsáveis por doenças cardiovasculares acarretando aproximadamente 30% das mortes em áreas urbanas.

## 1.1. Espectroscopia eletrônica de terras raras

O *design* de complexos de TR<sup>3+</sup> que apresentam alta intensidade luminescente contendo grupos do tipo β-dicetonatos, carboxilatos, tungstatos, vanadatos, silicatos etc... vem sendo amplamente investigados dentre os compostos de terras raras. O grande interesse na pesquisa sobre as propriedades luminescentes destes compostos de coordenação é devido, principalmente, as suas aplicações em: diagnóstico médico, eletroluminescência, triboluminescência e mesmo em materiais laser. Ademais, um número expressivo de indústrias emprega marcadores ópticos à base de TRs em seus produtos, tais como: na área farmacêutica, de alimentos, de embalagens, de etiquetas, de papel de segurança, papel moeda, de entretenimento etc... Por exemplo, os marcadores luminescentes de segurança foram desenvolvidos para evitar falsificações e permitir rastreabilidade dentro da sua respectiva cadeia produtiva.

A importância da espectroscopia de luminescência dos íons TR<sup>3+</sup> está diretamente associada à exibição de bandas de emissão extremamente finas, oriundas das transições intraconfigucionais 4f-4f e tempo de vida longo, apresentando propriedades ópticas singulares. A regra de Laporte proíbe transições por dipolo elétrico entre estados de mesma paridade ( $\Delta\ell = \pm 1$ ), por exemplo as transições 4f→4f para o íon livre ( $\Delta\ell = 0$ ). Contudo, essa regra pode ser relaxada quando o sistema atômico (íon terra rara) encontra-se na presença de um campo ligante cuja simetria não apresenta centro de inversão. Isso ocorre porque, nesse caso, a distorção da simetria esférica do íon livre leva a uma mistura de configurações eletrônicas de paridades opostas (4f<sup>N</sup> e 4f<sup>N-1</sup>5d). Quando a simetria do campo ligante apresenta centro de inversão a distorção ocorre, mas não leva a mistura de estados com paridades opostas portanto, os estados resultantes continuam com paridades bem definidas e a

---

## Capítulo 1 - Introdução

regra de Laporte não é violada. Além do mais, o efeito da polarização dos ligantes tem se mostrado de grande importância para as transições 4f-4f. [9].

A luminescência originada de transições intraconfiguracionais d-d é bem diferente daquelas oriundas das transições 4f-4f. Os espectros de metais d são pobres no número de transições zero-fônon, devido as configurações  $d^N$  possuirem menos microestados do que as  $4f^N$ . A interação vibrônica d-d é muito mais forte que para o caso das transições 4f-4f. Além do mais, nos elementos de transição d a interação do campo ligante é pelo menos uma ordem de magnitude maior, devido a maior extensão de distribuição radial d e menor efeito de blindagem. Isto conduz a bandas d-d muito largas [9].

Os complexos de metais de transição d usualmente apresentam um número de coordenação menor (4 e 6) do que os elementos 4f (7 a 12). No caso dos compostos de coordenação tetraedrais a regra de Laporte é relaxada devido a misturas dos orbitais d-p, permitindo assim a transição d-d. Por outro lado, a regra de Laporte não é relaxada em complexos com simetria octaédrica, exceto para interação vibrônica que quebra instantaneamente o centro de inversão, permitindo as transições d-d com menor intensidade do que nos complexos tetraédricos.

A configuração eletrônica  $4f^N$  dos íons  $TR^{3+}$  conduz o surgimento de vários termos espectroscópicos (Tabela 1.1) cujas energias são dada na seguinte ordem de magnitude: campo central ( $10^5 \text{ cm}^{-1}$ ) > repulsão intereletrônica ( $10^4 \text{ cm}^{-1}$ ) > acoplamento spin-órbita ( $10^3 \text{ cm}^{-1}$ ) > campo ligante ( $10^2 \text{ cm}^{-1}$ ). A interação do campo ligante remove a degenerescência dos níveis  $^{2S+1}L_J$  do íon livre gerando um número de subníveis de campo ligante (níveis Stark), que dependem da simetria em torno do íon terra rara [9].

### 1.1.1. Luminescência de terras raras

De acordo com a configuração eletrônica dos íons terras raras trivalentes apresentada na [Tabela 1.1](#), as suas propriedades luminescentes podem ser classificadas em quatro grupos diferentes [9,19-21].

- O primeiro grupo são os íons que apresentam configuração com subcamada 4f cheia ou vazia. Portanto, não exibem luminescência, pois não possuem elétrons opticamente ativos:  $\text{Sc}^{3+}$  ( $3\text{d}^0$ ),  $\text{Y}^{3+}$  ( $4\text{d}^0$ ),  $\text{La}^{3+}$  ( $4\text{f}^0$ ) e  $\text{Lu}^{3+}$  ( $4\text{f}^{14}$ ).
- O segundo grupo é um caso especial, considerando que o íon  $\text{Gd}^{3+}$  possui a subcamada 4f<sup>7</sup> semipreenchida apresentando um grande *gap* de energia. Em geral, o nível emissor do íon  $\text{Gd}^{3+}$  não aceita transferência de energia do estado excitado mais alto do ligante via transferência de energia intramolecular ligante-metal.
- O terceiro grupo, compreendendo dos íons  $\text{Sm}^{3+}$  ( $4\text{f}^5$ ),  $\text{Eu}^{3+}$  ( $4\text{f}^6$ ),  $\text{Tb}^{3+}$  ( $4\text{f}^8$ ) e  $\text{Dy}^{3+}$  ( $4\text{f}^9$ ), é o que apresenta *gap* de energia relativamente grande ([Tabela 1.1](#)) entre os níveis do estado excitado e do estado fundamental. Portanto, complexos contendo estes íons apresentam uma alta intensidade na luminescência via estado tripleno do ligante para o nível emissor do íon TR<sup>3+</sup>.
- O quarto grupo é constituído dos íons:  $\text{Ce}^{3+}$  ( $4\text{f}^1$ ),  $\text{Pr}^{3+}$  ( $4\text{f}^2$ ),  $\text{Nd}^{3+}$  ( $4\text{f}^3$ ),  $\text{Ho}^{3+}$  ( $4\text{f}^{10}$ ),  $\text{Er}^{3+}$  ( $4\text{f}^{11}$ ),  $\text{Tm}^{3+}$  ( $4\text{f}^{12}$ ) e  $\text{Yb}^{3+}$  ( $4\text{f}^{13}$ ). Os seus complexos apresentam apenas fraca intensidade luminescência, devido a pequena separação dos níveis de energia entre o estado emissor e estado fundamental. Este fato favorece os processos de decaimentos não radiativos através do acoplamento com os modos vibracionais dos ligantes.

**Tabela 1.1.** Propriedades luminescentes dos íons terras raras trivalentes [12].

Elemento	Configuração TR <sup>3+</sup> (termo espectroscópico)	Raio TR <sup>3+</sup> (Å)	Transição	λ <sub>emissão</sub> (nm)	Gap de energia <sup>*</sup> (cm <sup>-1</sup> )
<sup>21</sup> Sc	[Ar]3d <sup>0</sup> ( <sup>1</sup> S <sub>0</sub> )	0.68	-	-	-
<sup>39</sup> Y	[Kr]4d <sup>0</sup> ( <sup>1</sup> S <sub>0</sub> )	0.88	-	-	-
<sup>57</sup> La	[Xe]4f <sup>0</sup> ( <sup>1</sup> S <sub>0</sub> )	1.06	-	-	-
<sup>58</sup> Ce	[Xe]4f <sup>1</sup> ( <sup>2</sup> F <sub>5/2</sub> )	1.03	5d→ <sup>2</sup> F <sub>5/2</sub>	-	-
<sup>59</sup> Pr	[Xe]4f <sup>2</sup> ( <sup>3</sup> H <sub>4</sub> )	1.01	<sup>3</sup> P <sub>0</sub> → <sup>3</sup> H <sub>6</sub> <sup>1</sup> D <sub>2</sub> → <sup>3</sup> F <sub>4</sub> <sup>1</sup> G <sub>4</sub> → <sup>3</sup> H <sub>5</sub>	610 1000 1300	3910 6940 -
<sup>60</sup> Nd	[Xe]4f <sup>3</sup> ( <sup>4</sup> I <sub>9/2</sub> )	0.99	<sup>4</sup> F <sub>3/2</sub> → <sup>4</sup> I <sub>9/2</sub>	1060	5400
<sup>61</sup> Pm	[Xe]4f <sup>4</sup> ( <sup>5</sup> I <sub>4</sub> )	0.98	<sup>5</sup> F <sub>1</sub> → <sup>5</sup> I <sub>J</sub>	-	-
<sup>62</sup> Sm	[Xe]4f <sup>5</sup> ( <sup>6</sup> H <sub>5/2</sub> )	0.96	<sup>4</sup> G <sub>5/2</sub> → <sup>6</sup> H <sub>9/2</sub>	590	7400
<sup>63</sup> Eu	[Xe]4f <sup>6</sup> ( <sup>7</sup> F <sub>0</sub> )	0.95	<sup>5</sup> D <sub>0</sub> → <sup>7</sup> F <sub>2</sub>	615	12300
<sup>64</sup> Gd	[Xe]4f <sup>7</sup> ( <sup>8</sup> S <sub>7/2</sub> )	0.94	<sup>6</sup> P <sub>7/2</sub> → <sup>8</sup> S <sub>0</sub>	311	32100
<sup>65</sup> Tb	[Xe]4f <sup>8</sup> ( <sup>7</sup> F <sub>6</sub> )	0.92	<sup>5</sup> D <sub>4</sub> → <sup>7</sup> F <sub>5</sub>	550	14800
<sup>66</sup> Dy	[Xe]4f <sup>9</sup> ( <sup>6</sup> H <sub>15/2</sub> )	0.91	<sup>4</sup> F <sub>9/2</sub> → <sup>6</sup> H <sub>13/2</sub>	570	7850
<sup>67</sup> Ho	[Xe]4f <sup>10</sup> ( <sup>5</sup> I <sub>8</sub> )	0.89	<sup>5</sup> F <sub>5</sub> → <sup>5</sup> I <sub>7,6</sub> <sup>5</sup> S <sub>2</sub> → <sup>5</sup> I <sub>8</sub>	970,1450 550	3000 2200
<sup>68</sup> Er	[Xe]4f <sup>11</sup> ( <sup>4</sup> I <sub>15/2</sub> )	0.88	<sup>4</sup> S <sub>3/2</sub> → <sup>4</sup> I <sub>15/2</sub> <sup>4</sup> I <sub>13/2</sub> → <sup>4</sup> I <sub>15/2</sub>	545 1500	3100 6500
<sup>69</sup> Tm	[Xe]4f <sup>12</sup> ( <sup>3</sup> H <sub>6</sub> )	0.87	<sup>1</sup> G <sub>4</sub> → <sup>3</sup> H <sub>6</sub>	480	6250
<sup>70</sup> Yb	[Xe]4f <sup>13</sup> ( <sup>2</sup> F <sub>7/2</sub> )	0.86	<sup>3</sup> F <sub>5/2</sub> → <sup>2</sup> F <sub>7/2</sub>	980	10250
<sup>71</sup> Lu	[Xe]4f <sup>14</sup> ( <sup>1</sup> S <sub>0</sub> )	0.85	-	-	-

\*Valores para íons aquosos.

Como descrito, as transições 4f-4f são proibidas pela regra da paridade de Laporte, seus espectros de emissão e absorção exibem fraca intensidade sob excitação monitorada nos níveis do íon TR<sup>3+</sup>, portanto apresentam baixos valores de coeficientes de absorvidade molar ( $\sim 1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). No entanto, alguns ligantes orgânicos em compostos de coordenação podem agir como uma "antena", absorvendo e transferindo energia eficientemente para o íon terra rara e, consequentemente, aumentando seu rendimento quântico de emissão [9]. Deve-se lembrar que, o primeiro trabalho reportado deste fenômeno foi por Weissman [22] em 1942, o qual demonstrou que os espectros de emissão dos complexos de TR<sup>3+</sup>, sob excitação nos estados dos ligantes resultou em bandas finas de emissão características das transições 4f-4f do íon metálico central.

O interesse no estudo das propriedades de fotoluminescência de β-dicetonatos e benzenotricarboxilatos de TR<sup>3+</sup> tem crescido consideravelmente, pois estes ligantes podem atuar como sensibilizadores no sistema atuando como dispositivos moleculares conversores de Luz (DMCL). O termo *efeito antena* vem sendo usado para denotar a alta eficiência nos processos de absorção pelos ligantes, transferência de energia intramolecular e emissão eficiente do íon TR<sup>3+</sup> (Figura 1.1), com o intuito de sobrepujar o baixo valor do coeficiente de absorção destes íons [23,24].

Uma das etapas mais importante para sistemas moleculares que apresentam alto rendimento quântico de emissão é a transferência de energia não-radiativa entre os ligantes e o íon terra rara. A Figura 1.1 apresenta um esquema típico de diagrama de níveis de energia que ilustra os possíveis canais de transferência de energia intramolecular para compostos de coordenação de terras raras.

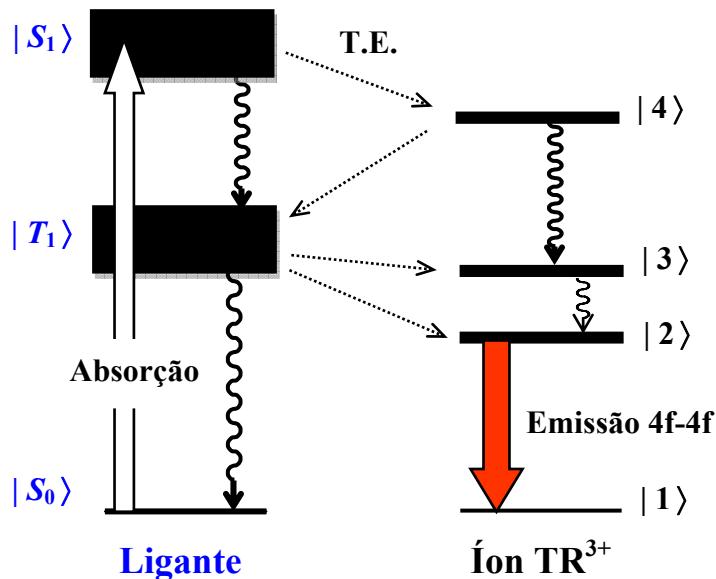
A Figura 1.1 mostra que após a forte absorção do ligante a partir do estado fundamental singlet  $|S_0\rangle$  para o estado excitado singlet  $|S_1\rangle$  pode ocorrer três tipos de processo de

## Capítulo 1 - Introdução

---

transferência de energia intramolecular não-radiativas, através dos quais o estado 4f emissor  $|2\rangle$  do íon terra rara pode ser populado [19,25-28]:

- i) O estado excitado doador  $|S_1\rangle$  transfere energia (T.E.) para um estado excitado 4f de maior energia  $|4\rangle$  que decai não radiativamente populando o estado 4f de menor energia  $|2\rangle$ ;
- ii) O estado excitado 4f de maior energia  $|4\rangle$  retro-transfere energia para um estado tripleto do ligante de menor energia  $|T_1\rangle$  o qual transfere energia para os estados 4f de mais baixas energias  $|3\rangle$  ou  $|2\rangle$ ;
- iii) O estado excitado  $|S_1\rangle$  do ligante decai não radiativamente para o estado excitado de menor energia  $|T_1\rangle$  (cruzamento intersistema), que então transfere energia para os estados 4f de mais baixas energias  $|3\rangle$  ou  $|2\rangle$  do íon  $\text{TR}^{3+}$ .



**Figura 1.1.** Diagrama de níveis de energia ilustrando os possíveis processos de transferência de energia intramolecular de compostos de coordenação de íons terras raras. As setas pontilhadas representam transferência de energia e as setas onduladas representam decaimentos não-radiativos.

As evidências experimentais e teóricas indicam que para compostos de coordenação contendo íons európio e térbio trivalentes o processo *iii* é dominante comparado com os processos *i* e *ii* [19,25-29], embora existam, também, evidências de que para alguns casos a transferência de energia intramolecular direta do estado singuleto  $|S_1\rangle$  para o estado  $|4\rangle$  é de grande importância (processo *i*) [30]. Dados experimentais de transferência de energia intramolecular têm sido determinados com valores entre  $10^5$  e  $10^{12}$  s<sup>-1</sup>. Em geral, o procedimento experimental adotado tem sido através de medidas de tempos de vida e supressão de luminescência.

#### 1.1.1.1. Fosforescência de complexos de Gd<sup>3+</sup>

Compostos de coordenação contendo íons Gd<sup>3+</sup> são utilizados para se obter informações sobre o estado tripleto excitado (T) de ligantes orgânicos, considerando que a banda fina atribuída à transição  $^6P_{7/2} \rightarrow ^8S_{7/2}$  do íon Gd<sup>3+</sup> encontra-se em torno de 32000 cm<sup>-1</sup>. Geralmente, o primeiro estado excitado tripleto ( $T_1$ ) da maioria dos ligantes encontra-se localizada em energia mais baixa do que do nível emissor  $^6P_{7/2}$  do íon Gd<sup>3+</sup>. Portanto, os espectros de fosforescência dos complexos de Gd<sup>3+</sup> exibem somente as bandas largas de emissão oriundas dos ligantes, desde a região do ultravioleta (350 nm) até visível e infravermelho [9].

A vantagem da utilização de íons Gd<sup>3+</sup> como “branco” ao invés de outros íons terras raras de camada vazia ou totalmente preenchida como La<sup>3+</sup> (4f<sup>0</sup>), Y<sup>3+</sup> (3d<sup>0</sup>) ou Lu<sup>3+</sup> (4f<sup>14</sup>) que não apresentam elétrons opticamente ativos, está no fato de que o íon Gd<sup>3+</sup> possui raio iônico muito semelhante aos dos íons Eu<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup>, tornando-o um bom mimetizador dos compostos destes íons [4,20]. Além do mais, o íon Gd<sup>3+</sup> apresenta elevado paramagnetismo (configuração eletrônica 4f<sup>7</sup>), induzindo a um aumento no processo de cruzamento

---

 Capítulo 1 - Introdução
 

---

intersistemas dos estados singuleto excitados para o estado tripleto ( $S \rightarrow T$ ), devido ao aumento na mistura entre os estados de diferentes multiplicidades (efeito do íon pesado) [31,32].

Os valores de energia dos estados tripletos do ligante TTA [3] em  $20492\text{ cm}^{-1}$ , foi determinado por Kai *et al.* [21] através do espectro de emissão do complexo  $[\text{Gd}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$  registrado a baixa temperatura e resolvido no tempo. Além do mais, Guedes [33] determinou os valores de energia dos estados tripletos para o ligante acetilacetonato nos complexos de gadolinio nas formas *tris* e *tetrakis*:  $[\text{Gd}(\text{ACAC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$  e  $(\text{C})[\text{Gd}(\text{TTA})_4]$ , onde o contra-cátion C =  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Souza *et al.* [4,20], fez um estudo detalhado para obter informações das energia dos estados tripleto dos ligantes BTC nos complexos  $[\text{Gd}(\text{BTC})(\text{H}_2\text{O})_n]$  (BTC = EMA, TLA e TMA), a 77 K, resolvido no tempo (Tabela 1.2).

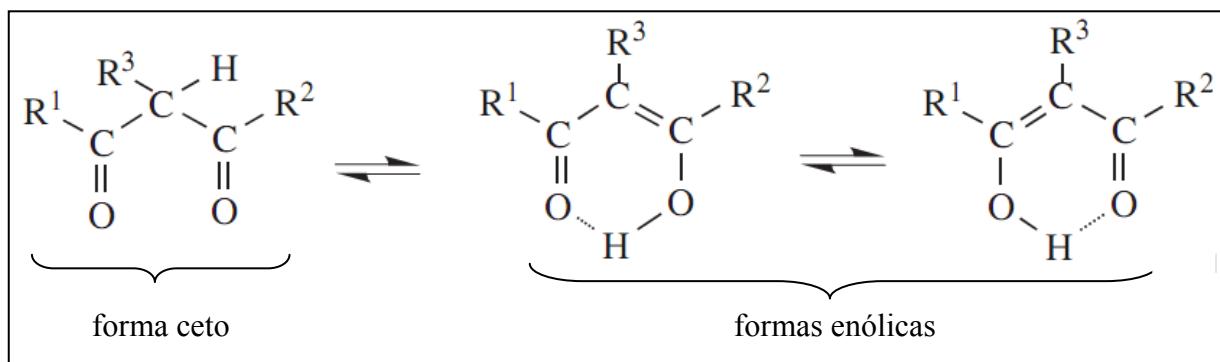
**Tabela 1.2.** Energias (em  $\text{cm}^{-1}$ ) dos estados  $T_1$  dos complexos  $[\text{Gd}(\text{ACAC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ ,  $[\text{Gd}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$  e  $[\text{Gd}(\text{BTC})(\text{H}_2\text{O})_n]$  (BTC = EMA, TLA e TMA), a 77 K, resolvido no tempo.

Complexo de $\text{Gd}^{3+}$	Estado tripleto ( $T_1$ ) ( $\text{cm}^{-1}$ )
$[\text{Gd}(\text{ACAC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$	25000
$[\text{Gd}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$	20492
$[\text{Gd}(\text{EMA})(\text{H}_2\text{O})_2]$	25694
$[\text{Gd}(\text{TLA})(\text{H}_2\text{O})_4]$	25523
$[\text{Gd}(\text{TMA})(\text{H}_2\text{O})_6]$	25100

## 1.2. Compostos de coordenação de terras raras

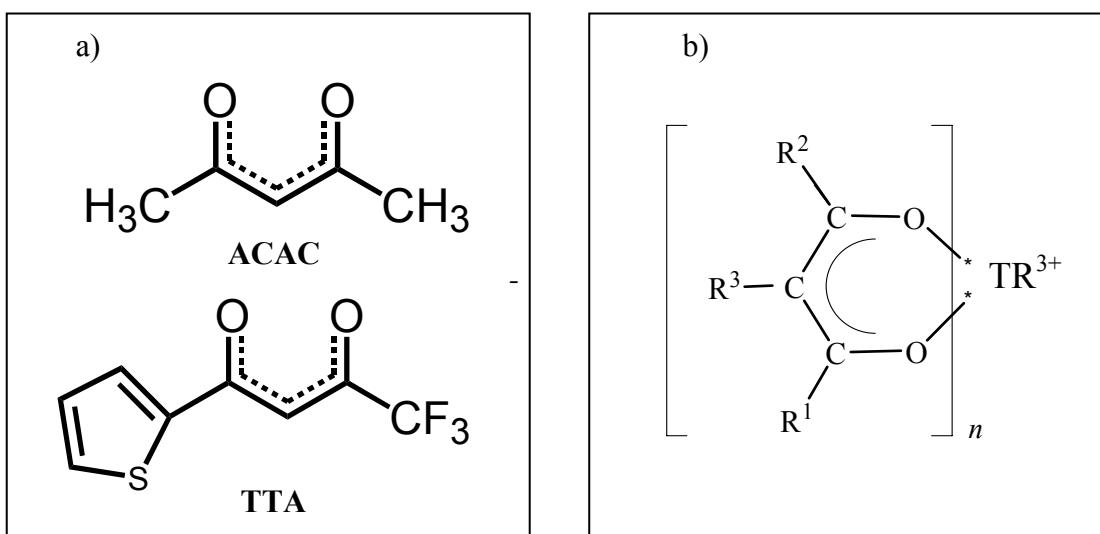
### 1.2.1. Complexos $\beta$ -dicetonatos de $\text{TR}^{3+}$

Os ligantes  $\beta$ -dicetonatos são compostos orgânicos que contêm dois grupos carbonílicos separados por um átomo de carbono. A  $\beta$ -dicetona mais simples é a 2,4-pentanodiona  $\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8$ , popularmente conhecida como acetilacetona (ACAC). Devido à presença dos grupos carbonila e a sua tendência para enolizar, as  $\beta$ -dicetonas apresentam um equilíbrio ceto-enólico ilustrado na Figura 1.2. A Figura 1.3a ilustra os  $\beta$ -dicetonatos utilizados neste trabalho, acetilacetônato (ACAC) e o tenoiltrifluoroacetonato (TTA).



**Figura 1.2.** Equilíbrio ceto-enólico de  $\beta$ -dicetonas, onde R é o grupo substituinte [9].

A deprotonação da  $\beta$ -dicetona provoca a deslocalização da ligação dupla do equilíbrio gerando um híbrido de ressonância. Assim, o íon metálico coordena-se com o híbrido, através dos dois átomos de oxigênio, formando um anel quelato de 6 membros (Figura 1.3b). A maioria dos  $\beta$ -dicetonatos de terras raras é obtida na forma de tri-complexos hidratados.

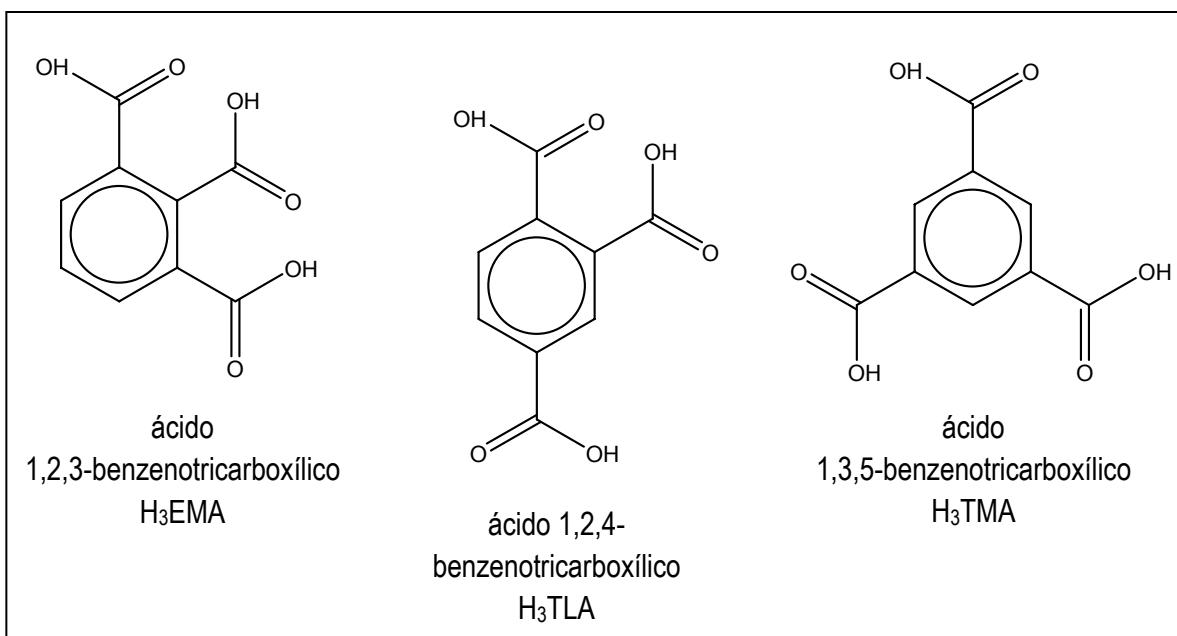


**Figura 1.3.** a) Fórmulas estruturais dos ânions  $\beta$ -dicetonatos: acetilacetonato (ACAC) e tenoiltrifluoroacetônato (TTA) e b) anel quelato de seis membros dos complexos  $\text{TR}-(\beta\text{-dicetonatos})_n$  [9].

### 1.2.2. Complexos benzenotricarboxilatos de $\text{TR}^{3+}$

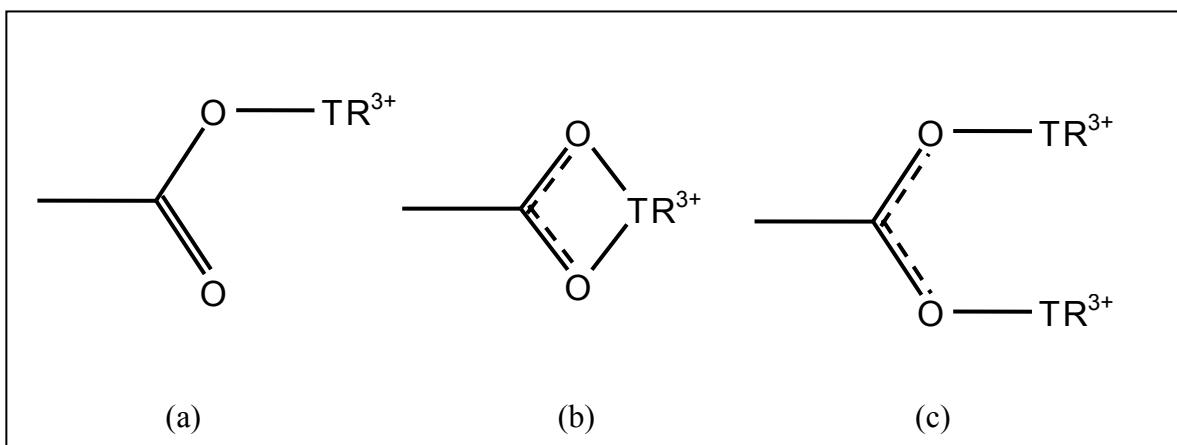
Os ligantes benzenotricarboxilatos (BTC) possuem o grupo carboxilato,  $\text{R}-\text{COO}^-$ , que é gerado pela desprotonação de um ácido carboxílico,  $\text{R}-\text{COOH}$ . Semelhantemente aos ligantes  $\beta$ -dicetonatos, a carga negativa é estabilizada pela sua deslocalização entre os dois átomos de oxigênio.

Os ácidos benzenotricarboxílicos  $\text{H}_3\text{BTC}$  ( $\text{H}_3\text{EMA}$ ) = ácido 1,2,3-benzenotricarboxílico;  $\text{H}_3\text{TLA}$  = ácido 1,2,4-benzenotricarboxílico;  $\text{H}_3\text{TMA}$  = ácido 1,3,5-benzenotricarboxílico) constituem um grupo de três triácidos (Figura 1.4) que são isômeros geométricos entre si, de forma molecular  $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_6$ . Suas estruturas moleculares diferem entre si apenas pelas posições dos substituintes COOH, o que provoca diferenças relevantes nas suas propriedades químicas tais como: solubilidade, valores de  $\text{pK}_a$ , ponto de fusão [34,35] e constantes de complexação etc. [36].



**Figura 1.4.** Fórmulas estruturais dos ácidos H<sub>3</sub>BTC (H<sub>3</sub>EMA = ácido 1,2,3-benzenetricarboxílico; H<sub>3</sub>TLA = ácido 1,2,4-benzenetricarboxílico e H<sub>3</sub>TMA = ácido 1,3,5-benzenetricarboxílico) [4].

Os complexos formados com os ligantes benzenetricarboxilatos podem se coordenar a um íon metálico de vários modos. A Figura 1.5 apresenta a forma mono e bidentada (quelante) em sistemas mononucleares e bidentada do tipo ponte entre dois centros metálicos, formando dímeros ou polímeros [20,37].



**Figura 1.5.** Modos de coordenação dos complexos [TR(BTC)(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]: a) monodentada, b) bidentada tipo quelante e c) bidentada tipo ponte [37].

### 1.3. Complexos de TR<sup>3+</sup> incorporados na rede de sílica

O uso de partículas de sílica em bioaplicações iniciou com a publicação de Stöber *et al.* [38] em 1968, onde micropartículas e nanopartículas monodispersas foram preparadas a partir de um alcóxido de sílica (por exemplo, tetraetilortosilicato Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub> – TEOS). Em meados da década de 70, técnicas de modificação de silanos proporcionaram grupos funcionais na superfície da partícula de sílica [39]. Deste modo, as partículas de sílicas modificadas passaram a ser utilizadas em todas as áreas de bioaplicações [40,41].

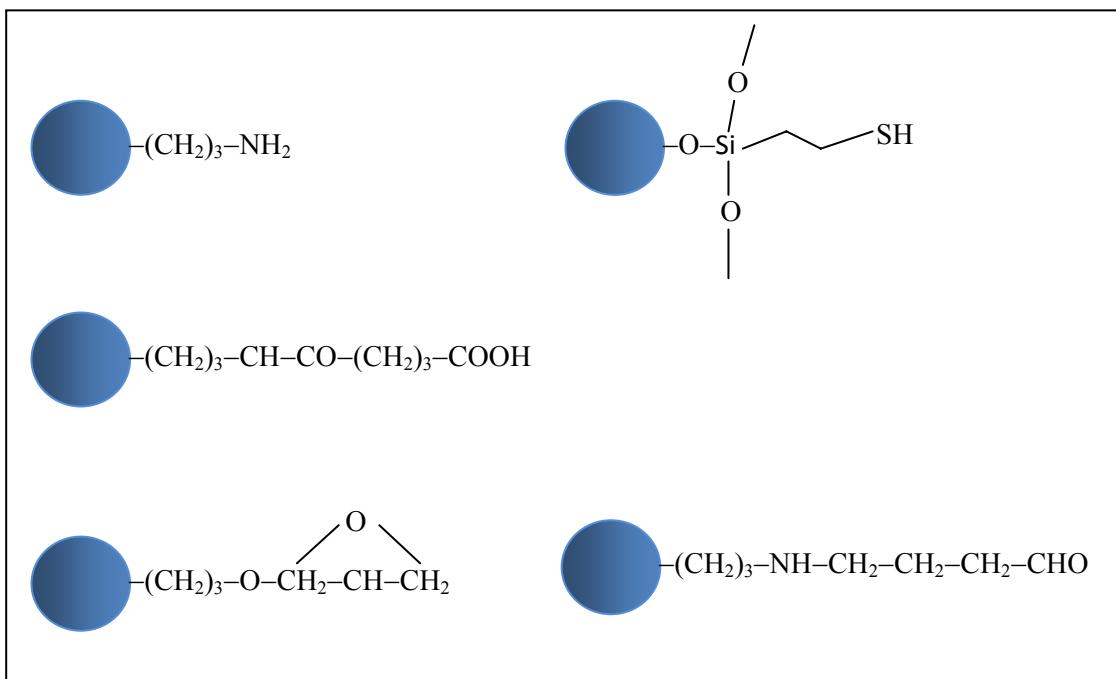
Há dois métodos principais para a síntese de partículas de sílica. O primeiro é o método de Stöber, que consiste na hidrólise e condensação de um precursor alcóxido em etanol e amônia em meio aquoso [38,42]. O método é relativamente simples e tanto compostos orgânicos como inorgânicos podem ser incorporados nesta síntese. Também é possível incorporar luminóforos em sílica utilizando a sua interação direta com o reagente silano.

A segunda técnica é o método de microemulsão reversa [43,44]. Este método é baseado na formação de uma microemulsão reversa água-óleo. Os três principais componentes que participam da mistura reacional são: água, surfactante e óleo (solvente orgânico, em proporção alta em relação à água). As micelas formadas são estabilizadas pela água na solução de óleo, e funcionam como pequenos microreatores, onde o silano hidrolisa e condensa formando as partículas de sílica.

Uma vez formadas as partículas, sua superfície pode ser modificada com reagentes apropriados (Figura 1.6). Devido à versatilidade da química do Si, vários grupos funcionais podem ser introduzidos na superfície das partículas. No entanto, o processo requer uma nova camada de sílica, usualmente a funcionalização é realizada com alquilsilanos. Pode-se tanto

## Capítulo 1 - Introdução

adicionar um grupo apropriado para acoplamento espontâneo com biomoléculas como também adicionar um grupo nucleofílico, como amina ou carboxilato [45-47].



**Figura 1.6.** Representação de partículas de sílica funcionalizadas com diferentes grupos funcionais: amina, carboxila, aldeído, epóxi e tiol.

As partículas contendo na sua superfície um terminal amina primária podem ser utilizadas em bioensaios realizando imobilização com interação covalente. Vale ressaltar que aminas secundárias e terciárias não são reativas nestes sistemas. Para as reações de acoplamento com partículas aminofuncionalizadas pode-se utilizar um agente bifuncional, que atua como um espaçador entre a partícula e a biomolécula, para diminuir os efeitos estéricos na ligação da partícula e a espécie biológica. Este espaçador possui dois grupos reativos, que podem ser iguais (homofuncional) ou diferentes (heterofuncional). Quando o espaçador interage com a partícula, ele utiliza um dos dois grupos funcionais (por exemplo,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$  etc.) de ligação, permanecendo o outro disponível para a interação com

---

## Capítulo 1 - Introdução

a espécie biológica. Normalmente o espaçador homofuncional glutaraldeído é o mais utilizado em conjugações biológicas [41].

As principais finalidades da modificação de superfícies são: a) introduzir grupos funcionais apropriados para conjugação com biomoléculas ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$  etc.); b) fornecer estabilidade para as partículas de sílica em solução e aumentar a dispersão em água; c) preservar a estabilidade e atividade das biomoléculas (anticorpos, proteínas, enzimas etc.) quando imobilizadas na superfície das partículas, e d) estabelecer um procedimento fácil e reprodutivo para a funcionalização das partículas [48].

### 1.4. Considerações gerais sobre proteínas e enzimas

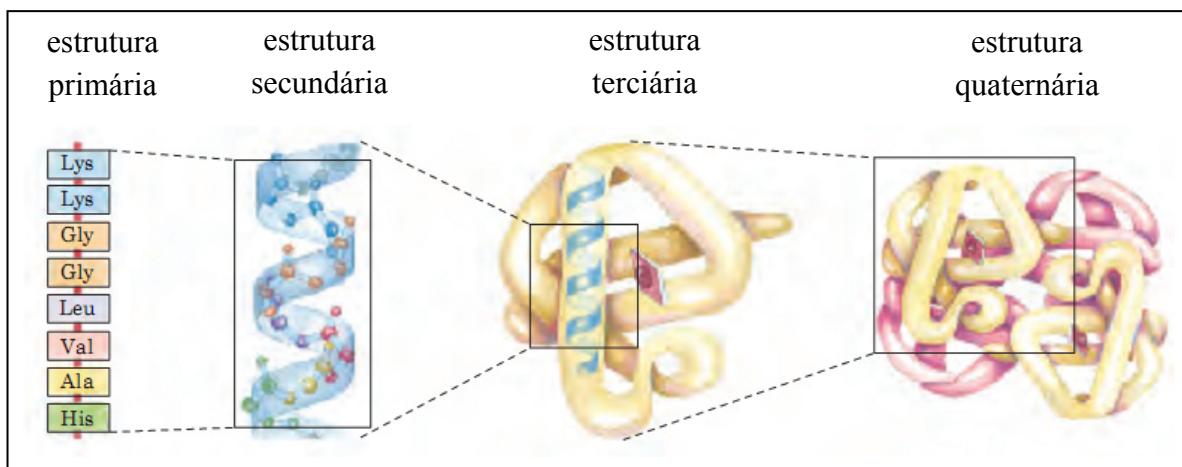
As proteínas são moléculas formadas por unidades monoméricas, aminoácidos, que formam grandes cadeias. Existem 20 tipos distintos de aminoácidos, e cada um deles é uma molécula consistindo de um carbono chamado  $\alpha$  ao qual se liga um átomo de hidrogênio, um grupo amina, um grupo ácido carboxílico, e também uma cadeia lateral ou radical, que varia de aminoácido para aminoácido. Em animais superiores, as proteínas representam cerca de 50 % do peso do tecido (seco). Seu papel é fundamental no ser vivo, não existindo processo biológico que não dependa da presença ou da atividade deste tipo de biomolécula. As proteínas atuam em inúmeras funções distintas, como por exemplo: enzimas, hormônios, anticorpos etc. [49].

Devido a estrutura molecular das proteínas ser muito complexa, é dividida em quatro níveis de organização: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária é formada pelo número e identidade dos aminoácidos que compõem a molécula e ao ordenamento ou seqüência dessas unidades na cadeia polipeptídica. A estrutura secundária é denominada quando se forma um enrolamento, devido ao aumento da cadeia e em função das condições físico-químicas do meio. A maioria das estruturas globulares é a terciária, onde

## Capítulo 1 - Introdução

---

ocorre um enrolamento tridimensional. A estrutura quaternária possui caráter oligomérico, compostas por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária (Figura 1.7) [48-51].



**Figura 1.7.** Níveis de estrutura da proteína [50].

As albuminas séricas como a albumina de soro bovina (*bovine serum albumin* - BSA) e albumina de soro humana (*human serum albumin* - HSA) são proteínas plasmáticas que contribuem consideravelmente em funções fisiológicas, e exercem um papel importante no transporte e distribuição de muitos ligantes exógenos e endógenos [52-53]. Ressalva-se que a BSA, constituída por 582 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 69000, é amplamente empregada na área de bioquímica. Isto se deve à relativa facilidade com que pode ser isolada e purificada em grande escala além de ser estruturalmente homóloga ao HSA.

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores na maioria das reações bioquímicas. Por atuarem como catalisadores eficientes são aproveitadas para aplicação na indústria farmacêutica e alimentar. As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam. Dentre elas, as peroxidases constituem uma classe caracterizada pela presença do grupo prostético heme no seu sítio ativo, o qual é oxidado na presença de

---

## Capítulo 1 - Introdução

peróxido de hidrogênio levando à produção de cátions radicais  $\pi$ . Estes, por sua vez, podem oxidar uma série de substratos [49,50].

A raiz forte (*Amoracia rusticana*) é uma planta perene que cresce em regiões temperadas e é uma fonte de peroxidase. A produção de peroxidase a partir de raiz forte ocorre relativamente em larga escala devido ao uso comercial da enzima produzida por esta planta. A peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase* - HRP) é uma glicoproteína globular obtida a partir da raiz forte. [54]. Esta isoenzima é constituída de 308 resíduos de aminoácidos, um grupo prostético heme, dois íons cálcio e oito cadeias laterais neutras de carboidratos que se ligam à enzima através dos resíduos de asparagina [55].

## 1.5. Imunologia

Imunologia é a ciência que estuda os mecanismos de defesa dos organismos vivos, em particular de humanos ou outros mamíferos. De uma maneira bem simples, a resposta imunológica de organismos vivos (exceto plantas) se dá pelo contato com抗ígenos (Ag), com produção de anticorpos (Ac). Os抗ígenos, substâncias imunogênicas, são capazes de desencadear reação em cadeia, ativando linfócitos (glóbulos brancos) e síntese de anticorpos específicos (sistema imune humoral) [56].

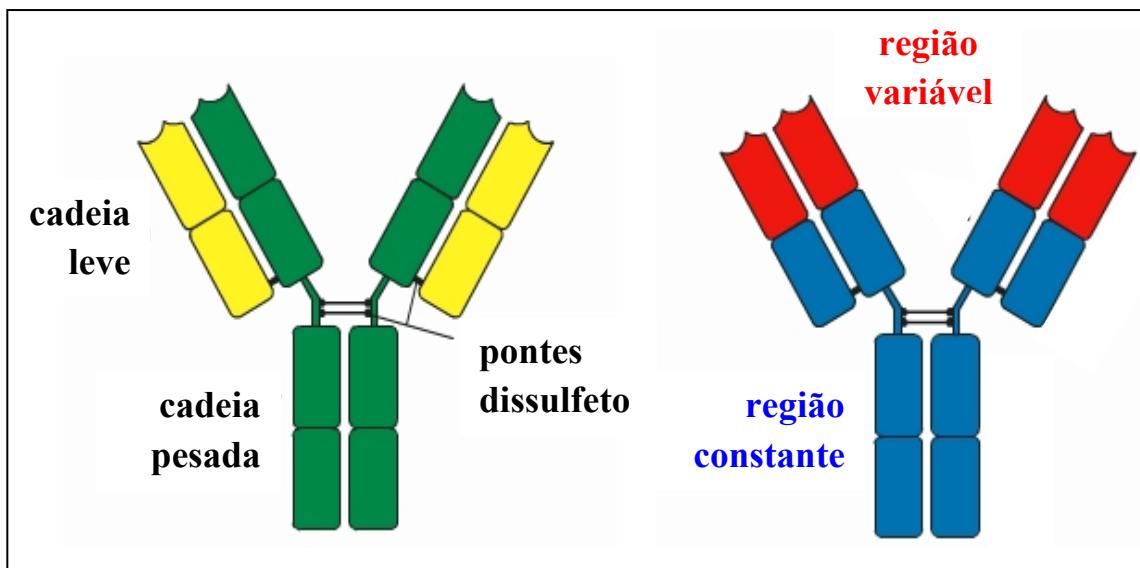
Anticorpos são proteínas produzidas em resposta à presença de moléculas estranhas, organismos ou outros agentes no corpo, capazes de neutralizar agentes infecciosos. Os anticorpos são sintetizados predominantemente pelas células do plasma, linfócitos B, e circulam por todo o sangue e linfa, onde se ligam aos抗ígenos. Assim que formam os complexos anticorpo-抗ígeno, são removidos da circulação por fagocitose pelos macrófagos [57].

Os anticorpos são proteínas de alto peso molecular PM (~150 kD), já os抗ígenos devem possuir, além de certa complexidade química que os diferencie das substâncias

## Capítulo 1 - Introdução

---

reconhecidas pelo organismo, pelo menos 1 kD. Os anticorpos ([Figura 1.8](#)), também chamados de imunoglobulinas (Ig), possuem duas cadeias “leves” (25 kD) e duas cadeias pesadas (50 kD), as quais são ligadas entre si por pontes de dissulfeto, formando estrutura simétrica em forma de Y. As cadeias têm sua porção amino terminal próxima ao topo da estrutura em Y, onde se encontra o sítio determinante do anticorpo (região variável), denominado fragmento  $F_{ab}$ . As seqüências dos aminoácidos neste fragmento determinam a especificidade do anticorpo e o tipo de imunoglobulina [\[50\]](#). Os grupamentos amina encontram-se na região variável, enquanto que os grupos carboxilatos ficam na constante.



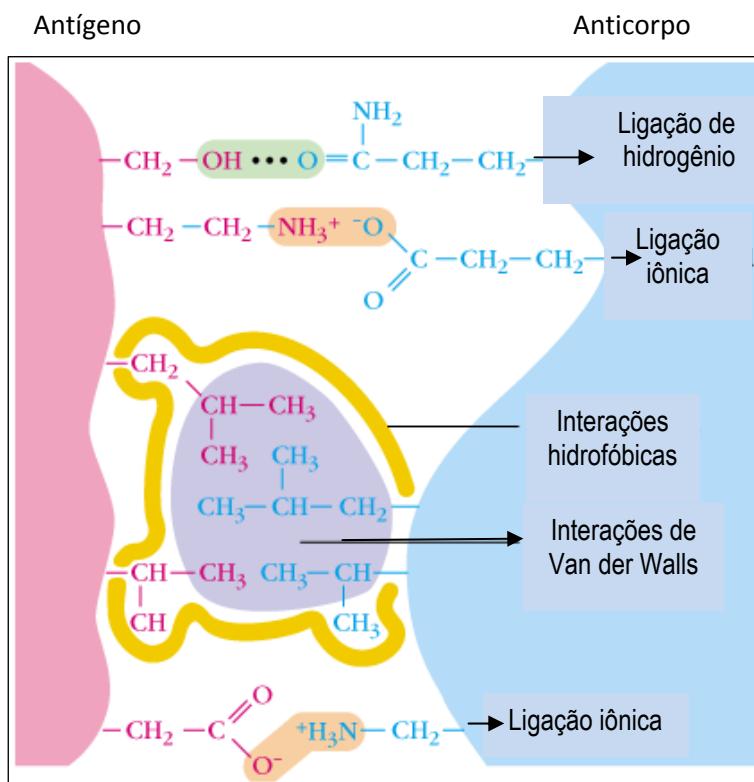
**Figura 1.8.** Representação da estrutura geral de anticorpo. A região variável determina a especificidade do anticorpo.

Os抗ígenos podem ser classificados em uni ou multidentados e uni ou multivalentes. Os primeiros relacionam-se à possibilidade de se ter um ou mais tipos de epítópos (grupos funcionais determinantes na interação抗ígeno-anticorpo, Ag-Ac), já o segundo se relaciona à repetição de cada tipo de epítopo.

A interação Ag-Ac é relativamente fraca, envolvendo ligações não covalentes como Van der Waals, eletrostática, ligação de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. Estas interações

## Capítulo 1 - Introdução

ocorrem a curta distância, de modo que, só as moléculas contendo determinante antigenico ou muito similares (reatividade cruzada) ligam-se ao sítio antígeno ligante do respectivo anticorpo (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Ilustração das interações entre o anticorpo e o antígeno.

### 1.5.1. Doença arterial coronariana

Arteriosclerose coronária é uma condição inflamatória caracterizada pelo acúmulo local de lipídio e proliferação celular do músculo liso vascular, em resposta ao dano endotelial [58-61]. É um processo progressivo, cujas lesões iniciam-se na primeira década de vida, atingindo a aorta e seguindo para as artérias coronárias e cerebrais com o avanço da idade. Trata-se de um processo com ausência de sintomas na fase inicial o qual pode persistir por muitos anos até suas manifestações clínicas tornarem-se evidentes.

---

## Capítulo 1 - Introdução

A fase inicial da lesão é caracterizada pelo espessamento e o acúmulo de lipídio na camada íntima do vaso produzindo estrias gordurosas, sendo também a fase mais branda, surgindo em crianças nos primeiros 10 anos de vida, podendo ser a precursora para uma placa ateromatosa ou arteriosclerótica, comprometendo o fluxo sanguíneo [62].

O processo arteriosclerótico tem início quando o endotélio dos vasos sofre algum tipo de lesão, induzindo a um processo inflamatório. O enrijecimento da parede arterial é devido à deposição de várias moléculas na placa, incluindo lipídios, cristais de colesterol e sais de cálcio. A consequente alteração na estrutura da parede endotelial leva a um aumento da adesão plaquetária, contribuindo para a formação de trombos. Além disso, células musculares lisas, que são produtoras de matriz extracelular, também passam a proliferar na área da lesão. Embora a proliferação de células musculares lisas ocorra de forma gradual, pequenas rupturas de placas em formação podem gerar surtos proliferativos desencadeados pela trombina ou pelo fator de crescimento de plaquetas derivadas (PDGF - *platelet-derived growth factor*).

No estado avançado da placa aterosclerótica, estão presentes dois componentes estruturais distintos: um núcleo lipídico, pouco denso, e a capa fibrosa. O núcleo lipídico é rico em lipídios extracelulares, principalmente cristais e ésteres de colesterol. A capa fibrosa compreende cerca de 70% do tamanho total da placa e é formada basicamente por células musculares lisas, matriz extracelular e células inflamatórias.

Os eventos iniciais da aterosclerose vêm sendo alvos de diversas hipóteses ao longo dos anos. Em 1973, Ross e Glomset [63] divulgaram a hipótese da resposta à injúria endotelial. Esta hipótese considera como evento inicial uma injúria na parede arterial associada a uma resposta inflamatória causando uma lesão degenerativa. Esta resposta inflamatória é caracterizada pela migração de células musculares lisas da camada íntima e média arterial. As manifestações desta resposta ocorrem principalmente nas regiões de bifurcações e ramificações das artérias, onde o fluxo sanguíneo é distribuído. Estas áreas

---

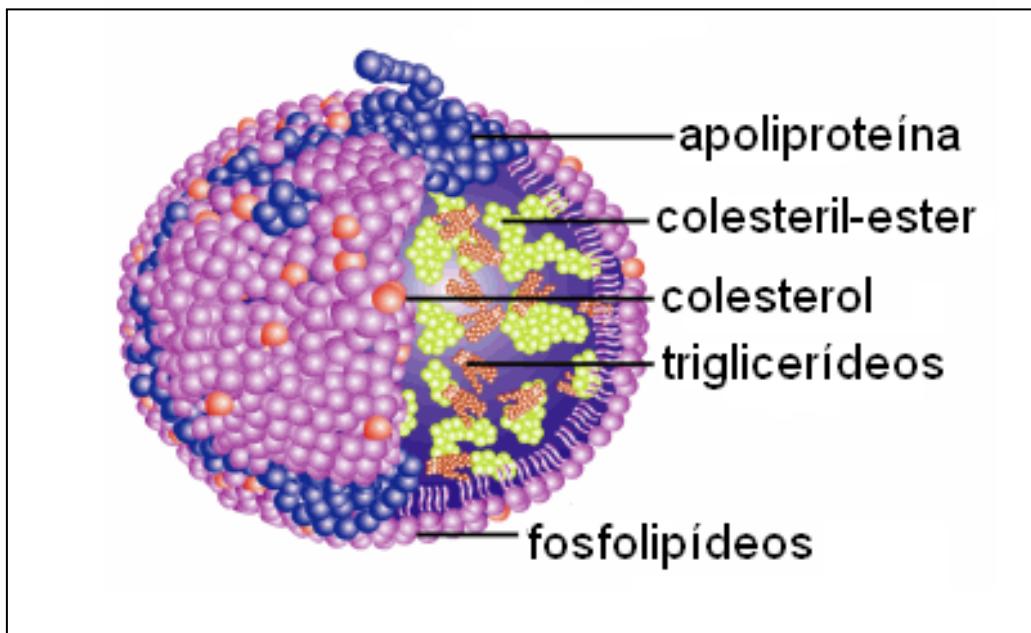
## Capítulo 1 - Introdução

mostram um aumento da permeabilidade para macromoléculas como a LDL (*low density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade) e um aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais.

Em 1991, outra hipótese importante foi proposta por Witztum e Steinberg [64]. Trata-se da “modificação oxidativa”, onde uma modificação por processos oxidativos da partícula de LDL poderia gerar substâncias capazes de causar um dano nas células endoteliais e iniciar o desenvolvimento da lesão. A participação da LDL oxidada (oxLDL) na aterogênese ocorreria através do recrutamento de monócitos circulantes para o espaço subendotelial, com consequente diferenciação em macrófagos, que se acumulariam na camada íntima arterial. Estes macrófagos aumentariam a captação da oxLDL, levando à formação de células espumosas (*foam cells*). Além disso, a citotoxicidade da oxLDL levaria à perda da integridade endotelial.

### 1.5.1.1. Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

A lipoproteína de baixa densidade é a principal partícula carreadora de colesterol no plasma humano. A LDL (Figura 1.10) é constituída principalmente por lipídios, vitaminas lipossolúveis e uma parte protéica, a apolipoproteína B-100 (apoB-100). Trata-se de uma partícula esférica com um diâmetro entre 180 a 280 Å e densidade entre 1,019 a 1,063 g.mL<sup>-1</sup>. A partícula de LDL contém cerca de 2700 moléculas de ácidos graxos, onde a maior parte é poliinsaturada com predominância de ácido linoléico e ácido araquidônico. O antioxidante associado mais abundante é o α-tocoferol, com cerca de 6 a 8 moléculas por partícula de LDL [62].



**Figura 1.10.** Representação esquemática da LDL.

A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma, sendo responsável pelo transporte de colesterol para células em processo ativo de divisão, na síntese de membrana ou tecidos que utilizam colesterol na síntese de hormônios esteróides ou sais biliares. As LDL interagem com receptores específicos presentes na superfície celular: são os receptores do tipo B/E. Estes receptores regulam a captação do colesterol exógeno. Desta forma, quando o conteúdo do colesterol intracelular está acima do normal, ocorre a inativação dos receptores para LDL. Em indivíduos normais aproximadamente 70% das partículas de LDL são removidas do plasma pelas células hepáticas por receptores B/E. Além disso, a perda funcional destes receptores está associada a altas concentrações de LDL plasmática, como ocorre em indivíduos com hipercolesterolemia familiar associada a causas genéticas.

Nos últimos anos, surgiram evidências sugerindo que a modificação oxidativa dos componentes lipídicos e apoB-100 da LDL poderiam ser as causas iniciais das estrias gordurosas. Conseqüentemente, estas modificações vão alterar as funções fisiológicas desta lipoproteína, além de contribuir para a instalação do processo inflamatório e formação de

---

## Capítulo 1 - Introdução

células espumosas. Portanto, a oxidação da LDL pode ser um dos eventos essenciais para o desenvolvimento da aterosclerose. O processo oxidativo tem-se mostrado presente em doenças inflamatórias tanto agudas quanto crônicas [65].

Neste trabalho de tese, a LDL foi extraída a partir do plasma humano de pessoas saudáveis. O processo de oxidação *in vitro* ocorre na presença de íons metálicos como ferro ou cobre, os quais funcionam como catalisadores da decomposição de lipoperóxidos. Dessa forma, a oxidação é obtida em três fases principais: uma fase inicial, onde ocorre o consumo dos antioxidantes endógenos ( $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno); uma segunda fase chamada de propagação, caracterizada por uma formação linear de produtos derivados da peroxidação lipídica (dienos conjugados, hidroperóxidos lipídicos e oxysterols) e uma terceira fase caracterizada por uma concentração constante de dienos conjugados. A LDL pode ser oxidada *in vivo* por diferentes mecanismos, entretanto ainda não está claro qual seria o mecanismo mais importante.

A LDL foi obtida de *pool* de plasma fresco de voluntários saudáveis em jejum com concentrações plasmáticas de Colesterol (CT) e Triacilglicerol (TG) nas faixas consideradas normais (CT < 240 mg/dL e TG < 150 mg/dL) confirmadas por método enzimático com *kits* comerciais utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

O sangue dos doadores foi colhido em tubos contendo EDTA (0,1%) e imediatamente centrifugado a temperatura de 4 °C durante 10 minutos, para obtenção do plasma, onde são acrescentados conservantes. A fração LDL foi obtida por ultracentrifugação seqüencial, utilizando-se rotor a 10 °C. Inicialmente, o plasma foi centrifugado durante 12 h, para obtenção da VLDL (densidade = 1,006 g/mL). Após este período, sua densidade é acertada para 1,063 g/mL com a adição de KBr e em seguida centrifugado durante 20 h para obtenção da LDL (densidade < 1,063 g/mL). A LDL, presente no sobrenadante foi coletada e dialisada durante 48 h, em solução PBS – tampão fosfato pH 7,4. Após este processo, a LDL foi

---

## Capítulo 1 - Introdução

esterilizada com filtro de 0,20 micra de diâmetro [62]. As proteínas são quantificadas utilizando o kit BCA de acordo com as instruções do fabricante.

Para a obtenção da oxLDL, primeiro a LDL é dialisada em PBS durante 24 h a 4 °C, para retirada do EDTA (antioxidante). Em seguida, a LDL foi incubada com solução de CuSO<sub>4</sub> (20 µM) durante 18 h a 37 °C, em frasco aberto. Após este período, a oxidação é bloqueada pela adição de EDTA (1,0 mM) ao meio contendo a LDL oxidada com cobre. Por fim, a oxLDL foi dialisada novamente em PBS contendo EDTA para eliminar resíduos de cobre [62].

## 1.6. Imunoensaios

No final da década de 50, Yalow e Berson [66] descreveram o primeiro ensaio imunológico para detectar insulina humana. Em 1977, estes pesquisadores ganharam o Prêmio Nobel por este desenvolvimento. A partir de então, as técnicas imunoquímicas ganharam atenção. Atualmente, ensaios bioanalíticos ultrasensíveis são rotineiramente utilizados em ciência médica e biológica, aplicando em citologia, diagnóstico de doenças, monitoramento de drogas terapêuticas e abuso de drogas. Nestes ensaios pode-se determinar a concentração ou a presença de um ou mais analitos, em células, soro, urina e outros fluidos biológicos, ou tecidos em concentrações de microgramas a picogramas por mililitro. O analito pode ser endógeno ou exógeno, e pode variar em tamanho de uma pequena molécula orgânica a uma macromolécula.

Um ensaio bioanalítico ideal deve ser confiável, preciso, rápido, de baixo custo e de simples execução. Um fator crítico para bioensaios é o método de detecção, isto é, a natureza do sinal específico gerado pela espécie marcadora e como o sinal é detectado. Uma variedade de métodos de alta sensibilidade vem sendo desenvolvida, sendo a maioria baseada em

---

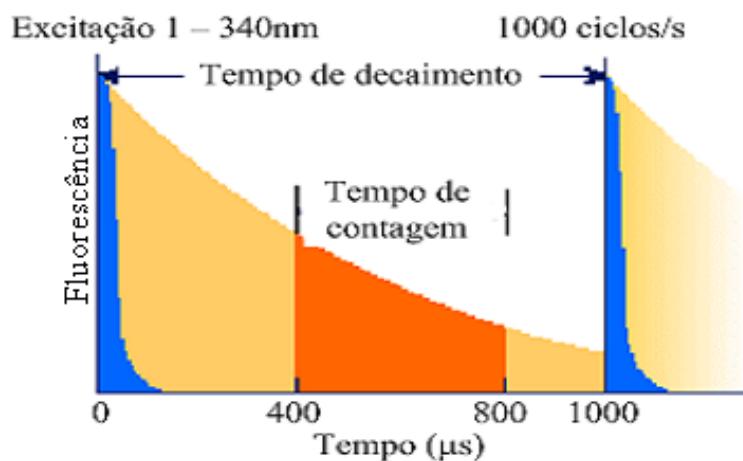
## Capítulo 1 - Introdução

moléculas que absorvem ou emitem radiação eletromagnética, tais como os métodos radioisótopos, colorimetria e fluorometria.

Imunoensaio [67] é a detecção específica de um analito em uma mistura de biomoléculas que utiliza uma reação específica de um anticorpo com um antígeno particular (analito). São rotineiramente usados em laboratórios clínicos para monitorar níveis de hormônios, toxinas, agentes infecciosos, drogas, marcadores tumorais e outras proteínas ou metabólitos, assim como nas áreas de citologia, hematologia etc. Os diferentes tipos de marcadores incluem os radioisótopos, as enzimas, a fluorescência, a fosforescência, a quimioluminescência e a bioluminescência.

Neste trabalho foi desenvolvido um marcador luminescente à base de íons terras raras para a detecção e quantificação do antígeno oxLDL. Um marcador, segundo a IUPAC [68], é um composto químico que é distinguido pelo observador mas não pelo sistema, e é usado para identificar um traçador. Lembrando que, traçador é um membro marcado de uma população usada para medir certas propriedades inerentes àquela população.

Na secção 1.1. foi relatado que os compostos com íons  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  são muito utilizados como sondas luminescentes devido ao seu longo tempo de vida e grande deslocamento de Stokes. Os longos tempos de vida dos íons de  $\text{TR}^{3+}$  permitem o uso de espectroscopia resolvida no tempo para separar temporalmente a luminescência do marcador em questão da luminescência oriunda do *background* do sistema biológico ([Figura 1.11](#)).



**Figura 1.11.** Princípio de fluorimetria resolvida no tempo com excitação pulsada janela de contagem com retardo.

O desenvolvimento de uma metodologia de interesse biotecnológico foi fundamentado na interação seletiva e/ou específica do conjugado “espécie biológica-composto de terra rara” com um componente do sistema biológico que se pretende analisar. O conjugado deve emitir luz quando exposto à radiação ultravioleta, deste modo, a técnica se baseia na medida/detecção da luminescência do composto de terra rara usado como marcador luminescente. Portanto, o diagnóstico é obtido por meio da medida da intensidade de luz emitida, que é proporcional à quantidade do conjugado “espécie biológica-composto de terra rara”.

## Referências

- [1] EDELMANN, F.K. Lanthanides and actinides: annual survey of their organometallic chemistry covering the year 2007. *Coordination Chemical Reviews*, v.253, p.2515-2587, 2009.
- [2] CARLOS, L.D.; FERRREIRA, R.A.S.; BERMUDEZ, V.Z.; RIBEIRO, S.J.L. Lanthanide-containing light-emitting organic-inorganic hybrids: a bet on the future. *Advanced Materials*, v.21, p.509–534, 2009.
- [3] TEOTONIO, E.E.S.; FETT, G.M.; BRITO, H.F.; FAUSTINO, W.M.; de SÁ, G.F.; FELINTO, M.C.F.C.; SANTOS, R.H.A. *Journal of Luminescence*, v.128, p.190-198, 2008.
- [4] SOUZA, E.R.; Silva, I.G.N.; TEOTONIO, E.E.S.; FELINTO, M.C.F.C.; BRITO, H.F. Optical properties of red, green and blue emitting rare earth benzenetricarboxylate compounds. *Journal of Luminescence*, v.130, n.2, p.283-291, 2010.
- [5] ELISEEVA, S.V.; BÜNZLI, J.-C.G. Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chemical Society Reviews*, v.39, p.189-227, 2010.
- [6] THOMPSON, L.C. Complexes In: GSCHNEIDNER Jr, K.A.; EYRING, L.R. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earth*. Amsterdam: North-Holland, 1979, v.3, p.20-297.
- [7] BÜNZLI, J.-C.G.; CHOPPIN, G.R. *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences – Theory and Practice*. Amsterdam: Elsevier, 1989, 448p.
- [8] WYBOURNE, B.G. *Spectroscopic Properties of Rare Earths*. New York: Interscience Publishers, 1965, 236p.
- [9] BRITO, H.F.; MALTA, O.L; FELINTO, M.C.F.C.; TEOTONIO, E.E.S. Luminescence phenomena involving metal enolates. In: ZABICKY, J., ed. *The chemistry of metal enolates*. England: John Wiley & Sons Ltd., 2009. cap.5, p.131-184.
- [10] JIANG, H.; WANG, G.; ZHANG, W.; LIU, X.; YE, Z.; JIN, D.; YUAN, J.; LIU, Z. Preparation and time-resolved luminescence bioassay application of multicolor luminescent lanthanide nanoparticles. *Journal of Fluorescence*, v.20, p.321-328, 2010.

---

Capítulo 1 - Introdução

- [11] MOORE, E.G.; SAMUEL, A.P.S.; RAYMOND, K.N. From antenna to assay: lessons learned in lanthanide luminescence. *Accounts of Chemical Research*, v.42, p.542-552, 2009.
- [12] BÜNZLI, J.-C.G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chemical Reviews*, v.110, p.2729-2755, 2010.
- [13] YE, Z.; TAN, M.; WANG, G.; YUAN, J. Development of functionalized terbium fluorescent nanoparticles for antibody labeling and time-resolved fluoroimmunoassay application. *Talanta*, v.64, p.206-210, 2005.
- [14] MOTSON, G.R.; FLEMING, J.S.; BROOKER, S. Potential applications for the use of lanthanide complexes as luminescent biolabels. *Advances in Inorganic Chemistry*, v.55, p.-432, 2004.
- [15] PAZOS, E.; VÁZQUES, O.; MASCARENAS, J.L.; VÁZQUES, M.E. Peptide-based fluorescent biosensors. *Chemical Society Reviews*, v.38, p.3348-3359, 2009.
- [16] HEMMILÄ, I.; LATAILA, V. Progress in lanthanides as luminescent probes. *Journal of Fluorescence*, v.15, n.4, p.529-542, 2005.
- [17] YAN, J.; WANG, G. Lanthanide-based luminescence probes and time-resolved luminescence bioassays. *Trends in Analytical Chemistry*, v.25, n.5, p.490-500, 2006.
- [18] VEISEH, O.; GUNN, J.W.; ZHANG, M.Q. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for target drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, n.3, p.284-304, 2010.
- [19] BUONO-CORE, G.E.; LI, H.; MARCINIAK, B. Quenching of excited-states by lanthanide ions and chelates in solution. *Coordination Chemistry Reviews*, v.99, p.55-87, 1990.
- [20] SOUZA, E.R. *Síntese de complexos benzenotricarboxilatos de terras raras e estudo de suas propriedades fotoluminescentes*. São Paulo: 2008, 128p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.
- [21] KAI, J. *Desenvolvimento de sistemas luminescentes à base dos polímeros PHB e PMMA dopados com complexos de terras raras*. São Paulo, 2009. 192p. Tese de Doutorado. Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

---

Capítulo 1 - Introdução

---

- [22] WEISSMAN, S.I. Intramolecular energy transfer – The fluorescence of complexes of europium. *Journal Chemical Physics*, v.10, p.214–217, 1942.
- [23] SABBATINI, N.; GUARDIGLI, M.; LEHN, J. M. Luminescent lanthanide complexes as photochemical supramolecular devices. *Coordenation Chemical Reviews*, v.123, p.201–228, 1993.
- [24] BRITO, H.F.; MALTA, O.L.; SOUZA, L.R.; MENEZES, J.F.S., CARVALHO, C.A.A. Luminescence of the films of europium (III) with thenoyltrifluoroacetone and macrocyclics. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.247, p.129-133, 1999.
- [25] DE SÁ, G.F.; MALTA, O.L.; DONEGÁ, C.M.; SIMAS, A.M.; LONGO, R.L.; SANTACRUZ, P.A.; SILVA JR, E.F. Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, v.196, p.165-195, 2000.
- [26] MALTA, O.L. Ligand-rare-earth ion energy transfer in coordination compounds. A theoretical approach. *Journal Luminescence*, v.71, p.229-236, 1997.
- [27] SILVA, F.R.G.; MALTA, O. L. Calculation of the ligand-lanthanide ion energy transfer rate in coordination compounds: contributions of exchange interactions. *Journal of Alloys and Compounds*, v.250, p.427-430, 1997.
- [28] MALTA, O.L.; GONÇALVES E SILVA, F.R. A theoretical approach to intramolecular energy transfer and emission quantum yields in coordination compounds of rare earth ions. *Spectrochimica Acta A – Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.54, p.1593-1599, 1998.
- [29] CROSBY, G.A. Luminescent organic complexes of rare earths. *Molecular Crystals*, v.1, p.37-&, 1966.
- [30] ALAOUI, I.M. Nonparticipation of the ligands first triplet-state in intramolecular energy-transfer in Eu<sup>3+</sup> and Tb<sup>3+</sup> Ruhemanns purple complexes. *Journal of Physical Chemistry*, v.99, p.13280-13282, 1995.
- [31] TOBITA, S.; ARAKAWA, M.; TANAKA, I. Electronic relaxation processes of rare-earth chelates of benzoyltrifluoroacetone. *Journal of Physical Chemistry*, v.88, p.2697-2702, 1984.

---

Capítulo 1 - Introdução

---

- [32] SATO, S.; WADA, M. Relations between intramolecular energy transfer efficiencies and triplet state energies in rare earth  $\beta$ -diketone chelates. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v.43, p.1955-1962, 1970.
- [33] GUEDES, M.A. *Comportamento fotoluminescente dos ânions complexos tetrakis( $\beta$ -dicetonatos) de íons de terras raras –  $Eu^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$  e  $Tm^{3+}$* . São Paulo, 2007. 148p. Tese de Doutorado. Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- [34] RZACZYNSKA, Z.; OSTASZ, A.; PIKUS, S. Thermal properties of rare earth elements complexes with 1,3,5-benzenetricarboxylic acid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.82, p.347–351, 2005.
- [35] WANG, Z.-M.; van de BURGT, L.J.; CHOPPIN, G.R. Spectroscopic study of lanthanide(III) complexes with carboxylic acids. *Inorganica Chimica Acta*, v.293, p.167–177, 1999.
- [36] CHOPPIN, G.R.; RIZKALLA, E.N.; EL-ANSI, T.A.; DADGAR, A. Complexation thermodynamics of lanthanide ions by benzene polycarboxylate ligands. *Journal of Coordination Chemistry*, v.31, p.297-304, 1994.
- [37] TEOTONIO, E.E.S. *Síntese e investigação das propriedades fotoluminescentes de dispositivos moleculares conversores de luz (DMCL) de complexos dicetonatos de terras raras com ligantes amidas*. São Paulo, 2004. 212p. Tese de Doutorado. Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- [38] STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.26, p.62-69, 1968.
- [39] REGNIER, F.E.; NOEL, R. Glycerolpropylsilane bonded phases in steric exclusion chromatography of biological macromolecules. *Journal of Chromatographic Science*, v.14, n.7, p.316-320, 1976.
- [40] SCHIEL, J.E.; MALLIK, R.; SOMAN, S.; JOSEPH, K.S.; HAGE, D.S. Applications of silica supports in affinity chromatography. *Journal of Separation Science*, v.29, n.6, p.719-737, 2006.
- [41] HERMANSON, G.T. *Bioconjugate Techniques*. 2.ed. Amsterdam: Elsevier, 2008, 1202p.
- [42] ENRICHI, F.; RICCÒ, R.; SCOPECE, P.; PARMA, A.; MAZAHERI, A.R.; RIELLO, P.; BENEDETTI, A. Comparison of  $Eu(NO_3)_3$  and  $Eu(acac)_3$  precursors for doping

---

Capítulo 1 - Introdução

---

- luminescent silica nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, v.12, p.1925-1931, 2010.
- [43] TAN, W.; WANG, K.; HE, X.; ZHAO, X. J.; DRAKE, T.; WANG, L.; BAGWE, R.P. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Medicinal Research Reviews*, v.24, n.5, p.621-638, 2004.
- [44] FINNIE, K.S.; BARTLETT, J.R.; BARBE, C.J.A. KONG, L. Formation of silica nanoparticles in microemulsions. *Langmuir*, v.23, p.3017-3024, 2007.
- [45] KNOPP, D.; TANG, D.; NIESSNER, R. Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Analytica Chimica Acta*, v.647, p.14–30, 2009.
- [46] YAN, J.; ESTÉVEZ, M.C.; SMITH, J.E.; WANG, K.; HE, X.; WANG, L.; TAN, W. Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nanotoday*, v.2, n.3, p.44-50, 2007.
- [47] AIROLDI, C.; FARIAS, R.F. O uso de sílica gel organofuncionalizada como agente sequestrante para metais. *Química Nova*, v.23, n.4, p.496-503, 2000.
- [48] DOSEV, D.; NICHKOVA, M.; KENNEDY, I.M. Inorganic lanthanide nanophosphors in biotechnology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v.8, p.1052–1067, 2008.
- [49] BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. *Biochemistry*. 5.ed. San Francisco:W.H.Freeman, 2008, 1026p.
- [50] NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4.ed. San Francisco:W.H.Freeman, 2004, 1100p.
- [51] GILBERT, H.F. *Basic Concepts in Biochemistry*. 2.ed. New York:McGraw Hill, 2000, 331p.
- [52] JUNIOR, V.T.; PARRA, D.F.; PITOMBO, R.N.M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.1, p.127-136, 2006.
- [53] RAN, D.; Wu, X.; ZHENG, J.; YANG, J.; ZHOU, H.; ZHANG, M.; TANG, Y. Study on the interaction between florasulam and bovine serum albumin. *Journal of Fluorescence*, v.17, p.721-726, 2007.
- [54] VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, v.65, p.249-259, 2004.

---

Capítulo 1 - Introdução

- [55] WELINDER, K. G. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *Febs Letters*, v.72, p.19-23, 1976.
- [56] GIL, E.S.; KUBOTA, L.T.; YAMAMOTO, Y.I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Química Nova*, v.6, p.874-881, 1999.
- [57] TOMIYAMA, C.S. *Utilização de supermoléculas de β-dicetonatos de európio e samário como agentes de fluoroimunoensaio para detecção do antígeno específico da próstata (PSA)*. São Paulo, 2007. 191p. Tese de Doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Autarquia Associada à Universidade de São Paulo.
- [58] FERNANDES, J.L.; ORFOD, J.L.; GARCIA, C.; COELHO, O.R.; GIDLUND, M.; BLOTTA, M.H.S.L. Differences in human antioxidantized LDL autoantibodies in patients with stable and unstable angina. *Journal of Autoimmunity*, v.23, p.345-352, 2004.
- [59] SVENJO, E.; BOSCHCOV, P.; KETELHUTH, D.F.J.; JANCAR, S.; GIDLUND, M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. *Inflammation Research*, v.52, p.214-220, 2003.
- [60] CASQUERO, A.C.; BERTI, J.A.; SALERNO, A.G.; BIGHETTI, E.J.B.; CAZITA, P.M.; KETELHUTH, D.F.J.; GIDLUND, M.; OLIVEIRA, H.C.F. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by CETP expression in transgenic mice. *Journal of Lipid Research*, v.47, p.1526-1534, 2006.
- [61] BRANDÃO, S.A.; IZAR, M.C.; FISCHER, S.M.; SANTOS, A.O.; MONTEIRO, C.M.; POVOLA, R.M.; HELFENSTEIN, T.; CARVALHO, A.C.; MONTEIRO, A.M.; RAMOS, E.; GIDLUND, M.; NETO, A.F.M.; FONSECA, F.A. Early increase in autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein in hypertensive patients after blood pressure control. *American Journal of Hypertension*, v.23, p.208-214, 2010.
- [62] RIOS, F.J.O. *LDL modificada inibe a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão das enzimas NO sintase (iNOS) e ciclooxygenase-2 (COX-2) induzidas em macrófagos*. São Paulo, 2004. 99p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de São Paulo
- [63] ROSS, R.; GLOMSET, G.A. Atherosclerosis and arterial smooth-muscle cell. *Science*, v.180, p.1332-1339, 1973.

---

Capítulo 1 - Introdução

- [64] WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, v.88, p.1785-1792, 1991.
- [65] ROSOKY, R.M.A.; WOLOSKER, N.; NASSER, M.; ZERATI, A.E.; GIDLUND, M.; PUECH-LEÃO, P. Oxidized low-density lipoprotein and ankle-brachial pressure index in patients with clinically evident peripheral arterial disease. *Clinics*, v.65, p.383-387, 2010.
- [66] YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, v.184, p.1648-1649, 1959.
- [67] DIAMANDIS, P.E. Analytical methodology for immunoassays and DNA hybridization assays – current status and selected systems. *Clinica Chimica Acta*, v.194, p.19-50, 1990.
- [68] KAROL, P. J. Label. In Glossary of terms for radiochemistry and nuclear techniques ([http://www.iupac.org/V7\\_karol/Main.html](http://www.iupac.org/V7_karol/Main.html)), 2001.

# Capítulo 2

## Objetivos

---

---

## 2. Objetivos

- Preparar e caracterizar partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporando complexos  $\beta$ -dicetonatos (ACAC e TTA) e benzenotricarboxilatos (EMA, TLA e TMA) de terras raras de  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ .
- Estudar as propriedades fotoluminescentes dos sistemas preparados por meio de dados espectrais (excitação e emissão), eficiências quânticas de emissão experimental ( $\eta$ ), tempos de vida ( $\tau$ ) e parâmetros de intensidade ( $\Omega_\lambda$ ).
- Investigar a potencial aplicação das partículas, como marcadores biológicos em ensaios com a proteína albumina do soro bovino (BSA) e a enzima peroxidase de raiz forte (HRP).
- Desenvolver um protocolo para a detecção e quantificação da lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), através da detecção por luminescência da reação antígeno oxLDL–anticorpo anti-oxLDL–partícula luminescente amino-funcionalizada contendo complexos de  $\text{TR}^{3+}$ .

# Capítulo 4

## Caracterização

---

## 4. Caracterização

### 4.1. Síntese dos complexos de terras raras

Os dados de análise elementar (CHN) de carbono e hidrogênio e da titulação complexométrica para os íons TR<sup>3+</sup> dos complexos sintetizados são apresentados na [Tabela 4.1](#). Os resultados confirmam as seguintes fórmulas: [Eu(ACAC)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>] [\[1-3\]](#), [Eu(TTA)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] [\[4-6\]](#) e [TR(BTC)(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>] (TR<sup>3+</sup> = Eu<sup>3+</sup> ou Tb<sup>3+</sup> e n = 0, 2, 4 ou 6) [\[7\]](#). Todos os complexos apresentaram-se na forma de pó branco e fino, com exceção do complexo com o ligante TTA, que se apresentou amarelo.

**Tabela 4.1.** Porcentagens de C, H e dos íons TR<sup>3+</sup> dos complexos sintetizados.

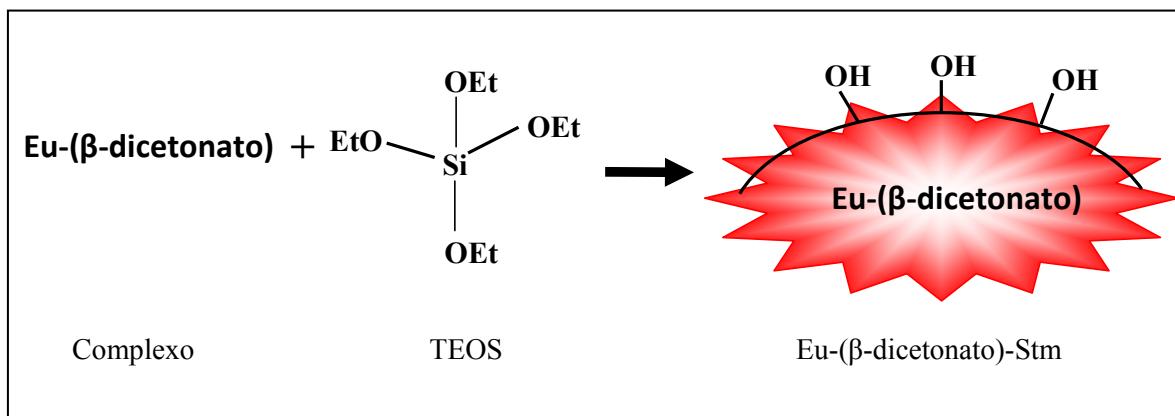
Complexo	% C		% H		% TR <sup>3+</sup>	
	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.
[Eu(ACAC) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ]	35,79	35,53	5,41	5,12	30,19	29,94
[Eu(TTA) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	33,85	33,98	1,89	1,95	17,85	17,50
[Eu(EMA)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	27,36	27,50	1,79	2,07	38,46	38,01
[Eu(TLA)(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ]	25,07	25,20	2,57	2,39	35,25	35,31
[Eu(TMA)(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	23,14	23,03	3,24	3,37	32,53	32,33
[Tb(EMA)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	26,88	26,79	1,75	2,10	39,53	39,35
[Tb(TLA)(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ]	24,67	24,59	2,53	2,45	36,28	36,58
[Tb(TMA)]	29,53	29,42	0,83	0,92	43,42	42,83

## 4.2. Preparação das partículas contendo os complexos de TR incorporados na sílica amino-funcionalizada

### 4.2.1. Partículas de sílica amino-funcionalizadas com o complexo Eu-(β-dicetonato): método Stöber

As partículas de sílica foram preparadas baseadas no método Stobér modificado [8-9].

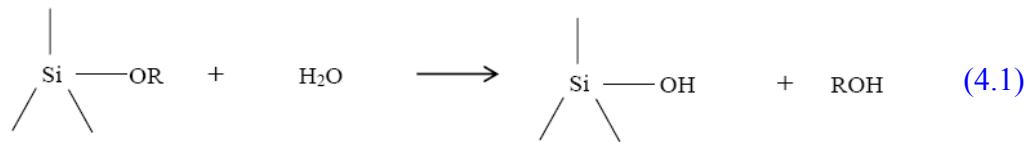
A reação envolveu a hidrólise e a condensação do ortosilicato de tetraetila (TEOS) na presença do complexo Eu-(β-dicetonato), onde β-dicetonato = ACAC e TTA, catalisada por NH<sub>4</sub>OH, em meio alcoólico (Figura 4.1).



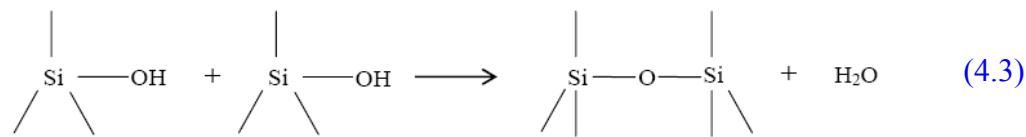
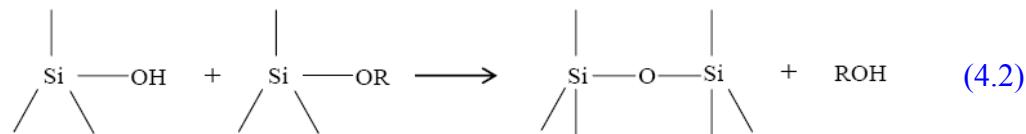
**Figura 4.1.** Representação esquemática do processo para a preparação de partículas de sílica incorporando o complexo Eu-(β-dicetonato) ( $[\text{Eu}(\text{ACAC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$  e  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ ), utilizando o método Stöber.

Deve-se ressaltar que as reações de hidrólise promovem a formação de grupos silanóis a partir de grupos alcóxidos (reação 4.1). Na condensação, ocorre o ataque nucleofílico do grupo silanol do alcoxisilano hidrolisado ao átomo de silício do alcoxisilano, produzindo álcool (reação 4.2) ou o ataque do grupo silanol ao átomo de silício de outro grupo silanol, produzindo água (reação 4.3) [10,11]. A condensação produzindo água ou álcool gera uma rede de sílica tridimensional.

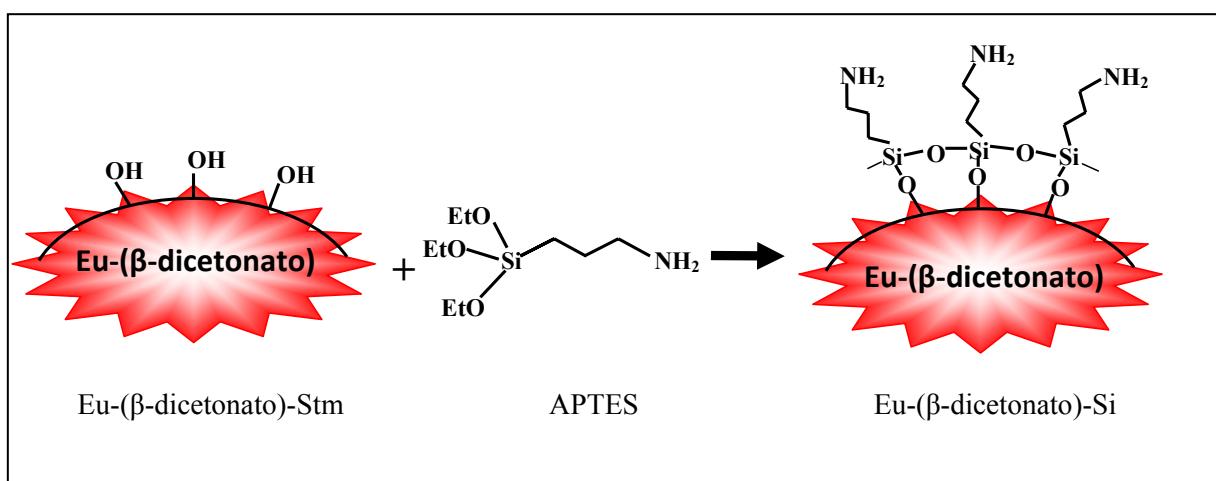
*Hidrólise*



*Condensação*



Em seguida, as partículas de sílica incorporadas com os complexos (na forma de pó) foram amino-funcionalizadas (Figura 4.2) utilizando o APTES (3-amino-propiltrióxilosilano), por meio da reação de silanização [12,13]. Esta reação compreende a hidrólise do grupo Si-O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> do reagente APTES, seguida pela reação de condensação do grupo Si-OH da superfície (reação 4.1) com o grupo Si-OH oriundo do APTES hidrolisado levando a formação do marcador luminescente Eu-(β-dicetonato)-Si (Figura 4.2).

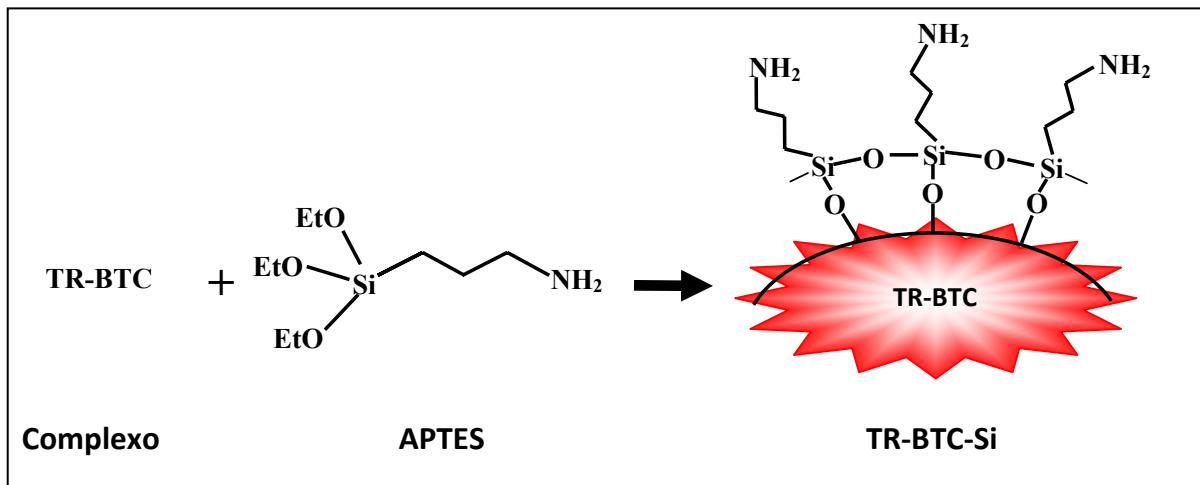


**Figura 4.2.** Representação esquemática da amino-funcionalização das partículas de sílica contendo o complexo Eu-(β-dicetonato) ( $[\text{Eu}(\text{ACAC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$  e  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ ), utilizando o método Stöber.

#### **4.2.2. Partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporadas com o complexo TR-BTC: método micro-ondas**

A utilização de uma rota alternativa para as reações de hidrólise e condensação do organosilano na presença do complexo de terras raras foi a reação pelo método micro-ondas. Deve-se considerar que os complexos de terras raras em questão TR-BTC ( $\text{TR}^{3+} = \text{Eu}^{3+}$  ou  $\text{Tb}^{3+}$  e  $\text{BTC}^{3-} = 1,2,3\text{-benzenotricarboxilato - EMA}$ ,  $1,2,4\text{-benzenotricarboxilato - TMA}$  e  $1,3,5\text{-benzenotricarboxilato - TMA}$ ) são insolúveis em água e em diferentes solventes orgânicos (dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metanol, etanol, isopropanol, acetona, clorofórmio, tetracloreto de carbono, tolueno, nitrometano etc.) [14]. Recentemente, diversos trabalhos [15-17] têm demonstrado a eficiência da reação de polimerização por meio de irradiação de micro-ondas. Assim sendo, o meio reacional é compreendido pelo complexo no estado sólido e o amino-silano no estado líquido.

Neste caso, na preparação das partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporadas com os complexos TR-BTC foi utilizada a reação por micro-ondas (Figura 4.3). Dados da literatura [18] indicam que o composto APTES não é susceptível à radiação de micro-ondas, portanto o complexo de TR absorve esta energia. A energia eletromagnética absorvida desencadeia a reação de polimerização. A transmissão de energia é dada por perda dielétrica, diferentemente do aquecimento convencional observado pelos processos de condução e convecção, e distribuída para o meio reacional [19-21]. A reação de polimerização do amino-silano ocorre na interface sólido-líquido, onde a camada de sílica interage covalentemente ao complexo de  $\text{TR}^{3+}$  [18].



**Figura 4.3.** Representação esquemática do processo para a preparação de partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporando o complexo TR-BTC ( $[\text{TR}(\text{EMA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,  $[\text{TR}(\text{TLA})(\text{H}_2\text{O})_4]$  e  $[\text{TR}(\text{TMA})(\text{H}_2\text{O})_n]$ , sendo  $n=6$  para o íon  $\text{Eu}^{3+}$  e 0 para o íon  $\text{Tb}^{3+}$ ), utilizando o método micro-ondas.

### 4.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho

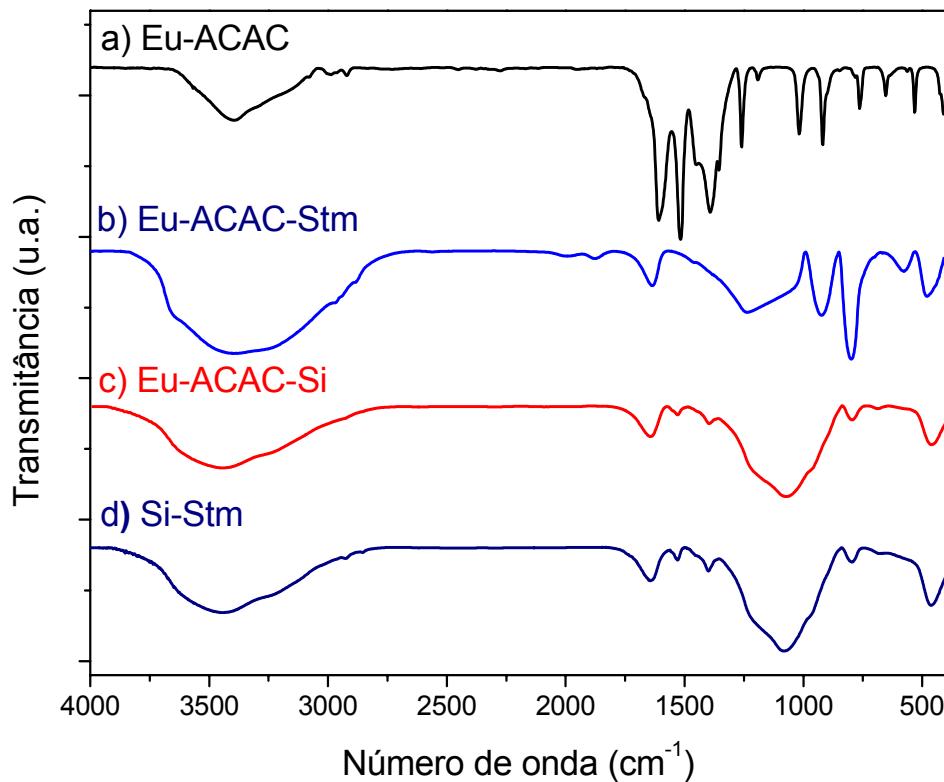
A técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) foi utilizada como ferramenta na caracterização das partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporadas com complexos de  $\text{TR}^{3+}$  com o intuito de investigar a presença de bandas de absorção referentes aos modos vibracionais da rede de sílica. Os espectros IV dos complexos e dos sistemas funcionalizados foram registrados em pastilhas de KBr na região espectral de 4000 à  $400 \text{ cm}^{-1}$ , à temperatura ambiente (298 K).

#### 4.3.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho: partículas de sílica amino-funcionalizadas contendo complexo de TR: método Stöber

A Tabela 4.2 apresenta as freqüências das principais atribuições dos modos vibracionais presentes na partícula de sílica (Si-Stm), nos complexos Eu-ACAC e Eu-TTA, na partícula de sílica que incorpora o complexo Eu-ACAC (Eu-ACAC-Stm) e na partícula de sílica amino-funcionalizada incorporada com o complexo Eu-ACAC (Eu-ACAC-Si) e Eu-

## Capítulo 4 - Caracterização

TTA (Eu-TTA-Si). Nesta parte, todas as amostras foram preparadas pelo método Stöber modificado.

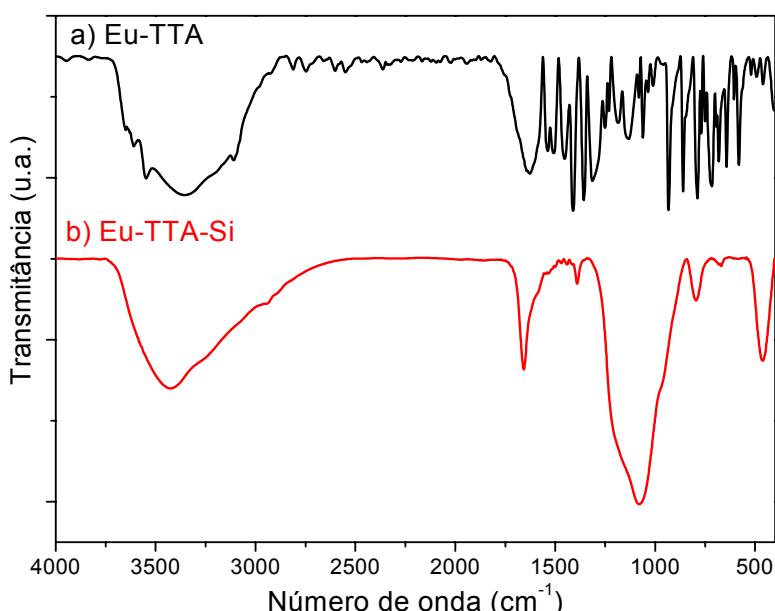


**Figura 4.4.** Espectros de absorção na região do infravermelho do a) complexo Eu-ACAC, b) da partícula de sílica incorporando o complexo Eu-ACAC, c) da partícula de sílica amino-funcionalizada incorporando o complexo Eu-ACAC e d) da partícula de sílica, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.

Os espectros de absorção dos complexos Eu-ACAC (Figura 4.4a) e Eu-TTA (Figura 4.5a) apresentam a banda de absorção referente ao estiramento simétrico do grupo carbonila ( $\nu_s \text{C=O}$ ) da dicetona deslocada para região de menor energia quando comparada com o respectivo ligante [22]. Este comportamento vibracional indica que os ligantes atuam como quelantes, os quais se coordenam ao íon  $\text{Eu}^{3+}$  através dos átomos de oxigênio dos grupos carbonilas. Ademais, a presença de uma banda larga situada na região de  $3400 \text{ cm}^{-1}$  confirma que a água presente no complexo refere-se à água coordenada ao íon metálico central, com fórmula geral de  $[\text{Eu}(\text{ACAC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$  e de  $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ .

## Capítulo 4 - Caracterização

Por outro lado, os espectros de absorção no infravermelho das amostras Eu-ACAC-Si (Figura 4.4b) e Eu-TTA-Si (Figura 4.5b) apresentam picos intensos em 1072 e  $1080\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, atribuídos ao estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si. Também são observados picos em torno de  $795\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento simétrico e outro em  $461\text{ cm}^{-1}$  atribuído à deformação angular da ligação Si-O-Si da sílica funcionalizada. Estes modos vibracionais indicam que a rede de sílica foi incorporada ao complexo.



**Figura 4.5.** Espectros de absorção na região do infravermelho do a) complexo Eu-TTA e da b) partícula de sílica amino-funcionalizada incorporando o complexo Eu-TTA, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.

Já a presença da banda de absorção em  $1650\text{ cm}^{-1}$  deve-se a deformação angular OH das moléculas de água fisiosorvidas. Também são observadas bandas largas referentes ao estiramento OH do silanol e da água adsorvida, centradas em  $3442\text{ cm}^{-1}$  para o Eu-ACAC-Si e  $3425\text{ cm}^{-1}$  para o Eu-TTA-Si. No entanto, o modo vibracional da ligação NH não pode ser observado, pois sobrepõe com modos vibracionais do OH. Portanto, os principais modos vibracionais da rede de sílica são observados na partícula Si-Stm (Figura 4.4d) e na partícula Eu-ACAC-Stm (Fig. 4.4c). No material Eu-ACAC-Stm, a deformação axial assimétrica da ligação Si–O–Si aparece como uma banda larga entre  $1500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ .

A ausência das bandas de absorção no IV relativos aos modos vibracionais dos complexos de terras raras nos materiais amino-funcionalizados, na região entre 1770-400 cm<sup>-1</sup>, é provavelmente devido ao fato da baixa concentração de complexo em relação à sílica [23-26].

**Tabela 4.2.** Atribuição das freqüências (cm<sup>-1</sup>) dos principais modos vibracionais das ligações presentes nos materiais Eu-ACAC, Eu-TTA, Eu-ACAC-Si, Eu-TTA-Si, Eu-ACAC-Stm e Si-Stm.

Material	Atribuição dos modos vibracionais						
	$\nu$ (O-H)	$\delta$ (O-H)	$\nu_s$ (C $\ddot{\text{:}}$ O)	$\nu_{as}$ (C $\ddot{\text{:}}$ C)	$\delta_{as}$ (CH <sub>3</sub> )	$\nu_{as}$ (Si-O-Si)	$\nu_s$ (Si-O-Si)
Eu-ACAC	3406	–	1610	1518	1450	–	–
Eu-TTA	3355	*	1627	1539	–	–	–
Eu-ACAC-Si	3442	1644	–	–	–	1072	795
Eu-TTA-Si	3425	1656	–	–	–	1080	796
Eu-ACAC-Stm	3404	1637	–	–	–	1050	800
Si-Stm	3448	1643	–	–	–	1082	798

\*Região no espectro com banda larga

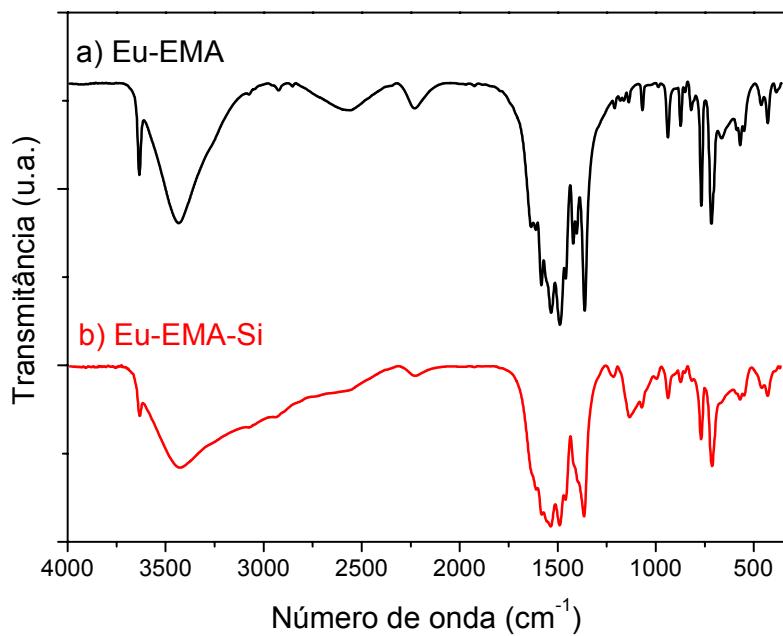
#### 4.3.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho: partículas de sílica amino-funcionalizadas contendo complexo de TR: método micro-ondas

As partículas funcionalizadas contendo os complexos benzenotricarboxilatos de terras raras (TR-BTC-Si) preparadas por meio da reação por micro-ondas exibem também as bandas de absorção na região do infravermelho referentes aos complexos precursores (Figuras 4.6 a 4.11).

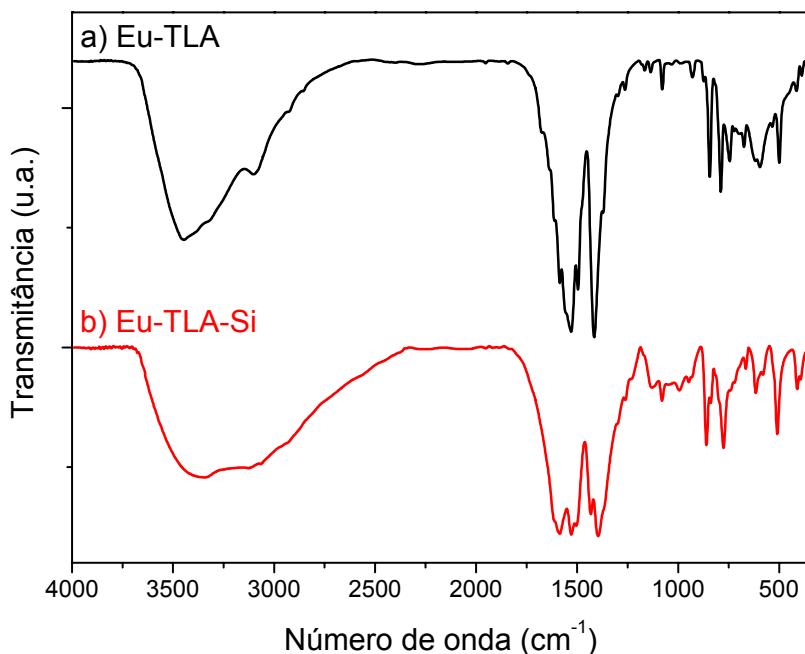
Os complexos TR-BTC apresentam bandas de estiramento simétrico e assimétrico, referentes ao grupamento  $\text{COO}^-$  (carboxilato), situados entre a faixa espectral de 1363 a 1414  $\text{cm}^{-1}$  e 1491 a 1583  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Os estiramendos simétrico ( $\sim 2675 \text{ cm}^{-1}$ ) e assimétrico ( $\sim 2535 \text{ cm}^{-1}$ ) da ligação OH do dímero ácido não são observados, que sugere a complexação dos ligantes por meio dos átomos de oxigênio do grupo carboxilato. Todos os complexos TR-BTC apresentam uma banda larga na região de 3500  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento OH da molécula de água coordenada ao íon central, exceto para os complexos TR-TMA anidros ( $\text{TR}^{3+} = \text{Tb a Lu}$ ), como citado na literatura [7].

Os espectros de absorção no IV do sistema TR-BTC-Si mostram uma banda larga no intervalo espectral de 1100-1000  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si, indicativo da formação da rede de sílica. O perfil espectral da banda alargada na região de 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao modo de vibração Si-OH, presente na superfície do material. O modo vibracional da ligação NH é localizado nesta mesma região. Enquanto que, a banda estreita localizada em torno de 3750  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  livre [23-26].

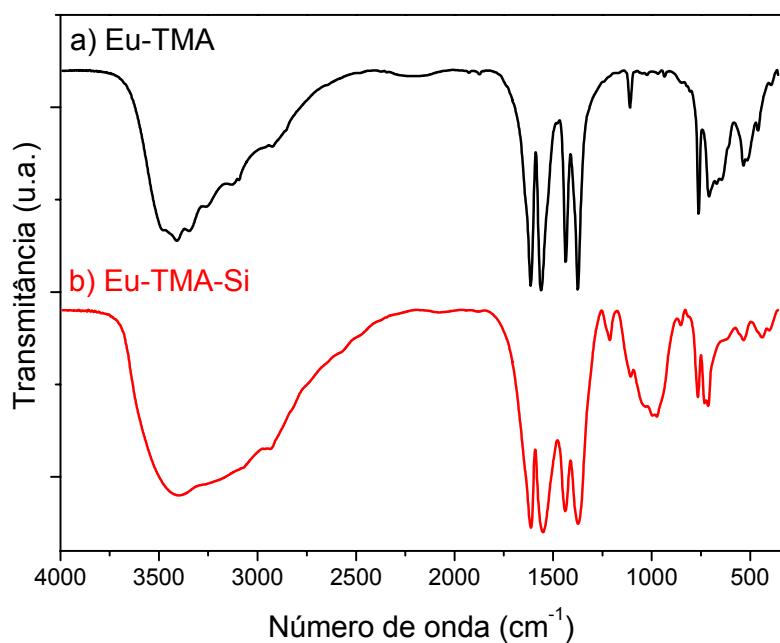
Com base nos dados espetrais na região do infravermelho nota-se a preservação das principais características vibracionais dos complexos TR-BTC após a amino-funcionalização, por meio da reação utilizando micro-ondas [27,28]. Este resultado indica que o material TR-BTC-Si apresenta as características da rede de sílica bem como do complexo luminescente TR-BTC. Ao contrário, o material Tb-TMA-Si não apresentou estas características vibracionais, provavelmente seja devido ao complexo precursor Tb-TMA ser anidro (Tabela 4.3).



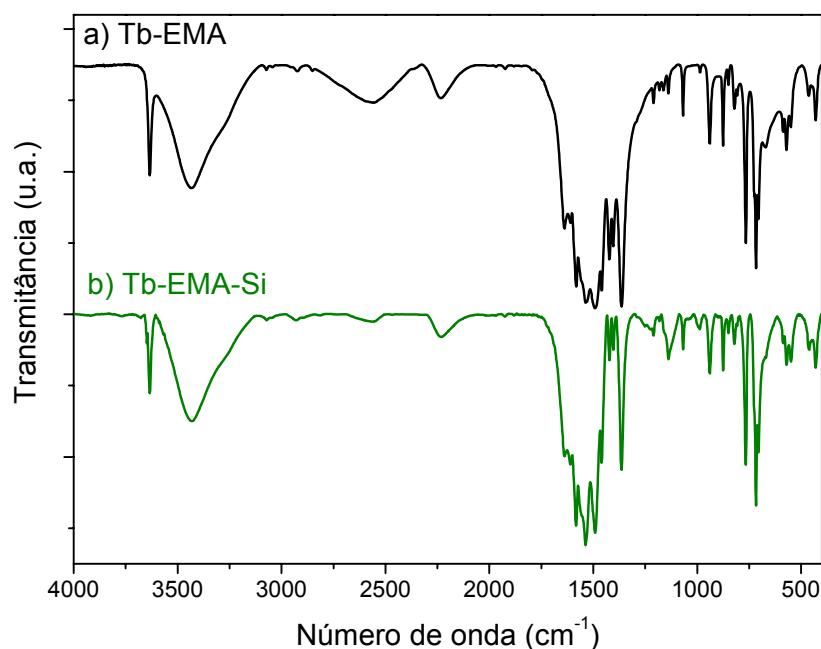
**Figura 4.6.** Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Eu-EMA e b) da partícula Eu-EMA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.



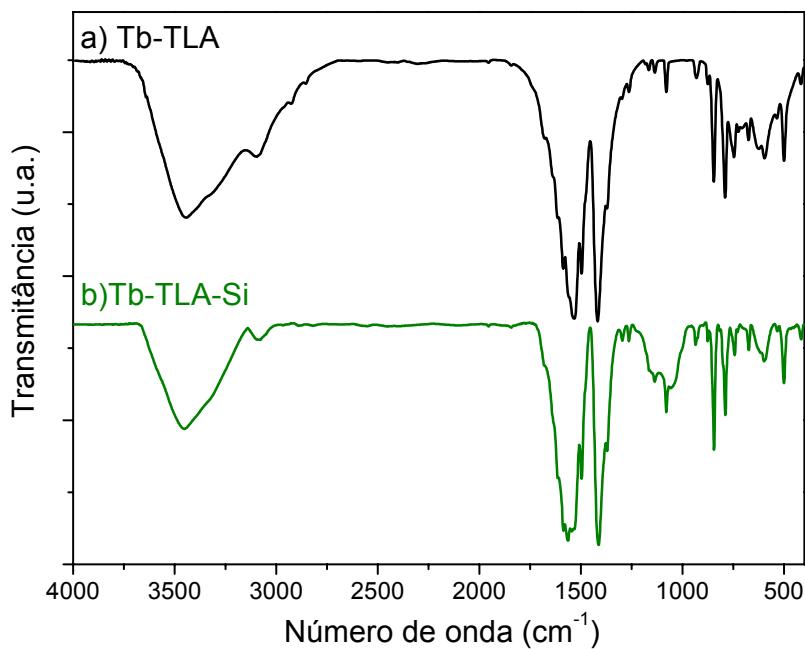
**Figura 4.7.** Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Eu-TLA e b) da partícula Eu-TLA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.



**Figura 4.8.** Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Eu-TMA e b) da partícula Eu-TMA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.

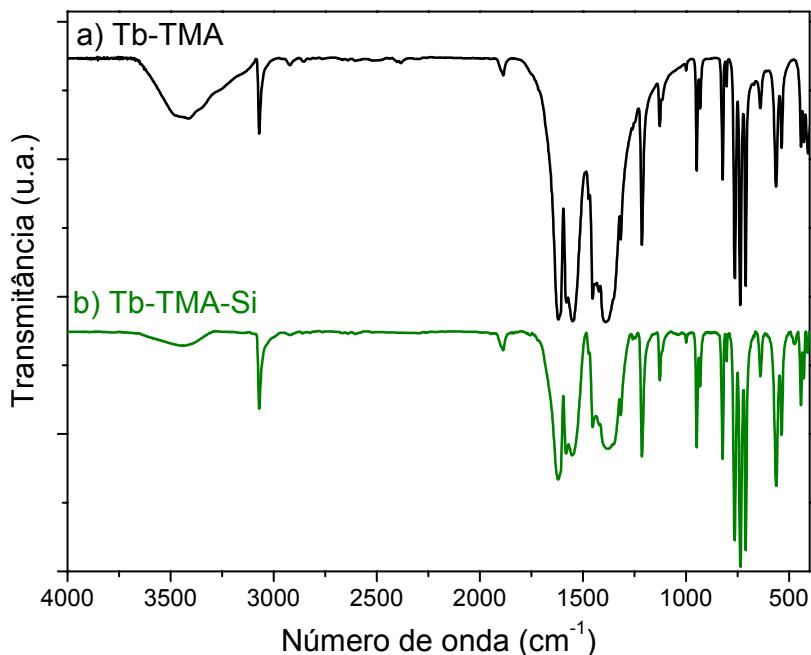


**Figura 4.9.** Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Tb-EMA e b) da partícula Tb-EMA-Si (b), obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.



**Figura 4.10.** Espectros de absorção na região do infravermelho: a) do complexo Tb-TLA e b) da partícula Tb-TLA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.

A Figura 4.11 apresenta ao espectro de absorção do complexo Tb-TMA anidro, porém é observada uma banda de em torno de  $3400 \text{ cm}^{-1}$  referente ao modo vibracional OH oriunda da água absorvida pela pastilha de KBr (Figura 4.11).



**Figura 4.11.** Espectros de absorção na região do infravermelho a) do complexo Tb-TMA e b) da partícula Tb-TMA-Si, obtidos em pastilha de KBr e à temperatura ambiente.

**Tabela 4.3.** Atribuição das freqüências ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos principais modos vibracionais dos complexos TR-BTC e dos materiais TR-BTC-Si.

Material	Atribuição dos modos vibracionais					
	O–H (livre)	$\nu$ (O–H)	$\nu_s$ (COO <sup>-</sup> )	$\nu_{as}$ (COO <sup>-</sup> )	$\nu_{as}$ (Si–O–Si)	$\nu_s$ (Si–O–Si)
Eu-EMA	3633	3435	1363	1489	—	—
Eu-EMA-Si	3631	3427	1365	1489	1134	—
Eu-TLA	—	3412	1373	1562	—	—
Eu-TLA-Si	—	3408	1373	1552	—	973
Eu-TMA	—	3450	1415	1531	—	—
Eu-TMA-Si	—	3344	1398	1529	—	991
Tb-EMA	3633	3433	1363	1490	—	—
Tb-EMA-Si	3633	3435	1365	1492	1137	—
Tb-TLA	—	3442	1417	1535	—	—
Tb-TLA-Si	—	3448	1413	1564	*	—
Tb-TMA	—	3420	1386	1550	—	—
Tb-TMA-Si	—	3439	1375	1548	**	**

\* Apresenta uma banda larga na região 1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ , devido aos modos vibracionais da rede de sílica.

\*\* Ausência dos modos vibracionais da rede de sílica.

## 4.4. Difratometria de raios X

### 4.4.1. Difratometria de raios X dos complexos Eu-(β-dicetonato) e das partículas Eu-(β-dicetonato)-Si: método Stöber

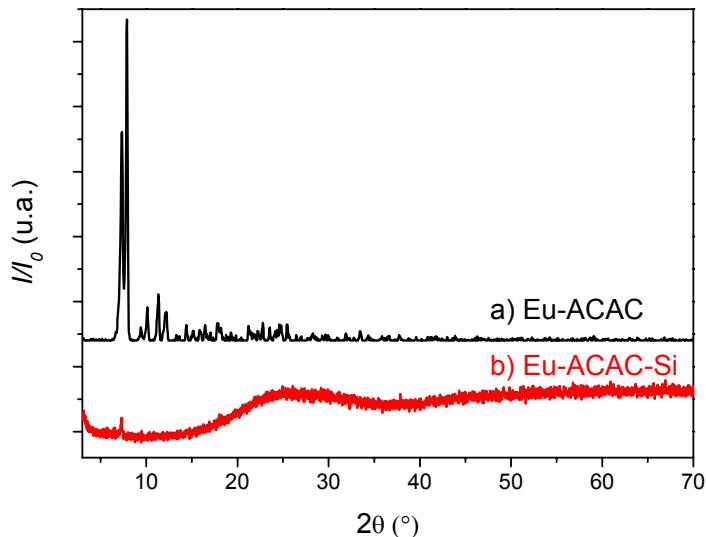
A [Figura 4.12](#) apresenta os difratogramas de raios X do complexo Eu-ACAC e da partícula de sílica amino-funcionalizada Eu-ACAC-Si preparada pelo método Stöber, no intervalo de 3 a 70°. Observa-se que o complexo Eu-ACAC ([Figura 4.12a](#)) apresenta vários picos de difração, indicando alta cristalinidade do composto de coordenação. Por outro lado, o difratograma de raios X do sistema Eu-ACAC-Si ([Figura 4.12a](#)) exibe apenas uma banda

---

 Capítulo 4 - Caracterização
 

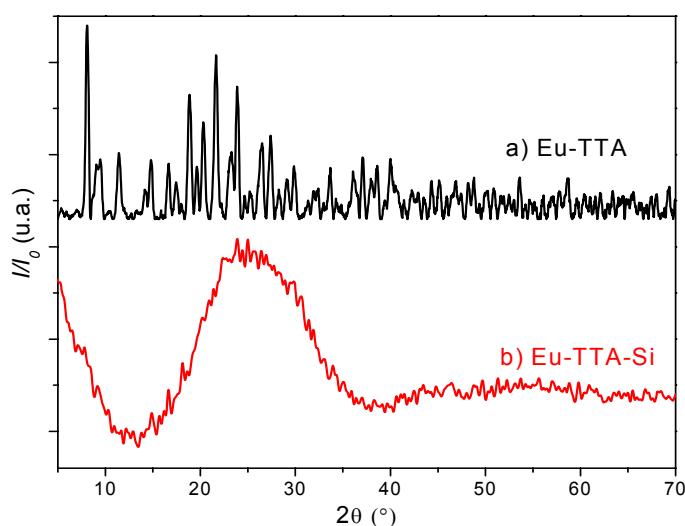
---

larga centrada em  $2\theta = 25^\circ$ , característico de sílica amorfa corroborado com os dados da literatura [24,25,29].



**Figura 4.12.** Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-ACAC e b) material Eu-ACAC-Si.

Nota-se a partir dos difratogramas de raios X, que os sistemas Eu-(ACAC)-Si (Figura 4.12b) e Eu-TTA-Si (Figura 4.13b) apresentam perfil cristalográfico característico da sílica amorfa, com poucos picos de difração referentes aos complexos precursores Eu-ACAC (Figura 4.12a) e Eu-TTA (Figura 4.13a). Isto se deve a diferentes interações entre os complexos de terras raras e a rede sílica no processo de silanização para o sistema preparado pelo método Stöber [30-33].



**Figura 4.13.** Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-TTA e b) material Eu-TTA-Si.

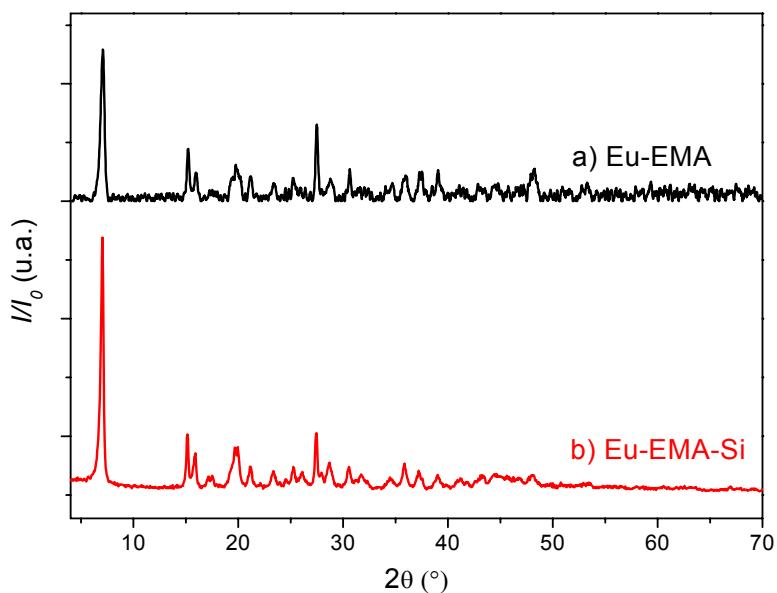
#### **4.4.2. Difratometria de raios X dos complexos TR-BTC e das partículas TR-BTC-Si: método micro-ondas**

Os difratogramas de raios X dos complexos TR-BTC (BTC = EMA, TLA e TMA) e das partículas de sílica amino-funcionalizadas TR-BTC-Si preparadas pelo método utilizando micro-ondas, no intervalo de 3 a 70°, estão apresentadas nas [Figuras 4.14 a 4.19](#). Os difratogramas dos materiais luminescentes Eu-TLA-Si ([Figura 4.15b](#)) e Eu-TMA-Si ([Figura 4.16b](#)) exibem uma banda larga centrada em  $2\theta = 25^\circ$  atribuída a banda de difração da sílica  $\text{SiO}_2$  evidenciando a forma amorfa [\[24,25,29\]](#). Observam-se também picos de difração característicos dos respectivos complexos incorporados, mostrando que a estrutura cristalina do composto de coordenação não foi comprometida com a silanização, mantendo suas propriedades cristalinas.

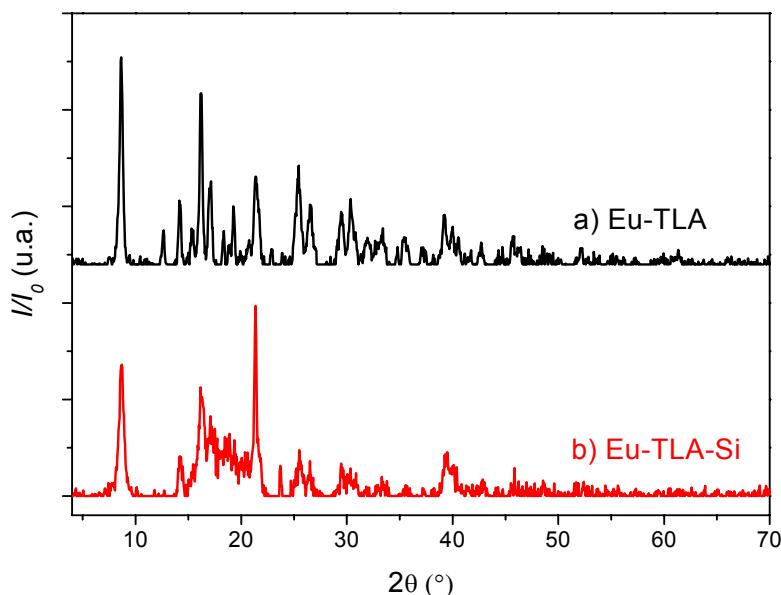
O difratograma do sistema incorporado com o complexo Eu-TLA ([Figura 4.15b](#)) evidencia maior cristalinidade devido ao menor recobrimento da rede de sílica comparado com o sistema contendo o complexo Eu-TMA ([Figura 4.16b](#)). Além do mais, o difratograma de raios X do material Eu-EMA-Si ([Figuras 4.14b](#)) não apresenta a banda característica da sílica amorfa, sugerindo baixa concentração da sílica neste material.

Nesta etapa do trabalho foi observado que a preparação por micro-ondas das partículas Eu-BTC-Si, onde Eu-BTC =  $[\text{Eu}(\text{EMA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,  $[\text{Eu}(\text{TLA})(\text{H}_2\text{O})_4]$  e  $[\text{Eu}(\text{TMA})(\text{H}_2\text{O})_6]$  utilizando o APTES como fonte de sílica depende do número de água coordenada ao íon terra rara. Portanto, notou-se que com o aumento do número de água coordenada de 2, 4 e 6 aumenta também o caráter amorfo do sistema, evidenciada pelo perfil dos picos alargados dos difratogramas de raios X ilustrados nas [Figuras 4.14 a 4.16](#). Estes dados de difração corroboram com aqueles obtidos pela técnica de espectroscopia vibracional a partir dos espectros no infravermelho, que apresentaram bandas de absorção referentes aos modos vibracionais do complexo Eu-BTC na partícula de sílica amino-funcionalizada ([Tabela 4.3](#)).

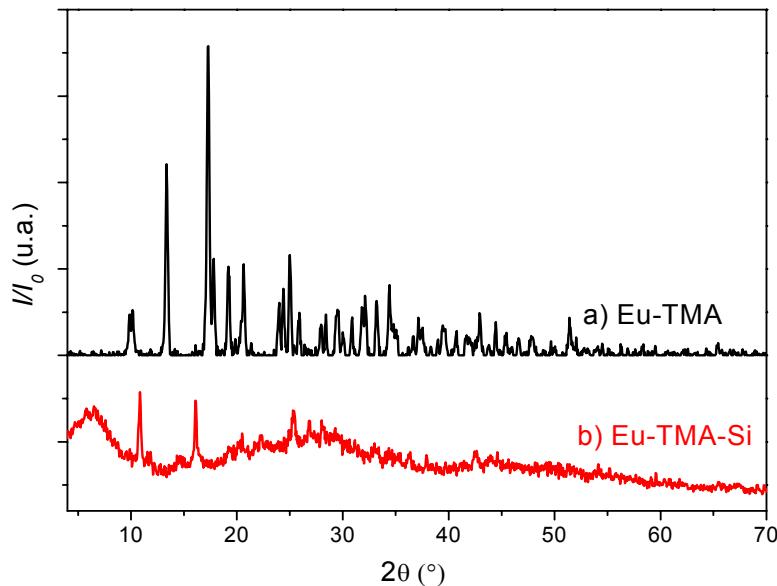
Outro ponto importante em relação ao método de preparação por micro-ondas é que o processo de hidrólise e condensação da sílica para a formação da rede revestindo o complexo envolve apenas uma fonte de sílica (APTES). Por outro lado, na preparação do material utilizando o método Stöber foram realizadas duas etapas de silanização compreendendo da hidrólise e condensação do TEOS, seguida pelo APTES. Este resultado indica que a camada de sílica é mais fina quando se utiliza o método micro-ondas.



**Figura 4.14.** Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-EMA e b) material Eu-EMA-Si.

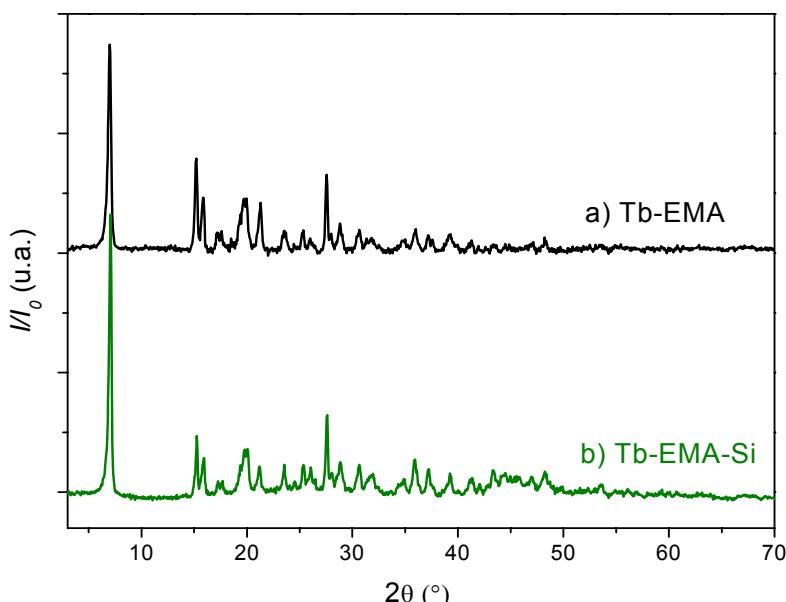


**Figura 4.15.** Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si.

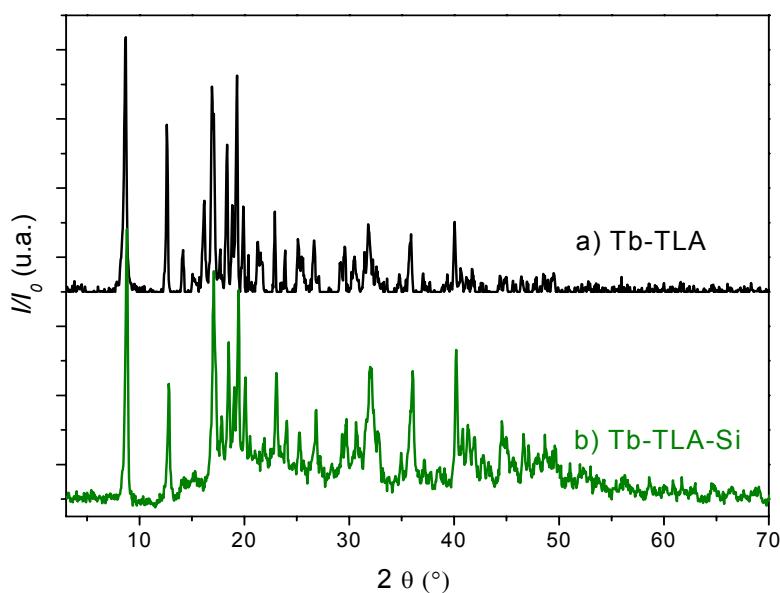


**Figura 4.16.** Difratogramas de raios X do a) complexo Eu-TMA e b) material Eu-TMA-Si.

As Figuras 4.17 a 4.19 mostram os difratogramas de raios X dos complexos Tb-BTC e dos materiais Tb-BTC-Si. A silanização do complexo Tb-EMA não provocou mudanças nas difrações, indicando uma pequena quantidade de rede de sílica incorporada ao complexo (Figura 4.17b). Os difratogramas nas Figuras 4.18b e 4.19b referentes aos materiais Tb-TLA-Si e Tb-TMA-Si, respectivamente, apresentam mudanças no perfil de difração. É verificado uma banda larga centrada em  $2\theta = 22^\circ$  (Figuras 4.18b) atribuída a banda larga de difração da sílica amorfa  $\text{SiO}_2$  e picos característicos do complexo Tb-TLA.

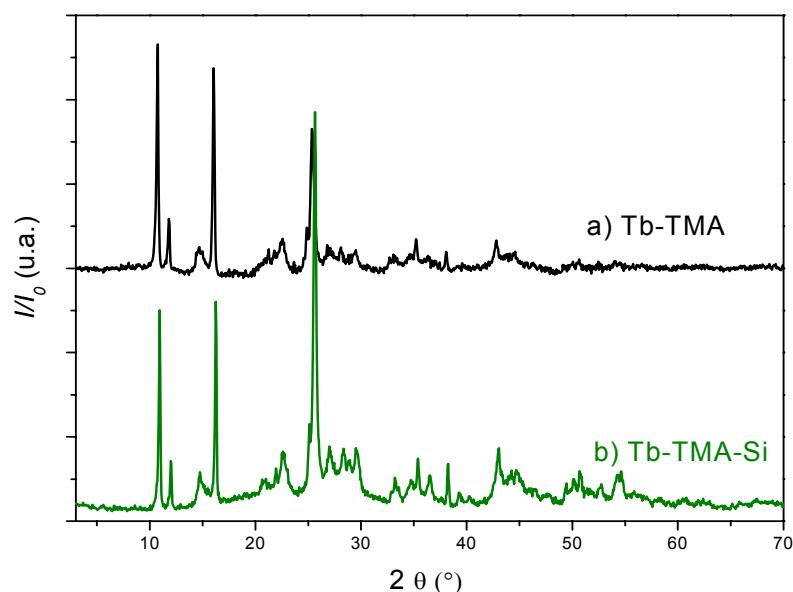


**Figura 4.17.** Difratogramas de raios X do a) complexo Tb-EMA e b) material Tb-EMA-Si.



**Figura 4.18.** Difratogramas de raios X do a) complexo Tb-TLA e b) material Tb-TLA-Si.

No entanto, o difratograma de raios X do material Tb-TMA-Si (Figuras 4.19b) apresenta alterações nas intensidades dos picos de difração comparado com as difrações referentes ao complexo, indicando que incorporação de sílica afeta preferencialmente o plano cristalográfico com reflexão em  $2\theta = 25^\circ$  do complexo Tb-TMA. Verifica-se um deslocamento das reflexões para valores maiores de  $2\theta$  com a incorporação de sílica, o que indica que o material deve apresentar menores parâmetros de célula.



**Figura 4.19.** Difratogramas de raios X do a) complexo Tb-TMA e b) material Tb-TMA-Si.

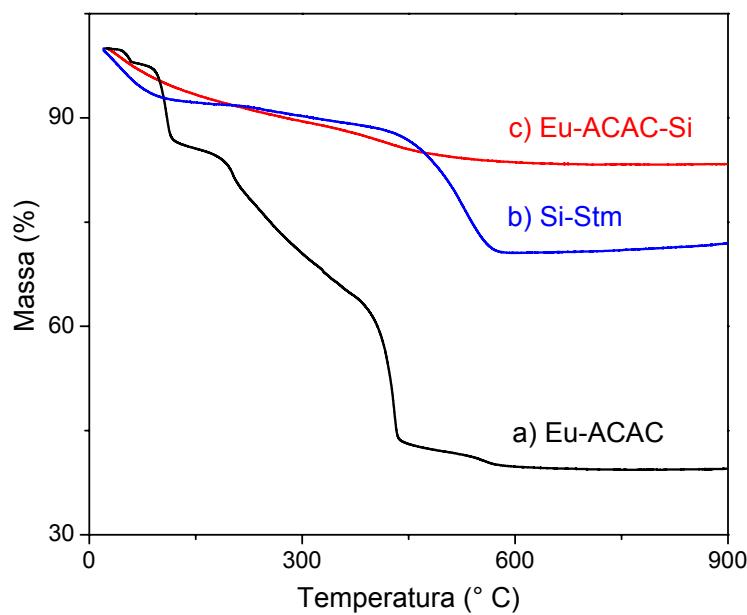
## 4.5. Análise Térmica

Análise térmica, segundo o Comitê Internacional de Análises Térmicas (ICTA) e a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC compreende um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química da substância, ou de um de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou da temperatura. Neste caso, a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada [34,35]. A termogravimetria (TG) é uma técnica na qual a massa de uma amostra é medida em função da temperatura.

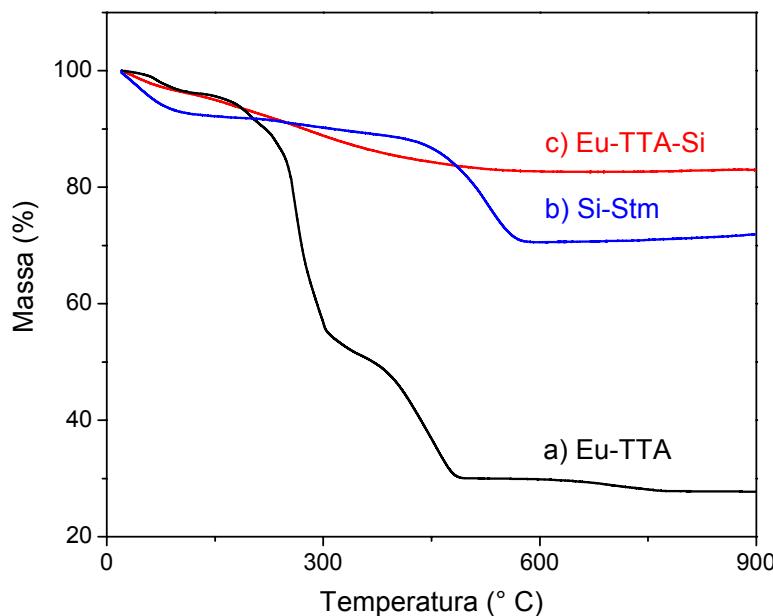
### 4.5.1. Termogravimetria dos complexos Eu-( $\beta$ -dicetonato) e das partículas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si: método Stöber

As [Figuras 4.20 e 4.21](#) mostram as curvas termogravimétricas, variação da massa da amostra em função de uma rampa de aquecimento, para os complexos de Eu-( $\beta$ -dicetonato), para os sistemas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e para a partícula Si-Stm.

De um modo geral, as curvas TG dos complexos Eu-ACAC ([Figuras 4.20a](#)) e Eu-TTA ([Figura 4.21a](#)) apresentam-se complexas sem patamares com linhas horizontais bem definidas, o que tem dificultado uma atribuição dos processos envolvidos nas reações de termodecomposição, que acontecem de formas consecutivas. Para estes complexos, observam-se inicialmente eventos relativos ao processo de desidratação e perda das águas coordenadas ao íon terra rara, no intervalo de 50 a 116 °C. Após estes eventos, as perdas de massa correspondem à decomposição térmica dos ligantes, apresentando uma perda de massa significativa ([Tabela 4.4](#)). O resíduo final do complexo Eu-ACAC está associado à formação do óxido de terra rara de fórmula  $\text{TR}_2\text{O}_3$ , enquanto que o resíduo final dos complexos de TTA está associado à formação dos oxifluoretos, TROF.



**Figura 4.20.** Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-ACAC, b) partícula Si-Stm e do c) material Eu-ACAC-Si.



**Figura 4.21.** Curva termogravimétrica do a) complexo Eu-TTA, b) partícula Si-Stm e c) do material Eu-TTA-Si.

O perfil das curvas TG para os materiais Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si são similares (Figuras 4.20c e 4.21c). A perda de massa até 200 °C está associada a perda de água e da dehidroxilação. Nota-se no intervalo de temperatura entre 200 e 700 °C a decomposição

---

 Capítulo 4 - Caracterização
 

---

térmica do APTES e do respectivo complexo de terra rara [36,37]. Já a curva TG da partícula Si-Stm (Figuras 4.20b) evidenciou, entre 25 e 100 °C, perda de massa correspondente à eliminação de água e álcool fracamente ligadas a superfície do material. Além do mais, a perda de massa entre 100 e 600 °C corresponde as moléculas de água e álcool presentes no interior da estrutura da partícula, assim como a pirólise dos grupos etóxi (-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) residuais. Neste intervalo ocorre também a reação de condensação e colapso da estrutura inorgânica, resultando em SiO<sub>2</sub> [38].

Com base nas curvas termogravimétricas ilustradas nas Figuras 4.20 e 4.21, observa-se que o resíduo final dos materiais Eu-(β-dicetonato)-Si é maior do que no sistema Si-Stm, indicando a interação do complexo no processo de incorporação na rede de sílica.

**Tabela 4.4.** Perda de massa dos complexos Eu-ACAC e Eu-TTA e dos materiais Eu-ACAC-Si e Eu-TTA-Si.

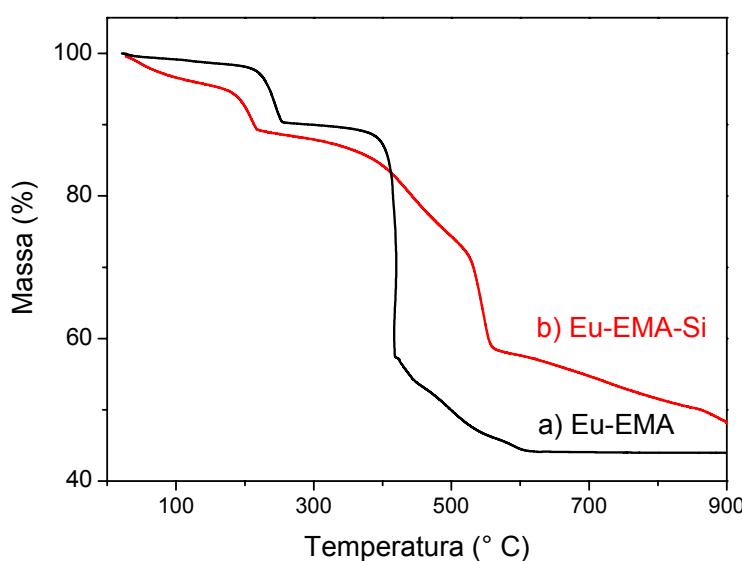
Composto	Intervalo de temperatura (°C)	Δm (%)
Eu-ACAC	50 - 70	4,5
	70-120	11,1
	120-730	47,3
Eu-ACAC-Si	25-730	16,7
Eu-TTA	25-110	3,6
	110-210	5,3
	210-750	63,0
Eu-TTA-Si	25-700	17,4
Si-Stm	25-100	7,0
	100-600	22,4

---

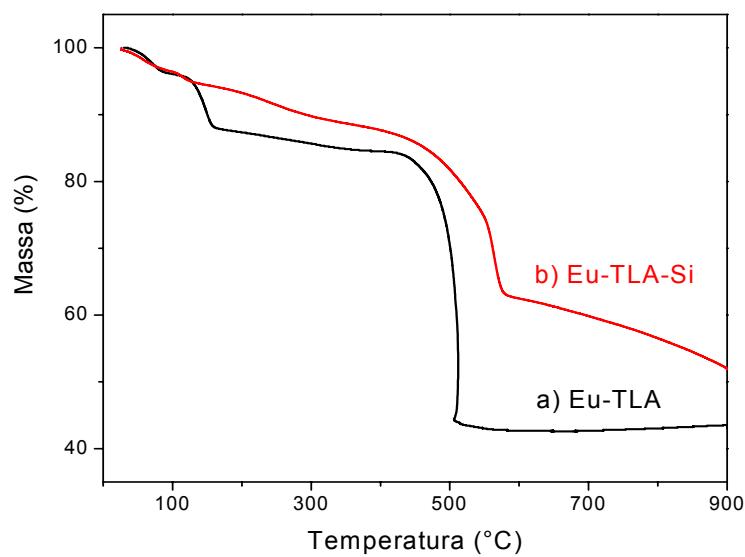
#### 4.5.2. Termogravimetria dos complexos TR-BTC e das partículas TR-BTC-Si: método micro-ondas

As curvas termogravimétricas dos complexos TR-BTC (BTC = EMA, TLA e TMA) e das partículas de sílica amino-funcionalizadas TR-BTC-Si são mostradas nas [Figuras 4.22 a 4.27](#). Perdas de massa abaixo de 50 °C são atribuídas a evaporação de água fisirosorvida. Os eventos de desidratação dos complexos TR-BTC confirmam o número de moléculas água coordenada ao íon terra rara [\[14\]](#). Os valores percentuais de perdas de massa dos compostos estão discriminados nas [Tabelas 4.5 e 4.6](#).

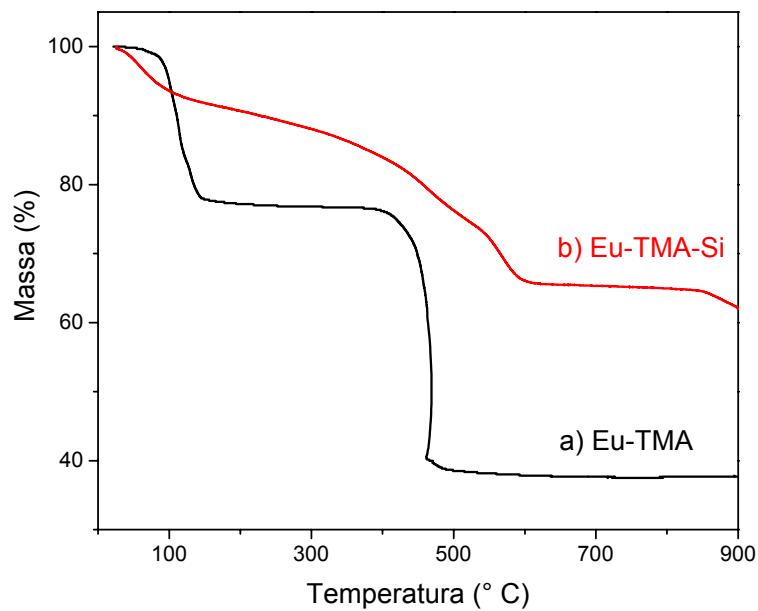
O perfil da curva termogravimétrica dos complexos precursores TR-BTC utilizados na reação de silanização difere do material amino-funcionalizado TR-BTC-Si em todos os casos, exceto para o Tb-TMA-Si ([Figura 4.27b](#)). Esta observação confirma a presença da rede de sílica amino-funcionalizada nos materiais TR-BTC-Si. A decomposição da matéria orgânica nos sólidos amino-funcionalizados foi em menor percentagem que o observado nos complexos, devido a presença de óxido de silício no resíduo, indicando interação do complexo luminescente no material TR-BTC-Si.



**Figura 4.22.** Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-EMA e b) material Eu-EMA-Si.



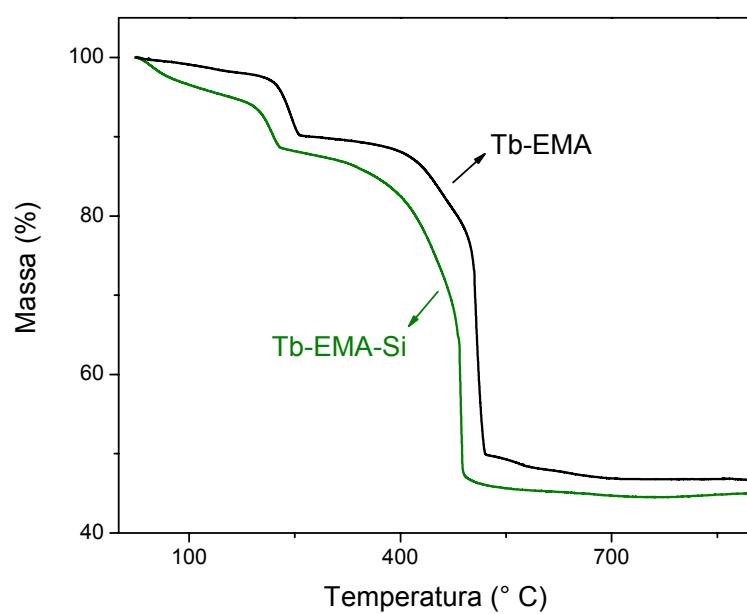
**Figura 4.23.** Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si.

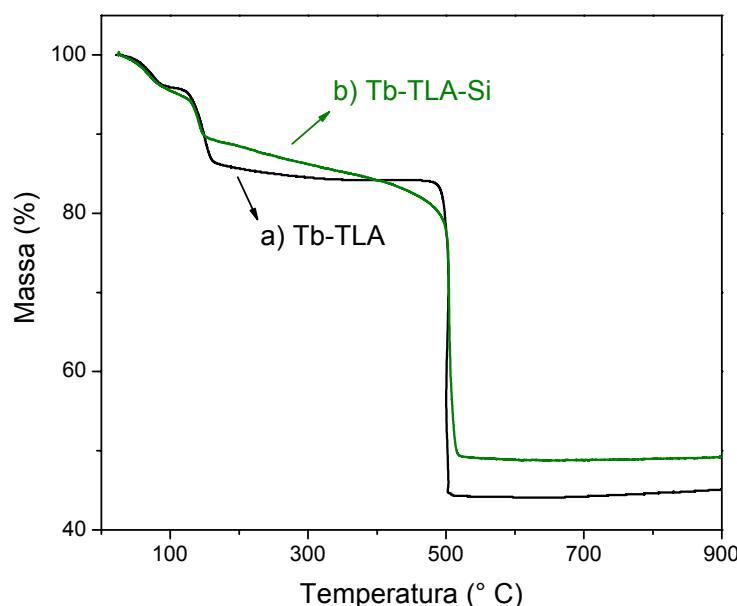


**Figura 4.24.** Curvas termogravimétricas do a) complexo Eu-TMA e b) material Eu-TMA-Si.

**Tabela 4.5.** Perda de massa dos complexos Eu-BTC e dos materiais Eu-BTC-Si.

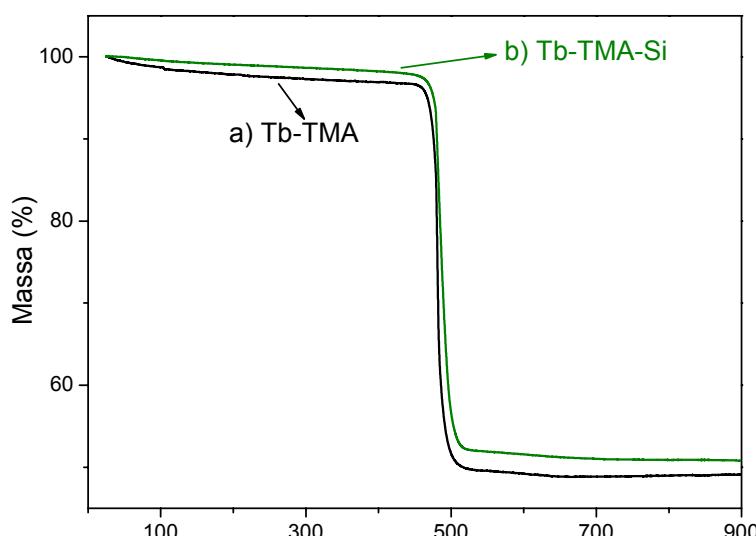
Composto	Intervalo de temperatura (° C)	$\Delta m$ (%)
Eu-EMA	50-260	9,2
	350-700	45,5
Eu-EMA-Si	25-220	10,7
	219-900	41,2
Eu-TLA	50-170	12,0
	350-600	42,1
Eu-TLA-Si	25-300	10,3
	300-900	37,9
Eu-TMA	50-150	22,0
	300-600	38,8
Eu-TMA-Si	25-150	8,2
	150-900	29,8

**Figura 4.25.** Curvas termogravimétricas do a) complexo Tb-EMA e b) material Tb-EMA-Si.



**Figura 4.26.** Curvas termogravimétricas do a) complexo Tb-TLA e b) material Tb-TLA-Si.

Também foi observado que o complexo Tb-TMA (Figura 4.27a) não apresenta perda de massa referente a eventos de desidratação, corroborando com os dados de análise elementar. O comportamento análogo foi observado no material Tb-TMA-Si (Figura 4.27b).



**Figura 4.27.** Curvas termogravimétricas do a) complexo Tb-TMA e b) material Tb-TMA-Si.

**Tabela 4.6.** Perda de massa dos complexos Tb-BTC e dos materiais Tb-BTC-Si.

Composto	Intervalo de temperatura (° C)	Δm (%)
Tb-EMA	50-260	9,5
	330-700	42,6
Tb-EMA-Si	25-230	11,4
	330-700	41,7
Tb-TLA	50-200	13,6
	450-600	40,2
Tb-TLA-Si	25-200	11,5
	200-600	39,6
Tb-TMA	400-650	48,1
Tb-TMA-Si	400-650	47,0

As curvas termogravimétricas dos materiais de sílica amino-funcionalizadas indicaram a interação dos complexos precursores com a rede de sílica, levando a formação de resíduo constituído por óxidos de európio e sílica. Ademais, a preparação do material luminescente amino-funcionalizado pelo método Stöber apresenta uma maior quantidade de sílica, dado a utilização de duas etapas de silanização da fonte de sílica.

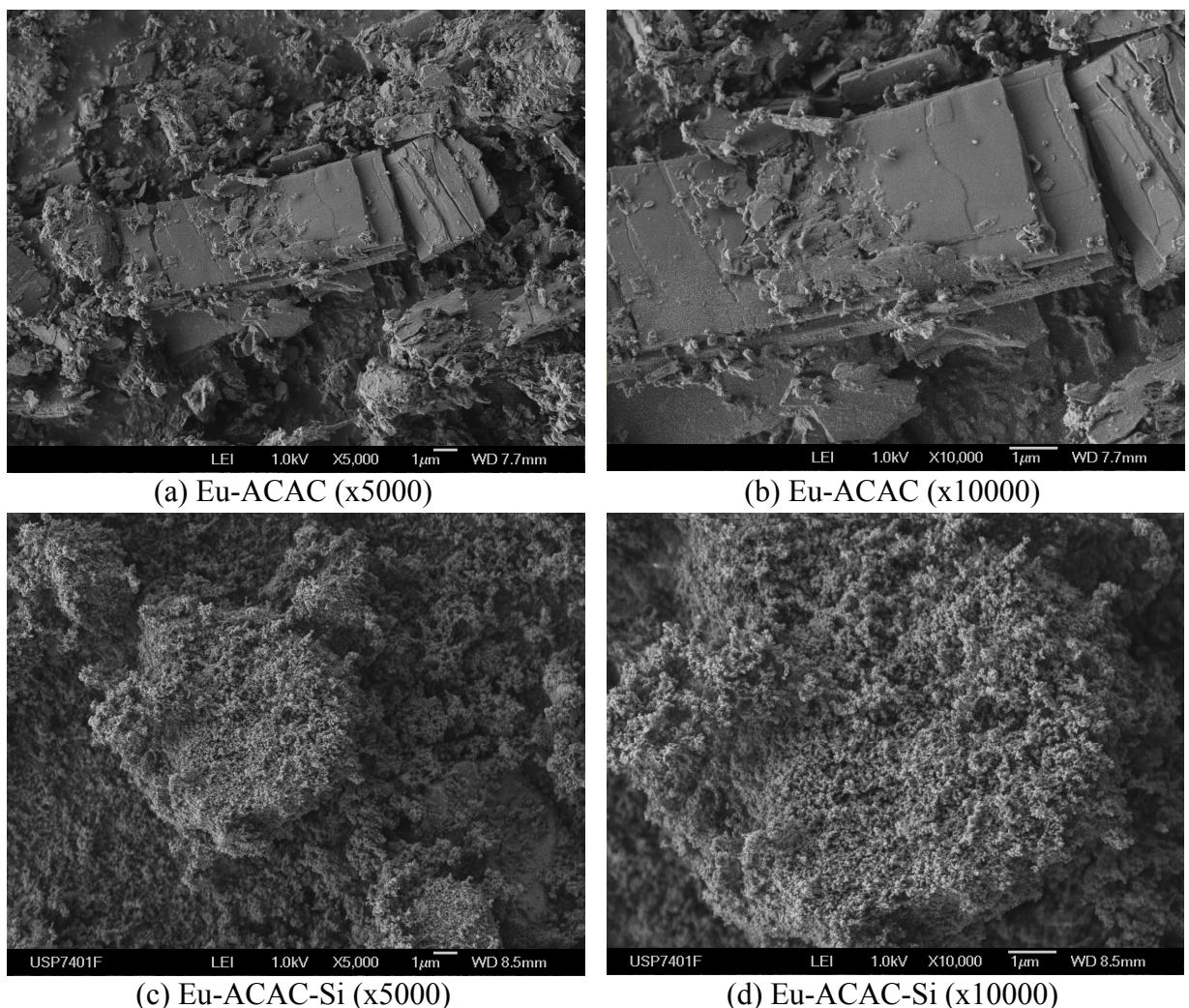
#### 4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As [Figuras 4.28 a 4.35](#) apresentam as micrografias dos complexos e das partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporando o complexo, em duas escalas diferentes (5000 e 10.000 vezes), obtidas com as amostras depositadas sobre uma fita de cobre dupla face, aderida ao porta-amostra de cobre. Comparando as imagens dos compostos antes e após a

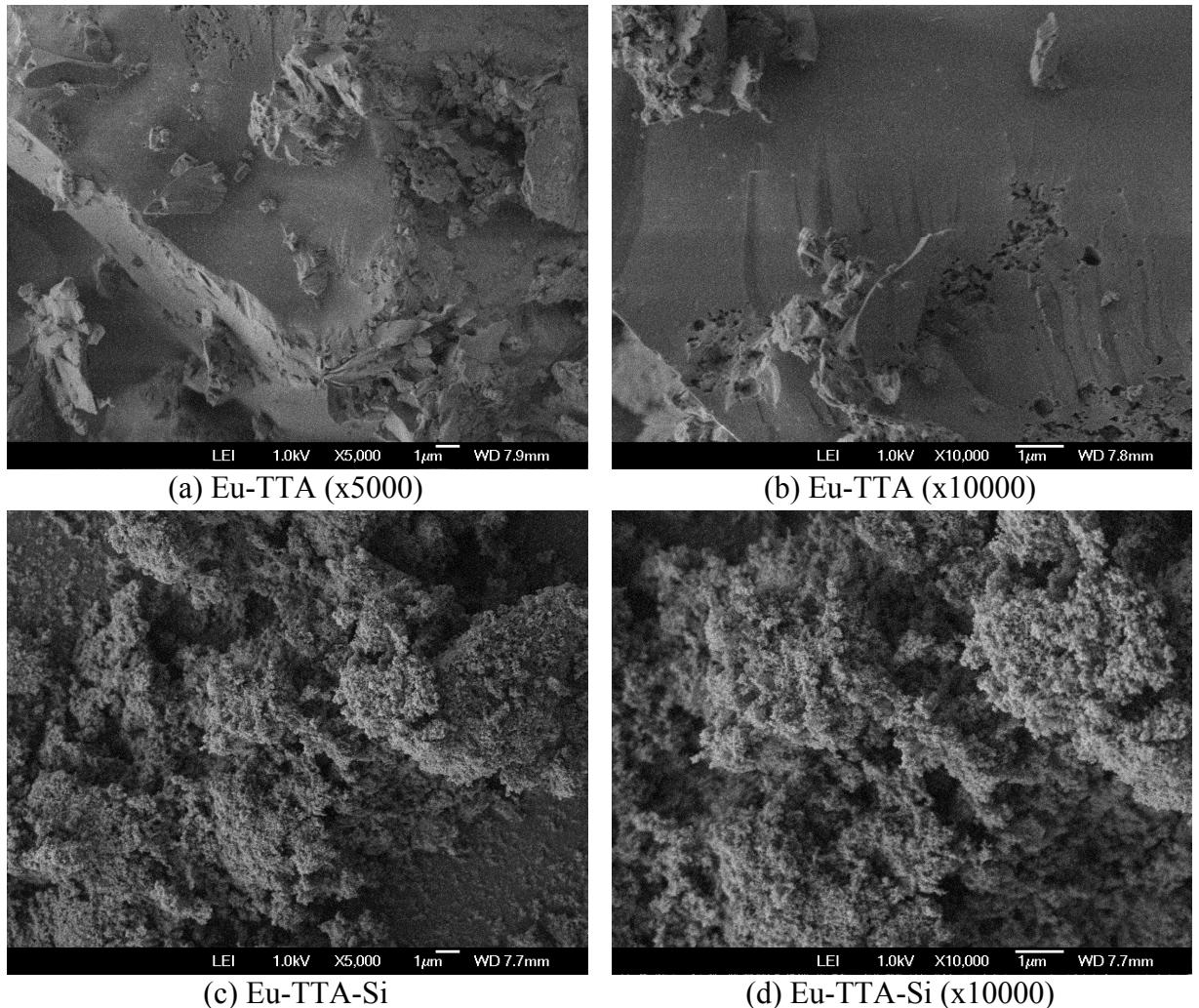
## Capítulo 4 - Caracterização

funcionalização, verificam-se diferenças na morfologia das amostras, especificamente na superfície. Esta alteração é atribuída à presença da rede de sílica na superfície do complexo precursor.

A micrografia do complexo  $[\text{Eu}(\text{ACAC})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ , [Figura 4.28a,b](#), mostra forma de placas e de pequenos grãos e uma superfície lisa. Após a funcionalização com a rede de sílica, [Figura 4.28c,d](#), a micrografia revela um material com revestimento homogêneo e com uma superfície rugosa. O mesmo comportamento foi também verificado quando se analisa as micrografias do complexo Eu-TTA e do material Eu-TTA-Si, [Figura 4.29](#).



**Figura 4.28.** Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-ACAC e do c) e d) partícula Eu-ACAC-Si.



**Figura 4.29.** Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-TTA e do c) e d) partícula Eu-TTA-Si.

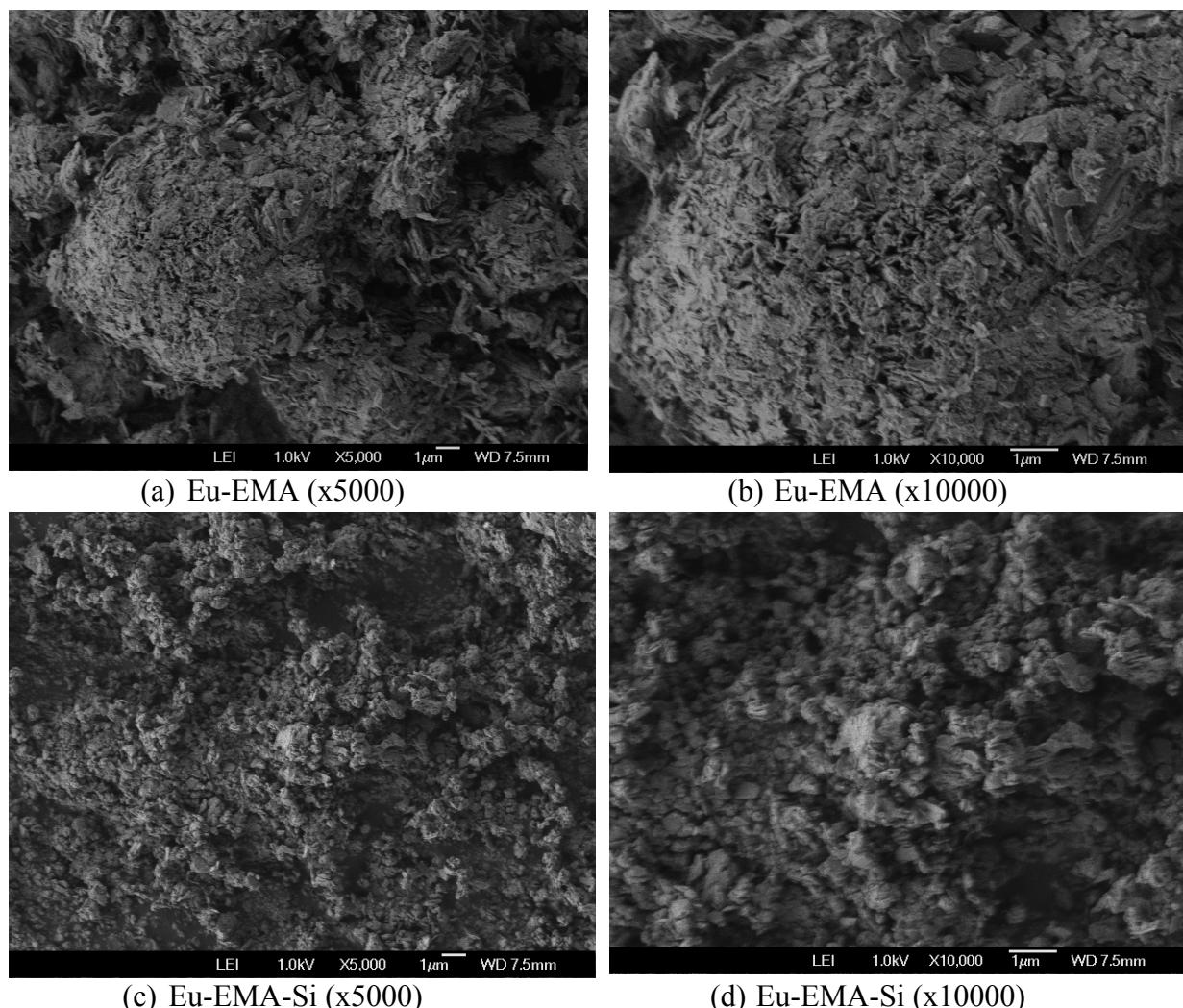
As imagens do material Eu-EMA-Si ([Figura 4.30c,d](#)) apresentam as placas do complexo aglomeradas devido a rede de sílica aderida na superfície do complexo ([Figura 4.30a,b](#)). Nas micrografias do complexo Eu-TLA ([Figura 4.31a,b](#)), observa-se grãos com superfície rugosa devido à presença de partículas menores. O revestimento da sílica ([Figura 4.31c,d](#)) no complexo leva a tamanhos de grãos menores. Além do mais, observa-se partículas de sílica pequenas, com forma diferente das partículas do complexo, aderidas a

---

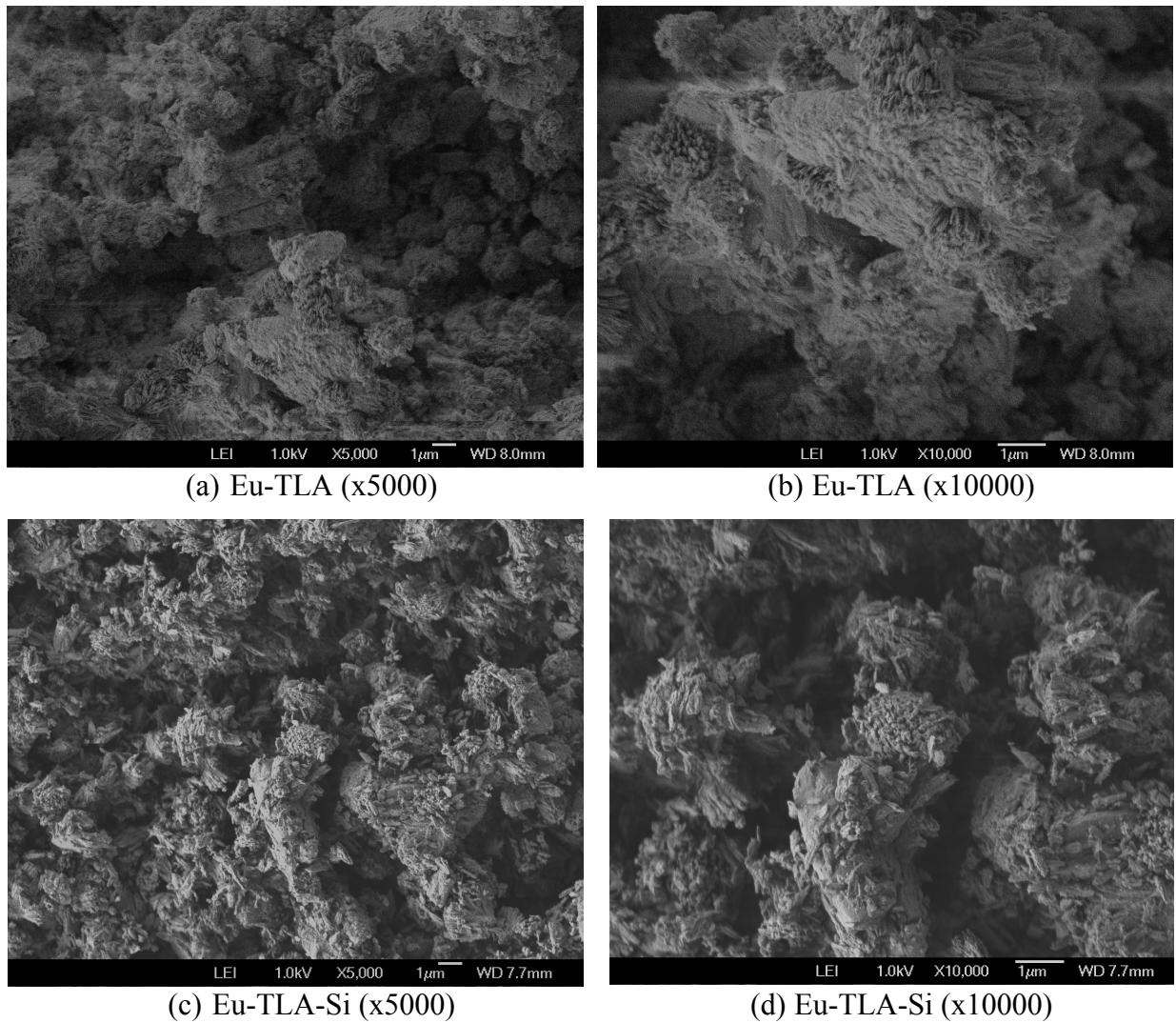
Capítulo 4 - Caracterização

---

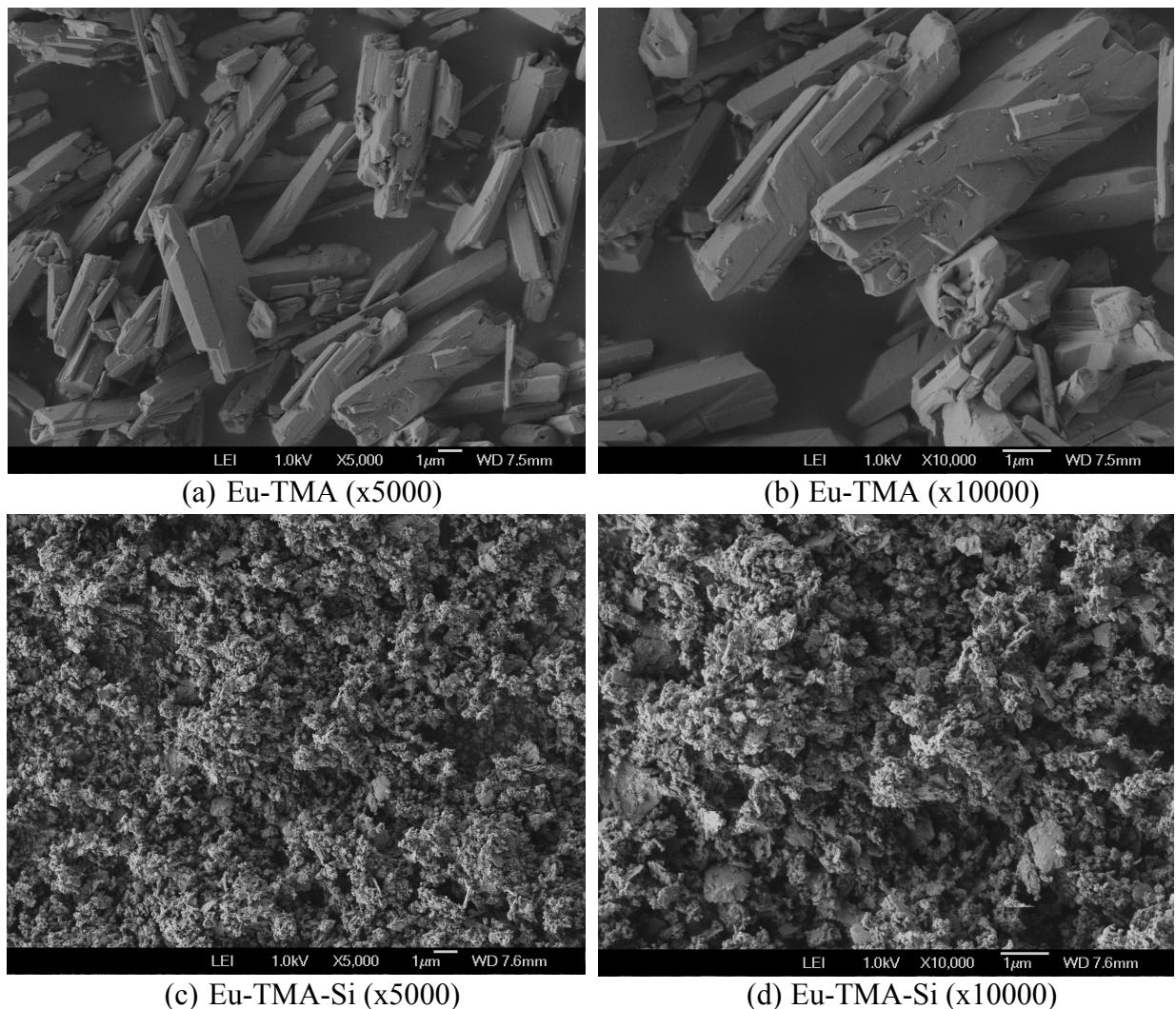
superfície. Por outro lado, as imagens registradas para o complexo Eu-TMA ([Figura 4.32a,b](#)) mostram bastões uniformes, porém quando este complexo é funcionalizado com APTES, altera da forma de bastões para grãos rugosos, indicando que a rede de sílica atua na mudança da morfologia do material Eu-TMA-Si ([Figura 4.32c,d](#)).



**Figura 4.30.** Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-EMA e do c) e d) partícula Eu-EMA-Si.



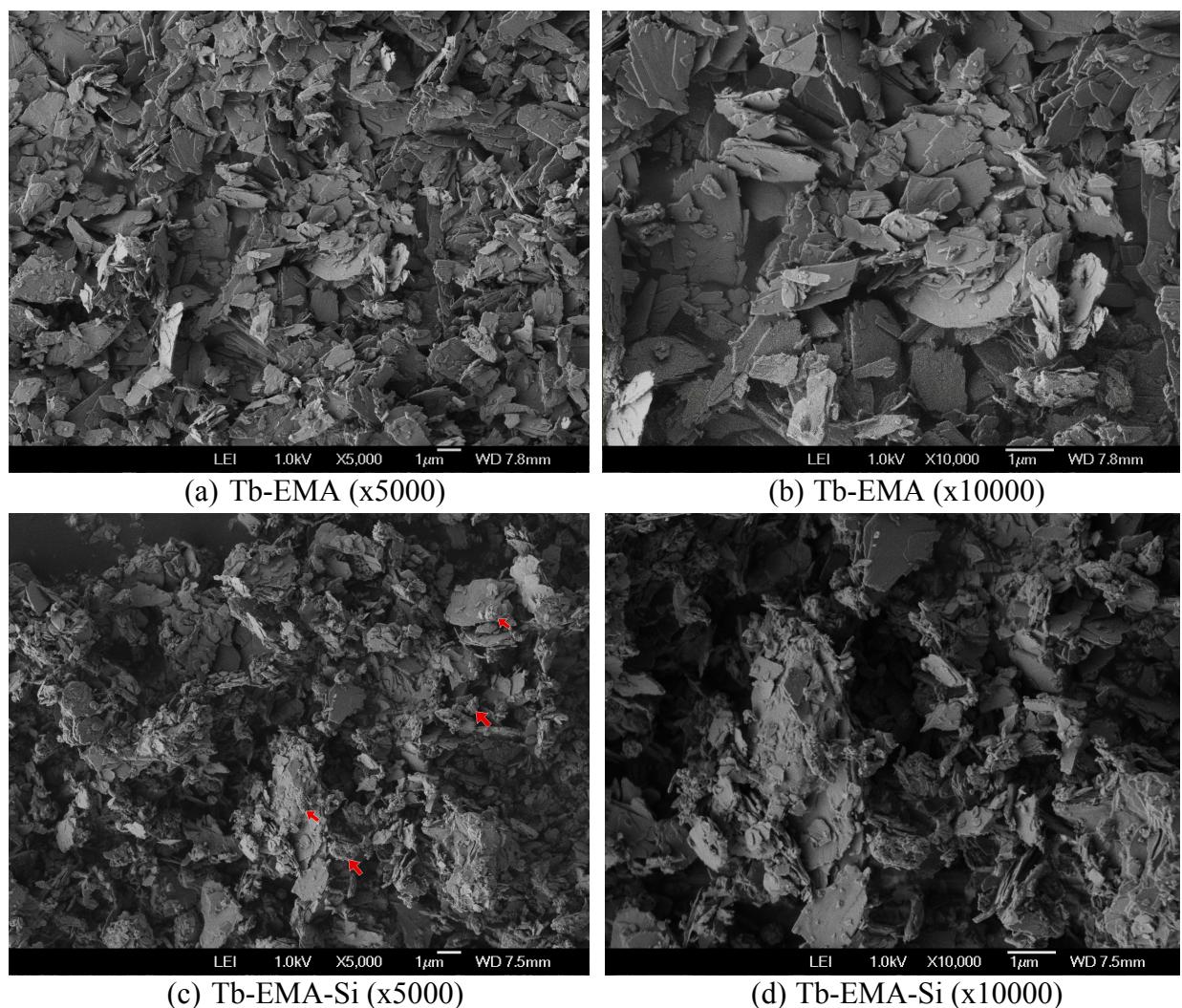
**Figura 4.31.** Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-TLA e do c) e d) partícula Eu-TLA-Si.



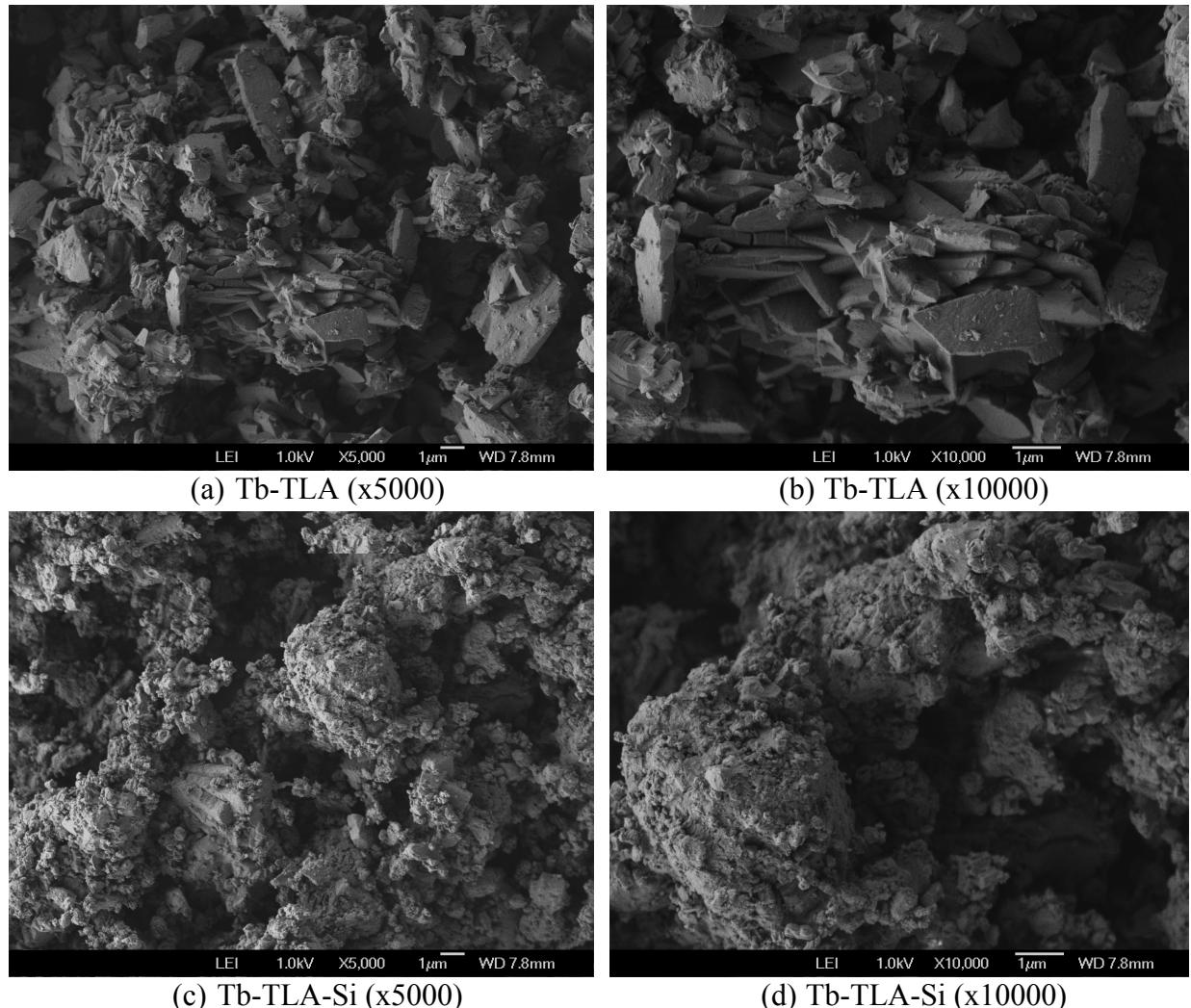
**Figura 4.32.** Micrografias eletrônica de varredura do a) e b) complexo Eu-TMA e do c) e d) partícula Eu-TMA-Si.

Também foram obtidas as micrografias eletrônicas de varredura do complexo Tb-EMA ([Figura 4.33a,b](#)), que apresentaram placas aglomeradas com diferentes tamanhos. A [Figura 4.33c](#) mostra a imagem deste complexo após a silanização, onde as regiões indicadas apresentam diferenças nas superfícies quando comparadas com o complexo Tb-EMA, devido à presença de sílica. A presença de uma menor quantidade de sílica observada nas micrografias ([Figura 4.33c,d](#)) deste material silanizado corrobora com os dados de espectroscopia no infravermelho e de difração de raios X.

No complexo Tb-TLA (Figura 4.34a,b), após a reação com o APTES (Figura 4.34c,d), passa de morfologia de placas lisas para grãos rugosos, devido à presença da rede de sílica. Na imagem do complexo Tb-TMA (Figura 4.35a,b) observam-se a presença da forma tanto de placas como de bastões. As imagens de micrografias da amostra Tb-TMA-Si (Figura 4.35c,d) mostram a presença de grãos de sílica na superfície do composto aglomerado, evidenciando a funcionalização do sistema.

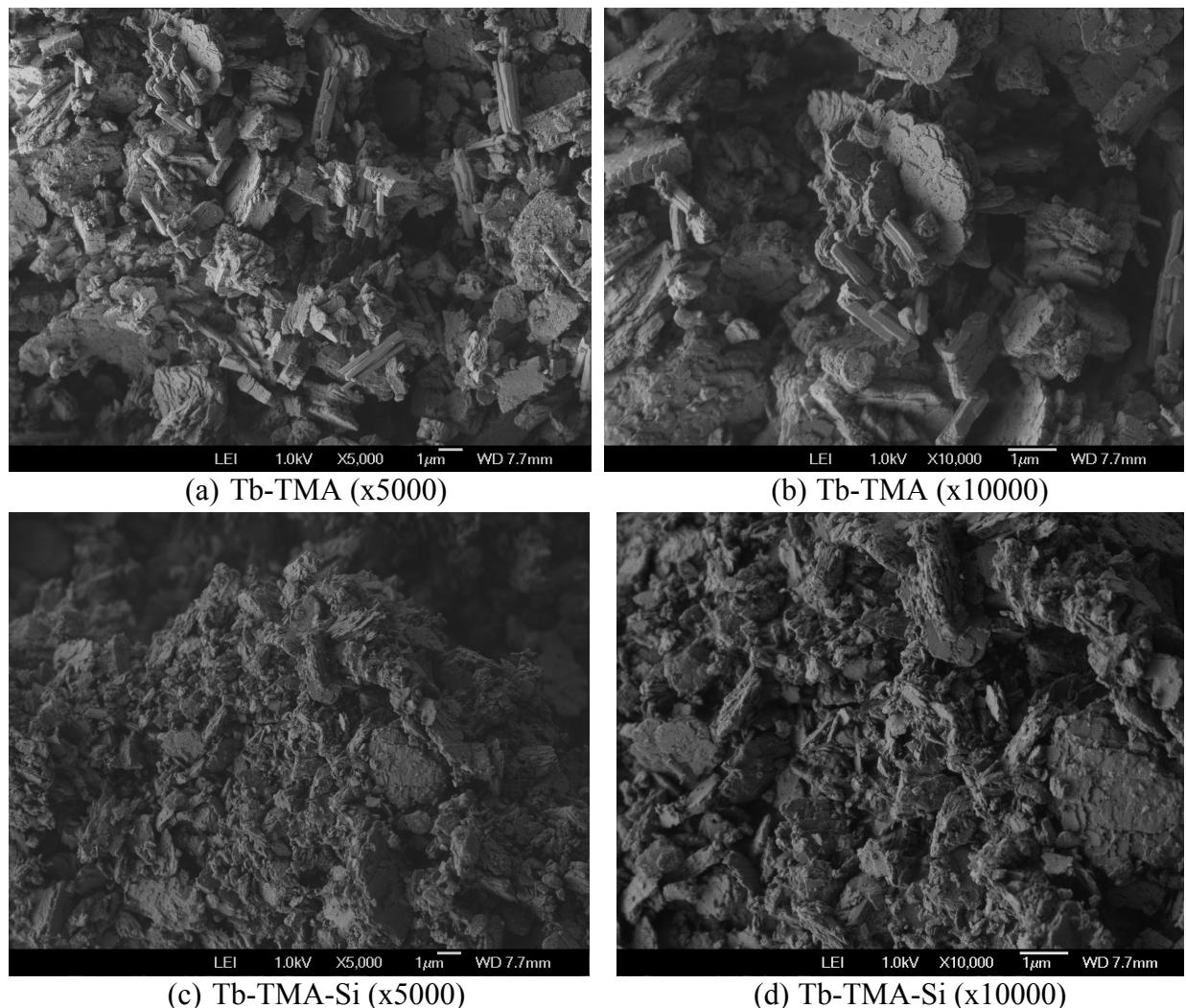


**Figura 4.33.** Micrografia eletrônica de varredura do a) e b) complexo Tb-EMA e c) e d) partícula Tb-EMA-Si.



**Figura 4.34.** Micrografia eletrônica de varredura do a) e b) complexo Tb-TLA e c) e d) partícula Tb-TLA-Si.

## Capítulo 4 - Caracterização



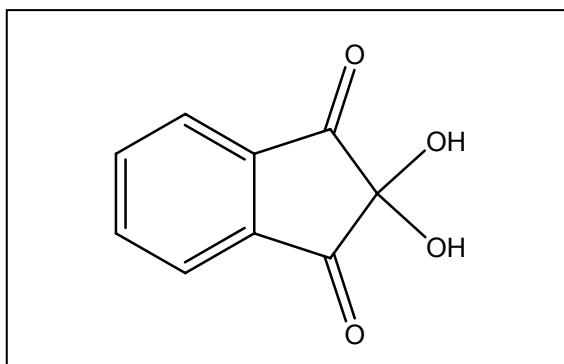
**Figura 4.35.** Micrografia eletrônica de varredura do a) e b) complexo Tb-TMA e c) e d) partícula Tb-TMA-Si.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura mostrou que ocorreu o processo de hidrólise e condensação da fonte de sílica, modificando a morfologia dos complexos precursores. O revestimento da rede de sílica observado na superfície dos materiais amino-funcionalizados é um indicativo qualitativo da eficiência da reação de silanização. As imagens indicaram que as partículas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si possuem um maior revestimento daquelas partículas TR-BTC-Si preparadas pelo método micro-ondas, corroborando com as observações feitas por meio das técnicas de caracterização de difração de raios X e espectroscopia de absorção no infravermelho.

#### 4.7. Determinação de aminas primárias – método da ninidrina

Os complexos de terras raras revestidos com a rede de sílica funcionalizada possuem pontes de ligação com biomoléculas, por meio do grupo NH<sub>2</sub> presentes na superfície da partícula. Portanto, faz-se necessário quantificar este grupo nestes materiais para confirmar a viabilidade da interação com espécies biológicas. Neste caso foi utilizado o “Teste da Ninidrina” com o intuito de detectar e quantificar os grupamentos de aminas primárias presentes nos marcadores luminescentes.

A ninidrina 2,2-di-hidróxi-1,3-indanodiona é um reagente heterocíclico ([Figura 4.36](#)), que após reagir exclusivamente com aminas primárias [\[39-42\]](#) forma o composto de Ruhemann de coloração violeta. A concentração de aminas é diretamente proporcional à intensidade de absorção do complexo formado. Deste modo, esta reação ([Figura 4.37](#)) foi utilizada para a determinação quantitativa das aminas primárias nos materiais amino-funcionalizados.

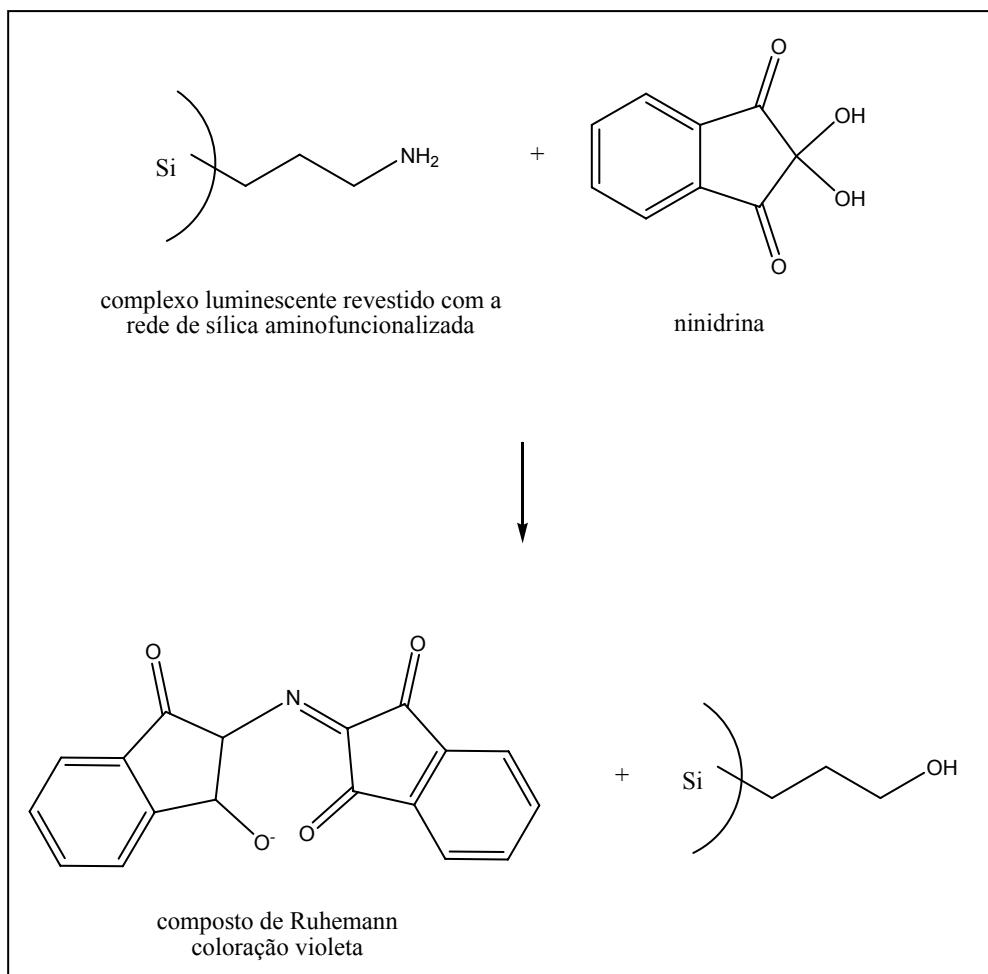


**Figura 4.36.** Estrutura molecular da ninidrina.

O estudo colorimétrico foi realizado a partir do máximo da banda de absorção na região do UV-VIS, centrada em 570 nm, que é característica do produto da reação entre a

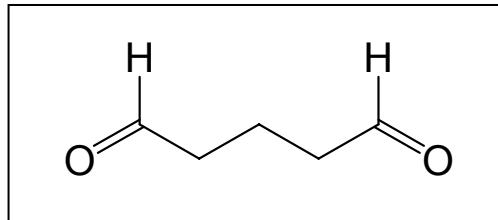
## Capítulo 4 - Caracterização

ninidrina e os grupos NH<sub>2</sub> (Figura 4.37) [39,40]. A curva padrão de concentração foi construída a partir da glicina, como material de referência.



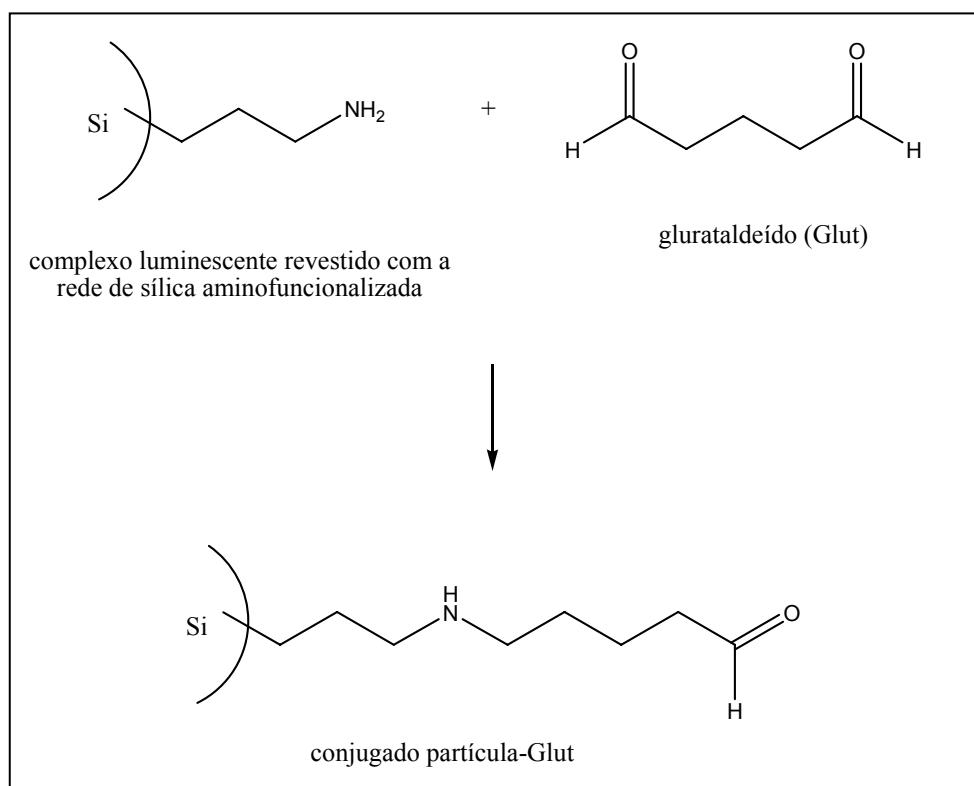
**Figura 4.37.** Reação da superfície da partícula amino-funcionalizada com a ninidrina.

Neste trabalho foi aplicada a técnica colorimétrica para quantificar os grupamentos NH<sub>2</sub> dos sistemas partículas de sílica amino-funcionalizadas e, também, das partículas após a conjugação com o glutaraldeído 1,5-pentanedral (Figura 4.38). O produto da reação da partícula com glutaraldeído agora é representado com a adição da palavra Glut (Figura 4.39), por exemplo, Eu-ACAC-Si-Glut. Deve-se frisar que o glutaraldeído é usualmente utilizado como um espaçador em reações antígeno-anticorpo [43].



**Figura 4.38.** Estrutura molecular do glutaraldeído.

Todas as partículas amino-funcionalizadas reagiram com a ninidrina, desenvolvendo cor violeta, indicando assim a presença de aminas primárias. Deste modo, os resultados indicam que ocorreu com sucesso o revestimento de sílica no complexo, e que a rede de sílica contém grupamentos de amina primária em sua superfície. Portanto, a presença do grupamento amino- permite a aplicação destas partículas como marcadores luminescentes de espécies biológicas. Os materiais também foram submetidos a conjugação com o glutaraldeído, para verificar a disponibilidade destas aminas primárias para reações biológicas. Notou-se que a concentração de aminas primárias decresce após a reação com o glutaraldeído, devido a interação do grupamento amino- com o espaçador (Figura 4.39).



**Figura 4.39.** Reação da partícula de sílica amino-funcionalizada com o glutaraldeído.

A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos na quantificação de aminas primárias das partículas de sílica amino-funcionalizadas antes e após a reação com o espaçador glutaraldeído. A coluna 3 da Tabela 4.7 mostra a percentagem do grupo amino- que interagiu com o espaçador Glut, indicando que os materiais Eu-ACAC-Si e Eu-TMA-Si atuam como potenciais candidatos como marcadores biológicos luminescentes. Embora o material Tb-TMA-Si tenha uma porcentagem alta de NH<sub>2</sub> disponível para interação com o espaçador Glut, não são bons candidatos a marcadores ópticos, dado a baixa concentração inicial de grupamentos amino.

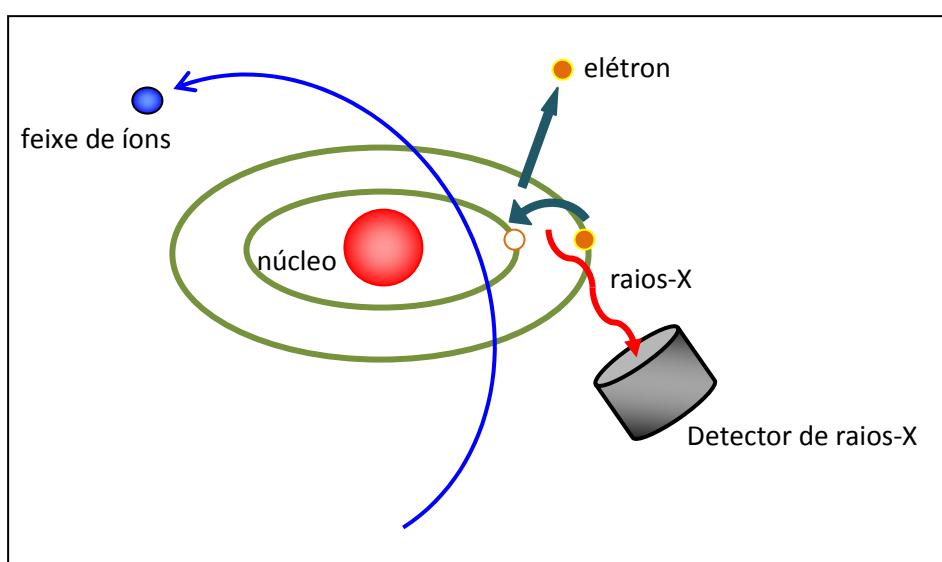
**Tabela 4.7.** Concentração de aminas primárias das partículas de sílica amino-funcionalizadas antes e após a reação com o glutaraldeído, em nmol mg<sup>-1</sup>, determinadas pelo método colorimétrico utilizando ninidrina. A coluna 3 apresenta a percentagem de NH<sub>2</sub> disponível para interação com o espaçador Glut.

Amostra	[NH <sub>2</sub> ] nmol mg <sup>-1</sup>	% NH <sub>2</sub> disponível
Eu-ACAC-Si	17.847	74,53
Eu-ACAC-Si-Glut	4.546	
Eu-TTA-Si	10.899	54,53
Eu-TTA-Si-Glut	4.955	
Eu-EMA-Si	1.652	41,16
Eu-EMA-Si-Glut	972	
Eu-TLA-Si	3.630	77,07
Eu-TLA-Si-Glut	832	
Eu-TMA-Si	43.597	86,30
Eu-TMA-Si-Glut	5.977	
Tb-EMA-Si	2.659	19,26
Tb-EMA-Si-Glut	2.147	
Tb-TLA-Si	1.539	36,13
Tb-TLA-Si-Glut	983	
Tb-TMA-Si	299	98,32
Tb-TMA-Si-Glut	5	

#### 4.8. Emissão de raios X induzida por partículas carregadas (PIXE)

O método Emissão de Raios X Induzida por Partículas Carregadas (PIXE = *Particle Induced X-ray Emission*), proposto em 1970 por Johansson e Johansson [44], baseia-se essencialmente na espectroscopia de raios X em que o feixe de íons (prótons ou alfas) incidente é usado para ionizar camadas eletrônicas mais internas (K ou L) dos átomos na amostra. Os raios X são coletados com um detector de Si(Li) refrigerado em nitrogênio líquido (77K) e o sinal armazenado em um analisador multicanal. O método PIXE é capaz de identificar e quantificar elementos com  $Z > 10$ , com limite de detecção de  $10^{-6}$  g/g (ppm), e precisão absoluta de 5 a 30%.

Quando o elétron de um átomo excitado desloca para uma camada eletrônica mais interna ocorre uma emissão característica de radiação eletromagnética (Figura 4.40). As transições de interesse na análise PIXE são aquelas que têm como base a camada K identificada pelos seus números quânticos  $n = 1$ ,  $\ell = 0$ ,  $s = \pm\frac{1}{2}$ ,  $j = \frac{1}{2}$ , que envolvem as camadas L e M [45].



**Figura 4.40.** Esquema simplificado do processo de emissão de raios X induzidos pela colisão de partículas carregadas.

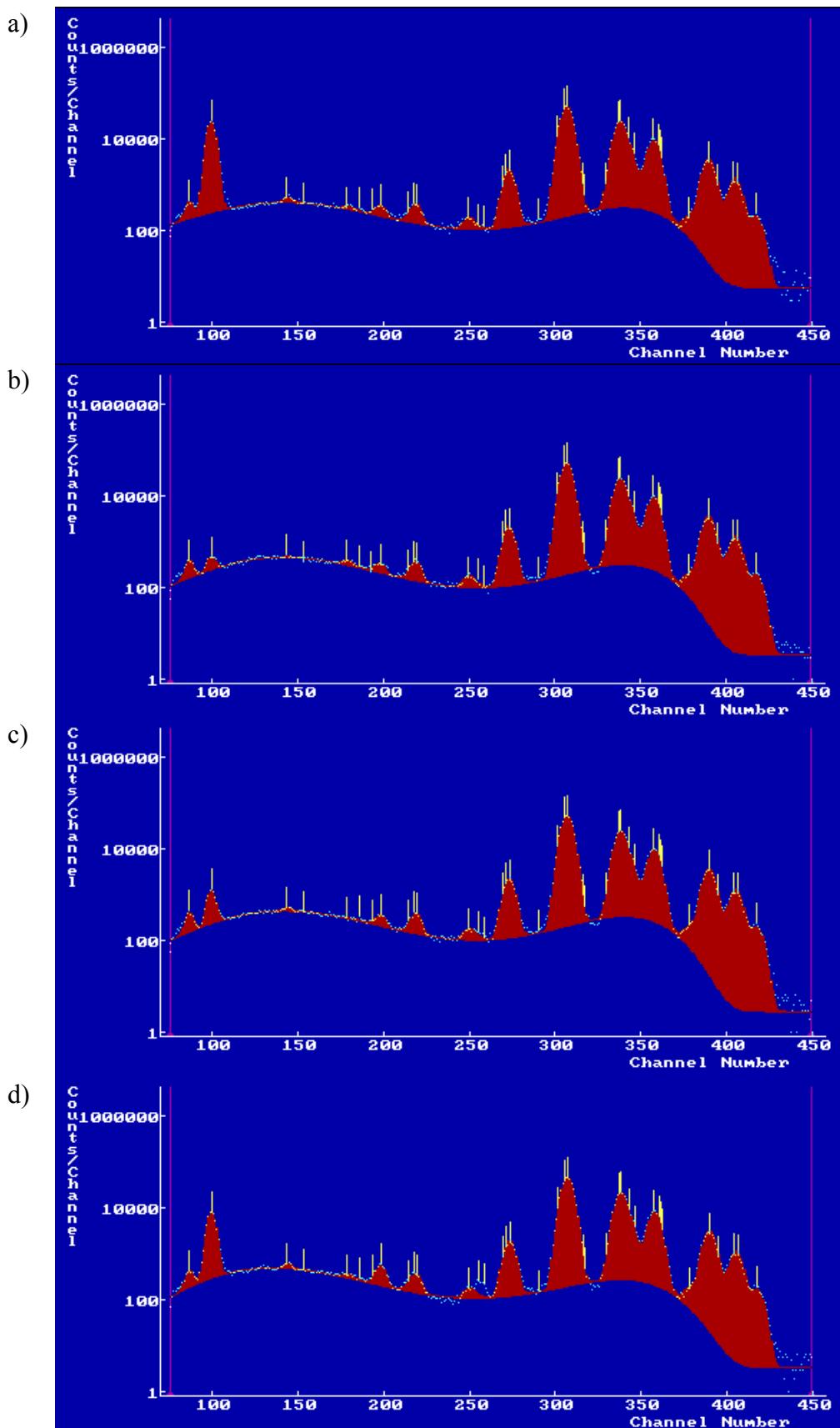
Todas as amostras foram irradiadas com feixe de prótons de 2,4 MeV, por dez minutos, mantendo uma taxa de contagens de 2000 fótons/segundo. Um filamento de tungstênio foi utilizado como emissor de elétrons para neutralizar a carga acumulada nas amostras.

Os espectros obtidos são apresentados na [Figura 4.41](#) juntamente com os ajustes de picos realizados pelo programa AXIL. O segundo pico, da esquerda para a direita, presente em todos os espectros, é relativo à quantidade de Si na amostra, e o conjunto dos dez últimos picos são relativos ao európio presente na amostra.

A carga coletada é medida experimentalmente e está relacionada com a quantidade de ions que incidem na amostra durante a irradiação. O fator de resposta do detector é tabelado para cada elemento químico, enquanto o fator de alvo grosso é calculado levando em conta os elementos constituintes da matriz da amostra. A [Tabela 4.8](#) contém a relação de massa e molar entre Si e Eu. Foi estimado em 10% a incerteza nos valores determinados.

A amostra Eu-ACAC-Si possui uma relação molar Si/Eu maior em relação as obtidas nas amostras Eu-BTC-Si. Este comportamento deve estar associado ao método de preparação. No método Stöber, há primeiramente a formação da camada de sílica no complexo, tendo como precursor o TEOS. Posteriormente, forma-se uma segunda camada de sílica, sendo o APTES como fonte de sílica. Já no método micro-ondas, a camada é formada apenas pelo APTES. Estes dados corroboram com os de difração de raios X, onde a banda de difração da sílica é mais proeminente no método Stöber.

## Capítulo 4 - Caracterização



**Figura 4.41.** Espectros PIXE das amostras a) Eu-ACAC-Si, b) Eu-EMA-Si, c) Eu-TLA-Si e d) Eu-TMA-Si.

A relação molar Si/Eu da amostra Eu-ACAC-Si é maior quando comparado a Eu-TMA-Si ([Tabela 4.8](#)). Por outro lado, a concentração de NH<sub>2</sub> é menor quando se faz a comparação entre estes dois materiais ([Tabela 4.7](#)). Este comportamento é coerente quando se analisa os métodos de preparação por Stöber e micro-ondas, considerando que o grupamento amina é oriundo apenas da fonte de sílica APTES. A relação molar Si/Eu indicou um maior revestimento de sílica funcionalizada na ordem de ligante TMA > TLA > EMA, a mesma tendência foi apresentada para a quantificação de aminas primárias. Ressalta-se que um comportamento semelhante também foi verificado pela técnica de difração de raios X destes materiais ([secção 4.4.2](#)).

**Tabela 4.8.** Relação Si/Eu obtida através do espectro PIXE, após cálculos matemáticos.

Amostra	Si/Eu (massa)	Si/Eu (molar)
Eu-ACAC-Si	0,300	1,62
Eu-EMA-Si	0,004	0,02
Eu-TLA-Si	0,015	0,08
Eu-TMA-Si	0,120	0,65

## Referências

- [1] MELBY, L.R.; ABRAMSON, E.; CARIS, J.C.; ROSE, N.J. Synthesis and Fluorescence of Some Trivalent Lanthanide Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, v.86, n.23, p.5117–5125, 1964.
- [2] BAUER, H.; BLANC, J.; ROSS, D.L. Octacoordinate Chelates of Lanthanides. 2 Series of Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, v.86, n.23, p.5125–5131, 1964.
- [3] ZHENG, Y.; LIN, J.; LIANG, Y.; YU, Y.; ZHOU, Y.; GUO, C.; WANG, S.; ZHANG, H. A novel way to enhance electroluminescence performance based on soluble binary and ternary europium 1,1,1-trifluoroacetylacetone complexes. *Journal of Alloys and Compounds*, v.336, n1/2, p.114-118, 2002.
- [4] CHARLES, R. G.; OHLMANN, R. C. Europium thenoyl trifluoroacetone preparation and fluorescence properties. *Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry*, v.27, n.1, p.255-259, 1965.
- [5] BRITO, H.F.; MALTA, O.L.; CARVALHO, C.A.A.; MENEZES, J.F.S.; SOUZA, L.R.; FERRAZ, R. Luminescence behavior of Eu<sup>3+</sup> with thenoyl trifluoroacetone, sulfoxides and macrocyclics. *Journal of Alloys and Compounds*, v.275/277, p.254-257, 1998.
- [6] TEOTONIO, E.E.S.; FETT, G.M.; BRITO, H.F.; FAUSTINO, W.M.; SA, G.F.; FELINTO, M.C.F.C.; SANTOS, R.H.A. Evaluation of intramolecular energy transfer process in the lanthanide(III) bis-and tris-(TTA) complexes: Photoluminescent and triboluminescent behavior. *Journal of Luminescence*, v.128, n.2, p.190-198, 2008.
- [7] SOUZA, E.R.; Silva, I.G.N.; TEOTONIO, E.E.S.; FELINTO, M.C.F.C.; BRITO, H.F. Optical properties of red, green and blue emitting rare earth benzenetricarboxylate compounds. *Journal of Luminescence*, v.130, n.2, p.283-291, 2010.
- [8] STOBER, W; FINK, A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.26, n.1, p.62-69, 1968.
- [9] JIN, Y.; LI, A.; HAZELTON, S.G.; LIANG, S.; JOHN, C.L.; SELID, P.D.; PIERCE, D.T.; ZHAO, J.X. Amorphous silica nanohybrids: Synthesis, properties and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, v.253, n.23/24, p.2998–3014, 2009.
- [10] COLTRAIN, B.K.; KELTS, L.W. The Chemistry of Hydrolysis and Condensation of Silica Sol–Gel Precursors. In: BERGNA, H.E.; ROBERTS, W.O., eds. *Colloidal sílica: fundamentals and applications*. Boca Raton:CRC Press, 2006. cap.48, p.637-644.

---

Capítulo 4 - Caracterização

---

- [11] BAGWE, R.P.; HILLIARD, L.R.; TAN, W. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. *Langmuir*, v.22, n.9, p.4357-4362, 2006.
- [12] AN, Y.; CHEN, M.; XUE, Q.; LIU, W. Preparation and self-assembly of carboxylic acid-functionalized silica. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.311, n.2, p.507-513, 2007.
- [13] KNOPP, D.; TANG, D.; NIESSNER, R. Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Analytica Chimica Acta*, v.647, n.1, p.14-30, 2009.
- [14] SOUZA, E.R. *Síntese de complexos benzenotricarboxilatos de terras raras e estudo de suas propriedades fotoluminescentes*. São Paulo: 2008, 128p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.
- [15] BACCILE, N.; BABONNEAU, F.; THOMAS, B.; CORADIN, T. Introducing ecodesign in silica sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, v.19, p.8537-8559, 2009.
- [16] XU, Z.-S.; DENG, Z.-W.; HU, X.-X.; LI, L.; YI, C.-F. Monodisperse polystyrene microspheres prepared by dispersion polymerization with microwave irradiation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v.43, n.11, p.2368-2376, 2005.
- [17] GALEMA, S. A. Microwave chemistry. *Chemical Society Reviews*, v.26, n.3, p.233-238, 1997.
- [18] FENG, J.; SHAN, G.; MAQUIEIRA, A.; KOIVUNEN, M.E.; GUO, B.; HAMMOCK, B.D.; KENNEDY, I.M. Functionalized europium oxide nanoparticles used as a fluorescent label in an immunoassay for atrazine. *Analytical Chemistry*, v.75, n.19, p.5282-5286, 2003.
- [19] LIDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WETSMAN, J. Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*, v.57, n.45, p.9225-9283, 2001.
- [20] CADDICK, S.; FITZMAURICE, R. Microwave enhanced synthesis. *Tetrahedron*, v.65, n.17, p.3325–3355, 2009.
- [21] GABRIEL, C.; GABRIEL, S.; GRANT, E.H.; HALSTEAD, B.S.J.; MINGOS, D.M.P. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chemical Society Reviews*, v.27, n.3, p.213-223, 1998.
- [22] KAI, J.; PARRA, D.F.; BRITO, H.F. Polymer matrix sensitizing effect on photoluminescence properties of Eu<sup>3+</sup>-β-diketonate complex doped into poly-β-hydroxybutyrate (PHB) in film form. *Journal of Materials Chemistry*, v.18, n.38, p.4549–4554, 2008.
- [23] CAO, Q.-Y.; CHEN, Y.-H.; LIU, J.-H.; GAO, X.-C. Novel luminescent europium(III) complexes covalently bonded to bis(phosphino)amine oxide functionalized MCM-41. *Inorganic Chemistry Communications*, v.12, n.1, p.48–51, 2009.

---

 Capítulo 4 - Caracterização
 

---

- [24] LIU, J.L.; YAN, B. Lanthanide ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ) centered hybrid materials using modified functional bridge chemical bonded with silica: molecular design, physical characterization, and photophysical properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.112, n.35, p.10898–10907, 2008.
- [25] REN, C.; LI, J.; SUN, J.; CHEN, X.; HUA, Z.; XUE, D. Preparation and characterization of a novel luminescent nanoparticles. *Journal of Luminescence*, v.130, n.1, p.65–69, 2010.
- [26] PRASSAS, M.; PHALIPPOU, J.; HENCH, L. L.; ZARZYCKI, J. Preparation of  $x\text{Na}_2\text{O}-(1-x)\text{SiO}_2$  gels for the gel-glass process: I. atmospheric effect on the structural evolution of the gels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.48, n.1, p.79-95, 1982.
- [27] LI, Y.; YAN, B.; YANG, H. Construction characterization, and photoluminescence of mesoporous hybrids containing europium(III) complexes covalently bonded to SBA-15 directly functionalized by modified  $\beta$ -diketone. *The Journal of Physical Chemistry C*, v.112, n.10, p.3959-3968, 2008.
- [28] COUSINIÉ, S.; GRESSIER, M.; REBER, C.; DEXPERT-GHYS, J.; MENU, M.-J. Europium(III) complexes containing organosilyldipyridine ligands grafted on silica nanoparticles. *Langmuir*, v.24, n.12, p.6208-6214, 2008.
- [29] HOFFMANN, H.; STAUDT, P.B.; COSTA, T.M.H.; MOROAND, C.C.; BENVENUTTI, E.V. FTIR study of the electronic metal–support interactions on platinum dispersed on silica modified with titania. *Surface and Interface Analysis*, v.33, n.8, p.631-634, 2002.
- [30] FENG, B.; HONG, R.Y.; WANG, L.S.; GUO, L.; LI, H.Z.; DING, J.; ZHENG, Y.; WEI, D.G. Synthesis of  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}/\text{PEG}$  diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.328, n.1/3, p.52-59, 2008.
- [31] YANG, P.; QUAN, Z.; LU, L.; HUANG, S.; LIN, J. Luminescence functionalization of mesoporous silica with different morphologies and applications as drug delivery systems. *Biomaterials*, v.29, n.6, p.692–702, 2008.
- [32] YU, M.; LIN, J.; FANG, J. Silica spheres coated with  $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  layers via sol-gel process: a simple method to obtain spherical core-shell phosphors. *Chemistry of Materials*, v.17, n.7, p.1783-1791, 2005.
- [33] SHENG, K.; YAN, B. A new luminescent molecular based terbium hybrid material containing both organic polymeric chains and inorganic silica networks. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, v.21, n.1, p.65-71, 2010.

---

Capítulo 4 - Caracterização

---

- [34] IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. Disponível em: [http://abratec1.tempsite.ws/abratec/download/nomenclatura\\_anal\\_termica.pdf](http://abratec1.tempsite.ws/abratec/download/nomenclatura_anal_termica.pdf). Acessada em 24 maio 2010.
- [35] PIMENTEL, A.S.; ARBILLA, G. Cinética não-isotérmica na análise térmica de sólidos. *Quimica Nova*, v.21, n.3, p.263-266, 1998.
- [36] BO, S.; LIU, X.; ZHEN, Z. Preparation and luminescence properties of hybrid materials containing lanthanide complexes covalently bonded to a terpyridine-functionalized silica matrix. *Journal of Luminescence*, v.128, n.10, p.1725–1730, 2008.
- [37] LI, H.; YU, J.; LIU, F.; ZHANG, H.; FU, L.; MENG, Q.; PENG, C.; LIN, J. Preparation and luminescence properties of in situ formed lanthanide complexes covalently grafted to a silica network. *New Journal of Chemistry*, vol.28, p.1137–1141, 2008.
- [38] STEFANESCU, M.; STOIA, M.; STEFANESCU, O. Thermal and FT-IR study of the hybrid ethylene-glycol-silica matrix. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol.41, p.71–78, 2007.
- [39] SARIN, V. K.; KENT, B. H.; TAM, J. P.; MERRIFIELD, R. B. Quantitative monitoring of solid-phase peptide-synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*, v.17, p. 147-157, 1981.
- [40] WALL, J. S. *Synthesis and characterization of organo-silica hybrid nanoparticles*. Richmond: 2001. Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Philosophy Virginia Commonwealth University.
- [41] XU, Z.; XU, T.; CHENG, Y.; MA, m.; XU, P.; QU, H.; WEN, L. Colorimetric determination of polyamidoamine dendrimers and their derivates using a simple and rapid ninhydrin assay. *Analytical Letters*, v.41, p.444–455, 2008.
- [42] HANSEN, D. B.; JOULLIE, M. M. The development of novel ninhydrin analogues. *Chemical Society Reviews*, v.34, p.408-417, 2005.
- [43] MIGNEAULT, I; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, v.37, p.790-802, 2004.
- [44] JOHANSSON, T. B.; AKSELSSON, R.; JOHANSSON, S. A. E. X-ray analysis elemental trace analysis at the  $10^{-12}$  g level. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section*, v.84, p.141-143, 1970.
- [45] GOVIL, I. M. Proton induced X-ray emission – a tool for non-destructive trace element analysis. *Current Science*, v.80, p.1542-1549, 2001.

# Capítulo 5

Intestigação da fotoluminescência de  
marcadores ópticos para ensaios biológicos

---

## 5. Investigação da fotoluminescência de marcadores ópticos para ensaios biológicos

O grande interesse na pesquisa sobre as propriedades espectroscópicas de complexos de terras raras trivalentes ( $\text{TR}^{3+}$ ) é principalmente devido a sua potencial aplicação na área de diagnóstico médico, eletroluminescência, triboluminescência, marcadores ópticos e mesmo em materiais laser [1-5]. Atualmente os íons  $\text{TR}^{3+}$  vêm sendo amplamente empregados no desenvolvimento de materiais luminescentes como marcadores ópticos, exibindo emissão de cores monocromáticas oriundas de suas propriedades ópticas singulares [1,6,7]. A essência da espectroscopia eletrônica dos íons  $\text{TR}^{3+}$  está associada às bandas finas de emissão características, resultantes das transições intraconfiguracionais 4f e ao tempo de vida longo [1,2,8]. Devido à grande importância dos compostos à base de  $\text{TR}^{3+}$  atuarem como materiais luminescentes, este capítulo é dedicado a investigação das suas propriedades luminescentes.

Os complexos de  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  usualmente são aplicados como dispositivos moleculares conversores de luz (DMCL). A utilização majoritária do íon  $\text{Eu}^{3+}$  como um eficiente marcador luminescente é devido a) cor de emissão vermelha monocromática; b) o estado excitado  $^5\text{D}_0$ , que é bem separado ( $\sim 12.000 \text{ cm}^{-1}$ ) do estado fundamental  $^7\text{F}_{0-6}$ ; c) o nível emissor  $^5\text{D}_0$  e o estado fundamental  $^7\text{F}_0$  são não degenerados; d) tempo longo de decaimento luminescente do nível emissor  $^5\text{D}_0$  (em milisegundos) e e) grande deslocamento de Stokes quando o espectro de emissão é registrado sob excitação direta na banda atribuída a transição do  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{L}_6$  ( $\sim 395 \text{ nm}$ ) [1]. Ao contrário, por exemplo, do estado emissor  $^5\text{D}_4$  do íon  $\text{Tb}^{3+}$  que tem uma degenerescência igual a nove ( $2x4+1$ ). Portanto, o número máximo de bandas resultantes de uma transição  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$  é dado pela regra de  $(2J+1)$ -componentes. Vale ressaltar, também, que o número de bandas associado a cada transição depende da simetria pontual ao redor do íon  $\text{TR}^{3+}$  e pode ser determinada

usando a teoria de grupos [9].

Estas características espectroscópicas tornam os íons európio e térbio trivalentes promissores marcadores luminescentes na aplicação como sondas em fluoroimunoensaios. No entanto, compostos de coordenação são pouco empregados no desenvolvimento de marcadores fotônicos devido a baixa estabilidade térmica e propriedades mecânicas. A fim de sobrepujar estas desvantagens, alguns pesquisadores têm incorporado os complexos de terras raras em materiais mesoporosos, matriz de sílica, polímeros etc...[10-16].

Neste trabalho serão investigadas partículas de sílica funcionalizadas contendo sondas luminescentes que têm recebido atenção especial, devido às suas potências aplicações biológicas como marcadores ópticos tanto *in vivo* como *in vitro*, diagnóstico clínico e transportadores de drogas. A incorporação de complexos contendo íons  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  que atuam como emissores vermelho e verde, respectivamente, em partículas de sílica combinam as características ópticas dos complexos de  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  e propriedades inorgânicas dos óxidos, resultando em materiais híbridos inorgânicos-orgânicos.

Com base nos espectros de excitação, emissão e curvas de decaimento da emissão, serão investigadas as propriedades fotoluminescentes dos materiais Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e TR-BTC-Si. Também serão calculadas as eficiências quânticas de emissão experimental ( $\eta$ ), tempos de vida dos estados emissores ( $\tau$ ), parâmetros de intensidade ( $\Omega_\lambda$ ) para os compostos luminescentes de európio trivalente. Estes dados espectroscópicos fornecerão informações a respeito das propriedades fotoluminescentes e da incorporação do complexo de terra rara na rede de sílica.

## 5.1. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Eu-(β-dicetonato) e Eu-BTC

### 5.1.1. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Eu-(β-dicetonato), preparadas pelo método Stöber

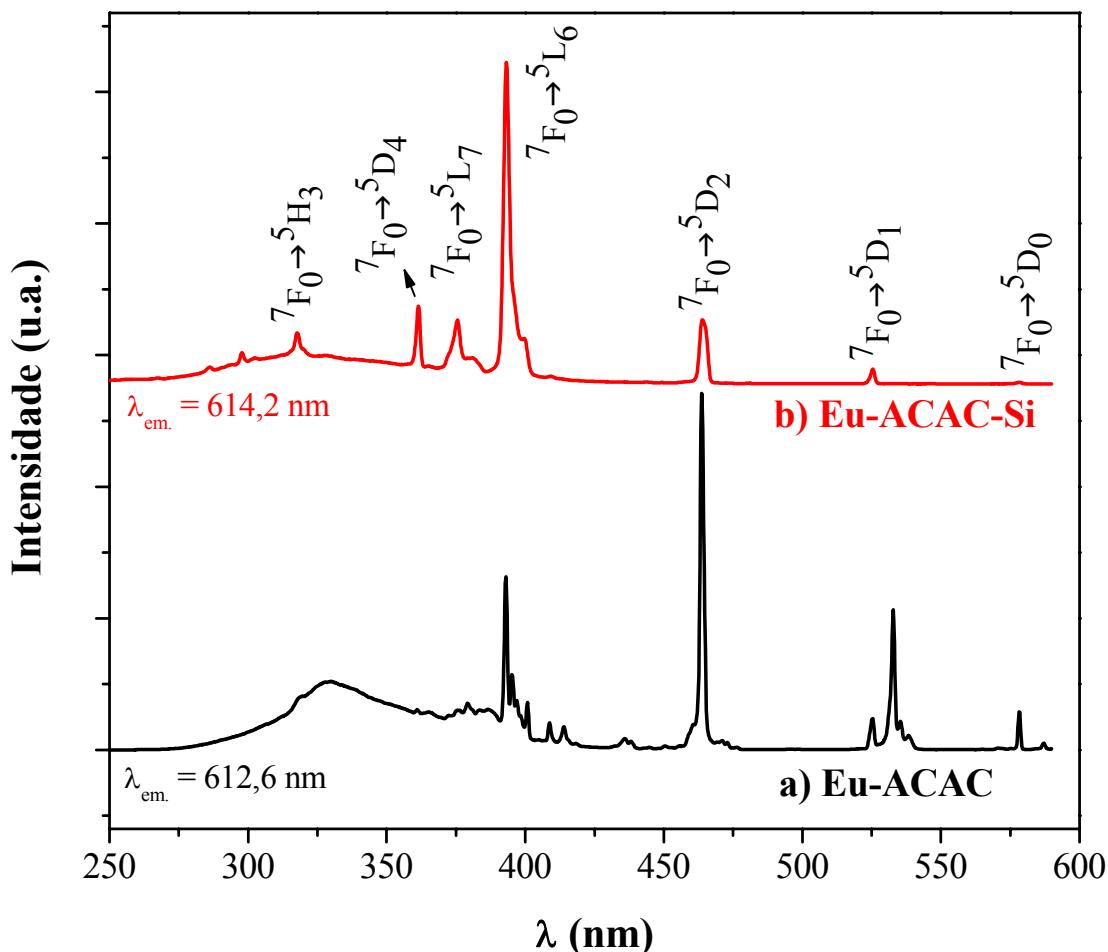
O estudo da fotoluminescência dos complexos e das partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporando o complexo foi realizado através dos espectros de excitação e emissão, registrados a temperatura ambiente (~298 K) e do nitrogênio líquido (77 K). É importante salientar, que os perfis espectrais do mesmo composto não apresentam mudanças significativas quando registrados a 77 K ou 298 K. No entanto, foi observado que para os espectros de excitação dos complexos registrados a baixa temperatura (77 K) apresentou maior resolução das transições eletrônicas, devido a menor contribuição vibrônica.

A [Figura 5.1](#) mostra os espectros de excitação do complexo Eu-ACAC e da partícula Eu-ACAC-Si a temperatura do nitrogênio líquido (77 K), registrados no intervalo de 250 a 590 nm, com emissão monitorada na transição hipersensível  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ . Os espectros de excitação do complexo Eu-ACAC ([Figura 5.1a](#)) e do complexo incorporado com sílica amino-funcionalizada Eu-ACAC-Si ([Figura 5.1b](#)) apresentam uma banda larga, na região de 300 a 375 nm, atribuída à transição  $S_1 \rightarrow S_0$  pertencente ao ligante acetilacetonato. Além do mais são observadas bandas finas oriundas das transições intraconfiguracionais  $4f^6$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  presentes nos espectros de excitação atribuídas aos seguintes níveis de energia:  $^7F_0 \rightarrow ^5L_6$  (393 nm),  $^7F_0 \rightarrow ^5D_2$  (463 nm),  $^7F_0 \rightarrow ^5D_1$  (525 nm) e  $^7F_0 \rightarrow ^5D_0$  (578 nm) [[17,18](#)].

Nota-se que as bandas finas atribuídas às transições intraconfiguracionais  $^7F_0 \rightarrow ^5H_3$ ,  $^7F_0 \rightarrow ^5D_4$  e  $^7F_0 \rightarrow ^5L_7$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  apresentam-se sobrepostas com as bandas largas do ligante ACAC para o caso do complexo Eu-ACAC, porém mostram-se melhor resolvidas para o material Eu-ACAC-Si na faixa de 270 a 375 nm. Quando se compara os espectros de excitação do complexo e do material sílica ilustrados na [Figuras 5.1](#), observa-se uma

Capítulo 5 – Investigação da fotoluminescência de marcadores ópticos para ensaios biológicos

diferença significativa do número de bandas e também uma variação nas intensidades de absorção, indicando que houve uma mudança no comportamento espectral entre o complexo Eu-ACAC e o material Eu-ACAC-Si, sugerindo a interação do complexo com a rede sílica.



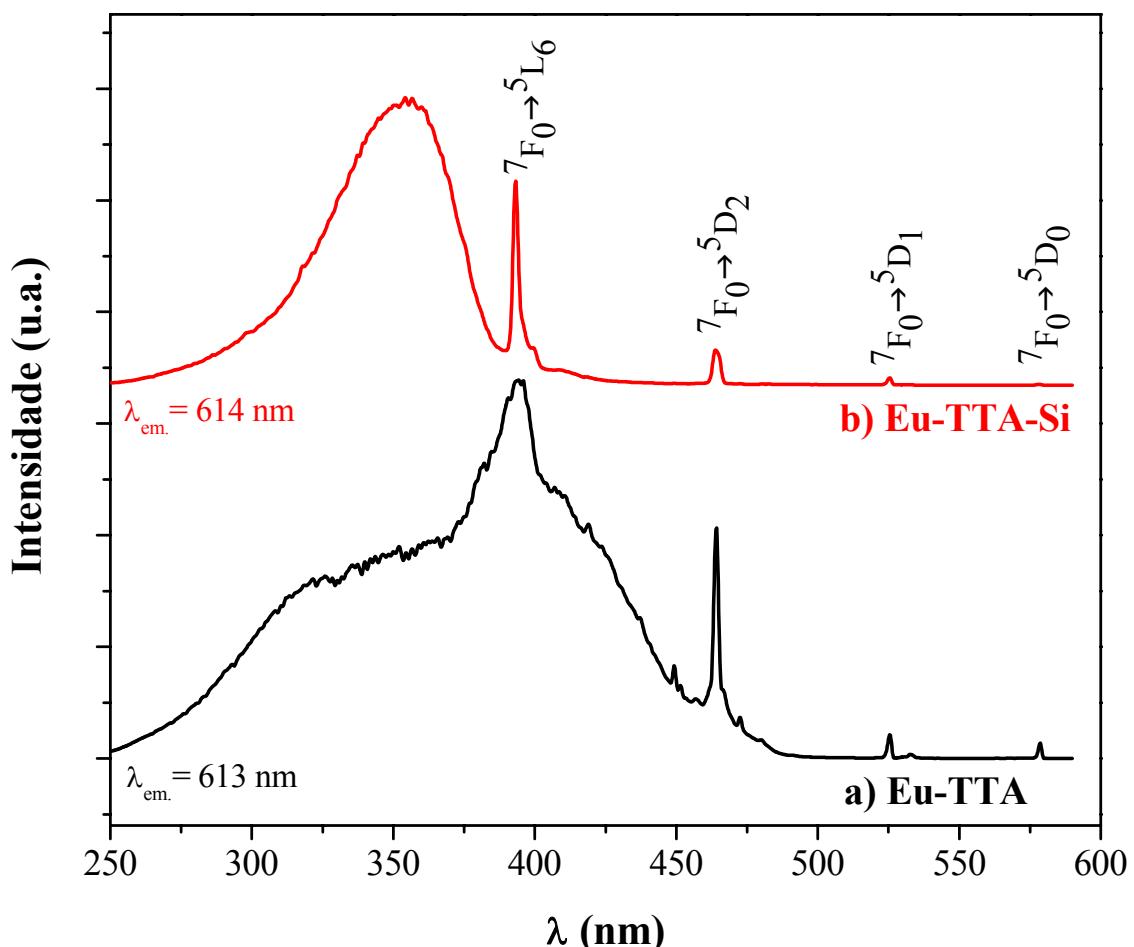
**Figura 5.1.** Espectros de excitação do a) complexo Eu-ACAC e b) material Eu-ACAC-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ .

Quanto aos espectros de excitação do complexo Eu-TTA e do sistema Eu-TTA-Si ([Figura. 5.2](#)) registrado a baixa temperatura (77 K) apresentam perfis espetrais bastante diferentes. Para o espectro do material Eu-TTA-Si é observada uma banda de absorção larga, tipo gaussiana, na região de 250 a 400 nm, centrada em 350 nm, está associada à transição permitida  $S_1 \rightarrow S_0$  pertencente ao ligante TTA. Ademais, este espectro ([Figura. 5.2b](#)) exibe somente três bandas finas atribuídas às transições intraconfiguracionais do íon  $\text{Eu}^{3+}$ , sendo

Capítulo 5 – Investigação da fotoluminescência de marcadores ópticos para ensaios biológicos

relativas as transições eletrônicas  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$  (394 nm),  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$  (464 nm) e  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_1$  (525 nm).

Por outro lado, o espectro de excitação do complexo Eu-TTA exibe uma banda de absorção bastante alargada que compreende a faixa espectral de 250 a 475 nm sobreposta com as bandas finas atribuídas as transições  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$  (394 nm),  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$  (464 nm) do íon európio trivalente. Nota-se também no espectro de excitação do complexo o surgimento de uma banda fina em torno de 578 nm referente à transição  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  do íon terra rara, porém ausente no espectro do material Eu-TTA-Si. A diferença entre os dados espetrais do complexo e do sistema Eu-TTA-Si sugere que houve uma interação efetiva entre o complexo Eu-TTA e a rede sílica (Eu-TTA-Si).



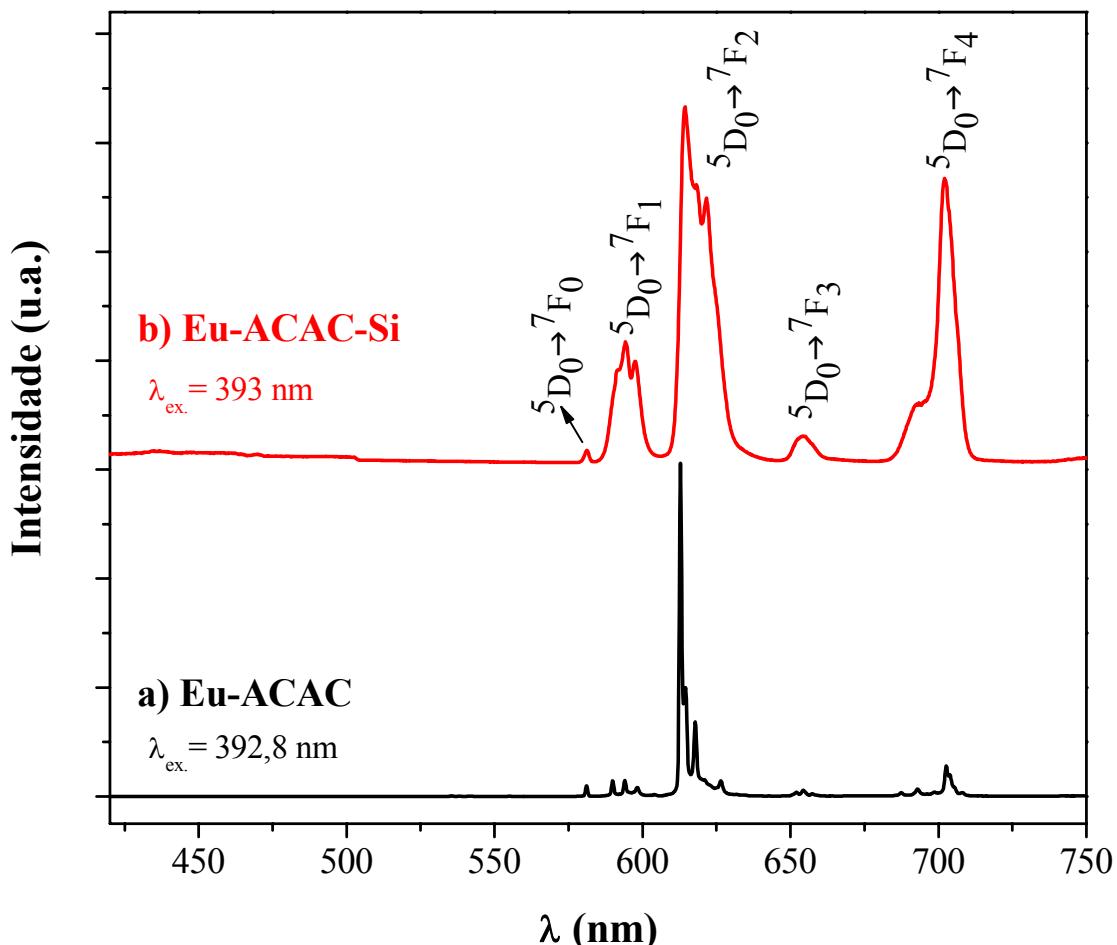
**Figura 5.2.** Espectros de excitação do a) complexo Eu-TTA e b) material Eu-TTA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ .

A diferença entre as bandas de absorção nos espectros de excitação dos complexos precursores Eu-(β-dicetonato) ([Figuras 5.1 e 5.2](#)) e do material amino-funcionalizado Eu-(β-dicetonato)-Si, onde β-dicetonato = ACAC e TTA, sugere que houve uma interação entre a rede de sílica e o complexo de terra rara. Este resultado evidencia alteração no ambiente químico ao redor do íon Eu<sup>3+</sup> [19,20]. Ademais, o espectro do material Eu-TTA-Si ([Figura 5.2b](#)) apresenta uma banda na região de absorção do TTA com maior intensidade quando comparada com as transições intraconfiguracionais  $^7F_0 \rightarrow ^5D_J$  do íon Eu<sup>3+</sup> no sistema, indicando o grande potencial do ligante TTA em atuar como “antena”, devido à eficiente transferência de energia ligante TTA–Eu<sup>3+</sup>.

Para o estudo da fotoluminescência dos complexos Eu-ACAC ([Figura 5.3a](#)) e Eu-TTA ([Figura 5.4a](#)) e dos materiais Eu-ACAC-Si ([Figura 5.3b](#)) e Eu-TTA-Si ([Figura 5.4b](#)), foram registrados espectros na faixa de 420 a 750 nm, sob excitação na transição  $^7F_0 \rightarrow ^5L_6$  do íon Eu<sup>3+</sup>. Estes espectros de emissão exibem bandas finas atribuídas às transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$  (onde J= 0, 1, 2, 3 e 4), nos quais apresentam a transição hipersensível  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  como a banda mais proeminente. No entanto, a intensidade da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  em relação à transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$  diminui nos espectros de emissão para os materiais Eu-(β-dicetonato)-Si quando comparados com os complexos Eu-(β-dicetonato), indicando um caráter centrossimétrico. Nota-se também a ausência das bandas largas compreendidas entre 420 e 600 nm, referente ao estado tripleto (T) dos ligantes ACAC e TTA com valores de 25000 e 20492 cm<sup>-1</sup> [21,22], respectivamente indicando uma eficiente transferência de energia.

É observado um alargamento das bandas de emissão ([Figura 5.4b](#)) das transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$  do sistema Eu-TTA-Si comparadas com aquelas do complexo, que pode ser explicada pela não homogeneidade dos sítios de Eu<sup>3+</sup> devido a microestrutura porosa da sílica [20,23]. Além do mais, as bandas alargadas atribuídas às transições 4f são típicas de material amorfo, corroborando com os dados obtidos com a técnica de difração de raios X. Deve-se

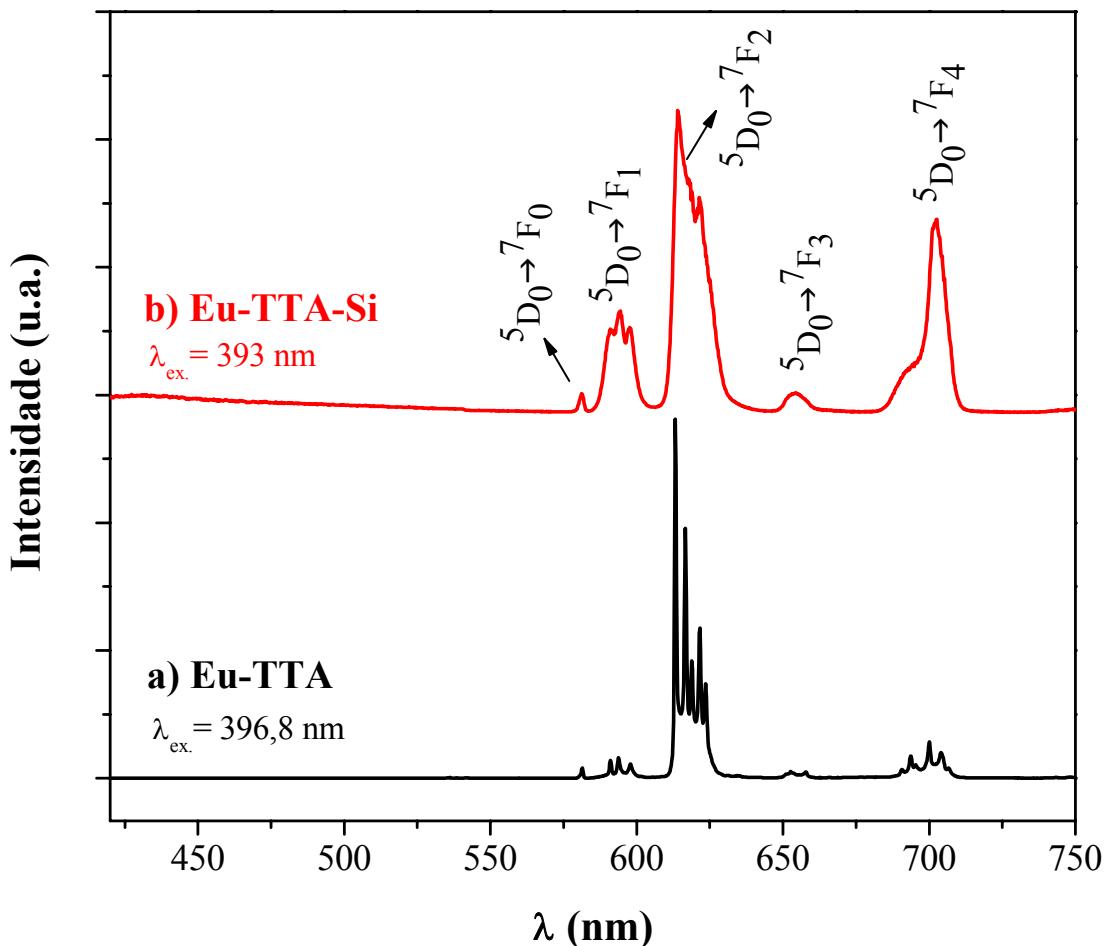
ressaltar que Malta *et al* [23] relatou que um dos efeitos da distribuição de diferentes sítios de simetria ocupados pelo íon terra rara em materiais vítreos é a presença do alargamento de linhas não homogêneas.



**Figura 5.3.** Espectros de emissão do a) complexo Eu-ACAC e b) material Eu-ACAC-Si. Os espectros foram registrados a 77 K, sob excitação na transição  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  em  $\lambda \approx 393$  nm.

É importante ressaltar que os materiais Eu-ACAC-Si e Eu-TTA-Si exibem uma intensidade excepcionalmente alta de emissão da transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ , sugerindo a incorporação dos complexos de  $\text{Eu}^{3+}$ , modificando o ambiente químico ocupado pelo íon  $\text{Eu}^{3+}$  para uma simetria próxima de um centro de inversão [24], embora uma parte dos complexos possa estar situada na superfície das partículas. As diferenças na energia, no perfil e na largura das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-4}$  entre os complexos Eu-( $\beta$ -dicetonato) e as partículas

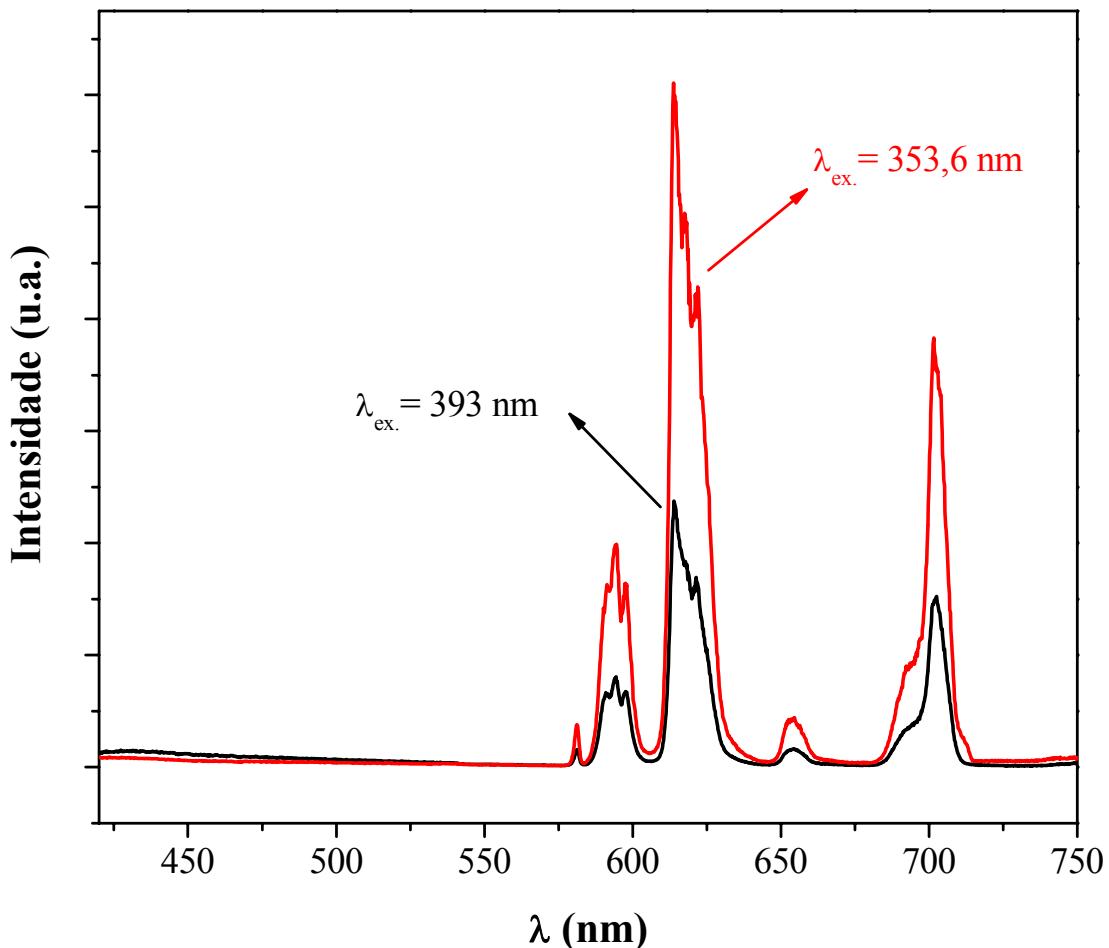
Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si indicam que existem modificações no ambiente do íon Eu<sup>3+</sup> quando o complexo é incorporado na rede de sílica.



**Figura 5.4.** Espectros de emissão do a) complexo Eu-TTA com excitação monitorada no íon Eu<sup>3+</sup> a  $\lambda = 396,8 \text{ nm}$  e b) material Eu-TTA-Si com excitação monitorada no íon Eu<sup>3+</sup> a  $\lambda = 393 \text{ nm}$ , ambos registrados a 77 K.

O espectro de emissão do sistema Eu-TTA-Si também foi registrado sob excitação na banda do ligante ( $\lambda_{\text{ex.}} = 353,6 \text{ nm}$ ) (Figura 5.5). Observou-se que o perfil espectral deste sistema é semelhante daquele monitorado com excitação na banda fina do íon Eu<sup>3+</sup> em 393 nm. No entanto, o espectro de emissão da partícula de silica amino-funcionalizada Eu-TTA-Si apresentou uma maior intensidade luminescente quando a excitação é monitorada na banda de absorção do ligante TTA. Deste modo, o material Eu-TTA-Si apresenta maior transferência de energia ligante–metal quando é excitado na banda do ligante, que atua como sensibilizador

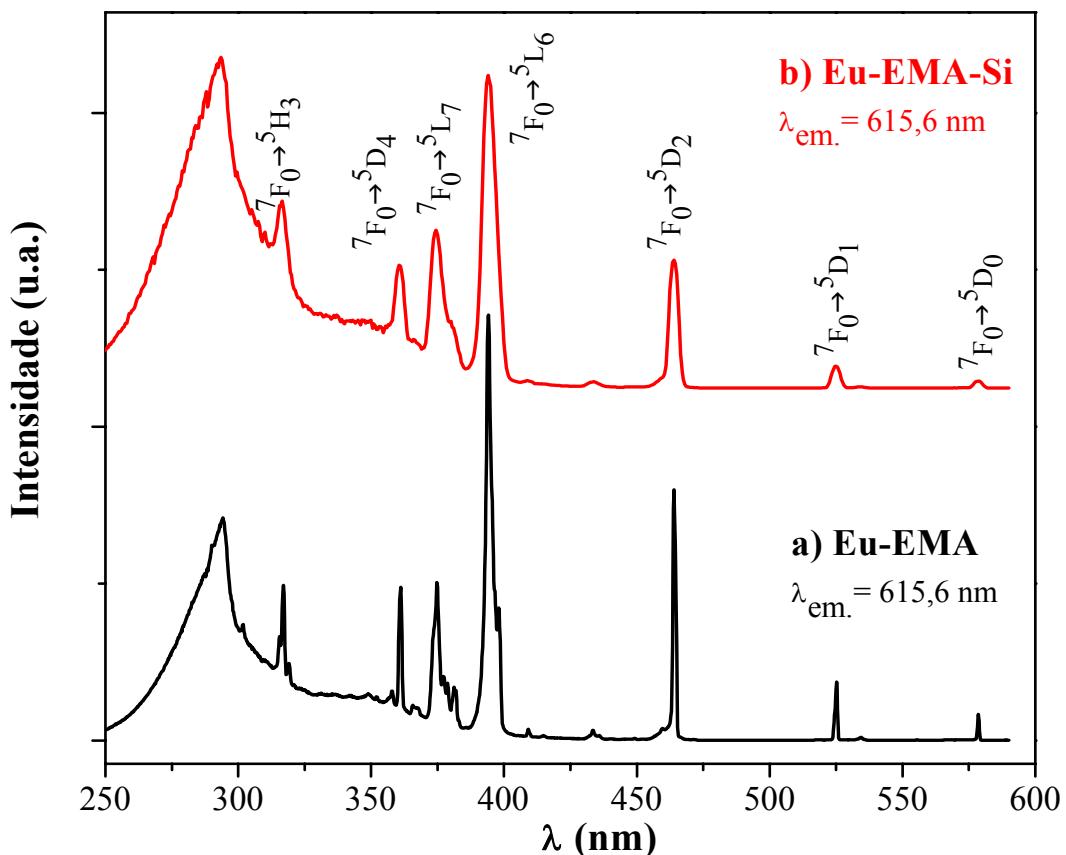
de luminescência e, consequentemente, apresenta-se como potencial candidato na aplicação de marcadores ópticos como dispositivos moleculares conversores de luz (DMCL).



**Figura 5.5.** Espectros de emissão do Eu-TTA-Si com excitação monitorada no íon  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\lambda = 393 \text{ nm}$  e com excitação monitorada na banda do ligante TTA a  $\lambda = 353,6 \text{ nm}$ , registrados a 77 K.

### 5.1.2. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Eu-BTC, preparadas pelo método micro-ondas

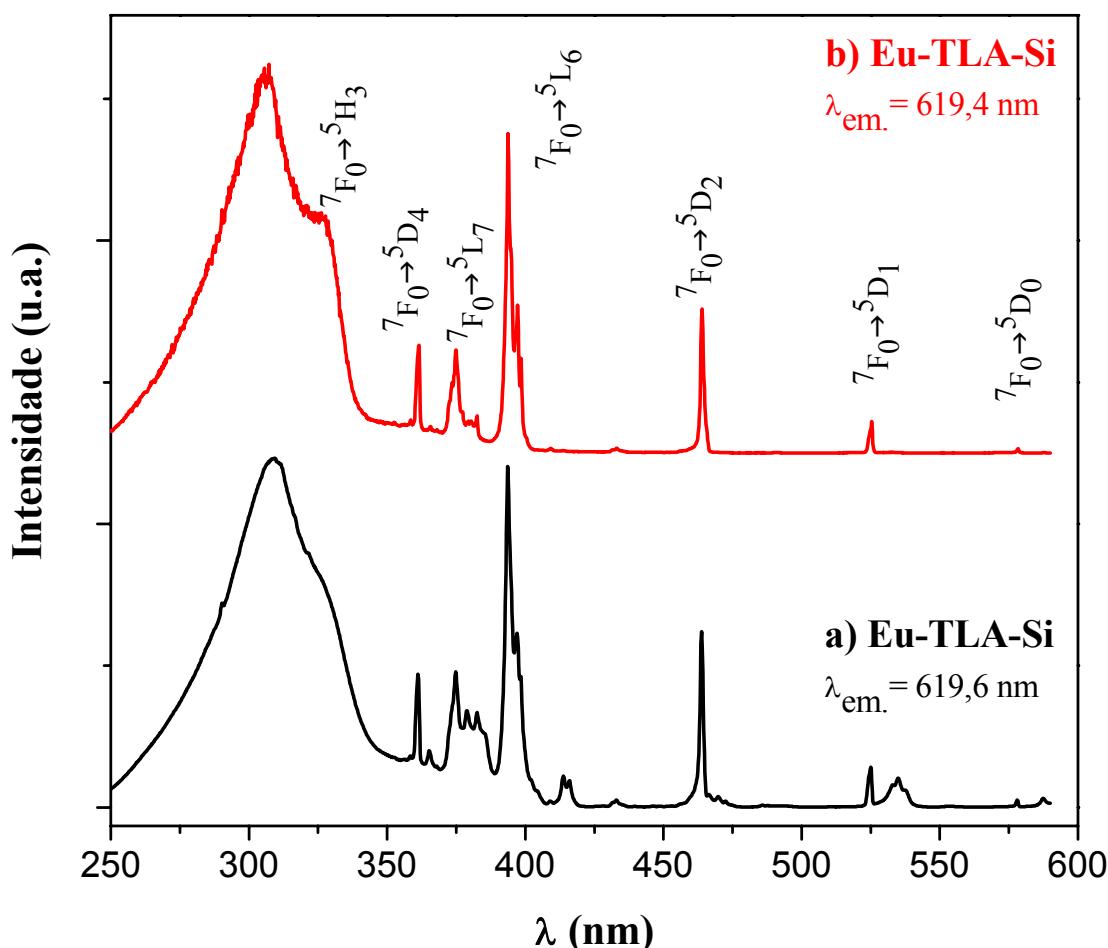
Nesta secção serão investigadas as propriedades espectroscópicas dos complexos benzenotricarboxilatos (BTC) de  $\text{Eu}^{3+}$  e dos materiais Eu-BTC-Si com base nos espectros de excitação e emissão. Os espectros de excitação foram registrados a temperatura ambiente (298 K) e do nitrogênio líquido (77 K) (Figuras 5.6 a 5.8) sob monitoramento na emissão da transição hipersensível  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ . As bandas finas de absorção observadas em 317, 361, 375, 394, 464, 525 e 579 nm foram atribuídas às transições 4f<sup>6</sup> intraconfiguracionais características do íon  $\text{Eu}^{3+}$  correspondentes a  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{H}_3$ ,  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_4$ ,  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{L}_7$ ,  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{L}_6$ ,  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_2$ ,  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_1$  e  $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_0$ , respectivamente. Ademais, nota-se no intervalo espectral de 350 a 590 nm que os sistemas Eu-BTC-Si exibem as mesmas transições intraconfiguracionais 4f<sup>6</sup> do íon  $\text{Eu}^{3+}$ .



**Figura 5.6.** Espectros de excitação do a) complexo Eu-EMA e b) material Eu-EMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ .

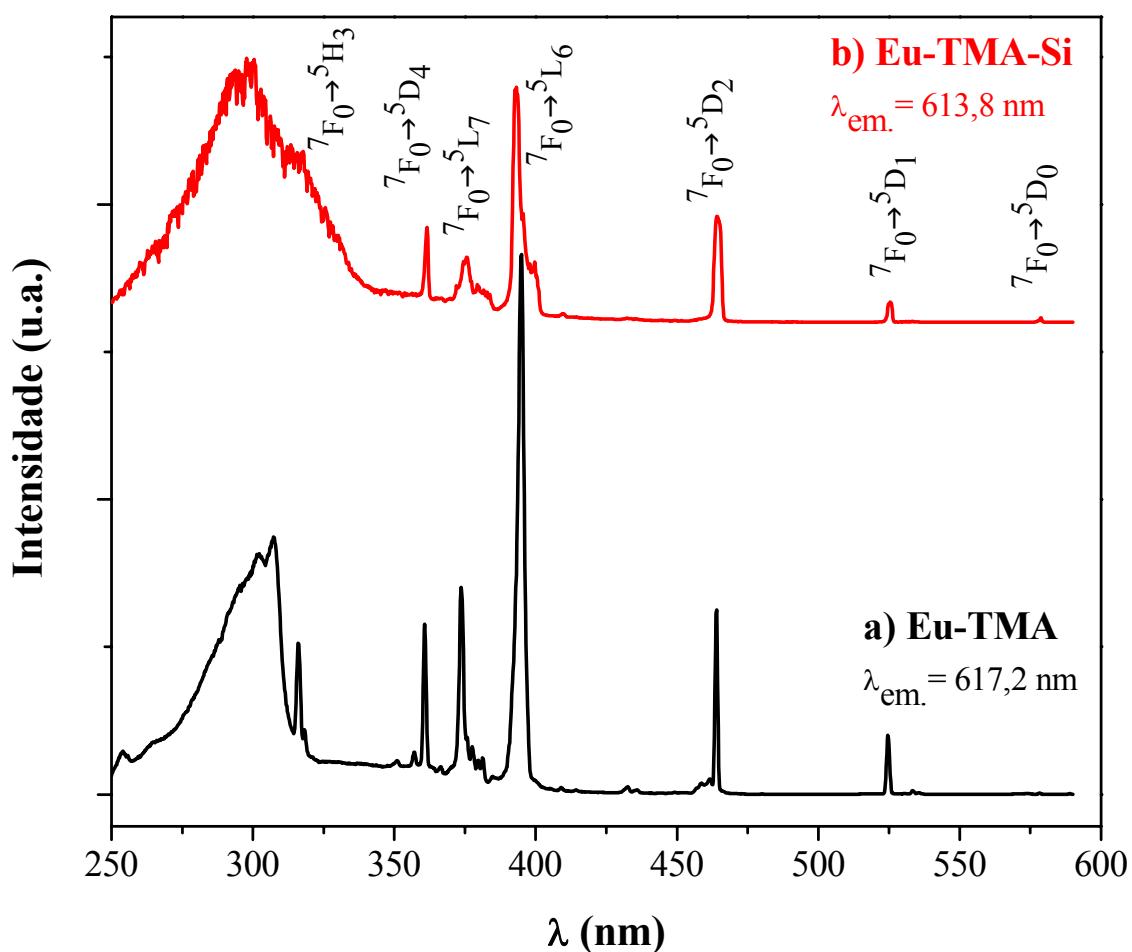
Verifica-se no espectro de excitação do material Eu-EMA-Si (Figura 5.6b) um maior alargamento nas bandas intraconfiguracionais  $4f^6$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  quando comparados com os materiais Eu-TLA-Si (Figura 5.7b) e Eu-TMA-Si (Figura 5.8b).

No geral, as bandas largas dos Eu-BTC-Si situadas na região espectral de 250-350 nm atribuída aos estados do ligante BTC apresentam perfis semelhantes aquelas dos respectivos complexos (Figuras 5.6 a 5.8). Este dado sugere que os complexos foram incorporados à rede de sílica quando preparado pela reação de condensação do APTES utilizando o método micro-ondas, preservando as características ópticas dos complexos.



**Figura 5.7.** Espectros de excitação do a) complexo Eu-TLA e b) material Eu-TLA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ .

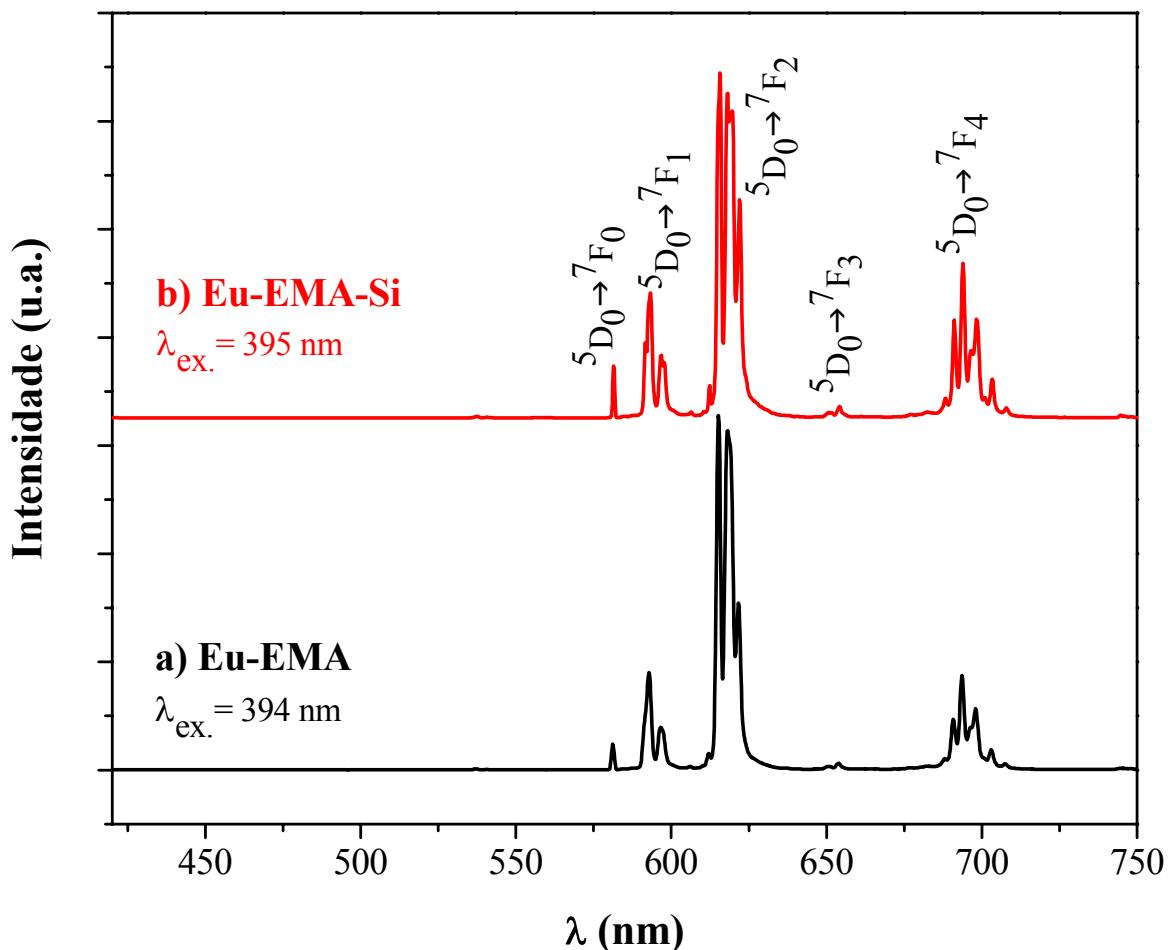
Verifica-se que esta banda larga é de intensidade próxima que das transições do centro metálico, exceto para os complexos Eu-EMA (Figura 5.6a) e Eu-TMA (Figura 5.8a) onde a banda larga é mais intensa do que as transições do centro metálico. Ademais, o perfil da banda larga espectro de excitação do material Eu-TMA-Si (Figura 5.8b) é diferente quando comparado com o complexo (Figura 5.8a), indicando a existência de uma interação efetiva entre os íons Eu<sup>3+</sup> e a rede de sílica.



**Figura 5.8.** Espectros de excitação do a) complexo Eu-TMA e b) material Eu-TMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição hipersensível  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ .

Para a investigação das propriedades luminescentes a partir dos dados espectrais de emissão dos complexos Eu-BTC e das partículas Eu-BTC-Si foram registrados os espectros a baixa temperatura (77 K) na faixa espectral de 420 a 750 nm, sob excitação na transição

$^7F_0 \rightarrow ^5L_6$ , em torno de 394 nm (Figuras 5.9 a 5.11). Observa-se bandas finas atribuídas às transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$  (onde  $J = 0-4$ ), exibindo a transição hipersensível  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  com maior intensidade.

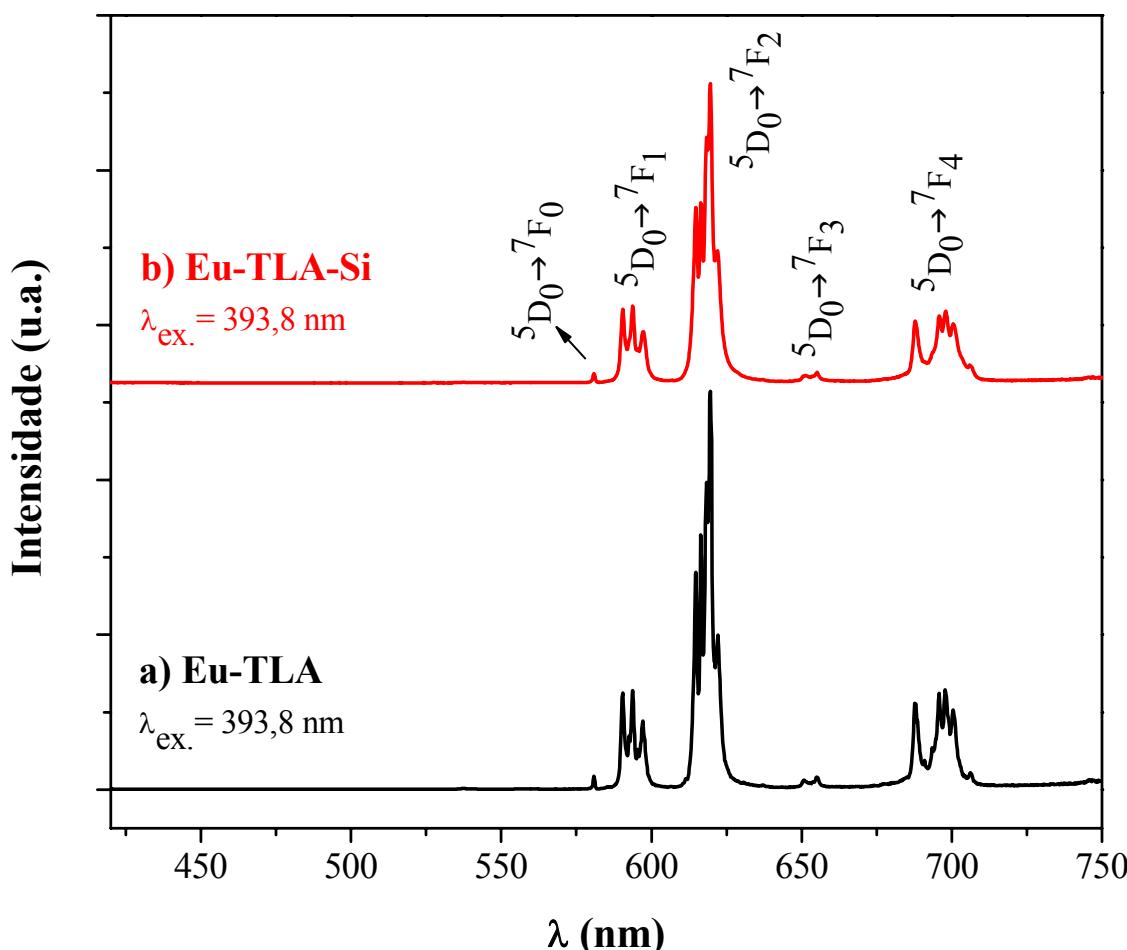


**Figura 5.9.** Espectros de emissão do a) complexo Eu-EMA com excitação monitorada no íon  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\lambda = 394$  nm e b) material Eu-EMA-Si com excitação monitorada no íon  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\lambda = 395$  nm, ambos registrados a 77 K.

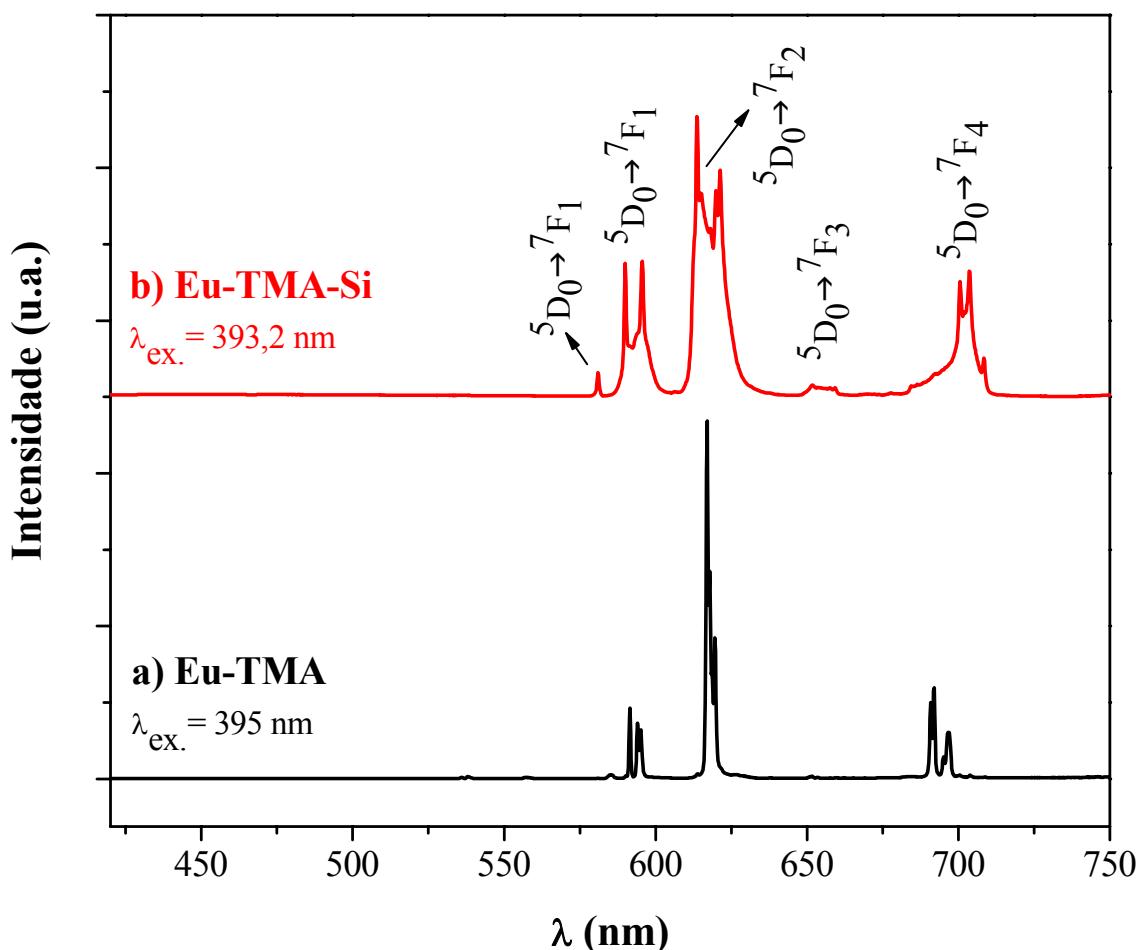
Os perfis espectrais das bandas de emissão dos sistemas Eu-EMA-Si (Figura 5.9b) e Eu-TLA-Si (Figura 5.10b) são semelhantes aquelas dos complexos Eu-EMA (Figura 5.9a) e Eu-TLA (Figura 5.10a), respectivamente, apresentando bandas finas características dos complexos precursores. No entanto, este comportamento espectroscópico de emissão é diferente para o sistema Eu-TMA-Si (Figura 5.11b) que apresenta bandas alargadas

comparada com o complexo precursor Eu-TMA (Figura 5.11a), devido a não homogeneidade dos sítios de  $\text{Eu}^{3+}$  na microestrutura porosa da sílica [7-9].

Também foi observado que as intensidades de emissão da transição  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  para as partículas Eu-EMA-Si (Figura 5.9b) e Eu-TLA-Si (Figura 5.10b) apresentam maiores em relação à transição  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ , porém não tão pronunciada como aquela apresentada para o sistema Eu-TMA-Si (Figura 5.11b). Além do mais, o sistema Eu-TMA-Si demonstra um comportamento centrossimétrico acentuado, que é semelhante aquele observado para as partículas Eu-ACAC-Si (Figura 5.3b) e Eu-TTA-Si (Figura 5.4b) apresentando transições  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$  alargadas que são típicas de material amorfo.

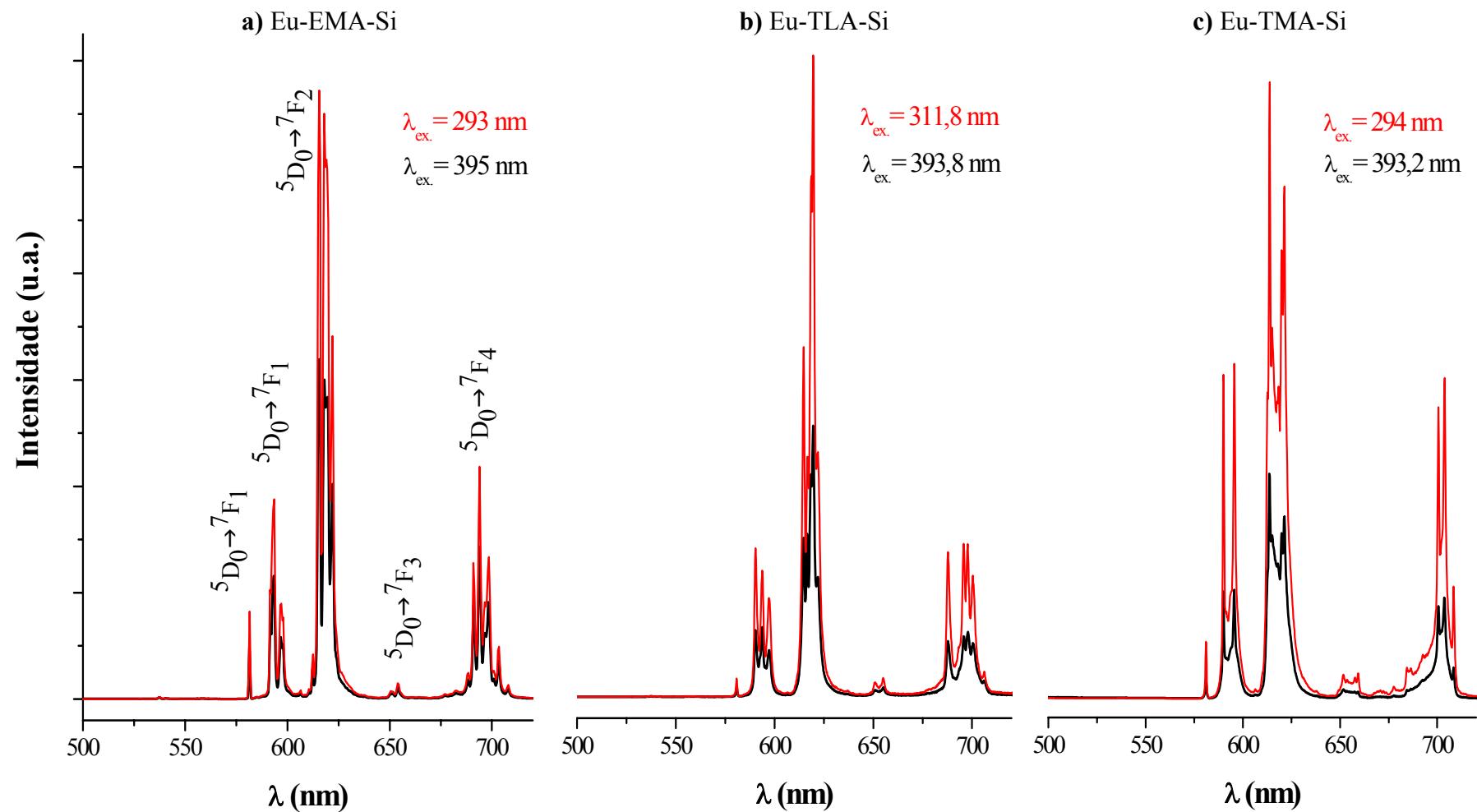


**Figura 5.10.** Espectros de emissão do a) complexo Eu-TLA e b) dmaterial Eu-TLA-Si, com excitação monitorada no íon  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\lambda = 393,8 \text{ nm}$ , ambos registrados a 77 K.



**Figura 5.11.** Espectros de emissão do a) complexo Eu-TMA com excitação monitorada no íon  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\lambda = 393,2 \text{ nm}$  e b) material Eu-TMA-Si com excitação monitorada no íon  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\lambda = 395 \text{ nm}$ , ambos registrados a 77 K.

Os espectros de emissão para os sistemas Eu-BTC-Si registrados com excitação na banda do ligante benzenotricarboxilato (Figura 5.12) apresentam maior intensidade de luminescência quando comparado com o sistema sob excitação no íon terra rara. Este comportamento espectroscópico indica que os processos de transferência de energia do estado T do BTC para os níveis  ${}^{2S+1}\text{L}_J$  excitados do íon  $\text{Eu}^{3+}$  são eficientes, corroborado pela ausência das bandas largas oriundas da fosforescência atribuídas aos estados triplets dos ligantes BTC. As energias dos estados T para os ligantes EMA, TLA e TMA foram determinadas por Souza *et al.* [25] e apresentaram valores de 25694, 25523 e 25100  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 5.12.** Espectros de emissão dos sistemas a) Eu-EMA-Si, b) Eu-TLA-Si e c) Eu-TMA-Si, com excitação monitorada no íon  $\text{Eu}^{3+}$  e na banda do ligante BTC, registrados a 77 K.

### 5.1.3. Tempo de vida da luminescência

O estado excitado, uma vez populado, tende a relaxar ao estado fundamental através de decaimentos radiativos e não radiativos. O tempo de vida ( $\tau$ ) do estado emissor  $^5D_0$  do íon Eu $^{3+}$ , tempo médio no qual o sistema permanece no estado excitado, foi determinado experimentalmente através do decaimento da intensidade de emissão,  $I(t)$ , ao longo do tempo,  $t$ , usando-se a aproximação de dois níveis [26]. Portanto, a variação da população com o tempo do nível emissor para um comportamento mono-exponencial é dada por:

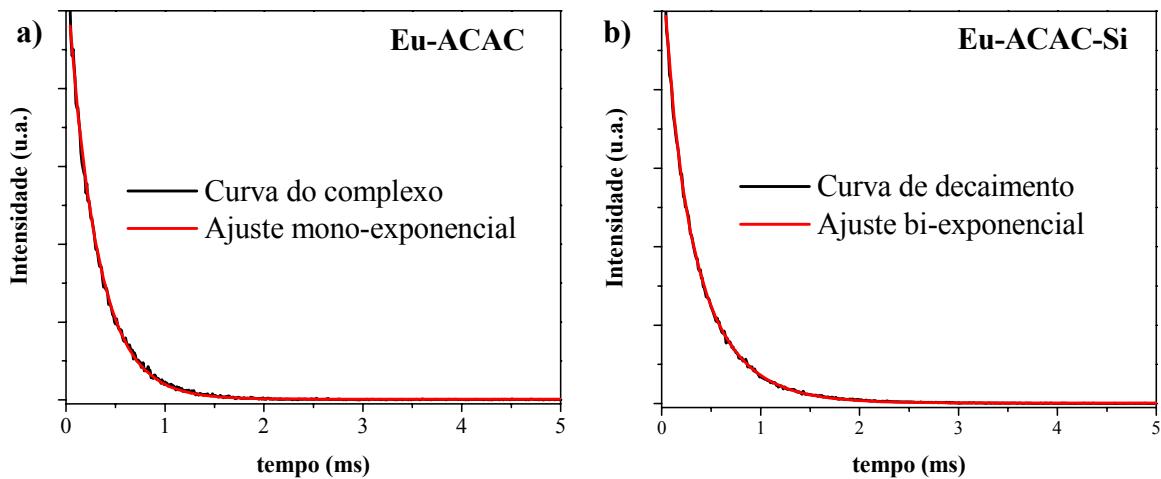
$$\frac{d\eta_{\text{emissor}}}{dt} = -K_T \eta_{\text{emissor}} \quad (5.1)$$

– onde  $\eta_{\text{emissor}}$  é a população do nível emissor,  $K_T$  representa as taxas radiativas ( $A_{\text{rad}}$ ) e não radiativas ( $A_{\text{nrad}}$ ). A integração da [equação 5.1](#) resulta no decaimento exponencial da luminescência – tempo necessário para a população do nível emissor decair a 1/e da população inicial.

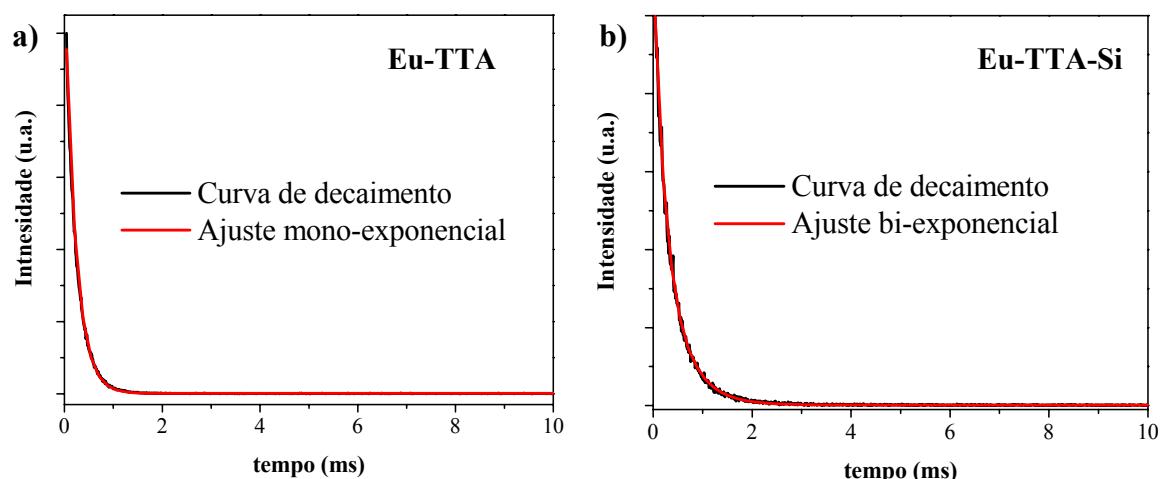
As curvas de decaimento luminescente dos complexos Eu-( $\beta$ -dicetonato) e Eu-BTC e das partículas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e Eu-BTC-Si foram registradas a temperatura ambiente (298 K), com excitação monitorada na transição  $^7F_0 \rightarrow ^5L_6$  e emissão na transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  ([Figuras 5.13 a 5.17](#)). As curvas de decaimento para os complexos foram ajustadas para uma curva mono-exponencial. Enquanto que, para os materiais com sílica um comportamento bi-exponencial [ $I(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)$ ], onde  $a_1$  e  $a_2$  correspondem aos coeficientes de intensidade. Os valores para os tempos de vida são apresentados na [Tabela 5.1](#), sendo que o tempo de vida médio  $\tau_{\text{médio}}$  do nível do íon Eu $^{3+}$  foi determinado pela fórmula  $\tau_{\text{médio}} = (a_1\tau_1) + (a_2\tau_2)/(a_1\tau_1 + a_2\tau_2)$  [27]. O ajuste bi-exponencial corrobora com o alargamento

Capítulo 5 – Investigação da fotoluminescência de marcadores ópticos para ensaios biológicos

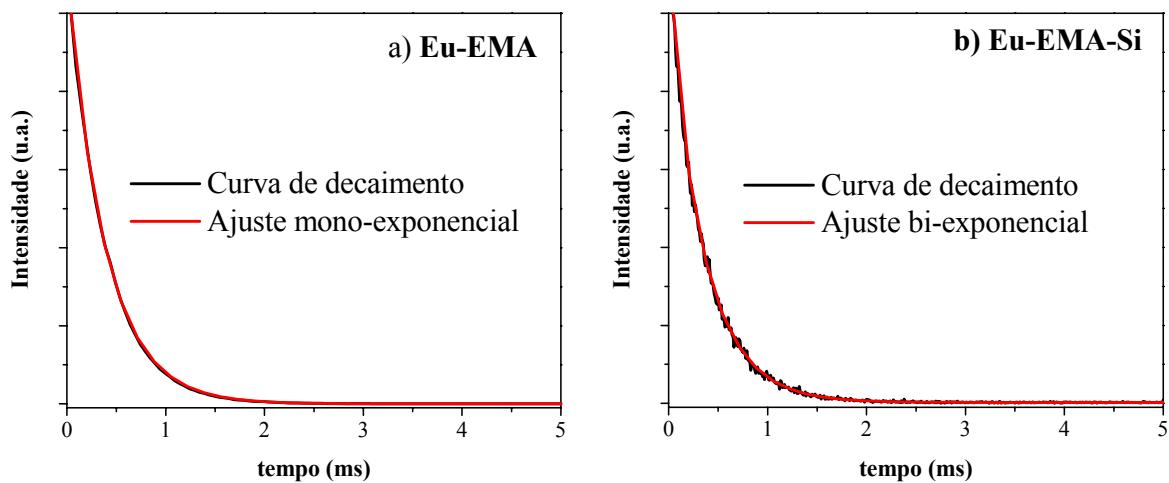
das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-4}$  do íon európio, devido à presença de mais de um sítio de simetria ao redor do íon metálico central.



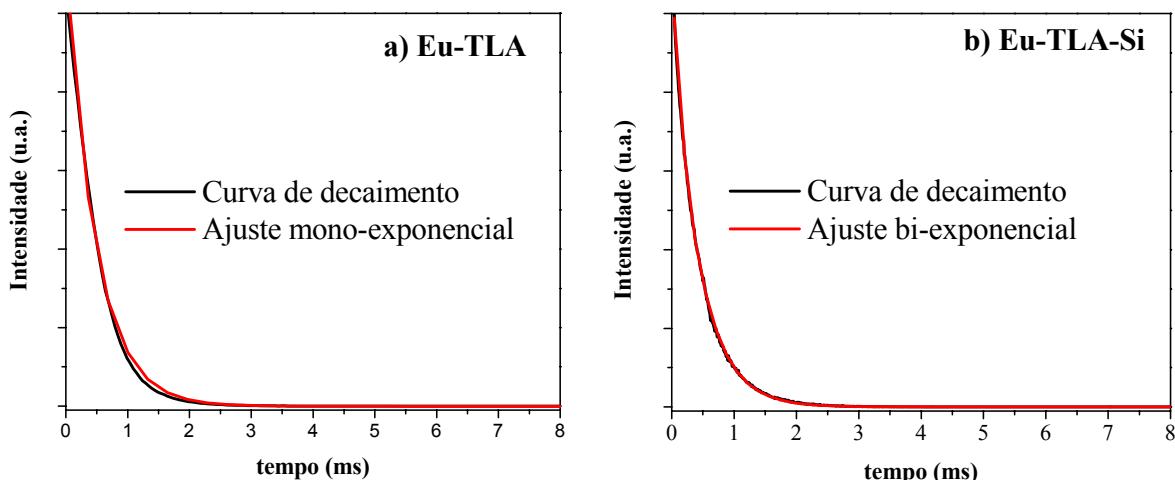
**Figura 5.13.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  ${}^5D_0$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  para a) complexo Eu-ACAC e b) material Eu-ACAC-Si, registrados a 298 K.



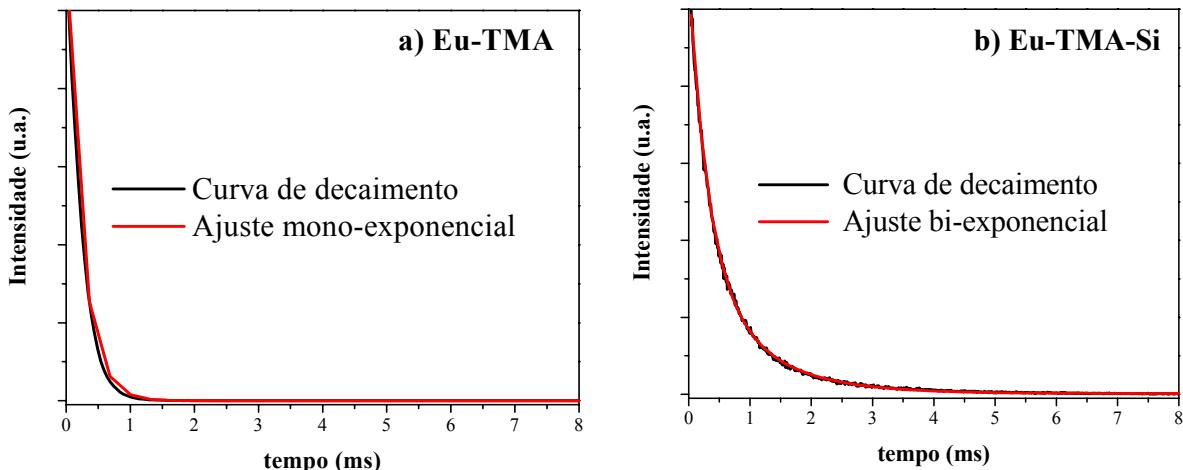
**Figura 5.14.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  ${}^5D_0$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  para a) complexo Eu-TTA e b) do material Eu-TTA-Si, registrados a 298 K.



**Figura 5.15.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  ${}^5D_0$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  para a) complexo Eu-EMA e b) do material Eu-EMA-Si, registrados a 298 K.



**Figura 5.16.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  ${}^5D_0$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  para a) complexo Eu-TLA e b) do material Eu-TLA-Si, registrados a 298 K.



**Figura 5.17.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  ${}^5D_0$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  para a) complexo Eu-TMA e b) do material Eu-TMA-Si, registrados a 298 K.

Os dados da [Tabela 5.1](#) mostram que após a silanização dos complexos Eu-( $\beta$ -dicetonatos) os tempos de vida aumentam em relação aos complexos precursores, devido a uma maior rigidez da rede sílica (Si-O) [\[28,29\]](#). Para o caso dos materiais Eu-EMA-Si e Eu-TLA-Si é observado que a silanização alterou moderadamente os valores de tempo de vida em relação aos complexos precursores. Este comportamento indica uma interação da rede de sílica com o complexo, alterando o ambiente do íon  $TR^{3+}$ . Por outro lado, o material Eu-TMA-Si apresenta um aumento considerável no valor do tempo de vida, sugerindo uma maior interação da rede rígida de sílica na estrutura do material, corroborado pelos perfis espectrais de emissão deste sistema ([Figura 5.11](#)) [\[28,29\]](#).

**Tabela 5.1.** Valores de tempos de vida  $\tau$  (ms) dos complexos Eu-( $\beta$ -dicetonatos) e Eu-BTC e das partículas Eu-( $\beta$ -dicetonatos)-Si e Eu-BTC-Si obtidos a partir das curvas de decaimento de luminescência do nível emissor  $^5D_0$  registradas a 298 K. Nota-se que as curvas de decaimento ajustadas para comportamento bi-exponencial apresentam  $\tau_1$  e  $\tau_2$  e tempo de vida médio\* ( $\tau_{\text{médio}}$ ).

Amostra	$\tau_1$ (ms)	$\tau_2$ (ms)	$\tau_{\text{médio}}^*$ (ms)
Eu-ACAC	0,30		
Eu-ACAC-Si	0,41	0,14	0,38
Eu-TTA	0,23		
Eu-TTA-Si	0,48	0,20	0,40
Eu-EMA	0,38		
Eu-EMA-Si	0,07	0,36	0,35
Eu-TLA	0,47		
Eu-TLA-Si	0,06	0,43	0,42
Eu-TMA	0,23		
Eu-TMA-Si	1,01	0,32	0,73

\* $\tau_{\text{médio}} = (a_1\tau_1)+(a_2\tau_2)/(a_1\tau_1+a_2\tau_2)$

### 5.1.4. Parâmetros de intensidade experimentais

Os parâmetros de intensidade experimentais  $\Omega_\lambda$  ( $\lambda = 2$  e  $4$ ) foram determinados para os compostos Eu-( $\beta$ -dicetonato) [1], Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si, Eu-BTC [25] e Eu-BTC-Si a partir dos dados espectrais de emissão.

Os  $\Omega_\lambda$  também chamados de parâmetros de Judd-Ofelt [30,31], são determinados por meio das intensidades das respectivas transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$  ( $J = 2$  e  $4$ ) do íon  $\text{Eu}^{3+}$  [1,32,33], onde os mecanismos de dipolo elétrico forçado (DEF) e acoplamento dinâmico (AD) são considerados simultaneamente. Por exemplo, os complexos contendo ligantes  $\beta$ -dicetonatos geralmente apresentam altos valores de  $\Omega_2$  e possuem uma maior contribuição do mecanismo de acoplamento dinâmico devido a polarizabilidade dos átomos vizinhos oriundo do ambiente químico em torno do íon  $\text{Eu}^{3+}$ . Portanto, a intensidade de luminescência ( $I$ ) é expressa em termos da área sob as transições provenientes do nível  $^5D_0$  para os níveis  $^7F_J$  ( $J = 2$  e  $4$ ) da curva de emissão do íon  $\text{Eu}^{3+}$ , que é definida como:

$$I_{0 \rightarrow J} = \hbar\omega_{0 \rightarrow J} A_{0 \rightarrow J} N_0 \quad (5.2)$$

onde  $\hbar\omega_0$  é a energia da transição (em  $\text{cm}^{-1}$ ),  $N_0$  é a população do nível emissor  $^5D_0$  e  $A_{0 \rightarrow J}$  é o coeficiente de emissão espontânea de Einstein. Para a determinação experimental do coeficiente de emissão  $A_{0 \rightarrow J}$  a partir dos espectros de emissão utilizou-se a transição permitida por dipolo magnético  $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ , que é formalmente insensível ao ambiente do campo ligante do composto de  $\text{Eu}^{3+}$  e, consequentemente, pode ser usada como uma transição de referência [34]. O valor de  $A_{0 \rightarrow J}$  para as transições de dipolo elétrico forçado é dado por:

$$A_{JJ'} = \frac{4e^2\omega^3}{3\hbar c^3} \frac{1}{2J+1} \chi \sum_{\lambda=2,4} \Omega_\lambda \left\langle ^5D_0 \left| U^{(\lambda)} \right| ^7F_J \right\rangle^2 \quad (5.3)$$

onde  $\chi = \frac{n_0(n_0^2 + 2)^2}{9}$  é o fator de correção de campo local de Lorentz,  $n_0$  é o índice de refração do meio com valor  $n_0 = 1,5$ . Os elementos de matriz reduzida ao quadrado  $\left\langle {}^5D_0 \left| U^{(\lambda)} \right| {}^7F_J \right\rangle^2$  são tabelados na literatura [35], cujos valores são 0,0032 e 0,0023 para  $J = 2$  e 4, respectivamente. Os coeficientes de emissão espontânea ( $A$ ), [equação 3](#), são obtidas a partir da [equação 5.4](#):

$$A_{0 \rightarrow J} = \left( \frac{\sigma_{0 \rightarrow 1}}{S_{0 \rightarrow 1}} \right) \left( \frac{S_{0 \rightarrow J}}{\sigma_{0 \rightarrow J}} \right) A_{0 \rightarrow 1} \quad (5.4)$$

onde  $S_{0 \rightarrow J}$  corresponde a área sob a curva relacionada à transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$  e  $\sigma_{0 \rightarrow 1}$  o baricentro da transição. O coeficiente de emissão espontânea  $A_{01}$  é dado pela expressão  $A_{01} = 0,31 \times 10^{-11} (n_0^3) (v_{01}^3)$ , cujo valor é estimado em  $50 \text{ s}^{-1}$  para índice de refração igual a 1,5. O coeficiente de emissão espontânea radiativo ( $A_{\text{rad}}$ ) do nível emissor  ${}^5D_0$  é determinado por meio da somatória das contribuições  $A_{0 \rightarrow J}$  de cada uma das transições,  $A_{\text{rad}} = \sum A_{0J} = A_{00} + A_{01} + A_{02} + A_{03} + A_{04}$ . Enquanto que os valores de todas as contribuições radiativas e não radiativas vem dado por  $A_{\text{total}} = A_{\text{rad}} + A_{\text{nrad}}$ , e podem ser avaliados através do tempo de vida ( $\tau$ ) do nível emissor  ${}^5D_0$ , com base na relação  $A_{\text{total}} = 1/\tau$ . Vale frisar que a contribuição não radiativa  $A_{\text{nrad}}$  depende do acoplamento vibrônico do ambiente químico em torno do íon  $\text{Eu}^{3+}$ . Ademais, é possível determinar a eficiência quântica ( $\eta$ ) de emissão do nível emissor  ${}^5D_0$  do íon európio com base na relação:

$$\eta = \frac{A_{\text{rad}}}{A_{\text{rad}} + A_{\text{nrad}}} \quad (5.5)$$

Os valores dos parâmetros de intensidade experimental  $\Omega_\lambda$  ( $\lambda = 2$  e  $4$ ), tempos de vida, coeficiente de emissão radiativa, coeficiente de emissão não radiativa e eficiência quântica de emissão para os complexos Eu-( $\beta$ -dicetonato) e Eu-BTC e para os sistemas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e Eu-BTC-Si são apresentados na [Tabela 5.2](#). Neste trabalho, os valores de  $\Omega_6$  não foram determinados, uma vez que as bandas referentes a transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_6$  não são observadas nos espectros de emissão.

Na [Tabela 5.2](#) é verificado um decréscimo nos valores dos parâmetros  $\Omega_2$  dos materiais Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e Eu-BTC-Si quando se compara com os dos seus respectivos complexos, devido a diminuição da intensidade da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ , indicando um maior carácter centrossimétrico. Consequentemente, os íons Eu<sup>3+</sup> nos materiais com sílica estão em um ambiente químico menos polarizável do que nos complexos, sugerindo uma menor contribuição do mecanismo de acoplamento dinâmico.

Os altos valores dos parâmetros de intensidade  $\Omega_4$  para os sistemas com sílica Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e Eu-BTC-Si comparados com os valores de  $\Omega_2$  reflete a intensidade extremamente alta da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$  observada nos espectros de emissão. Isto sugere que a incorporação dos complexos de Eu<sup>3+</sup> na sílica modifica a estrutura local ocupada pelo íon Eu<sup>3+</sup>, onde a simetria aproxima daquelas com centro de inversão.

De modo geral, os valores para eficiência quântica ( $\eta$ ) do estado emissor  $^5D_0$  dos materiais Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e Eu-BTC-Si (onde  $\beta$ -dicetonato = ACAC e TTA; BTC = EMA e TLA) ([Tabela 5.2](#)) são menores do que os determinados para os complexos precursores Eu-( $\beta$ -dicetonato) e Eu-BTC, respectivamente. Esta tendência é refletida nos valores das contribuições radiativas ( $A_{rad}$ ) e não radiativas ( $A_{nrad}$ ). Exceto para o sistema Eu-TMA-Si que apresenta maior valor  $\eta = 27\%$ , do que o complexo Eu-TMA.

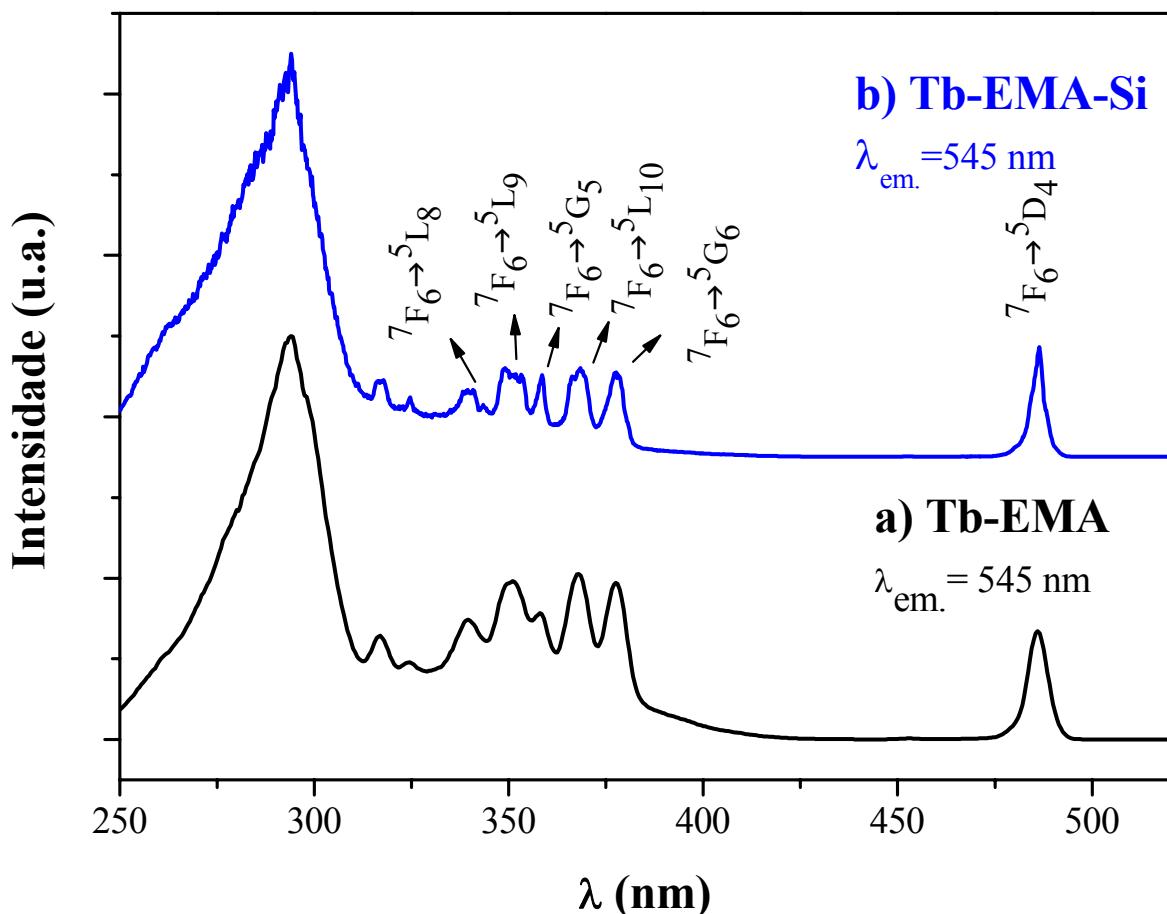
**Tabela 5.2.** Parâmetros de intensidade experimentais  $\Omega_\lambda(10^{-20} \text{ cm}^{-2})$ , tempos de vida  $\tau$  (ms), coeficiente de emissão radiativa  $A_{\text{rad}} (\text{s}^{-1})$ , coeficiente de emissão não radiativa  $A_{\text{nrad}} (\text{s}^{-1})$ , e eficiência quântica  $\eta$  (%) para os complexos: Eu-( $\beta$ -dicetonatos) e Eu-BTC, e para os materiais: Eu-( $\beta$ -dicetonatos)-Si e Eu-BTC-Si.  $R_{02}$  = a razão entre a intensidade das transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_0 / ^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ .

Amostras	$\Omega_2$ ( $10^{-20} \text{ cm}^{-2}$ )	$\Omega_4$ ( $10^{-20} \text{ cm}^{-2}$ )	$R_{02}$	$A_{\text{rad}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$A_{\text{nrad}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$A_{\text{tot}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\tau$ (ms)	$\eta$ (%)
Eu-ACAC	30	12	0,0170	757	2609	3366	0,30	32
Eu-ACAC-Si	7	10	0,0084	412	2500	2912	0,38	14
Eu-TTA	32	5	0,0120	1168	3180	4348	0,23	27
Eu-TTA-Si	8	9	0,0100	410	2090	2500	0,40	16
Eu-EMA	14	10	0,0120	622	2015	2637	0,38	24
Eu-EMA-Si	11	8	0,0150	510	2326	2836	0,35	18
Eu-TLA	10	9	0,0028	463	1653	2116	0,47	22
Eu-TLA-Si	7	8	0,0059	400	1958	2358	0,42	17
Eu-TMA	11	10	0,0042	525	3820	4345	0,23	12
Eu-TMA-Si	8	7	0,0070	373	992	1365	0,73	27

O efeito de mistura dos J's responsável pelo surgimento da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$  quando a transição é permitida por simetria é devido a mistura dos componentes  $|^7F_0\rangle$  e  $|^7F_2\rangle$ , principalmente com maior contribuição dos parâmetros do campo ligante de posto 2,  $B_q^2$  [36]. A Tabela 5.2 apresenta também os valores do parâmetro  $R_{02}$  para os compostos de Eu<sup>3+</sup>, o qual é definido como a razão entre a intensidade da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$  pela intensidade da transição hipersensível  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ . Esse parâmetro é uma medida da mistura de estados de acoplamento intermediário  $^7F_0$  componentes do estado  $^7F_2$ . Como pode ser observado, os maiores valores de  $R_{02}$  foram obtidos para o complexo Eu-ACAC ( $R_{02} = 0,0170$ ) e o sistema Eu-EMA-Si ( $R_{02} = 0,0150$ ), evidenciando a maior intensidade da transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$  resultante da mistura dos J's.

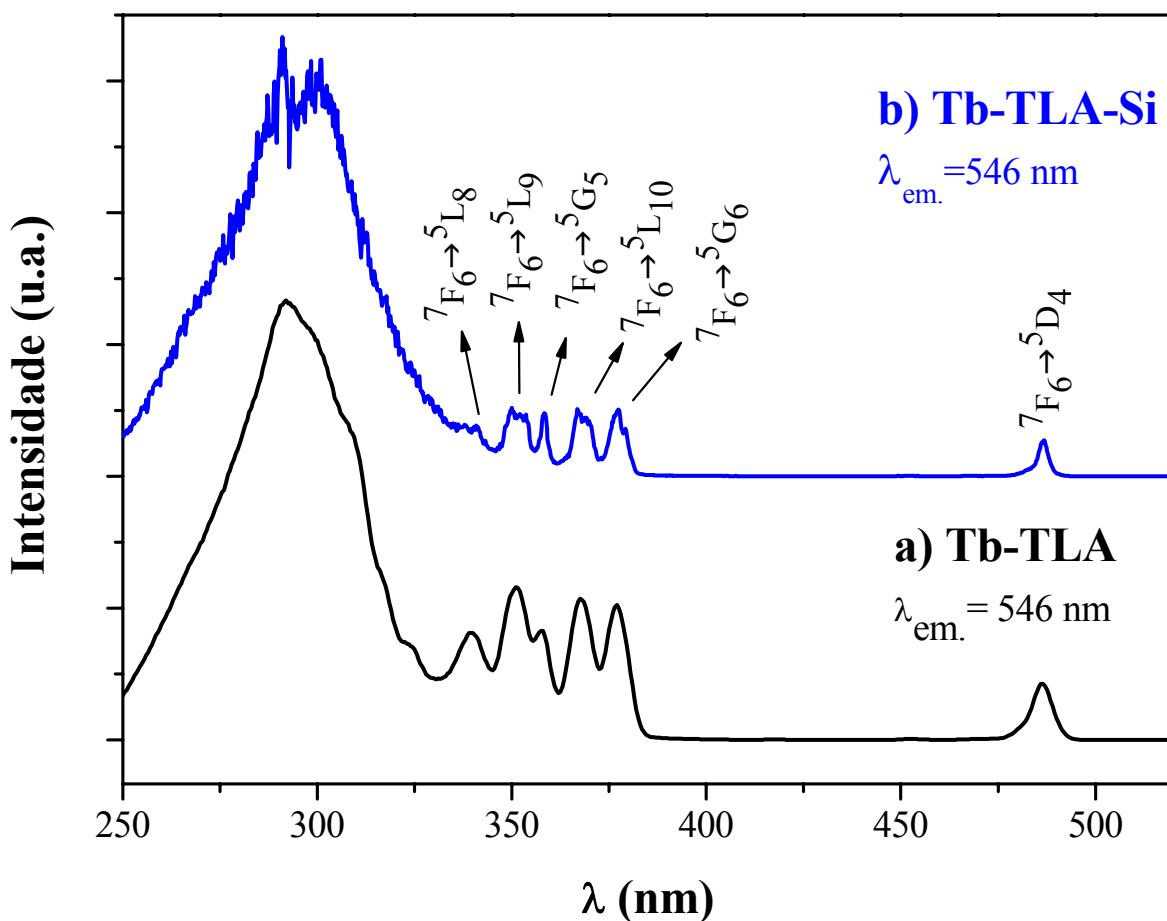
## 5.2. Investigação da luminescência das partículas de sílica contendo complexos de Tb-BTC, preparadas pelo método micro-ondas

Nesta parte da tese contém o estudo das propriedades fotoluminescentes dos complexos Tb-BTC [25] e dos materiais Tb-BTC-Si (BTC = EMA, TLA e TMA). Os espectros de excitação dos complexos Tb-BTC e das partículas de sílica funcionalizadas contendo os complexos Tb-BTC-Si foram registrados no intervalo de 250 a 520 nm, a temperatura ambiente (298 K) e a temperatura do nitrogênio líquido (77K) (Figuras 5.18 a 5.20), sob emissão em torno de 545 nm relativa a transição  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ . No entanto, os espectros de excitação destes compostos registrados a baixa temperatura apresentaram maior resolução das transições eletrônicas, devido a menor contribuição vibrônica.

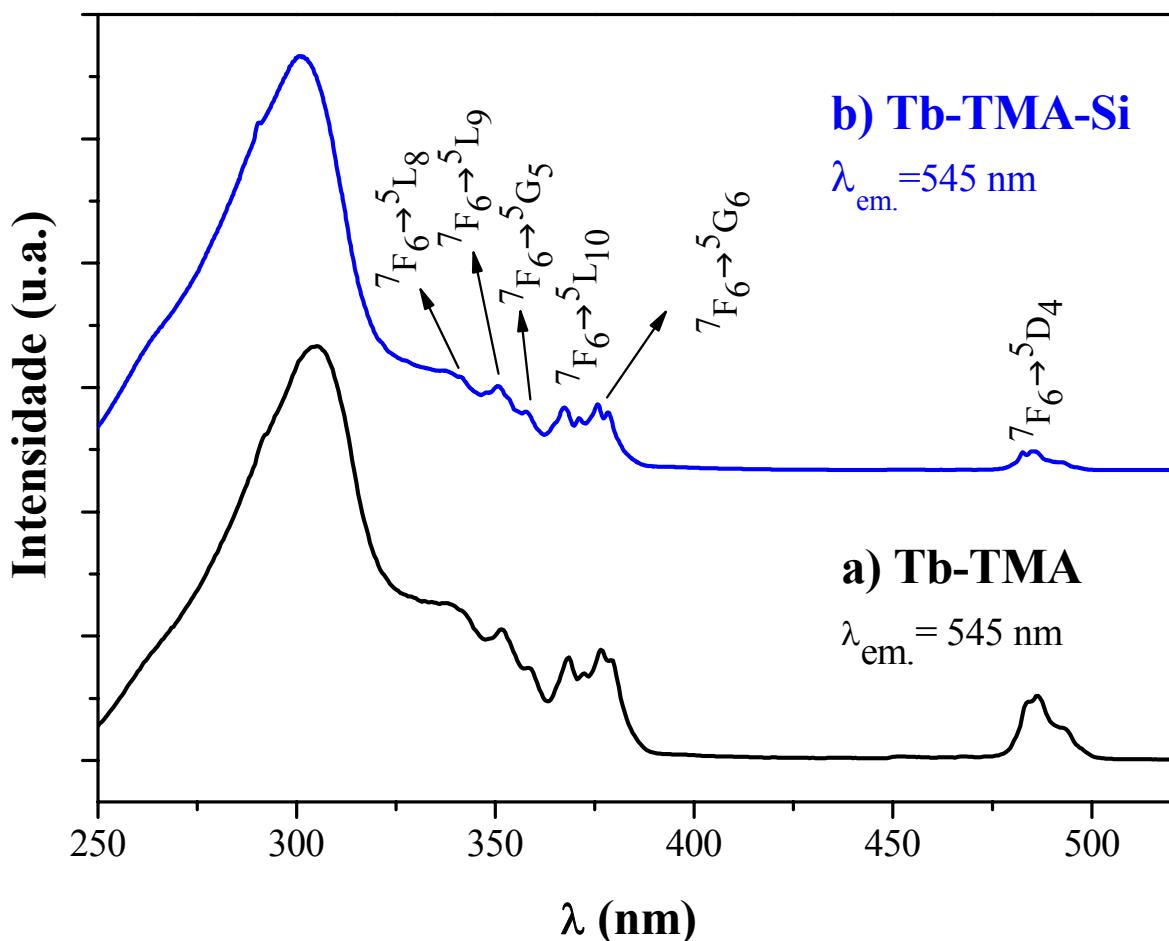


**Figura 5.18.** Espectros de excitação do complexo a) Tb-EMA e b) do material Tb-EMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$  do íon a 545 nm.

Quando se compara os espectros de excitação entre o sistema Tb-BTC-Si e o complexo precursor, nota-se que os perfis espetrais são semelhantes (Figuras 5.18 a 5.20), exibindo uma banda larga de alta intensidade oriundas dos ligantes EMA, TLA e TMA, com máximos de absorção em aproximadamente 300 nm. Também, estes espectros mostram bandas finas correspondentes às transições intraconfiguracionais características do íon  $Tb^{3+}$ :  $^7F_6 \rightarrow ^5D_4$  (486 nm),  $^7F_6 \rightarrow ^5G_6$  (376 nm),  $^7F_6 \rightarrow ^5L_{10}$  (367 nm),  $^7F_6 \rightarrow ^5G_5$  (357 nm),  $^7F_6 \rightarrow ^5L_9$  (351 nm) e  $^7F_6 \rightarrow ^5L_8$  (339 nm) [1, 37]. A maior intensidade da banda larga do ligante em relação às transições 4f-4f do íon  $Tb^{3+}$  sugere que o processo de excitação indireta do íon metálico via grupo cromóforo dos ligantes são mais eficientes.

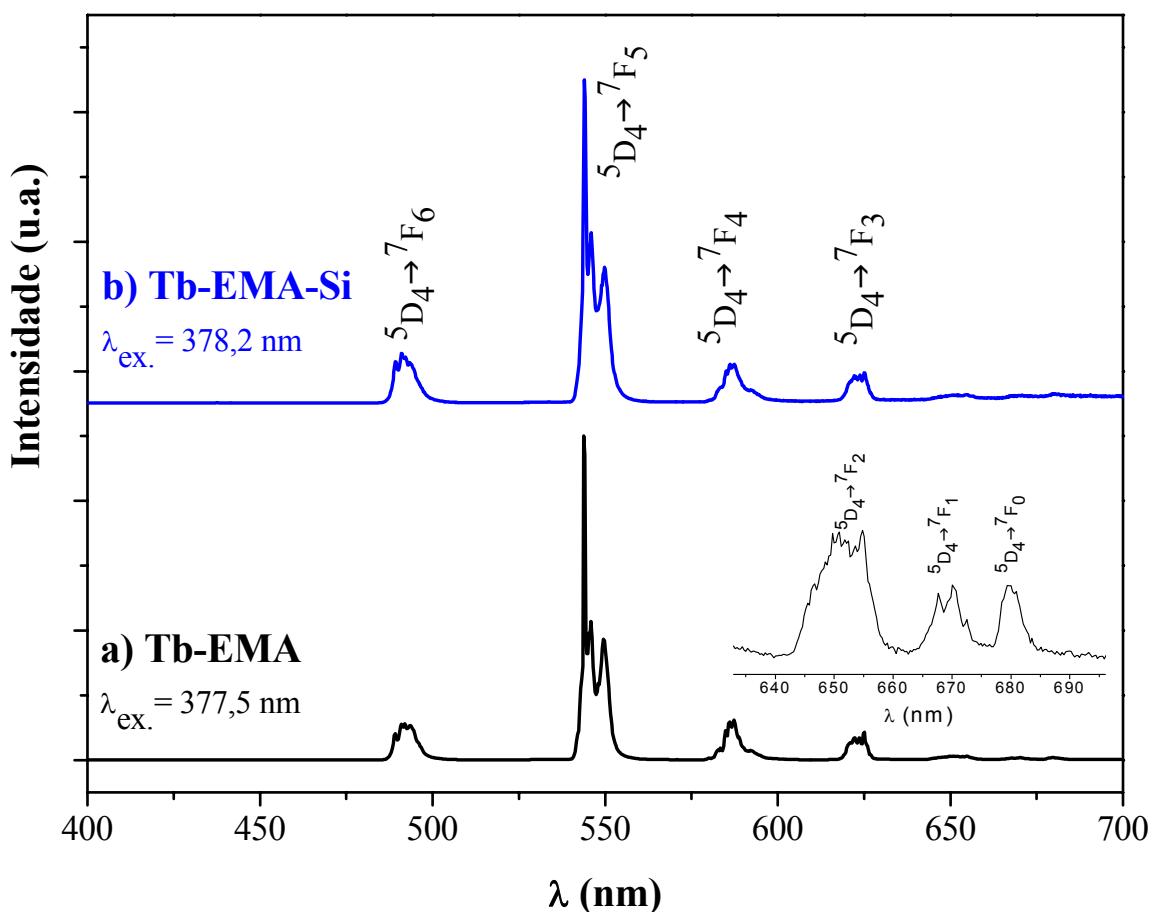


**Figura 5.19.** Espectros de excitação do complexo a) Tb-TLA e b) do material do Tb-TLA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição  $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$  do íon  $Tb^{3+}$ .



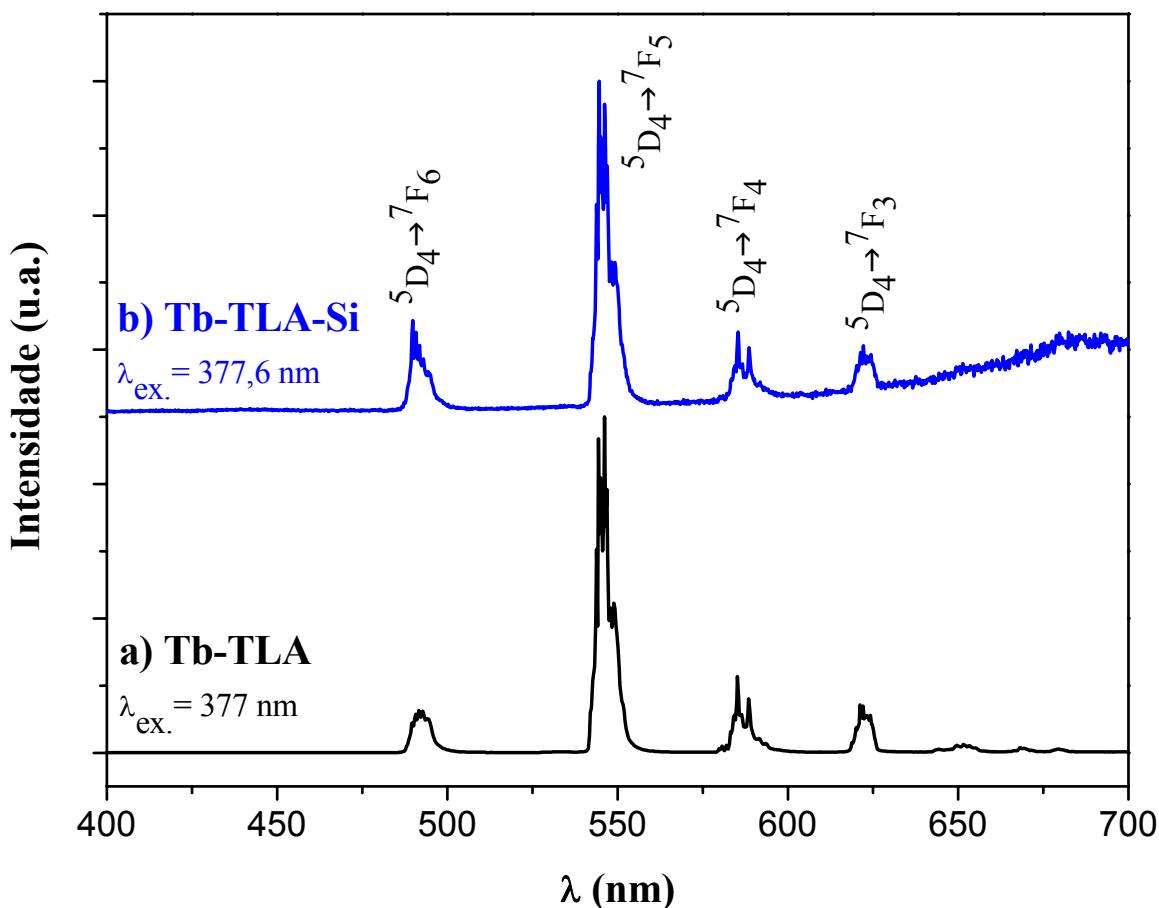
**Figura 5.20.** Espectro de excitação do complexo a) Tb-TMA e b) do material Tb-TMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição  $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$  do íon  $Tb^{3+}$ .

A fim de investigar as propriedades luminescentes dos compostos preparados pelo método por micro-ondas foram registrados os espectros de emissão (Figuras 5.21 a 5.23), no intervalo de 400 a 700 nm a temperatura ambiente (298 K) e a temperatura do nitrogênio líquido (77 K). Sendo que os espectros registrados a baixa temperatura apresentam um aumento da resolução nas bandas de emissão dos complexos e das partículas de sílica funcionalizadas, devido à diminuição das contribuições vibrônicas.



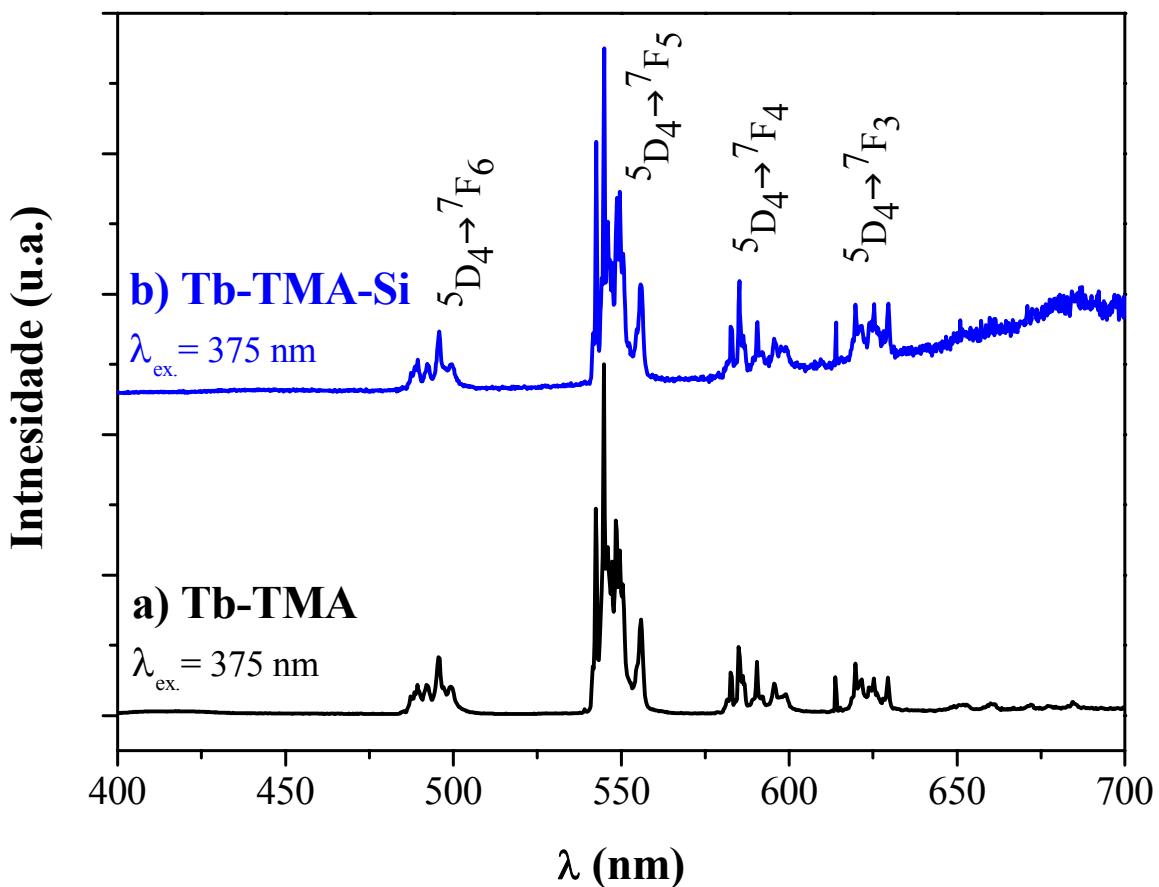
**Figura 5.21.** Espectro de emissão do complexo a) Tb-EMA e b) do material Tb-EMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição  ${}^7F_6 \rightarrow {}^5G_6$  do íon  $Tb^{3+}$ . A figura inserida mostra o espectro ampliado na região de 640 nm a 690 nm do complexo Tb-EMA.

As Figuras 5.21 a 5.23 mostram os espectros de emissão para os complexos e os sistemas com sílica (77 K). Pode-se observar bandas de emissão finas características das transições  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$  ( $J = 6, 5, 4, 3, 2, 1$  e  $0$ ), atribuídas:  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$  (490 nm),  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$  (545 nm),  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_4$  (587 nm),  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_3$  (621 nm),  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_2$  (653 nm),  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_1$  (669 nm) e  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_0$  (682 nm). A figura 5.21- inserida ilustra ampliação do espectro de emissão do complexo Tb-EMA na faixa de 640 a 690 nm com o intuito de atribuir as transições oriundas de baixos valores de momento angular total  $J = 0,1$  e  $2$ . A transição  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$  é predominante nos espectros de emissão, portanto, os complexos Tb-BTC e os materiais Tb-BTC-Si exibem uma emissão monocromática da cor verde sob irradiação UV.



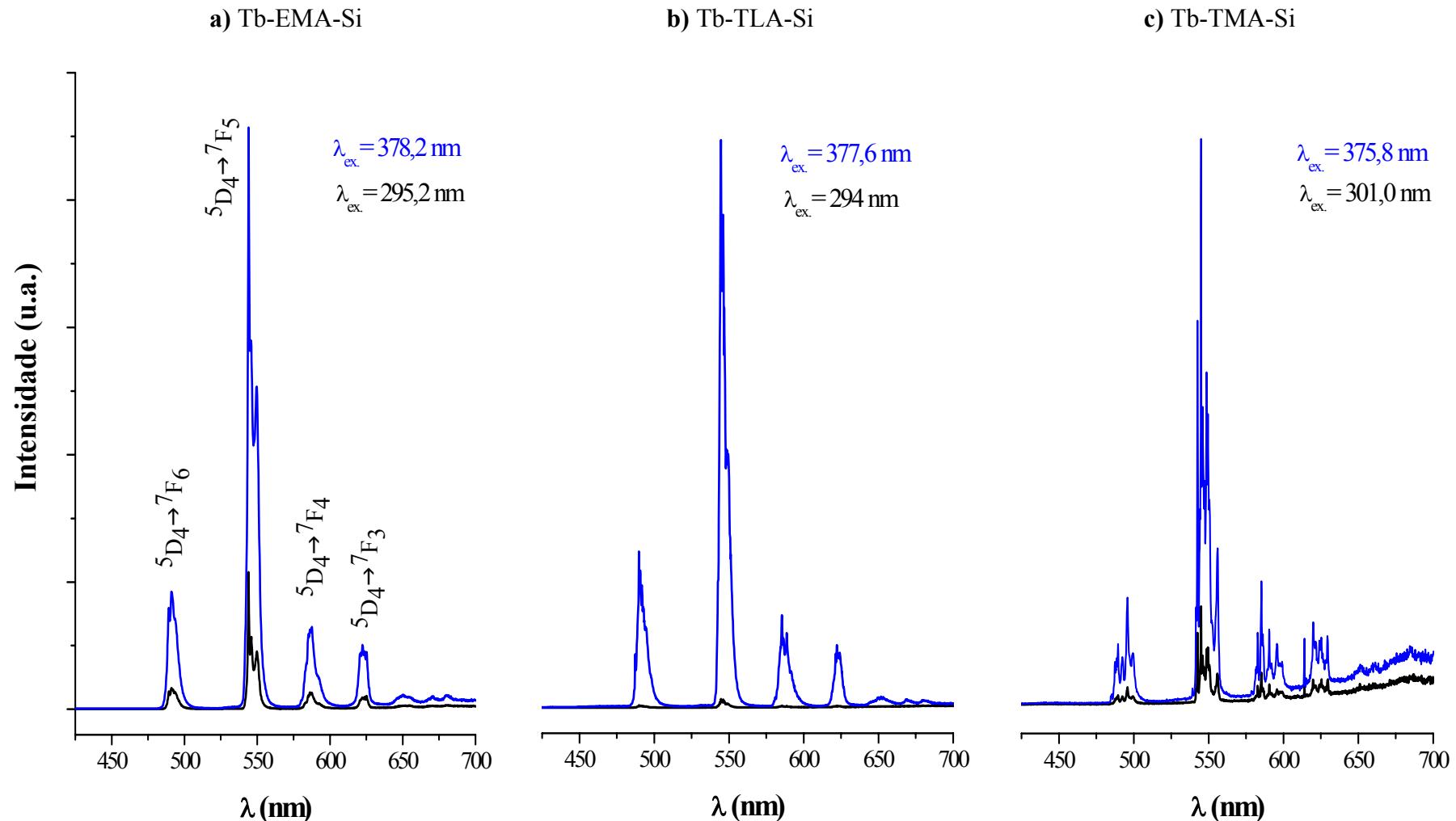
**Figura 5.22.** Espectro de emissão do complexo a) Tb-TLA e b) do material Tb-TLA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição  ${}^7F_6 \rightarrow {}^5G_6$ .

A grande diferença de energia entre os estados excitado  ${}^5D_4$  e fundamental  ${}^7F_{6-0}$  do íon terbio trivalente é em torno de  $15000\text{ cm}^{-1}$ . Geralmente, a *via* de sensibilização dos complexos de  $\text{Tb}^{3+}$  é semelhante aquele dos complexos contendo o íon  $\text{Eu}^{3+}$ . Portanto, os estados tripleto dos ligantes benzenotricarboxilatos encontram-se localizados acima ou em ressonância com o nível  ${}^5D_4$  do íon  $\text{Tb}^{3+}$  [1]. Considerando que as energias dos estados tripleto para os ligantes benzenotricarboxilatos EMA, TLA e TMA são  $25696$ ,  $25523$  e  $25100\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 5.23.** Espectro de emissão do complexo a) Tb-TMA e b) do material Tb-TMA-Si, registrados a 77 K, com emissão monitorada na transição  $^7F_6 \rightarrow ^5G_6$ .

As bandas largas de emissão referentes aos estados tripleno (T) dos ligantes não são observadas no intervalo de 425 a 600 nm nos espectros de emissão dos complexos Tb-BTC e dos materiais Tb-BTC-Si (Figura 5.24), resultando em uma elevada intensidade de emissão quando comparados com excitação direta no íon  $Tb^{3+}$ . Estes dados indicam que ocorreu uma eficiente transferência de energia intramolecular do ligante BTC para o íon  $Tb^{3+}$ , via estado  $T \rightarrow ^5D_4$ . A alta luminescência observada nos materiais Tb-BTC-Si é devido à diferença de energia entre o estado tripleno  $T_1$  do ligante e o nível emissor  $^5D_4$  do íon  $Tb^{3+}$ , fato que impede a retrotransferência de energia  $Tb^{3+}$ -ligante [38].

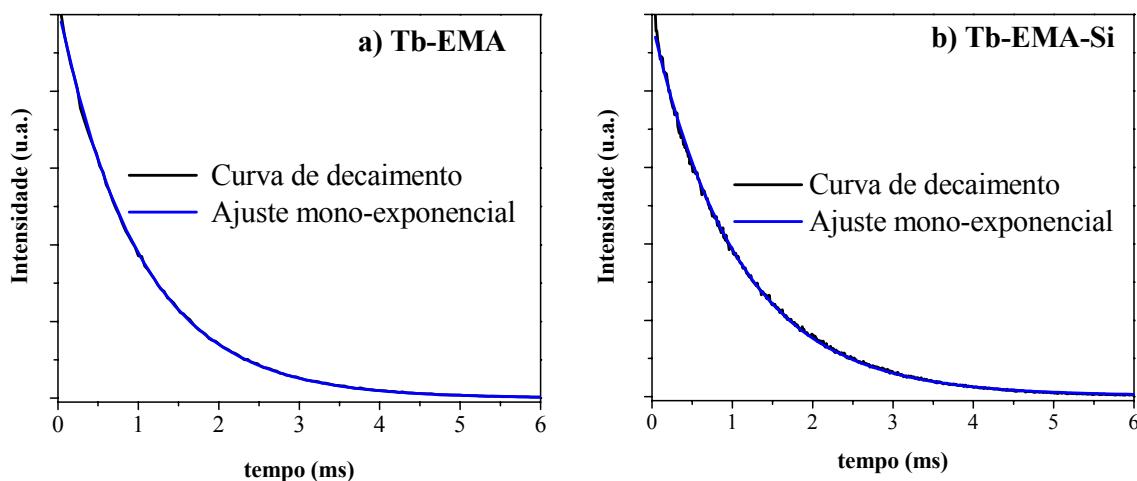


**Figura 5.24.** Espectros de emissão dos sistemas a) Tb-EMA-Si, b) Tb-TLA-Si e c) Tb-TMA-Si, com excitação monitorada no íon  $Tb^{3+}$  e na banda do ligante BTC, registrados a 77 K.

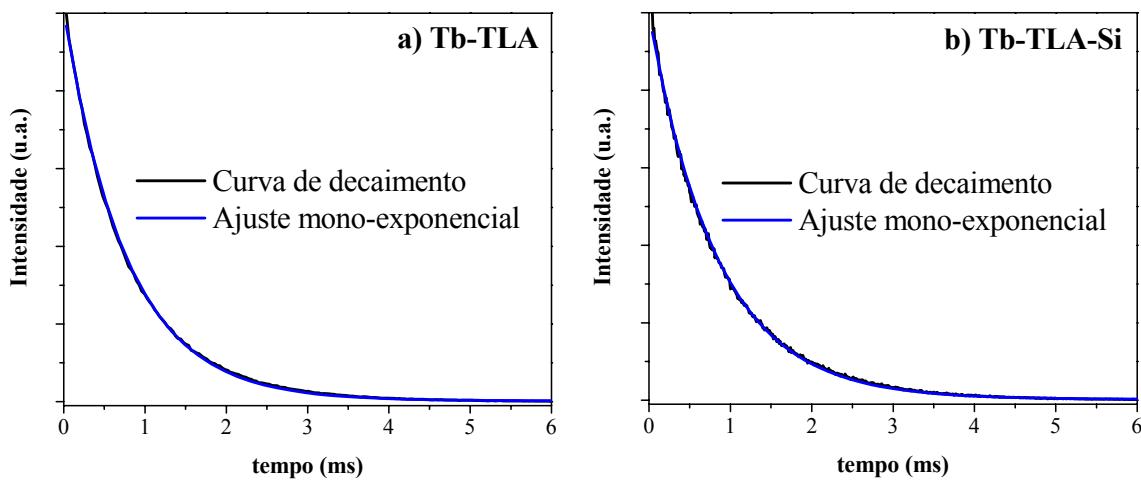
### 5.2.1. Tempo de vida de luminescência do nível emissor $^5D_4$ ( $Tb^{3+}$ )

Os tempos de vida calculados a partir do registro da curva de decaimento da luminescência (Figura 5.25 a 5.27) do nível emissor  $^5D_4$  do íon  $Tb^{3+}$  para os complexos Tb-BTC e para os sistemas Tb-BTC-Si, onde BTC = EMA, TLA e TMA, são apresentados na Tabela 5.3. As curvas de decaimento da luminescência foram ajustadas para um comportamento monoexponencial para todos os complexos Tb-BTC e os materiais Tb-BTC-Si, exceto para o material Tb-TMA-Si que apresentou um comportamento bi-exponencial, fornecendo os valores de tempo de vida. Vale lembrar que tempo de vida médio  $\tau_{\text{médio}}$  do nível do íon  $Tb^{3+}$  para o composto Tb-TMA-Si foi determinado pela fórmula  $\tau_{\text{médio}} = (a_1\tau_1)+(a_2\tau_2)/(a_1\tau_1+a_2\tau_2)$  [27] apresentando valor de  $\tau_1 = 1,12$  e  $\tau_2 = 1,06$  ms.

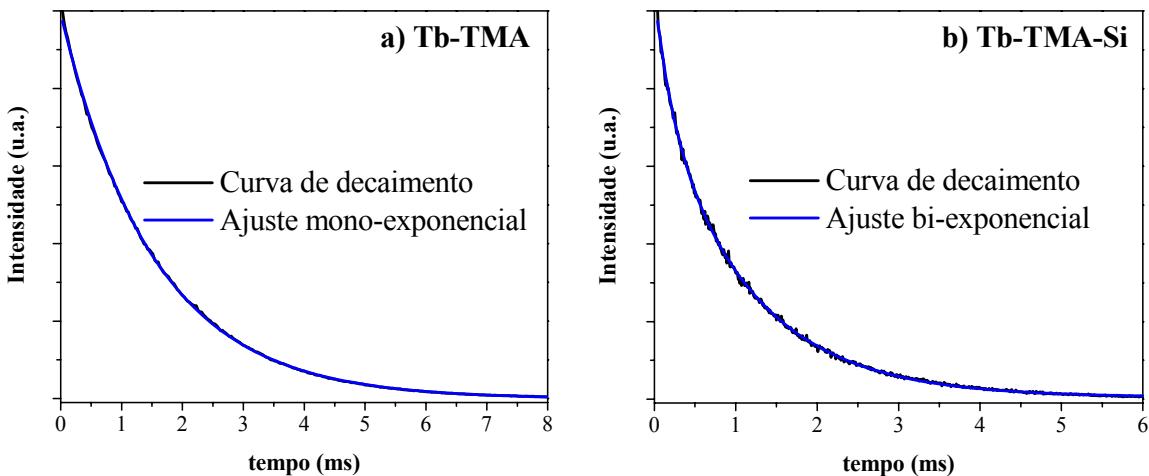
A pequena diferença nos valores de  $\tau$  do nível emissor  $^5D_4$  do íon  $Tb^{3+}$  nos sistemas com sílica em comparação com os complexos precursores, indica que a incorporação de complexos de térbio em rede de sílica amino-funcionalizada pouco alterou o processo de decaimento da luminescência.



**Figura 5.25.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  $^5D_4$  do íon  $Tb^{3+}$  para a) complexo Tb-EMA e b) do material Tb-EMA-Si, registrados a 298 K.



**Figura 5.26.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  $^5D_4$  do íon  $Tb^{3+}$  para a) complexo Tb-TLA e b) do material Tb-TLA-Si, registrados a 298 K.



**Figura 5.27.** Curvas de decaimento da luminescência do nível emissor  $^5D_4$  do íon  $Tb^{3+}$  para a) complexo Tb-TMA e b) do material Tb-TMA-Si, registrados a 298 K.

**Tabela 5.3.** Tempos de vida  $\tau$  (ms) dos complexos Tb-BTC e das partículas Tb-BTC-Si calculadas a partir das curvas de decaimento registradas a 298 K. A excitação foi monitorada na transição  $^7F_6 \rightarrow ^5G_6$  e emissão na transição  $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ .

Amostra	$\tau$ (ms)
Tb-EMA	1,00
Tb-EMA-Si	1,07
Tb-TLA	0,77
Tb-TLA-Si	0,84
Tb-TMA	1,52
Tb-TMA-Si	1,06*

\* $\tau_{\text{médio}}$

No estudo das propriedades fotoluminescentes dos materiais Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e TR-BTC-Si (TR = Eu<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup>) preparados pelo método Stöber e por micro-ondas, os espectros de excitação e de emissão apresentaram as transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0-4}$  e  $^5D_4 \rightarrow ^7F_{6-0}$  características dos íons Eu<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup>, respectivamente. Os dados de eficiências quânticas de emissão experimental ( $\eta$ ), tempos de vida dos estados emissores ( $\tau$ ), estrutura dos níveis de energia e parâmetros de intensidade ( $\Omega_\lambda$ ) evidenciaram que íon Eu<sup>3+</sup> atuou como sonda espectroscópica, indicando alterações em seu ambiente químico após a incorporação de sílica amino-funcionalizada. Além do mais, a ausência das bandas de emissão largas do estado tripleno do ligante indica que ocorreu eficiente transferência de energia intramolecular ligante-terra rara nos materiais amino-funcionalizados. Portanto, os materiais preparados atuam como dispositivos moleculares conversores de luz (DMCL), tornando-os fortes candidatos a atuarem como marcadores luminescentes em ensaios biológicos.

## Referências

- [1] BRITO, H.F.; MALTA, O.L; FELINTO, M.C.F.C.; TEOTONIO, E.E.S. Luminescence phenomena involving metal enolates. In: ZABICKY, J., ed. *The chemistry of metal enolates*. England: John Wiley & Sons Ltd., 2009. cap.5, p.131-184.
- [2] SABBATINI, N.; GUARDIGLI, M.; LEHN, J.-M. Luminescent lanthanide complexes as photochemical supramolecular devices. *Coordination Chemistry Reviews*, v.123, n.1/2, p.201-228, 1993.
- [3] BÜNZLI, J.-C.; PIGUET, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews*, v.34, p.1048–1077, 2005.
- [4] KIDO, J.; OKAMOTO, Y. Organo lanthanide metal complexes for electroluminescent materials. *Chemical Reviews*, v.102, n.6, p.2357–2368, 2002.
- [5] COTTON, F.A.; HUANG, P. Further observations on the non-rigorous relationship between triboluminescence and crystal centricity. *Inorganica Chimica Acta*, v. p.223-226, 2003.
- [6] FERNÁNDEZ-MOREIRA, V.; SONG, B.; SIVAGNANAM, V.; CHAUVIN, A.-S.; VANDEVYVER, C.D.B.; GIJS, M.; HEMMILÄ, I.; LEHR, H.-A.; BÜNZLI, J.-C.G. Bioconjugated lanthanide luminescent helicates as multilabels for lab-on-a-chip detection of cancer biomarkers. *Analyst*, v.135, p.42–52, 2010.
- [7] BÜNZLI, J.-C.G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chemical Reviews*, v.110, p.2729–2755, 2010.
- [8] ELISEEVA, S.; BÜNZLI, J.-C. Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chemical Society Reviews*, v.39, p.189 – 227, 2010.
- [9] TEOTONIO, E.E.S.;BRITO, H.F.; FELINTO, M.C.F.C.; THOMPSON, L.C.; YOUNG, V.G.; MALTA, O.L. Preparation, crystal structure and optical spectroscopy of the rare earth complexes ( $\text{RE}^{3+}$  =Sm, Eu, Gd and Tb) with 2-thiopheneacetate anion. *Journal of Molecular Structure*, v.751, p.93–102, 2005.
- [10] REISFELD, R.; PIETRASZKIEWICZ, M.; SARAIDAROV, T.; LEVCHENKO, V. Luminescence intensification of lanthanide complexes by silver nanoparticles incorporated in sol-gel matrix. *Journal of Rare Earths*, v.27, n.4, p.544-549, 2009.

- [11] LIMA, P.P.; FERREIRA, R.A.S.; JÚNIOR, S.A.; MALTA, O.L.; CARLOS, L.D. Terbium(III)-containing organic-inorganic hybrids synthesized through hydrochloric acid catalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v.201, p.214-221, 2009.
- [12] BINNEMANS, K. Lanthanide-based luminescent hybrid materials. *Chemical Reviews*, n.109, p.4283–4374, 2009.
- [13] CARLOS, L.D.; FERRREIRA, R.A.S.; BERMUDEZ, V.Z.; RIBEIRO, S.J.L. Lanthanide-containing light-emitting organic–inorganic hybrids: a bet on the future. *Advanced Materials*, v.21, p.509–534, 2009.
- [14] ENRICH, F.; RICCÒ, SCOPECE, P.; PARMA, A.; MAZAHERI, A.R.; RIELLO, P.; BENEDETTI, A. Comparison of Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and Eu(acac)<sub>3</sub> precursors for doping luminescent silica nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, v.12, n.5, p.1925-1931, 2010.
- [15] NASSAR, E.J.N.; CIUFFI, K.J.; RIBEIRO, S.J.L.; MESSADDEQ, Y. Europium incorporated in silica matrix obtained by sol-gel: luminescent materials. *Materials Research*, v.6, n.4, p.557-562, 2003.
- [16] TALLURY, P.; PAYTON, K.; SANTRA, S. Silica-based multimodal/multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing applications. *Nanomedicine*, v.3, n.4, p.579-592, 2008.
- [17] CARNALL, W.T.; GOODMAN, G.L.; RAJNAK, K.; RANA, R.S. A systematic analysis of the spectra of the lanthanides doped into single crystal LaF<sub>3</sub>. *Journal of Chemical Physics*, v.90, p.3443–3457, 1989.
- [18] KODAIRA, C.A.; BRITO, H.F.; MALTA, O.L.; SERRA, O.A. Luminescence and energy transfer of the europium (III) tungstate obtained via the Pechini method. *Journal of Lumininescence*, v.101, p.11–21, 2003.
- [19] LUO, Y.; HAN, Y.; LIN, J. Synthesis and luminescent properties of europium (III) Schiff base complexes covalently bonded to silica xerogels. *Journal of Luminescence*, v.122/123, p.83–86, 2007.
- [20] LIMA, P.P.; FERREIRA, R.A.S.; FREIRE, R.O.; PAZ, F.A.A.; FU, L.; Alves Jr., S.; CARLOS, L.D.; MALTA, O.L. Spectroscopic study of a UV-photostable organic-

- inorganic hybrids incorporating an Eu<sup>3+</sup> β-diketonate complex. *A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, v.7, n.3, p.735-746, 2006.
- [21] GUEDES, M.A. *Comportamento fotoluminescente dos ânions complexos tetrakis(β-dicetonatos) de íons de terras raras – Eu<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup> e Tm<sup>3+</sup>*. São Paulo, 2007. 148p. Tese de Doutorado. Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- [22] KAI, J. *Desenvolvimento de sistemas luminescentes à base dos polímeros PHB e PMMA dopados com complexos de terras raras*. São Paulo, 2009. 192p. Tese de Doutorado. Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- [23] MALTA, O.L.; CARLOS, L.D. Intensities of 4f-4f transitions in glass materials. *Química Nova*, v.26, n.6, p.889-895, 2003.
- [24] CARLOS, L.D.; MESSADDEQ, Y.; BRITO, H.F.; FERREIRA, R.A.S.; BERMUDEZ, V.Z.; RIBEIRO, S.J.L. Full-color phosphors from europium(III)-based organosilicates. *Advanced Materials*, v.12, n.8, p.594-598, 2000.
- [25] SOUZA, E.R.; Silva, I.G.N.; TEOTONIO, E.E.S.; FELINTO, M.C.F.C.; BRITO, H.F. Optical properties of red, green and blue emitting rare earth benzenetricarboxylate compounds. *Journal of Luminescence*, v.130, n.2, p.283-291, 2010.
- [26] DE SÁ, G.F.; MALTA, O.L.; DONEGÁ, C.M.; SIMAS, A.M.; LONGO, R.L.; SANTA-CRUZ, P.A.; SILVA JR, E.F. Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, v.196, p.165-195, 2000.
- [27] MURAKAMI, S.; HERREN, M.; RAU, D.; MORITA, M. Photoluminescence and decay profiles of undoped and Fe<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>-doped PLZT ceramics at low temperatures down to 10K. *Inorganica Chimica Acta*, v.300/302, p.1014–1021, 2000.
- [28] DIVYA, V.; BIJU, S.; VARMA, R.L.; REDDY, M.L.P. Highly efficient visible light sensitized red emission from europium tris[1-(4-biphenoyl)-3-(2-fluoroyl)propanedione](1,10-phenanthroline) complex grafted on silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, v.20, p.5220–5227, 2010.
- [29] GUO, X.; FU, L.; ZHANG, H.; CARLOS, L.D.; PENG, C.; GUO, J.; YU, J.; DENGA, R.; SUN, L. Incorporation of luminescent lanthanide complex inside the channels of organically modified mesoporous silica via template-ion exchange method. *New Journal of Chemistry*, v.29, p.1351-1358, 2005.

- [30] OFELT, G.S. Intensities of crystal spectra of rare-earth ions. *The Journal of Chemical Physics*, v.37, n.3, p.511-520, 1962.
- [31] JUDD, B.R. Optical absorption intensities of rare-earth ions. *Physical Review*, v.127, n.3, p.750-761, 1962.
- [32] MALTA, O.L.; BRITO, H.F.; MENEZES, J.F.S.; SILVA, F.R.G.; ALVES, S.; FARIAS, F.S.; DE ANDRADE, A.V.M. Spectroscopic properties of a new light-converting device Eu(thenoyl trifluoroacetone)<sub>3</sub>·2(dibenzyl sulfoxide). A theoretical analysis based on structural data obtained from a sparkle model. *Journal of Luminescence*, v.75, p.255-268, 1997.
- [33] FAUSTINO, W.M.; JUNIOR, S.A.; THOMPSON, L.C.; de SÁ, G.F.; MALTA, O.L.; SIMAS, A.M. Theoretical and experimental luminescence quantum yields of coordination compounds of trivalent europium. *International Journal of Quantum Chemistry*, v.103, p.572-579, 2005.
- [34] MALTA, O.L.; dos SANTOS, M.A.C.; THOMPSON, L.C.; ITO, N.K. Intensity parameters of 4f-4f transitions in the Eu(dipivaloylmethane)<sub>3</sub>1,10-phenanthroline complex. *Journal of Luminescence*, v.69, p.77-84, 1996.
- [35] CARNALL, W.T.; CROSSWHITE, H.; CROSSWHITE H.M. Energy Structure and Transition Probabilities of the Trivalent Lanthanides in LaF<sub>3</sub>. Argonne National Laboratory Report, unnumbered, 1977.
- [36] SOUZA, A.P.; RODRIGUES, L.C.V.; BRITO, H.B.; JUNIOR, S.A.; MALTA, O.L. Photoluminescence study of new lanthanide complexes with benzeneseleninic acids. *Journal of Luminescence*, v.130, p.181-189, 2010.
- [37] TEOTONIO, E.E.S.; FETT, G.M.; BRITO, H.F.; TRINDADE, A.C.; FELINTO, M.C.F.C. Novel unexpected Tb<sup>3+</sup> coordination polymer containing two carboxilato ligands: synthesis, structure and photoluminescent properties. *Inorganic Chemistry Communications*, v.10, p.867-872, 2007.
- [38] LATVA, M.; TAKALO, H.; MUKKALA, V.-M.; MATACHESCUC, C; RODRIGUEZ-UBISD, J.C.; KANKARE, J. Correlation between the lowest triplet state energy level of the ligand and lanthanide(III) luminescence quantum yield. *Journal of Luminescence*, v.75, p.149-179, 1997.

# Capítulo 6

Bioensaios com marcadores luminescentes à  
base de terras raras

---

## 6. Bioensaios com marcadores luminescentes à base de terras raras

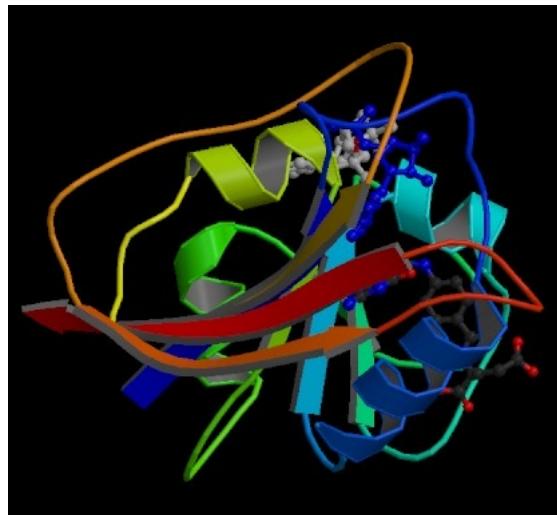
Nesta parte do trabalho, os complexos de terras raras incorporados com a rede de sílica amino-funcionalizada foram aplicados como potenciais candidatos a marcadores luminescentes em sistema biológico. Primeiro, os marcadores foram testados em reações com a proteína BSA (albumina de soro bovino - *bovine serum albumin*) para comprovar a interação com biomolécula. Posteriormente, no ensaio biológico foi utilizado a enzima HRP (peroxidase de raiz forte - *horseradish peroxidase*) conjugada com o antígeno oxLDL (lipoproteína de baixa densidade oxidada - *oxidized low-density lipoproteins*) em uma reação com a partícula ligada ao anticorpo anti-oxLDL para obter informações sobre a reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac). Por fim, a partir destes resultados foi possível desenvolver um protocolo utilizando marcadores luminescentes à base de terras raras para a detecção e quantificação do antígeno oxLDL, responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

### 6.1. Detecção colorimétrica de proteínas e enzimas

#### 6.1.1. Detecção de BSA conjugada com a partícula luminescente Eu-ACAC-Si utilizando o kit “comercial” de dosagem de proteínas BCA

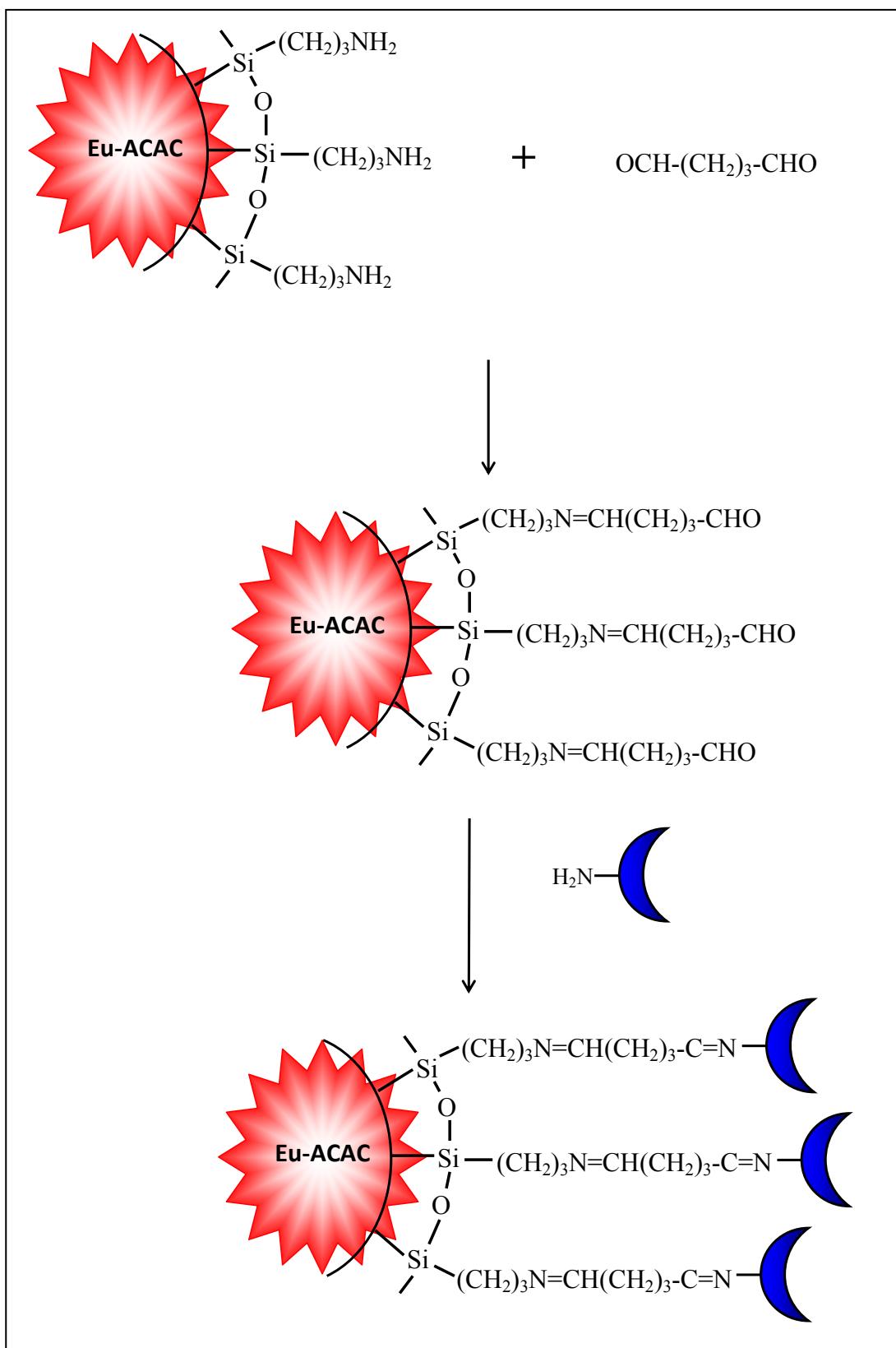
A proteína albumina de soro bovino ([Figura 6.1](#)) é amplamente empregada na área de bioquímica, devido à relativa facilidade com que pode ser isolada e purificada em grande escala além de ser estruturalmente homóloga ao HSA (albumina de soro humano – *human serum albumin*) [1,2]. A BSA é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo bovino e atua como depósito, assim como veículo para transporte intracelular. É a principal proteína que contribui para a pressão coloidal osmótica do sangue e também para o transporte de proteínas

para numerosos compostos endógenos e exógenos [3,4]. Com massa molecular de 66 kDa, consiste em uma única cadeia polipeptídica, contendo cerca de 580 aminoácidos [5].



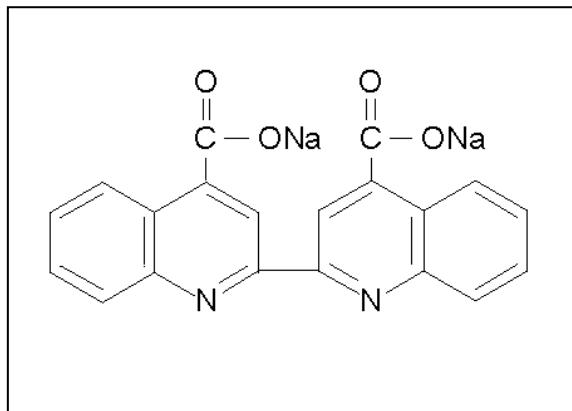
**Figura 6.1.** Estrutura da proteína BSA – albumina de soro bovino.

A capacidade da partícula Eu-ACAC-Si de interagir com a espécie biológica (proteína BSA) foi avaliada e identificada pelo “kit comercial” de dosagem de proteínas BCA [6]. A reação de imobilização da partícula amino-funcionalizada (Figura 6.2), contendo o espaçador glutaraldeído com a proteína BSA (Eu-ACAC-Si-Glut-BSA), foi realizada em meio de PBS (tampão fosfato salino - *phosphate buffered saline* – 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4). Para a identificação da presença de BSA no sistema foi analisado o sobrenadante do meio reacional da conjugação e as quatro águas de lavagem da partícula, assim como a dispersão em PBS da partícula. O ensaio biológico foi realizado em triplicata, sendo que uma das amostras foi submetida à clivagem ácida para investigar a força da interação partícula-proteína.



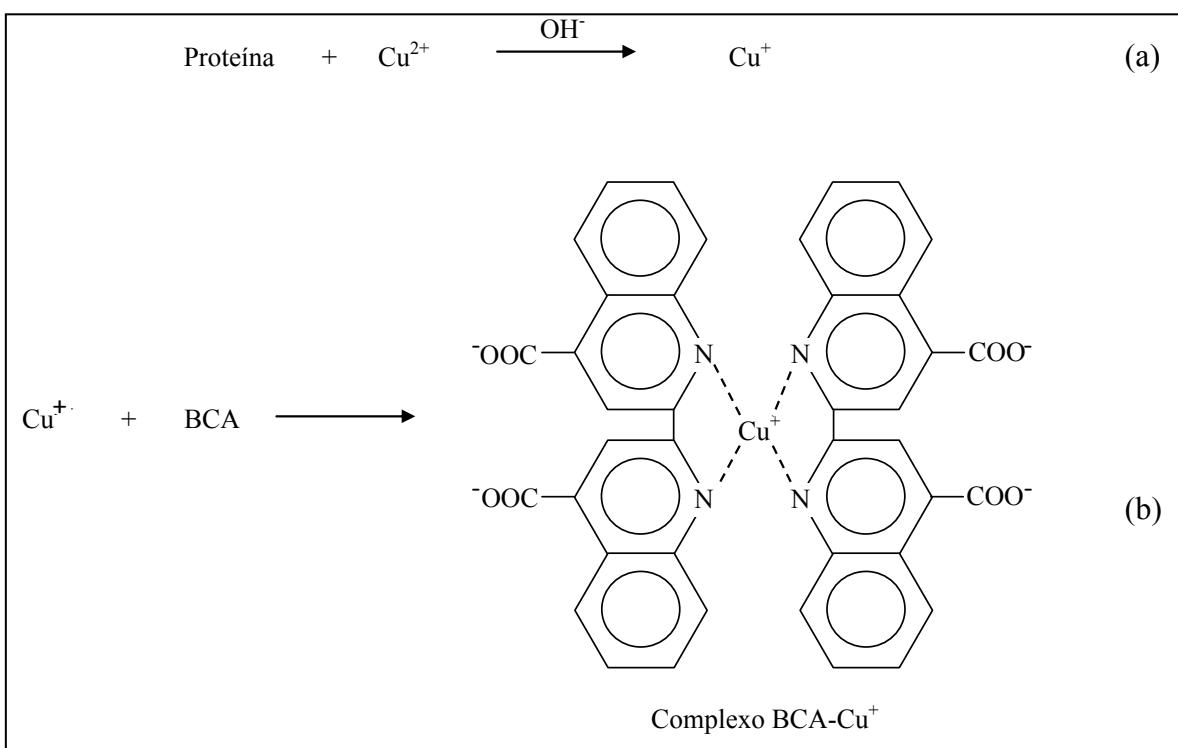
**Figura 6.2.** Esquema representativo da immobilização da proteína BSA na partícula Eu-ACAC-Si utilizando glutaraldeído como espaçador.

A proteína BSA presente na partícula, sobrenadante e águas de lavagem foi identificada por meio do *kit* “comercial” de dosagem de proteínas BCA. O *kit* BCA é composto por dois reagentes A e B, onde o reagente A é constituído por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$  (ácido bicinconílico - BCA),  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  (tartarato de sódio) e  $\text{NaOH}$ . Enquanto que, o reagente B constitui de uma solução de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (4%). O ácido bicinconílico BCA (4,4'-dicarboxi-2-2'-biquinolina) (Figura 6.3) é um dicarboxílico derivado da quinolina. Comercialmente é encontrado na forma dos sais de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ . Além do mais, o BCA é solúvel em água em pH acima de 7 e reage com alta especificidade com cobre monovalente em solução alcalina.



**Figura 6.3.** Fórmula estrutural do ácido bicinconílico – BCA.

Este método de identificação de proteínas consiste na redução do íon cobre  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$  pela proteína em meio alcalino, seguido pela formação de um complexo solúvel, resultante da interação do íon  $\text{Cu}^+$  com duas moléculas do reagente BCA, como ilustrada na Figura 6.4. A identificação da proteína BSA nas amostras foi efetuada a partir da reação com a solução do reagente BCA que passa de uma coloração inicial esverdeada para uma coloração púrpura, devido a formação do complexo BCA- $\text{Cu}^+$ , com uma forte absorbância em 540 nm [6-9].

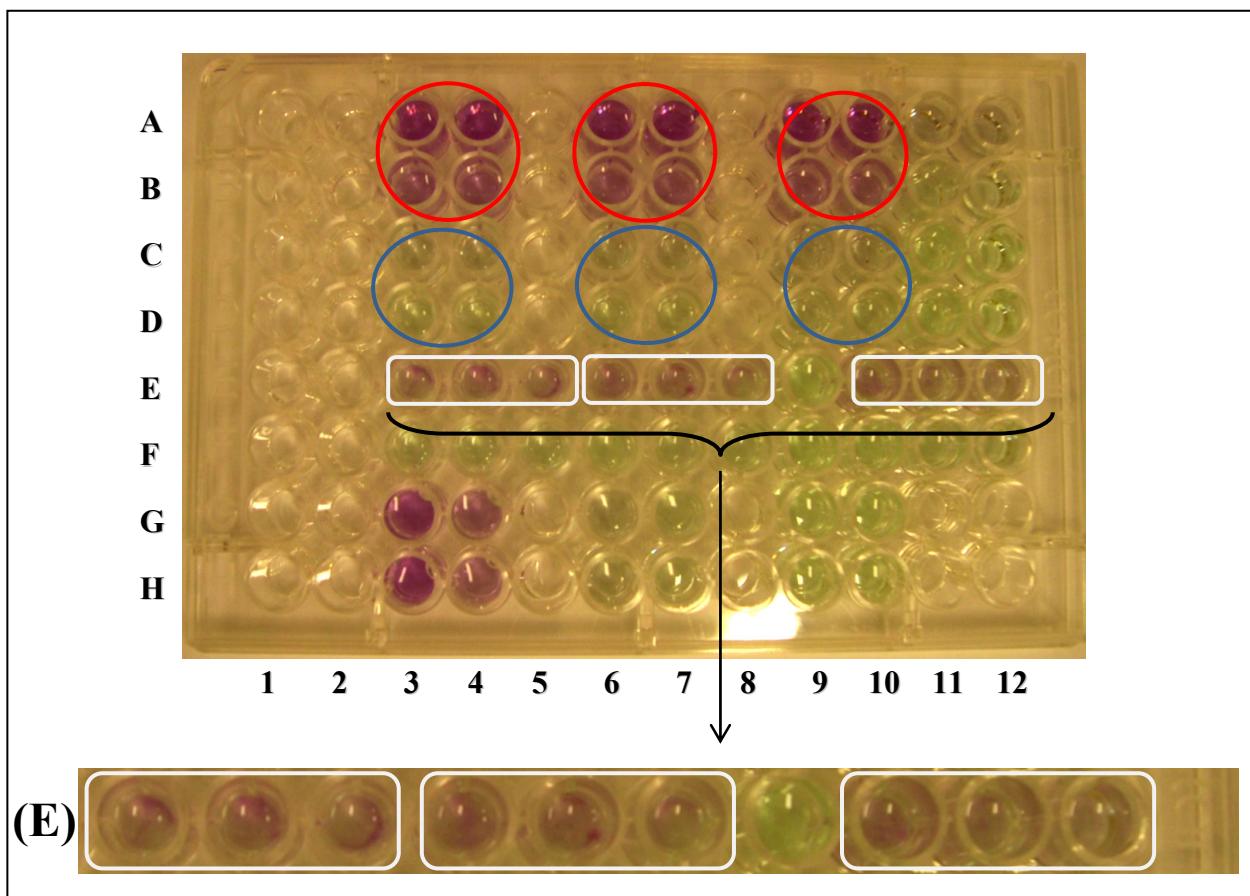


**Figura 6.4.** Esquema da reação para a identificação de proteínas, com a formação do complexo BCA-Cu<sup>+</sup>, de coloração roxa [6].

O ensaio realizado na placa de poliestireno de 96 poços permitiu a identificação da presença da proteína BSA no sobrenadante, através da formação de cor púrpura. Além do mais, a dispersão de partícula Eu-ACAC-Si-Glut-BSA em PBS também exibiu cor púrpura. No entanto, esta cor apresentou-se localizada nas partículas, indicando que a proteína está conjugada na partícula e não livre em solução (Figura 6.5). A Tabela 6.1 apresenta os dados obtidos no ensaio de identificação da presença de proteína BSA por meio do *kit* de dosagem BCA, na placa de poliestireno de 96 poços (Figura 6.5). Ressalta-se que as amostras simbolizadas como 1, 2 e 3 na Tabela 6.1 referem-se as amostras do ensaio realizado em triplicata, já a amostra 4 representa a amostra 3 após a clivagem ácida.

Os resultados obtidos neste ensaio confirmaram que a partícula Eu-ACAC-Si é capaz de conjugar com a proteína, devido à presença do grupamento amino disponível na superfície da partícula de sílica. Já a presença de proteína identificada pela cor púrpura no sobrenadante sugere BSA em excesso na reação de conjugação com a partícula Eu-ACAC-Si.

Este ensaio também foi realizado para a partícula Eu-ACAC-Si-Glut-BSA após tratamento em meio ácido ( $\text{HCl} - 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Este resultado evidenciou que as partículas realizam uma forte interação com a proteína, que foi confirmado por meio da análise do sobrenadante e dispersão das partículas. Considerando que a solução do sobrenadante não reagiu com a solução de trabalho BCA e a dispersão das partículas apresentou cor púrpura, devido à presença de proteína.



**Figura 6.5.** Fotografia da placa de poliestireno de 96 poços do ensaio para identificação da proteína BSA. Os sobrenadantes são identificados pelos círculos vermelhos, as 1<sup>a</sup> águas de lavagem são identificadas pelos círculos azuis e as dispersões de partículas são identificadas pelos retângulos brancos. A foto ampliada refere-se apenas a fileira (E), onde estão as dispersões das partículas.

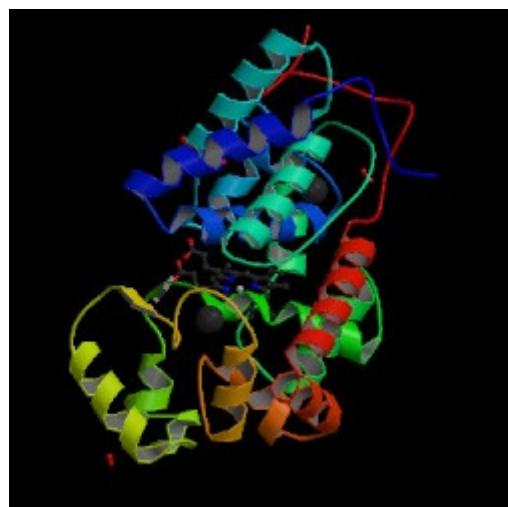
A investigação da presença de európio trivalente foi confirmada pela contagem de fôtons das dispersões das partículas Eu-ACAC-Si-Glut-BSA antes e após a clivagem ácida, por meio da técnica de luminescência. Por outro lado, a confirmação de íons Eu<sup>3+</sup> nos sobrenadantes, detectada no contador Victor<sup>2</sup>D, está associada também à presença de partículas dispersas. Deve-se ressaltar que as águas de lavagem não apresentaram leitura para o íon európio trivalente.

**Tabela 6.1.** Ensaio de identificação da presença de proteína BSA por meio do *kit* de dosagem BCA, na placa de poliestireno de 96 poços. A presença de BSA foi confirmada pelo desenvolvimento da cor roxa nas amostras contidas nos poços.

Amostra	Descrição	Presença de BSA	Poços
1	Sobrenadante	Sim	A3-4, B3-4
	1 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	C3-4, D3-4
	4 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	F3-5
	Dispersão da partícula	Sim	E3-5
2	Sobrenadante	Sim	A6-7, B6-7
	1 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	C6-7, D6-7
	4 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	F6-8
	Dispersão da partícula	Sim	E6-8
3	Sobrenadante	Sim	A9-10, B9-10
	1 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	C9-10, D9-10
	4 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	E9, F9-10
	Dispersão da partícula	Sim	
4	Sobrenadante	Não	A11-12, B11-12
	1 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	C11-12, D11-12
	4 <sup>a</sup> água de lavagem	Não	F11-12
	Dispersão da partícula	Sim	E10-12

### 6.1.2. Detecção de HRP – *horseradish peroxidase* – conjugado com o antígeno oxLDL em reação com a partícula Eu-(β-dicetonato)-Si conjugada com o anticorpo anti-oxLDL, utilizando TMB

A planta raiz forte *Armoracia rusticana* cultivada em regiões temperadas possui grande valor culinário devido suas raízes, que também são uma fonte rica em peroxidase [10], grupo de enzimas que catalisam reações de oxidação de uma variedade de compostos [11]. As peroxidases são empregadas na área de catálise, síntese orgânica, biossensores, imunoensaios enzimáticos etc., devido às suas propriedades catalíticas com grande versatilidade de reconhecer diversos substratos e a termoestabilidade [12-16]. A HRP (peroxidase de raiz forte – *horseradish peroxidase*) (Figura 6.6) é uma glicoproteína globular obtida a partir da raiz forte que contém vários tipos de isoenzimas.



**Figura 6.6.** Estrutura da enzima peroxidase de raiz forte – HRP.

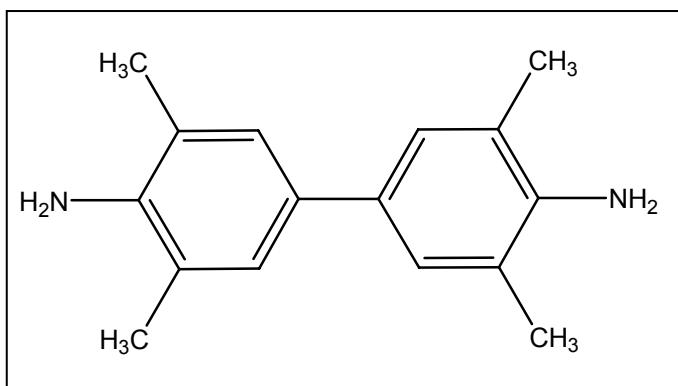
Algumas moléculas como lipídeos e esteróis essenciais para o metabolismo celular, devido às características hidrofóbicas ou hidrofílicas, são transportadas no sangue por nanopartículas conhecidas como lipoproteínas. A lipoproteína de baixa densidade [17], principal transportadora de lipídeos no plasma, compreende por partículas esféricas de

aproximadamente 20 nanômetros de diâmetro formadas por fosfolipídios, colesterol livre, ésteres de colesterol, triglicérides e apoliproteína B100 (apo100) [18]. O excesso de colesterol, associado com a presença da LDL oxidada no sangue, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e hipertensão [18,19].

#### **6.1.2.1. Quantificação da enzima na conjugação entre os sistemas Eu-ACAC-Si-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP**

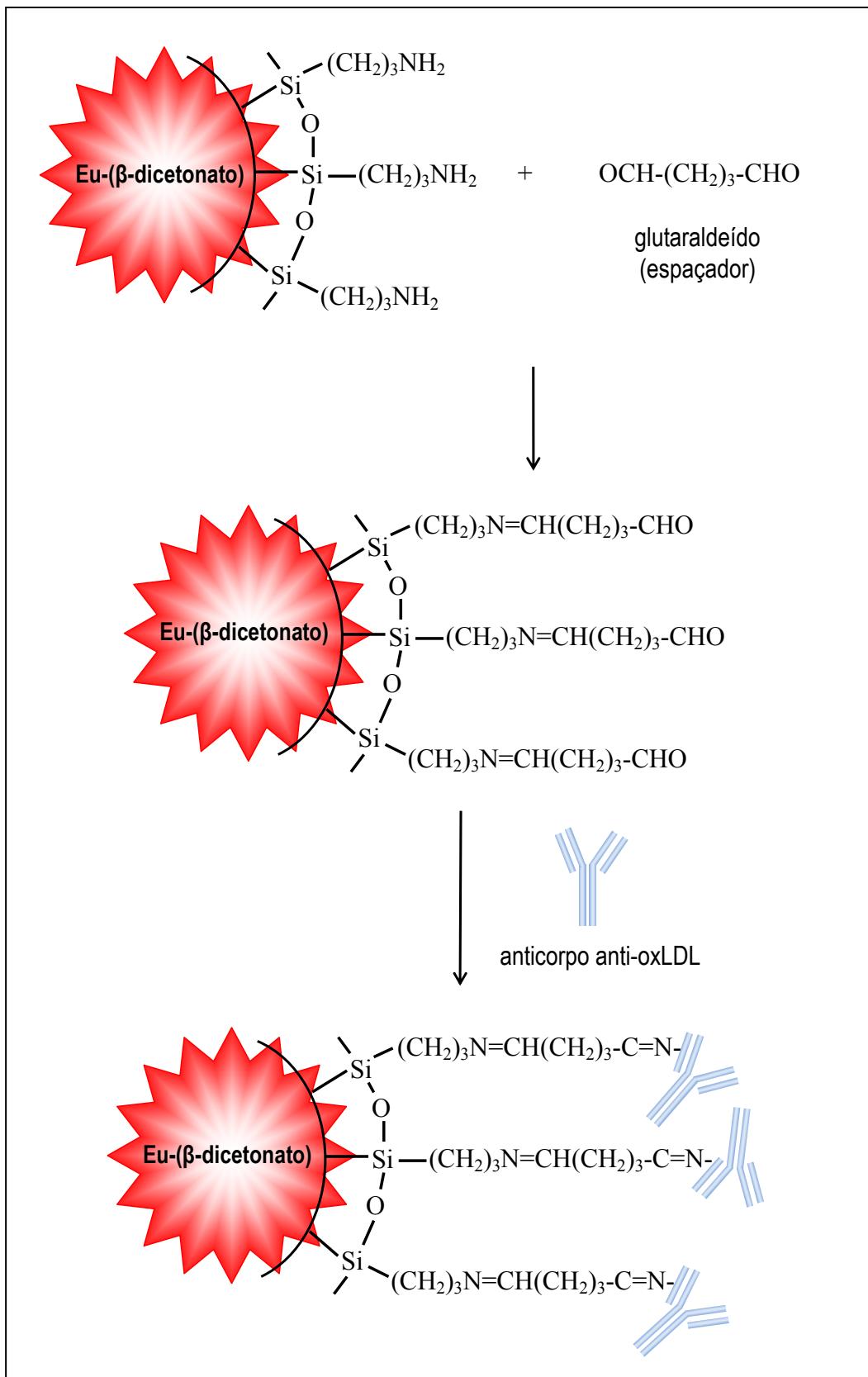
Com o objetivo de identificar a reação Ag-Ac na superfície da partícula Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si = Eu-ACAC-Si e Eu-TTA-Si, efetuou-se a conjugação Ag-Ac na presença da enzima HRP. O sistema utilizado foi a partícula Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si ligada ao anticorpo anti-oxLDL conjugada com o antígeno oxLDL ligado ao HRP. A concentração da enzima HRP foi determinada por meio do ensaio colorimétrico, utilizando uma reação enzima-substrato, que forneceram dados sobre a interação Ag-Ac-Glut-Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si.

Na reação enzima-substrato, com a presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a enzima HRP catalisa a oxidação do substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Figura 6.7) [20,21]. A oxidação do TMB pela enzima HRP resulta na formação de um produto com coloração azul. A formação de uma cor amarela é desenvolvida após a adição de solução ácida para parar a reação. Para a detecção do TMB oxidado foi determinada a absorbância das amostras em uma placa de poliestireno de 96 poços, no comprimento de onda centrado em 450 nm, logo após a adição do ácido.



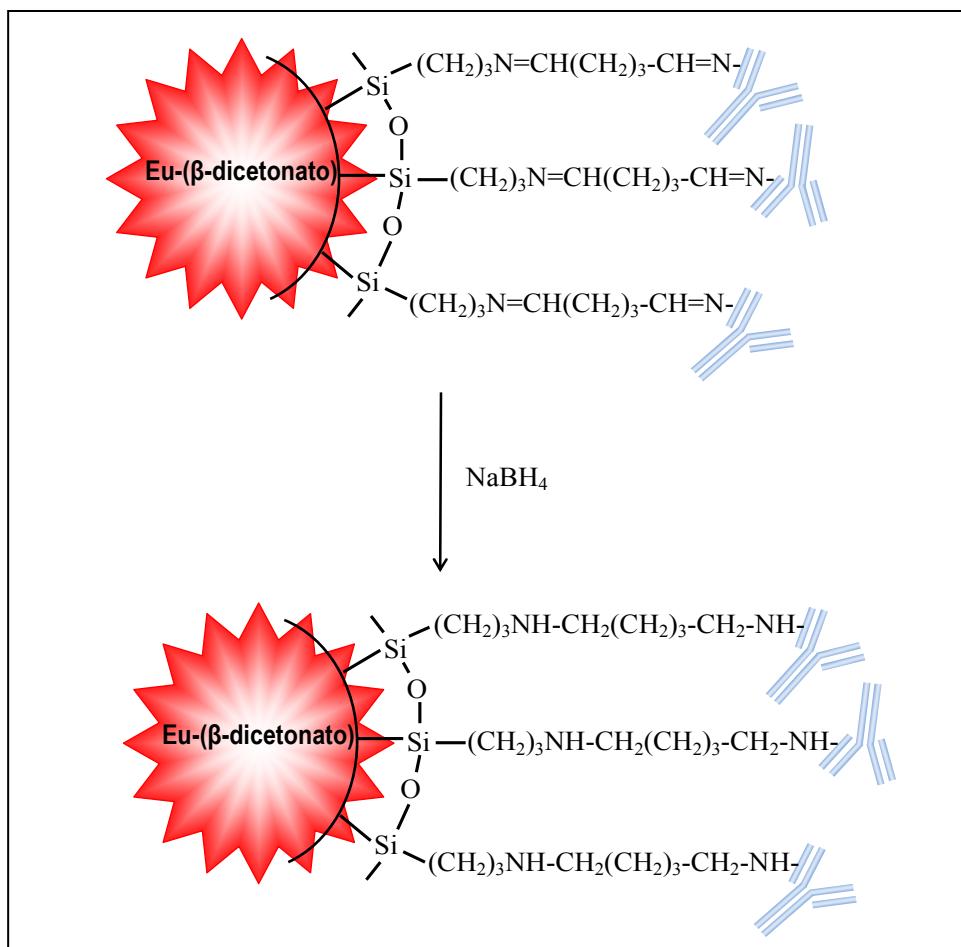
**Figura 6.7.** Estrutura molecular do TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina).

A partícula Eu-(β-dicetonato)-Si contendo o grupamento amina primária na superfície primeiro reage com o espaçador glutaraldeído ([Figura 4.37](#)). O glutaraldeído (Glut) é um dialdeído capaz de se ligar a grupamentos amina e assim formar derivados apropriados para efetuar ligação com biomoléculas. A reação entre o grupamento amina e o Glut forma uma base de Schiff, que é instável [\[22\]](#). Posteriormente, a partícula foi conjugada com o anticorpo anti-oxLDL ([Figura 6.8](#)). As bases de Schiff formadas, com a ligação do aldeído com o grupamento amina, tanto do espaçador Glu-partícula quanto o Glu-anticorpo foram reduzidas com a adição do borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), resultando em ligações simples C–N ([Figura 6.9](#)). Logo após, os grupos aldeídos remanescentes do espaçador Glut foram bloqueados com a adição de glicina. Por fim, o antígeno conjugado com a enzima HRP ([Figura 6.10](#)) foi adicionado ao sistema Eu-(β-dicetonato)-Si-Glut-anti-oxLDL ([Figura 6.11](#)). Vale informar que as bases de Schiff formadas no conjugado oxLDL-Glut-HRP foram reduzidas com a adição de NaBH<sub>4</sub> e os grupos aldeídos presentes bloqueados com a adição de glicina.

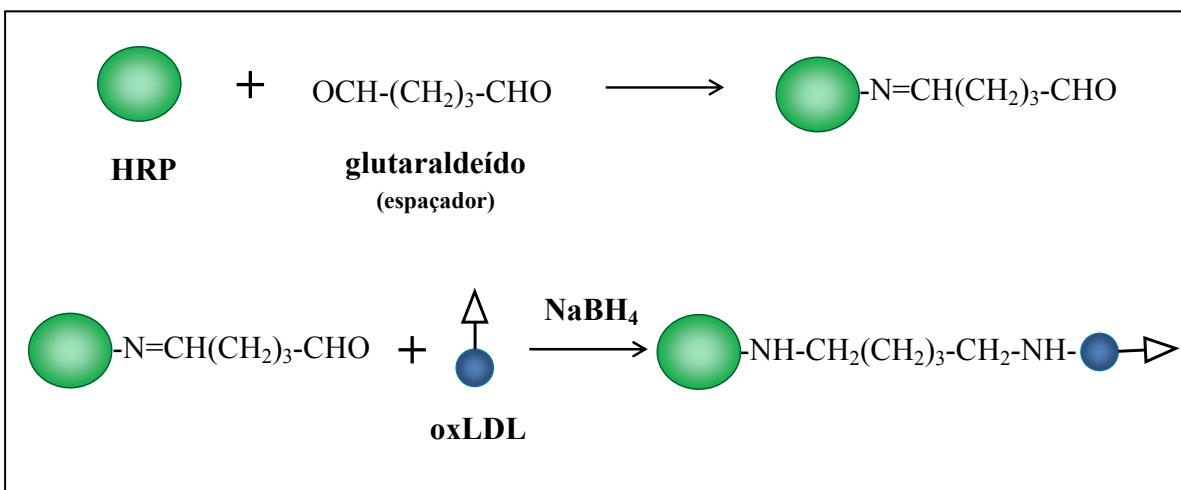


**Figura 6.8.** Esquema representativo da imobilização do anticorpo anti-oxLDL na partícula Eu-(β-dicetonato)-Si utilizando glutaraldeído como espaçador.

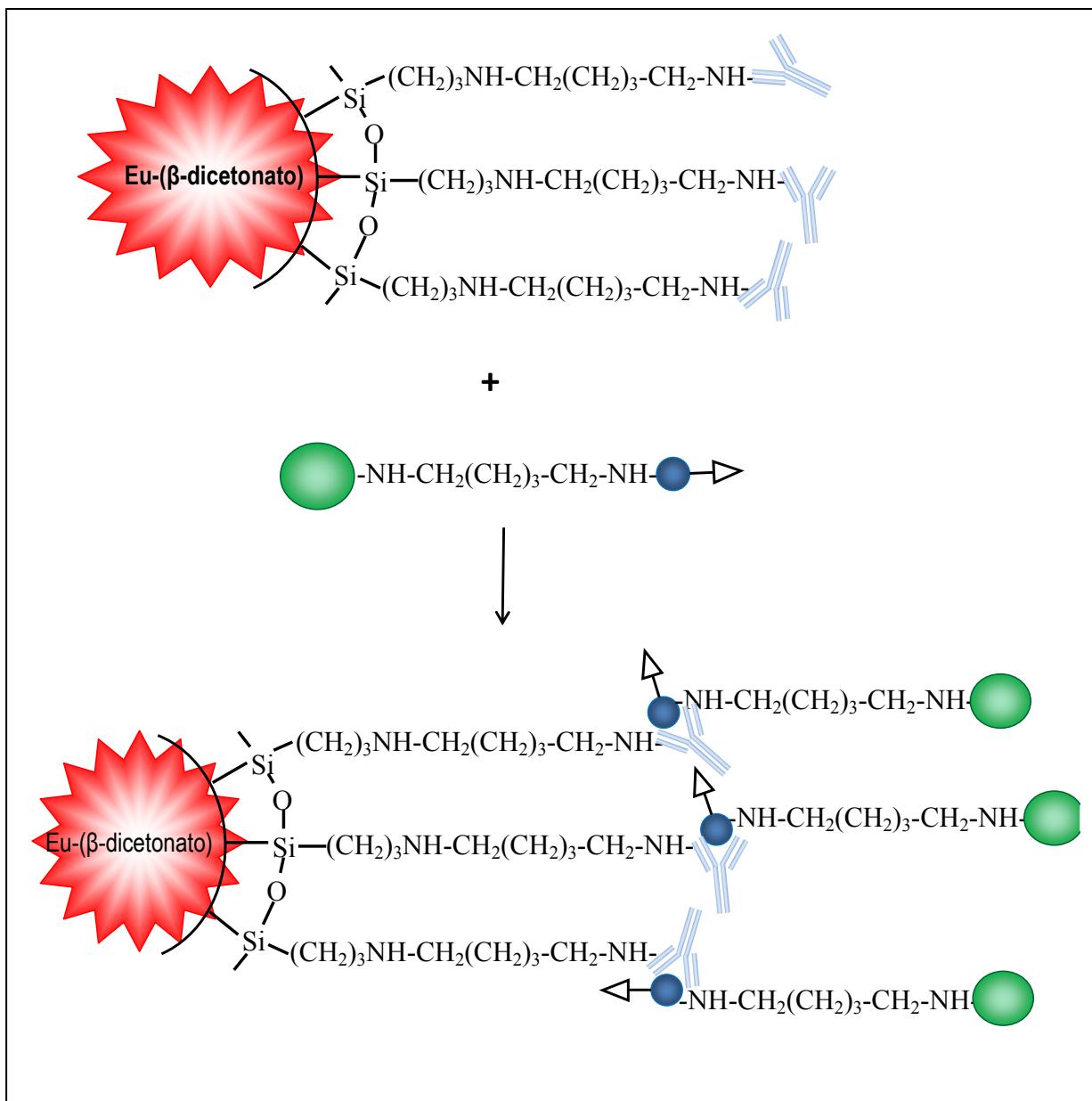
## Capítulo 6 – Bioensaios com marcadores luminescentes à base de terras raras



**Figura 6.9.** Esquema representativo da redução das bases de Schiff do conjugado partícula-Glut-anti-oxLDL.



**Figura 6.10.** Esquema representativo da imobilização da enzima HRP com o antígeno oxLDL, utilizando o espaçador glutaraldeído, e NaBH4 para estabilizar as bases de Schiff.

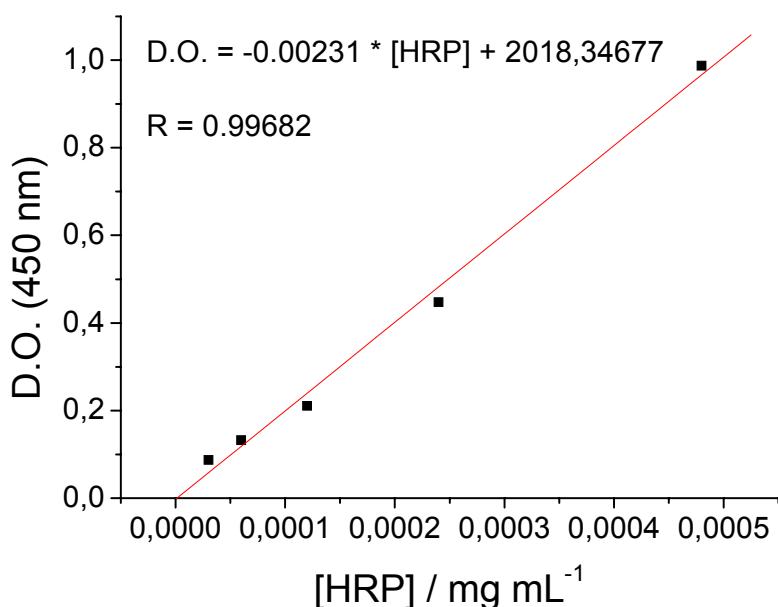


**Figura 6.11.** Esquema representativo da conjugação do anticorpo anti-oxLDL com o antígeno oxLDL, utilizando os sistemas oxLDL-Glut-HRP e anti-oxLDL-Glut-Eu-(β-dicetonato)-Si.

Para a avaliação dos resultados da interação Eu-(β-dicetonato)-Si-Glut-anti-oxLDL-oxLDL-Glut-HRP foi feita a quantificação da enzima HRP por meio do ensaio colorimétrico utilizando a reação enzima-substrato. A absorbância foi registrada através de um leitor de

placas ELISA, considerando que o grau de desenvolvimento de cor em cada poço é proporcional à concentração da enzima.

O método para conjugação Ag-Ac nas partículas foi otimizado para obter melhores resultados de detecção da enzima. Primeiro, foi realizada a conjugação de 1,5 mg da enzima com 1,0 mg da partícula Eu-ACAC-Si. Cada mg da enzima HRP utilizada neste ensaio contém 200 unidades e deve-se considerar neste caso, que a unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 mg de purpurogalina do pirogalol em 20 segundos a 20 °C e pH 6. Neste ensaio, foram analisados o sobrenadante do meio reacional (contendo as enzimas não ligadas) e as águas de 15 lavagens por colorimetria, utilizando o substrato TMB. Uma curva padrão de HRP ([Figura 6.12](#)) foi construída para viabilizar a quantificação de enzimas presentes nas amostras a serem avaliadas.



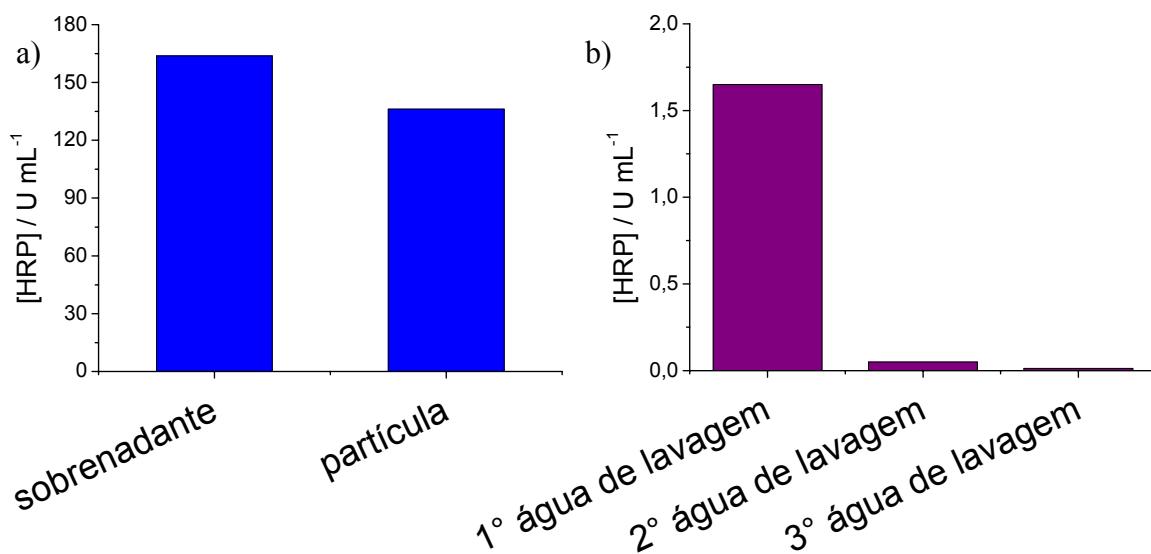
**Figura 6.12.** Relação entre a densidade óptica (D.O.) e a concentração da enzima HRP.

A quantificação da enzima HRP no sobrenadante do sistema Eu-ACAC-Si-Glut-Ac-Ag-Glut-HRP foi de 163,80 unidades ([Tabela 6.2](#)), sendo que foi adicionado ao sistema 300 unidades ([Figura 6.13a](#)). As unidades de enzima HRP na amostra foram determinadas pela diferença entre o total adicionado (300,00 U mL<sup>-1</sup>) e sobrenadante mais águas de lavagem (165,51 U mL<sup>-1</sup>), representando 45,4% da concentração inicial adicionada. Este resultado indica que a partícula de sílica amino-funcionalizada Eu-ACAC-Si foi capaz de interagir com o conjugado Ag-Ac, levando a formação do sistema Eu-ACAC-Si-Glut-Ac-Ag-Glut-HRP apresentando o valor de 134,49 U mL<sup>-1</sup> da enzima HRP. A presença de uma baixíssima concentração de enzimas nas primeiras águas de lavagem provavelmente está associada à enzima remanescente do sobrenadante e/ou a enzimas fracamente ligadas as partículas ([Figura 6.13b](#)). Este resultado também corrobora com a afirmação que as interações fortes desta conjugação são contundentes.

**Tabela 6.2.** Unidades de enzima (U) quantificadas no sobrenadante e águas de lavagem, utilizando o marcador luminescente Eu-ACAC-Si.

Descrição	[HRP] (U mL <sup>-1</sup> )
Sobrenadante	163,80
1° água de lavagem	1,65
2° água de lavagem	0,05
3° água de lavagem	0,01
4° a 15° água de lavagem	0,00

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho indicaram que a reação Ag-Ac ocorre na superfície da partícula Eu-ACAC-Si. Portanto, torna-se possível o estudo para o desenvolvimento de um marcador luminescente utilizando a partícula Eu-ACAC-Si para a detecção e quantificação do antígeno oxLDL.

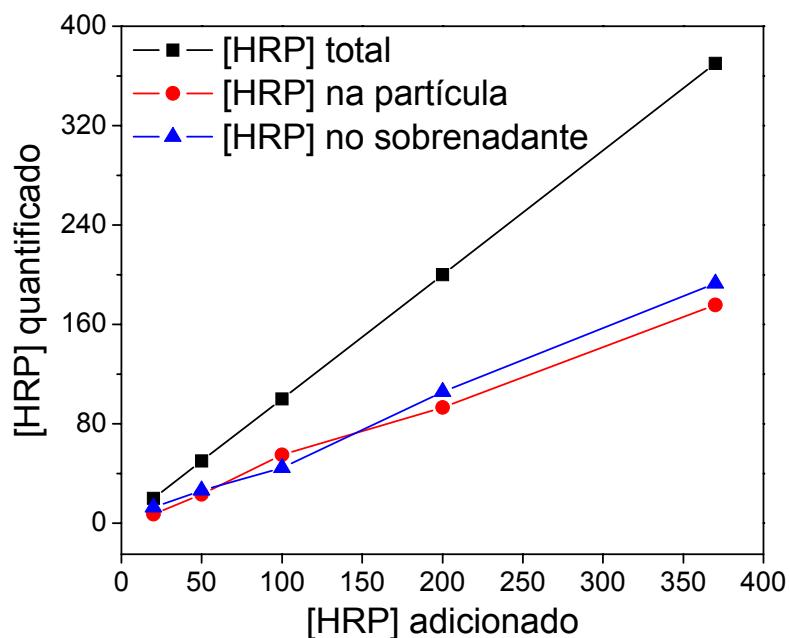


**Figura 6.13.** a) Representação da concentração da enzima HRP ( $\text{U mL}^{-1}$ ) quantificada no sobrenadante e no sistema Eu-ACAC-Si-Glut-Ac-Ag-Glut-HRP e b) representação da concentração da enzima HRP ( $\text{U mL}^{-1}$ ) quantificada nas três primeiras águas de lavagem.

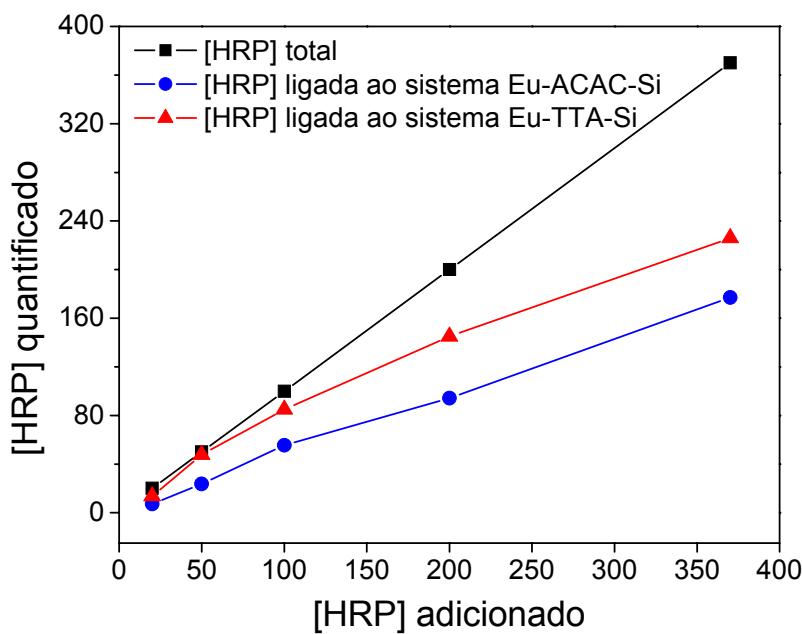
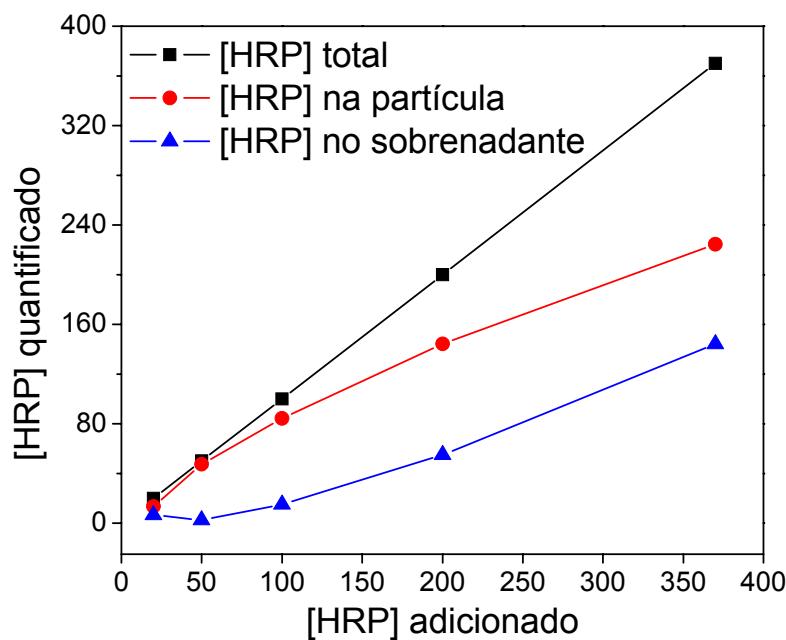
#### 6.1.2.2. Quantificação da enzima na conjugação dos sistemas Eu-(β-dicetonato)-Si-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP, variando a concentração de HRP

Nesta secção foi realizado o mesmo procedimento para a conjugação entre os sistemas Eu-(β-dicetonato)-Si-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP, contudo variou-se a concentração da enzima HRP no intervalo de 20 a 370  $\text{U mL}^{-1}$ , na interação com o antígeno oxLDL. As Figuras 6.15 e 6.15 ilustram a quantificação da enzima no sistema Eu-(β-dicetonato)-Si-Glut-Ac-Ag-Glut-HRP com a variação da concentração do HRP no sistema Ag-Glut-HRP. Os resultados demonstraram que com o aumento da concentração da enzima HRP de 20 a 370  $\text{U mL}^{-1}$  houve também um aumento da reação enzima-substrato. Este comportamento sugere que com o aumento da concentração da enzima HRP e, consequentemente, um incremento da concentração do antígeno oxLDL, aumenta a interação Ag-Ac. Ademais, na concentração máxima da enzima (370  $\text{U mL}^{-1}$ ) utilizada nesta parte do trabalho, não foi observada a ocorrência da saturação do sistema. Comparativamente, o sistema Eu-TTA-Si

apresentou uma maior concentração de HRP na partícula e, portanto, uma maior eficiência na interação Ag-Ac, em todas as concentrações analisadas (Figura 6.16). A Tabela 6.3 apresenta as quantificações do HRP para os marcadores Eu-ACAC-Si e Eu-TTA-Si. Notou-se que a partir da 4<sup>a</sup> água de lavagem, não foi detectada a enzima.



**Figura 6.14.** Quantificação da concentração de HRP imobilizada em função da concentração de enzima adicionada ( $[HRP] = 20, 50, 100, 200$  e  $370 \text{ U mL}^{-1}$ ) para o sistema utilizando o marcador Eu-ACAC-Si.

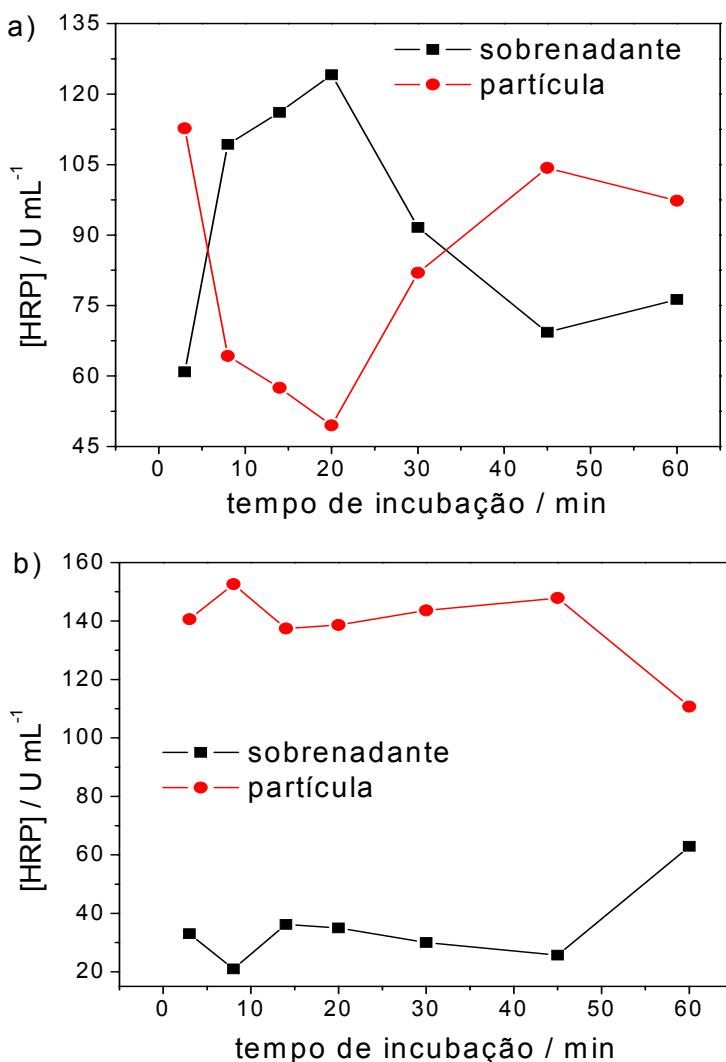


**Tabela 6.3.** Quantificação da concentração da enzima HRP ( $\text{U mL}^{-1}$ ), variando a concentração da enzima na reação entre Eu- $\beta$ -dicetonato-Si-Glut-Ac e o Ag-Glut-HRP.

Experimento	Descrição	Eu-ACAC-Si	Eu-TTA-Si
		[HRP] / $\text{U mL}^{-1}$	[HRP] / $\text{U mL}^{-1}$
1 [HRP] <sub>inicial</sub> = 20 $\text{U mL}^{-1}$	Partícula	7,137	13,454
	Sobrenadante	12,750	6,500
	1° água de lavagem	0,108	0,045
	2° água de lavagem	0,005	0,001
	3° água de lavagem	0	0
	Partícula	23,251	47,377
2 [HRP] <sub>inicial</sub> = 50 $\text{U mL}^{-1}$	Sobrenadante	26,250	2,380
	1° água de lavagem	0,220	0,228
	2° água de lavagem	0,006	0,014
	3° água de lavagem	0,003	0,001
	Partícula	54,983	84,362
	Sobrenadante	44,500	15,000
3 [HRP] <sub>inicial</sub> = 100 $\text{U mL}^{-1}$	1° água de lavagem	0,500	0,628
	2° água de lavagem	0,014	0,009
	3° água de lavagem	0,003	0,001
	Partícula	93,107	144,304
	Sobrenadante	105,750	55,000
	1° água de lavagem	1,118	0,647
4 [HRP] <sub>inicial</sub> = 200 $\text{U mL}^{-1}$	2° água de lavagem	0,022	0,047
	3° água de lavagem	0,003	0,002
	Partícula	175,662	224,652
	Sobrenadante	193,000	144,000
	1° água de lavagem	1,272	1,194
	2° água de lavagem	0,031	0,134
5 [HRP] <sub>inicial</sub> = 370 $\text{U mL}^{-1}$	3° água de lavagem	0,035	0,020

### 6.1.2.3. Estudo da conjugação entre os sistemas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP em função do tempo

A cinética da reação entre a partícula Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si-Glut-anti-oxLDL com oxLDL-Glut-HRP foi monitorada no intervalo de 3 a 60 min, sendo que o conjugado oxLDL-Glut-HRP foi preparado com concentração de  $[HRP] = 173,6 \text{ U mL}^{-1}$ . Por meio da quantificação da enzima presente no sobrenadante do meio reacional em diferentes tempos determinou-se a concentração de enzima presente na partícula pela diferença entre a concentração inicial adicionada (Figura 6.17).



**Figura 6.17.** Quantificação da enzima HRP em diferentes tempos de imobilização na reação para a) (Eu-ACAC-Si)-Glut-anti-oxLDL e HRP-Glut-oxLDL e b) (Eu-TTA-Si)-Glut-anti-oxLDL e HRP-Glut-oxLDL.

Os resultados demonstraram que a concentração do HRP ligado a partícula decresce de 3 a 20 min para o sistema contendo a partícula Eu-ACAC-Si ([Figura 6.17a](#)). Este comportamento pode estar associado a saída do HRP, inicialmente ligado a partícula (3 min), devido a interação enzima-enzima [22], como consequência da alta concentração de HRP inicialmente adicionada ao meio reacional. Além do mais, após 20 min, a curva apresenta um aumento da concentração de HRP, contudo não atingiu o equilíbrio no tempo monitorado ([Figura 6.17a](#)).

**Tabela 6.4.** Quantificação da concentração da enzima HRP ( $\text{U mL}^{-1}$ ) em função do tempo de reação entre (Eu- $\beta$ -dicetonato-Si)-Glut-anti-oxLDL e oxLDL-Glut-HRP, com concentração inicial de HRP 173,6  $\text{U mL}^{-1}$ .

Tempo (min)	Descrição	Eu-ACAC-Si [HRP] / $\text{U mL}^{-1}$	Eu-TTA-Si [HRP] / $\text{U mL}^{-1}$
3	Partícula	112,7	140,6
	Sobrenadante	60,9	33,0
8	Partícula	64,3	152,6
	Sobrenadante	109,3	21,0
14	Partícula	57,5	137,4
	Sobrenadante	116,1	36,2
20	Partícula	49,5	138,6
	Sobrenadante	124,1	35,0
30	Partícula	82,0	143,6
	Sobrenadante	91,6	30,0
45	Partícula	104,3	147,9
	Sobrenadante	69,3	25,7
60	Partícula	97,3	110,7
	Sobrenadante	76,3	62,9

Na quantificação da enzima HRP para o sistema envolvendo a partícula Eu-TTA-Si não foi observado mudanças significativas da concentração até aproximadamente 45 min. No

entanto, no tempo 60 min a concentração decresceu, impossibilitando informações sobre o equilíbrio no tempo monitorado ([Figura 6.17b](#)).

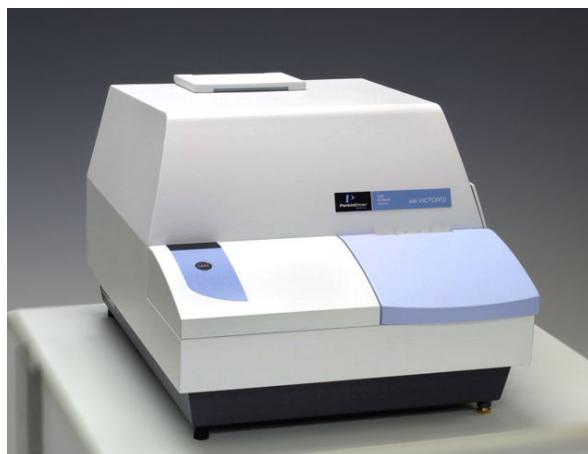
## **6.2. Desenvolvimento do imunoensaio, para determinar o antígeno oxLDL e LDL, utilizando marcador luminescente à base de terra rara**

Para demonstrar a eficácia dos marcadores luminescentes à base do íon Eu<sup>3+</sup> para detecção e quantificação de espécies biológicas, foi realizado um experimento para a conjugação do antígeno oxLDL e LDL com o anticorpo anti-oxLDL. Vale ressaltar, que para a obtenção destes resultados foi realizada uma série de experimentos para otimizar as condições reacionais. O imunoensaio é baseado na reação entre um anticorpo e antígeno – formando um conjugado Ac-Ag. Este conjugado pode ser identificado utilizando um marcador, no caso, um marcador óptico à base de íons terras raras. O experimento foi fundamentado na conjugação do anticorpo ligado a partícula luminescente com o antígeno, utilizando o glutaraldeído como espaçador.

As reações de conjugação empregaram a partícula Eu-ACAC-Si e diferentes concentrações de anticorpo anti-oxLDL à concentração constante dos抗ígenos LDL e oxLDL. O estudo da conjugação do antígeno LDL oxidado (oxLDL) e não oxidado (LDL) teve como finalidade verificar a diferenciação na reação de conjugação entre o antígeno não oxidado e o oxidado, que é responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Para o desenvolvimento do experimento foram preparadas quatro diferentes concentrações de anticorpo (Ac) ( $[Anti\text{-}oxLDL] = 25 \cdot 10^{-3}, 25 \cdot 10^{-4}, 25 \cdot 10^{-5}$  e  $25 \cdot 10^{-6} \text{ mg mL}^{-1}$ ) e dos抗ígenos (Ag;  $[oxLDL]$  e  $[LDL] = 25 \cdot 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ ). Na placa de poliestireno de 96 poços, imobilizada com o Ag, foram adicionadas 250  $\mu\text{L}$  das dispersões dos conjugados Eu-ACAC-Si-Glut-Ac (2mg de partícula em 12 mL de solução). A concentração da dispersão dos conjugados Eu-ACAC-Si-Glut-Ac foi escolhida com base na melhor dispersão e da eficiência de luminescência.

A placa de 96 poços do experimento utilizando o marcador luminescente Eu-ACAC-Si ligado ao conjugado Ac-Ag foi lida no contador Victor<sup>2</sup>D ([Figura 6.18](#)) por fluorescência resolvida no tempo. Para o registro da contagem de fótons foi utilizado um protocolo para leitura de európio existente no instrumento, usando os filtros de 340 nm na excitação e 615 nm na emissão.

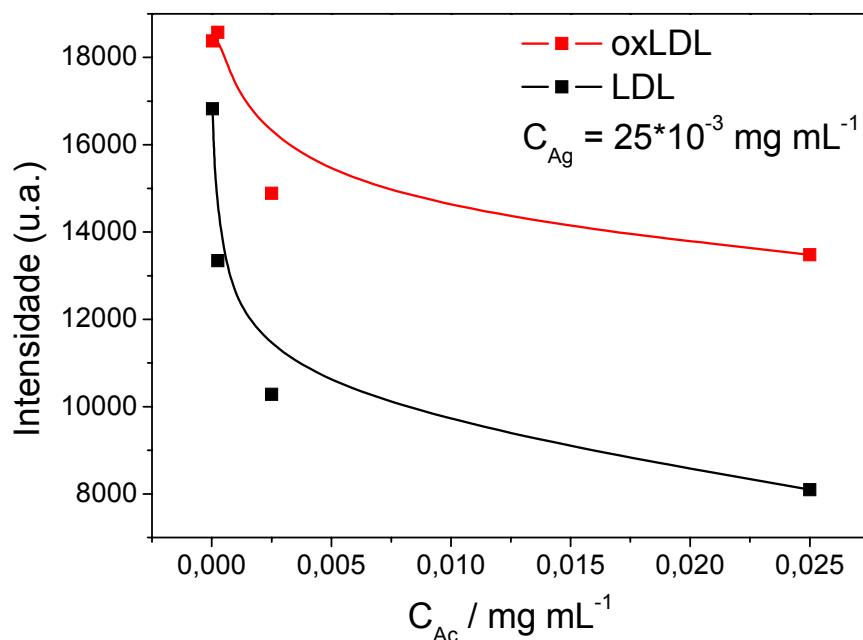


**Figura 6.18.** Fotografia do fluorímetro Victor<sup>2</sup>D da Perkin Elmer.

A utilização do marcador biológico Eu-ACAC-Si preparado pelo método Stöber indica a ocorrência da interação partícula-anticorpo-antígeno, devido a leitura de sinal luminescente oriundo do íon európio na placa. Estes dados de emissão corroboram com os obtidos no ensaio colorimétrico utilizando a enzima HRP, que demonstraram a presença da enzima na conjugação do marcador luminescente com o conjugado Ac-Ag. Assim, a partícula luminescente é capaz de atuar como marcador biológico.

A curva de calibração construída para a reação nos poços da placa Elisa (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*) das partículas conjugadas variando a concentração do anticorpo anti-oxLDL e mantendo constante a concentração do antígeno LDL oxidado e não oxidado ( $25 \cdot 10^{-3}$  g·mL<sup>-1</sup>) no imunoensaio é apresentada na [Figura 6.19](#). Neste caso, uma importante característica do ensaio foi que a partícula reconheceu eficientemente o antígeno oxidado daquele não oxidado. Esta técnica apresenta uma grande vantagem, pois o marcador

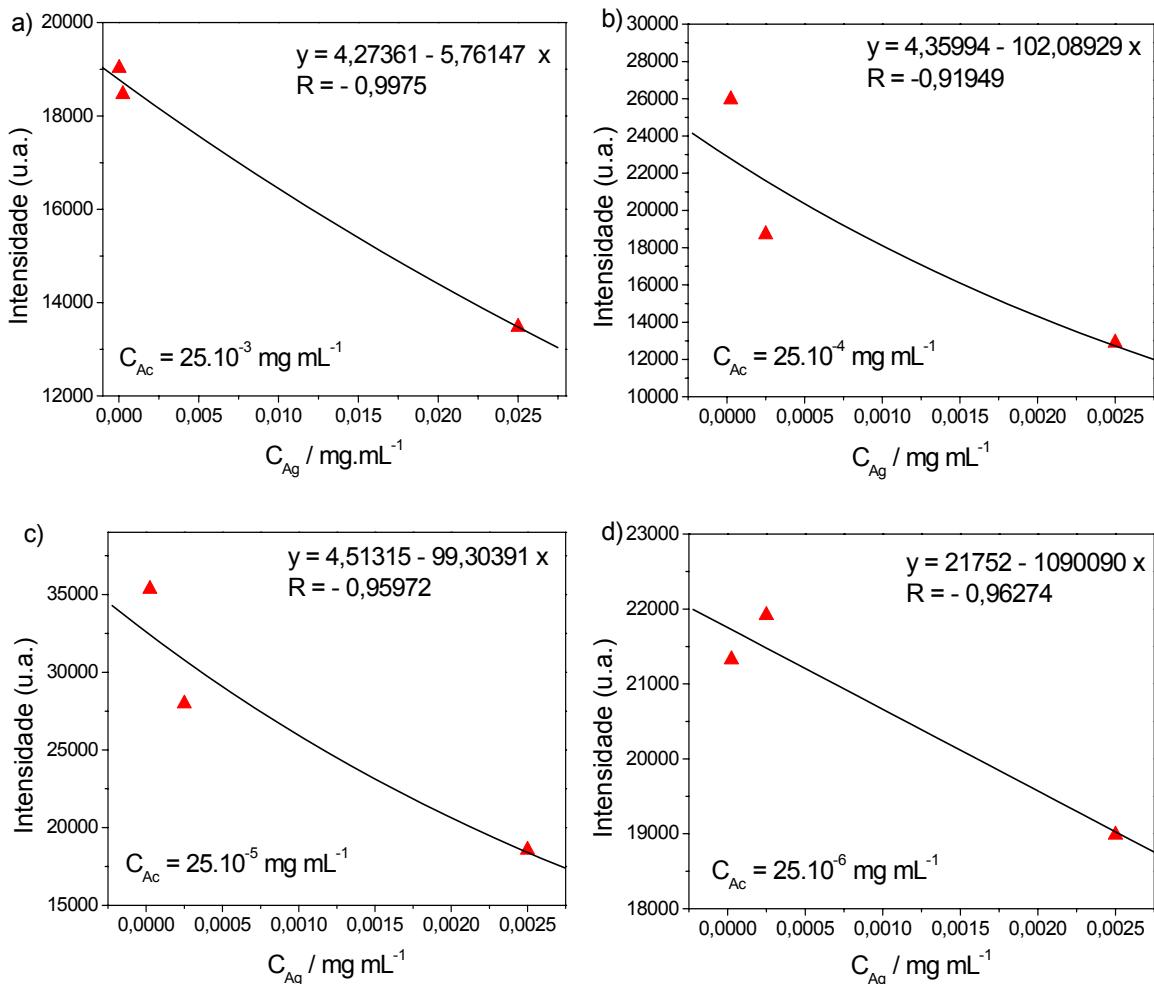
óptico desenvolvido neste trabalho detecta o antígeno responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares (oxLDL) e também esta reação poder ser determinada em escala de nanograma. O perfil da curva de calibração (Figura 6.19) indica que quanto mais concentrado o antígeno, menor o sinal de luminescência, sendo, portanto o sinal gerado através da supressão de luminescência por concentração ou outro mecanismo ainda desconhecido.



**Figura 6.19.** Curva de calibração do imunoensaio utilizando o marcador luminescente Eu-Acac-Si, na reação Ac-Ag. A concentração do anticorpo anti-oxLDL ligado a partícula variou de  $25 \cdot 10^{-6}$  a  $25 \cdot 10^{-3}$  mg mL $^{-1}$ , mantendo fixa a concentração dos抗ígenos LDL e oxLDL em  $25 \cdot 10^{-3}$  mg mL $^{-1}$ .

Um outro experimento para detecção e quantificação de espécies biológicas foi realizado, onde a concentração do anticorpo anti-oxLDL é mantida constante, porém variando a concentração do antígeno oxLDL immobilizado na placa. A Figura 6.20 apresenta as curvas de calibração para estes ensaios. Notou-se que com o aumento da concentração de antígeno immobilizado na placa, mais anticorpo ligado ao marcador óptico é fixado na placa e que o sinal gerado apresenta menor intensidade de emissão, indicando que houve uma supressão de

luminescência por concentração. A concentração de anticorpo anti-oxLDL de  $25.10^{-5}$  mg mL<sup>-1</sup> (Figura 6.20c) foi a que apresentou uma maior resposta luminescente.



**Figura 6.20.** Curva de calibração do imunoensaio utilizando o marcador luminescente Eu-ACAC-Si, na reação Ac-Ag. A concentração do antígeno oxLDL variou de  $25.10^{-6}$  a  $25.10^{-3}$  mg mL<sup>-1</sup>, enquanto manteve-se fixa a concentração do anticorpo anti-oxLDL ligado a partícula, a)  $25.10^{-3}$ , b)  $25.10^{-4}$ , c)  $25.10^{-5}$  e d)  $25.10^{-6}$  mg mL<sup>-1</sup>.

Os imunoensaios desenvolvidos demonstraram que é possível efetuar a marcação do conjugado Ac-Ag, para a detecção e quantificação do antígeno oxLDL. Além disso, é possível diferenciar o antígeno LDL oxidado (oxLDL) e não oxidado (LDL), como ilustrou a Figura 6.20. Todavia, os resultados deste ensaio biológico necessitam de maiores informações utilizando diferentes experimentos para aprimorar o desenvolvimento da validação de uma curva de calibração para a detecção do antígeno oxLDL.

## Referências

- [1] KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological Review*, v.33, p.17-53, 1981.
- [2] YANG, Q.; LIANG, J.; HAN, H. Probing the interaction of magnetic iron oxide nanoparticles with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. *The Journal Physical Chemistry B*, v.113, p.10454–10458, 2009.
- [3] YU, C. H.; AL-SAADI, A.; SHIH, S.-J.; QIU, L.; TAM, K. Y.; TSANG, S. C. Immobilization of BSA on silica-coated magnetic iron oxide nanoparticle. *The Journal Physical Chemistry C*, v.113, p.537–543, 2009.
- [4] RAN, D.; WU, X.; ZHENG, J.; YANG, J.; ZHOU, H.; ZHANG, M.; TANG, Y. Study on the interaction between florasulam and bovine serum albumin. *Journal of Fluorescence*, v.17, p.721–726, 2007.
- [5] MISRA, T. K.; HUANG, K.-P.; LIU, C.-Y. Bioconjugation of 32-macrocyclic polyammonium cations-functionalized gold nanoparticles with BSA. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.344, p.137–143, 2010.
- [6] SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSEN, G.T.; MALIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v.150, p.76-85, 1985.
- [7] KROHN, R.I. *The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein, Current Protocols in Cell Biology*. New York:John Wiley & Sons, Inc., 2002, p.83-86
- [8] ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v.21, p.787-793, 1998.
- [9] SÖZGEN, K.; CEKIC, S.D.; TÜTEM, E.; APAK, R. Spectrophotometric total protein assay with copper(II)-neocuproine reagent in alkaline medium. *Talanta*, v.68 p.1601–1609, 2006.
- [10] VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, v.65, p.249–259, 2004.
- [11] JANTSCHKO, W.; FURTMÜLLER, P.G.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M.A.; JAKOPITSCH, C.; REGELSBERGER, G.; OBINGER, C. Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.398, p.12-22, 2002.
- [12] LOUGHLIN, W.A. Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*, v.74, p.49-62, 2000.

- [13] SAKHAROV, I.Y.; BERLINA, A.N.; ZHERDEV, A.V.; DZANTIEV, B.B. Advantages of soybean peroxidase over horseradish peroxidase as the enzyme label in chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay of sulfamethoxypyridazine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.3284-3289, 2010.
- [14] BARRY, R.C.; LIN, Y.; WANG, J.; LIU, G.; TIMCHALK, C.A. Nanotechnology-based electrochemical sensors for biomonitoring chemical exposures, *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, v.19, p.1-18, 2009.
- [15] AHIRWAL, G.K.; MITRA, C.K. Direct Electrochemistry of horseradish peroxidase-gold nanoparticles conjugate. *Sensors*, v.9, p.881-894, 2009.
- [16] CANS, A.-S.; DEAN, S.L.; REYES, F.E.; KEATING, C.D. Synthesis and Characterization of enzyme-Au bioconjugates: HRP and fluorescein-labeled HRP. *Nanobiotechnology*, v.3, p.12-22, 2007.
- [17] BRANDÃO, S.A.; IZAR, M.C.; FISCHER, S.M.; SANTOS, A.O.; MONTEIRO, C.M.; POVOA, R.M.; HELFENSTEIN, T.; CARVALHO, A.C.; MONTEIRO, A.M.; RAMOS, E.; GIDLUND, M.; NETO, A.F.M.; FONSECA, F.A. Early increase in autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein in hypertensive patients after blood pressure control. *American Journal of Hypertension*, v.23, p.208-214, 2010.
- [18] COURROL, L.C.; MONTEIRO, A.M.; SILVA, F.R.O.; GOMES, L. VIEIRA JR., N.D. GIDLUND, M.A.; NETO, A.M.F. Novel fluorescent probe for low density lipoprotein, based on the enhancement of europium emission band. *Optics Express*, v.15, n.11, p.7066-7074, 2007.
- [19] SILVA, F.R.O.; SAMAD, R.E.S.; GOMES, L.; COURROL, L.C. Enhancement of europium emission band of europium tetracycline complex in the presence of cholesterol. *Journal of Fluorescence*, v.18, p.169-174, 2008.
- [20] FERNVIK, E.C.; KETELHUTH, D.F.J.; RUSSO, M.; GIDLUND, M. The autoantibody repertoire against copper-or macrophage-modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients. *Journal of Clinical Immunology*, v.24, n.2, p.170-176, 2004.
- [21] GAO, L.; ZHUANG, J.; NIE, L.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; GU, N.; WANG, T.; FENG, J.; YANG, D.; PERRETT, S.; YAN, X. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, v.2, p.577-583, 2007.
- [22] HERMANSON, G.T. *Bioconjugate Techniques*. 2.ed. Amsterdam: Elsevier, 2008, 1202p.
- [23] TOPCULAR, C.; AYHAN, H. Immobilisation of horseradish peroxidase onto monodisperse poly(glycidyl methacrylate) microspheres. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.18, n.5, p.595–607, 2007.

# Capítulo 7

## Conclusão

---

## 7. Conclusão

Este trabalho apresenta a preparação, caracterização e estudo das propriedades ópticas de partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporando complexos de terras raras trivalente. Ademais, aborda a avaliação da sua potencial aplicação em ensaios biológicos para detecção e quantificação do antígeno oxidado de baixa densidade (oxLDL).

A preparação das partículas amino-funcionalizadas incorporando os complexos  $[\text{Eu(ACAC)}_3(\text{H}_2\text{O})_3]$  e  $[\text{Eu(TTA)}_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ , a partir do método Stöber, mostrou-se bastante eficiente. Por outro lado, os sistemas partículas que incorporaram os complexos  $[\text{TR(BTC)}(\text{H}_2\text{O})_n]$  ( $\text{BTC} = \text{EMA}, \text{TLA}$  e  $\text{TMA}$  e  $\text{TR} = \text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ ) foram preparados pelo método por micro-ondas.

Os dados de absorção na região do infravermelho evidenciaram diferenças nas partículas de sílica amino-funcionalizadas variando o método de preparação. O método Stöber, compreende de duas etapas, empregando duas fontes de sílica. Por outro lado, o método microondas utiliza apenas uma fonte de sílica. Devido a este fato, os espectros exibiram apenas as bandas de absorção relativa a rede de sílica para o método Stöber devido a maior quantidade sílica neste sistema. Enquanto que para as partículas preparadas pelo método micro-ondas, com uma camada de revestimento, apresentaram também as bandas de absorções referentes ao complexo de  $\text{TR}^{3+}$  precursor.

Os difratogramas de raios X mostraram que os sistemas Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si apresentam perfil cristalográfico característico da sílica amorfa. Isto se deve a diferentes interações entre os complexos de terras raras e a rede sílica no processo de silanização para o sistema preparado pelo método Stöber. Os dados de raios X para as partículas Eu-BTC-Si preparadas por micro-ondas, onde  $\text{Eu-BTC} = [\text{Eu(EMA)}(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,  $[\text{Eu(TLA)}(\text{H}_2\text{O})_4]$  e  $[\text{Eu(TMA)}(\text{H}_2\text{O})_6]$ , indicaram que com o aumento do número de água coordenada de 2, 4 e 6

---

## Capítulo 7 - Conclusão

aumenta também o caráter amorfó do sistema. A silanização do complexo Tb-EMA não provocou mudanças nas difrações, indicando uma pequena quantidade de rede de sílica incorporada ao complexo. Os perfis dos difratogramas de raios X para os materiais Tb-TLA-Si e Tb-TMA-Si, evidenciaram interação com a rede de sílica.

As curvas termogravimétricas (TG) dos materiais de sílica amino-funcionalizadas indicaram a interação dos complexos precursores com a rede de sílica, levando a formação de resíduo constituído por óxidos de európio e sílica. Ademais, a preparação do material luminescente amino-funcionalizado pelo método Stöber apresenta uma maior quantidade de sílica.

As imagens MEV apresentaram diferenças na superfície entre os materiais amino-funcionalizados e os complexos precursores, demonstrando que ocorreu a incorporação da rede de sílica nestes compostos. Estes dados também foram corroborados pelas quantificações de aminas primárias disponíveis em suas superfícies, pelo método colorimétrico.

A técnica PIXE, forneceu a relação entre a rede de sílica e o íon európio, apresentando a mesma tendência da eficiência do revestimento observado pela quantificação de aminas primárias, na ordem de ligante TMA > TLA > EMA para os materiais Eu-BTC-Si. Além do mais, indicou também a maior relação Si/Eu para os materiais silanizados pela técnica Stöber, dada a utilização de duas fontes de sílica.

No estudo das propriedades fotoluminescentes dos materiais Eu-( $\beta$ -dicetonato)-Si e TR-BTC-Si, os seus espectros de emissão apresentaram as transições intraconfiguracionais  $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0-4}$  e  $^5D_4 \rightarrow ^7F_{6-0}$  características dos íons Eu<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup>, respectivamente. Os dados de eficiências quânticas de emissão experimental ( $\eta$ ), tempos de vida dos estados emissores ( $\tau$ ), estrutura dos níveis de energia e parâmetros de intensidade ( $\Omega_\lambda$ ) evidenciaram que íon Eu<sup>3+</sup> atuou como sonda espectroscópica, indicando alterações em seu ambiente químico após a incorporação de sílica amino-funcionalizada. Além do mais, a ausência das bandas de emissão

---

## Capítulo 7 - Conclusão

largas do estado tripleto do ligante indica que ocorreu eficiente transferência de energia intramolecular ligante-terra rara nos materiais amino-funcionalizados. Portanto, os materiais preparados atuam como dispositivos moleculares conversores de luz (DMCL), tornando-os fortes candidatos a atuarem como marcadores luminescentes em ensaios biológicos.

Os complexos de terras raras incorporados com a rede de sílica amino-funcionalizada foram aplicados como marcadores luminescentes em sistema biológico. Primeiro, os marcadores mostraram a capacidade de interagir com biomolécula, pelos ensaios utilizando a proteína BSA e a enzima HRP. Portanto, foi possível desenvolver um protocolo utilizando estes marcadores luminescentes à base de terras raras para a detecção e quantificação do antígeno oxLDL, responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além disso, foi possível diferenciar, nestes ensaios, o antígeno LDL oxidado (oxLDL), responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares, do antígeno não oxidado (LDL).

### 7.1. Perspectivas

A partir das propriedades químicas e dos estudos ópticos dos materiais amino-funcionalizados contendo complexos luminescentes, pode-se sugerir as seguintes etapas para trabalhos futuros:

- ✓ Investigar a interação dos complexos com a rede de sílica, obtidas pelo método de preparação Stöber. Além de variar as relações TEOS/NH<sub>3</sub>, para a obtenção de partículas menores e esféricas.
- ✓ Efetuar um estudo da interação partícula-espécie biológica em meio aquoso, registrando os espectros de emissão e excitação. Este estudo é de particular importância, haja vista que estes materiais apresentaram-se como candidatos para aplicações em ensaios clínicos.
- ✓ Incrementar os estudos de interação dos marcadores luminescentes com as espécies biológicas. Espera-se com isso a obtenção de dados da relação espécie biológica por massa de partícula e cinética de reação.

# Anexo 1

---

---

Anexo 1

**Ana Valeria Santos de Lourenço**

Curriculum Vitae

---

**Dados Pessoais**

<b>Nome</b>	Ana Valeria Santos de Lourenço
<b>Filiação</b>	Hotônio José de Lourenço e Carmen Lúcia Santos de Lourenço
<b>Nascimento</b>	18/03/1978 - Lorena/SP - Brasil
<b>Carteira de Identidade</b>	202059741 SSP - SP - 13/02/2007
<b>CPF</b>	26838805880

---

**Formação Acadêmica/Titulação**

- 2005** Doutorado em Química (Química Inorgânica).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Partículas de sílica funcionalizadas contendo complexos de TR3+ para aplicação como marcadores luminescentes em ensaios biológicos  
Orientador: Hermi Felinto de Brito
- 2000 - 2002** Mestrado em Química.  
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil  
Título: Síntese, Caracterização e Estudo das propriedades luminescentes de organofosfonatos de terras raras, Ano de obtenção: 2002  
Orientador: Ieda Lúcia Viana Rosa  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 1996 - 1999** Graduação em Química.  
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
- 

**Formação complementar**

- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Synchrotron radiation in materials science.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Synchrotron radiation in materials science.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Persistent luminescence phenomena.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Nanomateriais e nanotecnologia.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Introdução à Imunobiologia.  
Instituto Butantan, IBU, São Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Metod do Ens Quím para uso das Tecn da Inf e Comun.  
30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30A SBQ, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Espectroscopia Vibracional.  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

## **Atuação profissional**

### **1. Universidade de São Paulo - USP**

#### **Vínculo institucional**

<b>2008 - 2008</b>	Vínculo: estagiária , Enquadramento funcional: estagiária/bolsista , Carga horária: 6, Regime: Parcial
<b>2007 - 2007</b>	Vínculo: estagiária , Enquadramento funcional: estagiária/bolsista , Carga horária: 6, Regime: Parcial
<b>2007 - 2007</b>	Vínculo: estagiária , Enquadramento funcional: estagiária/bolsista , Carga horária: 6, Regime: Parcial

## **Produção em C, T& A**

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. ROSA, I L V, LOURENCO, A V S, Cláudio Roberto Neri, SERRA, O A Photophysical Properties of New Terbium (III) Organophosphonates. *Journal of Fluorescence.* , v.16, p.455 - 459, 2006.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1 .LOURENCO, A. V. S.; KODAIRA, C. A.; Sanches, E. M.; GOTO, H.; GIDLUND, M. A.; FELINTO, M. C. F. C.; BRITO, H. F. Viabilidade da aplicação de partículas de sílica incorporando complexo luminescente como marcador biológico In 33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Águas de Lindóia. **CD contendo Resumo da 33a. Reunião Anual da SBQ.** , 2010.

2. de RODRIGUES, A. S.; LOURENÇO, A. V. S.; BRITO, H. F.; FELINTO, M. C. F. C.; KODAIRA, C. A Nanopartículas de Gd<sub>2</sub>(WO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>:Eu<sup>3+</sup>: estudo do revestimento com APTMS", In 33º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Águas de Lindóia. **CD contendo Resumo da 33a. Reunião Anual da SBQ.** , 2010.

3. LOURENCO, A V S, RODRIGUES, L. C. V., KODAIRA, C. A., STEFANI, R., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C., HOLSA, J. Persistent luminescence BaAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:Eu<sup>2+</sup>,Dy<sup>3+</sup> phosphor incorporated in silica: water resistance In: 11th International Conference on Advanced Materials ICAM 2009 nd VIII Encontro da SBPMat, 2009, Rio de Janeiro. **11th International Conference on Advanced Materials ICAM 2009 nd VIII Encontro da SBPMat.** , 2009.

4. KODAIRA, C. A., LOURENCO, A V S, NUNES, K. C., FELINTO, M. C. F. C., STEFANI, R., BRITO, H. F.

Estudo espectroscópico do SmVO<sub>4</sub> preparado via método Pechini In: 31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. **CD contendo Resumo da 31a. Reunião Anual da SBQ.** , 2008.

5. KODAIRA, C. A., TOMIYAMA, C. S., FELINTO, M. C. F. C., STEFANI, R., LOURENCO, A V S, BRITO, H. F., REIS, F. J. O., GIDLUND, M. A. Nanopartículas de Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu<sup>3+</sup> funcionalizadas para

---

## Anexo 1

atuarem como marcadores luminescentes em imunoensaio para a LDL In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos da 30a Reunião Anual da SBQ.** , 2007.

6. LOURENCO, A V S, KODAIRA, C. A., FELINTO, M. C. F. C., TEOTONIO, E. E. S., BRITO, H. F. Preparação e investigação fotoluminescente de sílica contendo o complexo [Eu(TTA)3(PHA)2] de interesse biológico In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

**Livro de Resumos da 30a Reunião Anual da SBQ.** , 2007.

7. LOURENCO, A V S, KODAIRA, C. A., GUEDES, M. A., STEFANI, R., RODRIGUES, L. C. V., FELINTO, M. C. F. C., BRITO, H. F.

Synthesis and luminescent properties of Eu<sup>3+</sup>-complex silica particles for biomarkers In: VI Encontro SBPMat - 6th Brazilian MRS Meeting, 2007, Natal.

**VI Encontro SBPMat - 6th Brazilian MRS Meeting.** , 2007.

8. PAOLINI, T. B., STEFANI, R., RODRIGUES, L. C. V., LOURENCO, A V S, FELINTO, M. C. F. C., BRITO, H. F. White persistent luminescence of silicates doped with Dy<sup>3+</sup> In: VI Encontro SBPMat - 6th Brazilian MRS Meeting, 2007, Natal. **VI Encontro SBPMat - 6th Brazilian MRS Meeting.** , 2007.

9. ROSA, I L V, LOURENCO, A V S, Cláudio Roberto Neri, SERRA, O A  
Photophysical Properties of New Terbium (III) Organophosphonates In: 9th International Conference on Methods and Application of Fluorescence. Spectroscopy, Imaging and Probes, 2005, Lisboa.

**Book of Abstract of the 9th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence.** , 2005. v.1. p.237 - 237

10. LOURENCO, A V S, ROSA, I L V, SERRA, O A

Synthesis and luminescent properties of europium (III) organophosphonate In: X Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2000, Florianópolis. **Abstract Book.** , 2000. p.x - x

11. ROSA, I L V, LOURENCO, A V S, SERRA, O A, Cláudio Roberto Neri

Synthesis and Luminescent Properties of Eu<sup>3+</sup>:La:Ethylphosphonate In: 22nd Rare Earth Research Conference, 1999, Argone, Illinois - USA. **Abstract Book. Argone: 22nd RERC.** , 1999. p.76 - 76

### Apresentação de Trabalho

1. LOURENCO, A. V. S.; KODAIRA, C. A.; Sanches, E. M.; GOTO, H.; GIDLUND, M. A.; FELINTO, M. C. F. C.; BRITO, H. F **Viabilidade da aplicação de partículas de sílica incorporando complexo luminescente como marcador biológico**, 2010 . (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. LOURENCO, A V S, RODRIGUES, L. C. V., KODAIRA, C. A., STEFANI, R., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C., HOLSA, J. **Persistent luminescence BaAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:Eu<sup>2+</sup>,Dy<sup>3+</sup> phosphor incorporated in silica: water resistance**, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho Oral)

3. LOURENCO, A V S, RODRIGUES, L. C. V., KODAIRA, C. A., STEFANI, R., CARVALHO, C. A. A., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C., HOLSA, J. **Encapsulation study of persistent luminescent material in silica**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. LOURENCO, A V S, RODRIGUES, L. C. V., KODAIRA, C. A., STEFANI, R., CARVALHO, C. A. A., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C., HÖLSA, J. **Encapsulation study of persistent luminescent material in silica**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. KODAIRA, C. A., LOURENCO, A V S, STEFANI, R., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C. **Functionalization of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Sm<sup>3+</sup> and Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Tb<sup>3+</sup> materials**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. KODAIRA, C. A., LOURENCO, A V S, STEFANI, R., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C. **Functionalization on Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Sm<sup>3+</sup> and Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Tb<sup>3+</sup> materials**, 2008. (Congresso,Apresentação de

---

Anexo 1

Trabalho)

7. LOURENCO, A V S, KODAIRA, C. A., SOUZA, E. R., FELINTO, M. C. F. C., BRITO, H. F. **Functionalized luminescent particles: preparation and optical properties**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
8. LOURENCO, A V S, KODAIRA, C. A., SOUZA, E. R., FELINTO, M. C. F. C., BRITO, H. F. **Functionalized luminescent particles: preparation and optical properties**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
9. LOURENCO, A V S, KODAIRA, C. A., SOUZA, E. R., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C. **Preparation and optical properties of silica material encapsulating terbium complex**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
10. LOURENCO, A V S, KODAIRA, C. A., SOUZA, E. R., BRITO, H. F., FELINTO, M. C. F. C. **Preparation and optical properties of silica material encapsulating terbium complex**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)