

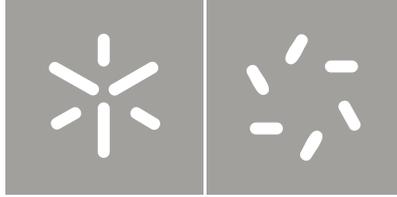


Universidade do Minho
Escola de Ciências

José Henrique Cachetas
Desenvolvimento e Ensaio Biológicos de Bionanossistemas
baseados em Pontos Quânticos de CdSe/ZnS

José Henrique Roque da Silveira Cachetas

Desenvolvimento e Ensaio Biológicos
de Bionanossistemas baseados em
Pontos Quânticos de CdSe/ZnS



Universidade do Minho
Escola de Ciências

José Henrique Roque da Silveira Cachetas

Desenvolvimento e Ensaio Biológicos
de Bionanossistemas baseados em
Pontos Quânticos de CdSe/ZnS

Tese de Mestrado
Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efectuado sob a orientação de
Professora Doutora Maria João Sousa
e
Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Maria João Sousa e Doutor Paulo Coutinho, pela disponibilidade e frutífero apoio que me deram ao longo deste projecto e mestrado.

Ao Doutor Peter Schellenberg pelo acompanhamento nas experiências de fluorimetria resolvida no tempo.

Ao Raju, pela cedência das moléculas de benzofenoxazinas, sintetizadas no Centro de Química, e pela sua disponibilidade para todas as explicações necessárias.

À Andreia Pacheco, pelo apoio e acompanhamento durante os ensaios biológicos, que me permitiu uma grande aprendizagem essencial para este projecto.

Aos meus pais, que me permitiram todos estes anos de aprendizagem ao longo da vida.

A todos os meus colegas de laboratório que possibilitaram um trabalho em equipa mais agradável.

À Vida, que me pôs neste lugar da Terra com a inteligência e energia suficientes para a conclusão este projecto.

Resumo

O desenvolvimento de bionanossistemas é uma área promissora para grandes avanços em diagnóstico, terapêutica e bioengenharia. Os pontos quânticos são de especial interesse devido às propriedades que os semicondutores cristalinos têm à nanoescala, tornando-se fluorescentes.

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um bionanossistema baseado em pontos quânticos com núcleo de seleneto de cádmio e coroa de sulfureto de zinco. Uma vez sintetizadas, estas partículas foram conjugadas com uma molécula benzofenoxazina, também fluorescente, de modo a funcionar como aceitadora da energia emitida pelos pontos quânticos, e assim se produzir um sensor capaz de detectar alterações em meios biológicos, como o interior das células.

Caracterizou-se a influência de diferentes parâmetros na síntese destes nanossistemas, através de técnicas espectroscópicas de fluorescência. Também se recorreu a diferentes abordagens para os ensaios biológicos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, que foram realizados por microscopia de fluorescência.

Os métodos de síntese resultaram em pontos quânticos fluorescentes na zona dos 610 nm, a zona em que a benzofenoxazina absorve. Estas nanopartículas mostraram um espectro de emissão intenso, estreito e simétrico. A sua conjugação fez com que a intensidade de fluorescência reduzisse consideravelmente, mas concluiu-se que ocorria transferência de energia entre os nanocristais e a benzofenoxazina.

Na interacção dos nanossistemas conjugados com NADH, acrilamida e iodeto observou-se que estas substâncias funcionam como inibidoras de fluorescência. Estas experiências mostraram também que as propriedades dos pontos quânticos conjugados não são simplesmente a soma das propriedades das suas partes em separado, mas novas características emergem após a conjugação. Os resultados foram inconclusivos quanto à incorporação dos nanossistemas conjugados nas células, ocorrendo para o caso de esferoplastos.

O conjunto dos resultados deste trabalho podem ser qualificados como preliminar, mas cujas conclusões apoiam a necessidade de continuar este projecto para o desenvolvimento de bionanossistemas baseados em pontos quânticos.

Abstract

The development of bionanosystems is a promising field for great breakthrough in diagnostics, therapeutics and bioengineering. Quantum dots are of special interest due to the unique properties crystalline quantum dots have at the nanoscale, becoming fluorescent.

The objective of this work was the development of a bionanosystems based on quantum dots with a core of cadmium selenide and a shell of zinc sulfide. Once synthesized, these particles were conjugated with a benzophenoxazine fluorescent molecule, that could function as an acceptor for the emitted energy by quantum dots, and this way to produce a sensor capable of detecting biological transformations.

The influence of different parameters on the synthesis of these nanosystems was characterized by fluorescent spectroscopic techniques. Different approaches were also required for the biological essays with *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 by fluorescent microscopy.

The synthesis methods resulted on 610 nm emitting quantum dots, with thin, intense and symmetric spectra. The conjugation of these nanoparticles made the fluorescence intensity to decrease considerably, as the conclusion was that some energy was transferred between the nanocrystals and the benzophenoxazine.

On the interaction of the conjugates with NADH, acrylamide and iodate, it was observed that these substances act as quenchers. These experiences also showed that the properties of conjugated quantum dots are not just the sum of the separated parts properties, but new characteristics emerge after the conjugation. The results were inconclusive about the internalization of the conjugated nanosystems on cells, occurring in the case of spheroplasts.

The results of this work can be qualified as preliminary, but which conclusions support the necessity of continuing this project for the development of bionanosystems based on quantum dots.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Pontos Quânticos	6
1.1.1 Propriedades estruturais: a quântica dos pontos	6
1.1.1.1 Estrutura do núcleo nanocristalino	7
1.1.1.2 Estrutura da superfície	8
1.1.1.3 Passivação da superfície	9
1.1.1.3.1 Passivação com camada orgânica	9
1.1.1.3.2 Passivação com camada inorgânica	10
1.1.2 Propriedades de luminescência	11
1.1.2.1 Dependência do tamanho	12
1.1.2.2 Intermitência dos pontos quânticos	13
1.1.2.3 Emissão dos defeitos	14
1.1.2.4 Efeito da passivação	15
1.1.3 Síntese de pontos quânticos	17
1.1.3.1 Processos <i>top-down</i> de síntese	18
1.1.3.2 Processos <i>botom-up</i> de síntese	19
1.1.3.3 Síntese de pontos quânticos pelo método de microemulsão	20
1.1.3.3.1 Efeito da razão de água para surfactante	22
1.1.3.3.2 Efeito da fase orgânica	23
1.1.3.3.3 Efeito dos reagentes	23
1.1.3.3.4 Efeito da concentração de reagentes	23
1.1.3.3.5 Efeito da misturação	24
1.1.3.3.6 Efeito da temperatura e do tempo de reacção	24

1.2	Benzofenoxazina	25
1.2.1	Caracterização de benzofenoxazinas	25
1.2.2	Aplicações de benzofenoxazinas	26
1.3	Conjugação de Pontos Quânticos	28
1.3.1	Solubilização de pontos quânticos	28
1.3.2	Troca de ligandos	39
1.3.3	Encapsulação em sílica	30
1.3.4	Encapsulação em polímeros	30
1.3.5	Aplicações de sistemas baseados em pontos quânticos	32
1.4	Purificação de bionanossistemas	34
1.4.1	Cromatografia	35
1.4.2	Centrifugação por gradiente de densidade	35
1.4.3	Precipitação Selectiva	36
1.5	Imagiologia em células vivas	37
1.5.1	Vias de endocitose	37
1.6	Pontos quânticos como biossensores	38
1.6.1	Conjugados de pontos quânticos com benzofenoxazinas	39
Capítulo 2 – Técnicas e Procedimentos Experimentais		42
2.1	A radiação electromagnética	42
2.2	Espectroscopia electrónica molecular	43
2.2.1	Absorção no UV-Visível	44

2.2.1.1	Espectrofotômetro	46
2.2.2	Fluorescência e transferência de energia	47
2.2.2.1	Espectrofluorímetro	48
2.2.3	Microscopia de Fluorescência	49
2.3	Procedimento experimental na síntese dos nanossistemas	51
2.3.1	Síntese dos núcleos de CdSe	51
2.3.2	Síntese da coroa de ZnS	53
2.3.3	Lavagem e mudança de solvente	54
2.3.4	Conjugação dos pontos quânticos	55
2.3.4.1	Cálculo da concentração e do diâmetro dos pontos quânticos	56
2.4	Ensaio biológicos	56
2.4.1	Obtenção dos esferoplastos	57
2.4.2	Incorporação dos pontos quânticos nas células	57
2.5	Monitorização da transformação de NADH em NAD⁺	58
2.5.1	Ensaio com pontos quânticos conjugados	59
2.5.2	Ensaio com benzofenoxazina	59
2.6	Dependência da concentração de Iodeto e Acrilamina	61
Capítulo 3 – Resultados e discussão		62
3.1	Síntese dos núcleos CdSe	62
3.1.1	Efeito da variação de alguns parâmetros	62
3.1.2	Temperatura	63
3.1.3	Sonificação	64

3.1.4	Posição do frasco	64
3.1.5	Tempo de reacção	65
3.1.6	Variação de ω_0	66
3.2	Síntese da coroa de ZnS	67
3.2.1	Influência da razão CdSe:ZnS	67
3.2.2	Ensaio de fluorescência com pontos quânticos	70
3.2.2.1	Lavagem e mudança de solvente	70
3.3	Benzofenoxazina	71
3.4	Conjugação dos pontos quânticos	73
3.4.1	Ensaio dos nanossistemas conjugados com NADH	78
3.4.2	Ensaio dos nanossistemas conjugados com Iodeto e Acrilamida	81
3.5	Ensaio biológico	84
3.5.1	Pontos quânticos nas células inteiras e em esferoplastos em	84
3.5.2	Influência das condições de incubação e da preparação de esferoplastos na incorporação dos pontos quânticos	88
	Capítulo 4 – Conclusões	94
	Bibliografia	98

Capítulo 1 - Introdução

As nanociências, também aplicadas à biologia, estão a avançar notavelmente no desenvolvimento de sistemas capazes de integrar um conjunto alargado de aplicações. Num só nanossistema, caminha-se para a conjugação simultânea de múltiplas funções, entre as quais visualização/monitorização, diagnóstico e atuação/tratamento, tudo isto ao nível celular ou sub-celular. Quando uma estrutura material criada à escala nanoscópica integra componentes biológicos, ou quando é concebida para interagir com sistemas vivos, a essa estrutura chamá-la-emos *bionanossistema*.

Uma importante característica do mundo físico está a ser explorada pelas bionanotecnologias, em parte devido à sua versatilidade e ubiquidade: a interação entre a matéria e a luz. A marcação de matéria biológica como aminoácidos, proteínas, células específicas ou vírus com fluoróforos sintéticos tornou-se uma ferramenta indispensável nas técnicas bioanalíticas. As suas aplicações vão desde ensaios imunológicos e sensores biocatalíticos, a análises de alto débito como a citometria de fluxo. Esta grande abrangência do uso de sondas fluorescentes deve-se à notória sensibilidade dos detetores de fluorescência que podem chegar ao nível da deteção de uma só molécula, para o caso de técnicas baseadas em laser.

A imagiologia fluorescente no intervalo entre 600 e 1000 nm do espectro é particularmente interessante (comparada com a UV e a parte visível de altas frequências), uma vez que as biomoléculas se mostram nessa zona com uma menor fluorescência de fundo, assim como porque maiores comprimentos de onda conseguem penetrar a maiores profundidades nos tecidos [1]. Além disso, do lado dos lasers, díodos de luz verde, amarela e vermelha são fontes preferíveis pelos seus baixo custo e tamanho compacto. Entre estas sondas de longo comprimento de onda estão as benzofenoxazinas, usadas para este trabalho, cujo uso é atrativo por uma conjugação de fatores, descritos mais à frente na secção 1.2.

Uma alternativa a moléculas fluorescentes – geralmente chamadas de fluoróforos, que é apenas a parte da molécula responsável pela fluorescência – para o

estudo de mecanismos biológicos tem vindo a ser desenvolvida nos últimos anos, graças aos avanços da nanotecnologia – os Pontos Quânticos (**figura 1.1**).

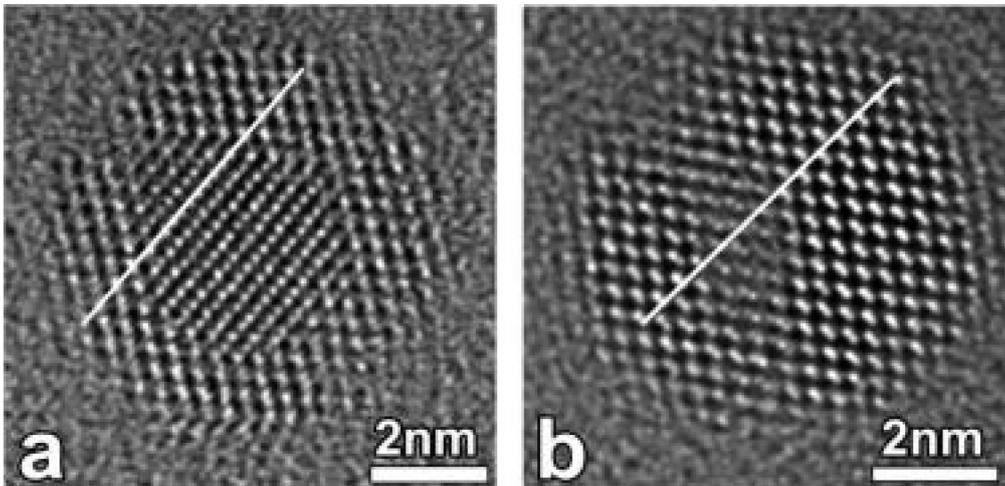


Figura 1.1 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de pontos quânticos núcleo/coroa (PbTe/CdTe), com cerca de 5 nm de diâmetro. [2]

Os pontos quânticos são estruturas obtidas através um material semiconductor com tamanho de poucos nanómetros, geralmente de 2 a 10 nm (**figura 1.1**). Esta é a escala de tamanhos em que prevalecem as leis da mecânica quântica e da qual emergem um conjunto que novos efeitos físicos. Se, por um lado, as Leis Fundamentais da Física podem ser postas à prova, por outro surge um enorme leque de aplicações.

As propriedades dos pontos quânticos e as suas possíveis aplicações dependem grandemente do método por que são obtidos, que por sua vez podem ser usados como critério de classificação [3]:

- **Pontos quânticos electrostáticos:** fabricados através da restrição de um gás eletrónico bidimensional numa heteroestrutura semicondutora, confinando os eletrões.
- **Pontos quânticos auto-organizados¹:** obtidos pelo crescimento heteroepitaxial de materiais com diferentes coeficientes de rede. Durante o crescimento da camada de um material sobre a de outro, formam-se *ilhas* nanoscópicas que causam um confinamento acentuado dos eletrões nessa zona.

¹ do inglês “self-assembled quantum dots”.

- **Pontos quânticos nanocristalinos:** estes são os sistemas de interesse para este trabalho. Constituídos por um núcleo de metais pesados como seleneto de cádmio (CdSe), estas nanopartículas, também chamadas pontos quânticos coloidais, são sintetizadas por via química. As suas propriedades principais, que incluem um alto rendimento quântico de fluorescência, serão aprofundadas mais à frente neste capítulo.

Devido ao largo espectro de absorção destas partículas, aliadas à estreita banda de emissão, é possível obterem-se processos eficientes de transferência de energia entre os pontos quânticos (como doadores) e outras moléculas fluorescentes (como aceptadores) [4]. Para isso, contribui uma sobreposição do espectro de emissão dos nanocristais com o espectro de absorção das benzofenoxazinas. Isto poderia servir para a criação de um sensor intracelular, que consoante o ambiente na proximidade do sistema, permitisse detetar uma alteração da transferência de energia.

Os bionanossistemas, construídos com capacidade de interação localizada com componentes biológicos, têm contribuído de forma crescente para diferentes áreas da biologia celular. Além das vantagens evidentes em termos biomédicos, a sua aplicação permite também uma maior compreensão dos fenómenos e mecanismos nos seres vivos a nível molecular, que de outra forma não seria atingida.

Os lipossomas [5, 6], lipoplexos [7, 8], dendrímeros [9, 10], nanopartículas metálicas [11], nanopartículas magnéticas [12], grafeno e nanotubos de carbono [13], além dos pontos quânticos, são algumas classes de nanossistemas com estudos publicados. Para a utilização eficiente em organismos vivos, foram deduzidos os seguintes critérios [5]:

- Não tóxicos a componentes celulares ou organismo vivo;
- Biodegradáveis após o desempenho da sua função;
- Biocompatíveis;
- Optimização estrutural aos menores custos: desde a síntese, caracterização e custo ambiental;

- Possibilidade de integração e funcionalização destes sistemas com moléculas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, que facilitem ou permitam a interação nanossistema-componente celular;
- Encapsulamento e preservação de substâncias (drogas, fármacos, enzimas, material genético);
- Libertação/atuação controlada no local pretendido.

Com vista a que no futuro se possam realizar estudos em animais, nomeadamente mamíferos ou mesmo humanos, há um conjunto de fatores que devem ser tomados em conta ainda nesta fase de síntese e caracterização. Quando um bionanossistema é aplicado *in vivo* – por via intravenosa, tópica ou outra – encontra no seu percurso funcional, e posteriormente até ser expelido do corpo, um conjunto de obstáculos e tarefas para os quais tem que ir preparado. Apenas os agentes que possuam características que o sistema imunitário considera como próprias, terão alguma possibilidade de sobreviver neste meio.

Uma vez no sistema circulatório, aqueles sistemas têm que se comportar de forma a não serem reconhecidos pelo sistema imunitário como prejudiciais, não devem agregar-se em estruturas maiores e têm que manter a sua estabilidade funcional. Depois, uma vez que ficam em suspensão no sangue e, por isso mesmo, espalhados por todo o corpo, os nanossistemas com especificidade para certos tipos de células endoteliais irão permear preferivelmente aquelas zonas em que são necessárias.

Para a internalização destas partículas em células, *in vitro* ou *in vivo*, conjuga-se a superfície do nanossistema com biomoléculas (e.g. proteínas, péptidos), tornando-o “invisível” ao sistema imunitário ou facilitando a endocitose mediada por recetores e conseqüente transporte até ao interior das células. Desta forma, pontos quânticos bioconjugados são nanossistemas susceptíveis de serem usados como sensores, em visualização, diagnóstico e em tratamento localizado [14, 15].

A endocitose destes bionanossistemas pode ocorrer por duas formas: adsorção e mediada por recetores [16]. O primeiro caso é comum para partículas com diâmetro reduzido, assim como para aquelas que são catiónicas - como geralmente são, por exemplo, os lipoplexos - uma vez que as cargas negativas à superfície das células as

atraem e facilitam o movimento através das membranas plasmáticas. Este processo, porém, carece de especificidade. Se por um lado a carga negativa pode atrair o sistema à superfície da célula, aumentando a possibilidade de internalização que as cargas opostas, isso facilita a aproximação a *todas* as células, o que pode tornar-se uma desvantagem, fazendo com que seja necessária uma maior concentração de sistemas para o mesmo efeito.

No transporte mediado por recetores, geralmente mais específico que o anterior, enquadra-se o transporte de vesículas ou nanossistemas funcionalizados adequadamente. Quando um ligando interage com o seu recetor específico na membrana da célula, o processo de endocitose é desencadeado e a invaginação membranar leva à criação de vesículas de transporte intracelular, nas quais podem ser transportados bionanossistemas [17].

Uma vez dentro da célula, os bionanossistemas podem cumprir uma ou mais tarefas, como desencadear a morte celular, libertar fármacos ou activar/inibir algum processo biofísico, para dar alguns exemplos.

O objectivo para esta tese de mestrado foi o de sintetizar nanopartículas deste tipo – pontos quânticos nanocristalinos –, conjugando-as com benzofenoxazinas à superfície, para com estes bionanossistemas realizar estudos de fluorescência e ensaios biológicos na *Saccharomyces cerevisiae*. A realização de ensaios em microorganismos permite estudar um conjunto de fatores cujas conclusões podem ser alargadas a muitos outros seres vivos, dada a semelhança entre a composição e processos biofísicos em todos os seres vivos conhecidos.

Para a exposição deste trabalho dividiu-se a dissertação em três partes principais: introdução, técnicas experimentais e resultados. No primeiro capítulo estão presentes o estado da arte relativamente aos pontos quânticos e à benzofenoxazina, assim como à conjugação de pontos quânticos para o desenvolvimento de biossensores. No segundo capítulo reúnem-se as informações relativas às técnicas experimentais utilizadas para esta tese. Por fim, reunir-se-á os resultados, far-se-á uma discussão geral destes e apresentar-se-á as principais conclusões.

1.1. Pontos Quânticos

Um processo de síntese de pontos quânticos de PbS foi desenvolvido há mais de 2000 anos, usando materiais naturais como PbO, Ca(OH)₂ e água [18]. Mais recentemente, a primeira aplicação documentada de pontos quânticos remonta a 1932, com a introdução de semicondutores de seleneto de cádmio (CdSe) e sulfureto de cádmio (CdS) em vidros de modo a colorí-los [19]. Em 1985 Ekimov et al. desenvolveram o modelo teórico e provaram experimentalmente que aquelas mudanças de cor se devem à densidade de estados eletrónicos determinada pelo tamanho do material cristalino [20].

O desenvolvimento de nanocristais semicondutores biocompatíveis para imagiologia e terapia localizada é uma área que tem beneficiado das notáveis características que a matéria adquire à nanoescala [21]. Na secção seguinte descreve-se alguma da física associada aos pontos quânticos.

1.1.1. Propriedades estruturais: a quântica dos pontos

Os semicondutores – dos quais são fabricados os pontos quânticos – são materiais cuja condutividade eléctrica se situa entre a dos isoladores (maus condutores) e a dos metais (bons condutores).

Com uma banda de valência totalmente preenchida por eletrões e uma banda de condução vazia, nestes materiais a separação entre estas duas bandas de energia é

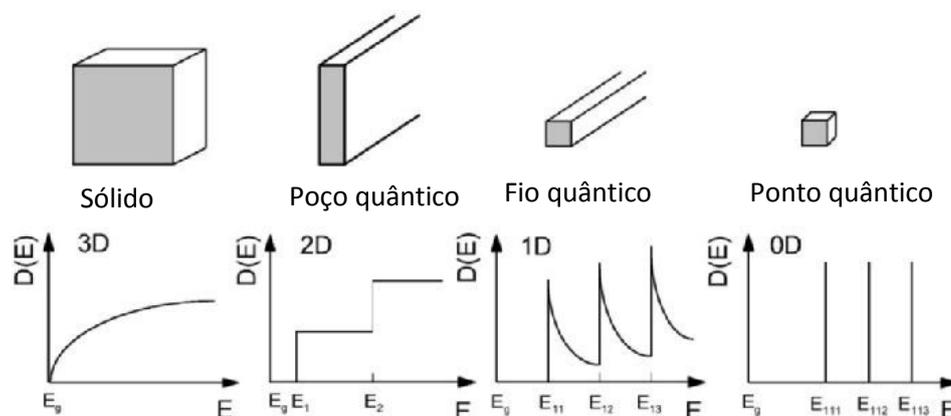


Figura 1.1.1 – Densidade de estados numa banda de um semicondutor como função da sua dimensão.

da ordem de 1eV, ficando o nível de Fermi entre elas. Por isso se podem situar estes sistemas entre as propriedades próprias de uma molécula e as de um sólido. Então, as propriedades optoelectrónicas destes sistemas advêm da combinação entre o material e a dimensionalidade, frequentemente referida como “confinamento quântico” [22, 23]. Uma revisão das propriedades electrónicas, ópticas e de luminescência de sistemas desta dimensão, assim como algumas das suas aplicações, pode ser encontrada nas referências [24], [25] e [26].

1.1.1.1. Estrutura do núcleo nanocristalino

Devido às propriedades referidas, quando os semicondutores são nanocristalinos, importantes efeitos físicos tornam-se muito dependentes das suas propriedades intrínsecas, tais como o tamanho, forma, composição, defeitos, impurezas e cristalinidade da partícula [25, 27]. As energias associadas à excitação óptica e ao transporte electrónico tornam-se assim controláveis durante a síntese.

À medida que o tamanho da partícula aumenta, a excitação electrónica desvia-se para uma menor energia. Por exemplo, o *hiato de energia*² no CdSe pode variar desde o verde (2.4 eV) até ao vermelho longínquo (1.7 eV) aumentando o diâmetro da partícula de 2 para 20 nm [28].

O fenómeno associado a este efeito é o confinamento quântico dos electrões, do qual resulta uma modificação da densidade de estados nas bordas das bandas [25]. Isto faz com que os nanocristais semicondutores tenham propriedades que se situam entre um átomo isolado e um material sólido contínuo.

O confinamento é observado quando o tamanho da partícula é suficientemente pequeno para que o espaçamento energético entre a banda de condução e a de valência exceda kT (onde k é a constante de *Boltzmann* e T é a temperatura) [21]. Diferenças de energia maiores que kT restringem a mobilidade dos pares electrão-lacuna dentro do cristal.

Como resultado do confinamento quântico de electrões e lacunas dentro do semicondutor, as mudanças de densidade de estados electrónicos causam a sua fluorescência com elevado rendimento quântico.

² do inglês “bandgap”.

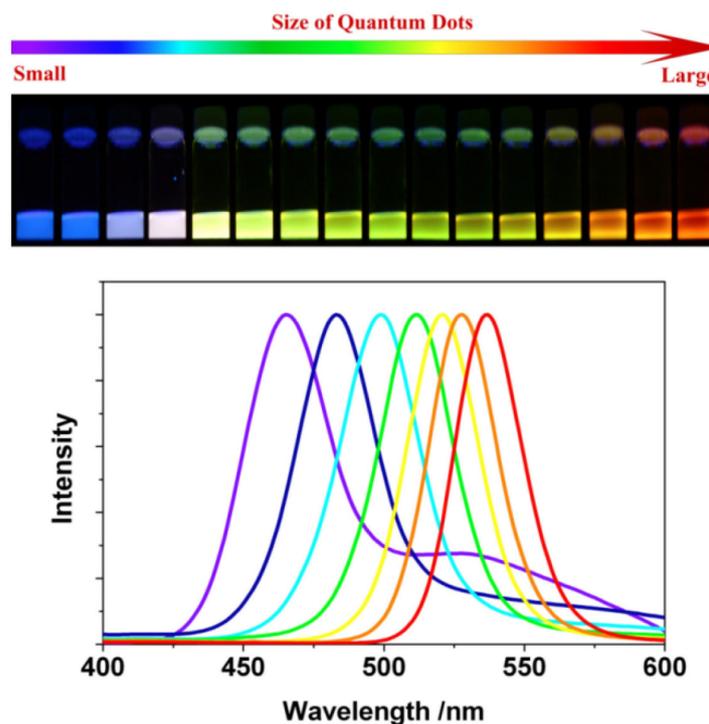


Figura 1.1.2 – Cor de núcleos de pontos quânticos de diferentes tamanhos, sucessivamente maiores da esquerda para a direita (em cima). Espectros de emissão de fluorescência dos mesmos pontos quânticos [21].

A analogia com o modelo de uma “partícula numa caixa”, apesar de não explicar totalmente a complexidade do processo, é útil à sua compreensão. Para uma partícula localizada, como é o caso dos pares elétron-lacuna dentro do ponto quântico excitado, apesar de a energia poder ser bem definida, o momento não o pode ser. Assim, os níveis discretos de energia de uma nanopartícula podem ser descritos como o resultado da sobreposição dos estados do momento do material sólido [27]. Isto faz que transições que ocorriam a energias ligeiramente diferentes sejam condensadas, pelo confinamento quântico, numa só e mais intensa transição num nanocristal.

1.1.1.2. Estrutura da superfície

Outro importante factor é que as propriedades óticas e elétricas de um material semiconductor são influenciadas pela grande quantidade de átomos que se encontram à superfície [27, 29]. Muito frequentemente ocorrem reconstruções na posição atómica superficial, cujos defeitos produzidos – num material com elevada razão superfície/volume – levam níveis energéticos para a zona proibida aos eletrões e assim degradam as suas propriedades. As causas destas alterações variam com a

estequiometria, espaços vazios e condições de síntese. A passivação é o processo químico pelo qual os átomos à superfície se ligam a um outro material. Quando este material é semicondutor, ele tem normalmente uma banda proibida mais larga, eliminando assim os níveis dentro do hiato de energia [30]. O objectivo é isto resultar num melhoramento, por exemplo, do rendimento quântico de fluorescência [31].

1.1.1.3. Passivação da superfície

Como discutido acima, os defeitos à superfície dos pontos quânticos *aprisionam* os electrões, as lacunas ou os excitões³, diminuindo a recombinação radiativa e reduzindo o rendimento quântico. Por essa razão, cobrir ou passivar a superfície é crucial para o desenvolvimento de pontos quânticos fotoestáveis. Idealmente, uma superfície perfeitamente passivada tem todas as ligações saturadas e, conseqüentemente, todos os estados próximos das bordas das bandas se encontram confinados quanticamente.

Então, a modificação da superfície dos pontos quânticos é essencial. Para este fim, o processo de passivação é geralmente levado a cabo pela deposição de uma camada, coroa ou capa – orgânica ou inorgânica – na superfície do nanocristal.

1.1.1.3.1. Passivação com camada orgânica

Pontos quânticos são frequentemente fabricados com a introdução de moléculas orgânicas que se adsorvem na superfície e funcionam como capas [32-34]. Algumas vantagens incluem a possibilidade de bioconjugação e a obtenção de suspensões coloidais monodispersas.

Geralmente, os ligandos mais usados são os fosfenos (e.g. óxido de tri-n-octilfosfina – TOPO) e os mercaptanos (-SH) [21]. Nestes casos, as ligações das moléculas à superfície da partícula são fracas o suficiente para serem quebradas sob luz ultravioleta e levar à falha da passivação.

Com vista à solubilização de pontos quânticos em água, em simultâneo com a passivação, foi já usada albumina do soro bovino (BSA) [35]. Deste modo, melhorou-se a estabilidade química e o rendimento quântico de fotoluminescência das partículas.

³ par electrão-lacuna ligado.

Também se passivou pontos quânticos com DNA, reportados como não-tóxicos e estáveis em sistemas biológicos [36].

1.1.1.3.2. Passivação com camada inorgânica

Como referido na secção 1.1.2., a passivação do ponto quântico é geralmente levada a cabo com uma camada de um material com maior hiato de energia, de modo a que os excitões fiquem confinados no núcleo. Mas além da diferença entre hiatos de energia, também a estrutura cristalina dos materiais é um fator considerável no momento de decidir a ordem da síntese dos pontos quânticos.

Para este fim, uma das combinações mais usada é entre CdSe e ZnS [4, 31, 37], sendo também comum CdTe [35], CdS e ZnSe [28, 36]. Apesar de ambos os materiais, CdSe e ZnS, terem estruturas tetraedricamente coordenadas, as suas constantes de rede cristalina são de 6.08 Å e 5.40 Å, respectivamente. A diferença entre os parâmetros de rede do CdSe e do ZnS (10.6%) é maior que entre CdSe e ZnSe (6.3%) e que entre CdSe e CdS (3.9%), o que dificulta, comparativamente, o crescimento epitaxial e a ausência de defeitos e tensões nas ligações [21]. No entanto, o CdSe tem um hiato de energia de cerca de 2eV e o ZnS tem cerca 3.2eV [37] – uma diferença maior do que no caso dos outros materiais – fator que melhora a passivação e o confinamento quântico.

A diferença entre o comprimento das ligações interatómicas faz com que o crescimento de uma camada à volta de um núcleo não resulte num crescimento epitaxial sem tensões. Este factor contribui para que seja mais difícil o crescimento de uma coroa de CdSe num núcleo de ZnS do que o contrário, uma vez que os átomos de Cd e de Se ficariam “em esforço”, ou então criar-se-iam defeitos na cobertura do núcleo, deixando ligações por preencher. Os átomos de Cd e de Se prefeririam assim criar outros núcleos, levando a uma heterogeneidade de sistemas durante uma mesma síntese. Por estas razões, é comum a preferência por uma passivação de núcleos de CdSe com uma coroa de ZnS, tal como se fez na parte laboratorial deste trabalho.

Para uma melhor passivação, o material da coroa deverá ter um parâmetro de rede com até cerca de 12% de diferença de modo a facilitar a epitaxia e a minimizar os defeitos e tensões [38]. A adaptação das constantes de rede na interface entre os dois

materiais contribui para um desvio para o vermelho do espectro de emissão após a passivação, além de um aumento do rendimento quântico de fluorescência [31, 39].

Outro importante fator a considerar é se a coroa resultará numa superfície hidrofóbica ou hidrofílica. Para aplicações biológicas dos pontos quânticos é recomendável uma cobertura compatível com a água, como a sílica [40], mas a qual pode ser obtida também com outros processos de funcionalização, adicionais à passivação [16, 23]. Isto será explorado mais aprofundadamente na secção 1.3.

Apesar da melhoria significativa observada após a passivação com uma camada inorgânica, existem na literatura evidências de que o processo é frequentemente imperfeito. Tais passivações incompletas causam diferentes resultados como (a) menores rendimentos quânticos que com passivação completa [41], (b) uma quantidade significativa de pontos quânticos não-fluorescentes [41], (c) foto-oxidação dos núcleos ou da coroa [42] e (d) flutuação da intensidade dos pontos quânticos núcleo/corona devido ao aprisionamento de cargas pelos estados de superfície [43], tal como acontece com as partículas não-passivadas.

1.1.2. Propriedades de luminescência

Quando a energia do fóton absorvido por um ponto quântico é maior que a menor transição excitónica (pelo menos do tamanho do hiato de energia), os electrões e lacunas (geralmente, sob a forma de excitações) são gerados com um excesso de energia, ao qual se chama frequentemente de energia cinética [44-46]. Este excesso de energia pode ser dissipado sob vários processos: (1) dissipação por calor através de interações electrão-fonão ou processos Auger até ao nível excitado mais baixo [45]; (2) um segundo excitação pode ser criado se a energia em excesso for maior que o hiato de energia [46]; e (3) os electrões e as lacunas podem separar-se e o excesso de energia pode ser convertido em energia eléctrica pelo efeito fotovoltaico [46]. O electrão e a lacuna podem então recombinar-se e relaxar para estados de energia mais baixos até ao estado fundamental. O excesso de energia deste processo pode ser libertado por vias radiactivas (emissão de fóton) ou não-radiativas (emissão de fonões).

A emissão de radiação fluorescente ocorre aquando das recombinações de eletrões e lacunas a partir das bordas das respectivas bandas, ou seja, do estado excitado energeticamente mais baixo. Todo este processo, desde a excitação até ao regresso ao estado fundamental, tem um tempo de vida que depende de vários fatores, entre os quais se encontra o tipo de material, a temperatura e também o tamanho. Por exemplo, o tempo de vida de fluorescência de pontos quânticos CdSe de 3.2 nm pode ser de $\sim 1 \mu\text{s}$ a 10K, enquanto em sólido esse tempo é de $\sim 1\text{ns}$ [47, 48].

1.1.2.1. Dependência do tamanho

A excitação dos pontos quânticos por uma fonte de energia externa cria pares eletrão-lacuna devido à transição do eletrão do estado fundamental para um estado excitado. As energias associadas com estas absorções óticas são diretamente determinadas pela estrutura eletrónica do material. O par eletrão-lacuna excitado pode ligar-se e levar à criação de um excitão, cuja energia depende do tamanho da partícula, como discutido acima.

Um nanocristal com menor volume tem um maior hiato de energia entre a banda de valência completamente preenchida – onde se forma a lacuna aquando da excitação – e a banda de condução do eletrão excitado. A recombinação de um eletrão excitado na banda de condução com uma lacuna na banda de valência liberta uma energia dependente do tamanho do hiato de energia. Por isso se podem tirar conclusões acerca do tamanho médio dos pontos quânticos a partir da frequência do pico de emissão de fluorescência [49].

Também no que concerne ao rendimento quântico de fluorescência, foi descrita uma dependência do mesmo em função do pico de emissão, e consequentemente em função do tamanho. Foram sintetizados pontos quânticos de vários tamanhos através do controlo do tempo de reação [50]. Como é visível na **figura 1.1.3**, o máximo de rendimento quântico de fluorescência corresponde às partículas cujo pico de emissão se situa nos 610 nm.

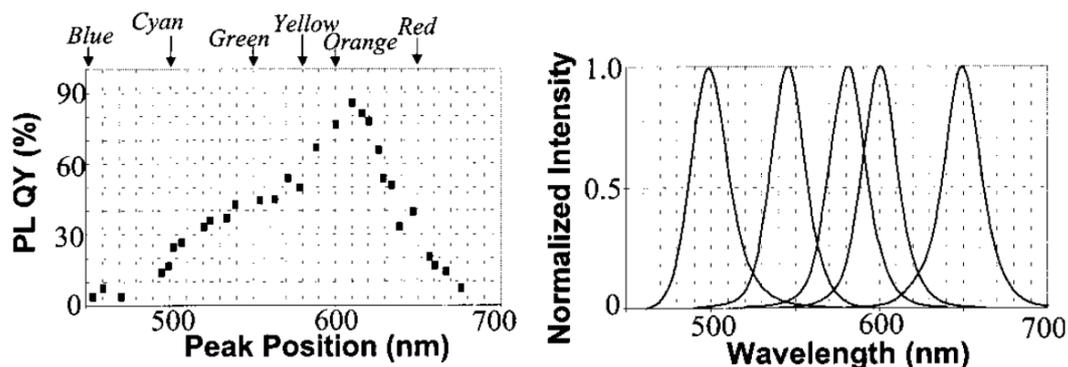


Figura 1.1.3 – Rendimento quântico de nanocristais CdSe com diferentes tamanhos em função do pico de emissão (à esquerda), e espectros de emissão de fluorescência dos mesmos nanocristais com diferentes posições de emissão (à direita). [50]

1.1.2.2. Intermitência dos pontos quânticos

Como já foi mencionado atrás, os pontos quânticos têm um conjunto de vantagens relativamente aos compostos orgânicos, como elevada fotoestabilidade, larga banda de absorção e estreita e controlável banda de emissão. No entanto, frequentemente os pontos quânticos apresentam também uma luminescência intermitente, ou seja, períodos de luminescência intercalados com períodos escuros. Vários modelos têm sido apresentados, sem contudo se chegarem a conclusões definitivas. Está descrito que existe um conjunto de fatores que contribuem para o fenómeno, nomeadamente que a ionização fotoinduzida resulta em pontos quânticos carregados que levam à separação dos eletrões e lacunas [43]. Os períodos escuros teriam portanto o tempo de vida da ionização. Mas outros estudos verificaram tempos de intermitência distintos dos descritos em [43], pelo que outros fatores foram adicionalmente propostos [51-54], como a ionização activada termicamente, efeito de túnel eletrónico através de barreiras flutuantes ou efeito de túnel de eletrões pela ressonância entre estados excitados de pontos quânticos e os estados escuros que variam ao acaso na energia.

1.1.2.3. Emissão dos defeitos

A radiação emitida pelos pontos quânticos pode também vir de impurezas localizadas ou de estados quânticos ativados no hiato de energia. A estes estados

costuma chamar-se *defeitos*⁴ [52]. Os defeitos podem comportar-se como dadores ou aceitadores, dependendo de terem excesso ou déficit de eletrões, e fazem com que lacunas ou eletrões sejam atraídos e aprisionados nesses estados por atracção *Colombiana* [55]. A luminescência destes níveis defeituosos pode ser usada para determinar as suas energias e a sua concentração é proporcional à sua intensidade.

Os estados de superfície aprisionam portadores de cargas e excitações, o que geralmente degrada as propriedades óticas e elétricas das partículas, quer aumentando a quantidade de relaxamento não-radiativo, quer levando a espectros de emissão assimétricos e incharacterísticos de pontos quânticos, como veremos nos resultados. São sempre esperados defeitos à superfície do ponto quântico, apesar dos vários métodos de passivação que pretendem eliminá-los, dada a elevada razão área de superfície/volume. Contudo, a concentração de estados de superfície pode ser controlada através dos processos de síntese e da passivação.

Foram estudados os defeitos em pontos quânticos de vários tamanhos, chegando-se à conclusão que a sua menor incidência ocorre para tamanhos médios (~3.5nm), enquanto que em pontos quânticos menores e maiores que tal tamanho, a influência dos defeitos é maior [56]. Isto foi explicado afirmando que, em pontos quânticos pequenos, o tempo de reação é demasiado curto para uniformizar o crescimento da partícula. Também a quantidade de átomos à superfície, por unidade de volume, é maior para partículas mais pequenas, pelo que a mesma quantidade de defeitos tem uma maior importância.

Como o crescimento das partículas está directamente ligado ao tempo de reação, as partículas de tamanho médio têm mais tempo para corrigir os defeitos de superfície e de estreitar a distribuição de tamanhos [57]. Por fim, as partículas maiores podem formar-se com a contribuição de outros processos, como a união de vários dos cristais mais pequenos que se incorporam em pontos quânticos maiores. Pelo facto de a união se processar através de superfícies defeituosas, típicas das partículas mais pequenas [58], o mesmo vai ocorrer para as partículas grandes resultantes, ficando também com um maior número de defeitos.

⁴ do inglês “*defect states*”.

1.1.2.4. Efeito da passivação

Centrando-nos no caso de pontos quânticos fabricados com CdSe (núcleo) e ZnS (coroa) – os materiais usados nas experiências laboratoriais desta tese –, foram estudadas as propriedades óticas em função dos tamanhos relativos do núcleo e da coroa [31].

Foram apresentados os resultados para pontos quânticos CdSe/ZnS núcleo coroa de vários tamanhos, reproduzidos nas **figuras 1.1.4 e 1.1.5**. O aumento do tamanho dos núcleos fez variar o comprimento de onda do pico de emissão entre os 470nm (nanocristais de 23 Å) e os 620 nm (nanocristais de 55Å).

A **figura 1.1.4** mostra os espectros de absorção dos pontos de CdSe com diâmetros entre 23 e 55 Å antes e depois de adição da camada de ZnS, com entre 1 e 2 monocamadas de espessura. A monocamada foi definida como uma coroa de 3.1Å [31]. Observou-se um pequeno desvio para o vermelho depois da cobertura, explicada por um deslocamento do excitão para a matriz do ZnS. O desvio para o vermelho é mais acentuado nos nanocristais mais pequenos devido ao aumento do efeito de confinamento quântico dos portadores de carga. A **figura 1.1.5** mostra os espectros de

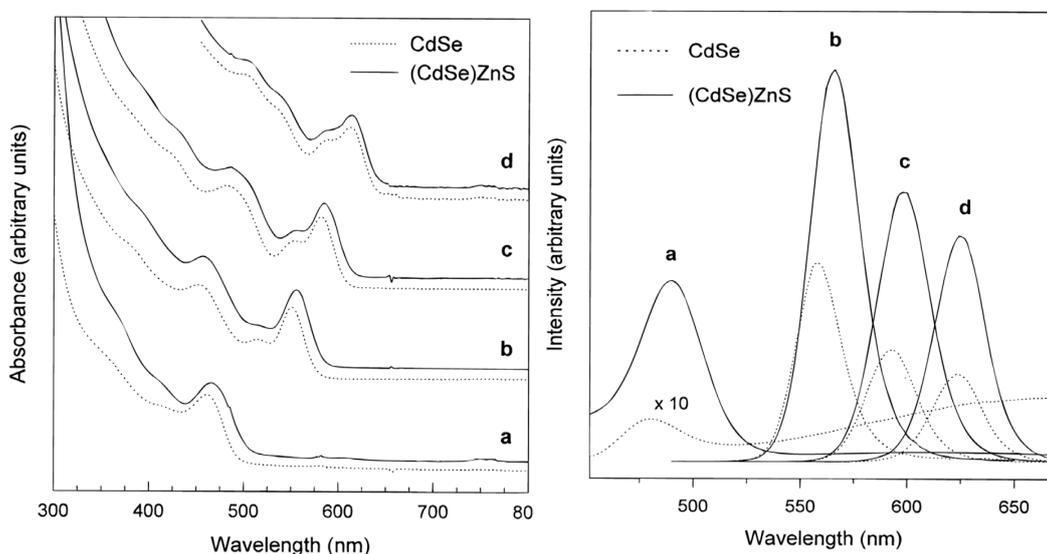


Figura 1.1.4 (à esquerda) – Espectros de absorção para os núcleos (linhas pontuadas) e núcleos/coróa (linhas cheias) com distintos diâmetros: (a) 23; (b) 42; (c) 48; (d) 55 Å. Os espectros de absorção para as partículas passivadas são mais largos e estão desviados para o vermelho relativamente à absorção dos núcleos. [31]

Figura 1.1.5 (à direita) – Espectros de emissão para os núcleos (linhas pontuadas) e núcleos/coróa (linhas cheias) com distintos diâmetros: (a) 23; (b) 42; (c) 48; (d) 55 Å. Os espectros de emissão das partículas passivadas são muito mais intensos devido a um muito maior rendimento quântico: (a) 40, (b) 50, (c) 35 e (d) 30 %. [31]

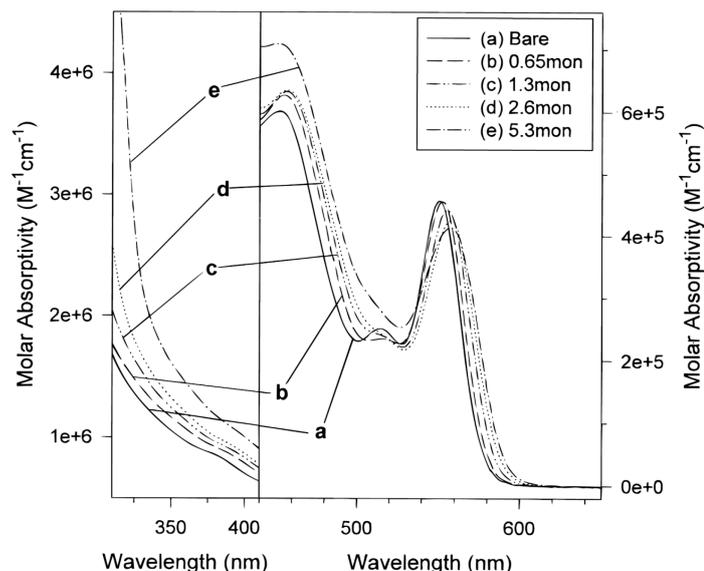


Figura 1.1.6 – Espectros de absorção para uma série de núcleos CdSe com 42 Å cobertos com diferentes espessuras de ZnS: (a) apenas cobertos com TOPO, (b) 0.65 monocamadas, (c) 1.3, (d) 2.6, e (e) 5.3. O lado direito mostra a zona de maiores comprimentos de onda e as menores transições energética. Os espectros demonstram um desvio para o vermelho maior para as camadas mais espessas, assim como um alargamento do primeiro pico de emissão como resultado do aumento da polidispersividade. O lado esquerdo evidencia a região onde o aumento da absorção para as energias mais altas com o aumento da espessura da coroa se deve à absorção directa do ZnS. [31]

fotoluminescência à temperatura ambiente das mesmas amostras, antes e depois da cobertura do núcleo de CdSe com ZnS. Os rendimentos quânticos aumentaram de 5 a 15% para os pontos não-cobertos para valores entre 30 a 50% dos nanocristais passivados.

Outra parte do mesmo estudo relata a evolução espectral que várias espessuras de camadas de ZnS fazem sobre núcleos com o mesmo tamanho. Na **figura 1.1.6** estão presentes os espectros de absorção que demonstram que os aumentos espessura da coroa levam a um maior desvio para o vermelho e também a um aumento da intensidade de absorção nas energias mais elevadas, devido a absorção directa do ZnS. A variação dos espectros de emissão dos mesmos pontos quântico CdSe com ~40 Å de diâmetro com diferentes espessuras de coroa ZnS está visível na **figura 1.1.7**. Existe inicialmente um incremento abrupto do rendimento quântico com a criação da camada de ZnS sobre o CdSe, seguido de uma descida estável do mesmo parâmetro com o crescimento da coroa depois de ~1.3 monocamadas de ZnS. Os espectros são, da forma, desviados para o vermelho e acompanha-os um alargamento

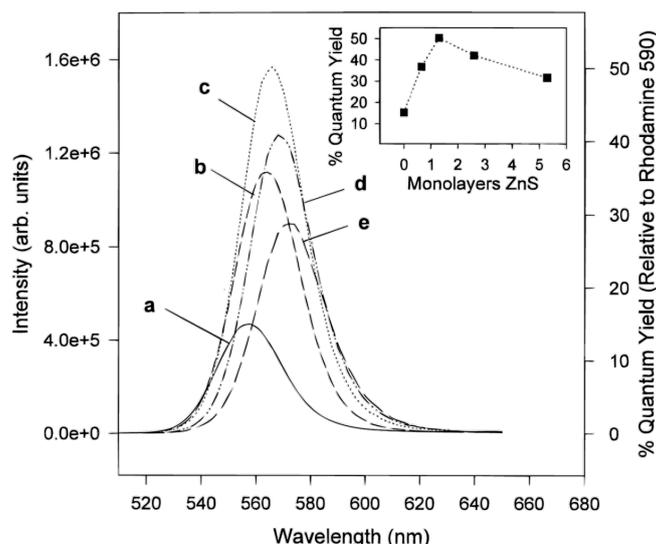


Figura 1.1.7 – Espectros de emissão dos mesmos pontos quântico CdSe com 42 Å de diâmetro com diferentes espessuras de coroa ZnS. Os espectros correspondem a coroas de espessura: (a) 0, (b) 0.65, (c) 1.3, (d) 2.6, (e) 5.3 monomonocamadas de ZnS. A posição do máximo de emissão desvia para o vermelho e o espectro alarga com o aumento da espessura. Inset: o rendimento quântico em função da quantidade de monocamadas, aumentando em 50% no máximo 1.3. [31]

da largura a meia altura. Temos então um aumento máximo de 50% do rendimento quântico a aproximadamente 1.3 monocamadas de cobertura.

1.1.3. Síntese de pontos quânticos

São várias as vias pelas quais se sintetizam pontos quânticos. Iremos abordar os processos para a obtenção de pontos quânticos, de uma forma geral, e aprofundar aqueles usados para o desenvolvimento laboratorial desta tese na síntese de pontos quânticos coloidais.

A síntese de nanocristais é um processo complexo e portanto existe uma vasta gama de técnicas disponíveis para produzir os diferentes tipos de partículas. Por esta razão não se consegue fazer uma generalização que enquadre todas as técnicas utilizadas. Ainda assim, geralmente, podem dividir-se as técnicas para a síntese de pontos quânticos em duas categorias, segundo a abordagem (i) *top-down* ou (ii) *bottom-up* [59]. No que se refere a pontos quânticos coloidais, também se podem categorizar as técnicas em três grupos principais: (1) condensação por vapor, (2) processos de estado sólido e (3) síntese por reação química.

Inicialmente, os investigadores estudaram nanopartículas homogêneas, de um só material, de modo a descobrir as propriedades que emergem quando a matéria é trabalhada à escala nanoscópica. Depois, no fim dos anos 80, os investigadores perceberam que materiais compósitos, heterogêneos ou em camadas, criam partículas coloidais semicondutoras que demonstram mais eficiência que as correspondentes partículas simples; em alguns casos, elas até desenvolveram novas propriedades [60-62]. Mais recentemente, durante os anos 90, os investigadores sintetizaram nanopartículas em multicamadas concêntricas de semicondutores com o objectivo de melhorar as propriedades das partículas semicondutoras. Só então foi adoptada a terminologia núcleo/coroa⁵ [63-65].

Em seguida, discutiremos brevemente estas abordagens.

1.1.3.1. Processos *top-down* de síntese

Na abordagem *top-down*, um semiconductor sólido é desbastado para formar pontos quânticos. Litografia de feixe de electrões (EBL⁶), corrosão por iões reactivos (RIE⁷) ou corrosão química em solução (WCE⁸) são frequentemente usados para esta finalidade [66-69]. Formas e tamanhos controláveis são, deste modo, obtidos para experiências sobre o efeito de confinamento quântico. Estas técnicas também são usadas para a obtenção de matrizes de pontos quânticos em substratos variáveis. Uma destas técnicas de síntese *top-down* é de seguida explicada resumidamente.

A técnica RIE foi usada para fabricar uma matriz de pontos quânticos de InGaN bem localizados, com grande uniformidade e luminescência à temperatura ambiente [70]. Depois do crescimento epitaxial de uma camada de 1.5 μm de GaN sobre um substrato de safira, foi então depositada outra camada de InGaN com 3 nm de espessura. Por último, foi depositada uma camada final de GaN. Todas estas deposições epitaxiais foram levadas a cabo pelo sistema MOCVD⁹. De seguida, com a prévia padronização de máscaras circulares cromadas, são formados os nanopilares por RIE, como mostra a **figura 1.1.8**.

⁵ do inglês "core/shell".

⁶ do inglês "electron beam lithography".

⁷ do inglês "reactive-ion etching".

⁸ do inglês "wet chemical etching".

⁹ do inglês "metal organic chemical vapor deposition"

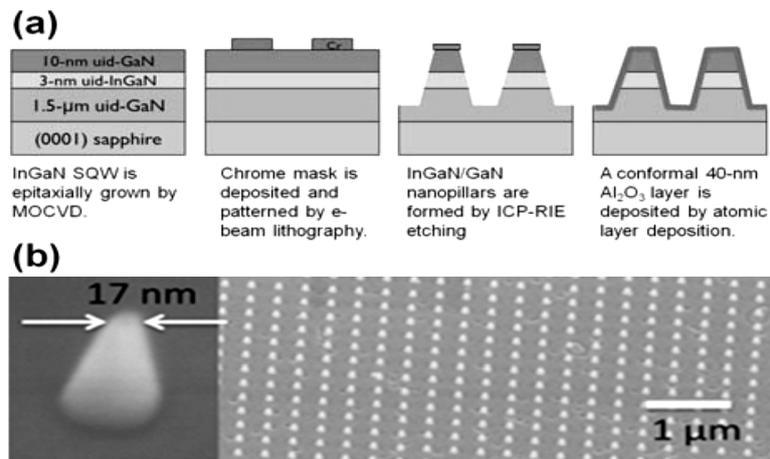


Figura 1.1.8 – Processo de formação de nanopilares por RIE (em cima). Imagens de microscópio electrónico evidenciando o padrão de nanopilares e em pormenor um nanopilar de aspecto cónico [70].

Nos processos de corrosão a seco, como é o caso do RIE, um gás reativo é inserido numa câmara e uma voltagem de radiofrequência é aplicada para criar um plasma que torna o gás mais reativo. Estas espécies com maior energia cinética presentes no gás atacam selectivamente a superfície onde não existe máscara, formando reacções volatilizantes e produzindo o padrão desejado. Apenas quando as espécies energéticas reactivas são iões é que o processo de corrosão é chamado de RIE.

Estas abordagens *top-down* oferecem um alto grau de flexibilidade no design de sistemas nanoestruturados. Qualquer forma de pontos quânticos de zero ou uma dimensões, anéis ou colunas com uma precisa separação e periodicidade podem ser realizadas com estas técnicas.

1.1.3.2. Processos *botom-up* de síntese

Processos *botom-up* são também recorrentemente designados por processos de auto-organização de partículas [59]. Estes processos envolvem, geralmente, a precipitação das partículas por nucleação de precursores, seguida de um tempo controlado de crescimento, através de métodos químicos em solução [71, 59]. Além destes encontram-se métodos e técnicas de fase-vapor, entre os quais CVD¹⁰ [72, 73, 74] ou feixe molecular epitaxial [75, 76].

¹⁰ do inglês “chemical vapor deposition”.

Alguns dos métodos químicos de síntese que utilizam soluções são: microemulsões [37, 77, 78]; sol-gel [79, 80]; reações químicas competitivas [81]; assistidos por irradiação de microondas [82, 83]; electroquímicos [84, 85]; ou decomposição em solução quente [86-88]. Este último método é considerado por Bera et. al como o melhor para a síntese de pontos quânticos com alta cristalinidade e monodispersividade [71].

Nos métodos húmidos – ou em solução –, pela variação dos fatores de reação como a temperatura, solventes, estabilizadores ou formação micelar, concentração de precursores ou razões entre espécies aniónicas e catiónicas, podem obter-se pontos quânticos com o tamanho, forma e composição desejados. Processos que envolvem microemulsões têm a vantagem de, ao contrário da decomposição em solução quente, não precisarem de temperaturas extremamente elevadas (maiores que 300°C [86]) para a obtenção de pontos quânticos de qualidade.

De seguida, faremos algumas referências ao método que foi usado, na parte laboratorial deste trabalho, para a síntese de pontos quânticos.

1.1.3.3. Síntese de pontos quânticos pelo método de microemulsão

Na verdade, todos os métodos atrás descritos podem ser transformados ou combinados para a obtenção de pontos quânticos com as características desejadas. O mesmo acontece com o uso de microemulsões. Contudo, podemos circunscrever este método a algumas das suas características mais comuns.

São duas as categorias em que podemos dividir este processo: microemulsões (1) normais ou (2) invertidas, caso se trate de um óleo em água ou de água em óleo, respectivamente [21]. De entre este tipo de processos encontra-se o de micelas invertidas, em que se juntam dois líquidos imiscíveis (geralmente água (polar) e um alcano de cadeia longa (apolar)) a um surfactante¹¹ para formar a emulsão [37, 89-93].

Ao nível microscópico, as moléculas de surfatante organizam-se em filmes que separam as fases polar e apolar, formando pequenas gotas de água dispersas em soluções de n-alcenos, ou vice-versa, através do uso de surfatantes como AOT¹²,

¹¹ Estrangeirismo do inglês “surfactant”, equivalente à palavra portuguesa “tensioactivo”.

¹² Do inglês “Aerosol OT - Dioctyl sodium sulfosuccinate”.

CTAB¹³ ou SDS¹⁴ [94]. Isto é devido às moléculas dos surfatantes terem terminações hidrofílicas e hidrofóbicas nos grupos terminais opostos. Assim se formam pequenos aglomerados chamados micelas, separando o óleo da água, como pequenos reservatórios [94]. Dado que as reações químicas de síntese de partículas podem ocorrer no interior destas micelas, elas são por vezes chamadas de micro ou nano-reatores [95, 96]. Chamam-se micelas invertidas quando a água fica no seu interior, em contato com os grupos hidrofílicos (cabeças), enquanto o óleo fica no exterior, em contato com as caudas hidrofóbicas do surfatante [97]. As microemulsões são isotrópicas, macroscopicamente homogêneas, termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes. As micelas podem albergar uma grande quantidade de moléculas no seu interior sem que isso distorça as suas propriedades macroscópicas. Esta estabilidade nas suas propriedades permitiram o uso de técnicas de polarização e fluorescência resolvida no tempo, fosforescência, espectroscopia no visível e UV, ESR e NMR para o estudo da estrutura e monitorização de reações que ocorram no seu interior [94].

Além dos procedimentos laboratoriais para o estudo da influência das micelas no crescimento de nanopartículas, e para simplificar a gama de experiências que teriam de ser levadas a cabo para esse fim, também têm vindo a ser desenvolvidos estudos e modelos teóricos [98-102]. Estes estudos focaram-se principalmente nos diferentes mecanismos e na cinética de formação de partículas em sistemas de microemulsão.

Considera-se a troca intermicelar de reagentes e partículas acabadas de formar numa só ou entre duas microemulsões. Em ambos os casos, o tamanho e a polidispersividade das partículas não dependem apenas do tamanho das micelas ou da concentração de reagentes mas também de outros parâmetros físicos, tais como a natureza dos reagentes, a fracção de volume polar, padrão de mistura dos reagentes, temperatura, pH, e até tipos de óleos usados. Uma revisão dos parâmetros envolvidos pode ser encontrada na referência [103], alguns dos quais resumiremos em seguida.

¹³ Do inglês "cetyl trimethyl-ammonium bromide".

¹⁴ Do inglês "sodium dodecyl sulfate".

1.1.3.3.1. Efeito da razão de água para surfatante

Quanto à utilização de técnicas que envolvem microemulsões na produção de nanopartículas, foi demonstrado, através do cálculo da energia livre de Gibbs de uma micela invertida, que o seu raio tem uma dispersividade reduzida, ou seja, que a população de micelas invertidas tem uma distribuição de tamanhos quase monodispersa [94]. Esta propriedade é muito importante para controlar o tamanho e a polidispersividade das partículas que se sintetizam no seu interior. Esta organização estrutural das micelas invertidas, juntamente com a quase monodispersividade do seu raio, permite [90, 97], no caso do AOT, o estabelecimento duma relação linear entre o raio da gota r_g , em nm, e o parâmetro externamente controlável ω_0 .

$$\omega_0 = \frac{[\text{água}]}{[\text{surfatante}]}$$

$$r_w(\text{gota de água}) = 0.175 \omega_0$$

O raio hidrodinâmico da micela invertida, r_m , será então o raio da gota de água, r_w , mais o tamanho da molécula de surfatante.

Podemos aumentar o tamanho das micelas pela simples adição de água, mas isso irá fazer com que se reduza a concentração micelar. Se fizermos aumentar a quantidade de água e de surfatante, de modo a que ω_0 se mantenha constante, então o número de micelas aumentará, mas não o tamanho delas.

Consideremos agora dois agentes reactivos arbitrários, A e B, em duas soluções micelares. Ao misturá-las, por causa de um processo de transferência de conteúdo entre micelas, A e B vão entrar em contacto e reagir [90]. Ao aumentar o tamanho da micela, o que diminui a rigidez do filme de surfatante, verifica-se um aumento das

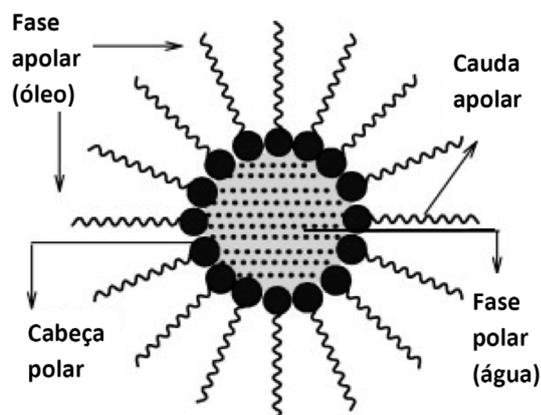


Figura 1.1.9 – Estrutura típica de uma micela invertida.

nucleações intermicelares em comparação com a nucleação intramicelar. Adicionalmente, isso também aumenta a agregação, por causa da colisão entre nanopartículas dentro da mesma micela.

1.1.3.3.2. Efeito da fase orgânica

A fase orgânica é um factor importante na síntese de nanopartículas através de técnicas de microemulsões. Nem todos os solventes orgânicos são adequados à formação de emulsões água-em-óleo (w/o).

A experiência de mudar o solvente de isoctano (viscosidade = 0.32 cP) para ciclohexano (0.85 cP), levou a uma diminuição por um factor de 10 da troca intermicelar, reduzindo assim o tamanho das partículas para metade, apesar do tamanho das micelas permanecer igual [104].

1.1.3.3.3. Efeito dos reagentes

Durante o processo de redução, normalmente o agente redutor não tem efeito no controlo do tamanho da partícula. No entanto, com agentes redutores fracos, a polidispersividade aumenta por causa dos lentos tempos de reacção. Em geral, quando a reacção é rápida a concentração de núcleos aumenta devido à maior troca inter e intramicelar; como resultado, são obtidas partículas mais pequenas [105].

1.1.3.3.4. Efeito da concentração de reagentes

No caso de sistemas de microemulsão, com o aumento da concentração de reagentes, o tamanho das partículas vai diminuir, devido a uma mudança no mecanismo de formação das partículas. De facto, este aumento de concentração leva a um aumento do número de átomos reactivos dentro de cada micela invertida individual. Mas, conseqüentemente, disto decorre um movimento do mecanismo de crescimento, desde uma reacção intermicelar em direcção a uma reacção predominantemente intramicelar. Deste movimento resulta, geralmente, uma diminuição do tamanho final das partículas [104, 106].

1.1.3.3.5. Efeito da misturação

A forma como se fazem as misturas na microemulsão é outro factor importante na síntese de nanopartículas. A literatura confirma que a adição de reagentes na forma líquida, ainda que não ocorra separação de fases, aumenta a agregação, enquanto a sonificação por ultra-sons melhoram eficientemente a distribuição dos reagentes pelas micelas invertidas [107].

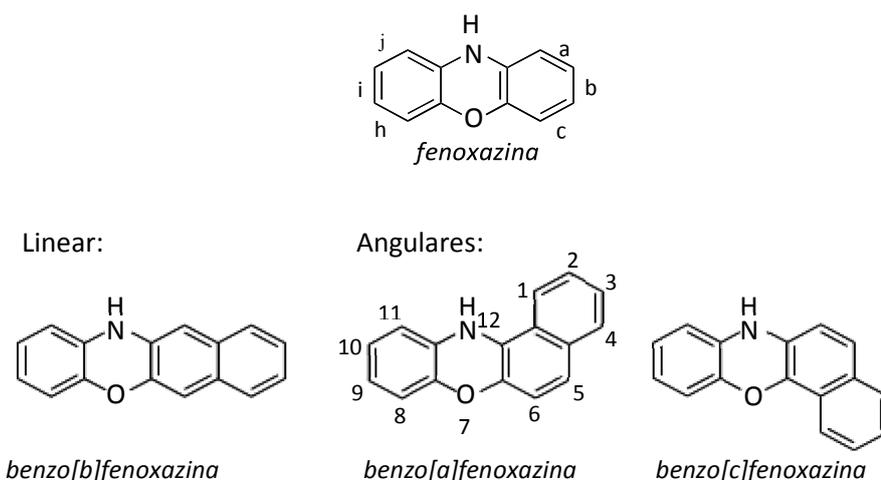
1.1.3.3.6. Efeito da temperatura e do tempo de reacção

A temperatura é um dos parâmetros mais usados para controlar a cinética de reacção na formação das nanopartículas. Geralmente, para reacções exotérmicas, a velocidade de reacção aumenta com o aumento da temperatura. O contrário acontece para reacções endotérmicas.

Para a formação de partículas por precipitação, a reacção pode ser dividida em três estágios distintos [103]: (i) nucleação, (ii) crescimento, e (iii) aglomeração. Como resultado, o tamanho das partículas depende na velocidade relativa destes três estágios, todos em parte dependentes da temperatura. Ou seja, as partículas começam por criar pequenos núcleos, iniciando o seu processo de crescimento. De seguida, o tamanho das partículas torna dependente do tempo de reacção. Por último, a reacção precisa de ser terminada antes que as partículas comecem a aglomerar. A temperatura infere na velocidade destes estágios.

1.2. Benzofenoxazina

Fenoxazinas são compostos heterocíclicos tricíclicos consistindo de um anel de oxazina, rodeado por dois núcleos de benzeno. Quando a estes compostos é adicionado um anel benzeno é adicionado às arestas *a-c* ou *h-j* são denominadas benzofenoxazinas angulares ou lineares, dependendo da orientação do anel benzeno adicionado [108].



Esquema 1.2.1 – Fenoxazina e benzofenoxazinas [108].

Foi já extensivamente descrita a síntese de benzo[*a*]fenoxazinas e suas características fotofísicas em diferentes meios, de forma a usá-las como sensores para distinguir diferentes acontecimentos como a micelização e determinação da sua concentração micelar crítica [109], interação com DNA [110], sondas para membranas [111] e para aminoácidos [112]. Uma revisão completa sobre as características fotofísicas e as aplicações fotofísicas das benzo[*a*]fenoxazinas pode ser encontrada na referência [113].

1.2.1. Caracterização de benzofenoxazinas

Ao estudarem-se as propriedades fotofísicas de benzofenoxazinas, verificaram-se desvios nos máximos de absorção e emissão em função da polaridade e de capacidade receptora de prótons por parte dos solventes [114].

Depois de mais algumas experiências, com a mesma sonda em diferentes solventes, concluiu-se que o solvente interage com a benzofenoxazina quer aceitando

uma ligação de hidrogénio, ou removendo completamente o protão amina e portanto originando a base correspondente [114]. Ao passar de etanol para água a capacidade de aceitar protões diminui enquanto a de doar protões aumenta. De acordo com estas variações observou-se que a forma alcalina só é importante em etanol e desaparece completamente em água.

Num outro trabalho [109], foram estudadas as interações entre benzofenoxazinas e a formação micelar. As micelas são um modelo simples através do qual se podem estudar as membranas biológicas, dado que estas apresentam na sua constituição uma bicamada fosfolipídica. Assim sendo, a interacção de fluoróforos com micelas pode permitir um paralelo entre as sondas e as propriedades das membranas.

1.2.2. Aplicações de benzofenoxazinas

Os trabalhos mencionados até aqui sugerem boas expectativas no uso destes fluoróforos como sonda em várias aplicações, tais como em processos biológicos de transporte de protões, transferência eletrónica fotoinduzida, assim como medição de pH local.

Os resultados do trabalho da referência [109] mostram que compostos fenoxazínicos catiónicos com uma cadeia alifática longa são capazes de detetar a concentração micelar crítica, até no caso de surfatantes catiónicos, nos quais existe uma repulsão electrostática entre as micelas e a sonda fluorescente.

Tal como das micelas, a compreensão das funções biológicas das membranas está relacionada com as suas propriedades físico-químicas. Parâmetros como a electrostática da membrana, a sua fase, hidratação ou dinâmica dos seus constituintes estabelecem a estrutura da célula e regulam a ligação ou transporte de espécies iónicas. A composição e a estrutura das membranas podem ainda condicionar a correcta inserção, conformação e função das proteínas membranares.

Os aminoácidos são pequenas moléculas de extrema importância devido à sua presença ubíqua nos tecidos e fluidos biológicos. Na maioria dos casos, a monitorização destas moléculas é alcançada apenas depois que um cromóforo ou fluoróforo se ligue ao grupo amina ou ao ácido carboxílico.

A pequena dependência que estas sondas mostram relativamente ao pH [112], apesar de impossibilitarem o uso como sondas de pH, fazem delas úteis para ensaios em que se esperam resultados do ambiente mais próximo da sonda, independentemente do pH, tal como estudos de conformação de macromoléculas biológicas. Outras aplicações podem ser encontradas, como sensor redox para a deteção de NADH [115], piruvatos [116], peróxido de hidrogénio [117], glucose [118] e 3-hidroxi-butirato [119].

1.3. Conjugação de Pontos Quânticos

As tendências atuais de encolher as dimensões de novos materiais são conduzidas pelo desejo de aceder às propriedades e performances únicas que emergem na transição para a escala nanométrica. Como vimos na secção 1.1, à medida que o tamanho diminui para a nanoescala, essas propriedades tornam-se fortemente dependentes do tamanho.

Além dos atributos óticos, electrónicos e quânticos que são deliberadamente almejados no fabrico destes materiais, também o aumento da área de superfície com o decréscimo do tamanho tido em consideração. Esta última característica faz com que haja actualmente uma grande produção científica na área da química de superfície de nanopartículas, onde se incluem os pontos quânticos.

Contíguo a isto, as nanopartículas são dos nanomateriais mais próximos dos fins comerciais de mercado. Estima-se que o mercado de nanopartículas para biotecnologia, desenvolvimento e entrega de fármacos tenha um valor global de 21,6 mil milhões de dólares em 2012, com um crescimento anual previsto de 19,9%, que chegará aos 53,5 mil milhões de dólares em 2017 [120].

Nesta secção sobre a conjugação de pontos quânticos, tal como na secção 1.1, debruçar-nos-emos apenas sobre o estudo de pontos quânticos coloidais, aqueles que foram utilizados na parte laboratorial deste trabalho.

1.3.1. Solubilização de pontos quânticos

Pontos quânticos produzidos em soluções não-polares são geralmente insolúveis em água, tornando necessária uma modificação da superfície das partículas para a transferência de fase. Após a síntese dos pontos quânticos (ver secção 1.1.3), três estratégias principais, consideradas de modo geral, têm sido desenvolvidas para transformar nanocristais hidrofóbicos em partículas solúveis em água: (1) troca de ligandos, (2) encapsulação em sílica e (3) encapsulação num polímero anfifílico. Este é um passo comum, mas não trivial, para a utilização destas partículas em aplicações a sistemas biológicos. Também já foram descritas sínteses directamente em soluções aquosas para ambientes biológicos [121, 122], mas estes protocolos dificilmente

atingem níveis de monodispersividade, cristalinidade, estabilidade e eficiência de fluorescência satisfatórios [123].

1.3.2. Troca de ligandos

A troca de ligandos tem-se mostrado especialmente adequada para solubilizar pontos quânticos com coroa de ZnS. Para este fim, uma suspensão de pontos quânticos cobertos com TOPO¹⁵ (ou outro tipo de moléculas) é misturada numa solução que contenha um excesso de um ligando heterobifuncional, o qual tem um grupo funcional que é hidrofílico. Assim, ligandos hidrofóbicos TOPO são substituídos através da ação da difusão de massa, uma vez que o novo ligando bifuncional se vai adsorver para melhorar a solubilidade na água.

Com este método, pontos quânticos núcleo/coroa de CdSe/ZnS foram revestidos com ácido mercaptoacético e (3-mercaptopropil) trimetoxisilano, ambos com grupos alcalinos tiol para se ligarem aos átomos da superfície dos cristais, obtendo-se partículas com monómeros de ácido carboxílico ou silano, respectivamente [124]. Podem ser empregues ligandos de vários tamanhos para reduzir ou eliminar a adsorção passiva de proteínas ou outras moléculas [125]. As propriedades óticas dos pontos quânticos depois de cobertos por estes processos são comparáveis às das partículas núcleo coroa originais [126-128]. Outros ácidos carboxílicos foram usados com procedimentos semelhantes, incluindo MPA e DHLA [129, 130].

Um método alternativo para a solubilização empreende a modificação da superfície com uma cobertura de resíduos de cisteína [131]. Pontos quânticos cobertos com estes resíduos foram usados com sucesso em tecido celular fixado para aplicações biológicas [131, 132]. De modo similar, péptidos anfifílicos ricos em cisteína também foram usados como cobertura solúvel em água para pontos quânticos. Os péptidos anfifílicos usados para a biocompatibilidade continham um domínio hidrofílico para a solubilização em água e outro domínio rico em cisteína para fazer a ligação à superfície dos pontos quânticos. Quando os resíduos de cisteína do domínio de ligação são

¹⁵ do ingles “tri-n-octylphosphine oxide”

substituídos por resíduos alanina, as partículas resultantes tornaram-se insolúveis em água, o que demonstrou que o grupo tiol da cisteína é necessário para a solubilização.

Quase todos os métodos de cobertura envolvem grupos funcionais terminais que providenciam a possibilidade de conjugação posterior, tal como ocorreu com conjugados cisteína-pontos quânticos que foram ligados com sucesso a biotina e usados para marcar proteínas na superfície de uma célula viva, que tinha também sido conjugada com avidina [133].

1.3.3. Encapsulação em sílica

A investigação de P. Alivisatos demonstrou a possibilidade de encapsular pontos quânticos para a sua solubilidade em água [134]. O mesmo grupo elaborou mais tarde protocolos para a funcionalização eficiente destes sistemas e a sua aplicação em imagiologia de células vivas [135, 136]. Além de solubilizar em água, a camada de sílica também protege o ponto quântico de se degradar e perder fluorescência, assim como diminui a toxicidade evitando que se liberte o material tóxico do núcleo.

1.3.4. Encapsulação em polímeros

Vários polímeros têm sido usados em técnicas de solubilização, tomando vantagem das várias composições químicas disponíveis. Tal como foi referido antes, polímeros anfifílicos são uma escolha comum, porque simultaneamente exploram a natureza hidrofóbica da superfície do ponto quântico, para se ligar, como também o ambiente aquoso, para a solubilidade [137, 138].

A diferença entre a cobertura dos pontos quânticos com polímero siloxano ou com polímero anfifílico é o método de encapsulação: a cobertura de sílica substitui o ligando hidrofóbico na superfície da partícula, enquanto o polímero anfifílico o usa para se ligar. Como noutros métodos de solubilização, as propriedades ópticas dos pontos quânticos de origem não são severamente afectadas pela adição da camada de polímero. Enquanto a camada adicional polimerizada aumenta a estabilidade, por outro lado, um aumento de tamanho da partícula pode prejudicar a actividade biológica [137, 139].

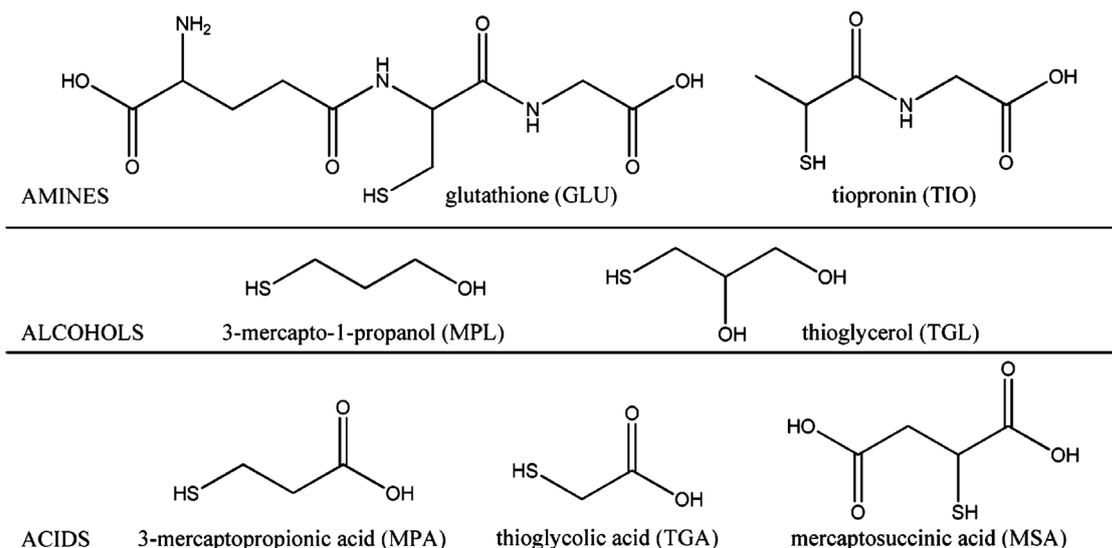


Figura 1.3.1 – Tióis solúveis em água usados na síntese de pontos quânticos. [155]

Ao mesmo tempo que cumprem a função de solubilizar os pontos quânticos, os polímeros podem ser modificados para conter grupos como tiol ou amina, e deste modo permitir uma posterior conjugação [139]. A carga do polímero de cobertura pode ser alterada fazendo variar os grupos funcionais contidos no polímero, o que pode ser útil para aplicações específicas tal como a entrada no espaço celular [140]. Também a composição do polímero é crítica para otimizar a solubilidade e limitar outras características indesejáveis dos nanossistemas, tais como agregação e toxicidade [139, 141].

Um tipo específico de polímero – micelas fosfolipídicas que contêm PEG – foi usado para encapsular pontos quânticos e deste modo monitorizar uma linhagem celular *in vivo* [139]. Os nanossistemas permaneceram dentro das células, mantiveram a sua fluorescência e não revelaram sinais de toxicidade celular. Durante a divisão celular, as células originalmente marcadas retiveram alguns pontos quânticos, enquanto alguns iam passando para as células-filhas. Desta forma, a linhagem celular pôde ser monitorizada medindo a intensidade de fluorescência dentro das células individuais sem recear o desaparecimento da fluorescência, como usualmente acontece com as sondas orgânicas.

1.3.5. Aplicações de sistemas baseados em pontos quânticos

A **figura 1.3.2** mostra os avanços tecnológicos mais correntemente aplicados em pontos quânticos. Além dos pontos quânticos não-funcionalizados (cujas cobertura é geralmente a necessária durante a sua síntese, ou para solubilização em água), os pontos quânticos podem ser conjugados para adquirirem afinidade a componentes biológicos, ou funcionalizados para um conjunto alargado de aplicações como sensores.

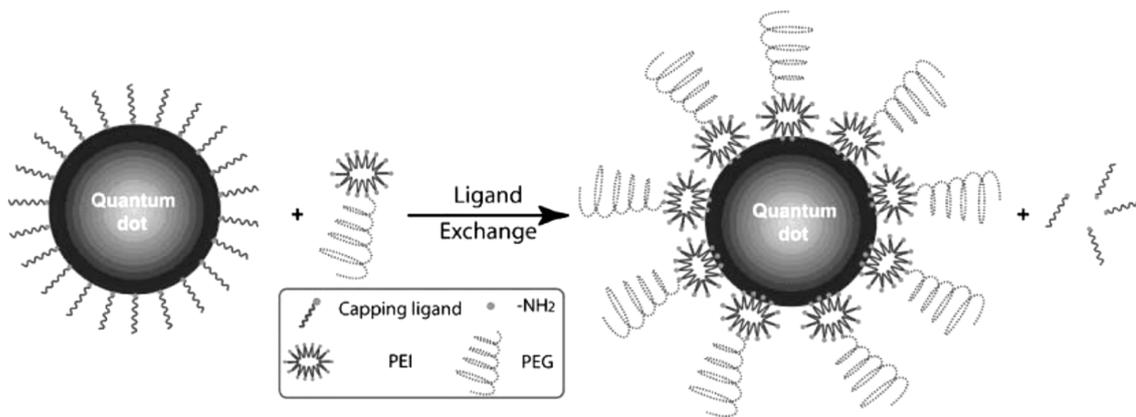


Figura 1.3.2 – Diagrama esquemático mostrando as reacções de troca directa entre os ligandos monovalentes de cobertura de octadecilamina e os ligandos de copolímero multivalentes. [141]

Estruturalmente, partículas a esta escala têm uma superfície onde se podem ligar agentes de diagnóstico (por exemplo, ópticos, radioisotópicos ou magnéticos) [123,126,125] e de terapia (por exemplo, anticancerígenos) [142]. Quando conjugadas com ligandos de afinidade biomolecular, como anticorpos, péptidos ou outras pequenas moléculas, as nanopartículas podem ser encaminhadas para tumores [143], ao sistema nervoso [144] ou outras áreas de um organismo vivo com elevada especificidade [145]. Pontos quânticos conjugados com anticorpos podem ganhar especificidade para uma variedade de antígenos [146]; ligados a pequenos ligandos, péptidos ou aptâmeros podem ligar-se com elevada especificidade a muitos alvos e recetores celulares diferentes [147, 148]; quando conjugados a péptidos catiónicos, como é o caso do péptido HIV Tat, podem rapidamente associar-se a células ou serem internalizadas por endocitose [136].

Além destas aplicações, as tecnologias de fluorescência permitem desenhar sondas em que os pontos quânticos funcionam como doadores ou aceitadores de

energia, electrões ou protões, e através desta transferência detetar-se a presença de biomoléculas ou alterações das condições intracelulares. Um exemplo disto foi a adaptação de pontos quânticos para monitorizar a presença de maltose, conjugando a proteína que se liga a este açúcar, à superfície dos nanocristais [149]. Pontos quânticos

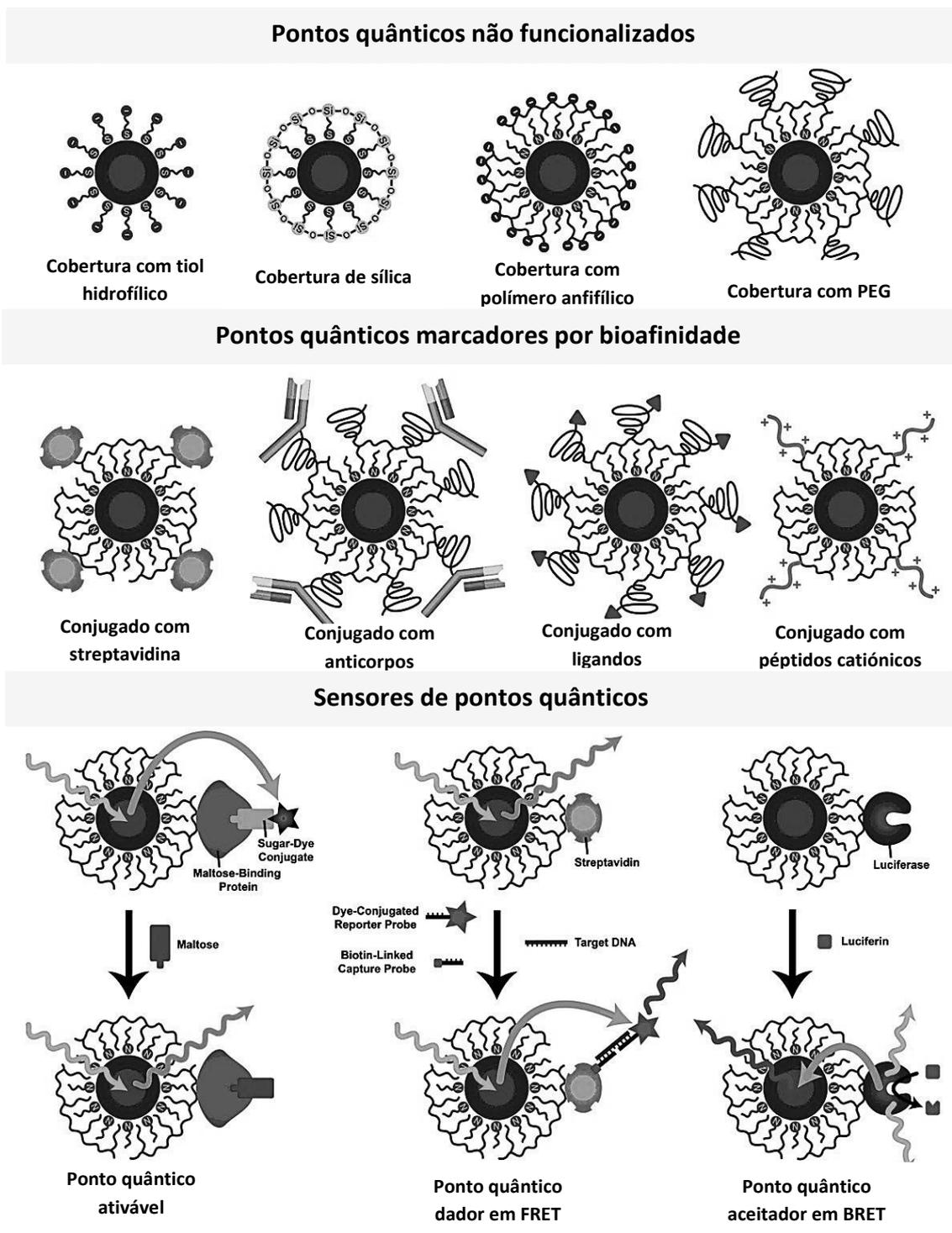


Figura 1.3.3 – Diagrama esquemático de várias possibilidades de funcionalização de pontos quânticos e da sua bioconjugação para imagiologia e aplicações como sensores. [123]

podem também funcionar como sensores de sequências específicas de DNA [150].

1.4. Purificação de bionanossistemas

Os pontos quânticos, como já vimos, podem ser sintetizados com uma grande variedade de formas e tamanhos, podem ter várias composições, conjugações e modificações de superfície.

Independentemente dos métodos de revestimento, funcionalização ou conjugação usados, os bionanossistemas têm que passar por um processo de purificação de ligandos residuais e excesso de moléculas anfifílicas, antes do seu uso em ensaios biológicos, através de centrifugações, diálises ou filtrações. Há também grande variedade de solventes e outras condições de síntese que podem interferir nos processos de purificação.

Convém lembrar que os pontos quânticos muito dificilmente são totalmente monodispersos, o que pode afectar as características das suas funções dependentes do tamanho. Torna-se então necessário que os processos de purificação incluam uma redução da polidispersividade, para se obterem fracções com propriedades bem definidas.

Várias técnicas de síntese reduzem a polidispersividade das nanopartículas através do uso de estabilizadores poliméricos ou de micelas invertidas, mas também aí a purificação se torna necessária para os subsequentes processos de conjugação e posterior uso em sistemas biológicos, no qual se inclui a mudança de fase das partículas para um meio aquoso.

Dependendo então das propriedades do sistema que queremos isolar, vários processos de purificação podem ser utilizados. Entre estes, encontram-se a separação por campos magnéticos (principalmente para nanocristais magnéticos [151, 152]); cromatografia [153-155]; centrifugação [156] e ultracentrifugação [157] por gradiente de densidade; electroforese [158, 159]; precipitação selectiva [160-162]; filtração por membranas [163, 164]; e extracção (CPE¹⁶) [165, 166]. Também uma combinação destes processos pode ser necessária ao longo da fabricação de bionanossistemas [167].

¹⁶ do inglês “cloud point extraction”

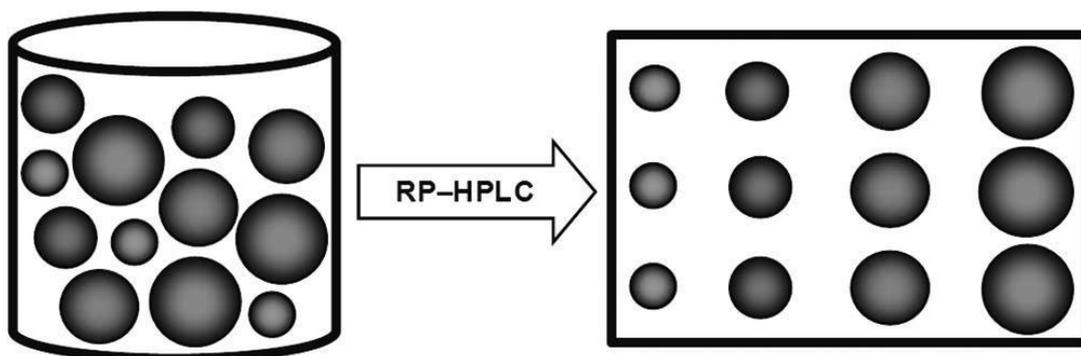


Figura 1.3.4 – Esquema da separação de uma mistura de pontos quânticos de vários tamanhos por cromatografia líquida. [155]

Descreveremos brevemente alguns destes processos de purificação aplicados a sistemas baseados em pontos quânticos.

1.4.1. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica de separação dos componentes de uma mistura que os distribui de acordo com o seu comportamento em duas fases, uma móvel e outra estacionária. Estas técnicas envolvem frequentemente uma coluna ou um papel em que um efluente percorre o meio fixo, geralmente sólido, cujo fluxo ocorre por gravidade ou capilaridade.

Aplicada à purificação de pontos quânticos solúveis em água, foi usada uma fase líquida composta por 50% de água (com pH ajustado a 12 com NaOH), 45% de metanol e 5% de álcool isopropílico [155]. Esta fase líquida fez-se passar através de uma coluna com micropartículas de 5 μm que reteve os componentes indesejados na mistura com pontos quânticos. O efluente é recolhido da coluna à mão para um frasco, por partes, onde os pontos quânticos solubilizados ficaram separados por tamanhos.

1.4.2. Centrifugação por gradiente de densidade

Os métodos de centrifugação e ultracentrifugação por gradiente de densidade são métodos gerais, não-destrutivos e escaláveis de separação adaptados da biologia molecular, que têm vindo a demonstrar um grande potencial para separar nanopartículas coloidais de acordo com as suas diferenças químicas, estruturais e de tamanho [156]. A técnica resume-se à centrifugação de soluções, cujo gradiente de

densidades do conjunto de solventes usados, estratifica as nanopartículas dentro do tubo segundo as suas características.

Nanopartículas de CdSe, envolvidas em ácido oleico e dispersas em solventes não-hidroxicos, foram separadas e purificadas em simultâneo [156]. Criou-se um gradiente com a mistura de ciclohexano e tetraclorometano, centrifugando-se a 50000 rpm durante 60 minutos. Desta forma, conseguiu-se a separação de partículas cujos máximos de fluorescência se distanciam entre 10nm a 50nm.

1.4.3. Precipitação Seletiva

Para este método de purificação, simples em procedimento, utilizam-se combinações de solventes de modo a que as nanopartículas precipitem seletivamente segundo as suas propriedades. Tal como no ponto anterior, este método também pode recorrer a centrifugações, mas o gradiente de densidade já não é o factor decisivo para a precipitação. O importante é a relação entre os tamanhos e as estruturas moleculares dos solventes e das partículas [167]. Como as propriedades físicas e químicas, a reatividade e a estabilidade, são fortemente dependentes do tamanho, a conjugação de solventes tem que ser otimizada para cada tipo ou funcionalização das nanopartículas.

Descreveremos um exemplo deste tipo de procedimentos. Depois de terem sido sintetizados numa solução aquosa com 2-mercaptoetanol e 1-tioglicerol (e usando os ácidos tioglicólico e tioláctico como estabilizadores), pontos quânticos de CdSe foram purificados pelo método de SSP¹⁷ [160]. Inicialmente, a solução da síntese das partículas foi concentrada para um quinto do volume inicial através de aquecimento. Depois disto, um não-solvente (acetona) foi adicionado à solução concentrada até que as partículas maiores começaram a precipitar. Da solução turva resultante, o sobrenadante e o precipitado foram separados por centrifugação. Ao primeiro sobrenadante obtido, foi adicionada uma pequena porção de acetona, seguindo-se outra centrifugação, produzindo uma nova fracção de sobrenadantes e precipitados. Este processo foi repetido de modo a obter nanocristais de diferentes tamanhos.

¹⁷ do inglês: size-selective precipitation.

1.5. Imagiologia em células vivas

Diferentes técnicas de imagiologia molecular e celular, tais como visualização óptica, de ressonância magnética, de ultra-sons, tomografia de emissão de positrões, entre outras, são usadas tanto para a visualização *in vivo* como *in vitro*.

Os pontos quânticos, pelas boas propriedades de fluorescência já descritas na secção 1.1 – como a estabilidade fotoquímica e metabólica, o brilho e o espectro de emissão estreito e alterável – incluem-se geralmente nas aplicações de imagiologia óptica. Os investigadores já alcançaram um sucesso considerável no uso de pontos quânticos para ensaios biológicos *in vitro* [168, 169], na marcação de células fixadas [137] e de tecidos [170], e para a visualização de proteínas membranares em células vivas [147, 171].

Estudos completos das aplicações de pontos quânticos bioconjugados para imagiologia molecular e celular podem ser encontrados nas referências [123, 125]. No entanto estas partículas têm desvantagens – que podem ser circunscritas, pelo menos em parte –, como a foto-oxidação, a solubilização em água e a toxicidade.

Como já foi dito atrás, para direccionar pontos quânticos a um determinado alvo específico, ou mesmo para que surjam novas funcionalidades, a bioconjugação é um passo essencial na fabricação de bionanossistemas. Mas apesar de estes nanossistemas serem largamente utilizados em ensaios biológicos, as vias usadas para internalização celular permanecem com grande grau de desconhecimento. A elucidação dos mecanismos de endocitose específicos de pontos quânticos é, portanto, de extrema relevância na área da nanomedicina, diagnóstico de tumores ou tratamento.

1.5.1. Vias de endocitose

Foram avaliados 24 inibidores de endocitose que podem ser classificados em sete grupos principais, baseando-se na localização dos seus efeitos na célula [172]: citoesqueleto, rafts lipídicos, clatrina, macropinocitose, receptores acoplados à proteína G, via de transferência de melanoma, e recetores associados a lipoproteínas de baixa densidade.

Os efeitos destes inibidores na internalização de pontos quânticos foram avaliados por citometria de fluxo para quantificação de inibição e também vistos por microscopia laser confocal. Também se investigou, no mesmo estudo, se a endocitose era mediada por recetores, assim como a localização intracelular dos nanossistemas recorrendo a fluoróforos específicos para organelos. Deste estudo, resultou uma tabela em que constam os 24 inibidores identificados, com a descrição das suas funções e localizações respetivas, assim como as concentrações usadas no ensaio de inibição [172].

Destas descobertas puderam tirar-se conclusões que ajudaram a construir um modelo para a endocitose dos bionanossistemas baseados em pontos quânticos, com todos os processos e vias metabólicas associadas. Um exemplo disso encontra-se na **figura 1.3.5**, que ilustra a complexidade dos mecanismos envolvidos.

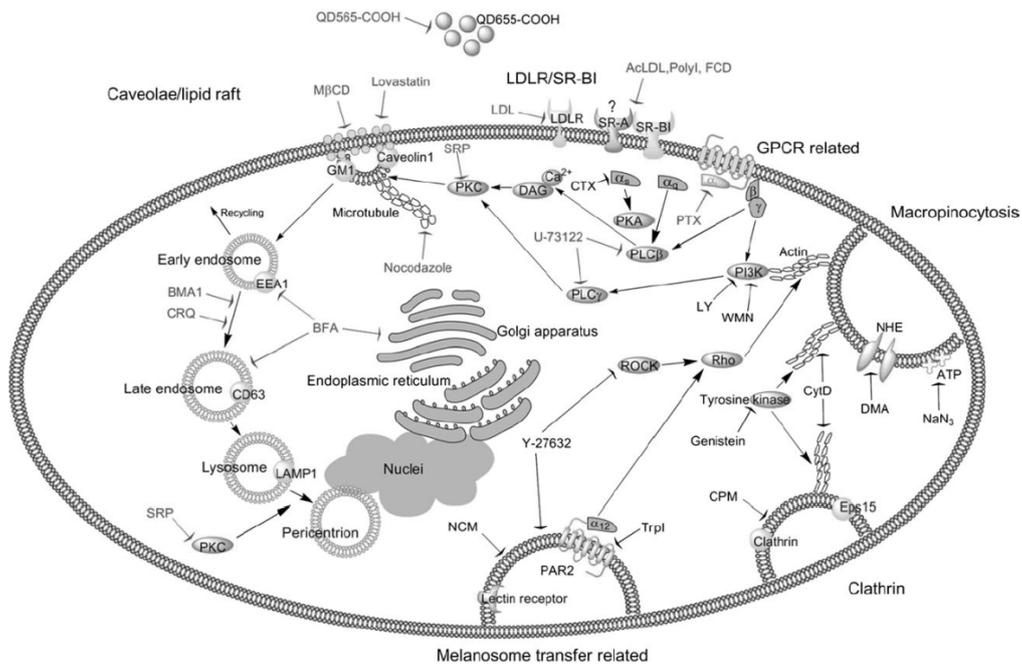


Figura 1.3.5 – Vias de endocitose dos pontos quânticos e inibidores associados. [172]

1.5.2. Pontos quânticos como biossensores

Os biossensores baseados em pontos quânticos podem ser de vários tipos. Podem usar conjugações que incluam fluoróforos ou biomoléculas próprias para a detecção de um dado analito. Os mecanismos envolvidos podem ser a inibição ou

desinibição de fotoluminescência, fenômenos de transferência de eletrão, como PET¹⁸ [173], ou ainda transferências energéticas ressonantes como FRET¹⁹ [174, 175] ou BRET²⁰ [176]. Todos estes processos podem também ser usados em conjunto.

A marcação por fluorescência é extensamente usada em biologia celular para determinar estruturas e localizar moléculas. Muitos dos estudos com imagiologia biológica são baseados nas sondas tradicionais, cujas limitações já foram atrás comparadas às propriedades dos pontos quânticos. As robustas propriedades óticas dos pontos quânticos tornam-nos adequados nesta área [123, 177, 178].

Como existe uma grande variedade de vias metabólicas que dependem do cofactor NAD(P)⁺, bioconjugados de pontos quânticos capazes de detetar processos que dependam deste cofator podem tornar-se sondas genéricas muito versáteis para análise de inúmeras transformações biocatalíticas. Baseados em pontos quânticos, foram já desenvolvidos detetores de vias metabólicas que usam NADH [179] diferentes elétrodos integrados consistindo em conjugações com NAD(P)⁺ para análise eletroquímica de diferentes enzimas e substratos [180, 181].

Foram também desenvolvidos sensores de pH baseados em pontos quânticos conjugados. Foi mostrado que, controlando a transferência de energia entre as partículas e um fluoróforo orgânico, se pode chegar a um método geral para o desenvolvimento de um sensor ratiométrico de pH [182], o que poderá resultar, no futuro, em sensores de pH intracelulares. Uma revisão completa sobre sensores de pH baseados em pontos quânticos pode ser encontrada na referência [183].

1.6. Conjugados de pontos quânticos com benzofenoxazinas

A síntese de pontos quânticos núcleo/coroa de CdSe/ZnS funcionalizados com Nile Blue foi descrita como sensor óptico, que permitiu imagiologia de fluorescência de transformações biocatalíticas dependentes de NAD(P)⁺, assim como a monitorização do metabolismo intracelular de células cancerígenas HeLa [179]. Depois de funcionalizados com albumina do soro bovino (BSA) e, posteriormente, com Nile Blue covalentemente ligado à camada de BSA, uma análise espectroscópica mostrou que

¹⁸ do inglês: Photoinduced Electron Transfer

¹⁹ do inglês: Förster (*ou* Fluorescence) Resonance Energy Transfer

²⁰ do inglês: Bioluminescence Resonance Energy Transfer

aproximadamente sete unidades de Nile Blue estavam ligadas a cada nanopartícula. Esta benzo[*a*]fenoxazina age como mediadora de elétrons para a oxidação dos cofactores NAD(P)H.

De acordo com isto, a **figura 1.3.6** mostra o método de análise do NAD(P)H através sistemas baseados em pontos quânticos conjugados. A fluorescência dos pontos quânticos é inibida pelo Nile Blue por FRET (pico de emissão dos nanocristais a 635 nm e pico de absorção do Nile Blue a 630 nm). Quando a luz incide na amostra, ambos são excitados, o que faz com que a transferência de energia ocorra com o Nile Blue fotoexcitado. Como o rendimento quântico de fluorescência do Nile Blue fotoexcitado é muito pequeno à temperatura ambiente, a sua luminescência não é detectada.

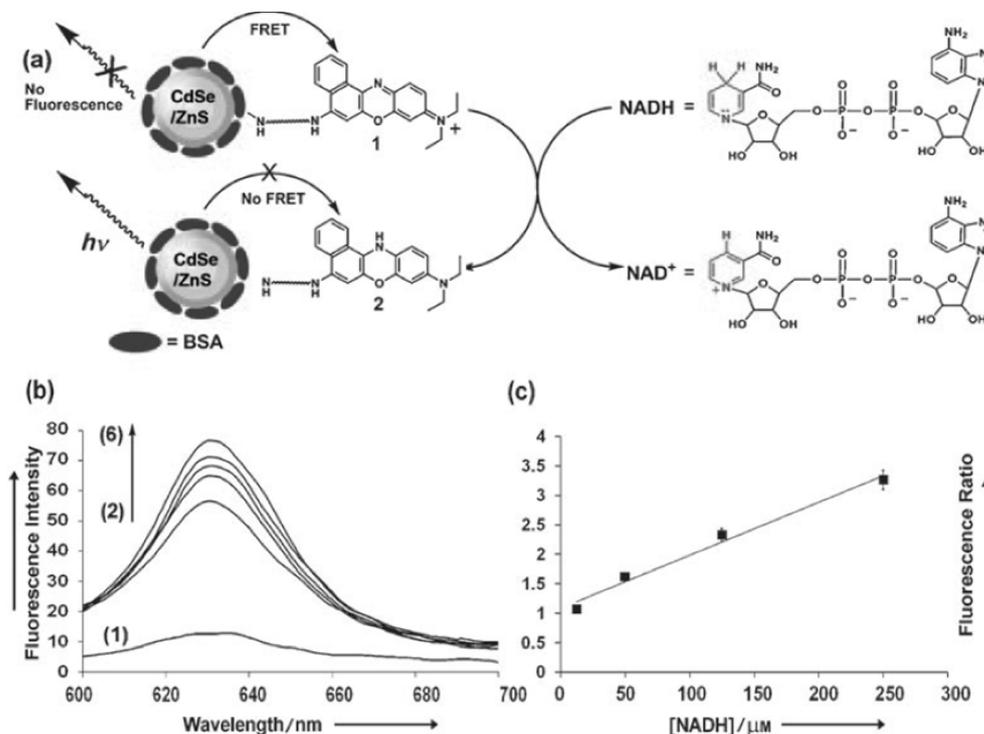


Figura 1.3.6 – Detecção de mecanismos dependentes de NADH com pontos quânticos. [179]

Apesar de o Nile Blue efetivamente inibir a fluorescência dos pontos quânticos por FRET, ele não é emissivo. Uma vez na presença de NADH, as sondas associadas aos pontos quânticos ficam reduzidas, deixando de absorver no visível e, portanto, já não funcionam como inibidores. Assim, como resultado da redução da camada de benzo[*a*]fenoxazinas que envolve os nanocristais pelos cofactores NAD(P)H, a fluorescência dos pontos quânticos é reativada, obtendo-se deste modo um sensor

ótico para a deteção da concentração de NADH. Este resultado, com pequenas diferenças, foi mais recentemente verificado por outra equipa de investigação [181].

Capítulo 2 – Técnicas e Procedimentos Experimentais

Neste capítulo serão expostas as técnicas experimentais de análise e caracterização, assim como os procedimentos de síntese dos nanossistemas produzidos. Dado tratar-se de pontos quânticos, as técnicas baseadas em análise de fluorescência têm aqui um relevo predominante.

2.1. A radiação eletromagnética

A luz pode ser fisicamente descrita como uma onda de energia que propaga alterações num campo eletromagnético. Mas, apesar de onda, a interação da luz com a matéria acontece por meio de fótons, que podem ser considerados corpúsculos ou pacotes discretos de energia.

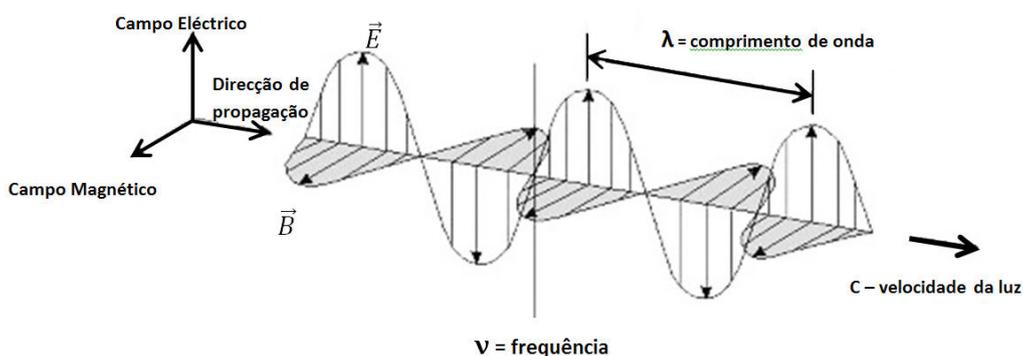


Figura 2.1.1 – Esquema da propagação da radiação eletromagnética.

As ondas eletromagnéticas têm este nome devido às duas componentes com que se descrevem, um campo elétrico (\vec{E}) e um campo magnético (\vec{B}) sinusoidais que oscilam em planos perpendiculares entre si e à direção de propagação da onda.

A onda eletromagnética pode então ser descrita pelo seu comprimento de onda λ , ou pela sua frequência ν , que estão diretamente relacionados pela seguinte equação 2.1:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}, \quad (2.1)$$

na qual c é a velocidade da luz na ausência de meio material.

Adicionalmente, uma frequência da onda eletromagnética corresponde a uma energia específica para o fóton correspondente, energia essa que determinará a

interação com os elétrons dos átomos em que a radiação incidir. A relação entre a frequência e a energia E de um fóton é descrita pela **equação 2.2**:

$$E = h \nu = h \frac{c}{\lambda}, \quad (2.2)$$

na qual h é a constante de Planck.

Portanto, a radiação eletromagnética tem um vasto espectro de frequências, do qual apenas uma pequena parte (uma oitava), é detectada pelo olho humano, como está ilustrado na **figura 2.1.2**.

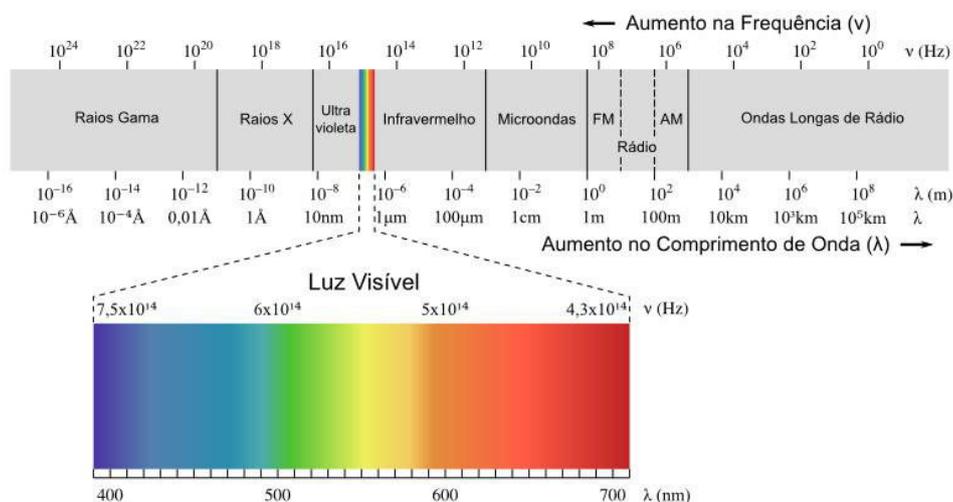


Figura 2.1.2 – Espectro eletromagnético, com destaque para a luz visível pelo Homem.

2.2. Espectroscopia eletrónica molecular

A absorção da radiação por um meio material é uma interação quantificada, que depende da estrutura das espécies atômicas ou moleculares envolvidas. Quando um feixe de radiação atravessa um meio material (sólido, líquido ou gasoso), certas frequências podem ser seletivamente absorvidas. A energia dos fótons absorvida é fixada por átomos ou moléculas cujos elétrons, conseqüentemente, sofrem excitação, passando do seu estado energético fundamental para estados energéticos superiores. Assim, nas transições entre dois níveis quânticos de energia como, por exemplo, de E_0 (estado fundamental) para E_1 (primeiro estado excitado), a quantidade de energia absorvida é determinada pela equação de Bohr (**equação 2.3**),

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \nu = h c / \lambda, \quad (2.3)$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo, h é a constante de Planck, ν é a frequência e λ é o comprimento de onda da radiação absorvida.

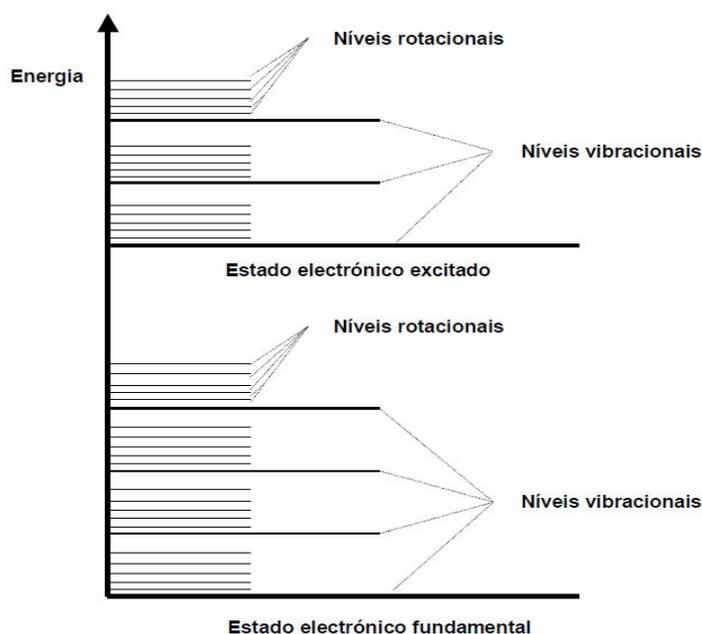


Figura 2.2.1 – Estados eletrônicos moleculares.

A energia total de uma molécula compreende três tipos diferentes de energia: rotacional, vibracional e eletrônica [184]. A energia rotacional está associada à rotação da molécula em torno do seu centro de gravidade. A energia vibracional está relacionada com a vibração dos átomos ou grupos de átomos dentro da molécula e, por fim, a energia eletrônica está relacionada com a distribuição dos elétrons pelos estados orbitais em torno dos núcleos dos átomos. Estes três tipos de energia contribuem para a energia total da molécula e estão quantificados, de modo que, para cada estado eletrônico, existe um conjunto de níveis vibracionais e rotacionais, como se pode observar na **figura 2.2.1**.

2.2.1. Absorção no UV-Visível

A intensidade dum feixe luminoso diminui, ao atravessar qualquer meio absorvente, de acordo com uma lei exponencial geral

$$I(\lambda) = I_0 e^{-\alpha \lambda b}, \quad (2.4)$$

em que I_0 e I são, respetivamente, as intensidades do feixe incidente e do feixe transmitido, α_λ é o coeficiente de absorção (cm^{-1}), e b é a espessura do meio absorvente (cm).

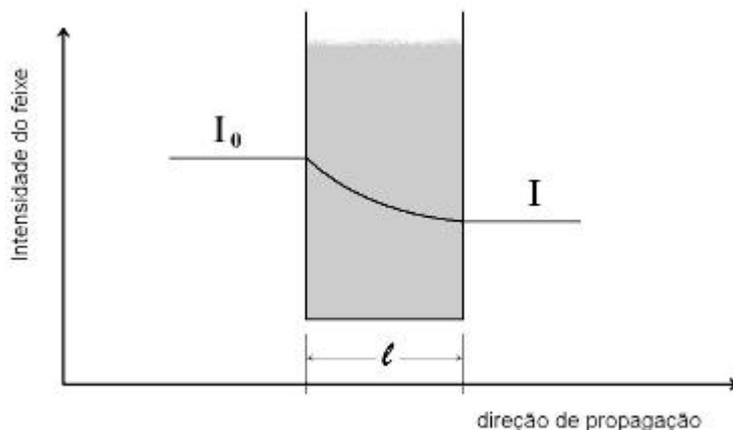


Figura 2.2.2 – Diagrama representativo da absorção de luz por uma amostra em função da distância percorrida pela luz no interior da amostra.

Define-se transmitância T_λ como

$$T_\lambda = \frac{I_\lambda}{I_0}, \quad (2.5)$$

e absorvância, A_λ , ou densidade óptica (D.O.), como

$$A_\lambda = -\log_{10} T_\lambda, \quad (2.6)$$

Quando o meio absorvente é uma solução, com uma dada concentração C , de espécies absorventes, interessa relacionar α_λ com a concentração, sendo

$$\alpha_\lambda = 2.303 \varepsilon_\lambda C, \quad (2.7)$$

em que ε_λ é o coeficiente de extinção molar ou absortividade molar, que é uma medida da intensidade da banda de absorção. Se a concentração for expressa em M (mol L^{-1}), ε_λ virá em $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Usando as relações anteriores, pode então escrever-se

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda b C, \quad (2.8)$$

que é a forma habitual da lei de Beer. Esta lei prevê uma proporcionalidade directa entre a absorvância e a concentração, para soluções diluídas e em que exista apenas uma espécie absorvente. Para concentrações superiores a 0,01 M, verificam-se desvios à linearidade entre a absorvância e a concentração, pois o coeficiente de absorção molar deixa de ser constante, devido a interações entre as núvens eletrónicas das espécies absorventes.

O processo de absorção resulta na transição de um elétron para um estado de energia mais elevado, ficando a molécula no estado excitado. Para que as moléculas percam esse excesso de energia, voltando o elétron ao estado fundamental, existem essencialmente dois tipos de processos: intramoleculares e intermoleculares.

2.2.1.1. Espectrofotómetro

Um espectrofotómetro (**figura 2.2.3**) de UV-Vis consiste essencialmente em quatro elementos: a fonte de luz UV-visível, o monocromador, o porta-amostras e o detector. Os espectrofotómetros de UV-Vis podem operar com feixe único ou duplo, sendo que o último tipo é o mais utilizado por eliminar facilmente as interferências da célula de amostra, refletância da amostra, etc.

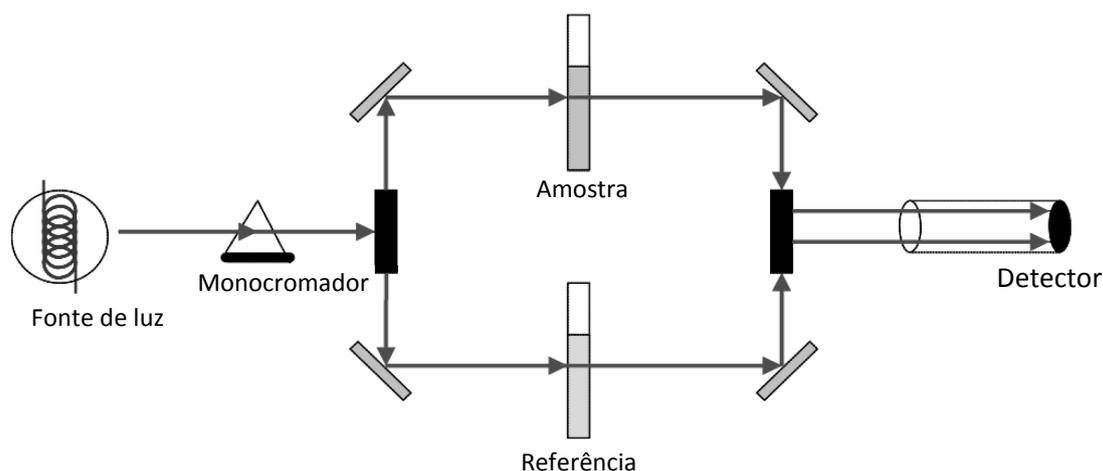


Figura 2.2.3 – Esquema de um espectrofotómetro de duplo feixe.

A obtenção do espectro baseia-se na detecção da luz transmitida pela amostra. As amostras líquidas são colocadas em células com dimensões muito precisas. As células de vidro não podem ser usadas para UV porque este material absorve nesta gama, ao passo que o quartzo é transparente para comprimentos de onda superiores a 180 nm. A radiação emitida pela fonte passa pelo monocromador que a faz variar pelo intervalo de comprimentos de onda a medir. Um sistema de espelhos divide a radiação incidente em dois feixes iguais (nos modelos que operem em duplo feixe), sendo um feixe direcionado para a célula com a referência (geralmente o solvente da amostra) e o outro para a amostra. Ambos os feixes são posteriormente enviados para o detector, que mede a diferença de intensidade para cada comprimento de onda e envia os dados para um sistema informático, que guardará o gráfico do espectro.

Os espectros de absorção para este trabalho foram determinados num espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu, modelo UV-3101PC.

2.2.2. Fluorescência e transferência de energia

Existem vários processos intermoleculares de desexcitação (**figura 2.2.4**). Além da fluorescência, podem ocorrer vários processos de inibição (“*quenching*”) de fluorescência, devido à presença de oxigénio, átomos pesados ou outros inibidores presentes na amostra.

Os processos fotofísicos de transferência de energia eletrónica e transferência electrónica também contribuem para inibir ou suprimir a emissão de fluorescência. As espécies inibidoras são conhecidas como *quenchers* e podem inibir total ou parcialmente a luminescência das amostras. O *quenching* (reversível ou irreversível) ocorre durante as várias interações entre a amostra e o inibidor. Na presença de inibidores, a expressão do rendimento quântico de fluorescência toma a forma:

$$\Phi_F = K_F / (K_F + K_{IS} + K_I + K_q[Q]) \quad (2.10)$$

em que K refere-se às constantes de velocidade dos processos de fluorescência (K_F), conversão intersistemas (K_{IS}), conversão interna (K_I) e de inibição de fluorescência (K_q), e $[Q]$ é a concentração da espécie inibidora. A **figura 2.2.4** ilustra alguns processos fotofísicos de desexcitação eletrónica. Processos de conversão interna

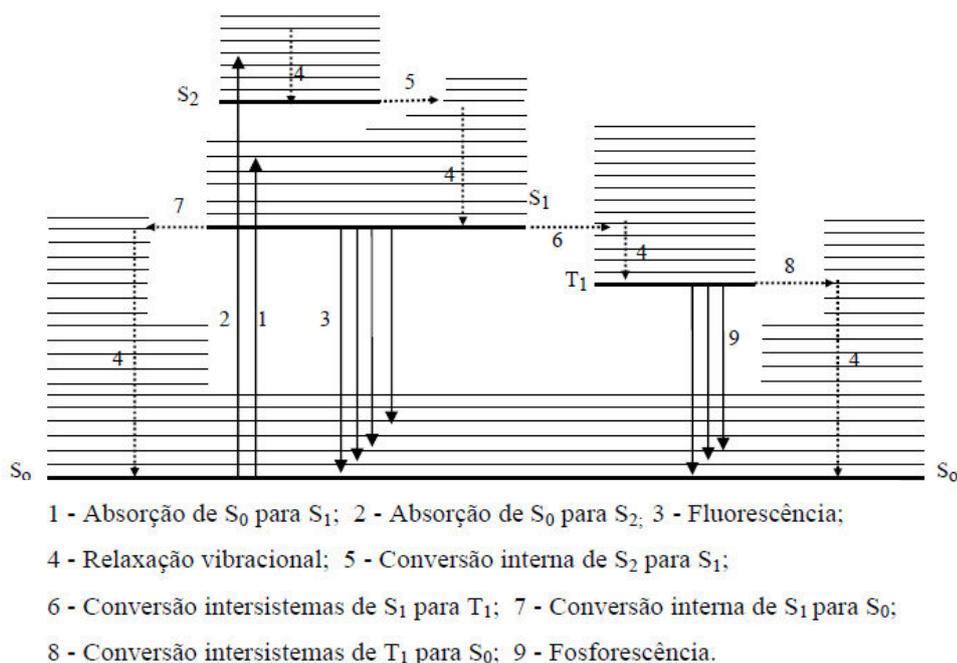
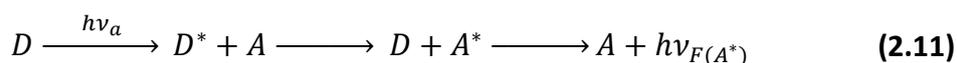


Figura 2.2.4 - Processos fotofísicos de desexcitação eletrónica.

ocorrem na passagem da molécula de um estado eletrónico de maior energia com nível vibracional de menor energia, para um estado eletrónico de menor energia, mas com nível vibracional excitado, sempre entre estados da mesma multiplicidade. No caso da conversão intersistemas, a passagem do electrão ocorre entre estados de multiplicidade diferente. Na transferência direta de energia eletrónica, um dador excitado (D^*) transfere energia para um aceitante (A), observando-se depois a emissão do aceitante.



A eficiência deste processo depende da sobreposição entre o espectro de emissão de D^* e o espectro de absorção de A. Depende também da distância entre D^* e A (à razão de d^{-6}) podendo ocorrer até distâncias de cerca de 80 Å. O estudo deste processo permite determinar distâncias entre moléculas (régua molecular), ou distâncias entre resíduos diferentes de uma mesma macromolécula. Na transferência eletrónica fotoinduzida (**equações 2.12 e 2.13**), ocorre a transferência de um eletrão entre a espécie excitada e um doador ou aceitante. Este processo é favorecido no estado excitado, dado que os estados excitados são melhores aceitantes e dadores eletrónicos que o estado fundamental.



2.2.2.1. Espectrofluorímetro

O espectrofluorímetro (**figura 2.2.5**) é o equipamento usado para medir a intensidade de emissão de fluorescência em função do comprimento de onda. É constituído por uma fonte de radiação contínua com excitação no ultravioleta e visível, habitualmente uma lâmpada de arco de xénon. A radiação passa por um monocromador (monocromador de excitação) antes de incidir na amostra, excitando as moléculas da espécie em estudo. De seguida, a radiação emitida pela amostra passa por um segundo monocromador (monocromador de emissão) e, por fim, no fotomultiplicador onde é amplificada e registada.

A variação do comprimento de onda pode ocorrer de duas formas, dando origem a dois tipos de espectros: o de espectro de emissão e o espectro de excitação.

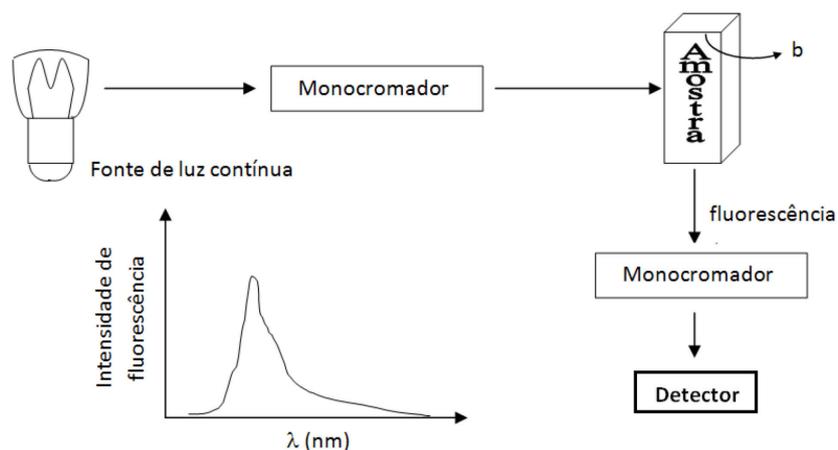


Figura 2.2.5 – Esquema de espectrofluorímetro e exemplo de um espectro de fluorescência.

O espectro de emissão determina-se mantendo o primeiro monocromador na mesma posição, num comprimento de onda em que a amostra absorva, ao mesmo tempo que se faz variar o segundo, medindo a fluorescência para cada comprimento de onda da luz emitida. Por outro lado, fazendo variar o primeiro monocromador e mantendo o segundo numa posição em que a amostra emita, o espectro de excitação mede a fluorescência emitida em um comprimento de onda definido, para uma excitação de energia variável. Este espectro relaciona-se com o espectro de absorção obtido pelo espectrofotómetro, que determina a quantidade de radiação absorvida pela amostra. A diferença entre os dois espectros é a quantidade de energia absorvida que não dá origem a fluorescência.

Neste trabalho, os espectros de excitação e emissão de fluorescência foram obtidos com um espectrofluorímetro com monocromadores duplo Spex 1680, com as fontes de alta voltagem HV1=950 (canal de amostra) e HV2=400 (canal do contador quântico que monitora a intensidade de luz de excitação), e fendas reguladas a 2 mm, caso indicação em contrário. Foram usadas curvas de correcção, fornecidas pelo fabricante do equipamento, que apenas permitem recolher espectros de excitação até um máximo de 600 nm.

2.2.3. Microscopia de Fluorescência

Um microscópio de fluorescência, para além da luz refletida e absorvida, trabalha também com a luminescência da amostra em estudo (fluorescência ou fosforescência). Para isso é normal o uso de cubos de filtros, os quais filtram a luz que

excita a amostra (filtro de excitação), assim como a luz emitida pela amostra (filtro de emissão ou supressão), de modo a que a amostra receba apenas aquela luz que a faz fluorescer e que apenas a radiação emitida pela amostra seja detectada. Estas funções podem ser combinadas recorrendo a um único espelho dicróico. Assim, podem alinhar-se a radiação incidente e a radiação emitida pela mesma linha directiva mas movimentando-se em sentidos contrários [185]. Obtém-se o que se chama imagem de epifluorescência.

Com esta tecnologia é possível obter imagens de alta resolução além do limite de resolução de um microscópio óptico [186].

As imagens obtidas para este trabalho foram capturadas pela câmara de um microscópio de fluorescência Leica DM 5000B. Neste equipamento existe a possibilidade de escolher entre três cubos de filtros: os cubos A, GFP e N2, cujas características estão resumidas na **tabela 2.2.1**.

Tabela 2.2.1 – Dados relativos aos filtros dos cubos do microscópio usado para este trabalho.

Cubo	Filtro de excitação	Espelho dicróico	Filtro de supressão
A	BP ²¹ 360/40 nm	400 nm	BP 470/40
GFP	BP 470/40	500	BP 525/50
N2	BP 515 - 560	580	LP ²² 590

Pelos dados da **tabela 2.2.1**, apenas o cubo N2 está apto a que se detecte fluorescência da zona do espectro em que os pontos quânticos e as benzofenoxazinas emitem, ou seja, acima dos 590nm. Isto acontece porque os filtros LP apenas impõem um limite inferior aos comprimentos de onda da radiação emitida, enquanto nos BP esse limite é simultaneamente inferior e superior, com a largura de uma banda de 40 nm. Porém, nesse mesmo cubo N2 o filtro de excitação apenas permite a passagem de radiação com comprimento de onda entre 515 nm e 560 nm, numa zona menos favorável, já que a sua absorção, após a banda excitónica, sobe continuamente com a diminuição do comprimento de onda.

²¹ BP – Band Pass.

²² LP – Long Pass.

2.3. Procedimento experimental na síntese dos nanossistemas

Os pontos quânticos de CdSe/ZnS foram sintetizados através do método de microemulsão de água em óleo, com o uso de AOT como surfatante (ver secção 1.1.3.3) Estas experiências continuam o trabalho que tem vindo a ser realizado no nosso laboratório no desenvolvimento de aplicações baseadas em nanopartículas [78]. Para este fim utilizou-se uma solução de AOT 0.2 M em ciclohexano, de modo a usar estas micelas invertidas como microrreatores, como já foi descrito atrás.

2.3.1. Síntese dos núcleos de CdSe

De forma genérica, a dois tubos com uma solução de AOT em ciclohexano, a que chamaremos de tubo 1 e tubo 2, foi adicionada uma solução aquosa que continha os agentes reativos que formariam o núcleo, em igual quantidade de átomos de cádmio e selénio respetivamente. Ao juntar a solução aquosa formaram-se micelas invertidas.

Após a junção do conteúdo do tubo 2 ao tubo 1, sempre gota-a-gota no vortex, foi adicionada também ao tubo 1 uma solução aquosa de Na_2SO_3 1 M, feita na altura, para limitar a oxidação durante a reação devido ao facto de nenhum destes procedimentos de síntese ter ocorrido em atmosfera controlada. A quantidade de água presente nas soluções de Cd, Se e Na_2SO_3 determinava o importante fator ω_0 . Fechando bem o tubo, aqueceu-se em banho-maria durante 60 minutos.

Este são os traços gerais dos procedimentos de síntese de núcleos de pontos quânticos, nos quais se foram inserindo alguns fatores variáveis como a quantidade de Cd (sempre igual à de Se), a quantidade de água na microemulsão, sonificação após a junção de reagentes, a posição do tubo durante o aquecimento, o tempo e a temperatura de reação (que se situou entre $\approx 75^\circ\text{C}$ e os $\approx 90^\circ\text{C}$ no banho).

O reagente reativo de Se foi o poli-seleneto, Se_n^{2-} , cujo processo de formação consiste em adicionar à solução aquosa que o contém uma base forte, um agente redutor e DMF ou DMSO como solvente, tal como se explica a seguir. Em todos os ensaios, foi utilizada hidrazina mono-hidratada, de concentração 20,188 M, como agente redutor e como base usou-se uma solução de TEAH (hidróxido de

tetraetilamónio, 25% em metanol), ou hidróxido de sódio 8,25M (NaOH, 50% em água).

A seguir indica-se um procedimento completo (o mais usado nesta tese) para a síntese bem-sucedida de núcleos CdSe:

A. Procedimento para a preparação do núcleo de CdSe:

I. Tubo 1

1. Num eppendorf, juntou-se 19,2 µl da solução de Cd²⁸⁺ 0,2 M em 60,8 µl de H₂O, ficando uma solução de 0,063 M.
2. No tubo I, injectou-se no vortex gota-a-gota 67,2 µl da solução anterior em 2,5 ml da solução de AOT/Ch de 0,2 M.
3. Juntou-se ao tubo I, no vortex, 8 µL da solução de NaSO₃ de 1 M (feita na altura devido à sua instabilidade ao oxigénio do ar).
4. A **equação 2.14** permite calcular o ω_0 .

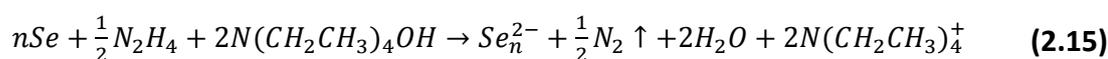
$$\omega_0 = \frac{[H_2O]}{[AOT]} = \frac{\left[\frac{V_{H_2O} \frac{d(H_2O)}{18 \text{ g.mol}^{-1}}}{V_{\text{solução}}(\text{dm}^3)} \right]}{0.2} \quad (2.14)$$

Neste passo a solução final fica com $\omega_0 = 4.18$.

- a. $V_{H_2O} = \frac{\frac{m(\text{Na}_2\text{SO}_3)}{1\text{M}}}{\text{PM}(\text{Na}_2\text{SO}_3)} = 7,937 \times m(\text{Na}_2\text{SO}_3)$.
 - b. Depois de pesar pelo menos 2 mg de NaSO₃ e juntar a água necessária, sonificou-se o eppendorf ligeiramente até diluir completamente.
5. Caso se criasse algum depósito neste tubo, sonificou-se ligeiramente para diluir.

II. Tubo 2

A **equação 2.15** é a que descreve o processo químico de formação do selénio nos núcleos, no qual nos baseamos para os cálculos seguintes [78]:



1. Assim, os volumes utilizados para a solução de selénio terão que ser calculados pelas seguintes expressões:

- a. $V_{base} = 5,686 \times m_{Se}$ (2º)
- b. $V_{hidrazina} = 1,229 \times m_{Se}$ (3º)
- c. $V_{DMF\ ou\ DMSO} = V_{Cd} - V_{base} - V_{hidrazina}$ (1º)
- d. Neste passo, independentemente da receita, fez-se sempre os cálculos de selénio com a seguinte fórmula para o volume de base:

$$V_{base} = 0,2 \times \frac{2}{n} \times 100x \times \frac{1}{C_{base}}, \text{ em que } x \text{ é igual à massa pesada a}$$

dividir pelo equivalente necessário ao volume total de 100 µl, ou seja, $m_{Se}/1,5792$ mg, e $C_{base} = 1,485$ M ou 8,25 M, consoante o caso.

2. Juntou-se no eppendorf do Se os volumes calculados, pela ordem dos números indicada e sonificou-se durante 10 s.
3. Injectou-se, gota-a-gota no vortex, o mesmo volume de Cd 0,2 M (16 µl) mas da solução de Se, a outros 2,5 ml da solução de AOT/Ch de 0,2 M.
4. Caso se criasse algum depósito neste tubo, sonificou-se ligeiramente para diluir.

III. Junção do conteúdo dos tubos

1. Juntou-se no vortex gota-a-gota o tubo 2 ao tubo 1.
2. Fechou-se bem o tubo e pousá-lo no fundo do frasco com água.
3. Aqueceu-se em banho-maria durante 60 min, com a água a cerca de 90°C.

Este procedimento (A) é o resultado de várias tentativas prévias, nas quais foram estudadas as influências da variação de alguns parâmetros (capítulo 3).

2.3.2. Síntese da coroa de ZnS

A camada de sulfureto de zinco é importante por variadas razões, entre as quais passivar, proteger e estabilizar o núcleo, impedir a libertação de cádmio e selénio, aumentar o rendimento quântico de fluorescência e facilitar a conjugação/funcionalização da superfície dos pontos quânticos (ver secção 1.1.2.6).

Com um método de base semelhante ao utilizado na síntese dos núcleos, este foi o procedimento utilizado para o crescimento da coroa de ZnS.

B. Procedimento para a preparação da coroa de ZnS

IV. Tubo 3

1. Encheu-se com 2,5 ml da solução de CdSe (previamente sintetizado).

V. Tubo 4

2. Preparou-se num eppendorf uma solução de ZnCl_2 com a mesma concentração da de Cd usada no ponto I e juntou-se um volume igual **(1:1)**, metade **(2:1)** ou o dobro **(1:2)** do de Cd, gota-a-gota no vortex, à mesma quantidade de AOT/Ch do passo anterior. O procedimento é o mesmo que no passo I, mas sem a adição de NaSO_3 .

VI. Tubo 5

3. Preparou-se num eppendorf uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (a) ou $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ (b) com a mesma concentração da de Cd e juntou-se um volume igual ao de Zn, no vortex gota-a-gota, à mesma quantidade de AOT/Ch do passo IV. O procedimento é o mesmo que no passo I, mas sem a adição de NaSO_3 .

VII. Junção do conteúdo dos tubos

4. Juntou-se o conteúdo do tubo 4 ao tubo 3 (com pipeta de Pasteur).
5. Juntou-se o conteúdo do tubo 5 ao tubo 3 (com pipeta de Pasteur).
6. Aqueceu-se em banho-maria durante 60 min, com a água a cerca de 90°C .

Os resultados finais relativos às partículas nem sempre se reproduziam completamente, o que levava algumas amostras a serem descartadas devido aos seus espectros anómalos. Contudo, para todas as razões CdSe:ZnS houve pelo menos um ensaio com bons resultados. Decidiu-se portanto continuar os trabalhos com a razão 1:1 e usar ZnCl_2 como fonte de zinco.

Numa primeira fase começou por se sintetizar a coroa de ZnS recorrendo a $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ como fonte de sulfureto. Como a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ se deteriorou, alterou-se posteriormente a fonte de sulfureto para tioureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$). Isto teve como consequência a necessidade de alterar o processo de lavagem das partículas, como descrito a seguir.

2.3.3. Lavagem e mudança de solvente

Para mudar o solvente evaporou-se o ciclohexano da solução de nanopartículas (cuja coroa foi sintetizada com $(\text{NH}_4)_2\text{S}$), criando-se um depósito viscoso de AOT com pontos quânticos. De seguida juntou-se a quantidade de volume evaporado em etanol,

sonificando até ressuspender totalmente a amostra. Ao juntar água em vez de etanol, verificou-se que as partículas não permaneciam em suspensão por muito tempo.

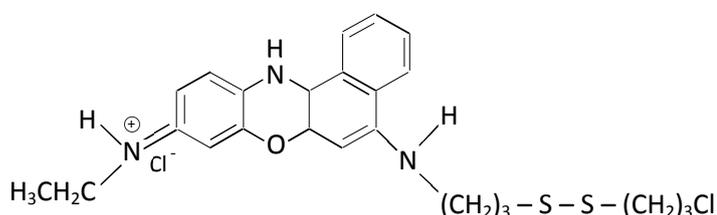
De modo a separar o AOT das partículas, em etanol, realizaram-se duas centrifugações a 3000 rpm, descartando o sobrenadante, e ressuspensando novamente em etanol. Como já foi referido atrás, este procedimento deixou de ser eficiente quando se passou a sintetizar a coroa com $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ em vez de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. A decomposição da tioureia resulta em sulfito de hidrogénio e cianamida segundo a seguinte reacção reversível [187]:



A cianamida resultante da fixação do sulfureto na camada de ZnS contribui para uma fase de impurezas que pode dificultar a purificação e afectar a conjugação posterior da benzofenoxazina. Nesta situação o procedimento para retirar o AOT consistiu em juntar metanol à solução em etanol, numa razão de 3:2 (metanol:etanol), seguindo-se quatro centrifugações a 3000 rpm. Em cada centrifugação as partículas de cor vermelha a depositavam-se no fundo, ficando o AOT no topo. Separavam-se as partículas do fundo e, para melhorar o rendimento de extracção, antes da centrifugação seguinte redispersava-se o sobrenadante no sonificador. No final secou-se as partículas resultantes e redispersou-se na quantidade de etanol inicial.

2.3.4. Conjugação dos pontos quânticos

O sal benzofenoxazínico usado para o desenvolvimento de conjugados baseados em pontos quânticos é da seguinte forma:



Esquema 2.3.1 – Benzofenoxazina usada para a conjugação de pontos quânticos nesta tese.

Devido à ligação S – S na molécula, ela teve de ser quebrada para que se proporcionasse a ligação tiol às nanopartículas. Para isso juntou-se à solução de benzofenoxazinas do **esquema 2.3.1**, com concentração 1×10^{-3} M em etanol, uma

outra solução de igual molaridade de hidrazina mono-hidratada e hidróxido de sódio. Depois desta junção da benzofenoxazina com a base+hidrazina, aqueceu-se durante 10 minutos a solução antes de se injectar na solução de pontos quânticos purificados. Alternativamente, foi neste ponto que se adicionou outros ligandos de solubilização, MDA²³, antes da mistura com os pontos quânticos. Fez-se conjugações dos ligandos isolados ou simultaneamente com a benzofenoxazina, como descrito nos resultados.

Para determinar a quantidade de benzofenoxazina a adicionar aos pontos quânticos para conjugação, calculou-se o diâmetro das partículas e a quantidade aproximada de átomos à superfície. Para uma concentração média de partículas de cerca de 4 µM, juntou-se 3,1 µl de MDA 0,2M a cada 1 ml de solução de pontos quânticos CdSe/ZnS. No caso de conjugação simultânea com benzofenoxazinas, a molaridade desta foi igual à de MDA.

De modo a confirmar que os pontos quânticos estavam efectivamente ligados à benzofenoxazina, tiveram que se conjugar as medidas de absorção com as de emissão, e, através das diferenças espectrais, detectar as alterações após o procedimento de conjugação. Quando, após a conjugação, a emissão na zona dos pontos quânticos deixa de existir, apenas o espectro de absorção poderá denunciar a sua presença. A confirmar-se que está a ocorrer transferência de energia das nanopartículas para os fluoróforos, mesmo aí pode acontecer que estes estejam apenas próximos das partículas, mas não ligados. No caso de a conjugação não se ter efetivado, uma lavagem em etanol iria fazer reduzir a emissão apenas das benzofenoxazinas (mais solúveis), ou em maior quantidade que a perda de fluorescência das partículas. Então, o método que se utilizou foi a lavagem em etanol seguida de medição do espectro de emissão. Caso a razão entre os picos de emissão se mantivesse, concluiu-se que o sistema estava conjugado.

2.3.4.1. Cálculo da concentração e do diâmetro dos pontos quânticos

Para o cálculo da concentração e do diâmetro médio dos pontos quânticos utilizou-se o modelo e as relações encontradas na referência [49]. A equação que

²³ MDA – MercaptoDodecanoic Acid (SHCH₂ (CH₂)₉ COOH)

permite calcular o diâmetro dos pontos quânticos, e conseqüentemente do seu volume, é a **equação 2.17**:

$$D_{CdSe} = (1.6122 \times 10^{-9})\lambda^4 - (2.6575 \times 10^{-6})\lambda^3 + (1.6242 \times 10^{-3})\lambda^2 - (0.4277)\lambda + 41.57 \quad (2.17)$$

onde D_{CdSe} é o diâmetro dos pontos quânticos de seleneto de cádmio e λ é o comprimento de onda do pico de emissão máxima de fluorescência.

Com o modelo referido, a introdução do valor do primeiro pico de absorção e da largura a meia altura da fotoluminescência, permitiu determinar a concentração de CdSe resultante das lavagens (**equações 2.8, 2.18 e 2.19**):

$$\varepsilon = 1600 \Delta E(D)^3 \quad (2.18)$$

$$A = A_m(fwhm)_{PL}/K' \quad (2.19)$$

em que ε é o coeficiente de extinção molar; ΔE é a energia de transição correspondente ao primeiro pico de absorção (em eV); D é o diâmetro dos pontos quânticos, calculado pela **equação 2.17**; A e A_m são a absorvância calibrada e a absorvância medida, respectivamente; $(fwhm)_{PL}$ é a largura a meia altura do espectro de emissão de fluorescência das partículas para as quais se está a fazer este cálculo; e K' é a $(fwhm)_{PL}$ média das amostras padrão calculada no artigo (25 nm). Para o cálculo da concentração recorre-se à Lei de Beer (**equação 2.8**).

Tomando em consideração que a conjugação se procede após o crescimento da camada de ZnS e, por causa disso, em partículas maiores que as determinadas pelo modelo descrito atrás, fez-se um simples cálculo do diâmetro aumentado às partículas pela mesma quantidade de CdSe, a menos da diferença entre as constantes de rede [188]. Chegou-se à conclusão que para uma partícula de 3,5 nm existiriam 157 átomos de Sulfureto à superfície, onde se poderiam formar ligações tiol com outras moléculas.

2.4. Ensaíos biológicos

Todos os ensaios biológicos foram realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. O meio de crescimento da levedura foi YPD, preparado em água desionizada, com a seguinte composição (para 1 litro):

a. 2% glucose: 20 g

b. 1% peptona: 10 g

c. 0,5% extracto de levedura: 5 g

d. Para os crescimentos em meio sólido (YPDA) em placas, juntou-se a este meio: 2% de agar (20g). As leveduras foram repicadas, periodicamente, neste meio líquido (YPD) em balões de Erlenmeyer com capacidade de 500 ml, com um volume total de 200 ml de meio. Os balões foram colocados numa incubadora orbital a 140 rpm a 30°C. O crescimento decorreu durante a noite, até uma densidade óptica de 0,5-0,6, altura em que a cultura se encontrava em fase exponencial de crescimento. Seguiu-se a recolha das células por centrifugação a 7000 rpm durante 2 minutos, e posterior lavagem destas com água desionizada. Finalmente as células foram ressuspensas em PBS (0,14 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,010 M PO_4^{3-}), para uso nos ensaios descritos abaixo.

2.4.1. Obtenção dos esferoplastos

Para a obtenção dos esferoplastos usaram-se duas abordagens.

Primeira abordagem: A 100 µl de uma suspensão de células em PBS, preparada como descrito acima, juntou-se 1 µl de zymolase (concentrado 50mg/ml, 0.1M sorbitol) e aguardou-se 30 minutos.

Segunda abordagem [189]: Após crescimento da cultura de leveduras como descrito acima, recolheram-se as células por centrifugação a 1200 g durante 5 minutos; lavou-se sucessivamente com 20 ml de EDTA 0.1 M, sorbitol 1,2 M e tampão SCEM (1,2 M sorbitol; 10 mM EDTA; 100 mM citrato pH 5,8; 30 mM 2-β mercaptoetanol). Ressuspendeu-se o sedimento de células em 15 ml de tampão SCEM, juntou-se 2 µl de lyticase (2 u/µl em 20% glicerol) e incubou-se 30 minutos a 30°C. Centrifugou-se a suspensão de esferoplastos 300 g durante 5 minutos e lavou-se com 20 ml de sorbitol 1,2 M e tampão STC (1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Ressuspendeu-se em 1 ml de tampão STC.

2.4.2. Incorporação dos pontos quânticos nas células

Com os esferoplastos preparados pela primeira abordagem e com suspensões de células inteiras, usou-se um procedimento simples de adição de pontos quânticos, assim como de benzofenoxazina isolada, directamente às células ou aos esferoplastos,

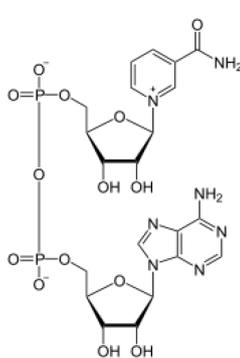
aguardando-se 30 minutos antes de se visualizar no microscópio de fluorescência. As quantidades estão indicadas nos resultados.

Num segundo procedimento foram utilizados os esferoplastos preparados pela segunda abordagem e suspensões de células inteiras, como a seguir se descreve: a 100 μ l de suspensão (células ou esferoplastos) adicionou-se 10 μ l de pontos quânticos, geralmente entre 4 e 10 μ M (ver resultados), com a adição simultânea de 5 μ L de BSA 20 mg/ml, de modo a minimizar a adsorção não-específica às membranas. Depois de 30 minutos à temperatura ambiente adicionou-se 900 μ L de tampão com PEG (20% W/V PEG8000 (Fluka), 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 7,5, filtrado). Após uma segunda incubação de 30 minutos as suspensões foram centrifugadas a 300g durante 5 minutos e o sedimento lavado duas vezes com sorbitol 1.2 M. Finalmente as células ou esferoplastos foram recuperados por centrifugação a 200 g durante 4 minutos, para remover pontos quânticos não incorporados. Realizaram-se os controlos sem o passo em que se adiciona PEG, sem o passo da adição de BSA, e sem digestão mas com PEG e BSA.

2.5. Monitorização da transformação de NADH em NAD⁺

Como já foi explicado na secção 1.3.8.1, sistemas baseados em pontos quânticos podem ser usados para a detecção de transformações biocatalíticas dependentes de NADH.

Tabela 2.5.1 – Fórmula molecular e massa molar do NADH

Fórmula Molecular do NADH	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ 
Massa Molar	663.43 g/mol

Na tentativa de produzir um sistema deste tipo, partiu-se de uma solução-mãe de pontos quânticos conjugados com benzofenoxazina e MDA, e realizou-se o seguinte procedimento.

Soluções preparadas previamente:

1. Solução de 1 ml com 50nM de pontos quânticos conjugados em buffer fosfato 10mM (pH 8.8)
2. Solução de 2 μ M de Benzofenoxazina em buffer fosfato 10mM (pH 8.8)
3. Solução de NADH 25mM (16,6 mg em 100ul, ou 8,3mg em 50 ul)

2.5.1. Ensaio com pontos quânticos conjugados

- **Fluorescência dependente do tempo após a adição de NADH:**
 - Retirou-se 500ul de **1** para a cuvete de fluorescência
 - Mediu-se espectro de fluorescência de **1**
 - Juntou-se 10ul de **3** à solução **1**, de modo a ficar com 0,5mM de NADH
 - Mediu-se o espectro de fluorescência a cada 3 minutos
- **Razão de intensidade de fluorescência dependente da concentração de NADH:**
 - Retirou-se 500ul de **1** para a cuvete de fluorescência
 - Mediu-se o espectro de fluorescência de **1**
 - Juntou-se 1ul de **3** à solução **1**, de 15 em 15 minutos, aumentando 50uM de NADH
 - Mediu-se o espectro de fluorescência antes de cada adição

2.5.2. Ensaio com benzofenoxazina

- **Fluorescência dependente do tempo após a adição de NADH:**
 - Retirou-se 500ul de **2** para a cuvete de fluorescência
 - Mediu o espectro de fluorescência de **2**
 - Juntou-se 10ul de **3** à solução **2**, de modo a ficar com 0,5mM de NADH
 - Mediu-se o espectro de fluorescência a cada 3 minutos

- **Razão de intensidade de fluorescência dependente da concentração de NADH:**
 - Retirou-se 500ul de **1** para a cuvete de fluorescência
 - Mediu-se o espectro de fluorescência de **1**
 - Juntou-se 1ul de **3** à solução **1**, de 15 em 15 minutos, aumentando 50uM de NADH
 - Mediu-se o espectro de fluorescência antes de cada adição

2.6. Dependência da concentração de Iodeto e Acrilamina

Nesta fase do trabalho realizaram-se ensaios de medição de fluorescência em função da concentração de iodeto e de acrilamina, tanto para pontos quânticos conjugados, como para a benzofenoxazina. O procedimento é em tudo semelhante ao anterior para a dependência da fluorescência na presença de NADH.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

No capítulo anterior foram descritos os procedimentos para a síntese, conjugação e caracterização dos nanossistemas baseados em pontos quânticos. De seguida reuniremos os resultados das diferentes etapas em direção ao objetivo desta tese.

3.1. Síntese dos núcleos CdSe

Como referido atrás, depois da etapa inicial de aperfeiçoamento do método de síntese (resultados mais à frente), chegou-se a um procedimento base para síntese de núcleos CdSe, cujos espectros típicos se encontram na **figura 3.1.1**:

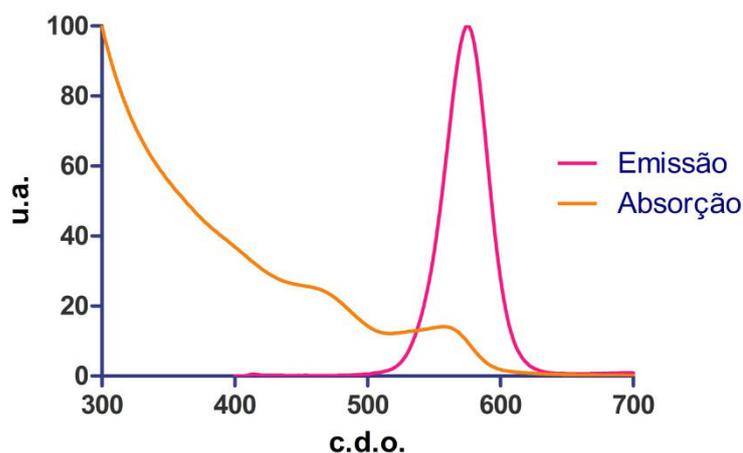


Figura 3.1.1 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência e de absorção de pontos quânticos CdSe em AOT/Ch, sintetizados pelo procedimento A (secção 2.3.1). Pico de emissão a 598nm. Largura a meia altura: 34nm.

Esta **figura 3.1.1** revela uma banda de emissão estreita, simétrica, e com a ausência de uma banda para os longos comprimentos de onda, característica de pontos quânticos com defeitos à superfície.

3.1.1. Efeito da variação de alguns parâmetros

Como descreveremos de seguida, a variação de vários fatores parecem demonstrar a importância de um estudo cuidadoso e metódico para chegar a um procedimento próximo do ideal, de acordo com as características pretendidas: pontos

quânticos núcleo/coroa de CdSe/ZnS com banda de emissão estreita e simétrica, sem defeitos, e com pico de emissão próximo dos 610nm.

3.1.2. Temperatura

Na **figura 3.1.2** estão presentes os espectros de emissão de fluorescência correspondentes a uma variação de temperatura aquando da síntese de pontos quânticos. Nesta fase injetou-se na solução de AOT/Ch a quantidade de cádmio presente em 11.5 μ L de solução aquosa 0.2M ($\omega_0 = 3$), com o tubo encostado no fundo do erlenmeyer, durante o aquecimento de 60 minutos.

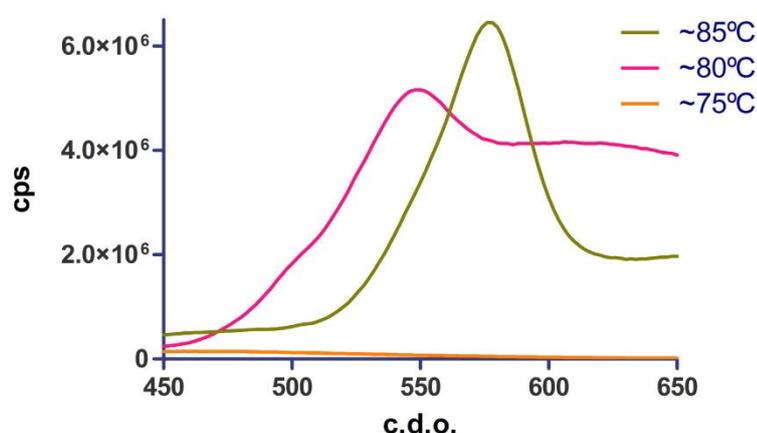


Figura 3.1.2 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe, sintetizados pelo procedimento A com distintas temperaturas.

Como se evidencia, a temperatura de síntese é um parâmetro fulcral para a formação destas partículas fluorescentes. O aumento da temperatura faz com que a intensidade de fluorescência aumente e a largura da banda de emissão fique mais estreita, possivelmente com a diminuição de defeitos (ver secção 1.1.3.3.6). Apenas se começa a definir uma curva própria de pontos quânticos a partir dos 80°C, onde ainda se encontram defeitos. Não incluímos aqui a temperatura de 90°C pois apenas foi utilizada com outra conjugação de parâmetros.

Contudo, cabe salientar que por vezes o conteúdo da solução fervia, denunciando algumas bolhas a evaporarem dentro do tubo. Isto indica que, dentro do frasco, a temperatura chegava a ser maior que 80 °C, a temperatura de ebulição do ciclohexano. Não se conseguiu total controlo sobre este fator, que se repetiu algumas vezes nem sempre conduzindo aos melhores resultados. Mas não foi possível

sistematizar os resultados destas ocorrências de modo a chegar a qualquer conclusão acerca da sua importância.

3.1.3. Sonificação

Os dados da **figura 3.1.3** são referentes a experiências que foram feitas para comparar o efeito da sonificação, ou ausência dela, durante 2 minutos depois da junção do conteúdo dos tubos 1 e 2. Todos os outros fatores são os mesmos dos descritos para a variação da temperatura.

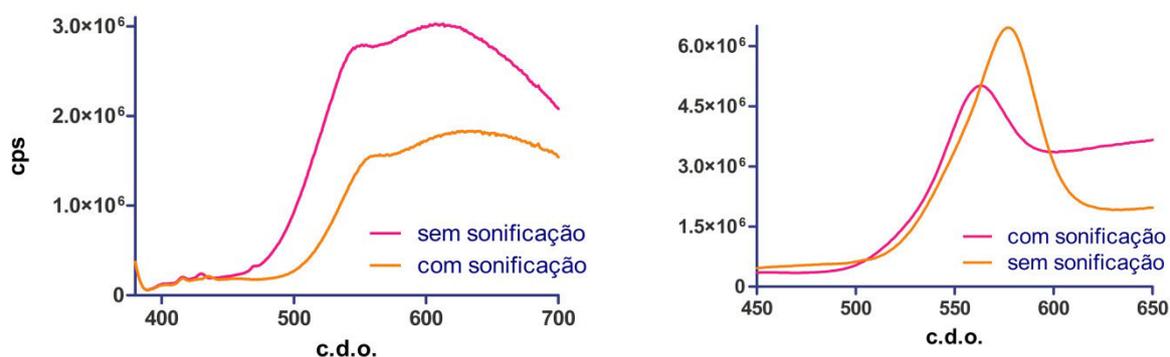


Figura 3.1.3 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe, sintetizados pelo procedimento A. À esquerda: temperatura de síntese 80 °C. À direita: temperatura de síntese 85 °C.

Enquanto no caso da temperatura de síntese de 80 °C, a sonificação diminuiu a intensidade do espectro (à esquerda), no caso da temperatura de síntese de 85 °C, a sonificação fez também que o espectro ficasse mais simétrico. Por estes ensaios, e pelo facto de se conseguir estabilizar a produção de nanocristais com qualidade suficiente sem sonificação (**figura 3.1.4**), deduzimos que esse passo prévio ao aquecimento é desnecessário.

3.1.4. Posição do frasco

Com mais este simples ensaio quisemos apenas testar um procedimento que já vinha a ser usado no laboratório na produção de pontos quânticos. Caso a suspensão do frasco por um suporte durante o aquecimento produzisse resultados positivos, isso melhoraria a reprodutibilidade das experiências.

Como os resultados da **figura 3.1.4** indicam esse não é o caso, uma vez que se torna maior a “cauda” na zona de maior comprimento de onda quando o tubo fica

suspensão, e portanto daqui em diante todos os ensaios foram feitos com o tubo encostado ao fundo do frasco durante o aquecimento.

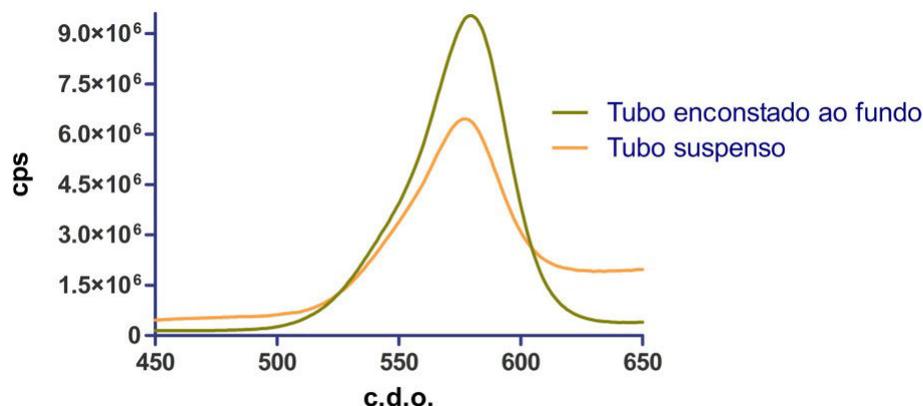


Figura 3.1.4 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe, sintetizados pelo procedimento A, a 90°C. Comparação entre duas posições do tubo durante o aquecimento.

Estes resultados sugerem que o contato do tubo com o vidro do erlenmeyer, por este estar diretamente encostado à placa de aquecimento, cria um microclima com maior temperatura junto ao fundo, importante para a síntese de pontos quânticos no interior do tubo.

3.1.5. Tempo de reacção

Para uma temperatura de 90°C, o tubo da reacção permaneceu 60 minutos em banho-maria encostado ao fundo do frasco. Os resultados na **figura 3.1.5** mostram uma redução acentuada da intensidade de fluorescência após os 60 minutos.

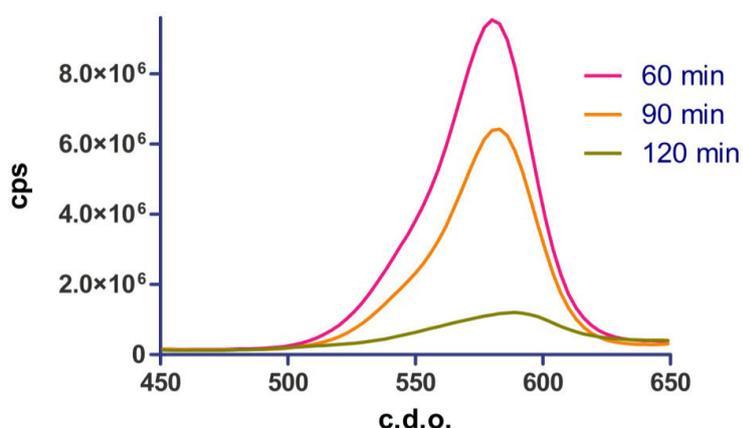


Figura 3.1.5 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe, sintetizados pelo procedimento A, a 90°C. Comparação entre três tempos de reacção: 60, 90 e 120 minutos.

Como se verificou uma ligeira assimetria no espectro de emissão das partículas resultantes, e na tentativa de o corrigir, decidiu-se reintroduzir parte do conteúdo do

mesmo frasco durante mais 30 minutos à mesma temperatura, o que se repetiu duas vezes. A redução de intensidade talvez se deva à degradação da fluorescência por crescimento excessivo, evidenciado pelo desvio para a direita dos espetros. Também pode estar na origem deste resultado a entrada num estágio de aglomeração de partículas, tal como está descrito na ver secção 1.1.3.3.6. Outra causa possível é a presença de oxigénio ter aumentado com a duração do aquecimento.

3.1.6. Variação de ω_0

A variação de ω_0 faz variar não só a quantidade de água dentro das micelas, mas foi também causa de diferentes quantidades de cádmio e selénio em reacção, sempre estequiométrica para estas substâncias. Como esta questão não foi tratada de forma suficientemente sistemática, os espetros da **figura 3.1.6** que se segue terão que ser comparados com a fixação dos parâmetros variáveis, ω_0 e a C_{Cd} (concentração de Cd).

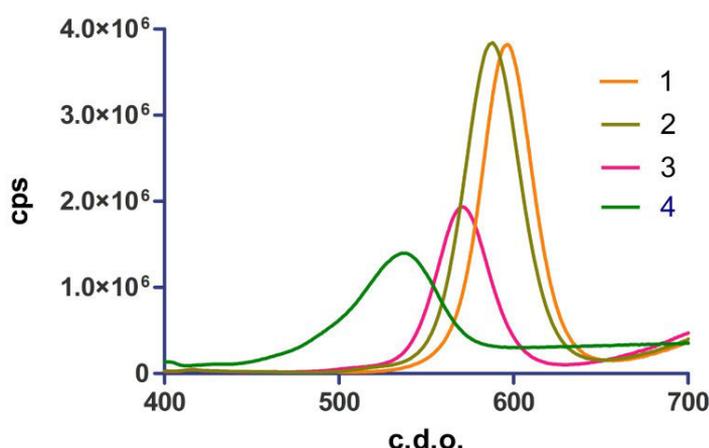


Figura 3.1.6 – Espetros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe, sintetizados pelo procedimento A, a 90°C. Comparação entre quatro combinações dos parâmetros ω_0 e C_{Cd} . 1: $\omega_0 = 4.18$ e $C_{Cd} = 0.063M$; 2: $\omega_0 = 4.15$ e $C_{Cd} = 0.058M$; 3: $\omega_0 = 3$ e $C_{Cd} = 0.05M$; 4: $\omega_0 = 3$ e $C_{Cd} = 0.042M$.

Os resultados evidenciam uma diferença da posição do pico de emissão, desviando-se para a direita com o aumento de ω_0 e a C_{Cd} . Isto é explicável pela maior quantidade de átomos de cádmio e de selénio presentes nas micelas invertidas que podem ter dado origem a partículas de maior tamanho.

Como já foi descrito numa secção anterior, o tamanho das partículas tem uma influência direta na posição do pico de emissão nos espetros de fluorescência. A menor intensidade de emissão para baixas concentrações pode dever-se a um

conjunto de fatores, entre os quais o tempo de reação não ser o mais adequado para produzir partículas de tamanho mais reduzido.

Uma menor intensidade espectral, por ter um máximo numa zona de menor comprimento de onda, poderá corresponder a uma quantidade de energia emitida total semelhante.

3.2. Síntese da coroa de ZnS

3.2.1. Influência da razão CdSe:ZnS

Para a este passo foram inicialmente ensaiadas várias razões entre a quantidade de átomos usada para o núcleo e a usada para a coroa. Experimentaram-se as razões de CdSe:ZnS 1:1, 2:1 e 1:2. Com a razão 1:2 não se obtiveram bons resultados, pelo que apenas se reproduzem aqui os respetivos às outras razões.

Os resultados não foram conclusivos quanto à melhor razão entre as quantidades de átomos no núcleo e na coroa, pois a repetição dos ensaios não mantinha o comportamento de fluorescência para as mesmas condições, que por vezes eram até contrários (resultados não mostrados). O mesmo se passou com a realização de ensaios para a comparação entre $ZnCl_2$ ou $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ como fonte de zinco.

As **figuras 3.2.1** e **3.2.2** mostram resultados típicos para a fluorescência de pontos quânticos núcleo/corôa comparada com a fluorescência dos núcleos. Nesta fase começou por se sintetizar a corôa de ZnS recorrendo a $(NH_4)_2S$ como fonte de sulfureto. Usou-se também a razão 2:1 de CdSe:ZnS.

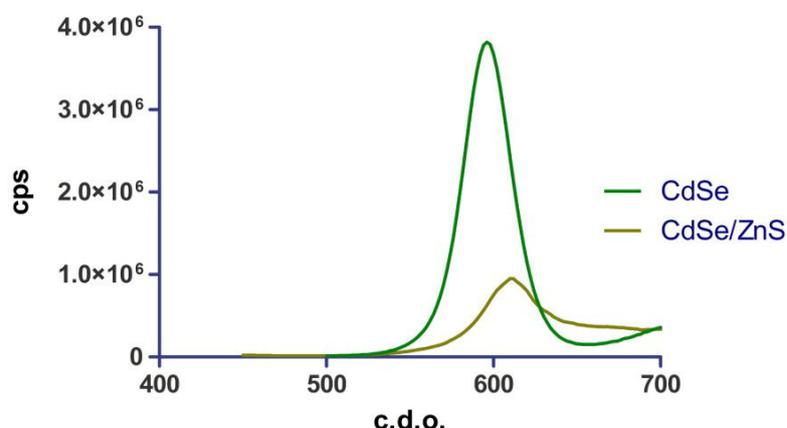


Figura 3.2.1 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe e CdSe/ZnS, sintetizados pelo procedimento A e B (CdSe:ZnS=2:1). Passagem do pico de emissão de 598 nm (CdSe) para 612 nm (CdSe/ZnS). Razão entre máximos de 4. Fator de diluição de 3.

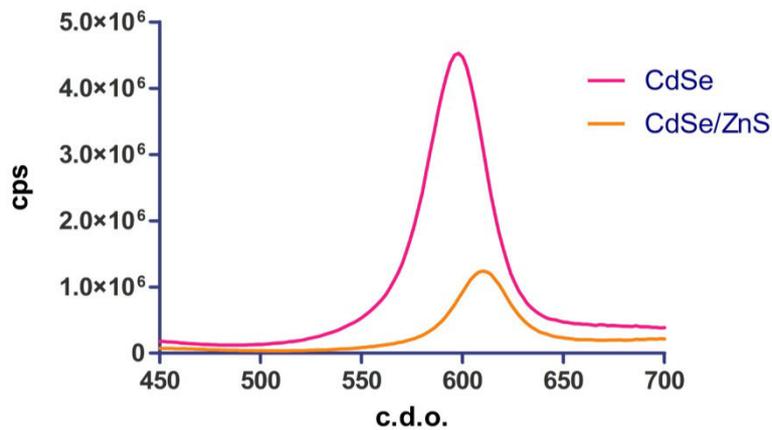


Figura 3.2.2 - Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe e CdSe/ZnS, sintetizados pelo procedimento A e B (CdSe:ZnS=2:1). Passagem do pico de emissão de 598 nm (CdSe) para 610 nm (CdSe/ZnS). Razão entre máximos de 3.6. Fator de diluição de 3.

É visível uma redução da intensidade de fluorescência, esperada devido à diluição tripla que acontece quando da síntese da coroa. Esta redução, porém, foi maior do que aquela esperada pois, a par do efeito da diluição para um terço da intensidade, parte desta redução deveria ser compensada pela passivação da coroa (ver secção 1.1.2.4).

Como já foi referido para os núcleos, os resultados finais das partículas nem sempre se reproduziam completamente, o que levava algumas amostras a serem descartadas devido aos seus espectros anómalos. Por isso, para a razão CdSe:ZnS 1:1 houve mais ensaio com bons resultados, decidiu-se continuar os trabalhos com a razão 1:1 e usar $ZnCl_2$ como fonte de zinco.

O desvio para a direita é também espectável, uma vez que o crescimento da camada de ZnS faz aumentar o tamanho das partículas. O desvio para a direita mostrou-se tanto maior quanto maior a camada de ZnS, tal como esperado devido à dependência entre o tamanho e o comprimento de onda de emissão máximo. Contudo, este desvio para a direita não comprova que a camada de sulfureto de zinco cresceu em torno dos núcleos de CdSe, uma vez que o mesmo poderia acontecer se os núcleos crescessem devido a átomos cádmio e selênio que não tivessem reagido.

Esperar-se-ia portanto uma redução da intensidade inferior a um terço. Acontece que, para os resultados das **figuras 3.2.1 e 3.2.2**, essa redução foi de cerca de 4 vezes. Mas, apesar de frequente, este resultado não se generalizou, como se pode ver, por exemplo, pelos espectros da **figura 3.2.4**.

A **figura 3.2.3** mostra os espectros de excitação das amostras antes e depois da síntese da coroa, nos quais é visível que os espectros se modificam consideravelmente.

Como se constata na **figura 3.2.3**, o espectro dos pontos quânticos com coroa é nitidamente mais acentuado, com maiores intensidades de excitação para os comprimentos de onda mais energéticos.

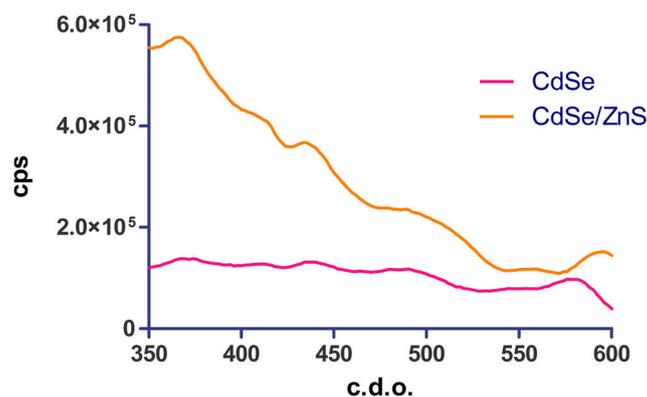


Figura 3.2.3 – Espectros de excitação de pontos quânticos antes e depois do crescimento da coroa de ZnS em torno dos núcleos de CdSe. Fator de diluição de 3.

Na **figura 3.2.4** estão presentes os resultados mais expressivos de aumento de rendimento quântico de fluorescência pela adição da camada de ZnS ao núcleo de CdSe.

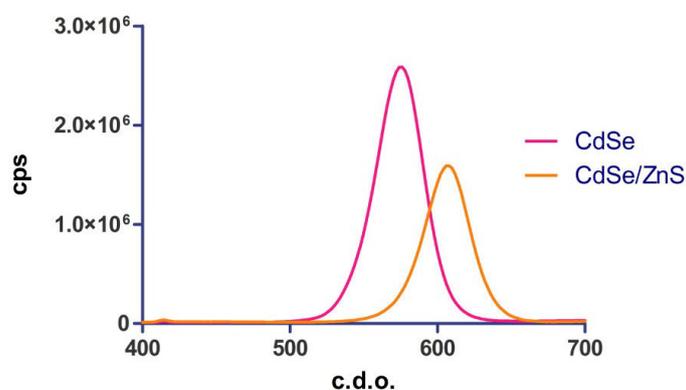


Figura 3.2.4 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe e CdSe/ZnS, sintetizados pelo procedimento A e B (CdSe:ZnS=1:1). Passagem do pico de emissão de 582 nm (CdSe) para 604 nm (CdSe/ZnS). Razão entre máximos de 1.6. Fator de diluição de 3.

Devido à deterioração do $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, esta amostra foi sintetizada recorrendo a tiourea como fonte de sulfureto. Mas a variação dos resultados consoante a fonte de sulfureto para a camada de ZnS não deve ser tomada como conclusiva, uma vez que também ocorreram outras situações em que os resultados obtidos com $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ foram piores que aqueles obtidos com $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (resultados não mostrados). No entanto, esta

alteração do procedimento fez com que o procedimento de lavagem das partículas, tal como está descrito na secção seguinte, deixasse de ser bem-sucedida. Pode então ver-se, na **figura 3.2.4**, um desvio para a direita de 22 nm após o crescimento da coroa, e uma diminuição da intensidade de fluorescência de apenas 1.6 vezes, o que corresponde a um aumento de 48% do rendimento quântico por efeito do crescimento da coroa de ZnS.

3.2.2. Ensaios de fluorescência com pontos quânticos de CdSe/ZnS

Depois da síntese, o objetivo foi conjugar os pontos quânticos com benzo[*a*]fenoxazinas à superfície, de modo a criar um sistema em que ocorresse transferência de energia. Como vimos na secção 2.3.3, para esse fim foi necessário purificar os pontos quânticos, transferindo as partículas para outro solvente e removendo o AOT.

3.2.2.1. Lavagem e mudança de solvente

O procedimento de lavagem inicial deixou de ser eficiente quando se passou a sintetizar a coroa com $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ em vez de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (ver na secção 2.3.3 a alteração do procedimento que se tornou necessária). Os espectros das soluções de CdSe/ZnS sintetizados com tiourea são apresentados na **figura 3.2.5**.

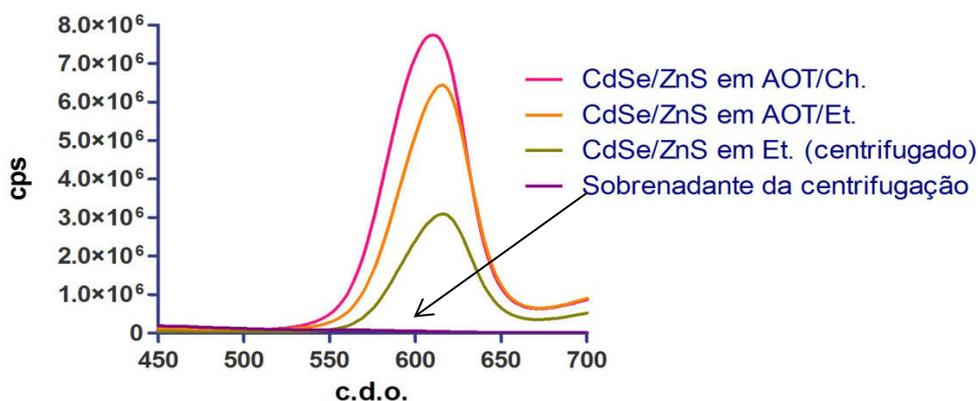


Figura 3.2.5 – Espectros de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência pontos quânticos CdSe/ZnS, sintetizados pelo procedimento A + B (CdSe:ZnS=1:1). A seta indica o espectro do sobrenadante, quase inexistente.

Como estes resultados mostram, a mudança de solvente de ciclohexano para etanol alterou o espectro de emissão de fluorescência das partículas, diminuindo a intensidade na metade esquerda do espectro, o que lhe deu também maior simetria. O

ligeiro desvio para o vermelho ocorre pois o etanol é um solvente mais polar. Como o AOT tem boa solubilidade em etanol e como o AOT já não tem de estar a manter as micelas invertidas (a água é solúvel em etanol), uma parte significativa do AOT dispersa-se em etanol. O AOT, ao dispersar homogeneamente pelo solvente, reduz a heterogeneidade do meio, minimizando a solvatação das partículas, que depende do balanço das interações AOT-partículas, AOT-etanol e partículas-etanol. Se a afinidade do AOT pelas partículas fosse muito grande estas poderiam ainda assim manter a sua camada exterior de AOT. Mas este não deverá ser o caso, dada a diminuição de rendimento quântico de fluorescência. Assim, uma parte significativa de AOT deve sair da superfície das partículas sendo substituídas por moléculas de solvente (etanol).

Também se pode constatar a diminuição mais acentuada aquando da remoção do AOT, o que comprova o efeito passivador da camada polimérica em torno das nanopartículas, tal como foi descrito na secção 1.1.1.3.1. A ausência de fluorescência no sobrenadante confirma que todas as partículas precipitaram durante a centrifugação.

A **figura 3.2.6** demonstra uma menor intensidade para zonas de maior energia no espectro de excitação das partículas em etanol.

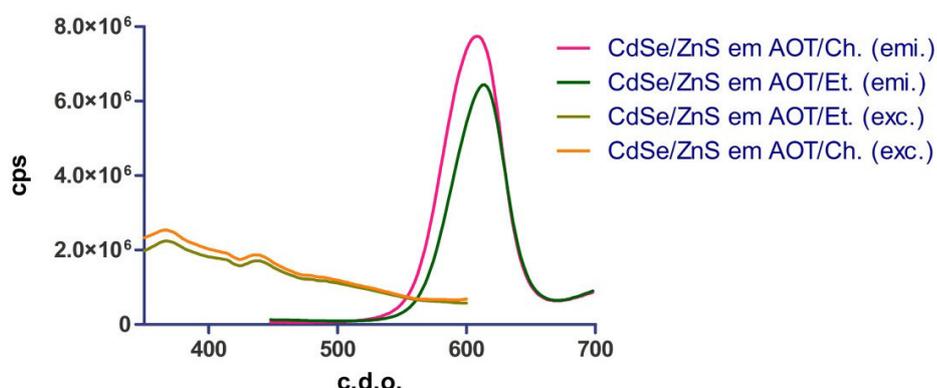


Figura 3.2.6 – Espectros de excitação (emi. a 630nm) e de emissão (exc. a 370nm) de fluorescência de pontos quânticos CdSe/ZnS, sintetizados pelo procedimento A + B (CdSe:ZnS=1:1).

3.3. Benzofenoxazina

Os espectros relativos à solução inicial de benzofenoxazina usada para a conjugação dos pontos quânticos encontram-se na **figura 3.3.1**.

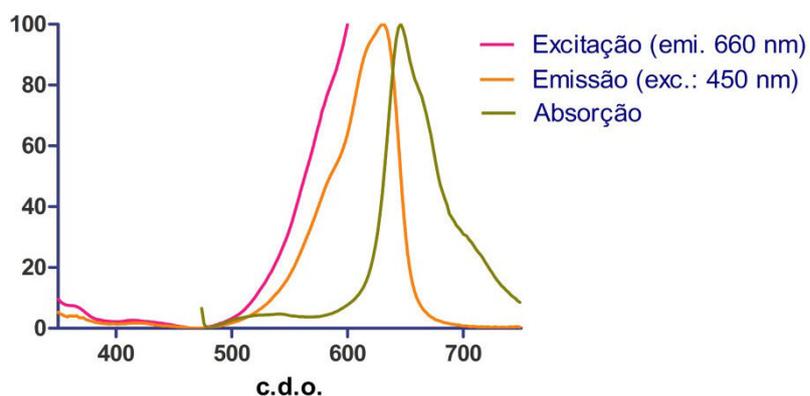


Figura 3.3.1 – Espectros normalizados de absorção e de excitação e emissão de fluorescência da benzofenoxazina. Pico de absorção a 630 nm. Pico de emissão a 645 nm.

Podemos, confirmar que a benzofenoxazina é fotoexcitável por radiação na zona dos 600 nm, onde os pontos quânticos emitem.

É visível na **figura 3.3.1**, entre os 500 e 600 nm, alguma emissão de fluorescência característica da forma básica destas moléculas. Esta emissão é maior para comprimentos de onda de excitação mais baixos, como os 370 nm com que realizamos os espectros dos pontos quânticos. Os espectros de emissão e absorção são relativamente simétricos.

Na **figura 3.3.2** é evidente que a benzofenoxazina tem uma maior emissão quando excitada a 600 nm, zona de emissão dos pontos quânticos. No entanto mantêm alguma emissão mesmo quando excitada a 370 nm.

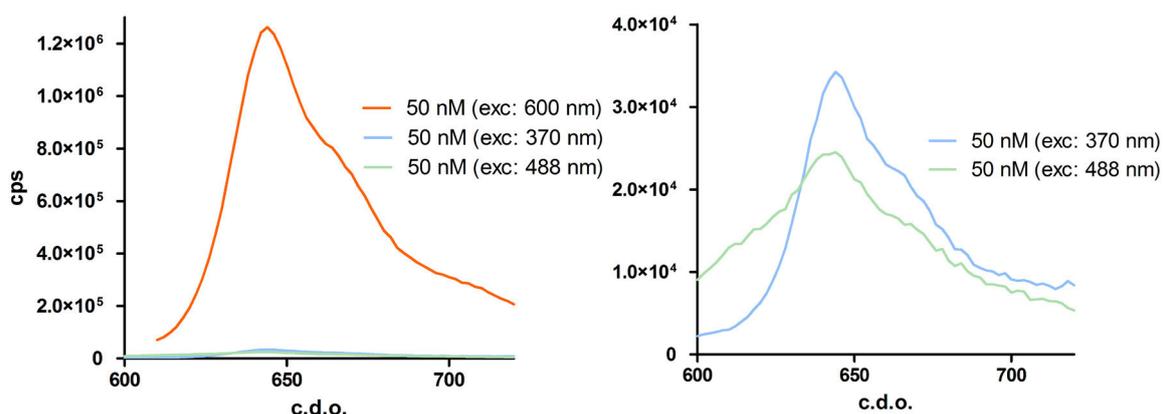


Figura 3.3.2 – Espectros de emissão de fluorescência de benzofenoxazina 50 nM, excitada a 3 comprimentos de onda.

A **figura 3.3.3** expõe a adequabilidade da conjugação deste pontos quânticos com esta benzofenoxazina com vista à fabricação de um sistema em que ocorra transferência de energia, uma vez que a energia emitida pelos pontos quânticos ocorre num comprimento de onda em que a benzofenoxazina absorve.

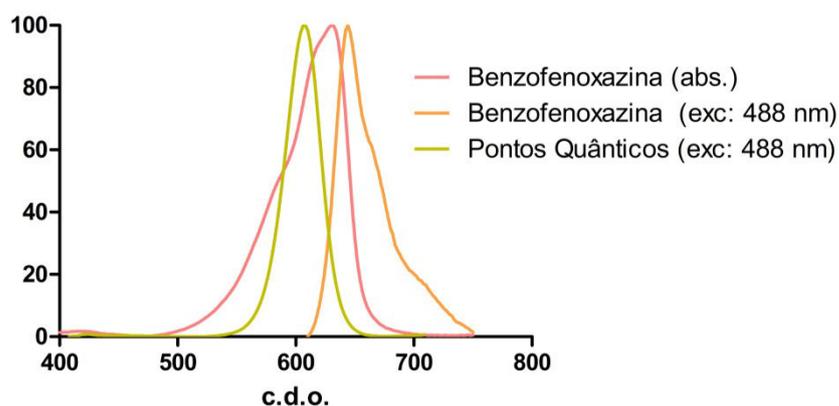


Figura 3.3.3 – Sobreposição espectral normalizada entre a emissão dos pontos quânticos e a absorção da benzofenoxazina.

3.4. Conjugação dos pontos quânticos

A conjugação dos pontos quânticos, tal como descrito na secção 2.3.4, foi realizada com MDA e benzofenoxazina, isoladamente ou em simultâneo. De seguida serão expostos os resultados referentes a esta fase do trabalho.

A **figura 3.4.1** mostra os resultados da tentativa de conjugar os pontos quânticos à benzofenoxazina, sem lavagem. Apenas se secou o ciclohexano em que as partículas foram sintetizadas e adicionou-se etanol na mesma quantidade. Após a adição da benzofenoxazina, a intensidade de fluorescência dos pontos quânticos foi extremamente reduzida, ficando alguma ainda visível no espetro. Aqui a benzofenoxazina foi adicionada propositadamente em excesso, para facilitar e melhorar a eficiência de conjugação. Ainda assim, esta quantidade não foi suficiente para inibir a fluorescência total dos pontos quânticos nem para que ocorresse a transferência da totalidade de energia emitida por eles. Como veremos na **figura 3.4.2**, isto pode dever-se à presença de AOT, que impede a aproximação da benzofenoxazina às partículas e consequentemente a transferência de energia que depende intensamente da distância. Aquela perda de intensidade de emissão dos pontos quânticos é também, em parte, devida à opacidade com que a solução ficou aquando da adição de benzofenoxazina.

Ainda na **figura 3.4.1** é visível que, após a lavagem, na qual saiu a camada de AOT e se pretendeu retirar o máximo de benzofenoxazina que não ficou ligada, a intensidade de fluorescência dos pontos quânticos foi retomada, apesar de não

completamente, e restou alguma emissão de fluorescência na zona da benzofenoxazina (650 nm). Como é sempre de esperar, nos processos de lavagem ocorre a perda de algum material, o que pode ter causado a diminuição da intensidade. Da mesma maneira, como os processos de lavagem não são perfeitos, é difícil determinar, neste caso, se a intensidade de fluorescência na zona das benzofenoxazinas é de moléculas ligadas ou não.

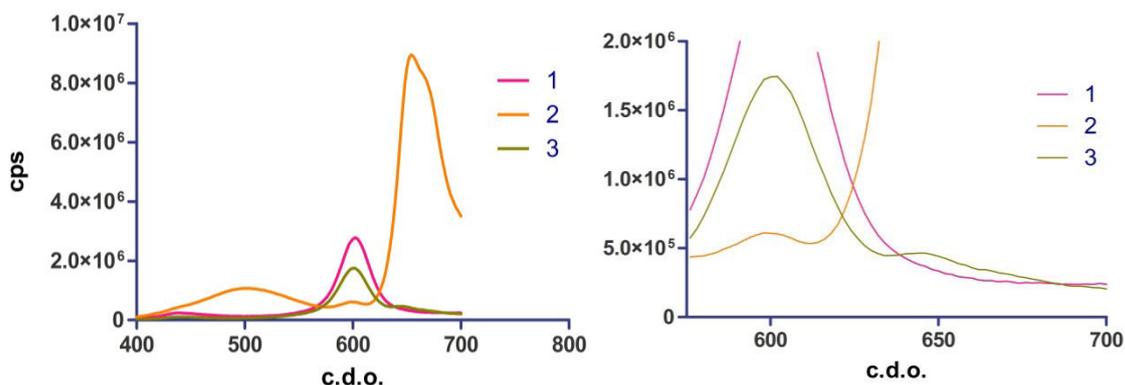


Figura 3.4.1 – Os gráficos da esquerda e da direita referem-se às mesmas medições. Espectros de emissão de fluorescência do processo de conjugação de benzofenoxazina. 1 – Pontos quânticos CdSe/ZnS em AOT/Et.; 2 – Adição de 100 μL de benzofenoxazina 10^{-6} M a 300 μL de pontos quânticos $\approx 4 \mu\text{M}$ (ver secção 2.3.4); 3 – Solução após o processo de lavagem das partículas, em etanol.

Como já foi explicado, a emissão na zona dos 500 nm deve-se à forma básica da benzofenoxazina, que desaparece depois das lavagens. A **figura 3.4.2** mostra os resultados de uma segunda tentativa de conjugação, usando a mesma amostra da tentativa anterior, mas que já não tem AOT a revesti-la.

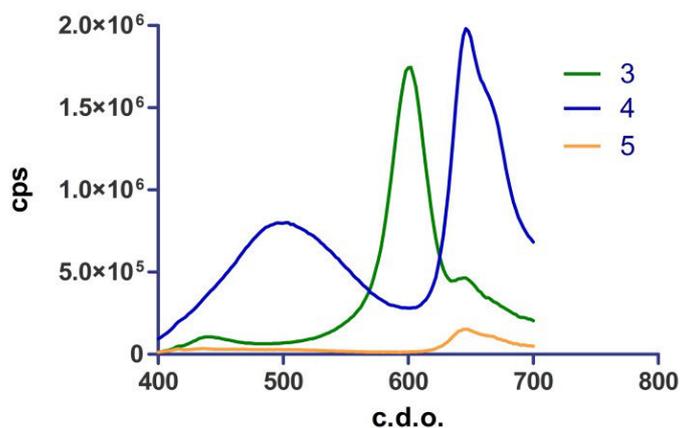


Figura 3.4.2 – Espectros de emissão de fluorescência da conjugação de pontos quânticos com benzofenoxazina. 3 – Solução após o processo de lavagem das partículas, em etanol, que resultou da tentativa de conjugação representada no gráfico 3.4.1; 4 – Adição de 25 μL de benzofenoxazina; 5 – Resultado depois da lavagem.

Estes resultados suportam a conclusão ensaiada atrás, sobre o AOT impedir uma suficiente aproximação da benzofenoxazina às nanopartículas e assim evitar que ocorra transferência de energia ou outros processos de inibição. Tais processos manifestam-se na **figura 3.4.2**, onde em **4** não é visível qualquer curva representante dos pontos quânticos. Por outro lado, em **5**, apenas a benzofenoxazina é visível, o que suporta a conclusão que ocorre transferência de energia. No entanto, como é evidente na mesma **figura 3.4.2**, a quantidade de energia emitida é muito menor que a que ocorria dos pontos quânticos antes da conjugação, pelo que devem estar a ocorrer, simultaneamente, outros processos de inibição de fluorescência.

Na **figura 3.4.3**, o espectro de emissão **5** apenas mostra fluorescência na zona da benzofenoxazina. Mas o espectro de absorção da mesma amostra **5** inclui a forma de absorção dos pontos quânticos, o que mostra que eles absorvem energia da radiação incidente e a transferem para a benzofenoxazina. É preciso ter em consideração que parte da emissão pode dever-se à fotoexcitação direta da benzofenoxazina.

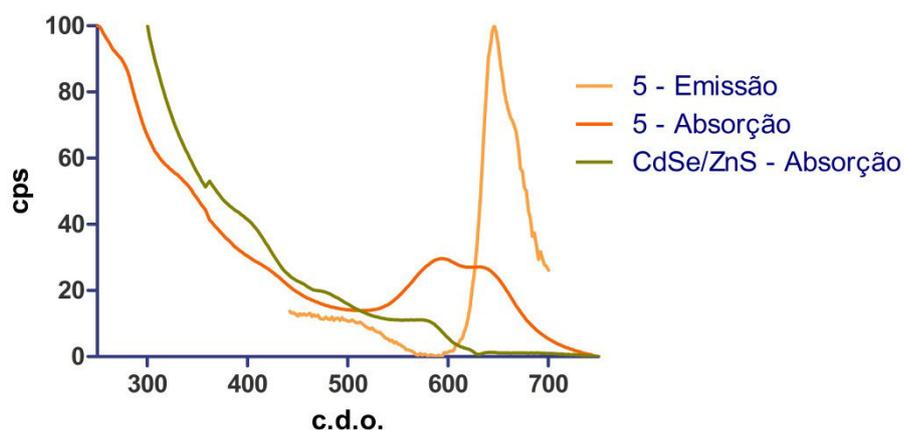


Figura 3.4.3 – Espectros de emissão e de absorção da amostra **5** da **figura 3.4.2**, sobreposto ao gráfico de absorção de pontos quânticos não conjugados.

Repetiu-se então os ensaios, desta vez removendo o AOT antes da conjugação. Os espectros da **figura 3.4.4**, no qual se observa que o resultado da lavagem após a conjugação, **2**, revelam também uma intensidade reduzida, mas desta vez com a presença da banda de fluorescência dos pontos quânticos.

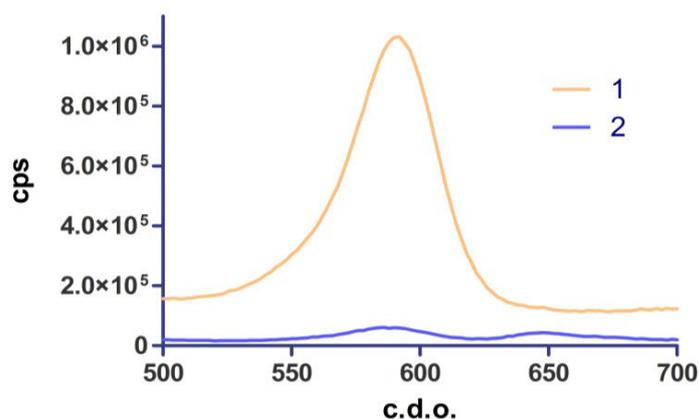


Figura 3.4.4 - Espectros de emissão de fluorescência relativos à conjugação de pontos quânticos com benzofenoxazina, após remoção do AOT. **1** – CdSe/ZnS sintetizado com o procedimento A e B (nos quais se utilizou $V_{Cd} = 16.1 \mu\text{L}$), em etanol; **2** – Nanossistemas conjugados com benzofenoxazina após o procedimento de lavagem.

De modo a tentar atenuar a redução de intensidade de fluorescência, e a evitar agregados de benzofenoxazina na separação dos pontos quânticos, decidiu-se realizar, posteriormente, a conjugação de benzofenoxazinas em simultâneo com outro ligando, o MDA, para avaliar se não seria a quantidade excessiva de benzofenoxazinas a que pudesse estar a causar o decréscimo acentuado de fluorescência.

Na **figura 3.4.5** podem ver-se as alterações no espectro de emissão resultantes da conjugação dos pontos quânticos com MDA. A fluorescência caiu cerca de 4 vezes, deslocando-se o espectro 3 nm para a direita. Isto pode resultar de um conjunto de fatores, entre os quais a passagem do solvente ciclohexano para etanol e a remoção do AOT (ver **figura 3.2.4**). Parece ser o processo inverso de uma passivação. Algo idêntico ao caso da conjugação com benzofenoxazinas pode estar a ocorrer.

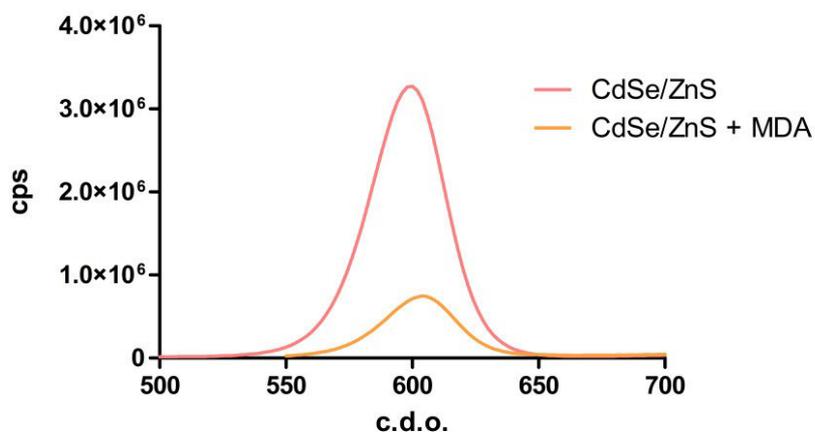


Figura 3.4.5 – Espectros de emissão de fluorescência de pontos quânticos CdSe/ZnS antes e depois do procedimento de conjugação com MDA. A linha vermelha refere-se a ponto quânticos na solução em que foram sintetizados, ou seja, AOT/Ch. A linha a cor de laranja é da solução final de pontos quânticos conjugados com MDA, em etanol.

Utilizando a amostra de pontos quânticos cujos espectros estão na **figura 3.4.6**, efetuou-se o procedimento de conjugação de pontos quânticos com MDA + benzofenoxazina. Depois de remover o AOT pelo processo explicado na secção 2.3.3 para o caso de sintetizar com $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ como fonte de sulfureto, procedeu-se à conjugação como explicado na secção 2.3.4.

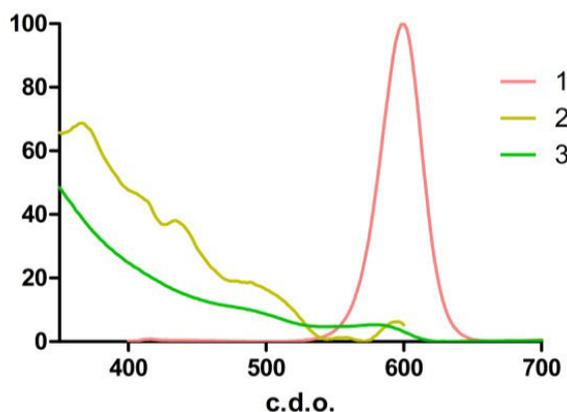


Figura 3.4.6 – Espectros normalizados emissão (1), excitação (2) de fluorescência e absorção (3) de pontos quânticos CdSe/ZnS antes procedimento de conjugação com MDA e benzofenoxazina. Síntese pelo procedimento A+B, razão CdSe:ZnS 1:1. Fonte de Sulfureto: $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$.

A **figura 3.4.7** mostra que, pelo critério explicado na secção 2.3.4, a benzofenoxazina está ligada aos pontos quânticos, uma vez que a razão entre os picos na zona dos pontos quânticos e da benzofenoxazina se mantém com as lavagens. Apenas se foi perdendo intensidade de fluorescência devido à perda de material associado a cada centrifugação. Este resultado revela maior intensidade de fluorescência do que a conjugação apenas com benzofenoxazina, aumentando cerca de duas ordens de grandeza (**figura 3.4.3** e **3.4.4** comparadas com **figura 3.4.7**).

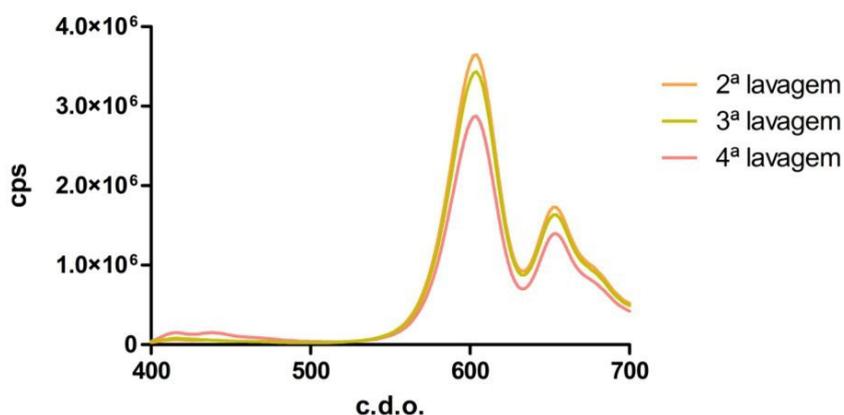


Figura 3.4.7 – Espectros de emissão de fluorescência das lavagens dos nanossistemas após a conjugação de pontos quânticos com MDA + benzofenoxazina. A razão entre os picos de emissão na zona dos pontos quânticos e da benzofenoxazina mantém-se com as lavagens.

3.4.1. Ensaios dos nanossistemas conjugados com NADH

Na tentativa de produzir um nanossistema que funcione como sensor de transformações biocatalíticas, realizaram-se estudos de fluorescência dos conjugados de pontos quânticos na presença de NADH, iodeto e acrilamida, como explicado na secção 2.5. Expõem-se nesta secção os resultados destes ensaios, relativos ao NADH.

Na **figura 3.4.8** estão representados os espectros de emissão de fluorescência relativos aos conjugados de pontos quânticos com benzofenoxazina e MDA, em função da concentração de NADH. Na parte esquerda da figura parece acontecer uma diminuição geral da intensidade de fluorescência, com o aumento da concentração de NADH, ao longo de todo o espectro e com especial incidência na parte direita da curva correspondente aos pontos quânticos.

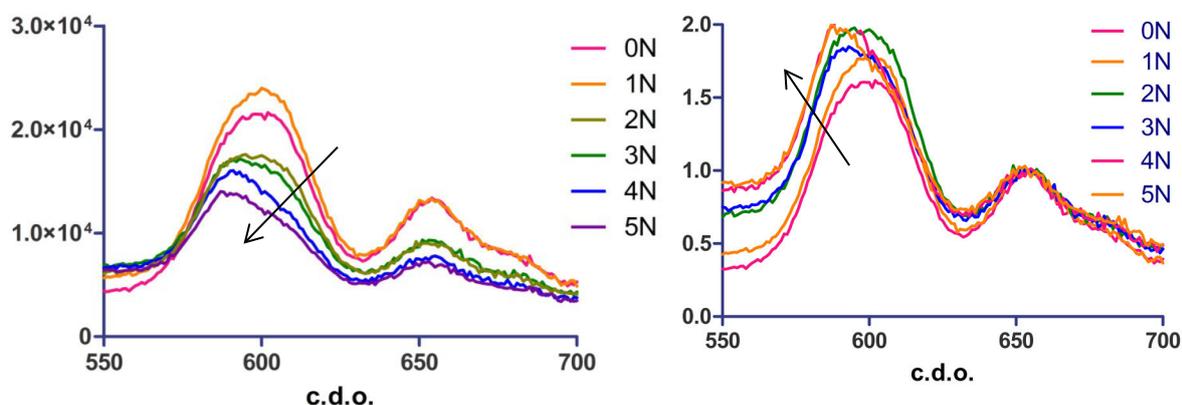


Figura 3.4.8 – Variação nos espectros de emissão (exc. 500 nm) de fluorescência (à esquerda) e espectros normalizados pelo pico da benzofenoxazina (à direita), com a adição de NADH a conjugados de pontos quânticos com MDA e benzofenoxazina. **0N** – Solução de 1 ml com 50nM de pontos quânticos conjugados em buffer fosfato 10mM (pH 8.8); **1N a 5N** – adição consecutiva de NADH, com incrementos de 50 nM, com 15 minutos de espera entre a adição e a medida do espectro.

Contudo, na parte direita desta figura, outro comportamento é evidenciado por estarem os espectros normalizados pelo pico da benzofenoxazina, na qual se observa que a intensidade de fluorescência aumenta do lado esquerdo da curva de emissão dos pontos quânticos.

A concentração dos pontos quânticos conjugados é aproximada, pois apenas se pôde recorrer a um modelo para o cálculo da concentração de núcleos, à qual se acrescentou estimativas para as partículas com coroa e conjugadas, com base no pressuposto que não houve perdas durante os processos de síntese, conjugação e

lavagens. Como, por certo, ocorreram perdas durante todas estas etapas, a concentração de pontos quânticos conjugados é menor que a indicada na **figura 3.4.8**.

A **figura 3.4.9**, relativa ao mesmo ensaio, expõe também a diminuição de intensidade dos picos de emissão, com o aumento da concentração de NADH, tanto na zona dos pontos quânticos como na zona de emissão das benzofenoxazinas.

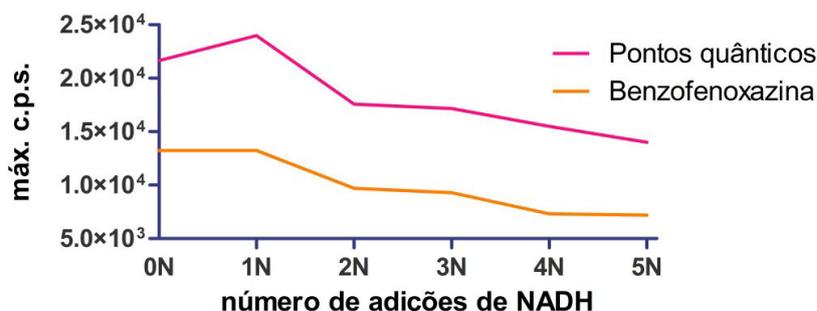


Figura 3.4.9 – Picos de emissão de fluorescência dos conjugados na zona dos pontos quânticos e na zona da benzofenoxazina em função da concentração de NADH. **0N** – Solução de 1 ml com 50nM de pontos quânticos conjugados em buffer fosfato 10mM (pH 8.8); **1N a 5N** – adição consecutiva de NADH, com incrementos de 50 μ M, com 15 minutos de espera entre a adição e a medição.

O decréscimo é similar em ambos os casos. Se a benzofenoxazina fosse intermediária da transformação catalítica do NADH, ficando reduzida, seria de esperar algum retorno da fluorescência para os pontos quânticos (ver secção 1.3.8). Ocorreu que ambos os picos de emissão diminuíram em intensidade, mas ao mesmo tempo, o aumento de fluorescência de parte da curva dos pontos quânticos em relação à curva da benzofenoxazina parece sustentar tal hipótese. Na **figura 3.4.10** estão os espectros do ensaio com a adição de NADH, desta vez a soluções de pontos quânticos sem a conjugação com benzofenoxazina.

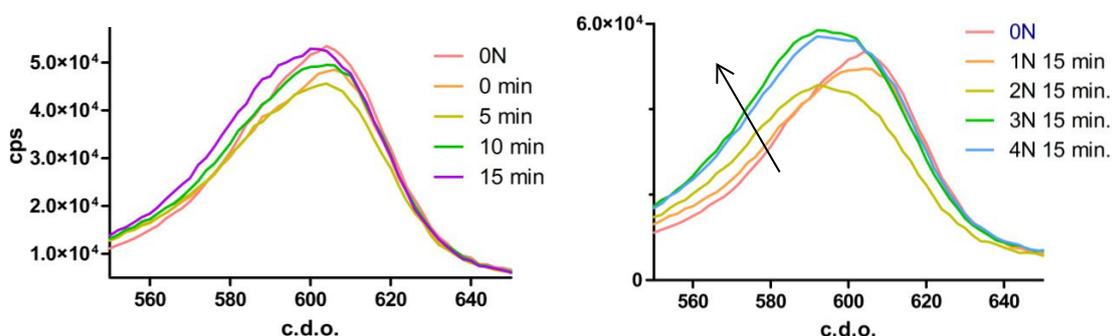


Figura 3.4.10 – Variação da intensidade de fluorescência com a adição de NADH a pontos quânticos conjugados com MDA. **À esquerda:** espectros medidos logo após a adição de NADH (0.5 mM), e sucessivamente após um intervalo de 5 minutos. **À direita:** espectros medidos para várias concentrações de NADH, após 15 minutos de cada incremento (ver secção 2.5.1). **0N:** solução de pontos quânticos sintetizados pelo procedimento A+B, com $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$; **1N a 4N:** sucessivas adições de NADH, com incrementos à sua concentração de 50 μ M.

É visível que após a adição, pela primeira vez, de NADH, ocorre uma descida da intensidade de fluorescência, descida essa que continua até aos 5 minutos. Contudo, a fluorescência volta a subir após esse tempo, nos 10 e 15 minutos, estabilizando num valor próximo do inicial. Isto parece indicar que algum processo dinâmico de interação esteja a ocorrer entre o NADH e os pontos quânticos conjugados com MDA.

Do lado direito da **figura 3.4.10**, as sucessivas adições de NADH aos pontos quânticos, medidas após 15 minutos para esperar a sua estabilização, mostram também uma evolução não-linear, decrescendo em intensidade inicialmente e voltando a subir para as concentrações maiores.

O aumento da concentração parece levar sempre a um ligeiro desvio para a esquerda dos espetros (lado direito da **figura 3.4.10**). Estes resultados, semelhantes ao que se observa na **figura 3.4.8** (lado direito) podem indicar que os pontos quânticos, no sistema conjugado com MDA e benzofenoxazina, também entram em contato com o NADH.

Repetindo o mesmo ensaio, agora para a benzofenoxazina, podemos constatar não ocorre qualquer variação na intensidade de fluorescência com o aumento de concentração da NADH (**figura 3.4.11**). Isto suporta a indicação que a evolução nos espetros dos nanossistemas conjugados (**figura 3.4.8**) se deve à interação entre o NADH e os pontos quânticos, ou mais especificamente com o MDA, e por esse meio se altera também a intensidade na zona da benzofenoxazina. Não vemos como o MDA pode interferir nas características energéticas e de fluorescência, a não ser como intermediário para a cedência de prótons, inibindo a emissão dos pontos quânticos.

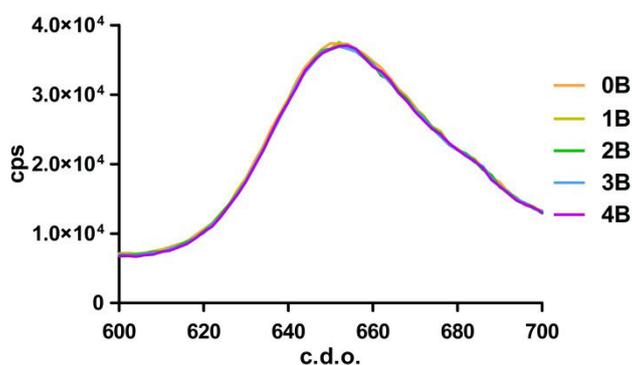


Figura 3.4.11 – Monitorização da intensidade de fluorescência da benzofenoxazina com a variação da concentração de NADH. **0B**: benzofenoxazina 5 μ M; **1B**: NADH 50 nM; **2B**: NADH 100 nM; **3B**: NADH 200 nM; **4B**: 500 nM.

Estes resultados parecem sugerir conclusões que vão no sentido oposto ao esperado. Esperava-se, pelo explicado na secção 2.5, que a interação entre o NADH e a benzofenoxazina diminuísse a sua aceitação de energia dos pontos quânticos. Isto manifestar-se-ia no aumento de intensidade na banda dos mesmos à custa da diminuição da banda da benzofenoxazina.

Os resultados apresentados atrás levaram-nos a considerar outras substâncias que pudessem inibir a fluorescência da benzofenoxazina, e assim possibilitar um aumento da intensidade da banda dos pontos quânticos. Realizaram-se ensaios semelhantes com iodeto e acrilamida, cujos resultados são apresentados a seguir.

3.4.2. Ensaios dos nanossistemas conjugados com Iodeto e Acrilamida

As figuras 3.4.12 e 3.4.13 expõem a evolução da emissão de fluorescência à medida que se aumenta a concentração de acrilamida e iodeto, respetivamente. Ambos os resultados evidenciam que o aumento de concentração destas substâncias funciona como inibidor da fluorescência ao longo de todo o espectro. O mesmo ocorre, aliás, que no caso anterior referente ao NADH.

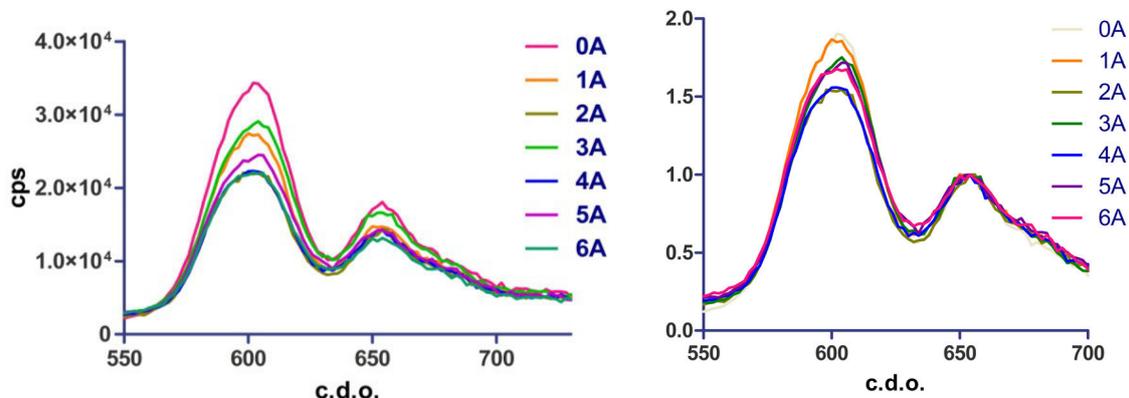


Figura 3.4.12 – Monitorização da fluorescência de conjugados de pontos quânticos com MDA e benzofenoxazina, com o aumento da concentração de acrilamida. À direita: espectros normalizados pelo pico da benzofenoxazina.

No caso da acrilamida (**figura 3.4.12**), os espectros normalizados pelo pico de fluorescência da benzofenoxazina mostram que o comportamento da curva correspondente aos pontos quânticos não é uniforme com o aumento de acrilamida. Algo de semelhante acontece para o caso do iodeto (**figura 3.4.13**), em que a sua concentração parece funcionar como inibidor da fluorescência, tanto da curva dos pontos quânticos como a da benzofenoxazina.

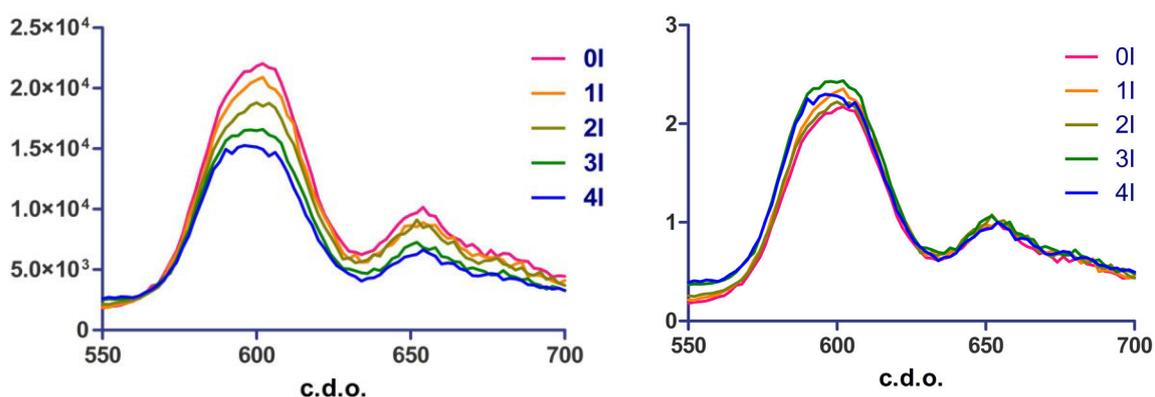


Figura 3.4.13 – Monitorização da fluorescência de conjugados de pontos quânticos com MDA e benzofenoxazina, com o aumento da concentração de iodeto. À direita: espectros normalizados pelo pico da benzofenoxazina.

Este ensaio tinha como objetivo verificar se seria possível, com estas substâncias, inibir a fluorescência da benzofenoxazina e assim fazer crescer a banda de emissão dos pontos quânticos. Tal não se verificou. Aconteceu que em ambos os casos se assistiu a uma redução geral da intensidade de emissão em todo o espectro. Ao realizar-se o mesmo ensaio para pontos quânticos e benzofenoxazinas separadamente, obtiveram-se os seguintes resultados, apresentados na **figura 3.4.14** os referentes à acrilamida e na **figura 3.4.15** os que correspondem ao iodeto.

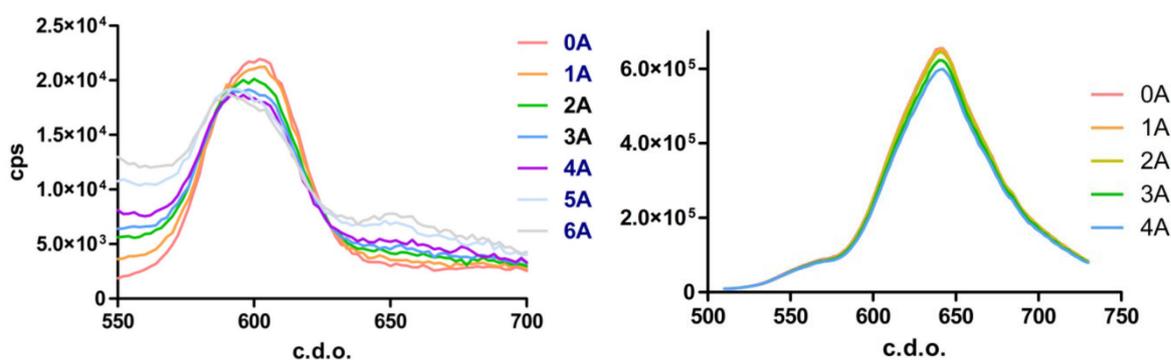


Figura 3.4.14 – Monitorização da fluorescência de benzofenoxazina (à direita) e de pontos quânticos revestidos com MDA (à esquerda) na presença de acrilamida. **0A**: soluções iniciais respetivas, sem acrilamida; **1A** a **6A**: aumento progressivo da concentração de acrilamida.

Esta **figura 3.4.14** evidencia que as alterações visíveis na **figura 3.4.12** podem ter a sua origem em ambas as partes do sistema conjugado, uma vez que a intensidade de fluorescência decresce tanto no caso dos pontos quânticos como na benzofenoxazina isolada.

Acontece porém que a diminuição do pico de intensidade máxima dos espectros dos pontos quânticos (**figura 3.4.14 à esquerda**), é acompanhada por uma subida de

intensidade nos limites do gráfico. Nesses mesmos espectros, o aumento de intensidade na zona dos 650 nm deveria acontecer também no caso do sistema conjugado, o que não se verifica. Pode isto indicar, como em todos os outros casos de conjugação, que as características do sistema conjugado não são apenas a soma das características dos sistemas isolados.

Na **figura 3.4.15**, a intensidade de fluorescência dos pontos quânticos não diminui com o aumento da concentração de iodeto, como acontece no caso da benzofenoxazina. Estas variações, apesar de distintas do caso da acrilamida, também não explicam a variação do sistema conjugado na presença de iodeto. No sistema conjugado, a presença de iodeto faz decrescer a intensidade de ambos os picos de emissão, mas quando estudados em separado, a emissão dos pontos quânticos não se altera mas a benzofenoxazina decresce. Este decréscimo não é suficiente para explicar a descida da curva dos pontos quânticos conjugados (**figura 3.4.13**).

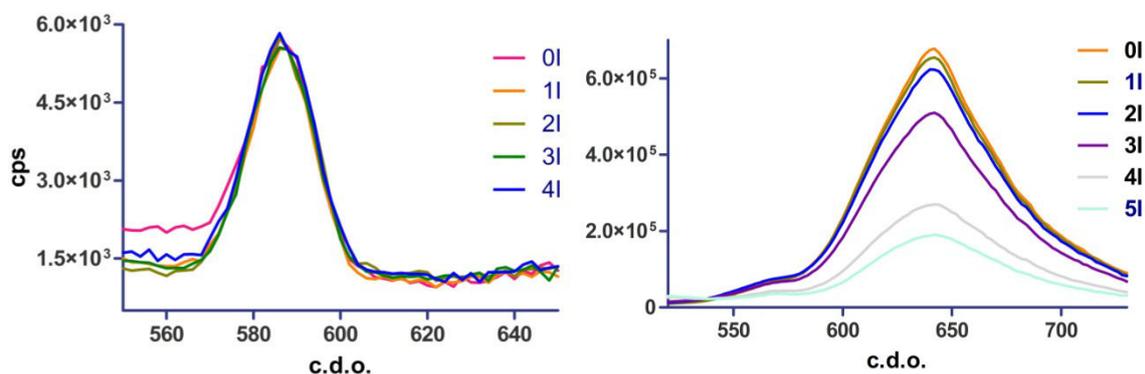


Figura 3.4.15 - Monitorização da fluorescência de benzofenoxazina (à esquerda) e de pontos quânticos revestidos com MDA (à direita) na presença de iodeto. **0I**: soluções iniciais respetivas, sem acrilamida; **1I** a **5I**: aumento progressivo da concentração de iodeto.

Recordamos que tal comportamento aconteceu de forma inversa para o caso da acrilamida, que alterou a fluorescência dos pontos quânticos, mas muito pouco a da benzofenoxazina. Como a acrilamida é neutra, ela não é repelida pelos pontos quânticos conjugados com MDA. Mas como o iodeto é negativo, assim como o MDA, eles repelem-se e não ocorre diminuição da intensidade de fluorescência.

Enquanto estudados separadamente, ambas as partes do sistema conjugado interagem de forma diferente para o caso da acrilamida e do iodeto, mas uma vez conjugado, o nanossistema reage de forma bastante similar na presença destas substâncias. Estes resultados evidenciam a complexidade de um estudo desta natureza com vista à produção de um sistema que funcione como sensor.

3.5. Ensaios biológicos

Nesta secção iremos apresentar os resultados dos ensaios biológicos realizados com conjugados de pontos quânticos e benzofenoxazina. Todos os ensaios biológicos foram realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, e utilizando microscopia de fluorescência. Para este efeito usaram-se células com e sem parede celular. Como foi explicado na secção 2.4, usaram-se duas abordagens para a obtenção de esferoplastos, uma simplificada e outra de modo a reproduzir ensaios com pontos quânticos descritos na literatura. Cada uma destas abordagens inclui também uma forma distinta de incubar os sistemas conjugados, e suas partes isoladamente.

3.5.1. Pontos quânticos nas células inteiras e em esferoplastos em PBS

Como se observa na **figura 3.5.1**, a incubação das células com benzofenoxazina, origina uma marcação tanto na zona do verde como na zona do vermelho.

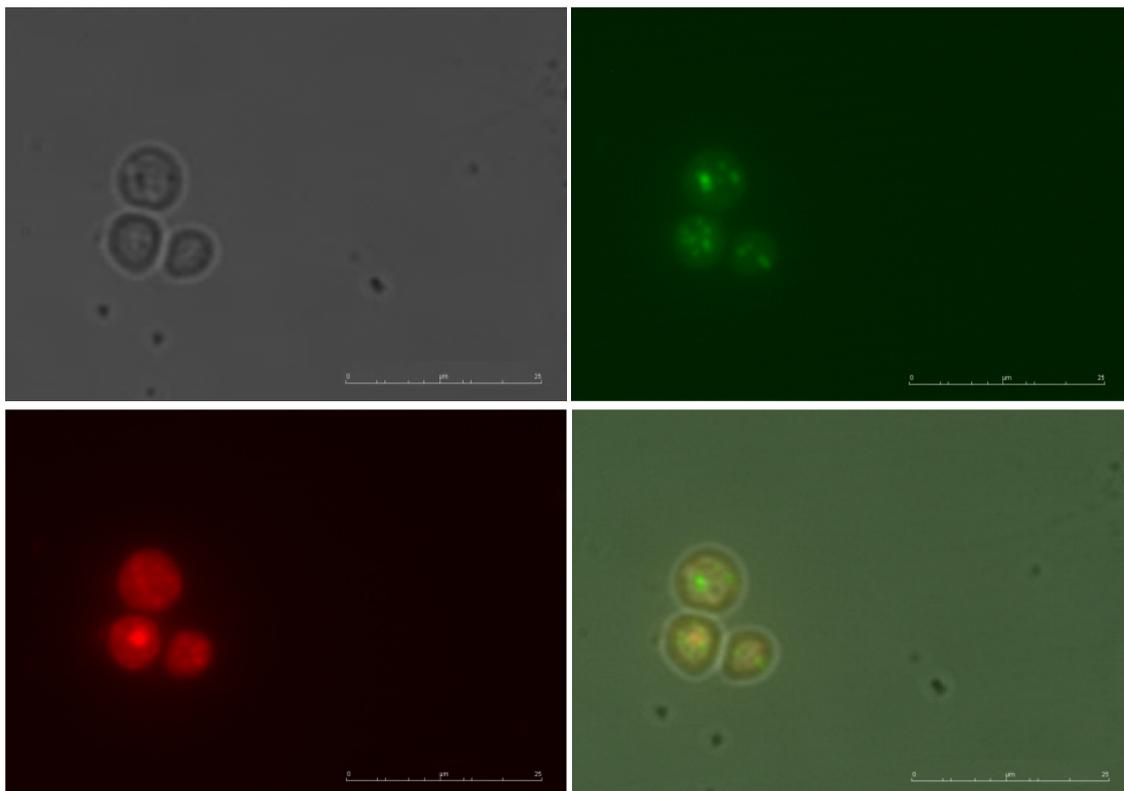


Figura 3.5.1 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com benzofenoxazina. 100 µL de suspensão celular D.O. = 0,38 + 10 µL de benzofenoxazina 5 µM. Em cima: campo claro à esquerda e fluorescência verde à direita. Em baixo: fluorescência vermelha à esquerda e sobreposição de todas as outras imagens á direita.

A fluorescência verde parece localizar-se principalmente em estruturas intracelulares,

enquanto o vermelho se espalha por toda a célula, com especial incidência em algumas zonas de maior intensidade. A emissão verde, como já foi mostrado atrás, deve-se à existência de uma forma básica na benzofenoxazina em estado puro.

As **figuras 3.5.2 e 3.5.3**, referentes a ensaios com pontos quânticos não conjugados em diferentes quantidades, mostram imagens com marcação celular na zona do vermelho.

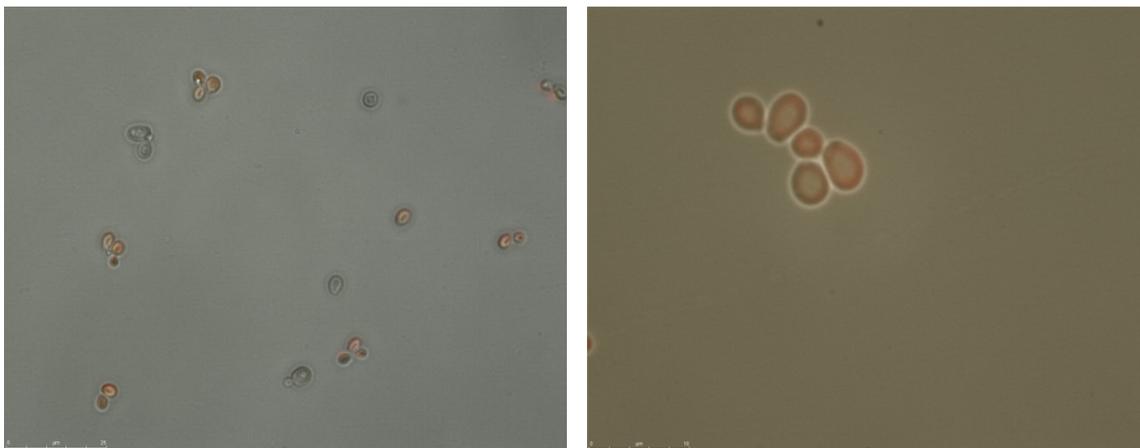


Figura 3.5.2 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos não conjugados. 100 μ L de suspensão celular D.O.= 0,5 + 5 μ L de pontos quânticos em etanol. Amostra de pontos quânticos sintetizada com tioureia. Imagens de campo claro e de fluorescência sobrepostas.

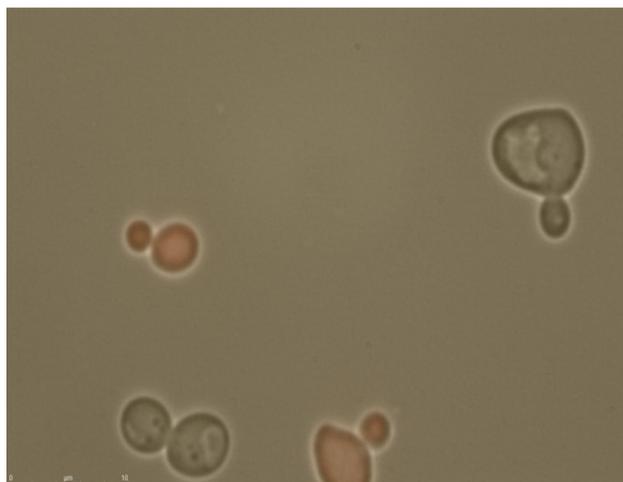


Figura 3.5.3 – Imagens de microscopia de fluorescência de células *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos não conjugados. 100 μ L de suspensão celular D.O.= 0,5 + 10 μ L de pontos quânticos em etanol. Amostra de pontos quânticos sintetizada com tioureia. Imagens de campo claro e de fluorescência sobrepostas.

Nestas figuras é visível que nem todas as células estão marcadas. Observa-se igualmente um aumento das dimensões do vacúolo, que ocupa a quase totalidade das células marcadas, parecendo indicar que os pontos quânticos poderão ter sido incorporados, induzindo este efeito. A marcação com pontos quânticos não conjugados é distinta da

marcação com benzofenoxazina, não só porque esta emite na zona do verde, mas também porque, na zona do vermelho, os pontos quânticos não têm maior intensidade de marcação em zonas específicas da célula, como no caso da benzofenoxazina.

Na **figura 3.5.4**, cujo ensaio se realizou com pontos quânticos conjugados com benzofenoxazina (ver **figura 3.4.3**), é possível visualizar a marcação celular da levedura com fluorescência na zona do vermelho. De forma a tentar confirmar se a benzofenoxazina ainda existia em estado livre, com o sistema conjugado, foram comparados os espectros dos pontos quânticos com os da benzofenoxazina, antes e após a realização de lavagens dos pontos quânticos conjugados por centrifugação (secção 2.3.4). Porém, no caso desta amostra, não foi possível fazer uma comparação entre os picos de emissão, pois os pontos quânticos não emitiam, apesar de estarem presentes. Por esta razão, a marcação celular visível na **figura 3.5.4** é inconclusiva quanto à sua origem: se pontos quânticos conjugados ou benzofenoxazina livre.

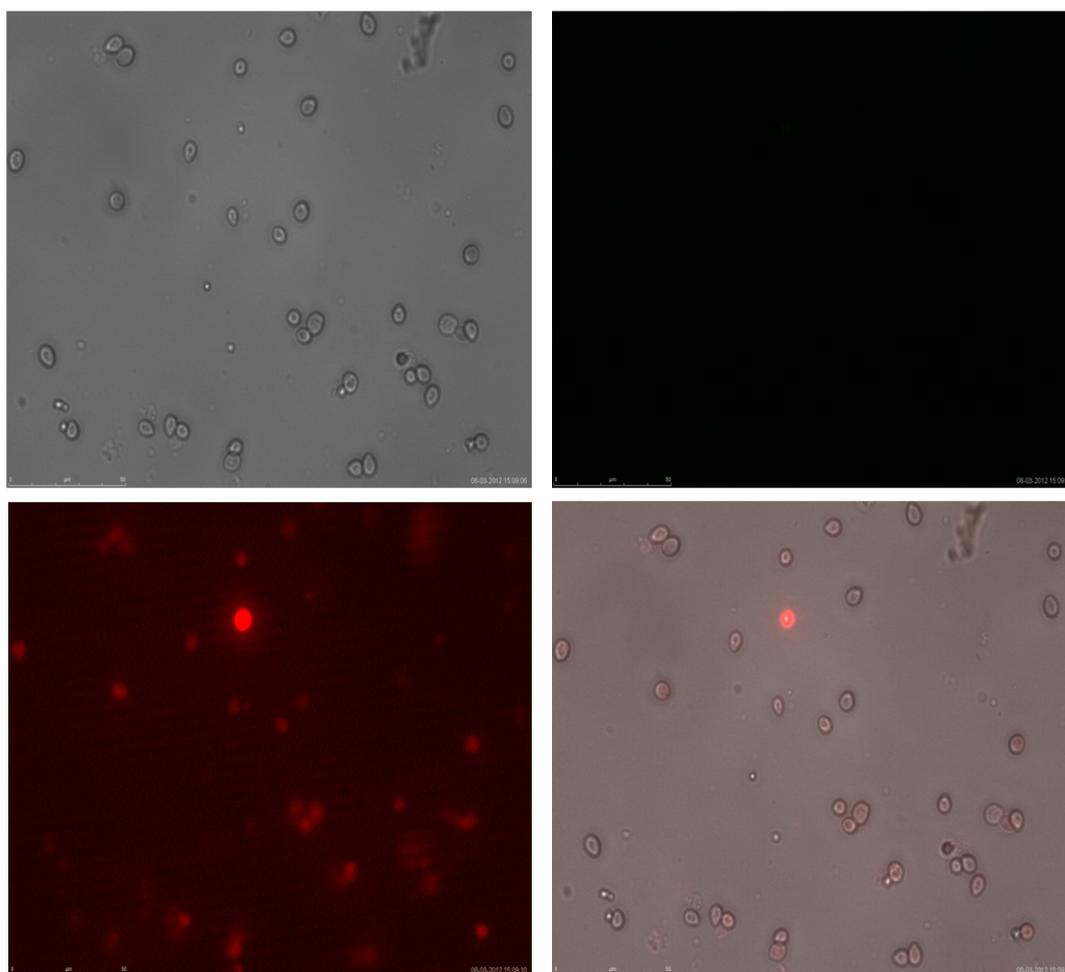


Figura 3.5.4 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com benzofenoxazina (partículas cujos espectro estão na **figura 3.4.3**). 100 μ L de suspensão celular D.O.= 0,38 + 10 μ L de nanoconjugados.

Procedeu-se então à preparação de conjugados de pontos quânticos com benzofenoxazina e MDA, nos quais são visíveis os picos de emissão dos pontos quânticos e da benzofenoxazina, e onde foi possível concluir que esta já não estava presente livremente (**figura 3.4.7**). Assim, utilizaram-se estas partículas seguidamente para marcação de suspensões de células inteiras e esferoplastos. Na **figura 3.5.5**, é possível verificar que não ocorreu marcação em nenhuma das condições.

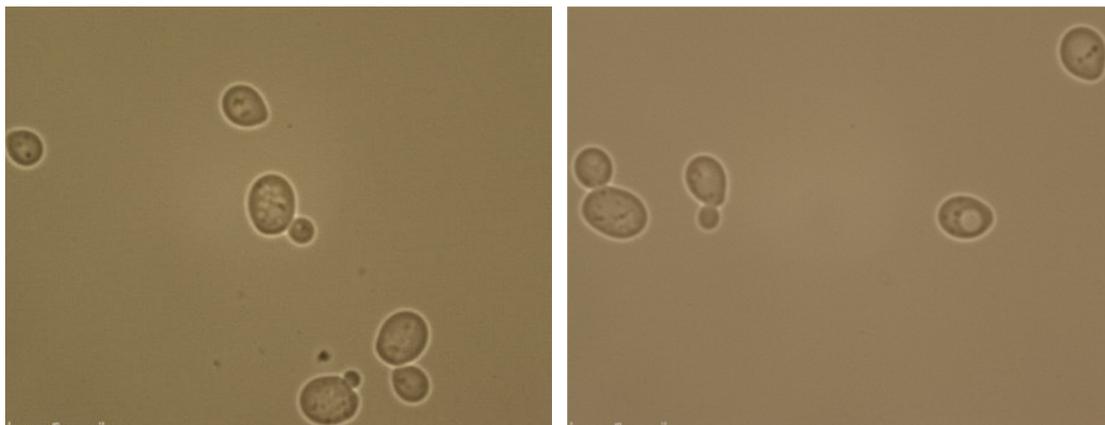


Figura 3.5.5 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com MDA e benzofenoxazina. **À esquerda:** 100 μ L de suspensão de células inteiras + 10 μ L de nanoconjugados em etanol. **À direita:** 100 μ L de suspensão de esferoplastos + 10 μ L de nanoconjugados em etanol (4 μ M). Imagens de campo claro e de fluorescência sobrepostas.

Como controlo para o ensaio com pontos quânticos conjugados com MDA e benzofenoxazina apresentado acima, realizou-se um ensaio nas mesmas condições com pontos quânticos apenas conjugados com MDA.

Quando se juntou estes pontos quânticos conjugados com MDA à suspensão celular, não se obteve qualquer marcação (**figura 3.5.6**). Este resultado indica que o MDA parece interferir com a incorporação das nanopartículas. Tal parece também, comparando as **figuras 3.5.4** e **3.5.5**, impedir que pontos quânticos conjugados com benzofenoxazina e MDA sejam incorporados pelas células.

No entanto, a presença de benzofenoxazina livre pode também estar na origem da marcação observada nos ensaios com nanopartículas conjugados apenas com benzofenoxazina (**figura 3.5.4**). Neste caso, talvez a superfície de pontos quânticos não conjugados, possivelmente mais reativa com as membranas, seja o que permite uma melhor internalização, o que não aconteceria com sistemas conjugados, nem com benzofenoxazina nem com MDA.

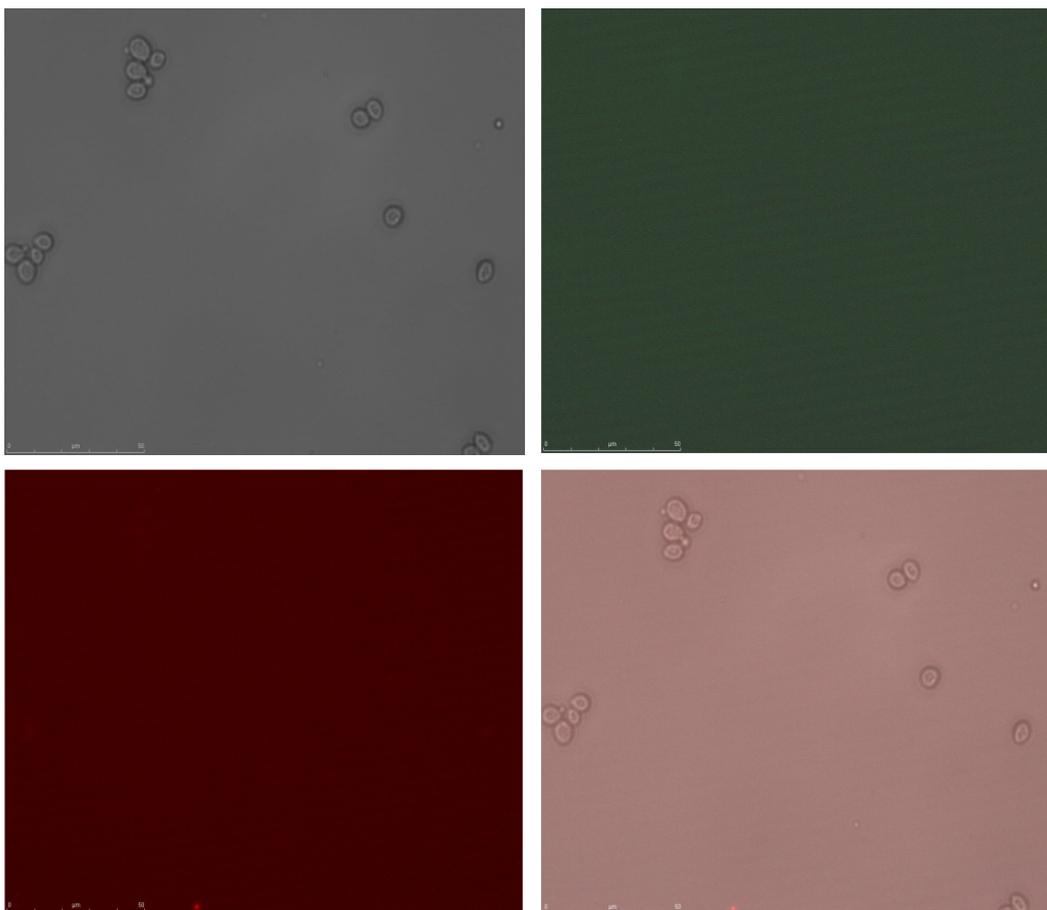


Figura 3.5.6 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com MDA. 100 µL de suspensão celular D.O. = 0.38 + 10 µL de pontos quânticos conjugados com MDA. Em cima: campo claro à esquerda e fluorescência verde à direita. Em baixo: fluorescência vermelha à esquerda e sobreposição de todas as outras imagens á direita.

3.5.2. Influência das condições de incubação e de preparação de esferoplastos na incorporação dos pontos quânticos

Para fundamentar melhor quaisquer conclusões acerca do processo e dos fatores que influenciam a internalização, partiu-se para uma abordagem mais elaborada para os ensaios biológicos, como descrito na secção 2.4. Nesta fase optou-se por omitir a imagem referente à fluorescência na zona do verde, na qual não se detetou marcação, em qualquer dos casos.

As **figuras 3.5.7, 3.5.8, 3.5.9 e 3.5.10**, referem-se a ensaios sem a digestão da parede celular, com pontos quânticos sem e com conjugação com benzofenoxazina e MDA.

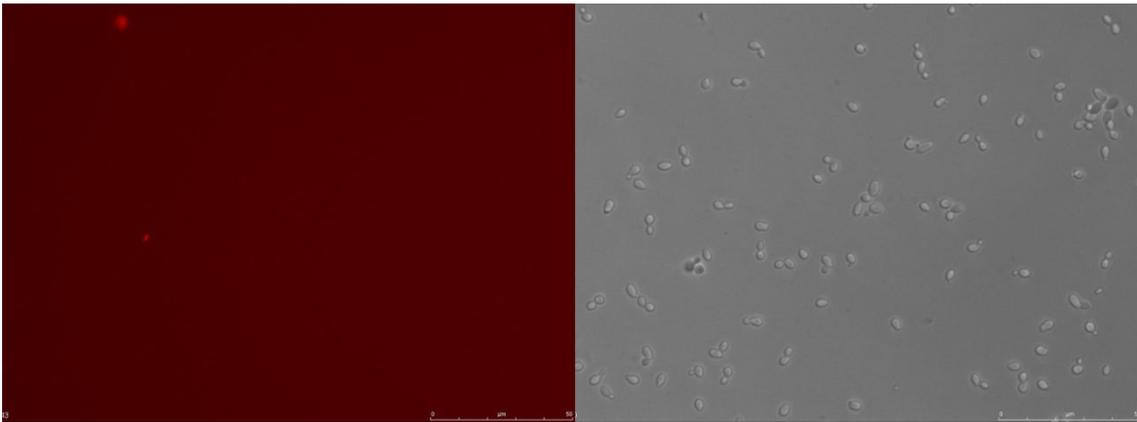


Figura 3.5.7 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos, sem digestão. Sem BSA nem PEG. À esquerda: fluorescência na zona do vermelho. À direita: campo claro.

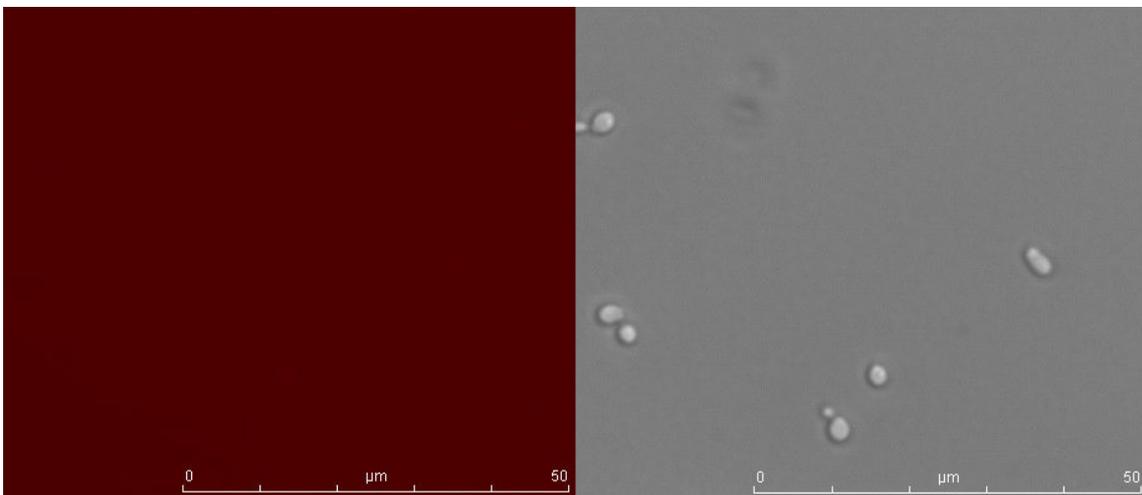


Figura 3.5.8 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos, sem digestão. Com BSA e PEG. À esquerda: fluorescência na zona do vermelho. À direita: campo claro.

Em nenhum destes resultados foi visível qualquer marcação. Para o caso de pontos quânticos não conjugados, os resultados (**figuras 3.5.7 e 3.5.8**) diferem daqueles obtidos pela primeira abordagem, em que simplesmente se adicionou as nanopartículas à suspensão celular, sem qualquer processamento (**figuras 3.5.2 e 3.5.3**). O uso de PEG e BSA não produziu, neste caso, qualquer influência. Nesta segunda abordagem (sem digestão) não se constata internalização dos pontos quânticos através da parede celular, ao contrário da primeira abordagem.

Comparando agora os resultados dos ensaios para pontos quânticos conjugados com MDA e benzofenoxazina, esta segunda abordagem (**figuras 3.5.9 e 3.5.10**) repetem os resultados da **figura 3.5.5**, em que não se observou marcação, e

suportam uma de duas conclusões: ou na **figura 3.5.4** a marcação se deve a benzofenoxazina livre (o que é improvável devido à ausência de marcação na zona do verde), ou então a presença de MDA é impeditiva da endocitose através da parede celular da levedura, ou seja, que pontos quânticos internalizam melhor quando apenas conjugados com benzofenoxazina.

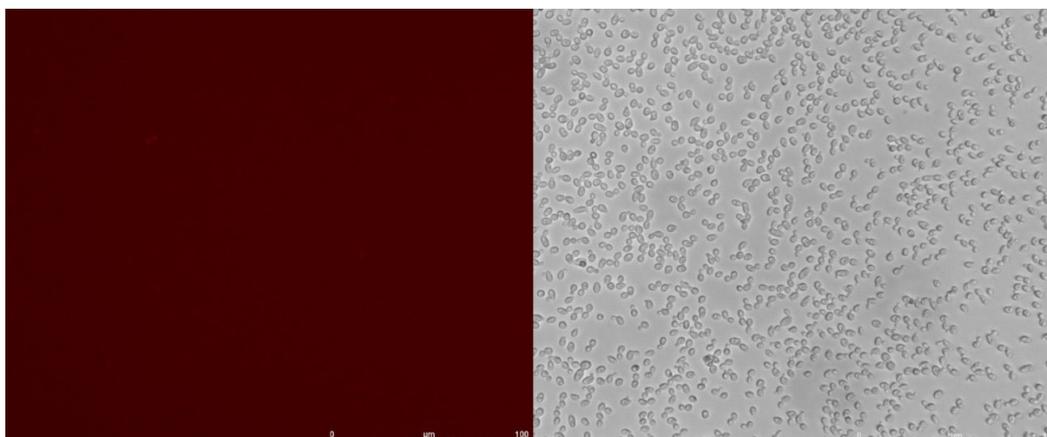


Figura 3.5.9 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com MDA e Benzofenoxazina, sem digestão. Sem BSA nem PEG. À esquerda: fluorescência na zona do vermelho. À direita: campo claro.

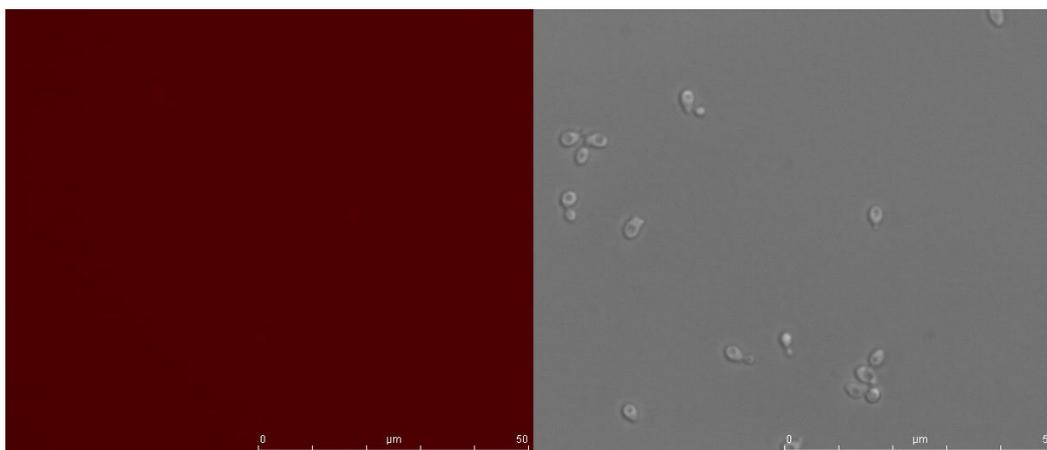


Figura 3.5.10 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos conjugados com MDA e Benzofenoxazina, sem digestão. Com BSA e PEG. À esquerda: fluorescência na zona do vermelho. À direita: campo claro.

Passando aos ensaios em que se realizou, por esta segunda abordagem, a digestão da parede celular antes da adição dos nanossistemas, a **figura 3.5.11** mostra a marcação na zona do vermelho de leveduras com pontos quânticos não conjugados. Voltou a ser visível a fluorescência nas células, indicando que a parede celular é, em alguma medida, impeditiva da internalização das nanopartículas. A maior intensidade do lado direito da imagem deve-se a um desalinhamento do microscópio aquando da captura destas imagens.

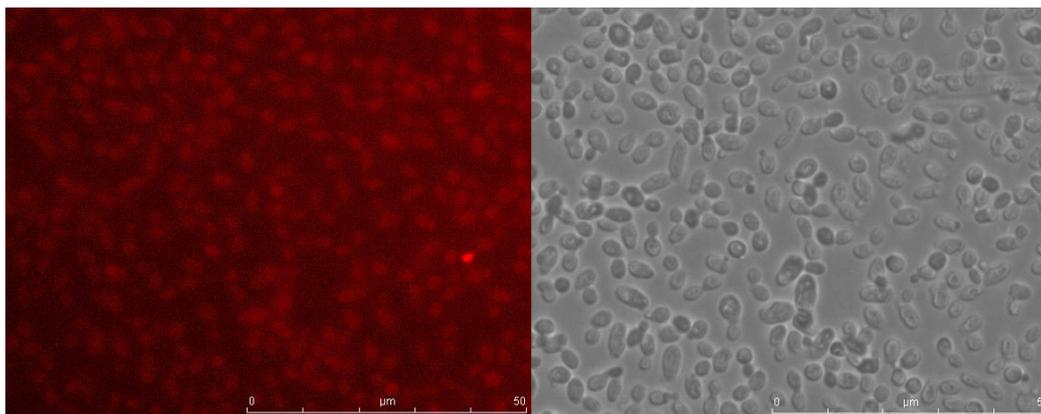


Figura 3.5.11 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos, com digestão. Sem BSA nem PEG. À esquerda: fluorescência na zona do vermelho. À direita: campo claro.

Como foi explicado na secção de procedimentos experimentais, efetuou-se um controlo com a adição de BSA e PEG ao mesmo tempo dos nanossistemas, para reduzir a marcação por adsorção não-específica. Isto parece ter efetivamente ocorrido, como mostra a **figura 3.5.12**. Ou seja, uma vez que a intensidade de marcação parece ter reduzido com o controlo em que se usou BSA e PEG, os resultados da **figura 3.5.11** incluem também, pelo menos em parte, alguma emissão de fluorescência de pontos quânticos que estão apenas adsorvidos, e não internalizados.

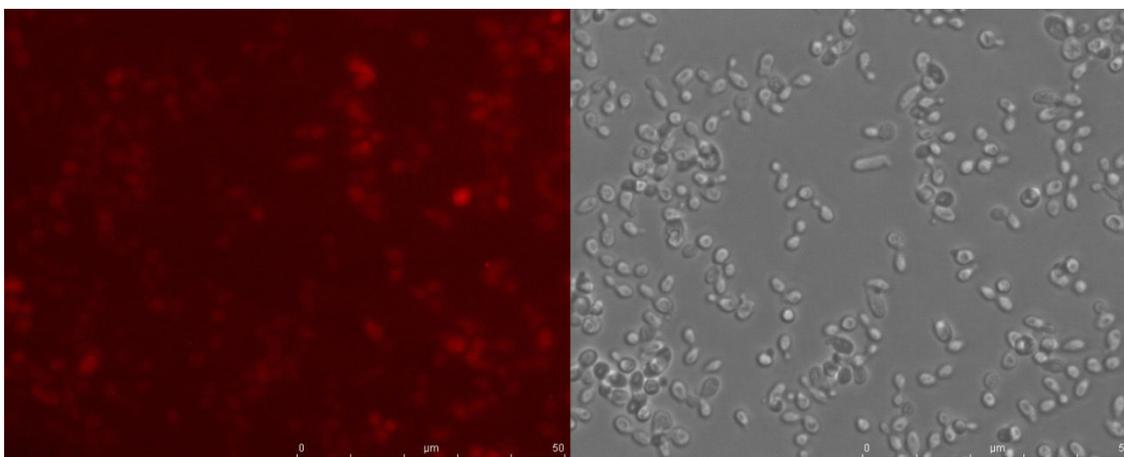


Figura 3.5.12 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos, com digestão. Com BSA e PEG. À esquerda: fluorescência na zona do vermelho. À direita: campo claro.

No que concerne aos ensaios com pontos quânticos conjugados com benzofenoxazina e MDA, esta segunda abordagem, que inclui a digestão da parede celular, levou a que se detetasse marcação celular por fluorescência na zona do vermelho (**figura 3.5.13**).

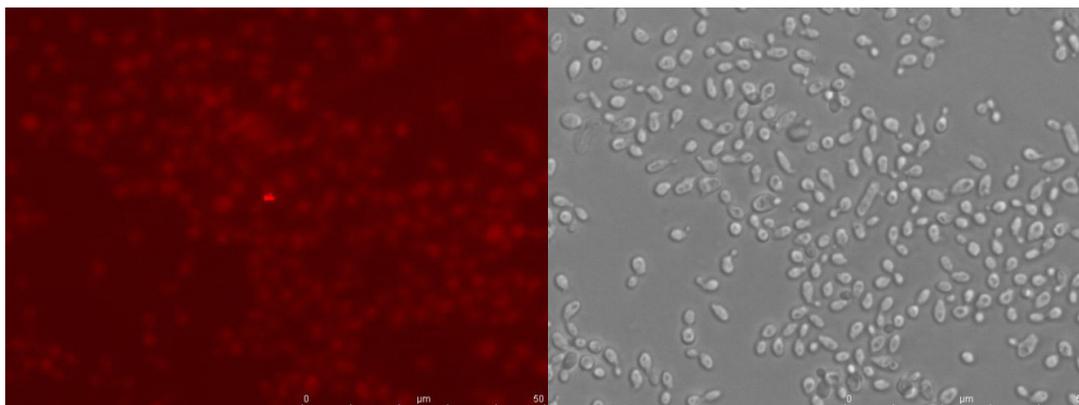


Figura 3.5.13 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com MDA e Benzofenoxazina, com digestão. Sem BSA nem PEG. À esquerda: fluorescência na zona do vermelho. À direita: campo claro.

Também aqui se realizou um controlo com BSA e PEG, desta vez tanto isoladamente como em simultâneo, como se pode ver na **figura 3.5.14** (com PEG e BSA), **figura 3.5.15** (com BSA) e **figura 3.5.16** (com PEG).

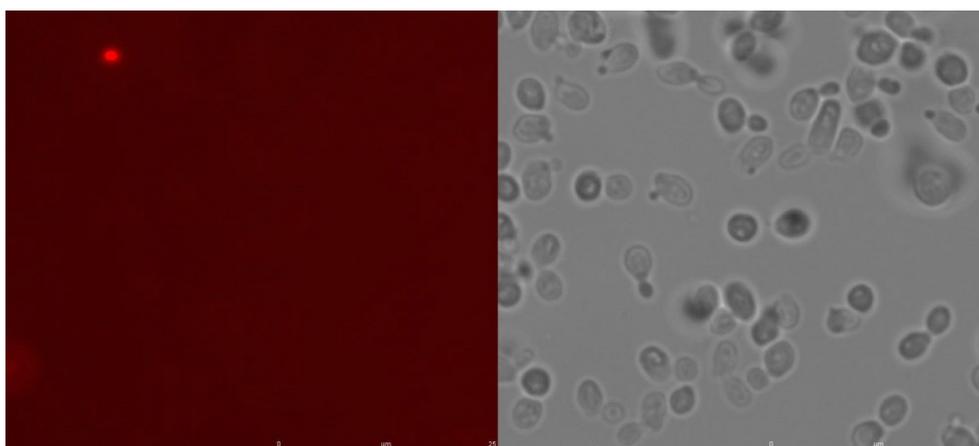


Figura 3.5.14 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com MDA e Benzofenoxazina, com digestão. Com BSA e PEG.

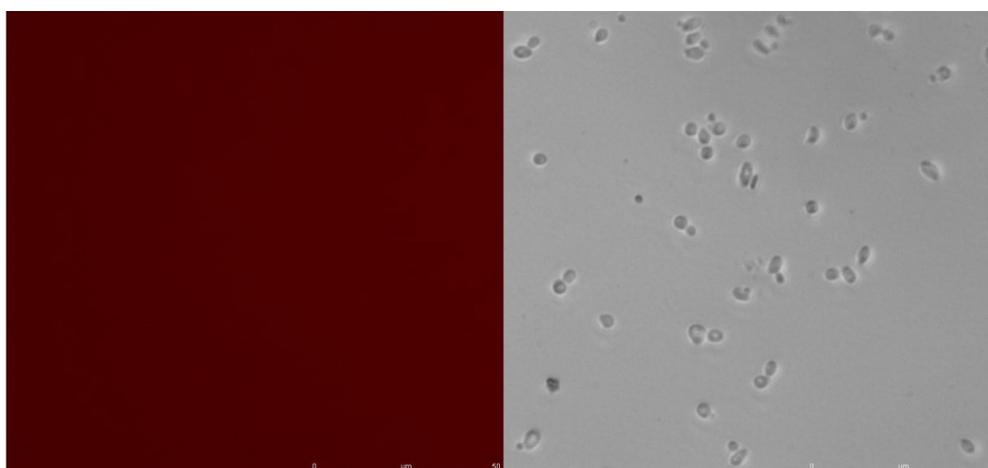


Figura 3.5.15 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com MDA e Benzofenoxazina, com digestão. Apenas com BSA.

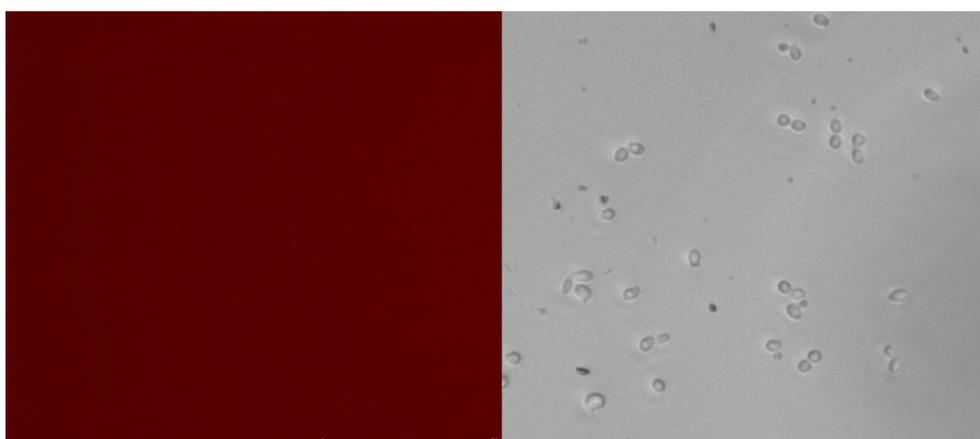


Figura 3.5.16 – Imagens de microscopia de fluorescência de células de *Saccharomyces cerevisiae* com pontos quânticos conjugados com MDA e Benzofenoxazina, com digestão. Apenas com PEG.

O conjunto destes resultados sugere que os pontos quânticos conjugados com MDA e benzofenoxazina não internalizam nas células, e apenas se adsorvem não especificamente às células no caso de ter ocorrido a digestão da parede celular. A análise fica também prejudicada devido à qualidade insuficiente das imagens para uma observação mais pormenorizada. O fato de não se detetar marcação celular em dois dos ensaios de pontos quânticos em células, sem digestão da parede celular (**figuras 3.5.6 e 3.5.10**), faz com diminuam as possibilidades de sucesso da endocitose de um sistema deste tipo, com MDA e benzofenoxazina à superfície dos pontos quânticos, em *Saccharomyces cerevisiae*.

Existe apenas uma possibilidade de estes ensaios biológicos terem sido bem-sucedidos, que é no caso da **figura 3.5.4** a marcação não se dever a benzofenoxazina livre. Contudo, como não se realizou mais ensaios com esta amostra, com os controlos adequados, a eliminar a possibilidade de adsorção não-específica, esta hipótese fica por confirmar.

Capítulo 4 - Conclusões

Como ficou explícito no capítulo introdutório, os pontos quânticos são uma nanotecnologia cujas propriedades e versatilidade as tornam promissoras para um conjunto alargado de aplicações, incluindo biológicas. A benzofenoxazina usada neste estudo, cuja emissão ocorre na zona dos 650 nm, está apta a funcionar como aceitadora de energia proveniente de pontos quânticos com cerca de 3,5 nm de diâmetro, ou seja, que emitam a cerca de 610 nm, a zona em que a benzofenoxazina absorve.

Neste trabalho, através do método de microemulsão, conseguiu-se produzir pontos quânticos núcleo/coroa de CdSe/ZnS com cerca de 3,5 nm de diâmetro, um espectro de emissão de fluorescência estreito, simétrico e na zona dos 610 nm, tal como pretendido para posterior conjugação com benzofenoxazinas. Demonstrou-se ser possível conseguir pontos quânticos, em ambientes sem atmosfera controlada, e com a qualidade pretendida, sem recorrer a métodos de muito elevada temperatura, o que torna estes procedimentos simplificados.

Foram testados, ainda que não exaustivamente, os efeitos da variação de alguns parâmetros durante a síntese dos nanocristais, cujos resultados foram ao encontro do que tinha sido descrito na revisão de literatura. A temperatura de síntese superior a 90°C mostrou ser a mais adequada. Pormenores como um passo intermédio de sonificação ou a posição do frasco parecem ter importância, o que demonstra o rigor com que tem que ser conduzido um estudo deste tipo. A variação dos parâmetros temperatura, ω_0 e C_{Cd} também se mostraram importantes para o domínio das características fluorescentes dos pontos quânticos. Os resultados evidenciam uma diferença de posição do pico de emissão, desviando-se para a direita com o aumento de ω_0 e a C_{Cd} . Tempos de síntese de uma hora mostraram ser os que obtiveram melhores resultados.

O crescimento da camada de ZnS em torno dos núcleos de CdSe produz resultados distintos consoante a largura dessa camada, em geral porque um ponto quântico maior tem um máximo de fluorescência em maiores comprimentos de onda. Não se conseguiu concluir com certeza que a coroa funcionasse como boa passivação, tal como descrito na introdução, uma vez que poucas vezes se obtiveram resultados

que o suportassem. Isto pode dever ao método utilizado na síntese das nanopartículas, uma vez que não foi encontrado nenhum idêntico na literatura revista. A fonte de sulfureto usada para o crescimento da coroa levou a alterações consideráveis no processo de purificação das partículas, o que indica a permanência de resíduos depois da síntese, possivelmente a cianamida, que à superfície delas as impede de precipitar com uma simples centrifugação. O crescimento da coroa foi confirmado pela alteração nos espectros de excitação, que se manteriam se apenas tivessem crescido os núcleos devido aos átomos de cádmio e selênio não reagidos.

A transferência das partículas para outro solvente e a retirada do surfatante levou a uma diminuição da intensidade de fluorescência, o que mostra o efeito passivador da camada de AOT. O pico de emissão desviou-se ligeiramente para a direita ao trocar o ciclohexano por etanol, efeito acompanhado por uma diminuição da intensidade. De seguida, ao retirar o AOT do etanol, a intensidade decresce para cerca de metade e a posição do pico mantém-se. Estes pontos quânticos mostraram-se insolúveis em água.

A conjugação com MDA levou também a uma redução da intensidade de fluorescência dos pontos quânticos.

Para a conjugação dos pontos quânticos com a benzofenoxazina, mostrou-se necessário retirar previamente o AOT, pois este parecia impedir a benzofenoxazina de se ligar às partículas. A conjugação apenas com benzofenoxazina levou, juntamente a um acentuado decréscimo da intensidade de fluorescência, a que desaparecesse a fluorescência na zona de emissão dos pontos quânticos.

Também se efetuou conjugações com MDA e benzofenoxazina em simultâneo, permanecendo assim as bandas de ambos os fluoróforos nos espectros finais. Confirmou-se a efetividade da ligação entre a benzofenoxazina e os pontos quânticos através de um simples método espectroscópico após sucessivas lavagens. Os resultados sugerem que existe transferência de energia, juntamente com outros processos desconhecidos de inibição de fluorescência.

Uma vez confirmada a conjugação, procedeu-se a estudos de fluorescência dos nanossistemas na presença de NADH, acrilamida e iodeto. Em todos estes casos, a reação do sistema conjugado foi semelhante, ocorrendo uma diminuição geral da fluorescência ao longo de todo o espectro com o aumento de concentração destas

substâncias. Contudo, quando se estudou o sistema por partes, separando os ensaios com pontos quânticos e com benzofenoxazinas, os resultados foram todos distintos entre si. A normalização dos espectros pelo pico de emissão da benzofenoxazina, no caso dos ensaios com NADH, sugere que é possível que esta substância interaja diretamente com os pontos quânticos, mesmo nos sistemas conjugados. Isto faria com que a intensidade de fluorescência observada na curva dos pontos quânticos aumentasse em relação à curva da benzofenoxazina.

A relação que se pode tirar, talvez a mais importante deste estudo, é que as propriedades do sistema conjugado não se resumem à soma das propriedades das partes que o compõem. Há aqui efeitos de uma emergência de propriedades que não estão presentes antes de ocorrer a conjugação, o que torna muito mais complexo o desenvolvimento de sistemas deste tipo, destinados a funcionarem como sensores. A complexidade aumenta se considerarmos que o meio onde estes sensores poderiam funcionar seria o meio celular, onde a quantidade de substâncias e imprevisibilidade de reações fazem requerer técnicas experimentais avançadas e muito sensíveis.

Os ensaios biológicos, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, realizaram-se com benzofenoxazina livre e pontos quânticos isolados, assim como com pontos quânticos conjugados apenas com MDA ou com MDA e benzofenoxazina em simultâneo.

A benzofenoxazina marca as células com especial incidência em estruturas intracelulares específicas, e de forma distinta na zona da fluorescência verde ou vermelha. A forma básica da benzofenoxazina está na origem da emissão de fluorescência na zona do verde, pelo que os resultados indicam que a carga elétrica da benzofenoxazina está a influenciar a sua distribuição intracelular.

Pontos quânticos isolados marcaram as células sem qualquer processamento prévio, o que foi evidenciando pelo crescimento dos vacúolos visível ao microscópio de fluorescência. Quando as células foram incubadas com BSA e PEG, sem digestão, os pontos quânticos já não atravessaram a parede celular, e portanto não ocorreu incorporação nem qualquer marcação. Nenhuma outra combinação de conjugações se incorporou nas células inteiras com este procedimento.

Ainda para a segunda abordagem, aquela em que a incubação foi feita com BSA e PEG, incluir nela a digestão da parede celular da levedura alterou os resultados.

Observou-se com este método a marcação fluorescente tanto para pontos quânticos não conjugados como para os conjugados com MDA e benzofenoxazina. No entanto, o controlo realizado simultaneamente, no qual se adicionaram PEG e BSA para a lavagem e redução de adsorção não-específica, reduziu a intensidade de marcação de pontos quânticos isolados, e eliminou a marcação por conjugados de MDA e benzofenoxazina.

O conjunto dos ensaios biológicos inclina-nos para a conclusão que nanossistemas baseados em pontos quânticos conjugados com MDA e benzofenoxazina, tal como foram produzidos e testados, não estão aptos a internalizar em *Saccharomyces cerevisiae*, com ou sem parede celular. No caso de pontos quânticos conjugados apenas com benzofenoxazina, apesar de resultarem numa intensidade de fluorescência menor que no caso de conjugação simultânea com MDA, parece ter ocorrido internalização. No entanto, a escassez de experiências feitas com tal sistema debilita esta conclusão. Assim, será necessário um trabalho continuado, no futuro, de modo a ensaiar todos os parâmetros criteriosamente e pormenorizadamente.

O trabalho futuro, a nosso ver, terá que ser dividido em partes, e muito provavelmente por vários investigadores. Será necessário otimizar o processo de produção e purificação de pontos quânticos, de modo a criar um lote estável a partir do qual se realizar as experiências subsequentes. A seguir, as experiências de conjugação dos pontos quânticos com um recetor de energia, a benzofenoxazina ou outros fluoróforos, terão que incluir técnicas avançadas de análise, como fluorimetria resolvida no tempo. Também aqui os processos de purificação terão de conduzir á certeza que não permanece fluoróforo em estado livre. Terá que se estudar a distância de conjugação do fluoróforo à superfície dos pontos quânticos, pois é possível que seja a sua elevada proximidade a causa do decréscimo acentuado de fluorescência, mais próxima de um inibidor que de um aceitador de energia.

Os ensaios biológicos poderão seguir o modelo usado para este trabalho, expandindo-se para ensaios de toxicidade e para tentativas de endocitose mediada por recetores, o que requereria a conjugação dos sistemas com outras biomoléculas.

Por fim, os estudos com NADH continuam a parecer-nos uma boa aposta, uma vez que existem na literatura casos de sucesso no desenvolvimento de sistemas deste género que atuam na sua presença.

Bibliografia

- [1] M. Link, P. Kelea, D. E. Achatz e O. S. Wolfbeis, "Brightly fluorescent purple and blue labels for amines and proteins," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 21, pp. 5538-5542, 2011.
- [2] N. Vukmirovic, "Physics of intraband quantum dot optoelectronic devices," University of Leeds, 2007.
- [3] M. Hardzei, M. Artemyev, M. Molinari, M. Troyon, A. Sukhanova e I. Nabiev, "Comparative Efficiency of Energy Transfer from CdSe–ZnS Quantum Dots or Nanorods to Organic Dye Molecules," *ChemPhysChem*, vol. 13, p. 330–335, 2012.
- [4] J.-C. Olivier, "Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles," *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, vol. 2, p. 108–119, 2005.
- [5] A. S. Ulrich, "Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles," *Bioscience Reports*, vol. 22, pp. 129-150, 2002.
- [6] S. Simões, A. Filipe, H. Faneca, M. Mano, N. Penacho, N. Düzgünes e M. de Lima, "Cationic liposomes for gene delivery.," *Expert Opin Drug Deliv.*, vol. 2, pp. 237-254, 2005 .
- [7] T. Shanmugam e R. Banerjee, "Nanostructured self assembled lipid materials for drug delivery and tissue engineering.," *Ther Deliv.*, vol. 2(11), pp. 1485-1516, 2011 .
- [8] Kaminskas, LM, V. McLeod, C. Porter e B. Boyd, "Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: an assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation.," *Mol Pharm.*, vol. 9(3), pp. 355-373, 2012 .
- [9] J. Khandare, M. Calderón, N. Dagia e R. Haag, "Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges.," *Chem Soc Rev.*, vol. 41(7), pp. 2824-2848, 2012 .
- [10] C. Höppener e L. Novotny, "Exploiting the light-metal interaction for biomolecular sensing and imaging.," *Q Rev Biophys.*, vol. 45(2), pp. 209-255, 2012 .
- [11] M. Colombo, S. Carregal-Romero, M. Casula, L. Gutiérrez, M. Morales, I. Böhm, J. Heverhagen, D. Prospero e W. Parak, "Biological applications of magnetic nanoparticles.," *Chem Soc Rev.*, vol. 41, pp. 4306-4334, 2012.
- [12] M. Pumera, "Graphene, carbon nanotubes and nanoparticles in cell metabolism.," *Curr Drug Metab.*, vol. 13, pp. 251-256, 2012.
- [13] F. Pinaud, X. Michalet, L. T. J. Bentolila, S. Doose, J. I. G. Li e S. Weiss, "Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1679-1687, 2006.
- [14] S. Pathak, C. Elizabeth, M. C. Davidson, J. Sungho e G. A. Silva, "Quantum Dot Applications to Neuroscience: New Tools for Probing Neurons and Glia," *The Journal of Neuroscience*, vol. 26, pp. 1893-1895, 2006.
- [15] S. Bhaskar, T. F., r. T. Stoege, W. Kreyling, J. de la Fuente, V. Grazú, P. Borm, G. Estrada, V. Ntziachristos e D. Razansky, "Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 7, n.º 3, 2011.
- [16] A. R. Jones e E. V. Shusta, "Blood-Brain Barrier Transport of Therapeutics via Receptor-Mediation," *Pharm Res.*, vol. 24, pp. 1759-1771, 2007.
- [17] P. Walter, E. Welcomme, P. Hallegot, N. Zaluzec, C. Deeb, J. Castaing, P. Veyssiere, R. Breniaux, J. Leveque e G. Tsoucaris, "Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula.," *Nano Lett.*, vol. 6, pp. 2215-2219, 2006.
- [18] H. P. Rooksby, "The Colour of Selenium Ruby Glasses," *Journal of the Society of Glass Technology*,

- vol. XVI, p. 171, 1932.
- [19] A. Ekimov, A. Efros e A. Onushchenko, "Quantum size effect in," *Solid State Communications*, vol. 56, n.º 11, pp. 921-924, 1985.
- [20] D. Bera, L. Qian, T.-K. Tseng e P. H. Holloway, "Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review.," *Materials*, vol. 3, pp. 2260-2345, 2010.
- [21] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir e S. Weiss, "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics," *Science*, vol. 307, n.º 5709, pp. 538-544, 2005.
- [22] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman e H. Mattoussi, "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing," *Nature Materials*, vol. 4, pp. 435 - 446, 2005.
- [23] A. D. Yoffe, "Semiconductor quantum dots and related systems: Electronic, optical, luminescence and related properties of low dimensional systems," *Advances in Physics*, vol. 50, pp. 1-208, 2001.
- [24] A. Yoffe, "Low-dimensional systems—quantum-size effects and electronic-properties of semiconductor microcrystallites (zero-dimensional systems) and some quasi-2-dimensional systems.," *Adv. Phys.*, vol. 42, pp. 173-266, 1993.
- [25] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan e M. El-Sayed, "Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes," *Chem. Rev.*, vol. 105, p. 1025–1102, 2005.
- [26] A. Alivisatos, "Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots.," *Science, New Series*, vol. 271, pp. 933-937, 1996.
- [27] B. Murray, D. Norris e M. Bawendi, "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 115, n.º 19, p. 8706, 1993.
- [28] J. Bang, H. Yang e P. Holloway, "Enhanced and stable green emission of ZnO nanoparticles by surface segregation of Mg.," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 973-978, 2006.
- [29] E. Kucur, W. Bucking, R. Giernoth e T. Nann, "Determination of defect states in semiconductor nanocrystals by cyclic voltammetry.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, p. 20355–20360, 2005.
- [30] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen e M. G. Bawendi, "(CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites," *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, n.º 46, pp. 9463-9475, 1997.
- [31] V. Colvin, A. Goldstein e A. Alivisatos, "Semiconductor nanocrystals covalently bound to metal-surfaces with self-assembled monolayers.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, p. 5221–5230, 1992.
- [32] C. Murray, C. Kagan e M. Bawendi, "Self-organization of CdSe nanocrystallites into 3-dimensional quantum-dot superlattices.," *Science*, vol. 270, p. 1335–1338, 1995.
- [33] B. Dabbousi, C. Murray, M. Rubner e M. Bawendi, "Langmuir-Blodgett manipulation of size-selected CdSe nanocrystallites.," *Chem. Mater.*, vol. 6, p. 216–219, 1994.
- [34] Q. Wang, Y. Kuo, Y. Wang, G. Shin, C. Ruengruglikit e Q. Huang, "Luminescent properties of water-soluble denatured bovine serum albumin-coated CdTe quantum dots.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, p. 16860–16866, 2006.
- [35] N. Ma, J. Yang, K. Stewart e S. Kelley, "DNA-passivated CdS nanocrystals: Luminescence, bioimaging, and toxicity profiles.," *Langmuir*, vol. 23, p. 12783–12787, 2007.
- [36] A. R. Kortan, R. Hull, R. L. Opila, M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, P. J. Carroll e L. E. Brus, "Nucleation and Growth of CdSe on ZnS Quantum Crystallite Seeds, and Vice Versa, in Inverse Micelle Media," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, pp. 1327-1332, 1990.
- [37] X. Peng, M. Schlamp, A. Kadavanich e A. Alivisatos, "Epitaxial growth of highly luminescent

- CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, p. 7019–7029, 1997.
- [38] X. Chen, Y. Lou, A. Samia e C. Burda, “Coherency strain effects on the optical response of core/shell heteronanostructures,” *Nano Lett.*, vol. 3, p. 799–803, 2003.
- [39] H. Yang, S. Santra, G. Walter e P. Holloway, “Gd-III-functionalized fluorescent quantum dots as multimodal imaging probes,” *Adv. Mater.*, vol. 18, p. 2890–2894, 2006.
- [40] Y. Ebenstein, T. Mokari e U. Banin, “Fluorescence quantum yield of CdSe/ZnS nanocrystals investigated by correlated atomic-force and single-particle fluorescence microscopy,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 80, p. 4033–4035, 2002.
- [41] A. Nazzal, X. Wang, L. Qu, W. Yu, Y. Wang, X. Peng e M. Xiao, “Environmental effects on photoluminescence of highly luminescent CdSe and CdSe/ZnS core/shell nanocrystals in polymer thin films,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, p. 5507–5515, 2004.
- [42] M. Nirmal, B. Dabbousi, M. Bawendi, J. Macklin, J. Trautman, T. Harris e L. Brus, “Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals,” *Nature (Londres)*, vol. 383, p. 802–804, 1996.
- [43] A. J. Nozik, M. C. Beard, J. M. Luther, M. Law, R. J. Ellingson e J. C. Johnson, “Semiconductor Quantum Dots and Quantum Dot Arrays and Applications of Multiple Exciton Generation to Third-Generation Photovoltaic Solar Cells,” *Chem. Rev.*, vol. 110, p. 6873–6890, 2010.
- [44] W. A. Tisdale, K. J. Williams, B. A. Timp, D. J. Norris, E. S. Aydil e X. Zhu, “Hot-Electron Transfer from Semiconductor Nanocrystals,” *Science*, vol. 328, pp. 1543-1547, 2010.
- [45] R. R. Cooney, S. L. Sewall, E. A. Dias, D. M. Sagar, K. E. H. Anderson e P. Kambhampati, “Unified picture of electron and hole relaxation pathways in semiconductor quantum dots,” *Physical Review B*, vol. 75, p. 245311, 2007.
- [46] M. Bawendi, W. Wilson, L. Rothberg, P. Carroll, T. Jedju, M. Steigerwald e L. Brus, “Electronic-structure and photoexcited-carrier dynamics in nanometer-size CdSe clusters,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 65, p. 1623–1626, 1990.
- [47] A. Efros, M. Rosen, M. Kuno, M. Nirmal, D. Norris e M. Bawendi, “Band-edge exciton in quantum dots of semiconductors with a degenerate valence band: Dark and bright exciton states,” *Phys. Rev. B*, vol. 54, p. 4843–4856, 1996.
- [48] W. Yu, L. Qu, W. Guo e X. Peng, “Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals,” *Chem. Mater.*, vol. 15, p. 2854–2860, 2003.
- [49] L. Qu e X. Peng, “Control of Photoluminescence Properties of CdSe Nanocrystals in Growth,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, pp. 2049-2055, 2002.
- [50] M. Kuno, D. Fromm, H. Hamann, A. Gallagher e D. Nesbitt, “Nonexponential “blinking” kinetics of single CdSe quantum dots: A universal power law behavior,” *J. Chem. Phys.*, vol. 112, p. 3117–3120, 2000.
- [51] A. Issac, C. von Borczyskowski e F. Cichos, “Correlation between photoluminescence intermittency of CdSe quantum dots and self-trapped states in dielectric media,” *Phys. Rev. B*, vol. 71, p. 161302, 2005.
- [52] W. van Sark, P. Frederix, D. van den Heuvel, A. Bol, J. van Lingen, C. Donega, H. Gerritsen e A. Meijerink, “A. Time-resolved fluorescence spectroscopy study on the photophysical behavior of quantum dots,” *J. Fluoresc.*, vol. 12, p. 69–76, 2002.
- [53] F. Stefani, X. Zhong, W. Knoll, M. Han e M. Kreiter, “Memory in quantum-dot photoluminescence blinking,” *New J. Phys.*, vol. 7, p. 197, 2005.
- [54] T. Gfroerer, “Photoluminescence in analysis of surfaces and interfaces,” *John Wiley & Sons Ltd.*, p.

9209–9231, 2000.

- [55] M. Amelia, S. Impellizzeri, S. Monaco, I. Yildiz, S. Silvi, F. Raymo e A. Credi, "Structural and Size Effects on the Spectroscopic and Redox Properties of CdSe Nanocrystals in Solution: The Role of Defect States," *Chem. Phys. Chem.*, vol. 12, p. 2280 – 2288, 2011.
- [56] U. Farva e C. Park, "Influence of thermal annealing on the structural and optical properties of CdSe nanoparticles," *Solar Energy Materials and Solar Cells*, vol. 94, n.º 2, pp. 303-309, 2010.
- [57] D. Pan, Q. Wang, S. Jiang, X. Ji e L. An, "Synthesis of Extremely Small CdSe and Highly Luminescent CdSe/CdS Core–Shell Nanocrystals via a Novel Two-Phase Thermal Approach," *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.*, vol. 17, pp. 176-179, 2005.
- [58] A. Valizadeh, H. Mikaeili, M. Samiei, S. Farkhani, N. Zarghami, M. Kouhi, A. Akbarzadeh e S. Davaran, "Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity," *Nanoscale Research Letters*, vol. 7, p. 480, 2012.
- [59] A. Henglein, "Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles," *Chemical Reviews*, vol. 89, pp. 1861-1873, 1989.
- [60] L. Spanhel, H. Weller e A. Henglein, "Photochemistry of semiconductor colloids. 22. Electron ejection from illuminated cadmium sulfide into attached titanium and zinc oxide particles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 109, pp. 6632-6635, 1987.
- [61] H. C. Youn, S. Baral e J. H. Fendler, "Dihexadecyl phosphate, vesicle-stabilized and in situ generated mixed cadmium sulfide and zinc sulfide semiconductor particles: preparation and utilization for photosensitized charge separation and hydrogen generation," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 92, pp. 6320-6327, 1988.
- [62] C. F. Hoener, K. A. Allan, A. J. Bard, A. Campion, M. A. Fox, T. E. Mallouk, S. E. Webber e J. M. White, "Demonstration of a shell-core structure in layered cadmium selenide-zinc selenide small particles by x-ray photoelectron and Auger spectroscopies," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 96, pp. 3812-3817, 1992.
- [63] I. Honma, T. Sano e H. Komiyama, "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for semiconductor microcrystallites observed in silver-cadmium sulfide hybrid particles," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, pp. 6692-6695, 1993.
- [64] H. S. Zhou, H. Sasahara, I. Honma, H. Komiyama e J. W. Haus, "Coated Semiconductor Nanoparticles: The CdS/PbS System's Photoluminescence Properties," *Chemistry of Materials*, vol. 6, pp. 1534-1541, 1994.
- [65] E. Chason, S. Picraux, J. Poate, J. Borland, M. Current, T. delaRubia, D. Eaglesham, O. Holland, M. Law, C. Magee, J. Mayer, J. Melngailis e A. Tisch, "Ion beams in silicon processing and characterization," *J. Appl. Phys.*, vol. 81, p. 6513–6561, 1997.
- [66] A. Scherer, H. Craighead e E. Beebe, "Gallium-arsenide and aluminum gallium-arsenide reactive ion etching in boron-trichloride argon mixtures," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 5, p. 1599–1605, 1987.
- [67] H. Zhang, M. Ross, M. Hopkinson, S. Zhang e T. Walther, "Study of Controlled Quantum Dot Formation on Focused Ion Beam Patterned GaAs Substrates," *2012 12th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO)*, 2012.
- [68] L. J. Martínez, I. Prieto, B. Alén e P. A. Postigo, "Fabrication of high quality factor photonic crystal microcavities in InAsP/InP membranes combining reactive ion beam etching and reactive ion etching," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 27, p. 1801, 2009.
- [69] L. K. Lee e P. Ku, "Fabrication of site-controlled InGaN quantum dots using reactive-ion etching," *Phys. Status Solidi C*, vol. 9, p. 609–612, 2012.
- [70] D. Bera, L. Qian e P. H. Holloway, "Semiconducting Quantum Dots for Bioimaging," *Drugs and the*

Pharmaceutical Sciences, vol. 191, p. 349, 2009.

- [71] K. Tachibana, T. Someya e Y. Arakawa, "Nanometer-scale InGaN self-assembled quantum dots grown by metalorganic chemical vapor deposition," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 74, p. 383, 1999.
- [72] S. Faure, M. Nishioka, S. Ishida, D. Guimard e Y. Arakawa, "Metal Organic Chemical Vapor Deposition Growth of High Spectral Quality Site-Controlled InAs Quantum Dots Using In situ Patterning," *Applied Physics Express*, vol. 4, pp. 112001-112003, 2011.
- [73] T. Li, Q. Wang, X. Guo, Z. Jia, P. Wang, X. Ren, Y. Huang e S. Cai, "The saturation density property of (B)InAs/GaAs quantum dots grown by metal-organic chemical vapor deposition," *Physica E*, vol. 44, pp. 1146-1151, 2012.
- [74] S. H. Xin, P. D. Wang, A. Yin, C. Kim, M. Dobrowolska, J. L. Merz e J. K. Furdyna, "Formation of self-assembling CdSe quantum dots on ZnSe by molecular beam epitaxy," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 69, p. 3884, 1996.
- [75] M. Ohishi, Y. Banden, M. Yoneta e H. Saito, "In-Situ RHEED Study of the Alloying of CdSe/ZnSe Quantum Dot Structure Fabricated by an Alternate Molecular Beam Supply," *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, vol. 8, pp. 283-286, 2010.
- [76] M. H. Entezari e N. Ghows, "Micro-emulsion under ultrasound facilitates the fast synthesis of quantumdots of CdS at low temperature," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, pp. 127-134, 2011.
- [77] A. Garcia, M. Fernandes e P. Coutinho, "CdSe/TiO₂ core-shell nanoparticles produced in AOT reverse micelles: applications in pollutant photodegradation using visible light," *Nanoscale Res Lett.*, vol. 6, p. 426, 2011.
- [78] D. Bera, L. Qian, S. Sabui, S. Santra e P. Holloway, "Photoluminescence of ZnO quantum dots produced by a sol-gel process," *Optical Materials*, vol. 30, p. 1233-1239, 2008.
- [79] Y. Liu, T. Morishima, T. Yatsui, T. Kawazoe e M. Ohtsu, "Size control of sol-gel-synthesized ZnO quantum dots using photo-induced desorption," *Nanotechnology*, vol. 22, p. 215605, 2011.
- [80] K. S. Rathore, D. P. Deepika, N. Saxena e K. Sharma, "Cadmium Sulphide Nanocrystallites: Synthesis, Optical and Electrical Studies," *AIP Conf. Proc.*, vol. 1249, pp. 145-148, 2009.
- [81] H. Qian, X. Qiu, L. Li. e J. Ren, "Microwave-Assisted Aqueous Synthesis: A Rapid Approach to Prepare Highly Luminescent ZnSe(S) Alloyed Quantum Dots," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, p. 9034-9040, 2006.
- [82] W. Cheng, D. Liu e Z. Yan, "Spectroscopic study on CdS nanoparticles prepared by microwave irradiation," *Spectrosc Spectral Anal*, vol. 28, p. 1348-1352, 2008.
- [83] R. Penner, "Hybrid Electrochemical/Chemical Synthesis of Quantum Dots," *Acc. Chem. Res.*, vol. 33, p. 78-86, 2000.
- [84] Y. Li, Y. Hu, Y. Zhao, G. Shi, L. Deng, Y. Hou e L. Qu, "An Electrochemical Avenue to Green-Luminescent Graphene Quantum Dots as Potential Electron-Acceptors for Photovoltaics," *Advanced Materials*, vol. 23, pp. 776-780, 2011.
- [85] L. Qian, D. Bera e P. H. Holloway, "Temporal evolution of white light emission from CdSe quantum dots," *Nanotechnology*, vol. 19, p. 285702, 2008.
- [86] L. Qu, Z. Peng e X. Peng, "Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals," *Nano Letters*, vol. 1, pp. 333-337, 2001.
- [87] M. A. Hines e H. Guyot-Sionnest, "Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, pp. 468-471, 1996.
- [88] A. M. F. Garcia, M. S. Fernandes e P. J. Coutinho, "CdSe/TiO₂ core-shell nanoparticles produced in AOT reverse micelles: applications in pollutant photodegradation using visible light," *Nanoscale*

- Research Letters*, vol. 6, p. 426, 2011.
- [89] M. Pileni, "Reverse micelles used as templates: a new understanding in nanocrystal growth," *Journal of Experimental Nanoscience*, vol. 1, pp. 13-27, 2006.
- [90] G. Hota, S. B. Idage e K. C. Khilar, "Characterization of nano-sized CdS-Ag₂S core-shell nanoparticles using XPS technique," *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 293, pp. 5-12, 2007.
- [91] G. Hota, S. Jain e K. C. Khilar, "Synthesis of CdS-Ag₂S core-shell/composite nanoparticles using AOT/n-heptane/water microemulsions," *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 232, pp. 119-127, 2004.
- [92] M. Y. Han, W. Huang, C. H. Chew, L. M. Gan, X. J. Zhang e W. Ji, "Large Nonlinear Absorption in Coated Ag₂S/CdS Nanoparticles by Inverse Microemulsion," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, pp. 1884-1887, 1998.
- [93] R. Bru, A. Sanchez-Ferrer e F. Garcia-Carmona, "Kinetic models in reverse micelle," *Biochem. J.*, vol. 310, pp. 721-739, 1995.
- [94] M. Pileni, "Reverse Micelles as microreactors," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, p. 6961-6973, 1993.
- [95] A. Pandeya e A. Pandey, "Reverse micelles as suitable microreactor for increased biohydrogen production," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, p. 273-278, 2008.
- [96] B. H. Robinson, C. Toprakcioglu e J. C. Dore, "Small-angle Neutron-scattering Study of Microemulsions Stabilised by Aerosol-OT. Part 1 - Solvent and Concentration Variation," *J. Chem. Soc.- Faraday Trans. I*, vol. 80, pp. 13-27, 1984.
- [97] M. Ethayaraja e R. Bandyopadhyaya, "Model for Core-Shell Nanoparticle Formation by Ion-Exchange Mechanism," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 47, pp. 5982-5985, 2008.
- [98] B. Viswanadh, S. Tikku e K. C. Khilar, "Modeling core-shell nanoparticle formation using three reactive microemulsions," *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 298, pp. 149-157, 2007.
- [99] C. Tojo, F. Barroso e M. de Dios, "Critical nucleus size effects on nanoparticle formation in microemulsions: A comparison study between experimental and simulation results," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 296, pp. 591-598, 2006.
- [100] M. A. Malika, M. Y. Wanib e M. A. Hashim, "Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials: 1st Nano Update," *Arabian Journal of Chemistry*, pp. 397-417, 2012.
- [101] M. d. Diosa, F. Barrosoa, C. Tojoa e M. López-Quintela, "Simulation of the kinetics of nanoparticle formation in microemulsions," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 333, pp. 741-748, 2009.
- [102] R. G. Chaudhuri e S. Paria, "Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications," *Chemical Reviews*, vol. 112, pp. 2373-2433, 2012.
- [103] I. Lisiecki e M. P. Pileni, "Copper Metallic Particles Synthesized "in Situ" in Reverse Micelles: Influence of Various Parameters on the Size of the Particles," *J. Phys. Chem.*, vol. 99, pp. 5077-5082, 1995.
- [104] M. P. Pileni, L. Motte e C. Petit, "Synthesis of cadmium sulfide in situ in reverse micelles: influence of the preparation modes on size, polydispersity, and photochemical reactions," *Chem. Mater.*, vol. 4, p. 338, 1992.
- [105] M. M. Husein, E. Rodil e J. H. Vera, "Preparation of AgBr Nanoparticles in Microemulsions Via Reaction of AgNO₃ with CTAB Counterion," *J. Nanopart. Res.*, vol. 9, pp. 787-796, 2007.

- [106] A. K. Sugih, D. Shukla, H. J. Heeres e A. Mehra, "CaCO₃ nanoparticle synthesis by carbonation of lime solution in microemulsion systems," *Nanotechnology*, vol. 18, p. 035607, 2007.
- [107] J. José, "Water-soluble benzophenoxazine dyes: syntheses, derivatization and photophysical studies," 2006.
- [108] P. Coutinho, M. Gonçalves, C. Alves and S. Naik, "New long alkyl side-chain benzo[a]phenoxazines as micellisation probes," *Tetrahedron Letters*, vol. 50, pp. 4470-4474, 2009.
- [109] C. M. A. Alves, S. Naik, P. J. G. Coutinho e M. S. T. Gonçalves, "Novel long alkyl side chain benzo[a]phenoxazinium chlorides: synthesis, photophysical behaviour and DNA interaction," *Tetrahedron*, vol. 65, p. 10441-10452, 2009.
- [110] S. Naik, C. Alves, P. Coutinho e M. Gonçalves, "N-(Di)icosyl-Substituted Benzo[a]phenoxazinium Chlorides: Synthesis and Evaluation as Near-Infrared Membrane Probes," *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2011, p. 2491-2497, 2011.
- [111] V. Frade, P. Coutinho, J. Moura e M. Gonçalves, "Functionalised benzo[a]phenoxazine dyes as long-wavelength fluorescent probes for amino acids," *Tetrahedron*, vol. 63, p. 1654-1663, 2007.
- [112] P. Coutinho, "Photophysics and Biophysical applications of benzo[a]phenoxazine type fluorophores," *Reviews in Fluorescence*, vol. 2007, pp. 335-362, 2009.
- [113] V. Frade, M. Gonçalves, P. Coutinho e J. Moura, "Synthesis and spectral properties of long-wavelength fluorescent dyes," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 185, pp. 220-230, 2007.
- [114] L. Kubota, F. Gouvea, A. N. Andrade, B. G. Milagres e G. O. Neto, "Electrochemical sensor for NADH based on Meldola's blue immobilized on silica gel modified with titanium phosphate," *Electrochimica Acta*, vol. 41, pp. 1465-1469, 1996.
- [115] L. Abayomi, L. Terry, S. White e P. Warner, "Development of a disposable pyruvate biosensor to determine pungency in onions (*Allium cepa* L.)," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, pp. 2176-2179, 2006.
- [116] I. Del Villar, I. Matias, F. Arregui e R. Claus, "Fiber-optic hydrogen peroxide nanosensor," *Sensors Journal, IEEE*, vol. 5, pp. 365-371, 2005.
- [117] M. A. Lomillo, J. G. Ruiz e F. J. M. Pascual, "Biosensor based on platinum chips for glucose determination," *Anal. Chim. Acta*, vol. 547, pp. 209-214, 2005.
- [118] N. Forrow, G. S. Sanghera, S. Walters e J. L. Watkin, "Development of a commercial amperometric biosensor electrode for the ketone d-3-hydroxybutyrate," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 1617-1625, 2005.
- [119] C. a. Markets, "Nanoparticles in Biotechnology, Drug Development and Drug Delivery," BCC Research, <http://www.companiesandmarkets.com/Market/Healthcare-and-Medical/Market-Research/Nanoparticles-in-Biotechnology-Drug-Development-and-Drug-Delivery/RPT1106619>, 2012.
- [120] N. Gaponik, D. Talapin, A. Rogach, K. Hoppe, E. Shevchenko, A. Kornowski, A. Eychmuller e H. Weller, "Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, p. 7177-7185, 2002.
- [121] W.-C. Law, K.-T. Yong, I. Roy, H. Ding, R. Hu, W. Zhao e P. N. Prasad, "Aqueous-Phase Synthesis of Highly Luminescent CdTe/ZnTe Core/Shell Quantum Dots Optimized for Targeted Bioimaging," *Small*, vol. 5, p. 1302-1310, 2009.
- [122] A. Smith, H. Duan, A. Mohs e S. Nie, "Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 1226-1240, 2008.
- [123] M. B. Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss e A. P. Alivisatos, "Semiconductor nanocrystals as

- fluorescent biological labels," *Science*, vol. 281, pp. 2013-2016, 1998.
- [124] M. A. Walling, J. A. Novak e J. R. E. Shepard, "Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, pp. 441-491, 2009.
- [125] M. Akerman, W. Chan, P. Laakkonen, S. Bhatia e E. Ruoslahti, "Nanocrystal Targeting In Vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 99, pp. 12617-12621, 2002.
- [126] M. Han, X. Gao, J. Su e S. Nie, "Quantum-dot-tagged Microbeads for Multiplexed Optical Coding of Biomolecules," *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, pp. 631-635, 2001.
- [127] H. Mattoussi, J. Mauro, E. Goldman, G. Anderson, V. Sundar, F. Mikulec e M. Bawendi, "Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, pp. 12142-12150, 2000.
- [128] J. Jaiswal, H. Mattoussi, J. Mauro e S. Simon, "Long-term Multiple Color Imaging of Live Cells Using Quantum Dot Bioconjugates," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 47-51, 2003.
- [129] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. MunozJavier, H. Gaub, S. Stolzle, N. Fertig e W. Parak, "Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles," *Nano Lett.*, vol. 5, pp. 331-338, 2005.
- [130] A. Sukhanova, L. Venteo, J. Devy, M. Artemyev, V. Oleinikov, M. Pluot e I. Nabiev, "Stable Fluorescent Nanocrystals as a Novel Class of Labels for Immunohistochemical Analysis of Paraffin-Embedded Tissue Sections," *Lab. Invest.*, Vols. %1 de %21259-1261, p. 82, 2002.
- [131] A. Sukhanova, J. Devy, L. Venteo, H. Kaplan, M. Artemyev, V. Oleinikov, D. Klinov, M. Pluot, J. Cohen e I. Nabiev, "Biocompatible Fluorescent Nanocrystals for Immunolabeling of Membrane Proteins and Cells. Anal. Biochem. 2004, 324, 60-67," *Anal. Biochem.*, vol. 324, pp. 60-67, 2004.
- [132] F. Pinaud, D. King, H.-P. Moore e S. Weiss, "Bioactivation and Cell Targeting of Semiconductor CdSe/ZnS Nanocrystals with Phytochelatin-Related Peptides," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, pp. 6115-6123, 2004.
- [133] M. J. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss e A. Alivisatos, "Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels," *Science*, vol. 281, pp. 2013-2016, 1998.
- [134] D. Gerion, F. Pinaud, S. Williams, W. Parak, D. Zanchet, S. Weiss e A. Alivisatos, "Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, pp. 8861-8871, 2001.
- [135] F. Chen e D. Gerion, "Fluorescent CdSe/ZnS Nanocrystal-Peptide Conjugates for Long-term, Nontoxic Imaging and Nuclear Targeting in Living Cells," *Nano Lett.*, vol. 4, pp. 1827-1832, 2004.
- [136] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. Haley, J. Treadway, J. Larson, N. Ge, F. Peale e M. Bruchez, "Immunofluorescent Labeling of Cancer Marker Her2 and Other Cellular Targets with Semiconductor Quantum Dots," *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 41-46, 2003.
- [137] H. Gussin, I. Tomlinson, D. Little, M. Warnement, H. Qian, S. Rosenthal e D. Pepperberg, "Binding of Muscimol-Conjugated Quantum Dots to GABA Receptors," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, pp. 15701-15713, 2006.
- [138] B. Dubertret, P. Skourides, D. Norris, V. Noireaux, A. Brivanlou e A. Libchaber, "In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles," *Science*, vol. 298, pp. 1759-1962, 2002.
- [139] J. Ryman-Rasmussen, J. Riviere e Monteiro-Riviere, "Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties," *Toxicol. Sci.*, vol. 91, pp. 159-165, 2006.
- [140] H. Duan e S. Nie, "Cell-Penetrating Quantum Dots Based on Multivalent and Endosome-Disrupting Surface Coatings," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, pp. 3333-3338, 2007.
- [141] M. Yezhelyev, X. Gao, Y. Xing, A. Al-Hajj, S. Nie e R. O'Regan, "Emerging use of nanoparticles in

- diagnosis and treatment of breast cancer," *Lancet Oncol.*, vol. 7, pp. 657-667, 2006.
- [142] M. Ferrari, "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, pp. 161-171, 2005.
- [143] S. Bhaskar, T. F. T. Stoeger, W. Kreyling, J. d. I. Fuente, V. Grazú, B. P. E. G. N. V e D. Razansky, Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging, doi:10.1186/1743-8977-7-3, 2011.
- [144] A. Wu, S. Gambhir e S. Weiss, "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics," *Science*, vol. 307, pp. 538-544, 2005.
- [145] Y. Xing, Q. Chaudry, C. Shen, K. Kong, H. Zhau, L. Chung, J. Petros, R. O'Regan, M. Yezhelyev, J. Simons, M. Wang e S. Nie, "Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry," *Nat. Protoc.*, vol. 2, p. 1152-1165, 2007.
- [146] D. Lidke, P. Nagy, R. Heintzmann, D. Arndt-Jovin, J. Post, H. Grecco, E. Jares-Erijman e T. Jovin, "Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction," *Nat Biotechnol.*, vol. 22, pp. 198-203, 2004.
- [147] R. Bagwe, X. Zhao e W. Tan, "Bioconjugated luminescent nanoparticles for biological applications," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 24, p. 453-464., 2003.
- [148] I. Medintz, A. Clapp, H. Mattoussi, E. Goldman, B. Fisher e J. Mauro, "Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors," *Nat. Mater.*, vol. 2, pp. 630-638, 2003.
- [149] C. Zhang, H. Yeh, M. Kuroki e T. Wang, "Single-quantum-dot-based DNA nanosensor," *Nat. Mater.*, vol. 4, p. 826-831, 2005.
- [150] C. T. Yavuz, J. T. Mayo, W. W. Yu, A. Prakash, J. C. Falkner, S. Yean, L. Cong, H. J. Shipley, A. Kan, M. Tomson, D. Natelson e V. L. Colvin, "Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals," *Science*, vol. 314, pp. 964-967, 2006.
- [151] G. D. Moeser, K. A. Roach, W. H. Green, T. A. Hatton e P. E. Laibinis, "High-gradient magnetic separation of coated magnetic nanoparticles," *AIChE J.*, vol. 50, pp. 2835-2848, 2004.
- [152] L. Alamo-Nole, S. Bailon-Ruiz, O. Perales-Perez e R. Roman, "Preparative size-exclusion chromatography for separation and purification of water-stable Cd-based quantum dots," *Anal. Methods*, vol. 4, pp. 3127-3132, 2012.
- [153] T. Arita, T. Yoshimura e T. Adschiri, "Size exclusion chromatography of quantum dots by utilizing nanoparticle repelling surface of concentrated polymer brush," *Nanoscale*, vol. 2, pp. 1467-1473, 2010.
- [154] S. A. Owens, M. C. Carpenter, J. W. Sonne, C. A. Miller, J. R. Renehan, C. A. Odonkor, E. M. Henry e D. T. Miles, "Reversed-Phase HPLC Separation of Water-Soluble, Monolayer-Protected Quantum Dots," *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, p. 18952-18957, 2011.
- [155] L. Bai, X. Ma, J. Liu, X. Sun e D. Zhao, "Rapid Separation and Purification of Nanoparticles in Organic Density Gradients," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, p. 2333-2337, 2010.
- [156] M. L. Mastronardi, F. Hennrich, E. J. Henderson, F. Maier-Flaig, C. Blum, J. Reichenbach, C. K. Uli Lemmer §, D. Wang, M. M. Kappes e G. A. Ozin, "Preparation of Monodisperse Silicon Nanocrystals Using Density Gradient Ultracentrifugation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, p. 11928-11931, 2011.
- [157] S. Ho, K. Critchley, G. D. Lilly, B. Shim e N. A. Kotov, "Free flow electrophoresis for the separation of CdTe nanoparticles," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, pp. 1390-1394, 2009.
- [158] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lotz e C. Sönnichsen, "Separation of Nanoparticles by Gel Electrophoresis According to Size and Shape," *Nano Lett.*, vol. 7, pp. 2881-2885, 2007.

- [159] D. L. Ferreira, F. O. Silva, L. C. S. Viol, M. A. Schiavon e P. Licinio, "Size Selective Precipitation of CdSe Colloidal Quantum Dots," *AIP Conf. Proc.*, vol. 1199, pp. 309-310, 2010.
- [160] M. Danek, K. F. Jensen, C. B. Murray e M. G. Bawendi, "Synthesis of Luminescent Thin-Film CdSe/ZnSe Quantum Dot Composites Using CdSe Quantum Dots Passivated with an Overlayer of ZnSe," *Chem. Mater.*, vol. 8, pp. 173-180, 1996.
- [161] S. Cingarapu, Z. Yang, C. M. Sorensen e K. J. Klabunde, "Synthesis of CdSe/ZnS and CdTe/ZnS Quantum Dots: Refined Digestive Ripening," *J. Nanomaterials*, vol. 2012, pp. 1-12, 2012.
- [162] E. Krieg, H. Weissman, E. Shirman, E. Shimoni e B. Rybtchinski, "A recyclable supramolecular membrane for size-selective separation of nanoparticles," *Nature Nanotechnology*, vol. 6, pp. 141-146, 2011.
- [163] S. Liu, H. Zhang e J. Braggin, "A review of retention efficiency measurement techniques for sub-30nm liquid filtration," *Solid State Technology*, vol. 55, n.º 9, 2012.
- [164] J.-f. Liu, R. Liu, Y.-g. Yin e G.-b. Jiang, "Triton X-114 based cloud point extraction: a thermoreversible approach for separation/concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase," *Chem. Commun.*, n.º 12, p. 1514-1516, 2009.
- [165] M. F. Nazara, S. S. Shahb, J. Eastoec, A. M. Khand e A. Shaha, "Separation and recycling of nanoparticles using cloud point extraction with non-ionic surfactant mixtures," *J.I of Colloid and Interface Science*, vol. 363, pp. 490-496, 2011.
- [166] B. Kowalczyk, I. Lagzi e B. A. Grzybowski, "Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 16, pp. 135-148, 2011.
- [167] A. Smith e S. Nie, "Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots," *Analyst*, vol. 129, pp. 672-677, 2004.
- [168] A. Smith, S. Dave, S. Nie, L. True e X. Gao, "Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer," *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 6, pp. 231-244, 2006.
- [169] T. Fountaine, S. Wincovitch, D. Geho, S. Garfield e S. Pittaluga, "Multispectral imaging of clinically relevant cellular targets in tonsil and lymphoid tissue using semiconductor quantum dots," *Mod. Pathol.*, vol. 19, pp. 1181-1191, 2006.
- [170] M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau e A. Triller, "Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking," *Science*, vol. 302, pp. 442-445, 2003.
- [171] L. Zhang e N. Monteiro-Riviere, "Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake.," *Toxicol Sci.*, vol. 110(1), pp. 138-155, 2009.
- [172] J. F. Callan, R. C. Mulrooney, S. Kamila e B. McCaughan, "Anion Sensing with Luminescent Quantum Dots – A Modular Approach Based on the Photoinduced Electron Transfer (PET) Mechanism," *J. Fluoresc.*, vol. 18, p. 527-532, 2008.
- [173] S. Pathak, M. Davidson e G. Silva, "Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots," *Nano Lett.*, vol. 7, pp. 1839-1845, 2007.
- [174] I. Medintz, A. Clapp, H. Mattoussi, E. Goldman, B. Fisher e J. Mauro, "Selfassembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors," *Nat. Mater.*, vol. 2, pp. 630-668, 2003.
- [175] M. So, C. Xu, A. Loening, S. Gambhir e J. Rao, "Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, pp. 339-343, 2006.
- [176] K. Sapsford, T. Pons, I. Medintz e H. Mattoussi, "Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots," *Sensors*, vol. 6, p. 925-953, 2006.
- [177] A. Sukhanova, M. Devy, L. Venteo, H. Kaplan, M. Artemyev, V. Oleinikov, D. Klinov, M. Pluot, J.

- Cohen e I. Nabiev, "Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells," *Anal. Biochem.*, vol. 324, p. 60–67, 2004.
- [178] R. Freeman, R. Gill, I. Shweky, M. Kotler, U. Banin e I. Willner, "Biosensing and Probing of Intracellular Metabolic Pathways by NADH-Sensitive Quantum Dots," *Angew. Chem.*, vol. 121, p. 315–319, 2009.
- [179] R. Freeman e I. Willner, "NAD⁺/NADH-Sensitive Quantum Dots: Applications To Probe NAD⁺-Dependent Enzymes and To Sense the RDX Explosive," *Nano Lett.*, vol. 9, pp. 322-326, 2009.
- [180] M. Y. Kim, Y. S. Kim, J. Kim, S. S. Hah, T. J. Kim e Y. D. Kim, "Functionalized quantum dots to quantify NADPH and their use for NADP⁺-dependent biocatalyzed transformations," *Biotechnology Letters*, vol. 33, pp. 623-628, 2011.
- [181] P. T. Snee, R. C. Somers, G. Nair, J. P. Zimmer, M. G. Bawendi e .. G. Nocera, "A Ratiometric CdSe/ZnS Nanocrystal pH Sensor," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, pp. 13320-13321, 2006.
- [182] M. Tomasulo, I. Yildiz e F. Raymo, "pH-Sensitive Quantum Dots," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, pp. 3853-3855, 2006.
- [183] W. Becker, "The bh TCSPC Handbook," *Boston Electronics*, vol. 800, pp. 347-5445, 2006.
- [184] S. R. Taboga, "Microscopia," em *A célula*, 2001, pp. 6-14.
- [185] B. Huang, H. Babcock e X. Zhuang, "Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells," *Cell.*, vol. 143(7), pp. 1047-58, 2010.
- [186] T. V. Vinogradova, V. F. Markov e L. N. Maskaeva, "Temperature Dependence of Constants of Thiourea Hydrolytic Decomposition and Cyanamide. Stepwise Ionization," *Russian Journal of General Chemistry*, vol. 80, pp. 2341-2346, 2010.
- [187] U. Hotje, C. Rose e M. Binnewies, "Lattice constants and molar volume in the system ZnS, ZnSe, CdS, CdSe," *Solid State Sciences*, vol. 5, p. 1259–1262, 2003.
- [188] T. T., K.-N. S., P. C.G., T. H., Y. J., N. T., K. M. e T. H., "Single-particle tracking of quantum dot-conjugated prion proteins inside yeast cells," *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 405, pp. 638-643, 2011.
- [189] K. Lambert, B. D. Geyter, I. Moreels e Z. Hens, "PbTe|CdTe Core|Shell Particles by Cation Exchange, a HR-TEM study," *Chem. Mater.*, vol. 21, pp. 778-780, 2009.