



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III – Paul Sabatier

Cotutelle Internationale avec :

Universidade Estadual Paulista Julho de Mesquita Filho (UNESP)

Présentée et soutenue par Adriana Pereira Duarte

Le 05 Mars 2012

Titre :

Hybrides luminescents à base de silice
et de complexes d'euprium silylés :
de nouveaux outils d'analyse de milieux biologiques

JURY

Pr. L. A. F. M. D. CARLOS (*rapporteur*) - *Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal*

Dr. J.-O. DURAND (*rapporteur*) *Institut C. Gerhardt, Université de Montpellier, Montpellier, France*

Pr. L.M.L. MALTA (*examineur*) *Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brésil*

Pr. E. BENOIT (*examineur*) - *Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France*

Pr. S. J. L. RIBEIRO (*directeur de thèse*) - *Universidade Estadual Paulista, IQ Araraquara, Brésil*

Pr. M.-J. MENU (*directeur de thèse*) - *Université Toulouse 3 Paul Sabatier, France*

Dr. J. DEXPERT-GHYS (*invité*) - *CEMES, Toulouse, France*

Pr. J. M. A. CAIUT (*invité*) - *UPS, Ribeirão Preto, Brésil*

Dr. M. GRESSIER (*invité*) - *Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France*

Ecole doctorale : Sciences de la Matière

Unité de recherche : Institut Carnot CIRIMAT/Instituto de Química de Araraquara

Directeur(s) de thèse : **Pr. M.-J. MENU** - *Université Toulouse 3 Paul Sabatier, France*

Pr. S. J. L. RIBEIRO - *Universidade Estadual Paulista, IQ Araraquara, Brésil*

Dedico este trabalho aos meus pais, Nelson e Marinez,
que com toda simplicidade me proporcionaram duas coisas muito
importantes na vida: O amor e a educação!

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratorio de Materiais Fotônicos de l'Universidade Estadual Paulista (UNESP) à Araraquara et au Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux de l'Université Paul Sabatier à Toulouse. Je remercie monsieur Philippe Tailhades, Directeur de recherche CNRS, pour m'avoir permis de mener à bien ce travail.

Je remercie Monsieur Luiz A. F. M. D. Carlos, Professeur de l'Universidade de Aveiro du Portugal et Monsieur Jean-Olivier Durand, Chargé de Recherche de l'Université de Montpellier pour avoir accepté de juger ce mémoire en qualité de rapporteur et pour s'être déplacés afin de participer à ce jury. Je tiens également à remercier monsieur Eric Benoit, Professeur de l'Université Paul Sabatier, Monsieur Oscar Malta de l'Universidade Federal de Pernambuco, Brésil, pour avoir accepté de siéger à ce jury.

Je remercie mes directeurs de thèse **Prof. Dr. Sidney J. L. Ribeiro** et **Prof Dra. Marie-Joëlle Menu**. Je leur témoigne toute ma reconnaissance pour la disponibilité, les conseils et l'aide dont ils ont su me faire part et pour la confiance qu'ils ont su m'accorder.

Je tiens à remercier Monsieur **José Mauricio A. Caiut**, Madame **Jeannette Dexpert-Ghys** e Madame **Marie Gressier** pour une participation effective dans cette thèse, la discussion des résultats, corrections des rapports, enfin, pour leur énorme disponibilité et attention.

Je tiens à remercier les enseignants, étudiants et employés du Département de Chimie Générale et Inorganique de l'Institut de Chimie à Araraquara qui ont de quelque façon contribué à ma formation et à l'exécution de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement tous les membres du CIRIMAT pour l'accueil qu'ils m'ont réservé lors de mon arrivée au laboratoire.

Je tiens à remercier Leila Mauline pour les travaux réalisés en collaboration en microscopie confocale et préparation des biofilms bactériens. Serge Mazeret pour les analyses de Microscopie Confocale sous excitation Multiphoton; et aussi à Denis Hudrisier pour les analyses de Cytométrie en Flux;

Je tiens à remercier la FAPESP pour la bourse de doctorat et le soutien au cours de ce travail. Le programme de coopération entre le Brésil et la France - CAPES-COFECUB, par l'échange de formation et de soutien en France.

Je tiens à remercier mes parentes pour l'amour, le soutien inconditionnel. Vous êtes mon exemple de vie. Et toute ma famille qui sera toujours mon refuge.

Je remercie mes amies de colocation Karine, Elodie, Elisa, Andreza, Meri Emili, Josiane, pour les moments de détente, de soutien, et les nombreux souvenirs qui seront toujours gardés dans ma mémoire;

Enfin je tiens à remercier tous mes amis: Silvana, Néia, Vanessa, Cris, Fernando, Doug, Hernane, Elaine, Kíria, Tâmara, Denise, Michele, Rafael (Piá), Sibeles, Silvia, obrigada pela amizade tão especial, pelos maravilhosos momentos que passamos juntos.

*De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Fazemos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!
(Fernando Sabino)*

*Cada pessoa que passa em nossa vida,
passa sozinha, é porque cada pessoa é
única e nenhuma substitui a outra! Cada
pessoa que passa em nossa vida passa
sozinha e não nos deixa só porque deixa um
pouco de si e leva um pouquinho de nós.
Essa é a mais bela responsabilidade da vida
e a prova de que as pessoas não se
encontram por acaso.
(Charles
Chaplin)*

RESUMO

Este trabalho apresenta a síntese, caracterização e estudo das propriedades de fotoluminescência de híbridos à base de sílica e complexos európio (III). Estes híbridos, também, foram funcionalizados e testados como sondas ou biomarcadores.

A associação do íon európio à matrizes inorgânicas (alumina, sílica) e orgânicas (PMMA), tem sido amplamente estudada. Entretanto, o estudo de diferentes metodologias de síntese são ainda necessárias para otimizar propriedades físico-químicas, incluindo as propriedades luminescentes destes materiais. Neste sentido, a presente tese propõe a síntese de dois novos luminóforos à base de sílica, via ligação covalente de complexos de Eu^{3+} à matriz, impedindo, desta forma, processos indesejados de lixiviação. Estes novos complexos de európio (III) devem apresentar ligantes com função alcooxisilanos, e uma estrutura eletrônica que possibilite a eficiente transferência de energia não radiativa (“efeito de antena”) Ligante $\rightarrow \text{Eu}^{3+}$, otimizando propriedades luminescentes. Além do ligante bipyridina (Bpy-Si) já conhecido na literatura, desenvolvido no CIRIMAT-Toulouse, o novo ligante alcoóxisilanos modificado β -dicetona (TTA-Si) foi sintetizado nessa tese, gerando neste trabalho uma família composta de três complexos de európio (III): $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{Bpy-Si})]$, $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy-Si})]$ e $[\text{Eu}(\text{TTA-Si})_3]$, que serão citados no texto sob as siglas [Eu1], [Eu2] e [Eu3], respectivamente.

A ancoragem dos complexos superficialmente à sílica foi realizada sobre duas matrizes diferentes: primeiro nanopartículas de sílica densas, 24 ± 2 nm (Ludox AS-40), e segundo, matrizes de sílica mesoporosas. A sílica mesoporosa foi sintetizada pela metodologia de pirólise de aerossol, um método (*one step*) capaz de produzir partículas mesoporosas em poucos minutos, sem resíduos de surfactante e elevada área superficial específica ($\text{BET} = 860 \text{ m}^2/\text{g}$), quando comparada às partículas densas tipo Ludox ($\text{BET} = 138 \text{ m}^2/\text{g}$). Utilizando os três complexos anteriormente citados, seis novos híbridos luminescentes foram preparados, com diferentes dimensões (0,025 a 2,5 microns) e diferentes taxas de ancoragem (0,1 a 0,6 mmol de complexo por grama da matriz).

Por outro lado, a incorporação de complexos foi alcançada pela preparação da matriz de sílica via microemulsão inversa, na presença destes. Um grande número de parâmetros (temperatura, agentes tensioativos, co-solvente, taxa de hidrólise, pH, etc.), foram ajustados para obtenção de três materiais híbridos. Estes apresentaram uma distribuição homogênea de diâmetros (esferas de 45 ± 5 nm), confirmado por

microscopias eletrônicas (SEM, TEM) e taxas de incorporação acima dos valores descritos na literatura.

As propriedades de luminescência de complexos livres e dos nove híbridos foram detalhadamente estudadas. Transições eletrônicas características do íon európio (III) foram observados em todos os espectros de emissão. Um alargamento não homogêneo das bandas foi observado nos sistemas híbridos, consequência de uma distribuição heterogênea de sítios de simetria ocupados pelo íon európio. Entretanto, os espectros de emissão correspondentes às nanopartículas com complexos ancorados (poros ou superfície) permanecem semelhantes ao complexo livre, o que está de acordo com o complexo sililado sobre a superfície das nanopartículas. Quando incorporados, maiores mudanças na simetria do íon central resultam no maior alargamento das transições observadas nos espectros de emissão. A transferência de energia ligante $\rightarrow \text{Eu}^{3+}$ foi confirmada pelos estudos espectroscópicos. As excelentes propriedades de luminescência, alcançadas, associada a morfologia e estabilidade destes híbridos, os tornaram candidatos a testes como sondas ou marcadores biológicos.

Inicialmente, as partículas híbridas foram testadas como sonda luminescente em biofilmes por meio de microscopia confocal, os resultados foram promissores, indicando que estes híbridos podem ser realmente utilizados como uma nova ferramenta na exploração de biofilmes ou também como uma sonda na espectroscopia bifoton.

Finalmente, os nove híbridos foram bio-funcionalizado (via anticorpo monoclonal ou N-hidroxissuccinimida), permitindo a utilização destes sistemas em marcação celular, através da detecção por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, técnicas amplamente utilizadas em laboratórios clínicos e análises biológicas. Os resultados mostram que estes híbridos, especialmente aqueles obtidos por ancoragem do complexo $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{bpy-Si})]$, são bons candidatos à biomarcadores.

RESUMÉ

Ce travail décrit la synthèse, la caractérisation et l'étude des propriétés de photoluminescence d'hybrides à base de silice et de complexes d'euporium(III). Ces hybrides sont ensuite organiquement modifiés pour illustrer leur application potentielle en tant que sondes ou biomarqueurs.

Associer les très bonnes propriétés de luminescence des complexes de lanthanides avec les propriétés physico-chimiques d'une matrice inorganique telle que la silice est une voie prometteuse pour l'obtention de nouveaux outils d'analyse pour la biologie. La silice, SiO_2 , est une excellente matrice inorganique qui, sous forme de particules submicroniques voire même nanométriques, puisqu'elle permet à la fois de concentrer le luminophore tout en le protégeant des perturbations externes susceptibles d'inhiber le processus de luminescence. De plus la modification de la surface des particules de silice via une fonctionnalisation par voie chimique rend ces nouveaux hybrides biocompatibles, adaptés à leur mise en suspension en milieu aqueux et donc intéressants pour l'analyse des milieux biologiques. Dans cette optique l'obtention de particules dont la taille reste inférieure à 100 nm est une condition qui s'impose et qui nécessite de développer de nouveaux hybrides organique-inorganiques. C'est dans ce cadre que se situe ce travail de thèse.

Les lanthanides voient leurs propriétés de luminescence exaltées par la présence dans leur sphère de coordination de chromophores organiques. Depuis une dizaine d'années l'association de chélates d'euporium(III) dans des matrices inorganiques (silice, alumine) et organiques (PMMA) a fait l'objet d'un très grand nombre d'études pour lesquelles les conditions de synthèse ne sont pas bien contrôlées conduisant à des hybrides dont les propriétés physico-chimiques et notamment de luminescence restent à améliorer. Pour pallier à ce manque nous avons entrepris la synthèse de deux types d'hybrides à base de silice dans lesquels les luminophores sont liés de façon covalente à la matrice pour éviter tout relargage du luminophore lors des applications ultérieures envisagées. Pour cela de nouveaux complexes d'euporium(III) possédant des ligands à fonction trialkoxysilane ont été synthétisés et entièrement caractérisés. Les ligands doivent donc posséder, en plus des sites de coordination pour complexer l'euporium, une structure électronique telle que l'effet d'antenne soit possible mais également un groupement podant pour l'ancrage du complexe au support inorganique. En plus du

ligand dérivé de la bipyridine développé récemment au CIRIMAT, un nouveau ligand dicétone a été synthétisé donnant accès à une famille de trois complexes d'euporium(III): [Eu(TMHD)₃(bpy-Si)] , [Eu1]; [Eu(TTA)₃(bpy-Si)] , [Eu2] et [Eu(TTA-Si)₃], [Eu3].

La versatilité de la silice vient du fait qu'il est possible d'en modifier le cœur mais aussi la surface ainsi deux types d'hybrides ont été envisagés. Ils sont obtenus soit par greffage des complexes silylés d'euporium à la surface des particules de silices, soit par incorporation des complexes pendant la synthèse de la nanoparticule en utilisant notamment la méthode de Stoeber en milieu microémulsion inverse. Ces deux voies ont été explorées dans ce travail. Si la première voie n'a donnée aucune difficulté, l'incorporation des complexes d'euporium(III) n'était pas connu à l'origine de ce travail. Des nanoparticules incorporant les trois complexes ont pu être isolées après évaluation d'un grand nombre de paramètres (température, surfactants, cosolvant, taux d'hydrolyse, quantité d'ammoniaque...), facteurs qui s'avèrent importants notamment pour le contrôle de la taille. Finalement les trois hybrides obtenus ont été caractérisés et leur morphologie (45 ± 5 nm) a été confirmée par microscopies électroniques (MEB, TEM). Les taux d'incorporation, exprimés en mmol de complexe par gramme de support ou nombre de complexe par unité de surface, sont tout à fait satisfaisants et largement supérieurs aux valeurs décrites à ce jour dans la littérature.

Le greffage des complexes en surface de particules de silice a été réalisé en utilisant des nanoparticules de silice dense, 24 ± 2 nm, très monodisperses mais également sur des matrices synthétisés au laboratoire à l'UNESP par pyrolyse d'aérosol. La particularité de cette méthode est de produire des particules de silice mésoporeuses en une étape donc beaucoup plus rapidement que par la voie humide conventionnelle. La taille des particules n'est cependant pas uniforme et comprise entre 0,05 et 2,5 μm . L'intérêt de ces particules réside dans le fait que la mesoporosité implique que l'essentiel de la particule est constituée par la surface ($S_{\text{BET}} = 860 \text{ m}^2/\text{g}$) par rapport aux particules denses de type Ludox ($S_{\text{BET}} = 138 \text{ m}^2/\text{g}$). Ainsi les trois complexes d'euporium ont été greffés sur les matrices de silice organisée ou non pour donner six nouveaux hybrides de tailles variés (0,025 à 2,5 μm) caractérisés par des taux de greffage compris entre 0,1 et 0,6 mmol de complexe par gramme de support.

Les propriétés de luminescence des complexes libres et des neuf hybrides ont été soigneusement étudiées. Les transitions caractéristiques de l'euporium sont observées dans tous les spectres d'émission. Un élargissement inhomogène de toutes les raies est observé

pour les hybrides comme conséquence d'une répartition différente des sites de symétrie occupés par l'ion europium. Les spectres correspondants aux nanoparticules fonctionnalisées par greffage restent très proches de ceux des complexes libres en accord avec le fait que le complexe silylé reste en surface de la nanoparticule. Lorsque ces derniers sont incorporés dans la matrice, des contraintes plus importantes viennent modifier l'environnement du centre métallique d'où un élargissement plus important de cette transition dans le spectre d'émission. Ces résultats sont très intéressants parce qu'ils mettent en évidence que les complexes restent stables après le processus d'immobilisation. Les mesures de luminescence montrent une forte émission excitée par le ligand (effet d'antenne). Ces propriétés de luminescence associées à la morphologie de ces hybrides et à leur stabilité suggèrent que ces nanohybrides sont de bons candidats comme outils d'analyse de milieux biologiques.

Tous les hybrides luminescents ont été testés sans fonctionnalisation ultérieure, en microscopie confocale et les résultats indiquent que ces hybrides pourraient être utilisés en tant qu'outil d'exploration de biofilms ou bien également en tant que sonde en spectroscopie biphoton.

Enfin les neuf hybrides ont été bio fonctionnalisés (par un anticorps d'une part ou par un groupement N-hydroxysuccinimide d'autre part) pour réaliser un marquage cellulaire et être détectés en cytométrie de flux, technique largement utilisée dans les laboratoires cliniques et de recherche en biologie. Les premiers résultats obtenus montrent que ces nanohybrides et notamment ceux obtenus par greffage du complexe $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy-Si})]$, sont de bons candidats adaptés aux conditions d'analyses des tests en milieu biologique et donc intéressants pour l'applications en tant que biomarqueurs.

ABSTRACT

This thesis focuses on the preparation of new hybrid materials based on the covalent grafting of new europium (III) complexes on silica nanoparticles.

The new complexes of europium (III) show ligands with alkoxy silane function, and an electronic structure that enables efficient energy transfer ("antenna effect") Ligand \rightarrow Eu^{3+} , optimizing luminescent properties. Alkoxy silane modified bipyridine and thenoyltrifluoroacetate ligands (Bpy-Si and TTA-Si) were used for the preparation of three complexes of europium (III) $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{Bpy-Si})]$, $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy-Si})]$ and $[\text{Eu}(\text{TTA-Si})_3]$.

Grafting of the complexes to silica surfaces was performed on two different matrices: commercial (Ludox AS-40) dense silica nanoparticles (particles diameter 24 ± 2 nm, BET surface specific area = $138 \text{ m}^2 / \text{g}$) and mesoporous silica (BET surface specific area = $860 \text{ m}^2 / \text{g}$) synthesized by spray pyrolysis. Six luminescent hybrids were prepared with varying grafting rates (0.1 to 0.6 mmol per gram of the complex matrix).

Eu complexes -silica hybrids were also prepared in reverse microemulsions. Temperature, surfactants, co-solvent, hydrolysis rate and pH were the parameters studied in the experimental route. Monodisperse spheres (45 ± 5 nm) were obtained confirmed by electronic microscopies (SEM, TEM). Incorporation ratios were similar to literature values.

Luminescence properties were studied in detail. Electronic transitions characteristics of the ion europium (III) were observed in all emission spectra. Nanoparticles with grafted complexes display spectroscopic properties similar to those observed for the free complexes. On the other side nanoparticles incorporating complexes exhibit distinct spectroscopic properties with inhomogeneously broadened bands. Energy transfer ligand \rightarrow Eu^{3+} were confirmed by spectroscopic studies in all systems.

Hybrid particles were tested as luminescent labels for biofilms in confocal microscopy. In a second test the hybrids were functionalized with monoclonal antibodies or N-hydroxysuccinimide, allowing us to use these systems in cell labeling, detection by flow cytometry or fluorescence microscopy techniques widely used in clinical and biological tests. The results show that these new hybrids, particularly those obtained by anchoring of the $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy-Si})]$ complex, are good candidates for biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática e ordem de magnitude dos efeitos de interações intra-atômicas e de campo cristalino agindo sobre uma configuração $4f^n$ 35
- Figura 2:** Primeiros níveis energéticos da configuração $4f^6$ do íon Eu^{3+} 40
- Figura 3:** Representação esquemática do efeito antena de um ligante orgânico e um íon metálico TR emissor. CI: conversão interna, CIS: cruzamento inter sistema, TE: Transferência de energia. Abs: Absorção. FL: Fluorescência. Fosf: Fosforescência. 43
- Figura 4:** Um esquema representativo de uma ligação específica do QDs com a proteína da membrana celular em uma ligação antígeno-anticorpo. 46
- Figura 5:** Células Glioblastomas marcadas com $\text{CdS-Cd(OH)}_2\text{-Glut}$. (esquerda) imagem confocal, (direita) intensidade de fluorescência. 47
- Figura 6:** Representação esquemática de uma nanopartícula “C dots” onde o corante (tetrametilrodamina) está incorporado..... 48
- Figura 7:** Esquema ilustrando a preparação e biofuncionalização das nanopartículas $\text{LaF}_3\text{:Ln}^{3+}$ 49
- Figura 8:** (Esquerda) princípio do microimunoensaio usando $\text{Eu:Gd}_2\text{O}_3$ como biomarcador (a) IgG de coelho mobilizadas sobre uma placa de vidro (b) adição de anticorpos bloqueados com a proteína, IgG:BSA (c) imunoreação entre os IgG de coelho e as nanopartículas com anticorpo IgG- $\text{Eu:Gd}_2\text{O}_3$. (Direita) Imagem de microscopia de fluorescência do material suportado. 50
- Figura 9:** Esquema que mostra a partícula luminescente 52
- Figura 10:** Representação de diferentes metodologias utilizadas para obter sílica luminescente com base em materiais que contenha complexos de európio (III) covalentemente ligados. a) introdução de sal ou quelato de Eu^{3+} em uma síntese de placas ou filmes finos de sílica; b) complexação de Eu^{3+} em matriz de sílica modificada organicamente..... 54
- Figura 11:** Ligantes bidentados com funções alcóxissilanos (pypy-Si^{92} , Phen-Si^{94} , Phen-Si_2^{95} e TTA-Si_2^{96}). 55
- Figura 12:** (a) a incorporação de complexo de Eu^{3+} sililado em uma reação tipo Stober usando o sistema microemulsão inversa (W/O); b) ancoragem de complexos de Eu^{3+} sililado na superfície de nanopartículas sílica mesoporosas ou densa. 56
- Figura 13:** Complexos de európio(III) sililados descritos 57
- Figura 14:** (Esquerda) Esquema do sistema de pirólise de aerossol; (direita) Foto do sistema de pirólise de aerossol do Instituto de Química-Unesp 68
- Figura 15:** Esquema do sistema para preparação das esferas de PMMA..... 70

Figura 16: Processo de síntese do ligante TTA-Si.....	72
Figura 17: Síntese do complexo [Eu3] e proposição da estrutura.	75
Figura 18: Síntese de ancoragem do aminoácido bloqueado na superfície da sílica luminescente.....	78
Figura 19: Esquema da proposta de reação do anidrido glutárico frente ao aminoácido sobre a superfície da partícula.	80
Figura 20: Esquema da síntese de funcionalização não específica das nanopartículas luminescentes.	81
Figura 21: Difratoograma de raio-X de pó para a alumina, $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$	90
Figura 22: Espectro na região do infravermelho para as partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ dispersas em KBr.....	90
Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura (a) e transmissão (b) das partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ obtidas por pirólise de aerossol. (c) Curva de distribuição de tamanho de partículas obtida a partir da imagem de MEV. A linha tracejada mostra um ajuste tentativo obtido com uma função de distribuição do tipo log-normal usualmente observada e distribuições de tamanhos de partículas.....	91
Figura 24: Espectro na região do infravermelho as partículas de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ preparadas por pirólise de aerossol.....	92
Figura 25: Fotos de Microscopia eletrônica (a) MEV (b) MET de partículas de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ preparada por pirólise de aerossol. (c) Curva de distribuição de tamanho de partículas de sílica obtida a partir da imagem de MEV.	93
Figura 26: Curva termogravimétrica de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ (vermelha) e $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (preta) obtida pela metodologia de pirólise de aerossóis.....	94
Figura 27: Espectro de excitação para as partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{em}}= 612 \text{ nm}$) e $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{em}}= 612 \text{ nm}$) obtida por pirólise de aerossol, medidas realizadas em amostras sólidas.....	95
Figura 28: Espectro de emissão para as partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{ex}}=394\text{nm}$) e $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{ex}}=392\text{nm}$) obtida por pirólise de aerossol, medidas realizadas em amostras sólidas.....	96
Figura 29: Curva de decaimento para a luminescência do íon Eu^{3+} na matriz alumina (vermelho) e sílica (preto) dopada com 5%.	97
Figura 30: Espectro na região do infravermelho das partículas de $\text{PMMA}:[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$	98
Figura 31: Microscopia eletrônica de varredura das partículas PMMA dopadas com o complexo $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$	99

Figura 32: Curva de distribuição de tamanho de partículas de PMMA obtida a partir da imagem de MEV.....	99
Figura 33: Curva termogravimétrica do polímero PMMA:[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂] (preto) e do polímero PMMA (vermelho).....	100
Figura 34: Espectro de excitação das partículas PMMA:[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂]. A emissão foi fixada em 612nm, na emissão do ⁵ D ₀ → ⁷ F ₂ do íon Eu ³⁺	101
Figura 35: Espectros de emissão do compósito PMMA:[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂] e do complexo com excitação fixada em 394 nm (Eu ³⁺).	102
Figura 36: Curvas de decaimento para a luminescência do complexo [Eu(TTA) ₂ (H ₂ O) ₂] (preta) e do compósito PMMA: [Eu(TTA) ₂ (H ₂ O) ₂] (vermelha). Os insets mostram o decaimento na função ln (I) vs tempo (ms) para os mesmos.....	102
Figura 37: Espectro de emissão do compósito PMMA-[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂] e as regiões espectrais utilizadas para os cálculos de área de cada transição.....	103
Figura 38: Estrutura dos ligantes Bpy-Si e TTA-Si.	109
Figura 39: Estrutura proposta para o complexo [Eu(TMHD) ₃ (Bpy-Si)], [Eu1]	111
Figura 40: Estrutura proposta para o complexo [Eu(TTA) ₃ (Bpy-Si)], [Eu2].....	112
Figura 41: Os espectros de absorção na região do Uv-visível dos complexos (azul) [Eu2], (vermelho) [Eu(TTA) ₃ .2H ₂ O] e (preto) o ligante Bpy-Si.....	113
Figura 42: O ligante organossilil-β-dicetona (TTA-Si).	114
Figura 43: Espectro de ¹ H RMN. (CDCl ₃ , 300 MHz) do ligante TTA-Si.....	115
Figura 44: Espectro de ¹³ C{ ¹ H}RMN (CDCl ₃ , 75,46MHz) do ligante TTA-Si.....	116
Figura 45: Comparação entre os espectros na região do infravermelho para o complexo [Eu3] (linha preta) e ligante TTA-Si (linha vermelha).	118
Figura 46: estrutura proposta para o complexo [Eu3].....	118
Figura 47: Espectros de absorção de soluções (preto) TTA-Si; (vermelho) [Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂]; (azul) [Eu3] em acetonitrila (2,5x10 ⁻⁵ mol/L)	119
Figura 48: Fotos de Microscopia de varredura (a) e transmissão (b) de sílica mesoporosa obtida pela metodologia de pirólise de aerossol. (c) curva de distribuição de tamanho de partículas obtida a partir da imagem de MEV.	121
Figura 49: Difratoograma de raios-X das amostras de sílica mesoporosas obtidas por pirólise de aerossol. Índice (hkl).....	122
Figura 50: Espectro vibracional no infravermelho para amostras de SiO ₂ mesoporosa.	122
Figura 51: Análise termogravimétrica de sílica mesoporosa.	123

Figura 52: Microscopia eletrônica de varredura das partículas de sílica Ludox AS-40.....	123
Figura 53: Esquema de síntese dos complexos de európio sililados na superfície de sílica.	125
Figura 54: Fotos de MET das partículas de sílica com os complexos ancorados sendo: (a) SiO ₂ -[Eu1], (b) SiO _{2mes} -[Eu1] (c) SiO ₂ -[Eu3] (d) SiO _{2mes} -[Eu3] (e) SiO ₂ -[Eu2] e (f) SiO _{2mes} -[Eu2]	126
Figura 55: Microscopia de transmissão as partículas de sílica preparadas pela metodologia de Tan et al ^{53; 76}	129
Figura 56: Esquema da reação de incorporação dos complexos sililados em nanopartículas de sílica por microemulsão inversa (W/O)	130
Figura 57: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos seguintes híbridos: (a) SiO ₂ @[Eu1], (b) SiO ₂ @[Eu2]e (c) SiO ₂ @[Eu3].....	130
Figura 58: Espectro na região do infravermelho para o complexo [Eu3] e DRIFT para os híbridos.....	132
Figura 59: Esquema dos complexos e híbridos obtidos neste trabalho.	133
Figura 60: Espectros de emissão obtidos a 77K para os complexos (a) [Gd(TTA) ₃ (Bipy-Si)] ($\lambda_{em} = 530\text{nm}$; $\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$, l) (b) [Gd(TTA-Si) ₃] ($\lambda_{em} = 462\text{nm}$; $\lambda_{ex} = 336 \text{ nm}$). (c) Níveis de energia dos íons Eu ³⁺ e Gd ³⁺ . (Hasegawa et al ¹³⁶)	134
Figura 61: Representação dos níveis de energia dos ligantes baseado nos complexos de gadolínio, e os níveis de energia do íon európio.....	135
Figura 62: Espectros de emissão ($\lambda_{EXC} = 365\text{nm}$) dos complexos no estado sólido e em solução (2,5mol/L em acetonitrila)	137
Figura 63: Curva de Decaimento da luminescência do nível emissor do nível ⁵ D ₀ do complexo (a) [Eu1] medido a emissão a 609nm e excitação a 365nm; (b) [Eu2] medido a emissão de 613 nm e excitação a 365 nm; (c) [Eu3] medido a emissão de 611 nm e excitação a 365 nm. Os insets mostram o decaimento na função ln (I) vs tempo (ms) para os mesmos.	138
Figura 64: Estruturas propostas para os complexos [Eu2] e [Eu3]	140
Figura 65: (a) Espectros de excitação(monitoradas na transição ⁵ D ₀ → ⁷ F ₂) e (b) absorção dos complexo sem solução 2,5mol/L em acetonitrila.....	142
Figura 66: Resultados de luminescência para as partículas de sílica modificadas. (I) espectros de excitação ($\lambda_{em} = 611 \text{ nm}$) e (II) espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) para as diferentes amostras do sólido, (a) [Eu1] (b) SiO ₂ -[Eu1], (c) SiO _{2meso} -[Eu1], e (d) SiO ₂ @[Eu1].	145
Figura 67: Resultados de luminescência para as partículas de sílica modificadas. (I) espectros de excitação ($\lambda_{em} = 611 \text{ nm}$) e (II) espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) para as diferentes amostras do sólido, (a) [Eu2] (b) SiO ₂ -[Eu2], (c) SiO _{2meso} -[Eu2], e (d) SiO ₂ @[Eu2].....	146

- Figura 68:** Resultados de luminescência para as partículas de sílica modificadas. (I) espectros de excitação ($\lambda_{em} = 612$ nm) e (II) espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 365$ nm) para as diferentes amostras do sólido, (a) $SiO_2-[Eu3]$, (b) $SiO_{2meso}-[Eu3]$, (c) $SiO_2@[Eu3]$, e (d) $[Eu3]$ 147
- Figura 69:** Imagens obtidas pelo software **ImageJ** de 450 microscopias (variação do plano xy) obtidas pelo Microscópio confocal do biofilme de *Pseudomonas Aeruginosa* marcadas com SYTO 9® (a) ($\lambda_{ex} = 488$ nm et $\lambda_{em} = 498-520$ nm) ou SYTO 45® (c e e) ($\lambda_{ex} = 452$ nm et $\lambda_{em} = 484$ nm) e dos híbridos luminescentes $SiO_2-[Eu2]$ (b) e $SiO_2-[Eu3]$ (d) incorporados no biofilme ($\lambda_{ex} = 405$ nm et $\lambda_{em} = 610$ nm). (e) imagem da sobreposição das imagens c e d. 156
- Figura 70:** Esquema de diagrama de energia das possíveis excitações dos ligantes orgânicos e transferência de energia para o íon lantanídeo. 158
- Figura 71:** Espectro de excitação bifóton (vermelho) e monofóton (preto, multiplicação da escala) dos híbridos $SiO_2-[Eu2]$ e $SiO_2-[Eu3]$ 159
- Figura 72:** Espectro de excitação bifóton do híbrido $SiO_2-[Eu2]$ obtido pelo software **ImageJ** sobre a microscopia. 159
- Figura 73:** Imagens dos híbridos (a) $SiO_2-[Eu2]$ e (b) $SiO_2-[Eu3]$ com excitação a 700 nm. Espectros de emissão obtidos da imagem pelo software **ImageJ** dos híbridos (c) $SiO_2-[Eu2]$ e (d) $SiO_2-[Eu3]$ 160
- Figura 74:** Esquema Óptico do citometro de fluxo do IPBS de Toulouse-FR. 162
- Figura 75:** Diagrama de intensidade de luminescência obtido por Citometria de fluxo para (a); o branco SiO_2 (Zero de emissão) e os híbridos $SiO_2-[Eu2]$ (b) e $SiO_2-[Eu2]-Cel$ com uma resolução temporal. 163
- Figura 76:** Diagrama de intensidade de luminescência obtido por Citometria de fluxo para (a); o branco SiO_2 (Zero de emissão) e os híbridos SiO_2 (Zero de emissão, (a)); $SiO_{2mes}-[Eu2]$ (b) e $SiO_{2mes}-[Eu2]-Cel$ com resolução temporal... 164
- Figura 77:** Estrutura esquematizada de um anticorpo, localizando as posições F_{ab} e F_c 167
- Figura 78:** Fotos de microscopia de luminescência das bactérias *Escherichiacoli* marcada com os híbridos: 168

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4), probabilidade de emissão espontânea de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q) de partículas de sílica e alumina dopadas com európio	97
Tabela 2: Parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4), probabilidade de emissão espontânea de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q) e número de moléculas de água (N_{H_2O} equação 19).	104
Tabela 3: Característica da sílica mesoporosa e da sílica comercial Ludox AS-40.	124
Tabela 4: Tamanho, eficiência de ancoragem (em mmol do complexo por grama de sílica) e número de complexos por nm^2 dos híbridos à base de sílica.	127
Tabela 5: Dados DRIFT para cada um dos híbridos.	128
Tabela 6: Tamanho e eficiência de incorporação (em mmol do complexo por grama de sílica) dos híbridos à base de sílica.	131
Tabela 7: Dados DRIFT para cada um dos híbridos	131
Tabela 8: Transições características dos complexos sintetizados.	136
Tabela 9: Probabilidade de emissão espontânea de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q) osciladores OH(N_{OH} e N_{H_2O}) e rendimento quântico (ϕ) dos complexos.	139
Tabela 10: Probabilidade de emissão de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q) dos complexos e híbridos sintetizados e referências.	148
Tabela 11: Parâmetros de intensidade Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4) e números de N_{H_2O} (equação 19) e N_{OH} (equação 24).	148
Tabela 12: Comparação dos híbridos: ζ é a quantidade de complexo incorporada e ancorada na sílica; S_T área total do espectro de emissão e S_T/S é a razão de S_T do híbrido sobre o menor S_T de menor valor, que é do híbrido $SiO_{2mes}[Eu1]$	151
Tabela 13: Valor da quantidade de aminoácido por grama de partícula, determinada pela quantidade de fmoc liberada após desbloqueio.....	166

Abreviaturas

ϕ - rendimento quântico	rendement Quantique
q- eficiência quântica	efficacité quantique d'émission
Ω - parâmetros de Judd e Ofelt	Paramètres de Judd et Ofelt
τ - tempo de vida	durée de vie
TTA - Tenoiltrifluoroacetone	thénoltrifluoreacetonate
Bpy - 2,2'-bipiridina	2,2'-bipyridine
DTP - disuccinimidilteftalato	disuccinimidyltéftalate
[Eu1] - [Eu(TMHD) ₃ (Bpy-Si)]	
[Eu2] -[Eu(TTA) ₃ (Bpy-Si)]	
[Eu3] - [Eu(TTA-Si) ₃]	
SiO₂-[Eu1] - Híbrido de sílica obtido por ancoragem de [Eu(TMHD) ₃ (Bpy-Si)] em sílica Ludox As 40 <i>Hybride de silice obtenu par greffage de [Eu(TMHD)₃(Bpy-Si)] sur Ludox AS-40</i>	
SiO₂-[Eu2] - Híbrido de sílica obtido por ancoragem de [Eu(TTA) ₃ (Bpy-Si)] em sílica Ludox-As40 <i>Hybride de silice obtenu par greffage de [Eu(TTA)₃(Bpy-Si)] sur Ludox AS-40</i>	
SiO₂-[Eu3] - Híbrido de sílica obtido por ancoragem de [Eu(TTA-Si) ₃] em sílica Ludox-As40 <i>Hybride de silice obtenu par greffage de [Eu(TTA-Si)₃] sur Ludox AS-40</i>	
SiO_{2meso}-[Eu1] - Híbrido de sílica obtido por ancoragem de [Eu(TMHD) ₃ (Bpy-Si)] em sílica mesoporosa <i>Hybride de silice obtenu par greffage de [[Eu(TMHD)₃(Bpy-Si)] sur silice mésoporeuse</i>	
SiO_{2meso}-[Eu2] - Híbrido de sílica obtido por ancoragem de [Eu(TTA) ₃ (Bpy-Si)] em sílica mesoporos. <i>Hybride de silice obtenu par greffage de [Eu(TTA)₃(Bpy-Si)] sur silice mésoporeuse</i>	
SiO_{2meso}-[Eu3] - Híbrido de sílica obtido por ancoragem de [Eu(TTA-Si) ₃] em sílica mesoporosa <i>Hybride de silice obtenu par greffage de [Eu(TTA-Si)₃] sur silice mésoporeuse</i>	
SiO₂@[Eu1] Híbrido obtido pela incorporação de [Eu(TMHD) ₃ (Bpy-Si)] em nanopartículas de sílica <i>Hybride de silice incorporant [Eu(TMHD)₃(Bpy-Si)]</i>	
SiO₂@[Eu2] Híbrido obtido pela incorporação de [Eu(TTA) ₃ (Bpy-Si)] em nanopartículas de sílica <i>Hybride de silice incorporant [Eu(TTA)₃(Bpy-Si)]</i>	
SiO₂@[Eu3] Híbrido obtido pela incorporação de [Eu(TTA-Si) ₃] em nanopartículas de sílica <i>Hybride de silice incorporant [Eu(TTA-Si)₃]</i>	

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	29
1- INTRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
1. Lantanídeos.....	33
2. Marcadores e detecção química para uso como sondas luminescentes	43
3. Complexos de lantanídeos e imobilização em matriz de sílica	52
4. Noções básicas de imunologia: Anticorpos monoclonais e técnicas de quantificação.....	58
2- OBJETIVOS	61
1. Objetivos específicos	63
3- PARTE EXPERIMENTAL	93
1. Síntese.....	67
1.1. Preparação da solução precursora para obtenção das partículas de alumina	69
1.2. Preparação da solução precursora para obtenção das partículas de sílica	69
1.3. Preparação da solução precursora para a preparação de sílica mesoporosa.....	69
1.4. Síntese das esferas de polimetil-metacrilato (PMMA) dopadas com o complexo [Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂].....	70
1.5. Síntese do ligante 4-metil-4'-(n-trietoxisililpropil)amino- metil- 2,2'-bipiridina (Bipy-Si).....	71
1.6. Síntese do ligante 4,4,4-trifluoro-2-(3-(trimetoxi-silil)propil)-1-(2-tenoil)-1,3-butanodieno (TTA-Si).....	72
1.7. Síntese do composto [Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂].....	73
1.8. Síntese do composto [Eu(TMHD) ₃ (Bpy-Si)], [Eu1] e [Eu(TTA) ₃ (Bpy-Si)], [Eu2].....	73
1.9. Síntese do complexo [Eu(TTA-Si) ₃], [Eu3]	74
1.10. Síntese do complexo [Gd(TTA) ₃ (Bpy-Si)].....	75
1.11. Síntese do complexo [Gd(TTA-Si) ₃]	75
1.12. Ancoragem de complexos luminescentes em nanopartículas de sílica mesoporosa e LUDOX AS-40.....	76
1.13. Incorporação de complexos luminescentes em nanopartículas de sílica	77
1.14. Adição do aminoácido na superfície das nanopartículas SiO ₂ :[Eu]- Fmoc	78
1.15. Determinação do grau de incorporação de aminoácidos na superfície das nanopartículas.....	78
1.15.1. Análise qualitativa- Teste de anidrina (teste Kaiser)	78

1.15.2. Análise quantitativa- Dosagem de Fmoc por Ultravioleta-visível.....	79
1.16. Crescimento da estrutura do grupo espaçador via reação com anidrido glutárico <i>SiO₂:Eu-Ami-glu</i>	79
1.17. Funcionalização dos Híbridos via proteína A	80
1.18. Imobilização do Anticorpo IgG1 sobre as partículas luminescentes previamente funcionalizadas com proteína A.....	80
1.19. Adição de APTS na superfície do híbrido.....	81
1.19.1. Adição de DTP.....	81
2. Métodos de Caracterização	82
2.1. Análise Elementar	82
2.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho e espectroscopia eletrônica no Ultravioleta-visível	82
2.3. Ressonância Magnética Nuclear	82
2.4. Espectroscopia de massas.....	83
2.5. Microscopia eletrônica de varredura de transmissão	83
2.6. Luminescência.....	84
2.7. Difração de raio-X.....	84
2.8. Superfície específica.....	84
3. Técnicas de detecção dos híbridos	85
3.1. Microscópio de Varredura confocal: Nanopartículas em Biofilme bacteriano	85
3.2. Microscópio de Varredura confocal : Excitação multifoton.....	85
3.3. Microscópio de Fluorescência.....	85
3.4. Citometria de Fluxo	86
4- PROPRIEDADES DE LUMINESCÊNCIA DO EURÓPIO EM DIFERENTES MATRIZES POLIMERICAS INORGÂNICAS E ORGÂNICAS.....	93
1. Óxidos de alumínio e silício contendo európio (III) obtidos por Pirólise de Aerossóis, <i>Al₂O₃:Eu³⁺ e SiO₂:Eu³⁺</i>	89
1.1. Estudo espectroscópico do íon európio	94
2. Compósitos PMMA:[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂]	98
5- SÍNTESES DE HÍBRIDOS LUMINESCENTES À BASE DE SÍLICA E COMPLEXOS DE EURÓPIO SILILADOS.....	93
1. Complexos de európio com ligantes bipyridina com função alcóxidosilanos	110
1.1. Ligante 4-Metil-4'-(metilaminopropiltrióxidosilano)-2,2'-bipyridina, Bpy-Si.....	110
1.2. Complexo [Eu(TMHD) ₃ (Bpy-Si)], [Eu1]	110
1.3. Complexo [Eu(TTA) ₃ (Bpy-Si)], [Eu2].....	111

2. Complexo de európio com ligante dicetona com função alcoxisilano ligante TTA-Si.....	113
2.1. Síntese do ligante TTA-Si.....	113
2.2. Complexo [Eu(TTA-Si) ₃], [Eu3].....	117
3. Híbridos de sílica e complexos de európio	120
3.1. Descrição das matrizes de sílica	120
3.2. Ancoragem de complexos de európio em partículas de sílica mesoporosa e Ludox AS-40.....	124
3.3. Incorporação de complexos de európio em sílica pela metodologia de microemulsão inversa (W/O).....	129
4. Propriedades de luminescência.....	133
4.1. Luminescência dos Complexos [Eu1], [Eu2] e [Eu3]	133
4.2. Híbridos de sílica com complexos de európio.....	143
 6. HÍBRIDOS LUMINESCENTES-TESTES EXPLORATÓRIO DE APLICAÇÃO COMO SONDAS E BIOMARCADORES.....	
1. Microscopia Confocal	155
1.1 Exploração de Biofilme	155
1.2 Excitação Multifóton	157
2. Marcação celular	161
2.1. Detecção por citometria de fluxo	161
2.1.1. Funcionalização da superfície dos híbridos com moléculas de disuccinimidilteptalato (DTP).....	162
2.2. Detecção por Microscopia de fluorescência	165
2.2.1. Adição de aminoácido (Fmoc-ε Ahx-OH)	165
2.2.2. Acoplagem de Anticorpo monoclonal (IgG) sobre micro e nanopartículas obtidas no processo de síntese peptídica em fase sólida e estudos preliminares de marcação de bactérias.	166
 7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	
1. Conclusões	173
2. Perspectivas Futuras.....	175
 REFERÊNCIAS	177
RÉSUMÉ DE THÈSE	191

INTRODUCTION GÉNÉRALE	193
1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	194
1. Les lanthanides	194
2. Structure générale d'un marqueur biologique et détection	202
3. Hybrides à base de silice et de chélate d'euporium	205
OBJECTIFS.....	210
1. Objectifs spécifiques	210
3- ETUDE EXPLORATOIRE DE PARTICULES LUMINESCENTES A BASE D'EUROPIUM(III).....	212
1. Matrices d'Alumine et de silice dopées avec Eu^{3+} obtenues par pyrolyse d'aérosol, $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$	212
2. Composite PMMA: $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$	214
4. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION D'HYBRIDES A BASE DE SILICE ET DE COMPLEXES SILYLES D'EUROPIUM(III).....	216
1. Complexes d'euporium à ligand bipyridine silylé.....	217
2. Complexes d'euporium à ligand thénoltrifluoroacétone silylé	217
3. Hybrides à base de silice et de complexes d'euporium	219
4. Propriétés de luminescence	221
5. SONDÉS LUMINESCENTES : ESSAIS EXPLORATOIRES D'ANALYSE DE MILIEUX BIOLOGIQUES	225
1. Observation en microscopie confocale (CLSM).....	225
2. Marquage cellulaire	227
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	228

INTRODUÇÃO

Associar a luminescência de íons Lantanídeos com as propriedades físico-químicas de nanopartículas abre novos caminhos na obtenção de marcadores luminescentes destinados a identificação biomolecular. As nanopartículas desempenham um excelente papel como matriz, isolando os íons ativos de perturbações externas e diminuindo eventuais processos de supressão de luminescência. Por fim, a possibilidade de funcionalização superficial pode tornar estes materiais biocompatíveis, além de favorecer a preparação de suspensões estáveis em meio aquoso.^{1;2}

Nas últimas décadas, métodos imunocitoquímicos têm sido desenvolvidos para a caracterização de células e patologias, bem como para a caracterização de tecidos e no estudo do genoma humano³. Numerosos compostos inorgânicos, quando associados à métodos imunocitoquímicos, podem ser utilizados em química biomédica como agente de diagnóstico e terapêutico. A demanda pelo desenvolvimento de sistemas altamente sensíveis para aplicações biológicas tem motivado a busca por novos nanomateriais para os campos da biomedicina e biotecnologia.

Compostos orgânicos são os mais utilizados atualmente como biomarcadores em análises de rotina e são disponíveis comercialmente na forma de kits. No entanto, estes biomarcadores apresentam algumas limitações como: a fotoestabilidade reduzida; a luminescência destes compostos ocorre na região da autofluorescência do meio biológico e tempo de vida de alguns nanosegundos. Uma maneira de superar estas deficiências consiste no desenvolvimento de materiais estáveis e com tempo de vida de emissão suficientemente longo, para medir a emissão de luz após a extinção da luminescência do meio biológico.

Os materiais à base de lantanídeos são bons candidatos para tais medidas. No entanto, para que estes materiais desempenhem sua função como biomarcadores é necessário que algumas de suas propriedades sejam otimizadas⁴. Em meio aos desafios que o tema oferece, a presente tese visa a preparação de nano/micro partículas luminescentes, sua funcionalização com grupos de reconhecimento biológico e sua utilização em processos de marcação em sistemas biológicos.

1- INTRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Lantanídeos

No final do século XVIII, descobriu-se na Suécia uma série de minerais, denominados terras-raras, que compreendem elementos químicos com características peculiares. Embora chamados terras-raras, estes não são escassos na natureza. Calcula-se que a crosta terrestre seja formada por 0,02% de terras raras, por exemplo, a prata (0,00002%) tem ocorrência mil vezes menor que estes elementos. Fazem parte das terras-raras 17 elementos: escândio (Sc), ítrio (Y), lantânio (La), cério (Ce), praseodímio (Pr), neodímio (Nd), promécio (Pm), samário (Sm), európio (Eu), gadolínio (Gd), térbio (Tb), disprósio (Dy), hólmio (Ho), érbio (Er), túlio (Tm), itérbio (Yb) e lutécio (Lu). Dentre as terras raras, os lantanídeos compreendem 15 elementos químicos, do lantânio (La) até o Lutécio (Lu), com números atômicos entre 57 a 71. O fato de suas propriedades físicas e químicas serem semelhantes às do lantânio justifica o nome lantanídeos com que são designados^{5;6}.

Os íons lantanídeos apresentam configuração eletrônica $[\text{Kr}]4d^{10} 4f^n 5s^2 5p^6$, sendo a subcamada $4f^n$ preenchida ao longo da série. A subcamada $4f^n$ é mais interna que as camadas preenchidas $5s^2$ e $5p^6$ e, portanto os elétrons dos orbitais f estão blindados pelos elétrons dos orbitais $5s^2$ e $5p^6$. Como consequência, os elétrons 4f são pouco afetados pelo ambiente químico ao redor do íon⁷.

Com exceção do íon La^{3+} que possui a camada 4f vazia e o Lu^{3+} que possui a camada 4f cheia, a maior parte dos compostos dos íons lantanídeos apresenta a propriedade de luminescência nas regiões do UV-VIS-IV. Há muito tempo já se conhece que compostos a partir dos íons Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} e Dy^{3+} apresentam propriedades de luminescência na região do visível, uma vez que a diferença energética entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado é de 7000–15000 cm^{-1} . Já para os cátions Pr^{3+} , Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} e Yb^{3+} quando ligados a ligantes orgânicos, as transições não radiativas são favorecidas, uma vez que, a diferença energética entre os estados fundamental e o primeiro estado excitado é pequena, mas já nos óxidos todos estes íons emitem no visível. Compostos de Gd^{3+} emitem no UV, pois a diferença de energia entre os estados é de aproximadamente 32000 cm^{-1} .⁷

Os níveis de energia do íon livre são descritos por um Hamiltoniano que leva em conta a interação resultante do campo central (H_0) a repulsão intereletrônica (H_{RE}) e a interação spin-orbita (H_{SO})^{6; 8; 9}, dando origem aos níveis rotulados na notação de momento angular como $^{2S+1}L_J$ onde S e L são os momentos angulares totais de spin e orbital e J o momento angular total que leva em conta o acoplamento de S e L⁹.

$$H_{\text{ion livre}} = H_0 + H_{\text{RE}} + H_{\text{SO}} \quad (1)$$

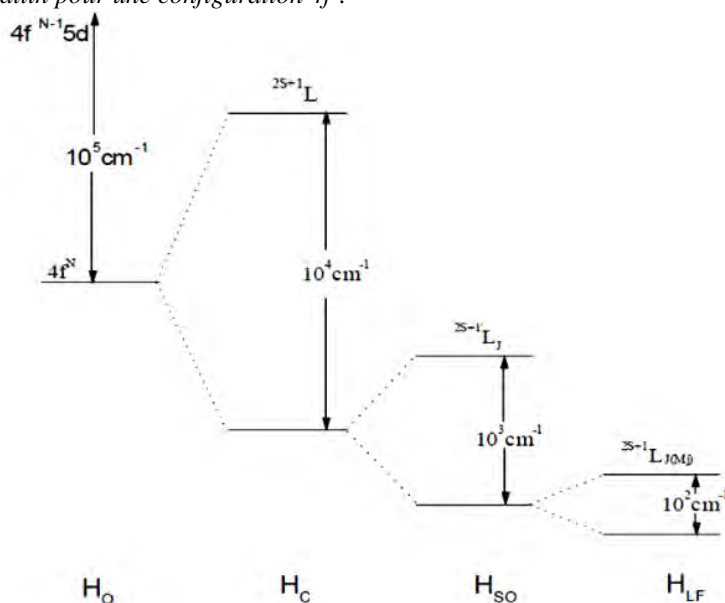
A perturbação causada pelo ambiente químico levanta a degenerescência em J destes níveis dando origem aos níveis de Stark cujo número e rótulo vai depender da simetria do campo ligante. Essa perturbação provocada pelo ambiente químico ao redor do íon terra rara é descrita pelo Hamiltoniano de campo ligante (H_{cc}). O Hamiltoniano total será dado por:

$$H = H_{\text{ionlivre}} + H_{\text{CC}} \quad (2)$$

A interação do campo cristalino é também de fundamental importância para o caso da intensidade das transições 4f – 4f. Estas transições ocorrem em sua grande maioria pelo mecanismo de dipolo elétrico e são, portanto, proibidas pela regra de Laporte. A regra de Laporte proíbe transições por dipolo elétrico entre estados de mesma paridade, a exemplo de transições no interior de uma configuração eletrônica, como é o caso das transições 4f – 4f para o íon livre. Contudo, essa regra pode ser relaxada quando o sistema atômico (íon lantanídeo) se encontra na presença de um campo ligante cuja simetria não apresenta centro de inversão. Isso ocorre porque, nesse caso, a distorção da simetria esférica do íon livre leva a uma mistura de configurações eletrônicas de paridades opostas. Por outro lado, quando a simetria do campo ligante apresenta centro de inversão, a distorção também ocorre, mas não leva a mistura de estados com paridades opostas; os estados resultantes continuam com paridades bem definidas e a regra de Laporte é mantida⁹. A figura 1 mostra uma representação esquematizada na ordem de grandeza de cada um dos componentes do Hamiltoniano total.

Figura 1: Representação esquemática e ordem de magnitude dos efeitos de interações intra-atômicas e de campo cristalino agindo sobre uma configuração $4f^n$.

VF Figure 1: Representation schématique et ordre de grandeur des différentes interations intra-atomiques et du champ cristallin pour une configuration $4f^n$.



Fonte: Malta et al⁹

Em 1962, Judd e Ofelt¹¹, independentemente, utilizando a técnica de operadores tensoriais irredutíveis, apresentam um tratamento teórico que permite o cálculo da contribuição do mecanismo de dipolo elétrico para as intensidades espectrais $4f - 4f$ e estabelece regras de seleção para os estados de momento angular, inicial e final, numa dada transição eletrônica. Dois anos mais tarde, Jørgensen e Judd¹² consideram os efeitos da polarização dos ligantes, produzida pelo campo eletromagnético incidente, sobre as transições $4f - 4f$, com o intuito de explicar o comportamento hipersensível, ao ambiente químico, de algumas transições. Como resultado, eles introduzem o mecanismo denominado originalmente de pseudo-quadrupolar (atualmente, também conhecido na literatura como acoplamento dinâmico). As estimativas teóricas de forças do oscilador feitas a partir desses dois mecanismos concordavam com valores experimentais em termos de ordem de grandeza. Ficavam assim estabelecidas as bases para o que hoje se conhece como a teoria das intensidades $f-f$. Logo, basicamente têm-se dois mecanismos que regem as transições eletrônicas: dipolo elétrico (DE) e dipolo magnético (DM).

As forças de oscilador para as transições eletrônicas podem ser obtidas experimentalmente pela equação¹³:

$$f_{J \rightarrow J'} = \frac{2303mc^2}{N_a \pi e^2} \frac{1}{\chi} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} = 4,32 \times 10^{-9} \frac{1}{\chi} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (3)$$

onde, N_a é o número de Avogadro, $\chi = (n^2+2)^2/9n$ é o fator de correção do campo elétrico onde n é o índice de refração, ε a absorvidade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Valores de 10^{-6} são observados para $f_{J \rightarrow J'}$

As forças de oscilador para transições de dipolo magnético podem ser calculadas por:

$$f_{DM} = \frac{8\pi mc}{3h(2J+1)} \bar{\nu} n \left(\frac{e}{2mc} |\langle f^n \Psi_J || L + 2S || f^n \Psi'_{J'} \rangle|^2 \right) \quad (4)$$

onde, h é a constante de Planck, m e c a massa e a velocidade da luz, e o termos entre barras é o elemento de matriz onde $L+2S$ é o operador de dipolo magnético.

Do trabalho de Judd e Ofelt as forças de oscilador para as transições eletrônicas de DE são dadas por:

$$f_{DE} = \chi \frac{8\pi^2 mc \bar{\nu}}{3h(2J+1)} \sum_{\lambda=2,4,6} \Omega_\lambda |\langle f^n \Psi_J || U^{(\lambda)} || f^n \Psi'_{J'} \rangle|^2 \quad (5)$$

onde, h é a constante de Planck, Ω_λ são os chamados parâmetros fenomenológicos de intensidade que contém os denominadores de energia, os termos ímpares do campo ligante, originado de uma dada simetria e as integrais radiais. Os $U^{(\lambda)}$ são operadores tensoriais unitários e os elementos de matriz reduzidos $|\langle f^n \Psi_J || U^{(\lambda)} || f^n \Psi'_{J'} \rangle|^2$ foram calculados e tabelados por Carnal et al ^{14; 15} para os íons terras raras de maior interesse.

O termo $(2J+1)$ surge a partir da consideração de que as componentes M_j do estado inicial são igualmente populadas termicamente. O parâmetro Ω_λ é geralmente tratado como um parâmetro fenomenológico através de ajustes às forças dos osciladores determinadas experimentalmente.

Considerando-se o processo de emissão, a intensidade será proporcional ao coeficiente de emissão espontânea de Einstein, ou seja, a desexcitação de um nível excitado (J) para o nível fundamental (J'), que é dado por¹³:

$$A_{J \rightarrow J'} = \frac{8\pi^2 e^2 \bar{\nu}}{mc} f_{J \rightarrow J'} \quad (6)$$

onde, ν é a frequência de transição, c é a velocidade da luz, e e m são a carga e massa do elétron, e $f_{J \rightarrow J'}$ é a força do oscilador da transição eletrônica. O inverso do coeficiente de emissão espontânea é o tempo de vida radiativo (τ_{RAD}).

O tempo de vida experimental para um dado estado excitado é obtido de medidas do decaimento de luminescência, ou seja, a curva de decaimento da intensidade de emissão em função do tempo depois de cessada a excitação, considerando que todos os íons excitados são equivalentes e independentes a população correspondente a $N_{(t=0)}$ (número de espécies no estado excitado no tempo $t=0$) e cada uma dessas espécies emitem um fóton via emissão espontânea e decai ao estado fundamental (i), através de um processo de primeira ordem, assim, o processo de despopulação pode ser descrito como:

$$d \frac{N}{dt} = -kN_{(t=0)} \Rightarrow N_{(t)} = N_{(t=0)} e^{-kt} \quad (7)$$

A intensidade de emissão é diretamente proporcional ao número de moléculas no estado excitado, então:

$$I_{(t)} = I_{(t=0)} e^{-kt} \Rightarrow k = \frac{1}{\tau} \quad (8)$$

Considerando que um determinado estado excitado pode ser despopulado por mecanismos radiativos e não-radiativos,

$$k = k_{rad} + k_{nrad} \quad (9)$$

Se ocorrer um decaimento exponencial, (8) e (9) aplicam-se com:

$$k = \frac{1}{\tau_{exp}} \quad (10)$$

Os termos rendimento quântico e eficiência quântica de emissão têm significados diferentes, embora sejam citados na literatura muitas vezes indistintamente. A eficiência quântica q pode ser escrita por:

$$q = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nrad}} = \frac{\tau_{exp}}{\tau_{rad}} \quad (11)$$

O rendimento quântico de emissão (ϕ) é definido como a fração de moléculas que emitem um fóton após a excitação direta da luz. É dado pela razão entre número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos¹⁶.

Os métodos mais utilizados para determinação de rendimento quântico absoluto são:

- Utilização de óxidos de metais inertes espectroscopicamente como o de magnésio (utilizam-se também KCl, Na₂SO₄ ou KBr) ou soluções espalhadoras como padrões de espalhamento. O princípio da metodologia resume-se na medida da intensidade de reflexão, em determinado comprimento de onda de excitação, pelo óxido de magnésio e pela amostra, obtendo um valor proporcional ao número de fótons absorvidos; e a partir do espectro de emissão da amostra obtem-se o número de fótons emitidos, por fim, é possível determinar a razão entre os dois¹⁷. Podemos também utilizar uma esferas de integração: neste método a necessidade de medidas contra um padrão de luminescência é superada. A esfera é montada dentro de um fluorímetro comercial, o que dá flexibilidade de excitação e emissão de comprimentos de onda.¹⁸
- Método calorimétrico: este método baseia-se nas mudanças na temperatura (ou volume) que ocorrem durante a irradiação de luz em um padrão não luminescente e amostra luminescente de densidade óptica similar. Como o padrão não luminescente terá ϕ igual a zero, a razão de mudanças de temperatura (ou volume) de ambos (padrão e amostra) resulta na fração de energia absorvida, a qual é perdida por processos não radiativos na amostra luminescente. Os processos não radiativos são complementares do rendimento quântico.¹⁹

Pode-se ainda determinar valores de rendimento quântico relativo que envolve a comparação, geralmente em solução, de rendimentos quânticos conhecidos de alguns compostos (padrão) com o material a ser analisado.²⁰

$$\phi_{amostra} = \left(\frac{Abs_{ref.}}{Abs_{amostra}} \right) \left(\frac{Em_{amostra}}{Em_{ref.}} \right) \left(\frac{n_{amostra}}{n_{ref.}} \right)^2 \phi_{ref} \quad (12)$$

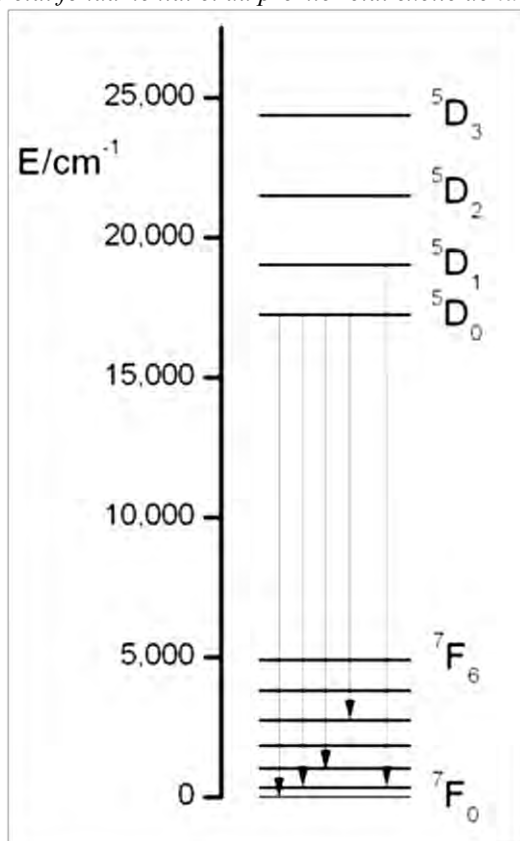
onde, Abs é a absorvância máxima obtida pelo espectro de absorção, Em é a intensidade de emissão obtida pela integração do espectro de emissão, e n o índice de refração do solvente utilizado.

Dentre os íons lantanídeos os compostos de Eu^{3+} têm sido objeto de uma grande parte dos trabalhos sobre luminescência devido a várias características próprias tais como:

(i) A maior parte dos compostos exibe forte luminescência no visível (alaranjada ou vermelha), o que em termos de aplicação propicia que sejam utilizados nos mais variados campos tais como: telas de tubo de imagem, lâmpadas, ou ainda como sondas estruturais, juntamente com o Tb^{3+} na determinação, por exemplo, de sítios de ligação do íon Ca^{2+} em sistemas biológicos.^{21; 22}

(ii) O íon Eu^{3+} possui configuração $[Kr]4d^{10}4f^65s^25p^6$ e raio iônico igual a 0,96 Å. Sua configuração 4f possui um total de 3003 microestados distribuídos em 119 multipletos que por força da interação spin-órbita originam 295 níveis diferentes. O termo de menor energia é um septeto ($2S+1 = 2 \times 3 + 1 = 7$) e o momento orbital de menor energia será $L=3$ que é representado pela letra F. Logo, temos 7F_J onde J assume valores no intervalo de $|L+S|$ e $|L-S|$ ou seja, $0 < J < 6$. Como o número de elétrons f é menor que sete, o estado fundamental será o 7F_0 . As emissões dos níveis 5D_0 para os ${}^7F_{0-4}$ são observadas na região de 580 a 710 nm^{23; 24; 25}.

(iii) O principal nível emissor excitado 5D_0 não se desdobra sob a ação de campo cristalino, o que facilita a interpretação dos espectros utilizando-se a teoria de grupo e considerações de simetria. A figura 2 mostra alguns níveis energéticos do íon Eu^{3+} . As setas verticais mostram algumas transições usualmente observadas em espectros de emissão de compostos deste íon.

Figura 2: Primeiros níveis energéticos da configuração $4f^6$ do íon Eu^{3+} **Figure 2:** Niveaux d'énergie de l'état fondamental et du premier état excité de la configuration de l'ion Eu^{3+} 

Os parâmetros de intensidade de Judd são difíceis de serem obtido a partir de espectros de absorção experimentais. De fato, poucas bandas de absorção são observadas com bastante intensidade na faixa visível, que poderiam ser usadas no cálculo. No entanto a obtenção desses parâmetros é possível a partir dos espectros de emissão.

A observação da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, de caráter puramente de dipolo magnético, permite a determinação dos parâmetros de intensidade. Uma vez que esta transição não depende do campo ligante local ela pode ser usada como referência para todo o espectro.

O coeficiente de emissão espontânea de Einstein da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, $A_{0 \rightarrow 1}$, é dado por¹³:

$$A_{0 \rightarrow 1} = A'_{0 \rightarrow 1} n^3 \quad (13)$$

onde, $A'_{0 \rightarrow 1}$ no vácuo é igual a 14.65 s^{-1} . Dessa forma, expressando a intensidade das transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0 \rightarrow 6}$, I_{0J} , em termos de área das suas curvas de emissão, S_{0J} :

$$I_{0j} = hc\bar{\nu}N(^5D_0) \equiv S_{0j} \quad (14)$$

onde $N(^5D_0)$ é a população do nível emissor 5D_0 , logo podemos escrever a taxa de decaimento radiativo total como:

$$A_t = \sum_{j=0}^6 A_{0j} = \frac{A_{01} hc\nu_{01}}{S_{01}} \sum_{j=0}^6 \frac{S_{0j}}{hc\nu_{0j}} \quad (15)$$

Normalmente, a contribuição radiativa é calculada a partir das intensidades relativas das transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0-4}$. Devido as intensidades relativamente baixas as transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_{5,6}$ podem ser negligenciadas.

Os parâmetros de intensidade Ω_λ serão então calculados por¹³:

$$\Omega_\lambda = \frac{3h}{64\pi^4 e^2 \bar{\nu}^3} \frac{9}{n(n^2 + 2)^2} \frac{1}{|\langle ^5D_0 || U(\lambda) || ^7F_j \rangle|^2} A_{0j} \quad (16)$$

com $\lambda=J= 2, 4, 6$. Os valores para os elementos de matriz reduzida são 0,0032 e 0,0023, para $\lambda=J=2, 4$ respectivamente^{9; 13; 25}.

A partir de medidas de tempo de vida de estado excitado 5D_0 em água e água deuterada pode-se também obter o número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação do Eu^{3+} . Osciladores OH promovem um eficiente decaimento não radiativo para o estado 5D_0 , enquanto que para osciladores OD, esta desativação não é tão eficiente. Desta forma Horrocks²⁶ observou uma relação entre o tempo de vida e número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação para sólidos cristalinos de estrutura conhecida e preparados separadamente em H_2O e D_2O . Esta relação gerou uma resposta linear para a diferença entre os tempos de vida para as amostras cristalizadas em H_2O e D_2O que é expressa pela equação:

$$N_{OH} = A \left[(\tau_{H_2O})^{-1} - (\tau_{D_2O})^{-1} \right] \quad (17)$$

onde o valor de A obtido foi da ordem de 1,05 (moléculas de água ms) para o Eu^{3+} e o erro estimado para o valor de n_{OH} era igual a +/- 0,5 moléculas de água. Considerando um grande número de complexos uma fórmula mais precisa foi estabelecida²⁶

$$N_{H_2O} = 1,11 \left[(\tau_{H_2O})^{-1} - (\tau_{D_2O})^{-1} - 0,31 \right] \quad (18)$$

Dias Filho et al²⁷ calculou o número de moléculas de água para o Eu^{3+} usando dois métodos, ou seja, a partir de medidas em água deuterada ou substituindo-se $\tau(\text{D}_2\text{O})$ pelo valor do tempo de vida radiativo τ_{RAD} obtido dos espectros de emissão. O número de moléculas de água calculado pelos dois métodos foi concordante.

$$N_{H_2O} = 1,11 \left[(\tau_{\text{exp}})^{-1} - (\tau_{\text{rad}})^{-1} - 0,31 \right] \quad (19)$$

Alternativamente nós propusemos outra determinação experimental para as matrizes híbridas no capítulo 5 deste trabalho (item 4.2).

Os processos de transferência de energia envolvendo íons lantanídeos não são totalmente prejudiciais (ou supressores), a transferência de energia entre uma molécula e um íon (ou grupo de íons) é, também, um interessante mecanismo excitação, pois grupos cromóforos, após absorverem determinada quantidade de luz, podem transferir esta energia, ou parte dela, para um centro emissor. No caso de compostos de íons lantanídeos, esta excitação indireta permite a obtenção de compostos fortemente luminescentes, o que não ocorreria caso a excitação fosse feita diretamente no íon lantanídeo, visto que as transições $4f \rightarrow 4f$ destes íons não são muito apropriadas para a absorção, por serem transições proibidas.^{28; 29}

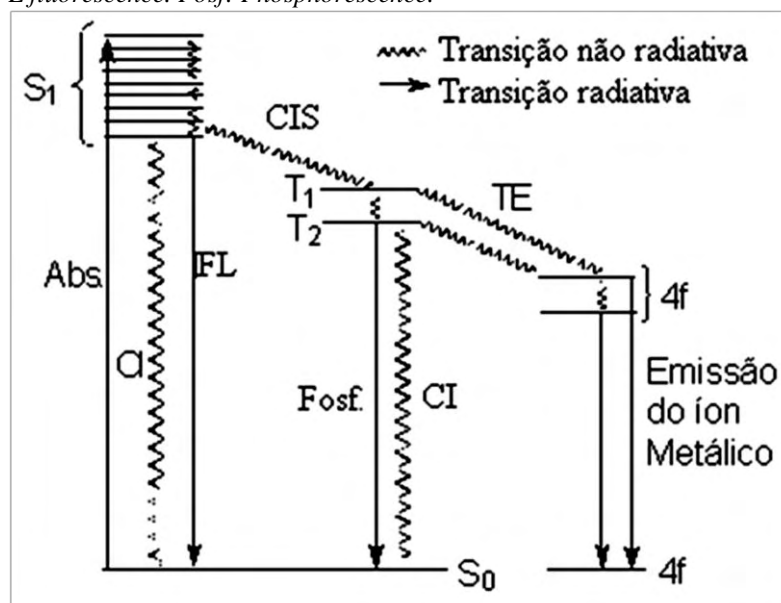
O mecanismo de transferência de energia de um ligante orgânico para o metal foi observado pela primeira vez por Weissman.³⁰

A figura 3 apresenta esquematicamente o mecanismo de transferência de energia entre um ligante orgânico e um íon emissor^{24; 29; 31; 32}. A primeira etapa envolve a absorção (Abs) de energia pelo ligante, que é levado do estado fundamental singleto (S_0) para um estado excitado singleto (S_1). A molécula perde energia não radiativa até atingir o nível vibracional de menor energia dentro do estado eletrônico singleto (S_1). A desexcitação deste estado pode ocorrer por: decaimento radiativo passando do S_1 para o S_0 , processo denominado fluorescência (FL); decaimento não radiativo passando do S_1 para o S_0 , mecanismo denominado de conversão interna (CI); ou passar para o estado tripleto do ligante (T_1 e T_2), denominado cruzamento intersistema (CIS). A desativação dos estados tripletos para o estado fundamental pode ocorrer via: mecanismo radiativo, denominado fosforescência (fosf); ou

mecanismo não radiativo, cruzamento intersistema (CIS). Pode ocorrer ainda a transferência de energia dos estados tripleto do ligante para os níveis excitados do íon metálico que pode sofrer uma transição radiativa com emissão característica do centro emissor ($4f \rightarrow 4f$).

Figura 3: Representação esquemática do efeito antena de um ligante orgânico e um íon metálico TR emissor. CI: conversão interna, CIS: cruzamento inter sistema, TE: Transferência de energia. Abs: Absorção. FL: Fluorescência. Fosf: Fosforescência.

Figure 3: Représentation schématique de l'effet d'antenne d'un ligand organique et d'un ion métallique émetteur. IC: conversion interne, CEI: croisement inter système, TE: Transfert d'énergie. Abs: l'absorption. FL fluorescence. Fosf: Phosphorescence.



Fonte: figura adaptada de Sabbatini^{24; 31; 32}

2. Marcadores e detecção química para uso como sondas luminescentes

Um marcador é uma molécula ou sistema capaz de emitir sinal quando usado como agente de detecção. Além do grupo gerador de sinal, um grupo reativo facilita a ligação covalente entre o analito e o marcador. Entre estes dois grupos há usualmente um espaçador que tem a função de dificultar interações indesejáveis entre o grupo gerador de sinal e o substrato a ser marcado³³.

O acoplamento ao analito deve ser simples, não agressivo e as propriedades de luminescência não devem mudar significativamente após o acoplamento. Além disso, as propriedades das substâncias não devem ser alteradas pelo marcador³³.

Basicamente, todo composto luminescente pode ser usado como um grupo gerador de sinal. Ele deve exibir um rendimento quântico relativamente elevado em solução aquosa, ser estável nas condições empregadas e deve poder ser funcionalizado visando a otimização

de propriedades, como aumento da estabilidade em água ou características de emissão como comprimento de onda e tempo de vida³³.

Como já mencionado, o grupo reativo ou ancora é usado para ligar o marcador à substância a ser marcada. A formação de uma ligação peptídica entre grupos carboxílicos e amino é bastante comum nesses casos³³. Dos grupos reativos mais conhecidos, a N-succinamida éster (NHS), apresenta vantagens, como a facilidade de síntese a partir de derivados carboxílicos. Os marcadores com NHS podem ser purificados, o que facilita seu estoque por longos períodos e a reação de acoplamento do NHS com grupos aminos ocorre a temperatura ambiente em solução aquosa. Em contraste, alcoóis não reagem com o NHS sob as mesmas condições^{21; 33; 34; 35}. Cadeias carbônicas curtas ou grupos aromáticos ou alifáticos são usados como espaçadores. O uso de cadeias com grupamentos aminoácidos e pontes éster pode aumentar a solubilidade do marcador na água^{21; 33; 34; 35; 36}.

A detecção química de analitos específicos é essencialmente dependente de três condições: -o reagente de detecção deve ter alta afinidade com o analito mesmo quando estiver presente em quantidades traço; -a ligação do reagente ao analito deve ser altamente específica garantindo que substâncias similares não levem a uma falsa detecção; -o produto da reação analito-reagente deve ser sensível a detecção, isso é, emita um sinal que possa ser quantificado pelos equipamentos de análise desejados

Os critérios de afinidade e especificidade são plenamente atendidos pela utilização de anticorpos. Anticorpos (item 1.4) são glicoproteínas endógenas que nas formas de vida superiores desempenham papel crucial no sistema imune eliminando substâncias não desejadas (bactérias, vírus, toxinas, etc.) com constantes de afinidade que variam de 10^{10} a 10^{12} L.mol⁻¹. Eles são capazes de reconhecer diferenças estruturais mínimas a nível molecular, distinguindo substâncias exógenas e endógenas³³.

Por outro lado, a geração de sinal detectável na reação analito-reagente é motivo de estudo há diversos anos, o emprego de isótopos radioativos como reagente de detecção via marcação biológica foi o primeiro método a apresentar taxas de quantificação e confiança satisfatórias. Entre as vantagens dos emissores gama pode-se citar o tamanho pequeno (minimização de efeitos de interferência) e sinal forte, que leva a resultados de baixa interferência e alto índice de detecção. A combinação anticorpo-marcador radioativo levou a introdução dos radioimunoensaios no final da década de 50, e se desenvolveu como importante técnica de diagnóstico *in vitro* na medicina³⁷. Entretanto, marcadores radioativos não apresentam somente vantagens. O manuseio de materiais radioativos é regulamentado,

necessitando de licença oficial o que torna o uso limitado. O tempo de meia vida para o isótopo ¹²⁵I, por exemplo, é de 60 dias, o que é um tempo curto para garantir a longa validade dos reagentes marcadores.

No início da década de 70 iniciou-se o uso de enzimas como marcadores. Em combinação a substratos cromogênicos ou luminogênicos, a detecção do sinal é realizada com a medida de luz absorvida ou emitida. Neste ponto a luz substitui a radioatividade no processo de quantificação de analitos^{38; 39}. Os métodos usando enzimas são muito sensíveis e apresentam a vantagem de que o grupo absorvedor ou emissor de radiação é gerado como produto da reação de identificação, mas a dificuldade se encontra na separação espectral dos produtos finais. A sobreposição de bandas dos muitos cromóforos gerados pode dificultar a quantificação de mais de um antígeno⁴⁰. Além disso, a detecção do sinal depende sempre de tempo de incubação e existe também a possibilidade de interferências através de enzimas endogênicas ou inibidores e a repulsão estérica gerado pela enzima no acoplamento anticorpo – antígeno⁸.

A necessidade de medir e identificar mais de um analito biológico impôs crescente demanda de sondas luminescentes para aplicação na pesquisa biológica. A literatura nesta área é vasta, na sequência serão apresentados os principais grupos de materiais luminescentes utilizados como sondas em biologia e os processos de funcionalização necessária para essa aplicação.

As sondas luminescentes utilizadas como biomarcadores na medicina podem ser divididos em quatro categorias: as partículas metálicas, as nanopartículas de semicondutores inorgânicos, pontos quânticos (QDs do termo em inglês “quantum dots”), os corantes orgânicos e os compostos a base dos íons lantanídeos.

Nas partículas metálicas, o fenômeno responsável pela resposta óptica é a interação entre o campo eletromagnético e as oscilações coletivas de elétrons na superfície da partícula, os chamados plásmons. Nanopartículas de Ag ou Au, por exemplo, são bem conhecidas com a banda de ressonância dos plásmons ocorrendo na região visível do espectro. Como resultado da absorção de radiação visível, o campo eletromagnético próximo a partícula pode ser muitas ordens de magnitude maior do que o campo incidente, e fenômenos de intensificação de espectros de luminescência ou de espalhamento Raman são possíveis para espécies que estejam nas proximidades da nanopartícula e, portanto sujeitas ao campo intensificado^{41; 42; 43;}

⁴⁴.

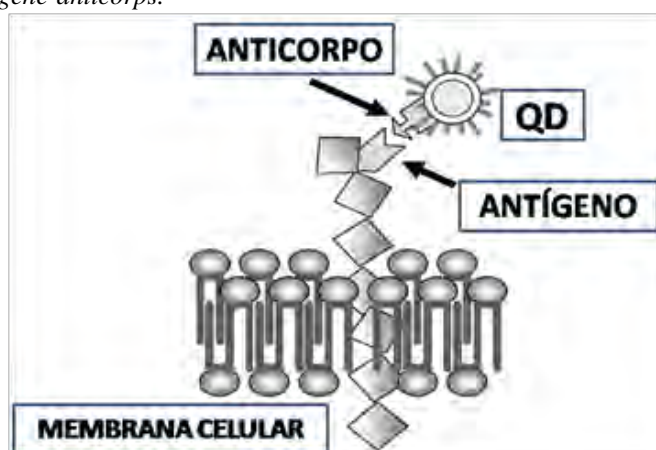
Nos QDs, obtidos pela associação dos elementos dos grupos (tabela periódica) 12-16, 14-15 e 14- 16 o fenômeno de luminescência é associado a transições eletrônicas entre as bandas de valência e condução. Sobre excitação na região do ultravioleta esses materiais emitem fótons no espectro visível, com cores que vão do vermelho ao azul quando o tamanho das nanopartículas diminui. Este é o chamado efeito de confinamento quântico presente nos QDs³.

A fim de direcionar a interação dos QDs a uma determinada biomolécula, a sua superfície deve ser quimicamente modificada com espécies orgânicas (funcionalização) e o sistema resultante pode ser considerado uma nanoestrutura híbrida orgânico-inorgânica^{45; 46,47}. Os sistemas resultantes possuem a combinação de propriedades de ambas a parte orgânica e inorgânica: as propriedades ópticas do QDs e a funcionalidade química.

P. M. Farias et al⁴⁸ mostram diversos exemplos bem sucedidos de nanopartículas (d=2-6nm) de CdS/Cd(OH)₂, CdSe/CdS e CdTe/CdS, funcionalizadas e sua ligação a diferentes sistemas biológicos (câncer de células e tecidos, parasitas e células de levedura). Um destes exemplos se refere à análise de tecidos e células, conjugadas com QDs (figura 4 e 5) utilizando-se microscopia óptica confocal. Os QDs funcionalizados com glutaraldeído (CdS/Cd(OH)₂-Glut (6 nm)) ligados a células de câncer cerebral (glioblastomas) (figura 5) podem ser observados pela imagem da fluorescência.

Figura 4: Um esquema representativo de uma ligação específica do QDs com a proteína da membrana celular em uma ligação antígeno-anticorpo.

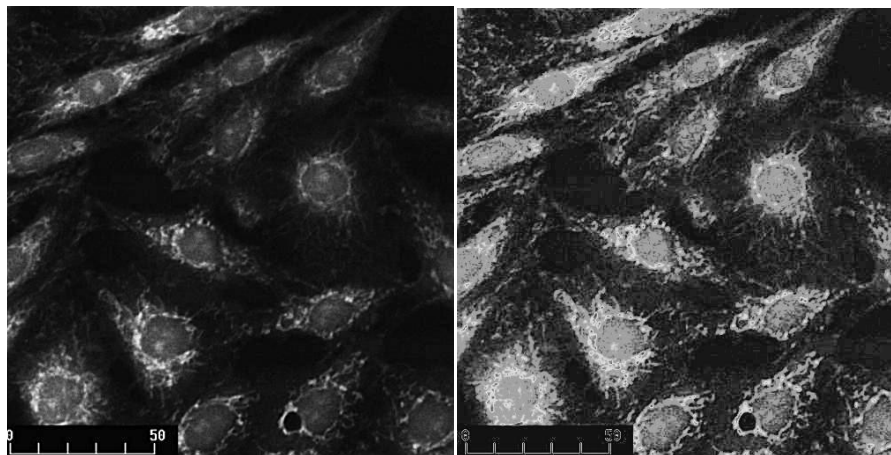
Figure 4: Schéma représentatif d'une liaison spécifique entre un QDs et une protéine d'une membrane cellulaire dans une interaction antigène-anticorps.



Fonte: P. M. Farias et al⁴⁸

Figura 5: Células Glioblastomas marcadas com CdS-Cd(OH)₂-Glut. (esquerda) imagem confocal, (direita) intensidade de fluorescência.

Figura 5: Glioblastomes marquées avec CdS-Cd (OH) 2-Glut. (à gauche) cliché de microscopie confocale, (à droite) cliché en fluorescence.



Fonte: P. M. Farias et al⁴⁸

Os aspectos negativos ligados a utilização dos QDs se referem a sua característica hidrofóbica, que requer modificação superficial adicional o que leva a um aumento de seu raio hidrodinâmico em 15 nm ou mais. Além disso, os QDs são geralmente preparados a partir de íons de metais pesados, como Pb^{2+} ou Cd^{2+} , que são tóxicos⁴⁹.

Alternativamente moléculas orgânicas tais como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou cianina também são usadas como marcadores luminescentes. Suas principais limitações provêm da fotoestabilidade reduzida e do fato de sua luminescência ocorrer na região da autofluorescência do meio biológico e tempo de vida de alguns nanosegundos.

Visando aumentar o número de moléculas orgânicas ligadas a biomoléculas utiliza-se a associação com polímeros e sílica. Os corantes são ancorados sobre a superfície da nanopartícula⁵⁰ ou incorporado no seu interior⁵¹.

A sílica é biocompatível e a sua funcionalização é relativamente fácil, desempenhando assim um excelente papel com matriz para suportar marcadores fluorescentes. Ela é estável química e mecanicamente, e pode proteger o corante encapsulado de perturbações externas⁴⁹.

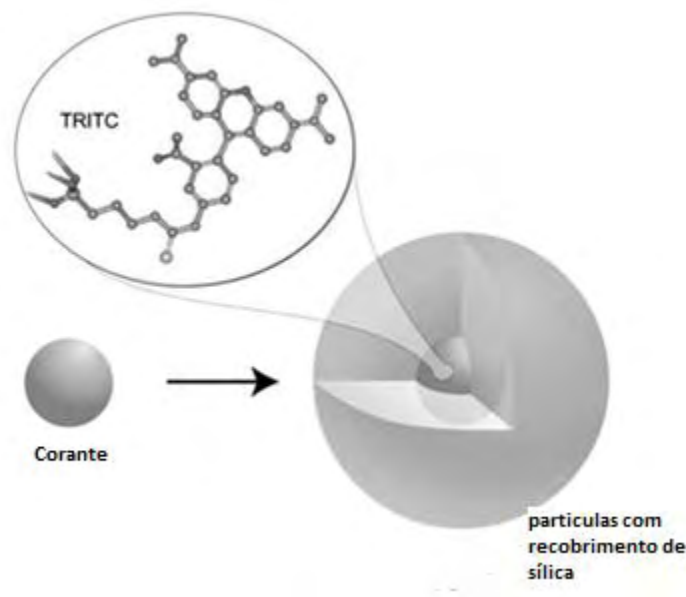
O encapsulamento de moléculas em nanopartículas apresenta algumas vantagens. Observa-se o aumento na foto estabilidade e no rendimento quântico de emissão, devido ao isolamento de possíveis supressores como oxigênio molecular e água⁵². Além disso, é possível funcionalizar a superfície de partículas luminescentes para facilitar a conjugação com

moléculas bioativas como enzimas e anticorpos^{52; 53}. Corantes orgânicos e complexos como [Ru(phen)₃]Cl₂ (phen- fenantrolina) tiveram sua estabilidade aumentada quando incorporados à nanopartículas de sílica⁵³. Porfirinas e corantes bem conhecidos, como o Azul do Nilo, também podem ser incorporados a esferas de dimensões nanométricas. As aplicações possíveis para estas esferas dopadas com corantes podem cobrir uma ampla área, como aplicação em diagnósticos em biologia e medicina, microsensores combinados com fibras ópticas, cavidades óptica para emissão laser, entre outras.

Em 2006, Wiesner et al⁴⁹ e colaboradores, apresentaram a síntese de partículas de sílica incorporada com isocianato de tetrametilrodamina, figura 6, e referiram-se a essa partícula como “C dots” (Core-shell Dots). O raio hidrodinâmico é da ordem de 10-15 nm e a intensidade de sinal emitida por partícula se aproxima ao observado nos QDs.

Figura 6: Representação esquemática de uma nanopartícula “C dots” onde o corante (tetrametilrodamina) está incorporado.

Figure 6: Représentation schématique d'une nanoparticules "C dots" où le colorant (tétraméthylrhodamine) est incorporé.



Fonte: adaptada de Wiesner et al⁴⁹

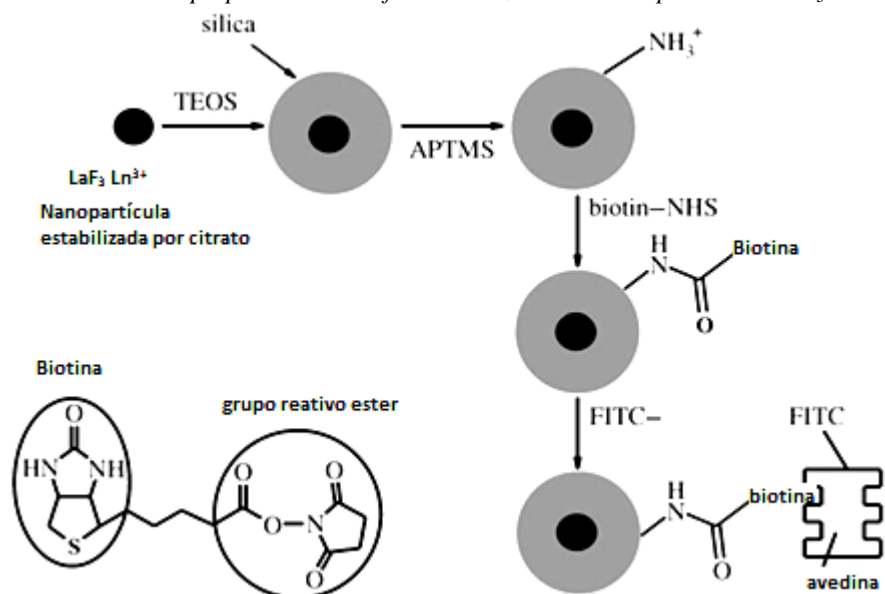
Corantes e QDs podem ser substituídos por nanocristais inorgânicos contendo íons lantanídeos. Estes materiais luminescentes são promissores para biodeteção devido às suas boas propriedades ópticas, estabilidade química e baixa toxicidade⁵⁴. O desenvolvimento de novos luminóforos combinado com o progresso técnico para a aquisição de dados e imagens abrem caminho para tecnologias com melhor resolução espacial, espectral e temporal, em particular para a visualização do comportamento de tecidos e células.

A introdução de um pequeno atraso entre o pulso de excitação sobre a amostra e a medida do sinal de luminescência permite excluir o espalhamento da luz de excitação e a fluorescência de curto tempo de vida (luminescência de fundo) observado geralmente sobre o meio estudado. Geralmente, o tempo de vida de uma espécie de fundo é menor que 10 ns, e para medidas sem interferência deste ruído, o marcador deve ter um tempo de vida no mínimo 10 vezes maior que o ruído. Na prática luminóforos ideais deveriam apresentar tempo de vida maior que 50ns³³.

Podemos considerar nessa categoria os íons lantanídeos. Em razão de seu pequeno tamanho atômico e suas propriedades químicas semelhantes, o íon ativo pode substituir parcialmente a outro elemento do grupo de terras raras presente na matriz hospedeira. Vários grupos de pesquisa estão trabalhando na síntese de nanopartículas de óxidos de lantanídeos e dopando com diferentes íons Ln^{3+} além da modificação destas partículas e utilização em testes para marcação celular⁵⁵⁻⁶⁰.

Van Veggel et al⁵⁵ descreve a síntese de uma matriz de LaF_3 dopada com Tb^{3+} , Eu^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} , $\text{Yb}^{3+} + \text{Er}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+} + \text{Tm}^{3+}$. As partículas obtidas por precipitação em solução aquosa permitem obter, pela escolha do dopante, uma faixa de emissão larga, entre 450 e 1600 nm. Estas partículas têm sua superfície modificada por grupos aminosiloxanos e ligada a biotina por funções hidroxisuciinimidil-éster, para teste na marcação da adivina (figura 7).

Figura 7: Esquema ilustrando a preparação e biofuncionalização das nanopartículas $\text{LaF}_3:\text{Ln}^{3+}$
Figure 7: Schéma illustrant la préparation et biofunctionalization de nanoparticules $\text{LaF}_3:\text{Ln}^{3+}$



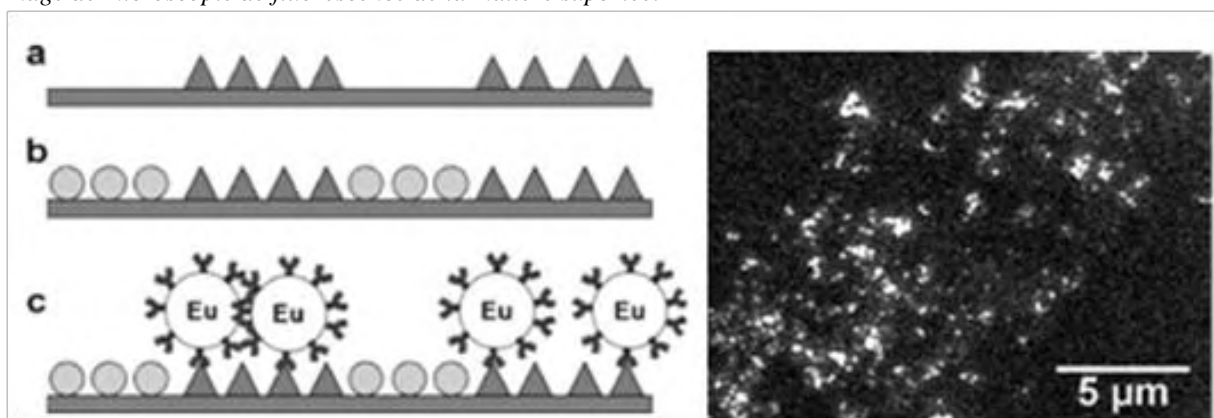
Fonte: adaptada de Van Veggel et al⁵⁵

Beaurepaire et al⁶¹ apresentam a utilização de nanopartículas luminescentes de vanadato de ítrio dopado com íons európio ($\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$) preparadas por precipitação em solução aquosa, como biomarcadores. Estas nanopartículas envolvidas por uma camada de sílica, e incorporando a função aminosilano podem ser funcionalizadas com grupos guanidina que agem como toxina artificial, que podem ser detectadas por microscopia de fluorescência com atraso temporal em membranas das células do coração.

Dosev et al⁶⁰ mostram a possibilidade de utilizar as nanopartículas de óxido de gadolínio dopadas com európio ($\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$) funcionalizadas com avidina para a visualização de proteínas. As nanopartículas foram sintetizadas por pirólise de aerossol a 2100°C e as proteínas ligadas a biotina adicionada em placas de vidro pelo método de “micro-contact printing”. Esse material foi detectado por Microscopia de fluorescência e força atômica, mostrando a possibilidade de detecção de proteína com óxidos de lantanídeos (figura 8). Estes autores também apresentam a utilização do $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ incorporado em uma camada de polilisina e conjugado a um anticorpo para detecção em Microscopia de fluorescência e força atômica de antígenos depositados sobre placas de vidro^{60; 62; 63}.

Figura 8: (Esquerda) princípio do microimunoensaio usando $\text{Eu}:\text{Gd}_2\text{O}_3$ como biomarcador (a) IgG de coelho mobilizadas sobre uma placa de vidro (b) adição de anticorpos bloqueados com a proteína, IgG:BSA (c) imunoreação entre os IgG de coelho e as nanopartículas com anticorpo IgG-Eu: Gd_2O_3 . (Direita) Imagem de microscopia de fluorescência do material suportado.

Figure 8: (À gauche) Principe de microimmunoessais utilisant Gd_2O_3 en tant que biomarqueur (a) IgG de lapin mobilisés sur une plaque de verre (b) l'addition d'anticorps marqués avec la protéine, IgG:BSA (c) immunoréactions entre IgG de lapin et les nanoparticules avec des anticorps IgG-Eu: Gd_2O_3 . (À droite) Image de microscopie de fluorescence de la matière supportée.



Fonte: adaptada Dosev et al⁶⁰

Os lantanídeos apresentam propriedades intrínsecas de emissão interessantes para utilização como biomarcadores, embora os coeficientes de absorção para a luz de excitação sejam baixos. Em complexos de ligantes orgânicos a absorção é mais eficiente e uma vez que

possa haver transferência não radiativa de energia ligante→lantanídeo a emissão pode ser intensificada.

J. C. Bunzli⁶⁴ apresenta varias aplicações no domínio da medicina para sondas luminescentes a base de lantanídeos. A maioria dos exemplos é baseada em complexos fortemente luminescentes obtidos pela escolha apropriada dos ligantes e íons lantanídeos. Para essa associação é necessário que os níveis eletrônicos dos ligantes orgânicos e o íon emissor estejam situados em posições tais, de maneira que seja favorável a transferência não radiativa do ligante para o íon lantanídeo, comparada aos processos concorrentes como emissão radiativa dos próprios ligantes, transferência de energia íon→ligante, e desexcitação não radiativa.

Os complexos de íons lantanídeos são marcadores interessantes nesse sentido. Em complexos de Eu^{3+} e Tb^{3+} , o tempo de vida da luminescência é da ordem de milisegundos, o que associado com a resolução temporal no tratamento do sinal, leva a um aumento significativo na razão sinal/ruído. O uso de complexos de íons lantanídeos trivalentes facilita não somente o desenvolvimento de imunoenaios sensíveis para medidas resolvidas no tempo, mas também, simultâneas determinações de diferentes parâmetros, pois complexos de Eu (III), Tb (III), Sm (III) e Dy (III) emitem em comprimento de onda diferentes e com diferentes tempos de vida de estados excitados. Além disso, os espectros de emissão destes íons apresentam bandas finas que podem ser comparadas, de certa forma, ao espectro do átomo livre o que pode facilitar a discriminação²³.

Alguns complexos de Ln^{3+} podem, ainda, ser excitados por mecanismo de absorção de 2 fótons, desde que o laser de excitação seja pulsado com largura de pulsos de fentosegundos e alta potência. Este princípio é utilizado no chamado “imageamento” multifóton. Tipicamente a excitação é feita por lasers de Ti-safira com comprimento de onda sintonizável na região de 800 nm e a detecção da emissão na região de 540-610 nm.^{65; 66}

Em adição, a luminescência dos íons lantanídeos no infravermelho próximo é especialmente promissora, em especial para pesquisas biomédicas, devido à relativa transparência do tecido da pele na faixa de 700-1100 nm^{67; 68}.

Portanto, o desenvolvimento de complexos luminescentes Ln^{3+} com ligantes quelatos que apresentam uma melhor estabilidade e rendimento quântico é uma atividade atualmente intensa^{69; 70; 71; 72; 73}. A incorporação dos compostos a nanopartículas inorgânicas ou poliméricas é particularmente interessante já que a intensidade de luz emitida pode ser aumentada pela presença de muitas moléculas dos complexos numa única partícula^{74; 75; 76}.

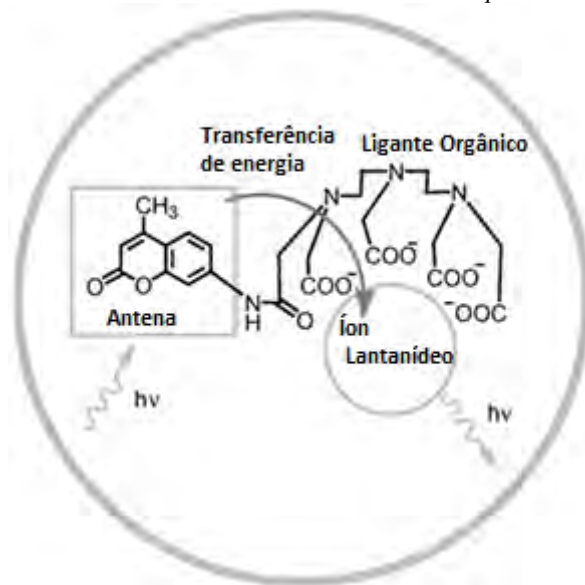
H. Harma et al⁷⁵ por exemplo, apresentam nanopartículas de poliestireno de 107 nm de diâmetro contendo um complexo de európio. Esse é um material comercial, cujo nome de mercado é Fluoromax, (Seradyn).

Z. Ye et al⁷⁶ descrevem a preparação da partícula $\text{SiO}_2@\text{Tb}^{3+}\text{BPTA}$ por microemulsão inversa (W/O) Essas nanopartículas apresentam um diâmetro de 42 nm e são utilizados em testes TR-FIA. No mesmo grupo descreve a síntese do $\text{SiO}_2@\text{Eu}^{3+}\text{BPTA}$, que é utilizado como marcador de antígenos da hepatite B, para detecção por espectroscopia de fluorescência com resolução temporal.

Y. Chen⁷⁷, apresenta a preparação de partículas de sílica de 55 nm contendo um complexo de európio quelado por um poliaminocarboxilato associado a um corante que age como uma “antena” (figura 9).

Figura 9: Esquema que mostra a partícula luminescente

Figura 9: Schéma d'une particule luminescence à base de chélate d'euporium



Fonte: adaptada de Y. Chen⁷⁷

3. Complexos de lantanídeos e imobilização em matriz de sílica

Complexos de lantanídeos fazem parte de uma importante classe de compostos para o desenvolvimento de materiais luminescentes avançados em aplicativos óptico-eletrônicos, imagens e marcadores fluorescentes^{7; 13; 67; 78; 79; 80; 81}. Nas últimas décadas, vários trabalhos mostraram a importância de utilizar ligantes orgânicos que absorvem intensamente no UV, permitindo, assim, importantes resultados de emissão de luz como consequência da

transferência de energia intramolecular eficiente dos ligantes ao íon central (o chamado “efeito de antena”)^{13; 78; 79}. A lista de potenciais ligantes, que associados aos íons lantanídeos, apresentam essa propriedade é abundante^{7; 13; 64; 67}. Para explorar o potencial dos complexos de lantanídeos para várias aplicações é útil ancorá-los ou mesmo incorporá-los a matrizes inertes. O processo sol-gel é bem conhecido para a preparação de materiais híbridos orgânico-inorgânicos com propriedades (mecânicas, térmicas, físicas e químicas) que podem ser controladas, pela modificação das condições de síntese. Portanto microestrutura, forma e grau de conexão de duas redes podem ser controlados.

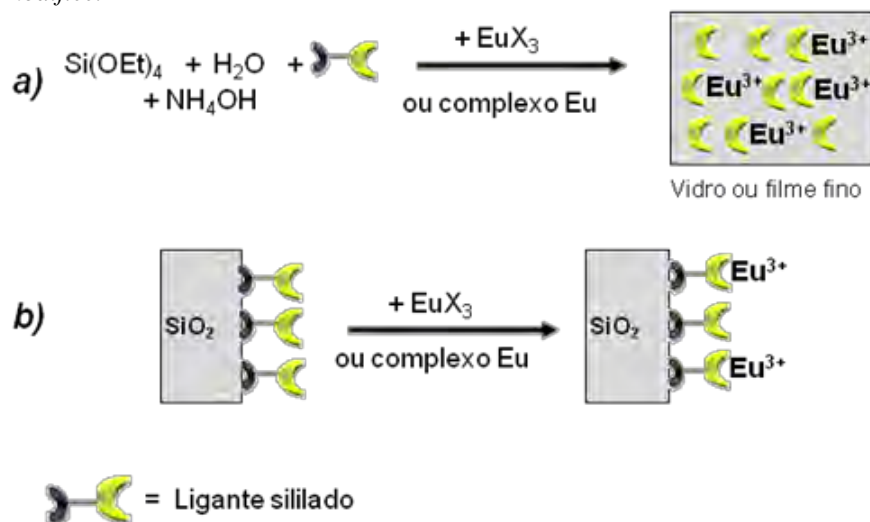
Em paralelo, materiais à base de sílica são bastante utilizados em muitos domínios e aplicativos. Em bioanálise, a utilização de nanopartículas de poliestireno dopada com quelatos fluorescentes também tem sido explorada⁷³. No entanto, esses materiais apresentam desvantagens como risco de formação de quelatos, tendência de formar aglomerado e dificuldade de separar da solução. Como alternativa nanopartículas de sílica funcionalizadas tem sido utilizadas principalmente por causa das propriedades interessantes como hidrofiliabilidade, possível modificação da superfície e fácil separação do meio reacional.

Materiais orgânico-inorgânicos contendo lantanídeos podem ser obtidos pela metodologia sol-gel. Neste sentido, espécies organosilanos têm sido usadas como agentes de acoplamento para induzir a ligação covalente entre o complexo de lantanídeos e a matriz, envolvendo um primeiro passo a incorporação de ligantes orgânicos em matriz inorgânica. Observa-se que propriedades como: estabilidade térmica, propriedades fotofísicas e a facilidade de processamento dos híbridos melhoram em comparação com os complexos de lantanídeos puros. A metodologia geral esta descrita nos esquemas das figuras 10 e 12 e envolve vidros^{28; 82; 83; 84; 85} e filmes finos⁸⁶ obtidos por sol-gel contendo európio (III) ou outros Ln(III) como centros luminescentes.

Materiais luminescentes com complexo de európio incorporado em sílica mesoporosa modificada com aminoalcoxissilano^{87; 88} também têm sido bastante discutidos na literatura (figura 10 a). Em outros trabalhos, reação de complexação de sílica modificada com grupos alcoxissilanos e sais ou quelatos de íons lantanídeos (figura 10b), tem sido investigado em diferentes substratos de sílica: sílica mesoporosa^{89; 90; 91; 92}, micropartículas⁹³ ou superfícies de sílica ou silício funcionalizadas⁹⁴. Neste último caso, uma monocamada do complexo tris(benzoilmetano)(5-amino-1,10-fenantrolina)európio (III) foi ligada covalentemente sobre uma superfície de sílica, mostrando que o procedimento sugerido pelo esquema b (figura 10) é eficiente para a preparação de dispositivo sólido luminescentes.

Figura 10: Representação de diferentes metodologias utilizadas para obter sílica luminescente com base em materiais que contenha complexos de európio (III) covalentemente ligados. a) introdução de sal ou quelato de Eu^{3+} em uma síntese de placas ou filmes finos de sílica; b) complexação de Eu^{3+} em matriz de sílica modificada organicamente.

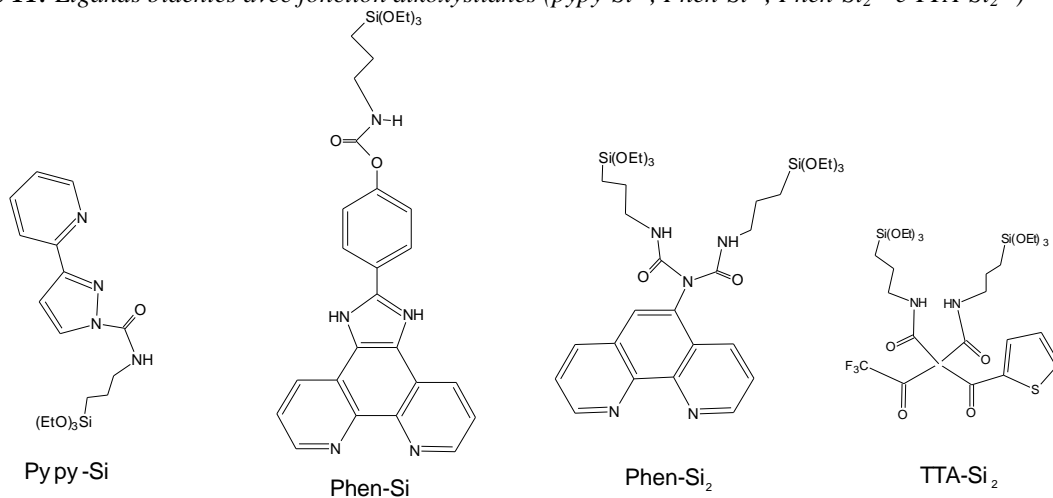
Figure 10: Représentation des différentes méthodologies utilisées pour les matériaux à base de silice et de complexes d'europium(III) lié de façon covalente (a) l'introduction d'un sel ou d'un chélate d' Eu^{3+} dans une réaction en une étape, (b) Complexation de l'ion Eu^{3+} ou d'un complexe sur une matrice de silice organiquement modifiée.



Carlos et al⁹² apresentam derivados monosililados como piridil-pirazol, PyPy-Si, para funcionalizar sílica mesoporosa MCM41, e também, Gulino et al⁹⁴ utiliza moléculas de fenantrolina modifica, Phen-Si, para ancorar na superfície de wafers de silício, como mostrado no esquema (figura 10b). Em ambos os casos a adição da função é realizada reagindo o isocianato-propiltrialcoxisilano (IPTS) com pirazol ou fenantrolina.

Zang et al⁸², mostra a reação de dois equivalentes de IPTS reagindo com o ligante, formando uma espécie com duas funções alcoxisilanos, e que é ancorada sobre filmes e superfícies vítreas pelo processo sol-gel, Phen-Si₂ mostrado na figura 11.

Figura 11: Ligantes bidentados com funções alcoxisilanos (Pypy-Si⁹², Phen-Si⁹⁴, Phen-Si₂⁹⁵ e TTA-Si₂⁹⁶).
Figure 11: Ligands bidentés avec fonction alcoxysilanes (pypy-Si⁹², Phen-Si⁹⁴, Phen-Si₂⁹⁵ e TTA-Si₂⁹⁶)



Outra vantagem na utilização de complexos com função alcoxisilanos é impedir a lixiviação do fluorocromo incorporado em nanopartículas de sílica. Li et al⁹⁷ descrevem a preparação de nanopartículas de sílica dopadas com complexos de lantanídeos, com a finalidade de utilizá-las como marcadores em bioanálise. Neste trabalho, um ligante fenantrolina modificado com um grupo aminopropiltriatoxisilano foi utilizado para posterior ancoragem na superfície da sílica.

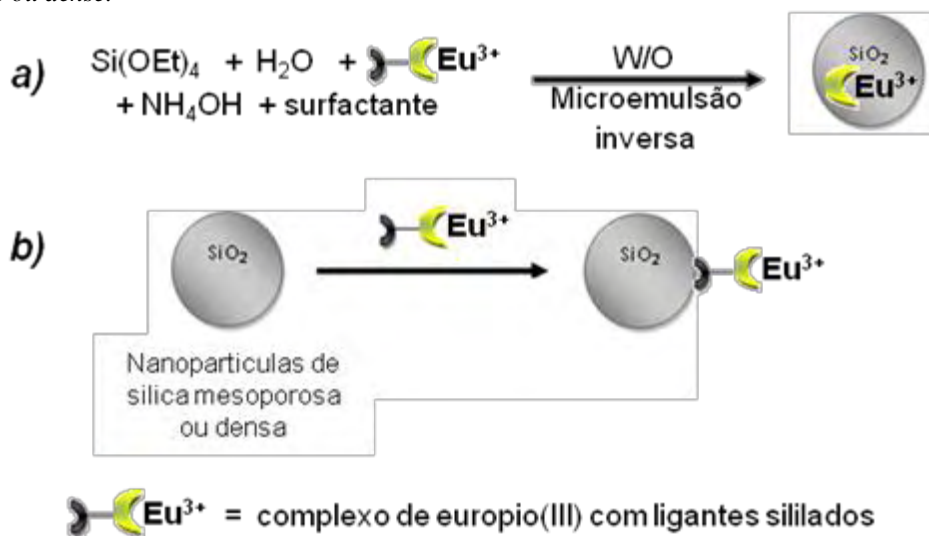
Os ligantes dicetonas como dibenzoilmetano (DBM)⁸⁹, acac^{90, 96} ou 2-tenoiltrifluoroacetona (TTA)⁹⁷ foram usados, respectivamente, por Serra e Yan para sintetizar híbridos poliméricos a base de lantanídeos. O híbrido polimérico contendo molécula TTA com duas funções alcoxisilanos (TTA-Si₂, figura 11) foi obtido pela reação de dois equivalentes de IPTES, $\text{NCO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OEt})_3$, com um equivalente de TTA. A utilização do ligante TTA-Si₂ e in-situ a formação do complexo európio, pode-se tanto observar a aglomeração e/ou lixiviação do centro emissor e verificar a dispersão homogênea das duas fases.

A síntese de complexos com ligantes que apresentam função alcoxisilanos pode ser utilizada para funcionalizar de forma homogênea o núcleo (figura 12a) ou a superfície (figura 12b) de nanopartículas de sílica. Muito poucos complexos de lantanídeos sililados foram isolados e caracterizados. Binnemans e Driesen mostram a preparação de superfície de vidro⁸³ e filmes finos⁸⁶ pela metodologia sol-gel onde suportam complexos de lantanídeos em uma distribuição homogênea, utilizando como ligante de ancoragem a 1,10-fenantrolina. Ligantes com função alcoxisilanos impedem a ancoragem não homogênea do complexo

luminescente na matriz que poderia ser responsável pela diminuição da intensidade de luminescência.

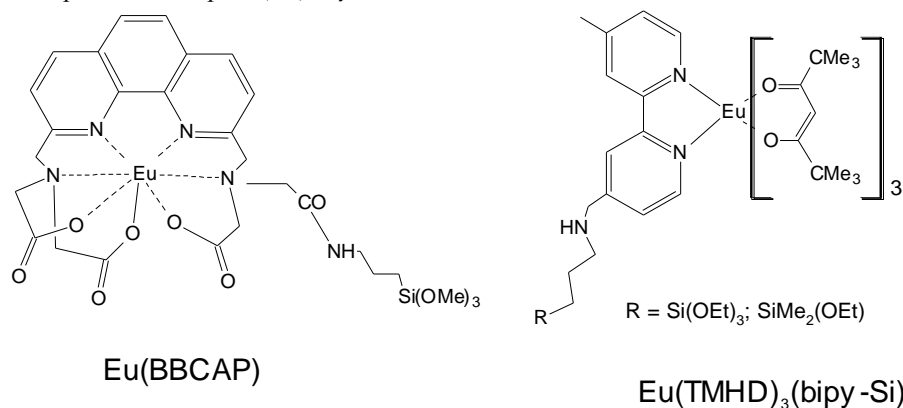
Figura 12: (a) A incorporação de complexo de Eu^{3+} sililado em uma reação tipo Stober usando o sistema microemulsão inversa (W/O); b) ancoragem de complexos de Eu^{3+} sililado na superfície de nanopartículas sílica mesoporosas ou densa.

Figure 12: (a) Incorporation de complexes silylés d'europlum(III) dans une synthèse par microemulsion inverse « Water in Oil » ; (b) Greffage de complexes d'europlum (III) silylés à la surface des nanoparticules de silice mesoporeuse ou dense.



Na figura 13 mostramos exemplos distintos de organosilanos exibindo ligantes bidentados de nitrogênio como sítio de complexação que são explorados em diferentes metodologias. Complexo de térbio e európio (III) $[\text{Ln}(\text{BBCAP})]$, foram previamente preparados, e em seguida, covalentemente incorporados em nanopartículas de sílica (40 nm), usando a metodologia de microemulsão inversa (W/O) (figura 12a)⁹⁷. Esses nanohíbridos apresentam luminescência significativa com resolução temporal, podendo ser usados em imunoenaios. Cousinié et al⁹⁸, ilustra bem a metodologia para obter nanomateriais luminescentes à base de sílica (figura 12b). Este trabalho mostra que é possível funcionalizar a superfície de nanopartículas de sílica com complexos de európio obtidos via ligantes bipyridina com função alcóxidosilanos¹⁰⁹, $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{Bpy-Si})]$ com bpy-Si igual a $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{-bpy}$ ou $(\text{EtO})(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{-Bpy}$ (figura 13). Observou-se também, que ao utilizar o ligante monoetoxisilil-dipiridina como grupo de ancoragem ocorre a formação de uma monocamada de complexo sobre a nanopartícula⁹⁸.

Figura 13: Complexos de európio(III) sililados descritos
Figure13: Complexes d'europium(III) silylés décrits



Neste contexto, esta tese apresenta a preparação de partículas de diferentes matrizes para o desenvolvimento de eficientes emissores de luz, visando a utilização como marcadores luminescentes ou sondas. A sílica pode ser preparada por diferentes metodologias, que permitem a obtenção de partículas de alguns nanômetros a microns. Devido à multifuncionalidade deste material, é possível incorporar e ancorar espécies luminescentes nestes sistemas.

A rota alternativa e original, proposta aqui, envolve a preparação prévia dos complexos de lantanídeos via ligantes que apresentem funções alcoxisilanos, com posterior incorporação ou ancoragem sobre nanopartículas de sílica. As vantagens são óbvias, já que é possível projetar o substrato previamente com qualquer tamanho, morfologia, porosidade, ou outras características ajustáveis, e após, ocorre a ligação covalente com os complexos de lantanídeos.

As β -dicetonas são conhecidas pela formação de complexos de európio estáveis e altamente luminescentes. A proposta deste trabalho foi sintetizar complexos de európio contendo o ligante sililados 2-tenoiltrifluorodiketona (TTA-Si) e $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2$ -bipy (Bpy-Si), a fim de ter um melhor controle das reações de hidrólise e condensação envolvida nos processos de ancoragem e incorporação. Os complexos de Eu^{3+} foram adicionados em sílica, envolvendo as metodologias apresentadas na figura 12.

As matrizes de sílica escolhidas neste trabalho para ancoragem dos complexos sililados foram: a sílica densa monodispersa Ludox AS-40, e uma sílica mesoporosa preparada pela metodologia de pirólise de aerossol⁹⁹. Além da metodologia de microemulsão inversa, que foi utilizada para obter partículas de sílica com complexos de európio

internalizados. A diferença dos materiais utilizados esta de acordo com o interesse de obter uma matriz com alta eficiência de luminescência para aplicações futuras.

Na utilização como marcadores em imunoenaios, foi necessária a funcionalização superficial destas partículas com espécies de reconhecimento celular ou biológico. Dentre os sistemas estudados, a utilização de anticorpos monoclonais mostrou-se promissora.

4. Noções básicas de imunologia: Anticorpos monoclonais e técnicas de quantificação

A imunologia é a ciência que estuda os mecanismos de defesa dos organismos vivos, em particular, de humanos ou outro mamífero. De uma maneira bem simples, a resposta imunológica de organismos vivos (exceto plantas) se dá pelo contato com antígenos, com produção de anticorpos. Os antígenos (substâncias imunogênicas) são capazes de desencadear reação em cadeia ativando linfócitos (glóbulos brancos) e síntese de anticorpos específicos (sistema imune humoral)¹⁰⁰.

Quando um indivíduo entra em contato com um agente imunogênico causador de doença, o sistema imunológico reage dentro da sua função de defesa produzindo uma resposta imune específica com a produção de anticorpos.

A presença de anticorpos no soro de um paciente indica que ele entrou em contato com o antígeno seja através de uma imunização ou por contato com o agente imunogênico. A detecção de anticorpos contra um determinado agente microbiológico pode ser de grande utilidade para orientar o diagnóstico. Diferentes testes sorológicos na prática clínica foram desenvolvidos para uso no diagnóstico ou também em pesquisas laboratoriais e são baseados na reação de afinidade antígeno-anticorpo. Dentre as testes sorológicos destacam-se a imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)¹⁰⁰. Na imunofluorescência indireta a reação ocorre entre os anticorpos presentes no soro infectado contra os epítomos do parasita fixado em lâmina de microscopia. É revelada a presença de anticorpos em microscopia de fluorescência com anti-IgG humana ligada a um fluorocromo. No imunoensaio ELISA o princípio é o mesmo da IFI, porém a anti-IgG humana é conjugada com uma enzima (por exemplo, enzima peroxidase) e através da adição de substrato (peróxido de hidrogênio) e cromógeno (tetrametilbenzidina) ocorre a formação de um produto solúvel colorido revelado a olho nú ou por espectrofotometria, indicando a presença de anticorpos no soro do paciente.

Os anticorpos monoclonais (**AcM**) são anticorpos de especificidade única, derivados de um único clone de linfócitos e que respondem a um único epítipo. A associação de nanopartículas a moléculas de anticorpos monoclonais permite a separação de células do sistema imunológico como linfócitos T, linfócitos B, leucócitos em geral, células-tronco hematopoéticas e recentemente a separação de células-tronco mesenquimais. A eficácia do processo pode ser avaliada pela Citometria de fluxo, quantificando-se as populações celulares isoladas com uso de monoclonais específicos às mesmas^{101; 102;103}. As técnicas de Microscopia confocal, Microscopia de fluorescência e Citometria de fluxo se destacam entre as muitas análises utilizadas para detecção e reconhecimento de materiais biológicos, pois permitem detectar a fluorescência emitida por partículas em um meio biológico.

A *Citometria de fluxo* é uma tecnologia de análise multiparamétrica qualitativa e quantitativa de partículas individualizadas, de origem biológica ou não¹⁰⁴. Este método permite verificar características físico-químicas em células ou partículas individualmente, permitindo caracterizar variações destas, permite também evidenciar e caracterizar eventos, como identificação de antígenos fixados na superfície de células ou partículas, suspensas em meio líquido, quando tratadas com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo^{105; 106}.

Outra técnica utilizada para detecção de materiais marcados é a Microscopia eletrônica de fluorescência, que permite a visualização detalhada do meio biológico. Entre elas a microscopia de varredura a laser confocal (SCLM) oferece a possibilidade de visualização detalhada de amostra microbiológica em espessura, em casos onde a microscopia de fluorescência é limitada.

2- OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de híbridos luminescentes para aplicação como sondas luminescentes.

1. Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar diferentes matrizes poliméricas orgânicas e inorgânicas ($\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ e $\text{PMMA}:[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$) e estudar suas propriedades de luminescência.
- Preparar e caracterizar complexos de európio (III) aptos a ancoragem covalente em matrizes inorgânicas e estudo das propriedades de luminescência.
- Sintetizar híbridos à base de sílica por duas diferentes metodologias:
 - Ancoragem de complexos sililados na superfície de sílica mesoporosa, preparada por pirólise de aerossol, e na superfície de sílica comercial Ludox AS-40.
 - Incorporação de complexos sililados em sílica utilizando a metodologia de microemulsão inversa (W/O).
- Funcionalização de partículas dos híbridos por duas diferentes metodologias.
 - A funcionalização específica com a adição de um anticorpo monoclonal IGg, específico ao reconhecimento das bactérias *Escherichia coli*, e posterior análise em microscopia de fluorescência.
 - A funcionalização não específica, com adição de DTP, molécula para reconhecimento de grupos N-H na superfície celular.
- Testes dos híbridos obtidos em Citometria de fluxo, microscopia confocal e microscopia de luminescência.

3- PARTE EXPERIMENTAL

1. Síntese

A pirólise de aerossóis permite a obtenção de materiais de dimensões nano e micrométricas apresentando grãos geralmente esféricos. Neste processo, cada gota do aerossol pode ser vista como um micro reator homogêneo, com a mesma composição química da solução inicial.

No processo de pirólise de aerossol, existem três etapas distintas: a geração de aerossol, a sua pirólise e a recuperação do material final.

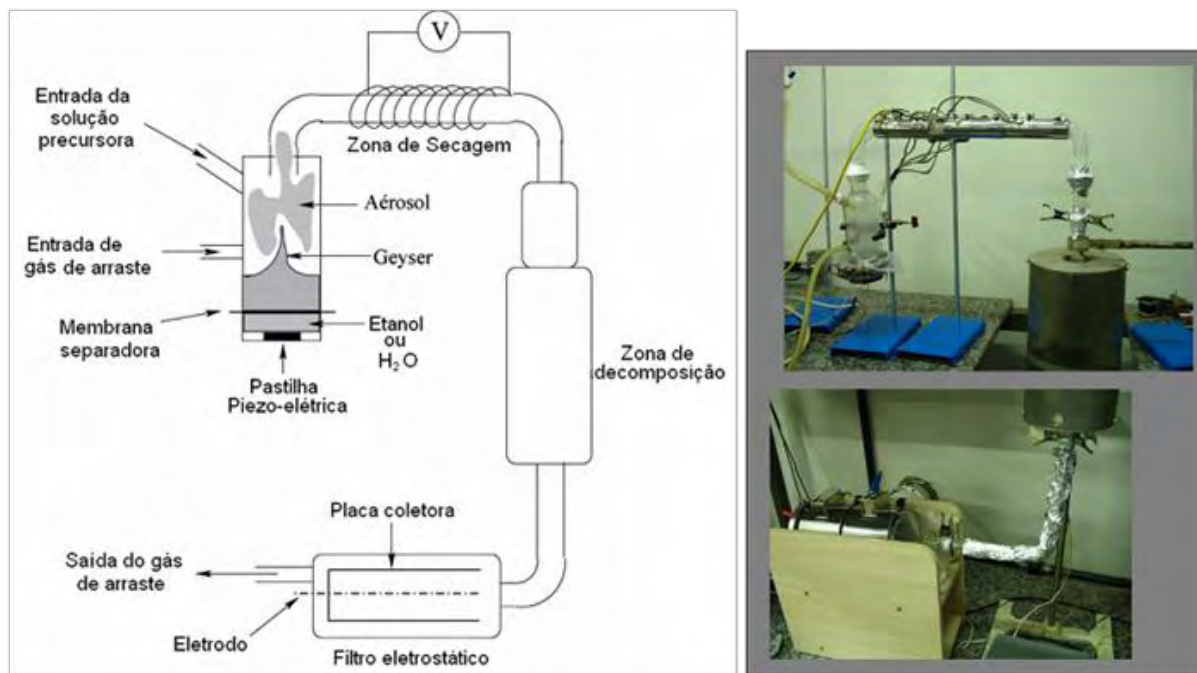
O aerossol é gerado a partir de nebulização por ultra-som, pela ação de uma pastilha piezoelétrica na solução do precursor (figura 14). A propagação das ondas geradas faz aparecer uma sucessão de ondas de compressão e dilatação no interior do líquido, levando ao fenômeno de cavitação. O conjunto de processos leva a formação de um “géiser” e consequentemente micro gotas são ejetadas da superfície do líquido originando o aerossol. O fenômeno de cavitação depende, principalmente, da frequência ultra-sonora, da tensão superficial do solvente, da viscosidade e da temperatura da solução a ser nebulizada^{10; 107; 108}.

Na segunda etapa o aerossol gerado é carregado por um fluxo de gás (geralmente ar) através das zonas de tratamento térmico. A primeira região é conhecida por zona de secagem. Durante esta etapa com temperatura baixa (da ordem de 130°C) o solvente da solução precursora é evaporado para gerar um precipitado inicial. Na segunda região (zona de decomposição), de temperatura mais elevada (600-1000°C), o precipitado inicial é transformado no produto final.

Na terceira e última etapa, para a recuperação dos pós é utilizado um filtro eletrostático, trabalhando com uma diferença de potencial de 12 kV.

Figura 14: (Esquerda) Esquema do sistema de pirólise de aerossol; (direita) Foto do sistema de pirólise de aerossol do Instituto de Química-Unesp

Figure 14: (À gauche) Schéma du système de pyrolyse d'aérosol, (à droite) Photo du système de pyrolyse d'aérosol installé à l'Institut de chimie-UNESP



Uma vantagem da pirólise de aerossol é a relativa simplicidade do processo, que permite a obtenção de materiais em maiores escalas. Todos reagentes devem ser solúveis, estáveis e coexistirem em razões estequiométricas apropriadas na solução precursora. As soluções precursoras podem ser produzidas a partir de materiais de baixo valor comercial, como os acetatos e nitratos^{10; 107; 109}.

Neste trabalho utilizou-se a metodologia de pirólise de aerossol para a preparação de partículas de alumina e sílica contendo európio. As soluções precursoras foram adicionadas ao nebulizador (figura 14) de modo que o nível da solução na câmara de nebulização fosse mantido constante. A nebulização foi gerada por uma pastilha piezoelétrica (2,4 MHz e 30W) e o *spray* formado carregado a fluxo constante de ar em torno de 0,83 L.min⁻¹ através do sistema, passando inicialmente pela zona de secagem a 130°C. Após a secagem, o spray passou pela zona de decomposição (T= 600- 850°C), e o pó obtido foi coletado com o auxílio de um filtro eletrostático, trabalhando com uma diferença de potencial de 12 kV.

1.1 Preparação da solução precursora para obtenção das partículas de alumina

O precursor utilizado na obtenção das nano e micropartículas de alumina foi uma solução de cloreto de alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,2 mol/L preparada a partir de 50 mmol (12,07 g) de AlCl_3 (QUIMIS) em 250 mL de água destilada. Para a obtenção de partículas de Al_2O_3 dopadas com Eu^{3+} nas proporções de 5% do íon lantanídeos (mol/mol, em relação ao Al^{3+}) ao precursor foi previamente adicionado 10 mL solução de EuCl_3 (0,5 mol/L). A solução foi adicionada no sistema de pirólise de aerossol (temperatura de decomposição= 850°C) e recuperado o pó de alumina ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$). Quantidade Obtida: 1,5 g. Rendimento: 75%. Infravermelho (KBr, cm^{-1}): 3450 $\nu(\text{OH})$; 1645 $\delta(\text{OH})$; 1380 $\nu(-\text{O}-\text{Al}-\text{O}-)$; 750-500 $\delta(\text{Al}-\text{O})$. Tamanho médio: 550±1600 nm. BET: 430 m^2/g .

1.2 Preparação da solução precursora para obtenção das partículas de partículas de sílica

O precursor utilizado na obtenção das nano e micropartículas de sílica foi uma solução de tetraetilortosilicato (TEOS) 0,2 mol/L preparada a partir de 20 mmol (4,45 mL) de TEOS (Alfa Aesar) em uma mistura água : etanol (90/10 mL). Na obtenção da solução dopada com íons Eu^{3+} , foi adicionada à solução 2,0 mL de EuCl_3 (0,50 mol/L) necessária para a obtenção de sílica dopadas com as proporções de 5% do íon lantanídeos (mol/mol, em relação ao silício). A solução foi adicionada no sistema de pirólise de aerossol (temperatura de decomposição = 800°C) e recuperado o pó de sílica. Quantidade Obtida = 800mg. Rendimento = 67%. Infravermelho (KBr, cm^{-1}): 3.440 $\nu(\text{OH})$; 1640 $\delta(\text{OH})$ 1.180 $\nu_{as}(\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-)$; 818 $\delta(\text{Si}-\text{O})$. Tamanho médio: 650± 1800nm. BET: 320 m^2/g .

1.3 Preparação da solução precursora para a preparação de sílica mesoporosa

Segundo a rota de L. A. Rocha et al^{99; 109}, a solução precursora foi obtida pela homogeneização do 68 mmol (14,16 mL) de TEOS (Alfa Aesar) em uma solução de 5,5 mol (100mL) de água e 0,38 mol (22 mL) de etanol (pH = 1,2, com HCl) contendo 11 mmol (4 g) de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Alfa Aesar). A solução foi adicionada no sistema de pirólise de aerossol (temperatura de decomposição = 650°C) e recuperado o pó obtido foi de sílica mesoporosa. Quantidade Obtida: 3,5g. Rendimento: 85%. Infravermelho

(KBr, cm^{-1}): 3476 $\nu(\text{OH})$; 1640 $\delta(\text{OH})$; 1.185 $\nu_{\text{as}}(\text{Si-O-Si-})$; 965 $\delta(\text{Si-O})$; 800 $\delta(\text{Si-O})$; 465 $\delta(\text{Si-O-Si})$. Tamanho médio: 600 ± 2100 nm. BET: $860 \text{ m}^2/\text{g}$. V_p : $0,42 \text{ cm}^3/\text{g}$.

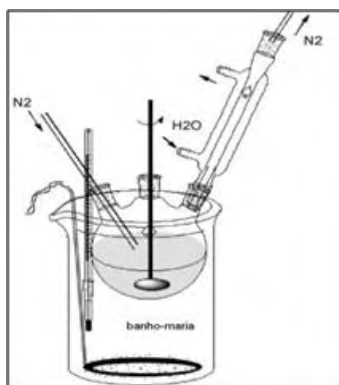
1.4 Síntese das esferas de polimetil-metacrilato (PMMA) dopadas com o complexo $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$

As esferas de PMMA foram sintetizadas pela adição de 93 mmol (10 mL) de metilmetacrilato (Aldrich) adicionado em 100 mL de água destilada e 0,93 mmol (0,798 g) de $[\text{Eu}(\text{TTA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ em um balão de três bocas. A mistura foi levada a refluxo a temperatura de $\sim 100^\circ\text{C}$ sob agitação mecânica de rotação ~ 280 rpm em atmosfera de nitrogênio (figura 15). Após a mistura entrar em ebulição foi adicionado lentamente 0,36 mmol (0,1 g) de persulfato de potássio (Aldrich). A reação foi interrompida após 2 horas com adição de uma solução 0,05% de hidroquinona, e a emulsão foi colocada em banho de gelo. Em seguida as esferas foram separadas do meio reacional através de sucessivas centrifugações e lavagem com água. Obteve-se partículas de $\text{PMMA}:[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$. Rendimento= 64%.

Infravermelho (KBr, cm^{-1}): 3013-2833 $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$; 1734 $\nu(\text{C=O})$, 1450 $\delta_s(\text{C-H})$. Tamanho médio: 450 ± 50 nm.

Figura 15: Esquema do sistema para preparação das esferas de PMMA.

Figura 15: Schéma du réacteur utilisé pour la préparation de sphères de PMMA.



1.5 Síntese do ligante 4-metil-4'-(n-trietoxissililpropil)amino- metil- 2,2'-bipiridina (Bipy-Si)

A síntese do ligante foi realizada em três etapas:

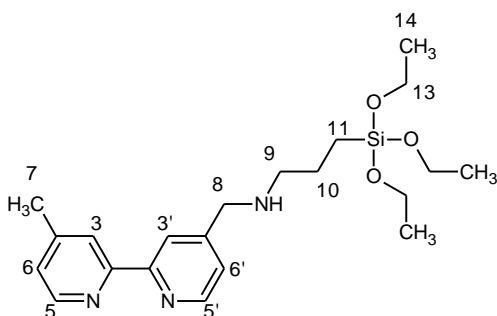
1º etapa: obtenção do aldeído: Em um balão, foi adicionado 100 mL de dioxano (PROLAB), 13,8 mmol (2,53 g) de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Fluka), e 13,8 mmol (1,52 g) de óxido de selênio (Acros), a solução foi mantida sob agitação por 24 horas sob refluxo e atmosfera de nitrogênio, e após filtrada a quente. O filtrado foi deixado em repouso por uma hora, filtrado novamente e evaporado o solvente. O pó obtido foi dissolvido em 300 mL de acetato de etila (Acros) e adicionado em um funil de separação. A extração foi realizada uma vez com 50 mL de uma solução de carbonato de sódio à 0,1 mol/L (Acros), e depois três vezes com uma solução de bissulfito de sódio à 0,2 mol/L (Acros) a pH5. A solução aquosa recuperada é baseificada a pH9, e o aldeído extraídos com 100 mL de diclorometano (Acros). O solvente foi evaporado.

2º etapa: adição do grupo trietoxissilano: 3 mmol (0,6 g) do aldeído foram adicionados em 50 mL de clorofórmio anidro. Adicionou-se 3 mmol (0,644 mL) de 3-aminopropiltrietoxissilano (Aldrich). A solução foi mantida sob agitação por 3 horas em temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio. Após esse período, o solvente foi evaporado.

3º etapa- redução da imina: 4,8 mmol (1,95 g) da imina foram adicionados em 100 mL de etanol anidro. Adicionou-se 14 mmol (0,52 g) de borohidreto de sódio (Acros) e a solução foi mantida sob agitação por 18 horas a temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio. O solvente foi evaporado e o óleo foi adicionado a um funil de separação com 50 mL de água destilada, três extrações com 50 mL de diclorometano foram realizadas. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ (Acros), filtrada e evaporado o solvente. O Ligante Bpy-Si foi obtido na forma de um óleo amarelo.

Rendimento: 87%, Quantidade Obtida: 1,69 mg. Infravermelho (KBr, cm⁻¹): 3308

ν(N-H); 2928 ν_{as}(CH₂,CH₃); 1595,1555 ν(C=C)_{bpy}; 1269 ν(Si-C); 1076 ν(Si-O-C); 958 δ(Si-O). ¹H NMR (300,18 MHz, δppm, CDCl₃): 0,67 (m, 2H, CH₂ (11)); 1,23 (t, 9H, CH₃ (13)); 1,63 (m, 2H, CH₂ (10)); 2,40 (s, 3H, CH₃ (7)); 2,60 (m, 2H, CH₂ (9)); 3,72 (q, 6H, CH₂ (12)); 3,84 (s, 2H, CH₂ (8)); 7,14 (d, 1H, CH (5')); 7,35 (d, 1H, CH (5)); 8,24 (s, 1H, CH (3')); 8,33



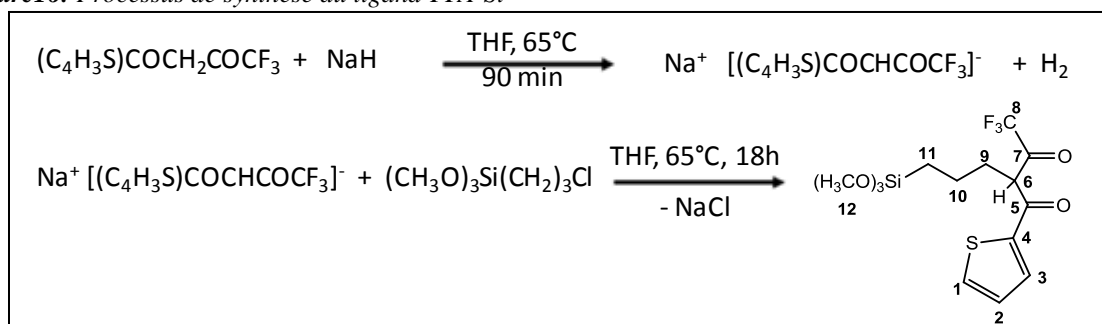
(s, 1H, CH (3)); 8,54 (d, 1H, CH (6')); 8,62 (d, 1H, CH (6)). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (75,5 MHz, δ ppm, CDCl_3): 7,9 (1C, CH_2 , (11)); 18,3 (3C, CH_3 , (14)); 21,2 (1C, CH_3 , (7)); 23,4 (1C, CH_2 , (10)); 52,3 (1C, CH_2 , (9)); 53,4 (1C, CH_2 , (8)); 58,2 (3C, CH_2 , (13)); 120,4 (1C, CH , (3')); 122,0 (1C, CH , (5')); 124,1 (C, CH , (5)); 125,1 (1C, CH , (3)); 148,1 (1C, CH , (5')); 149 (1C, CH , (6')); 142,5 (1C, CH , (6)); 150,8 (1C, (4)); 156,0, 156,3 (2C, C, (2,2')). SM (EI): 403 $[\text{M}]^+$. UV-visível: 383nm ($\epsilon=44400 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 259nm ($\epsilon=47050 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

1.6 Síntese do ligante 4,4,4-trifluoro-2-(3-(trimetoxi-silil)propil)-1-(2-tenoil)-1,3-butanodieno (TTA-Si).

2 mmol (444.36 mg) de 2-tenoiltrifluoro-acetonato (TTA) (Aldrich) foi adicionado em 20 mL de tetrahidrofurano anidro sob agitação, e 2 mmol (48 mg) de anidrido de sódio (Fluka). A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 90 minutos. Então, 2 mmol (371 μL) de 3-cloropropiltrimetoxisilano (Aldrich) foi adicionado gota a gota, sobre a solução e a mistura foi agitada sob refluxo e atmosfera de nitrogênio durante 18 horas. O solvente foi evaporado e o produto foi solubilizado em éter etílico e filtrado. A solução resultante foi evaporada, e o composto TTA-Si ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{O}_5\text{SSi}$, MW: 384.44) foi recuperado (figura 16).

Figura 16: Processo de síntese do ligante TTA-Si

Figure 16: Processus de synthèse du ligand TTA-Si



Rendimento: 87 %. Quantidade Obtida; 662 mg. Análise elementar $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{O}_5\text{SSi}$, %, experimental (teórico): C 43.62 (43.69), H 4.83 (4.98), S 8.27 (8.32). Infravermelho (KBr, cm^{-1}): 3104 $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$; 2995 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 2877 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 1620 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1535 e 1516 $\nu(\text{C}-\text{O}, \text{C}-\text{C})$; 1501, 1481, 1415 e 1355 $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{S} \text{ tenoil})$; 1280 $\nu(\text{CF}_3)$; 1244 $\nu(\text{C}-\text{Si})$; 1191 e 1180 $\delta(\text{Si}-\text{O}-\text{CH}_3)$; 1149 $\nu(\text{Si}-\text{O})$; 1059 $\delta(\text{O}-\text{CH}_3)$; 933 $\delta(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 861 $\delta(\text{CH}_3)$; 785 $\delta(\text{CH} \text{ tenoil})$; 712 e 702 $\delta(\text{CF}_3)$. ^1H NMR (δ ppm, CDCl_3): 0.78 (m, 2H, CH_2 (11)); 1.89 (m, 2H, CH_2 (10)); 3.40 (m, 2H, CH_2 (9)); 3.68 (s, 9H, CH_3 (12)); 6.22 (t, 1H, CH (6));

7.06 (d, 1H, CH (2)); 7.55 (d, 1H, CH (1)); 7.67 (d, 1H, CH (3)). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (δ ppm, CDCl_3): 5.30 (s, CH_2 , (10)); 23.83 (s, CH_2 , (11)); 44.00 (s, CH_2 , (9)); 49.61 (s, CH_2 , (12)); 90.24 (s, CH, (6)); 117.19 (q, $^1\text{JC-F}=293$ Hz, CF_3 , (8)); 127.29 (s, CH tenoil, (3)); 129.64 (s, CH tenoil, (2)); 132.50 (s, CH tenoil, (1)); 148.05 (s, C tenoil (4)); 169.13 (q, $^2\text{JC-F}=31.9$ Hz, CO, (7)); 181.89 (s, CO, (5)). SM (FAB): $m/z = 385$ [M^+]; UV-visível (acetonitrila): 270 nm ($\epsilon = 14.050$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$), 339 nm ($\epsilon = 32.800$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$).

1.7 Síntese do composto $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$

Para a preparação do composto $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ utilizamos a metodologia de Melby et al¹¹⁰. Em um balão de fundo redondo, mantido a temperatura de 18°C, foram adicionados, nessa ordem, 18,75 mL de etanol (Acros), 3,9 mmol (0,86 g) de 2-tenoiltrifluoroacetato (TTA) (Aldrich), 15 mmol (0,450 mL) de amônia (32%, Acros), 1,3 mmol (0,47 g) de cloreto de európio hexahidratado (Aldrich) em 30 mL de água. Após a adição dos reagentes, o balão foi fechado, para evitar a evaporação da amônia, e a reação foi conduzida durante 3 horas a temperatura ambiente. Após este período, o balão contendo a suspensão foi submetido ao choque térmico por 5 minutos, em seguida, a filtração. O pó obtido foi solubilizado em 2 mL de acetona e precipitado em 20 mL de água gelada. O produto foi obtido na forma de um pó amarelo ($\text{EuC}_{24}\text{H}_{19}\text{F}_9\text{O}_8\text{S}$ MM: 854,55). Rendimento: 80%. Quantidade Obtida: 889 mg. Análise Elementar ($\text{EuC}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_8\text{F}_9\text{S}_3$): experimental (teórico)%: C 33,85(33,62); H 1,89 (1,26); Infravermelho(KBr, cm $^{-1}$): 3410 $\nu_{\text{as}}(\text{OH})$; 3090 $\nu_{\text{as}}(\text{CH})$; 1654 $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$; 1578, 1520, 1407 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1358 $\nu_{\text{as}}(\text{C-F})$; 680 $\delta(\text{C-F})$; 456 $\nu(\text{Eu-O})$. SM (FAB): 856[M^+]. UV-Visível (acetonitrila): 268nm ($\epsilon = 16000$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$), 338nm ($\epsilon = 50400$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$).

1.8 Síntese do composto $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{Bpy-Si})]$, $[\text{Eu1}]$ e $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy-Si})]$, $[\text{Eu2}]$

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados, nessa ordem, 20 mL de diclorometano anidro, 0,5 mmol (202 mg) de Bpy-Si, e 0,5 mmol (350 mg) de complexo $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3]$ (Aldrich) para a preparação do $[\text{Eu1}]$ e 0,5 mmol (428 mg) de $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ para a preparação do $[\text{Eu2}]$. Após a adição dos reagentes, o balão foi fechado, e a reação foi conduzida durante 3 horas a temperatura ambiente e atmosfera de

nitrogênio. Após este período, o solvente foi evaporado a metade e adicionado 20 mL de pentano para precipitar o complexo.

O complexo [Eu1] foi obtido na forma de um pó bege ($\text{EuC}_{53}\text{H}_{88}\text{N}_3\text{O}_9\text{Si}$; MM: 1105.36). Rendimento: 54%. Quantidade Obtida; 295 mg. Análise Elementar ($\text{EuC}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_3\text{O}_9\text{Si}$): experimental (teórico)%: C 58,50 (58,68); H 6,56 (8,21); N 3,84 (3,80). Infravermelho (KBr, cm^{-1}): 3360 $\nu_{\text{as}}(\text{NH})$; 1975 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 2863 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 1578 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N} \text{ anel})$, 1222 $\nu(\text{Si}-\text{C})$; 1089 $\nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 962 $\delta(\text{Si}-\text{O})$; 790 $\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$; 580 $\nu(\text{Eu}-\text{N})$. SM (FAB): m/z 922 [M-TMHD]; 702 [M-Bpy-Si]; 519 [M-(TMHD+Bpy-Si)]; UV-Vis (acetonitrila): 250 nm ($\epsilon = 21.400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); 283 nm ($\epsilon = 39.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

O complexo [Eu2] foi obtido na forma de um pó amarelo ($\text{EuC}_{45}\text{H}_{41}\text{F}_9\text{O}_9 \text{ N}_3\text{S}_3\text{Si}$ MM.1215.05). Rendimento: 62%; Quantidade Obtida: 377 mg. Análise Elementar ($\text{EuC}_{45}\text{H}_{48}\text{O}_9\text{N}_3\text{F}_9\text{S}_3\text{Si}$): experimental (teórico): C: 43,90 (44,08); H: 3,82 (3,95); N: 3,40 (3,43). Infravermelho (KBr, cm^{-1}): 3431 $\nu_{\text{as}}(\text{NH})$; 3090 $\nu_{\text{as}}(\text{CH})$; 1627 $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$; 1578, 1520, 1407 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1357 $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{F})$; 682 $\delta(\text{C}-\text{F})$; 456 $\nu(\text{Eu}-(\text{Bpy}-\text{Si}))$, 1578 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N} \text{ aromático})$, 1222 $\nu(\text{Si}-\text{C})$; 1089 $\nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 962 $\delta(\text{Si}-\text{O})$; 790 $\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$. SM (FAB): 1109 [M- ($\text{C}_9\text{H}_{21}\text{O}_3\text{Si}$)]; 996 [M-[TTA]]. UV-Vis (acetonitrila): 270 nm ($\epsilon = 29.250 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 337 nm ($\epsilon = 53.950 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

1.9 Síntese do complexo [Eu(TTA-Si)₃], [Eu3]

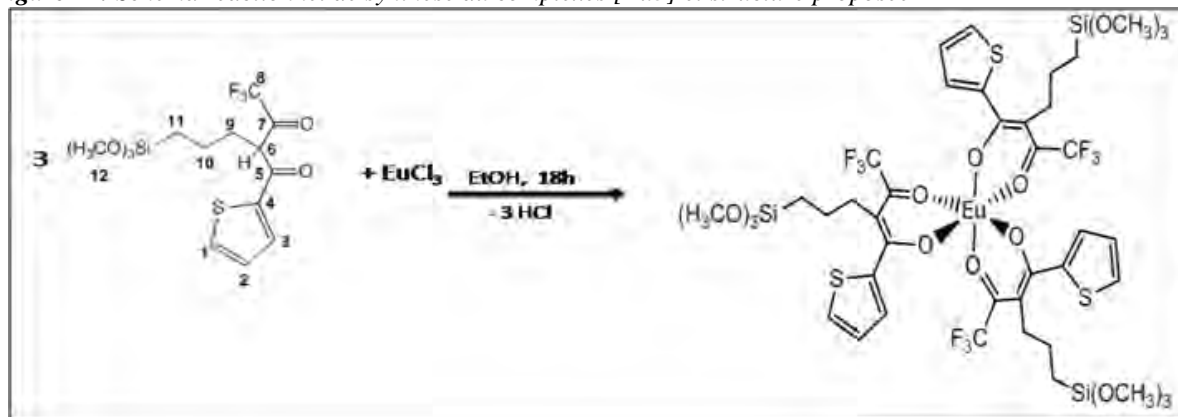
6 mmol (2.30 g) de TTA-Si e 2 mmol (0.732 g) de cloreto de európio hexahidratado (Aldrich) foram adicionados em 20 mL de etanol anidro. A mistura foi agitada sob atmosfera de nitrogênio por 18 horas. O solvente foi evaporado e o pó lavado com pentano, éter etílico e seco a vácuo (figura 17).

O complexo [Eu(TTA-Si)₃] ($\text{EuC}_{42}\text{H}_{54}\text{F}_9\text{O}_{15}\text{S}_3\text{Si}_3$, MM: 1302.27) foi obtido na forma de um pó bege. Rendimento: 76 %; Quantidade Obtida: 1,98 g. Análise Elementar ($\text{EuC}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_{15}\text{F}_9\text{S}_3\text{Si}_3$)% experimental (teórico): C 38.20 (38.76), H 3.98 (4.18), S 7.29 (7.38). Infravermelho (KBr, cm^{-1}): 3109 $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$; 2977 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 2875 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 1627 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1533 e 1520 $\nu(\text{C}=\text{O}, \text{C}=\text{C})$; 1505, 1485, 1414 e 1355 $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{S} \text{ tenoil})$; 1285 $\nu(\text{CF}_3)$; 1241 $\nu(\text{C}-\text{Si})$; 1184 $\nu(\text{Si}-\text{O}-\text{CH}_3)$; 1144 $\nu(\text{Si}-\text{O})$; 1058 $\rho(\text{O}-\text{CH}_3)$; 932 $\delta(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 860 $\delta(\text{CH}_3)$; 783 $\delta(\text{CH}-\text{tenoil})$; 723 $\delta(\text{CF}_3)$.

SM (FAB): m/z 1303 $[M^+]$; UV (acetonitrila) 275 nm ($\epsilon = 33.400 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 342 nm ($\epsilon = 41.350 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Figura 17: Síntese do complexo [Eu3] e proposição da estrutura.

Figure 17: Schéma réactionnel de synthèse du complexes [Eu3] et structure proposée



1.10 Síntese do complexo [Gd(TTA)₃(Bpy-Si)]

Este complexo foi obtido como na metodologia descrita para o [Eu2]. A adição de 0,5 mmol (202 mg) de Bpy-Si e 0,5 mmol (0.410 g) de [Gd(TTA)₃(H₂O)₂]. O complexo foi recuperado na forma de pó amarelo. Rendimento: 69%. Análise elementar (GdC₄₅H₄₈O₉N₃F₉S₃Si)% experimental (teórico): C 43,90 (44,08), H 3,82 (3,95), N 3,43 (3,40). Infravermelho (KBr, cm⁻¹): 3410 $\nu_{\text{as}}(\text{NH})$; 3090 $\nu_{\text{as}}(\text{CH})$; 1654 $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$; 1578, 1520, 1407 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1358 $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{Cl})$; 680 $\delta(\text{C}-\text{Cl})$; 456 $\nu(\text{Gd}-\text{L})$. SM (FAB): $[M^+]=1228$.

1.11 Síntese do complexo [Gd(TTA-Si)₃]

Este complexo foi obtido como na metodologia descrita para o [Eu3]. A adição de 6 mmol (2.30 g) de TTA-Si e 2 mmol (0.742 g) de cloreto de gadolínio hexahidratado. O complexo Ga(TTA-Si)₃ (GdC₄₂H₅₄F₉O₁₅S₃Si₃, MW: 1307,56) foi obtido na forma de um pó amarelo. Rendimento: 78 %. Análise elementar (GdC₄₂H₅₄O₁₅F₉S₃Si₃), % experimental (teórico): C 37.70 (38.55), H 3.87 (4.16), S 7.32 (7.34). Infravermelho (KBr, cm⁻¹): 3109 $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$; 2957 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 2878 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 1627 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1537 e 1517 $\nu(\text{C}=\text{O}, \text{C}=\text{C})$; 1500, 1479, 1415 e 1353 $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{C}=\text{S} \text{ tenoil})$; 1280 $\nu(\text{CF}_3)$; 1243 $\nu(\text{C}-\text{Si})$; 1191 $\delta(\text{Si}-\text{O}-\text{CH}_3)$; 1133 $\nu(\text{Si}-\text{O})$; 1057 $\delta(\text{O}-\text{CH}_3)$; 933 $\delta(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 860 $\delta(\text{CH}_3)$; 786 $\delta(\text{CH} \text{ tenoil})$; 705 $\delta(\text{CF}_3)$.

SM (FAB): m/z 1308 [M^+]. UV-visível (acetonitrila): 286 nm ($\epsilon = 24150 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 339 nm ($\epsilon = 52750 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

1.12 Ancoragem de complexos luminescentes em nanopartículas de sílica mesoporosa e LUDOX AS-40

A notação utilizada para o complexo ancorado na superfície de sílica Ludox AS-40 é $\text{SiO}_2\text{-[complexo]}$ para a sílica mesoporosa é $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[complexo]}$. A eficiência de ancoragem (R) é calculada a partir das porcentagens de nitrogênio e enxofre obtido por análise elementar equação 21 (item 2.1)

Para a ancoragem dos complexos tanto em sílica mesoporosa quanto sílica Ludox AS-40, foi utilizado o mesmo procedimento. Inicialmente 500 mg de Ludox AS-40 (200 mg de sílica) ou 200 mg de sílica mesoporosa foram suspensos em 20mL de etanol anidro. Em uma segunda etapa, os complexos solubilizados em etanol anidro foram adicionados nas quantidades: [Eu1] (200 mg; 0,18 mmol); [Eu2] (200 mg; 0,16 mmol) e [Eu3] (200 mg; 0,15 mmol) para cada síntese. A mistura permaneceu sob agitação constante por 72 horas à temperatura de 22°C . A suspensão resultante foi dializada por 72 horas e o sólido foi isolado por centrifugação a 15.000 rpm por 15 minutos. Os sólidos obtidos foram lavados com etanol, diclorometano, éter etílico e seco à vácuo por 2 horas.

SiO₂-[Eu1]- Quantidade Obtida: 175mg. R = 0.26 mmol/g. Análise Elementar: % experimental (teórico): C 16,42 (16,82), H 2,95 (2,33), N 1,09 (1,09). **SiO_{2meso}-[Eu1]**- Quantidade Obtida: 180 mg. R = 0.52 mmol/g. Análise Elementar: % experimental (teórico): C 32,91 (33,63), H 5,08 (4,67), N 2,18 (2,18). DRIFT para ambos: 1632 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1539 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N} \text{ anel})$, 1231 $\nu(\text{Si}-\text{C})$; 1227-1050 $\nu(\text{Si}-\text{C}) + \nu(\text{Si}-\text{O}) + \nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 958 $\delta(\text{Si}-\text{O})$ e 803 $\delta(\text{Si}-\text{O})$.

SiO₂-[Eu2]- Quantidade Obtida: 168 mg. R = 0.30mmol/g. Análise Elementar: % experimental (teórico): C 16,36 (16,20), H 2,46 (1,23), N 1,26 (1,26). **SiO_{2meso}-[Eu2]**- Quantidade Obtida: 170 mg. R = 0.64 mmol/g. Análise Elementar: % experimental (teórico): C 32,95 (34,45), H 3,07 (2,61), N 2,68 (2,68). DRIFT para ambos: 1629 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1414 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1238-1050 $\nu(\text{Si}-\text{C}) + \nu(\text{Si}-\text{O}) + \nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 940 $\delta(\text{Si}-\text{O})$ e 796 $\delta(\text{Si}-\text{O})$.

SiO₂-[Eu3]- Quantidade Obtida: 182 mg; R = 0.21 mmol/g. Análise Elementar: % experimental (teórico): C 7,85 (10,58), H 1,58 (1,13), S 2,02 (2,01) **SiO_{2meso}-[Eu3]** Quantidade Obtida: 175 mg. R = 0.41 mmol/g. Análise Elementar: % experimental (teórico):

C 18.48 (20.66), H 2.07 (2.21), S 3.93 (3.93). DRIFT para ambos: 1630 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1414 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1230-1050 $\nu(\text{Si}-\text{C}) + \nu(\text{Si}-\text{O}) + \nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 950 $\delta(\text{Si}-\text{O})$ e 800 $\delta(\text{Si}-\text{O})$.

1.13 Incorporação de complexos luminescentes em nanopartículas de sílica

Para o complexo incorporado em sílica utilizaremos a notação $\text{SiO}_2@[\text{complexo}]$.

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados, nessa ordem, 20 mL de ciclohexano (SDS), 3 mL n-octanol (Acros), 4,6 mL TX100 (Acros), 4 mL de água. 20 mg de complexo ([Eu1]: 0,02 mmol; [Eu2]: 0,016 mmol; [Eu3]: 0,016 mmol), foram dissolvidos em 2 mL de n-octanol e adicionados na mistura. Posteriormente 266 μL de TEOS (Acros), e 160 μL amônia (32%, Prolab), a TEOS e a amônia foram adicionadas gota à gota, e a mistura foi mantida sob agitação a temperatura de 22°C por 24 horas. Após esse período a microemulsão foi interrompida com a adição de 100 mL de acetona, e as partículas foram recuperadas por centrifugação. Esse material foi lavado exaustivamente com etanol, água e éter.

$\text{SiO}_2@[\text{Eu1}]$ - Quantidade Obtida: 145 mg. R= 0.31 mmol/g; Análise Elementar % experimental (teórico): C 18,43 (19,68), H 3,29 (2,78), N 1,30 (1,30). DRIFT (cm^{-1}): 2980 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 2878 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 1630 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1414; $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1230-1050 $\nu(\text{Si}-\text{C}) + \nu(\text{Si}-\text{O}) + \nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 950 $\delta(\text{Si}-\text{O})$ e 800 $\delta(\text{Si}-\text{O})$.

$\text{SiO}_2@[\text{Eu2}]$ - Quantidade Obtida: 156 mg. R = 0.31 mmol/g. Análise Elementar % experimental (teórico): C 15,98 (16,69), H 2.48 (1,27), N 1,30 (1,30). DRIFT (cm^{-1}): 2980 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 2878 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ 1640 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1414 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1230-1050 $\nu(\text{Si}-\text{C}) + \nu(\text{Si}-\text{O}) + \nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 950 $\delta(\text{Si}-\text{O})$ e 800 $\delta(\text{Si}-\text{O})$.

$\text{SiO}_2@[\text{Eu3}]$ - Quantidade Obtida: 161 mg. R= 0.12 mmol/g, Análise Elementar % experimental (teórico): C 4.68 (6.05), H 1.48 (0.64), S 1.14 (1.14). DRIFT (cm^{-1}): 2980 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$; 2878 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ 1630 $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1414 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$; 1230-1050 $\nu(\text{Si}-\text{C}) + \nu(\text{Si}-\text{O}) + \nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 950 $\delta(\text{Si}-\text{O})$ e 800 $\delta(\text{Si}-\text{O})$.

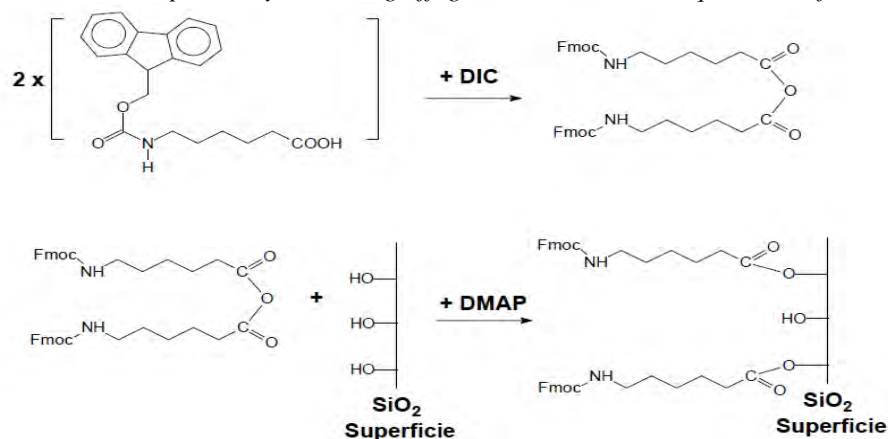
As metodologias utilizadas para funcionalização dos híbridos $\text{SiO}_2-[\text{Eu2}]$, $\text{SiO}_{2\text{mes}}-[\text{Eu2}]$, $\text{SiO}_2@[\text{Eu3}]$, $\text{SiO}_2-[\text{Eu3}]$, $\text{SiO}_{2\text{mes}}-[\text{Eu3}]$ e $\text{SiO}_2@[\text{Eu3}]$ são descritas a seguir. A metodologia de reconhecimento específica foi possível graças a utilização do anticorpo monoclonal IGg, específico do reconhecimento das bactérias *Escherichia coli*.

1.14 Adição do aminoácido na superfície das nanopartículas $SiO_2:[Eu]-Fmoc$

Foram adicionados 0,3 mmol (0,107 g) de Fmoc- ϵ -Ahx-OH (NOVA BIOCHEM) em 5 mL de diclorometano (QUIMIS). A mistura foi resfriada a 0°C em banho de gelo e adicionou-se 0,15 mmol (24 μ L) de N,N'-diisopropilcarbodiimida (FLUKA), a mistura permaneceu sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o solvente foi evaporado e o produto foi solubilizado em 2 mL de dimetilformamida (QUIMIS). Essa solução foi adicionada sobre 80 mg de partículas já ambientadas em DMF, em seguida adicionou-se 0,48 mol (4 mg) de 4-dimetilamina-piridina (FLUKA). A mistura ficou em agitação por 24 horas. Após esse período, as partículas foram lavadas exaustivamente, primeiramente com DMF e em seguida com água, e secas em um liofilizador por 12 horas (figura 18).

Figura 18: Síntese de ancoragem do aminoácido bloqueado na superfície da sílica luminescente.

Figura 18: Schéma réactionnel pour la synthèse de greffage de l'aminoacide bloqué à la surface de la silice.



1.15 Determinação do grau de incorporação de aminoácidos na superfície das nanopartículas

1.15.1. Análise qualitativa- Teste de anidrina (teste Kaiser)

Teste qualitativo para caracterizar os grupos N-H livres.

Solução A: Preparada a partir de 2 mL de uma solução de cianato de potássio em 98 mL de piridina;

Solução B: Preparada a partir de 5 g de ninidrina em 100 mL de etanol;

Solução C: Preparada a partir de 80 g de fenol em 20 mL de etanol.

Na amostra previamente separada em um tubo de ensaio, adicionou-se nesta ordem: duas gotas da solução **A**, duas gotas da Solução **B** e duas gotas da Solução **C**. A mistura foi aquecida por 5 minutos a 120°C. E a mudança na coloração da suspensão indicará a presença (cor azul) ou não (cor amarela) de grupos N-H livres.

1.15.2. Análise quantitativa- Dosagem de Fmoc por Ultravioleta-visível

Para obter o grau de incorporação do aminoácido nas partículas pesou-se 1,7 mg da amostra do híbrido e adicionou-se 1 mL de piperidina (FLUKA), que é base responsável pela liberação do grupo Fmoc. A solução resultante foi analisada em espectrofotômetro. A concentração em função da quantidade de partículas lavadas é dada pela equação (19)

$$\text{Grau de Incorporação} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{1,65 \times m_{\text{g amostra}}} \quad (20)$$

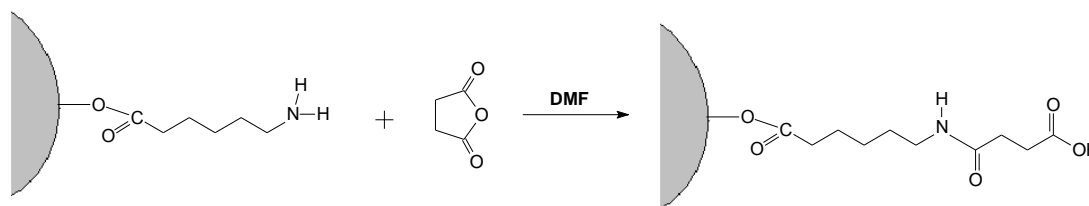
1.16 Crescimento da estrutura do grupo espaçador via reação com anidrido glutárico $\text{SiO}_2\text{:}[Eu]\text{-Ami-glu}$

70 mg das partículas previamente preparadas, $\text{SiO}_2\text{:}[Eu]\text{-Fmoc}$, foram dispersas em piperidina 20% (v/v em DMF) e mantidas sobre agitação por 30 minutos, seguido de lavagem (com DMF, 5 vezes) e centrifugação (etapa necessária para remover o grupo protetor Fmoc). O sólido final, de massa conhecida, foi redisperso em 5 mL de DMF e neste meio, sob agitação, foi adicionado o anidrido glutárico na proporção de 1 grupo amina para cada 4 moléculas de anidrido glutárico adicionados. A proporção utilizada neste trabalho foi obtida a partir do grau de incorporação do aminoácido bloqueado sobre as partículas (procedimento 1.15.2), por exemplo, $\text{SiO}_2\text{:}[Eu]\text{-Fmoc}$ apresenta 98 μmol de aminoácido por grama de partícula, sendo assim, em 100 mg do sistema $\text{SiO}_2\text{:}[Eu]\text{-Fmoc}$ foi adicionado 4,5 mg de anidrido glutárico (figura 19).

O meio reacional foi mantido sob agitação por 24 horas e na sequência as partículas foram lavadas em DMF, centrifugadas (5 vezes) e secas à temperatura ambiente sob pressão reduzida.

Figura 19: Esquema da proposta de reação do anidrido glutárico frente ao aminoácido sobre a superfície da partícula.

Figure 19: Schéma réactionnel du couplage de l'anhydride glutarique avec l'aminocide à la surface de la particule.



1.17 Funcionalização dos Híbridos via proteína A

65 mg dos híbridos *SiO₂:[Eu]-Ami-glu* foram dispersos em 2,5 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH=7,0). Foram adicionados sob agitação 5 mg de EDC [N-etil-N-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida] como catalisador da reação entre os grupos carboxílicos proveniente do anidrido glutárico e da proteína A. Finalmente, ainda sob agitação branda, foi adicionada a proteína A, em excesso (125 mg), previamente dispersa em 1 mL de tampão PBS (pH=7,0). A reação foi mantida por 2 horas e 30 minutos, seguida de centrifugação, lavagem com H₂O (3 vezes) e secagem à vácuo por 12 horas.

1.18 Imobilização do Anticorpo IgG1 sobre as partículas luminescentes previamente funcionalizadas com proteína A

50 mg dos híbridos foram redispersos em 4 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH=7,0) e mantido sobre agitação lenta. Foram adicionados 0,37 mg do anticorpo IgG1, específico do reconhecimento das bactérias *Escherichia coli*, previamente disperso em 1 mL de PBS (pH=7,0). A incubação foi mantida por 4 horas, seguida de centrifugação e lavagem com H₂O (2 vezes). O material final foi redisperso em uma solução tampão PBS (pH=7,0) e mantida a temperatura de -20⁰C.

A metodologia de adição do grupo de reconhecimento não específica, DTP, foi utilizado para marcar células de mastócito de ratos para testes em Citometria de fluxo.

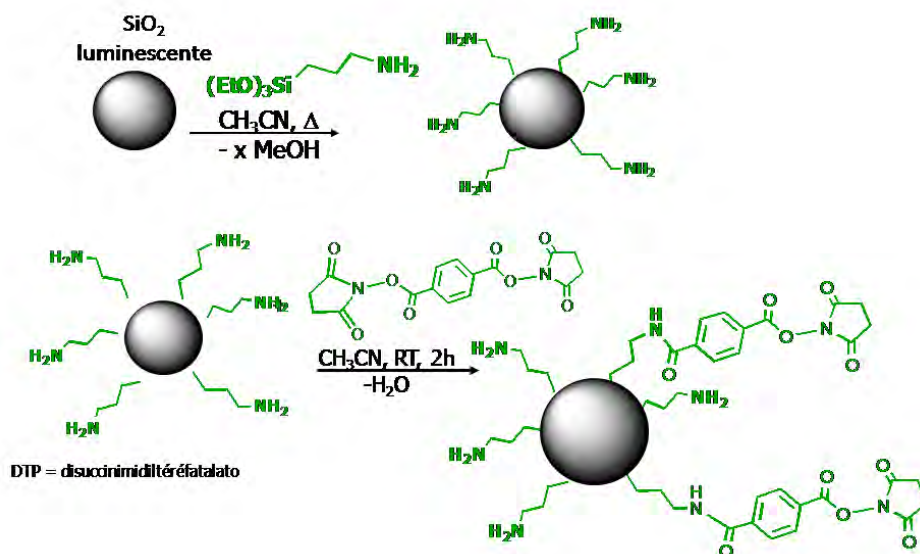
1.19 Adição de APTS na superfície do híbrido

50 mg das híbridos previamente preparados foram adicionadas em 25 mL de acetonitrila anidro. Em seguida adicionaram-se 4,6 mmol (1 mL) de aminopropiltrietoxissilano (Aldrich). Após a adição dos reagentes a mistura foi aquecida a 50°C durante 24 horas. O material foi centrifugado, lavado três vezes com etanol, duas vezes com éter e seco a vácuo.

1.19.1. Adição de DTP

45 mg do material resultante foi disperso em 30mL de acetonitrila e adicionado 0,15 mmol (52 mg) de DTP (ACROS) (figura 20), a mistura foi mantida sob refluxo e agitação durante 2 horas, centrifugada e lavada (três vezes, acetonitrila, três vezes THF, duas vezes etanol).

Figura 20: Esquema da síntese de funcionalização não específica das nanopartículas luminescentes.
Figura 20: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation des nanoparticules de silice luminescentes.



SiO₂-[Eu1]-NH-DTP Quantidade Obtida: 30 mg. R= 0.40 mmol/g; **SiO₂-[Eu2]-NH-DTP** Quantidade Obtida: 35 mg. R = 0.03 mmol/g; **SiO₂-[Eu3]-NH-DTP** Quantidade Obtida: 25 mg. R= 0.40 mmol/g; **SiO₂@[Eu1]-NH-DTP** Quantidade Obtida: 30 mg. R = 0.50 mmol/g; **SiO₂@[Eu2]-NH-DTP** Quantidade Obtida: 28 mg. R = 0.06 mmol/g. **SiO₂@[Eu3]-NH-DTP** Quantidade Obtida: 36 mg. R = 0.07 mmol/g.

2. Métodos de Caracterização

2.1. Análise Elementar

As análises de C, H, N, S foram realizadas no serviço de microanálise do Laboratório de controle ENSIACET de Toulouse no equipamento Elementary Analyser EA 1110 de Thermoquest (com um erro relativo 0,3% e um limite de detecção de 0,6% para o carbono, 0,3% para o hidrogênio e 0,5% para o nitrogênio).

Para os cálculos de eficiência de ancoragem ou incorporação (mmol de complexo/grama de sílica) consideramos a porcentagem experimental de nitrogênio ou enxofre obtido partir dos resultados de análise elementar.

$$R_N = \frac{\%N}{14 \times 100} \times \frac{10^3}{n_N} \quad \text{ou} \quad R_S = \frac{\%S}{32 \times 100} \times \frac{10^3}{n_S} \quad (21)$$

n_N n_S é igual ao número de nitrogênio e enxofre do complexo.

2.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho e espectroscopia eletrônica no Ultravioleta-visível

Os espectros foram registrados no espectrofotômetro Nicolet FT-IR 400 na região de 1400– 400nm, com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando a técnica de pastilha em KBr (proporção composto: KBr de 1:100 e pressão de 10.000 Pounds). E no espectrômetro Bruker Vector 22 acoplado a um software OPUS.

Os espectros na região do infravermelho por refletância difusa foram realizados no serviço comum de infravermelho na Université Paul Sabatier de Toulouse por C. Routaboul. Para esta técnica o aparelho utilizado foi um espectrômetro Perkin-Elmer 1760 X com um detector DTGS.

Os espectros na região do ultravioleta-vísivel foram obtidos em um espectrômetro Varian UV-Visible Cary 1 e acoplado a um software CarryWin UV. A solução com concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ foi introduzida em uma cubeta de quartzo de dimensões (3x1x1cm).

2.3. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram registrados no espectrômetro BRUKER Avance 300 ($n= 300,18$ MHz para o ^1H , e $75,5$ MHz para o ^{13}C) do serviço comum de RMN da Université Paul Sabatier de Toulouse. O deslocamento químico é dado em ppm e são dados em relação ao sinal do solvente deuterado (CD_3OD e CDCl_3).

2.4. Espectroscopia de massas

Os espectros de massa foram registrados por C. Claparols et col. Os aparelhos utilizados dependem das análises requeridas. Esta depende da natureza, massa e carga da amostra.

Para o FAB, o equipamento é um NERMAG R10-10 (simples quadrupolo), equipado com uma fonte FAB (Fast Atom Bombardment). A matriz utilizada para mobilização da amostra foi o álcool 3-nitrobenzílico chamado MNBA e o que permite excitar este último uma lâmpada de xenônio.

Para a ionização química (IQ) foi utilizado um espectrômetro TSQ 7000 Thermo Quest.

2.5. Microscopia eletrônica de varredura de transmissão

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em um microscópio field-emission scanning electron microscope JEOL JSM-6700F FEG. As amostras foram preparadas com a dispersão das partículas em etanol, e uma gota desta suspensão foi adicionada no porta-amostra. Após seca realizou-se a metalização com platina (80mA/30seg).

E também no microscópio JEOL JEM 200 CX, as amostras observadas foram preparadas em deposição de alguns miligramas de pó sobre uma pastilha e após seco, foram metalizadas com carbono (80 mA/60seg).

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada num microscópio Philips - CM20. Na preparação, as amostras foram suspensas em etanol e depositadas em grades de cobre utilizadas como suporte.

2.6. Luminescência

Os espectros de emissão e excitação foram obtidos a temperatura ambiente no equipamento Jobin-Yvon modelo Fluorolog FL3-22 spectrometer equipado com um fotomultiplicador R928 Hamamatsu e uma lâmpada de excitação Xe 450-W. As bandas espectrais são selecionadas por monocromadores, e cada conjunto de duas fendas motorizadas, a abertura pode ser continuamente variável de 0 a 7 mm. O software utiliza um detector de Referência (um fotodiodo), que recebe uma fração da luz incidente e permite a padronização do sinal de fluorescência em comparação com a intensidade de excitação recebida. A referência é muito útil para corrigir flutuações da lâmpada no tempo (longo prazo) e para aquisições de espectros de excitação. Medidas de decaimento de emissão com o tempo foi obtido com o mesmo equipamento, usando uma lâmpada de Xe pulsada (largura de banda de 3 μ s).

2.7. Difração de raio-X

Foram obtidos difratogramas de raio-X dos compostos, pelo método de pó, no intervalo de 4 a 80°(0,05/1s) usando radiação K α de cobre, em um aparelho Siemens D-5000.

2.8. Superfície específica

A superfície específica foi obtida em um aparelho Micromeritics Flowsorb II 2300 por M-C. Barthélémy do laboratório CIRIMAT.

As amostras foram aquecidas a 50°C sob vácuo por 4 horas, para retirar todas as moléculas de água absorvidas. Em seguida é introduzido nitrogênio na célula, e este se condensa na superfície da amostra. O equipamento faz medidas de pressão antes e depois da introdução do gás. Após varias medidas é possível determinar a quantidade de gás adsorvido na superfície da amostra e determinado a sua superfície específica (BET-Brunauer-Emmett-Teller)

3. Técnicas de detecção dos híbridos

3.1. Microscópio de Varredura confocal: Nanopartículas em Biofilme bacteriano

As microscopias do biofilme foram registradas em um microscópio de varredura confocal LAICA SP2 é equipado com uma câmera de diferentes feixes de laser. O laser Ar é utilizado para excitações à 458 e 488 e o laser GreNe (Green Neon) é utilizado para excitações à 543nm. Os espelhos dicromaticos utilizados, o DD488/543 ou DD458/514 são escolhidos em função do comprimento de onda de excitação. E uma objetiva com imersão em água (63 x 1,2 NA) é utilizada para a observação direta do biofilme. Todas as aquisições são realizadas de modo sequencial.

Os biofilmes bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* foram preparados por L. Mauline (USP). As amostras foram preparadas coma adição dos híbridos SiO₂-[Eu²⁺] e SiO₂-[Eu³⁺] sobre os biofilmes. Após 12 horas, esse biofilme foi lavado para retirar as partículas não incorporadas e analisados no microscópio confocal.

3.2. Microscópio de Varredura confocal : Excitação multifoton

As microscopias e espectros multifóton foram realizados no "Toulouse Réseau Imagerie" no Laboratório IPBS (Toulouse, France) por Serge Mazère. Em um Microscópio invertido LSM710 através de uma objetiva de imersão em água 40x NA 1,30 e software Zen (Carl Zeiss, Inc.). A excitação multifoton foi realizada a partir de um laser Chameleon femto segundos120 (Coherent, Inc). As amostras foram adicionadas entre lamina de vidro e analisadas no equipamento descrito.

3.3. Microscópio de Fluorescência

O microscópio de Fluorescência DMRXE Leica com DFC300F Xn usando uma câmera Leica Image Manager de 50 software. A excitação foi realizada a 365±5 nm, e a luminescência é registrada sobre todo o espectro visível, entre 400-800.

Para a análise foi utilizado uma colônia de *E. coli* retirada do meio de cultura BHI ágar ("Brain HeartInfusion", Sigma-Aldrich) e ressuspendida em BHI líquido (Sigma-Aldrich). Após crescimento no meio de cultura, foi retirada uma alíquota e preparado um

esfregação a seco em lâmina de vidro. Após secagem à temperatura ambiente, foi realizada a fixação do esfregão em lâmina com auxílio de chama. Sobre os esfregaços de bactérias foram adicionadas as amostras de partículas com (item 1.6.5) e sem modificações (item 1.5) em diferentes diluições (1-1; 1-10; 1-20; 1-50) empregando o meio RPMI-1640 (“Roswell Park Memorial Institute” - meio de cultura, série 1640, Sigma Aldrich) acrescido de antibióticos e nutrientes (RPMI-1640-C). Após incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, as lâminas foram suficientemente lavadas (três vezes) com solução RPMI-1640-C. Com a secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram analisadas em Microscópio de Fluorescência.

3.4. Citometria de Fluxo

O aparelho utilizado é um Citômetro de fluxo BD LSR II, com quatro lasers alinhados que permitem a aquisição até dez cores. Os lasers são fixos e a detecção é um sistema de espelhos, que coletam a fluorescência e transformam em sinais. Com isso o sinal é registrado em 1 μ s e a duração do percurso entre os lasers é de 20 μ s.

Amostras:

Híbridos- 0,2mg da amostra preparadas anteriormente (item 1.5.1; 1.5.2; 1.7.2) foram dispersas em soro fisiológico e mantidas sob agitação por 5 minutos. Após esse tempo as partículas

Células: Híbridos- Os híbridos foram adicionados sobre uma solução de soro fisiológico contendo células de mastocitos de rato a temperatura de 4°C. Após 2 horas este material foi analisado no citômetro de fluxo.

**4- PROPRIEDADES DE LUMINESCÊNCIA
DO EURÓPIO EM DIFERENTES MATRIZES
POLIMERICAS INORGÂNICAS E
ORGÂNICAS**

1. Óxidos de alumínio e silício contendo európio (III) obtidos por Pirólise de Aerossóis, $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ e $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$

A vantagem da metodologia de pirólise de aerossol é a relativa simplicidade do processo, que permite a obtenção de materiais em maiores escalas. Todos reagentes devem ser solúveis, estáveis e coexistirem em razões estequiométricas apropriadas na solução precursora. Além de que, as soluções precursoras podem ser produzidas a partir de materiais de baixo valor comercial, como os acetatos e nitratos^{10; 107; 109}.

A preparação de partículas de sílica ou alumina dopadas com európio, por diferentes metodologias, é comum e existem diversos trabalhos publicados.

Segundo Kato et al.¹¹¹ é possível a formação de uma mistura de microesferas sólidas ou ocas de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, dependendo da solução precursora utilizada. Vallet-Regi et al.¹¹² investigaram os tipos estruturais de alumina sintetizadas a partir de cloreto, sulfato, nitrato de alumínio. A metodologia empregada nestas referencias foi o método combustão e Pechini.

A metodologia de pirólise de aerossol foi a escolhida para esse trabalho, a partir de uma solução precursora cloreto de alumínio obteve-se esferas de γ -alumina contendo 5% de európio. No sistema de pirólise, as temperaturas de 150°C e 850°C foram utilizadas na primeira e segunda zonas de secagem, respectivamente.

A alumina dopada com íons Eu^{3+} foi obtida diretamente ao final do processo, sem a necessidade de etapas de purificação ou tratamento térmico posterior. Como ilustrado no difratograma de raios - X obtido para a amostra (figura 21), os picos de difração ($2\theta = 45,5^\circ$ e 67°) caracterizaram a fase γ -alumina¹¹¹. Segundo Brito et al.¹¹³ os picos largos estão relacionados a uma estrutura cúbica desordenada predominantes na γ -alumina.

O espectro de absorção na região do infravermelho (figura 22) apresenta bandas na região de $870\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ referentes as deformações dos grupos Al-O alumina. São observadas também *bandas* na região de $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ referente às ν_s e $\nu_{as}\text{OH}$. Na região de $1630\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ observam bandas referentes a deformação da ligação H-O-H($\delta\text{H-O-H}$).

Figura 21: Difratoograma de raio-X de pó para a alumina, $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ obtida por pirólise de aerossol.

Figure 21: Diffractogramme de Rayons-X de la poudre d'alumine obtenue par pyrolyse d'aérosol $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$

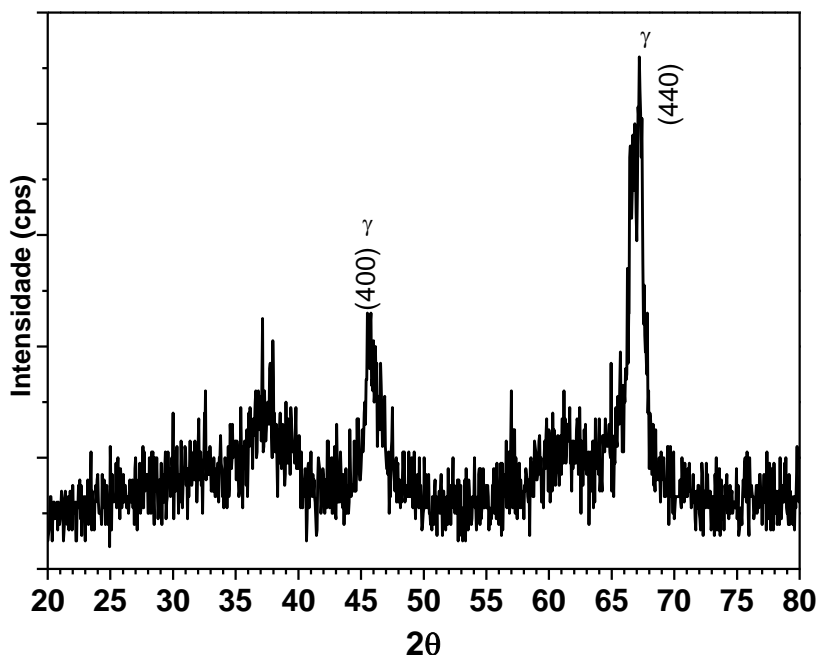
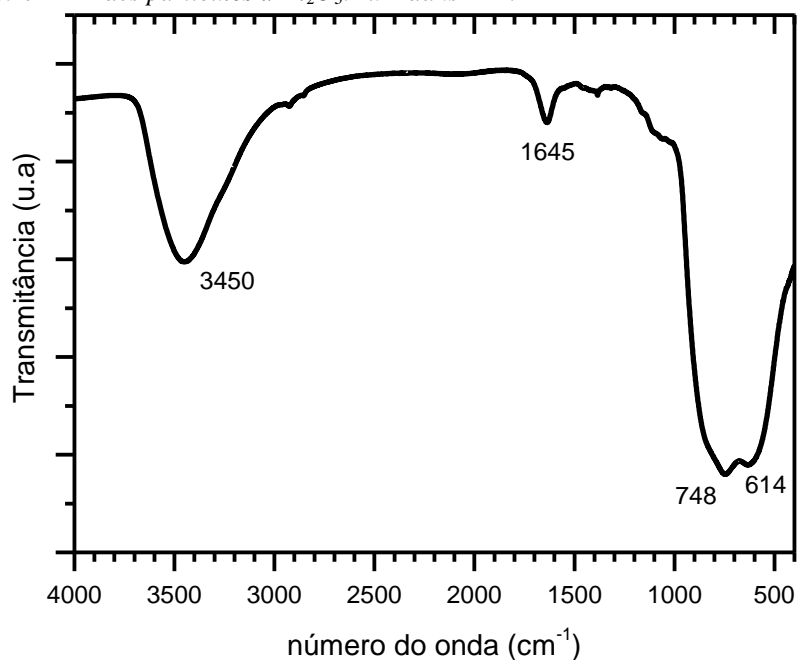


Figura 22: Espectro na região do infravermelho para as partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ dispersas em KBr.

Figure 22: Spectre IRTF des particules d' $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ dans KBr.



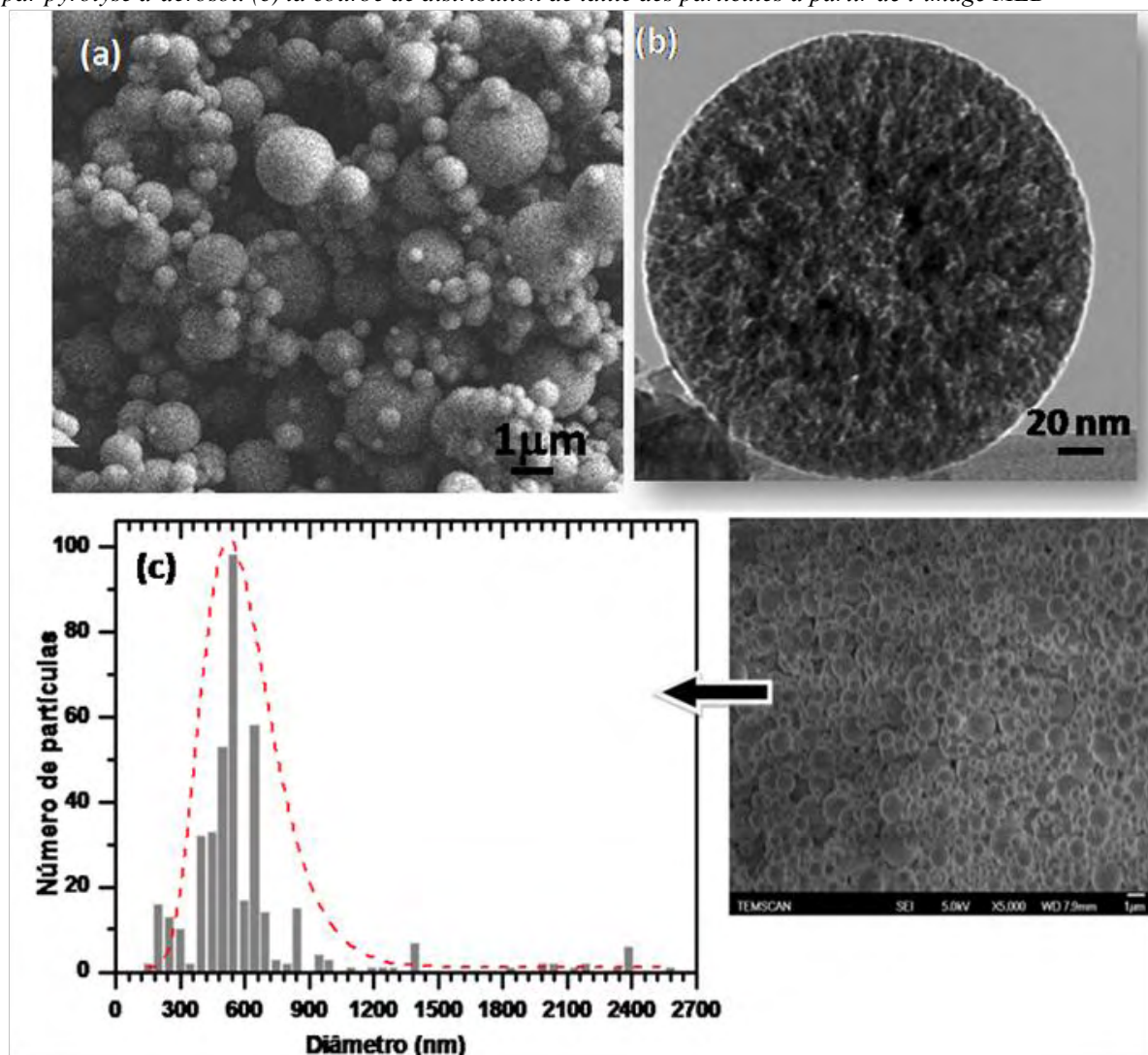
Uma das características da metodologia de pirólise de aerossol é o controle da morfologia das partículas a partir da solução precursora, sendo possível obter partículas densas, porosas ou ocas¹¹⁴ As aluminas obtidas nesse trabalho foram caracterizadas por

microscopia eletrônica de varredura (a) e transmissão (b), figura 23, apresentando a formação de esferas porosas com distribuição não homogênea de diâmetros.

Na figura 23 (c) está a distribuição de tamanho das esferas, onde o eixo y representa o número de partículas ($n_{\text{total}} = 300$) e o eixo x o diâmetro em nanômetros, obtido a partir de imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observam-se partículas esféricas uniformes de dimensões entre 0,1 e 2,5 μm , com um tamanho médio de cerca de 550 nm e a superfície específica de $430\text{m}^2/\text{g}$. foi medida por BET.

Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura (a) e transmissão (b) das partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ obtidas por pirólise de aerossol. (c) Curva de distribuição de tamanho de partículas obtida a partir da imagem de MEV. A linha tracejada mostra um ajuste tentativo obtido com uma função de distribuição do tipo log-normal usualmente observada e distribuições de tamanhos de partículas

Figure 23: Microscopie électronique à balayage (a) et transmission (b) des particules d'alumine obtenues par pyrolyse d'aérosol. (c) la courbe de distribution de taille des particules à partir de l'image MEV

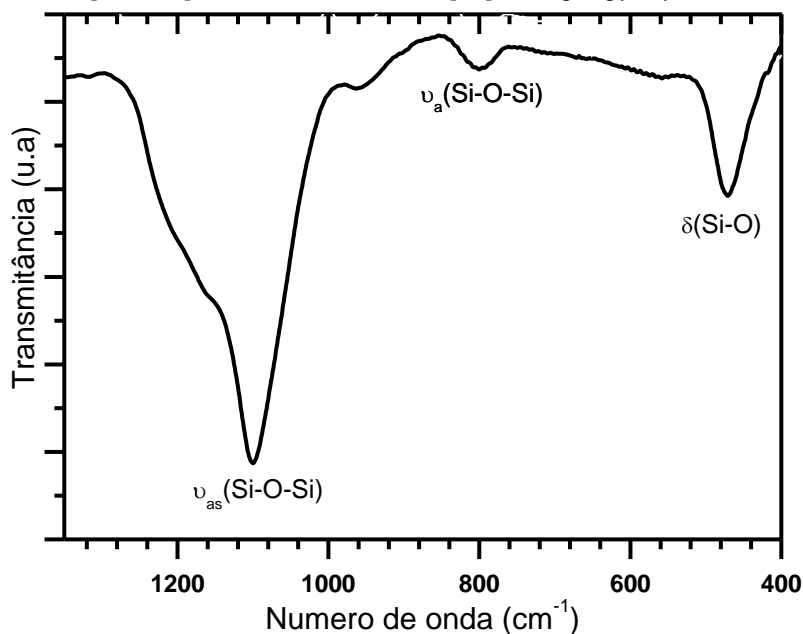


Para a obtenção de partículas de sílica, via pirólise de aerossol, optou-se por utilizar uma solução de TEOS em água e etanol dopada com 5% de európio como solução precursora. Diferente da alumina, nesse sistema as temperaturas para a primeira e segunda zonas de secagem foram 150°C e 800°C.

A análise do espectro vibracional na região do infravermelho (figura 24) para as partículas de sílica apresenta bandas características aos modos vibracionais relacionados às ligações presentes na sílica. Os principais modos de vibracionais observados foram em 1080 e 1160 cm^{-1} relativo ao estiramento assimétrico das ligações Si-O-Si do SiO_4 , a banda a 810 cm^{-1} é relativa ao estiramento simétrico da ligação Si-O e a banda a 471 cm^{-1} que está relacionada ao modo de vibração de deformação Si-O^{115; 116}.

Figura 24: Espectro na região do infravermelho as partículas de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ preparadas por pirólise de aerossol.

Figure 24: Spectre IRTF pour les particules de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ préparées par pyrolyse d'aérosol

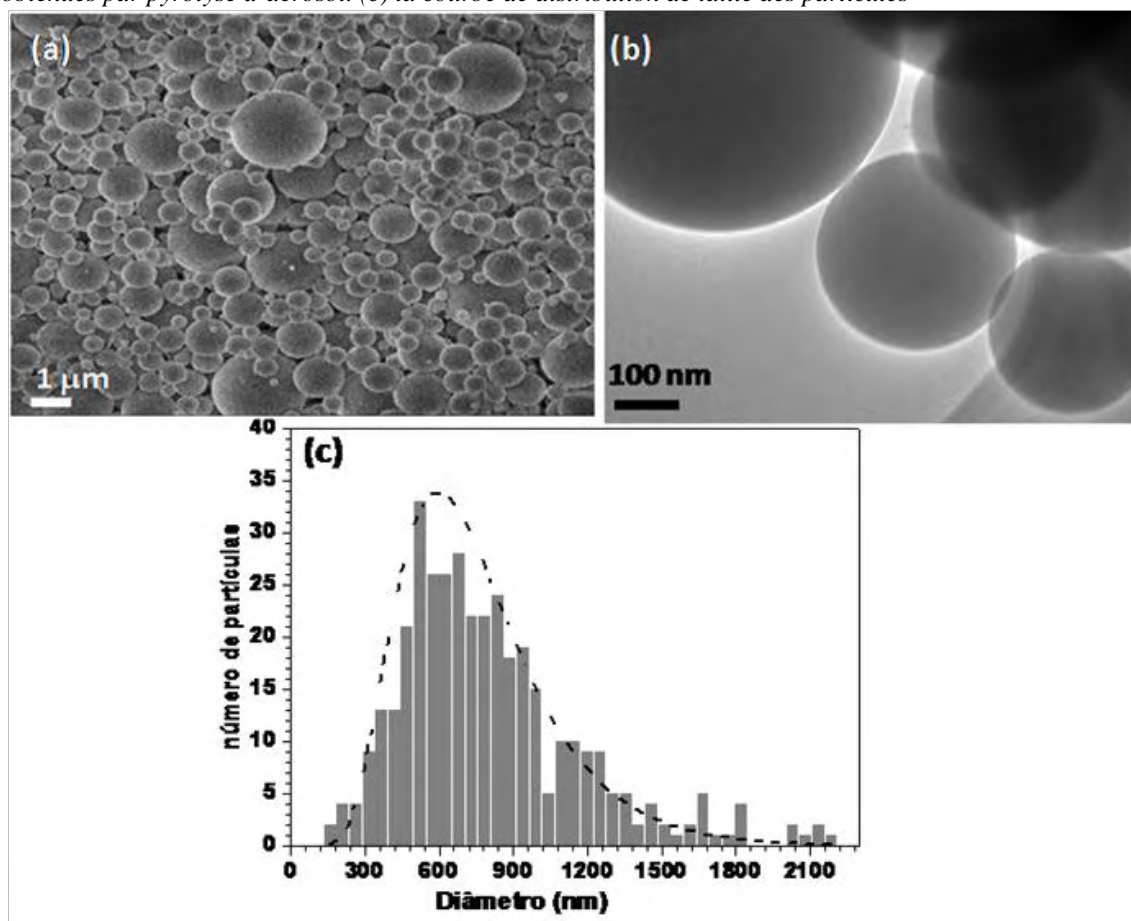


Como esperado para a metodologia de síntese empregada, as partículas de sílica foram obtidas com morfologia esférica, ver imagens de MEV e MET (figura 25) e larga dispersão de diâmetros (tamanho médio igual a 650nm). Diferente das partículas de alumina, as imagens de MET para a $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ indicam que estas são aparentemente densas. Via medidas de adsorção e desorção de nitrogênio, a superfície específica foi de 320 m^2/g . Cabe ressaltar que não é evidente via microscopias a presença de poros nessas partículas, a porosidade em partículas obtidas por pirólise de aerossol é algo comum, uma

vez que no rápido processo de síntese não é possível a completa coalescência e densificação dos núcleos formadores da partícula, neste caso específico, existe o adicional da temperatura da zona de secagem ser considerada baixa (800°C) para uma matriz de sílica. A dificuldade de obter partículas densas de SiO₂, via coalescência de partículas menores, por pirólise pode ser exemplificado pelo trabalho de Caiut et. al¹¹⁷ neste trabalho utilizou-se como precursor uma suspensão de Ludox AS-40 (sílica nanoparticulada comercial) obtendo partículas esféricas de tamanhos variados, compostas por nanopartículas de 25 nm.

Figura 25: Fotos de Microscopia eletrônica (a) MEV (b) MET de partículas de SiO₂:Eu³⁺ preparada por pirólise de aerossol. (c) Curva de distribuição de tamanho de partículas de sílica obtida a partir da imagem de MEV.

Figure 25: Microscopie électronique à balayage (a) et transmission (b) des particules de SiO₂:Eu³⁺ obtenues par pyrolyse d'aérosol. (c) la courbe de distribution de taille des particules

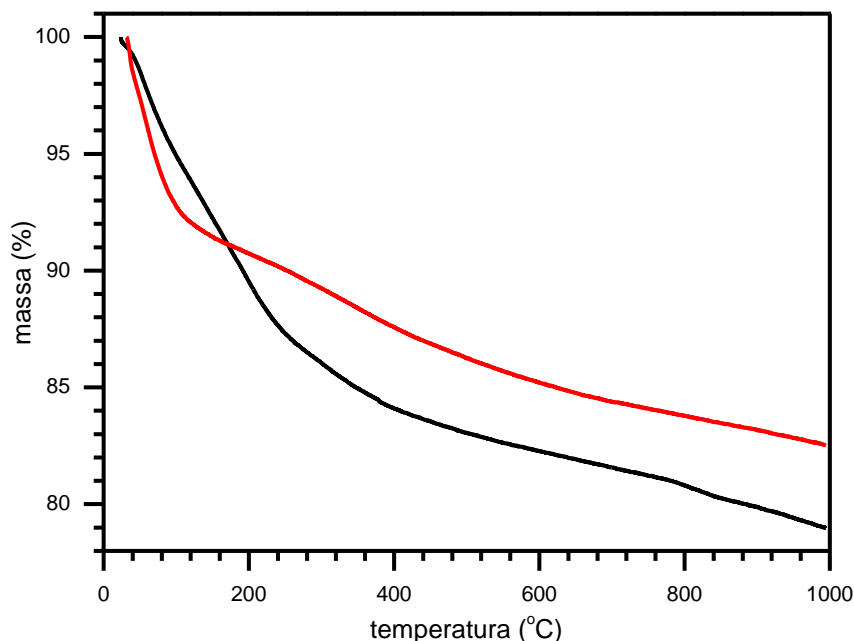


O comportamento térmico dos materiais foi avaliado através de termogravimetria (TG) (figura 26). De maneira geral, ocorreu uma perda total de massa da ordem de 17% para as partículas de sílica e 21% para as partículas de alumina. Esta

variação de massa está associada a três principais eventos; o evento inicial, ocorreu entre 22°C e ~300°C devido a dessorção de moléculas de solventes. Nesta etapa, as amostras apresentaram uma perda de massa inicial de cerca de 9% (sílica) e 15 % (alumina). A variação de massa no segundo evento é referente a moléculas de água e solventes encapsulados na matriz (300 à 500°C). À temperatura acima de 500°C (último evento), as perdas de massa estão mais relacionadas a eliminação de moléculas de água formadas em consequência à mudanças estruturais e/ou condensação dos grupos silanóis presentes na superfície.

Figura 26: Curva termogravimétrica de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ (vermelha) e $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (preta) obtida pela metodologia de pirólise de aerossóis.

Figure 26: Courbes d'analyse thermogravimétrique de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ (rouge) et $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (noir) obtenues par pyrolyse d'aérosol



1.1. Estudo espectroscópico do íon európio

A figura 27 apresenta o espectro de excitação da amostra $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{em}}=612\text{nm}$) e $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$. São observadas as bandas associadas às transições 4f-4f do íon európio, as atribuições são feitas na própria figura. A banda de transferência de carga O-Eu é observada a comprimento de onda menor de 325 nm para a $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ e a comprimento de onda menor que 300 nm para a $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$. O deslocamento para maior comprimento de onda indica que a interação oxigênio- európio é mais forte na matriz de alumina.

A figura 28 apresenta os espectros de emissão obtidos com excitação na transição ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$. São observados picos de emissão característicos do íon Eu^{3+} referentes às transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ indicadas na figura. As linhas de emissão são alargadas mostrando que o íon európio está em ambientes ligeiramente diferentes como no caso do íon európio em vidro ou em matrizes desordenadas. Um espectro de emissão similar ao da $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ é apresentado por H. Brito et al¹¹³, onde $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ foi preparada pela metodologia Pechini a temperatura de 800°C e também similar é o espectro obtido do pó obtido por pirólise de aerossol à 700°C a partir de um sol de boemita¹¹⁸.

Figura 27: Espectro de excitação para as partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{em} = 612$ nm) e $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{em} = 612$ nm) obtida por pirólise de aerossol, medidas realizadas em amostras sólidas.

Figure 27: Spectres d'excitation normalisés pour des particules d' $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{em} = 612$ nm) et $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$

($\lambda_{em} = 612$ nm) obtenues par pyrolyse d'aérosol à l'état solide. Spectres normalisés.

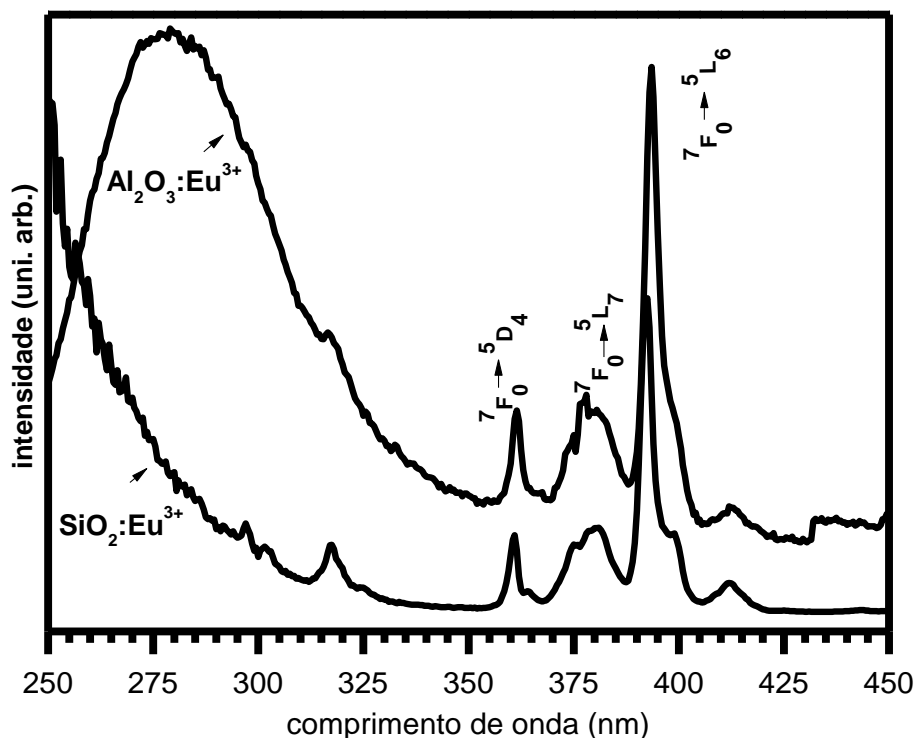
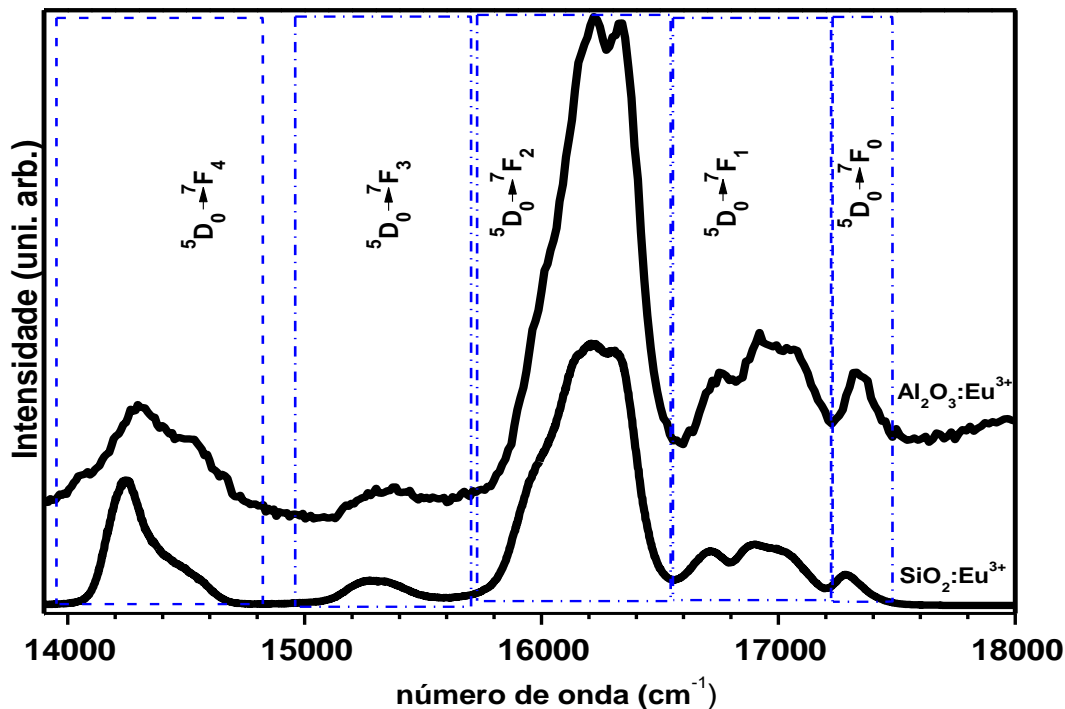


Figura 28: Espectro de emissão para as partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{ex}}=394\text{nm}$) e $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{ex}}=392\text{nm}$) obtida por pirólise de aerossol, medidas realizadas em amostras sólidas.

Figure 28: Spectre d'émission normalisés pour des particules d' $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{ex}}=394\text{nm}$) et $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{ex}}=392\text{nm}$) obtenues par pyrolyse d'aérosol, à l'état solide. Les spectres sont normalisés.



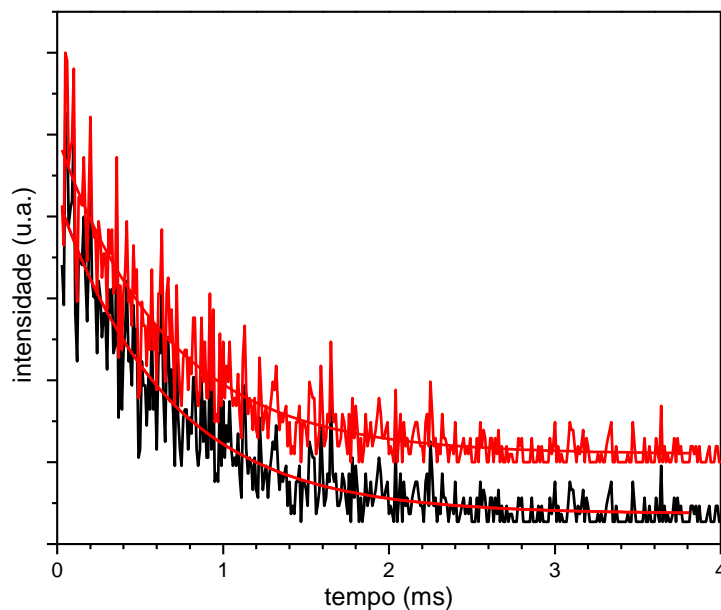
O espectro de emissão obtido para a amostra de sílica apresenta bandas alargadas confirmando a presença do európio em matriz amorfa. Espectros análogos foram obtidas para partículas de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ por pirólise de aerossol de uma solução de sílica comercial Ludox AS-40^{117;119} e também em vidros dopados com európio(III) preparados por sol-gel¹²⁰.

A figura 29 mostra a curva de decaimento obtido para a emissão do estado ${}^5\text{D}_0$ para as duas matrizes. O decaimento não segue uma lei exponencial simples confirmando a distribuição de sítios de simetria para o íon Eu^{3+} já sugerida pela largura das bandas de emissão. Por isso, um tempo de vida médio (τ_{exp}) de $0,22 \pm 0,02$ ms para partículas de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ e $0,26 \pm 0,02$ ms para as partículas de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ foi obtido usando a seguinte expressão:

$$\tau_{\text{EXP}} = \frac{\int_0^{\infty} I(t) t dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (22)$$

Figura 29: Curva de decaimento para a luminescência do íon Eu^{3+} na matriz alumina (vermelho) e sílica (preto) dopada com 5%.

Figure 29: Declin de luminescence du niveau 5D_0 de l'ion europium (III) dans les matrices d'alumine (rouge) et de silice (noir).



Baseado no espectro de emissão foi possível calcular o coeficiente de emissão espontânea (A) (equação 15), o tempo de vida radiativo (τ_{rad}), a eficiência quântica (q) (equação 11), os parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt (Ω_λ) (equação 16), que estão apresentados na tabela 1. O número de moléculas de água foi calculado utilizando a equação (19)

Os baixos valores de Ω_2 sugerem que o európio se encontra em diferentes ambientes químicos, e a baixa eficiência quântica, comparada com os dados de Brito et al.¹¹³ é devido a desativação do estado emissão pela presença de osciladores OH.

Tabela 1: Parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4), probabilidade de emissão espontânea de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q) de partículas de sílica e alumina dopadas com európio

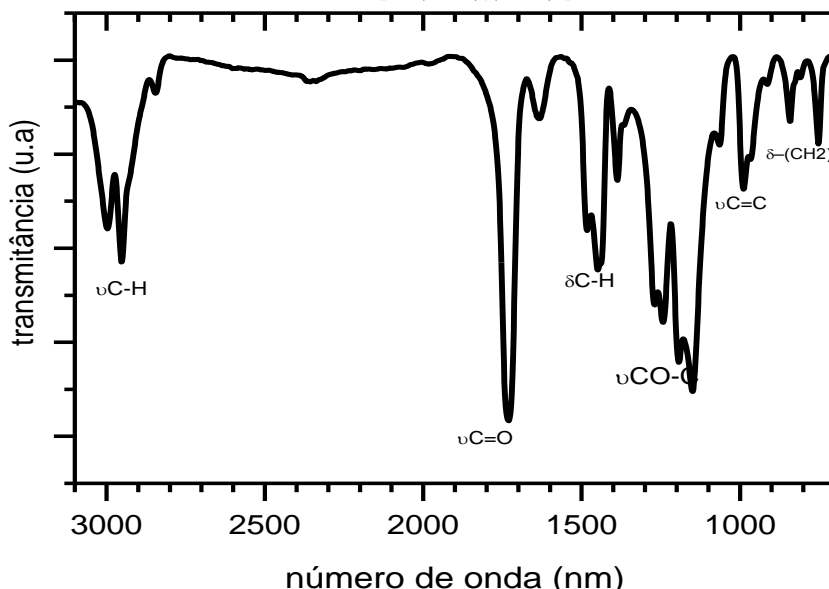
Tableau 1: Paramètres d'intensité de Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4), probabilité d'émission spontanée d'Einstein (A_{rad}), durées de vie radiatives et expérimentales (τ_{rad} , τ_{exp}), le efficacité quantique (q) de particules de silice et d'alumine dopées à l'euporium.

AMOSTRAS	Ω_2 (10^{-20}cm^2)	Ω_4 (10^{-20}cm^2)	A_{RAD} (ms^{-1})	τ_{RAD} (ms)	τ_{EXP} (ms)	q	$N_{\text{H}_2\text{O}}$
$\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+113}$	18,8	18,8	0,888	1,12	0,44	0,32	1,2
$\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$	$4,20\pm 0,21$	$1,70\pm 0,08$	$0,24\pm 0,01$	$4,16\pm 0,20$	$0,22\pm 0,02$	$0,05\pm 0,01$	4,4
$\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$	$7,10\pm 0,35$	$3,10\pm 0,15$	$0,35\pm 0,02$	$2,83\pm 0,14$	$0,26\pm 0,02$	$0,09\pm 0,01$	3,5

2. Compósitos PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂]

A figura 30 apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho do compósito PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂]. São observadas bandas características do polímero, ou seja, as bandas de ν C-H na região de 2996-2900 cm⁻¹, a banda em 1725 cm⁻¹ e 1627 cm⁻¹ de ν (C=O), além das bandas na região na 1400-1000 cm⁻¹ de deformação e estiramento C-H. São observadas também bandas na região de 3500-3200 cm⁻¹ referente às estiramento a_sOH. Na região de 1630–1600 cm⁻¹ observam bandas referentes a deformação da ligação H-O-H(H-O-H). Estas atribuições estão de acordo com as apresentadas por Kai et al¹²¹

Figura 30: Espectro na região do infravermelho das partículas de PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂].
Figure 30: Spectre IRTF de l'échantillon PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂].



A figura 31 apresenta imagens de MEV das partículas de PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂]. Foram obtidas partículas esféricas e monodispersas. O diâmetro médio e o coeficiente de variação foram determinados estatisticamente para uma amostragem de aproximadamente 250 esferas. A determinação do diâmetro de cada esfera foi realizada manualmente e os resultados obtidos foram expressos na forma de um histograma de distribuição que também é apresentado na figura 32. A distribuição de tamanhos é estreita, com media de 450 nm.

Na figura 31(c e d) nota-se que estas partículas podem se organizar em um arranjo ordenado, e quando isto ocorre verifica-se diferentes colorações quando observado a diferentes ângulos.

Figura 31: Microscopia eletrônica de varredura das partículas PMMA dopadas com o complexo $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$.

Figure 31: Microscopie électronique à balayage des particules de le PMMA : $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$

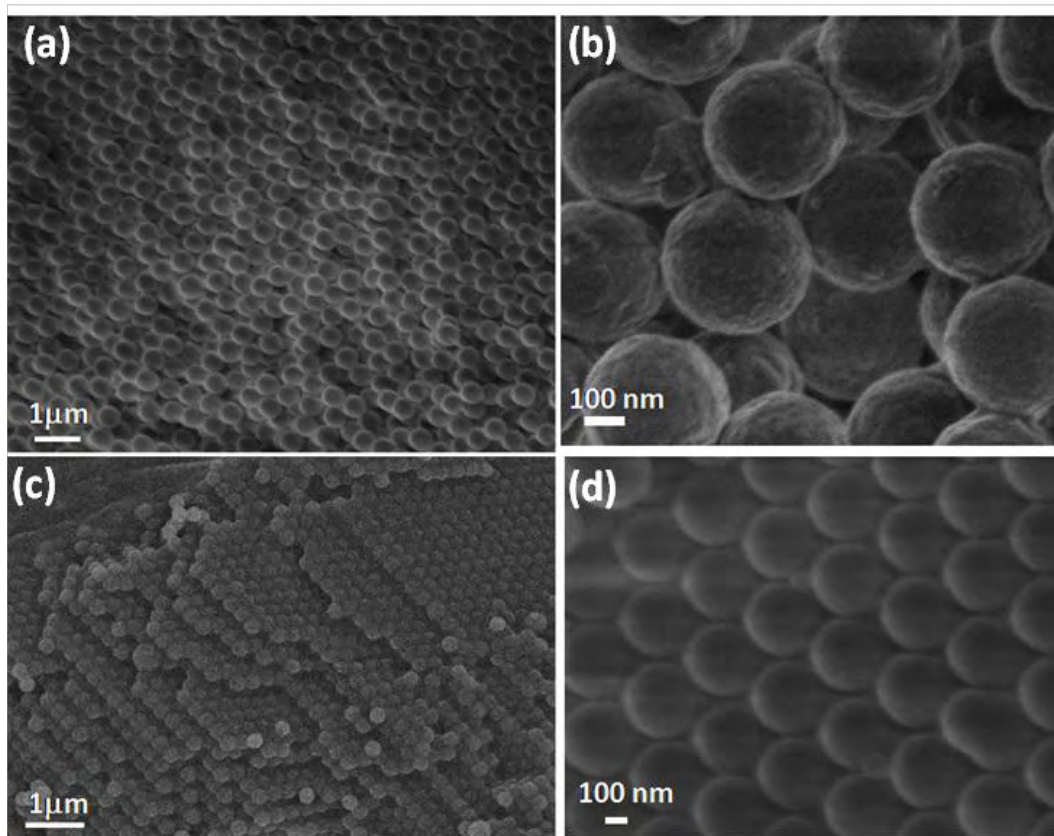
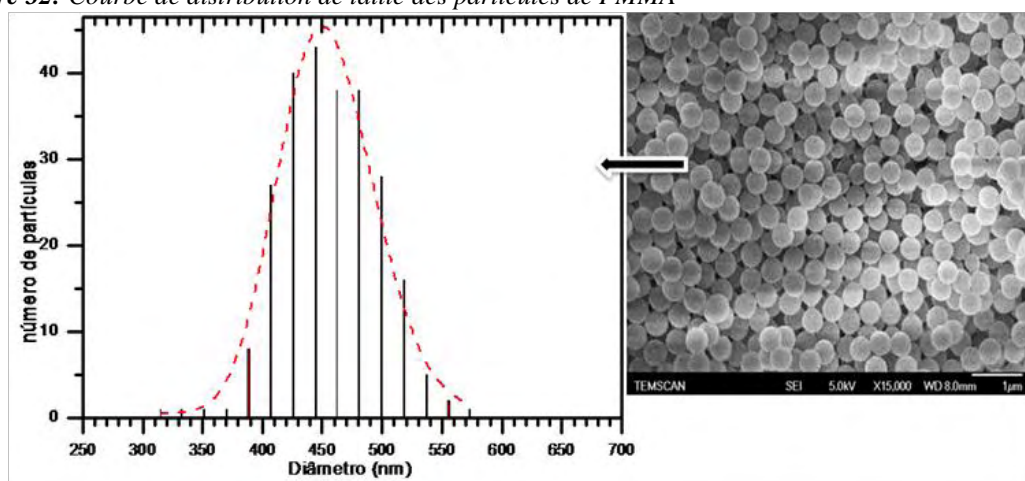


Figura 32: Curva de distribuição de tamanho de partículas de PMMA obtida a partir da imagem de MEV.

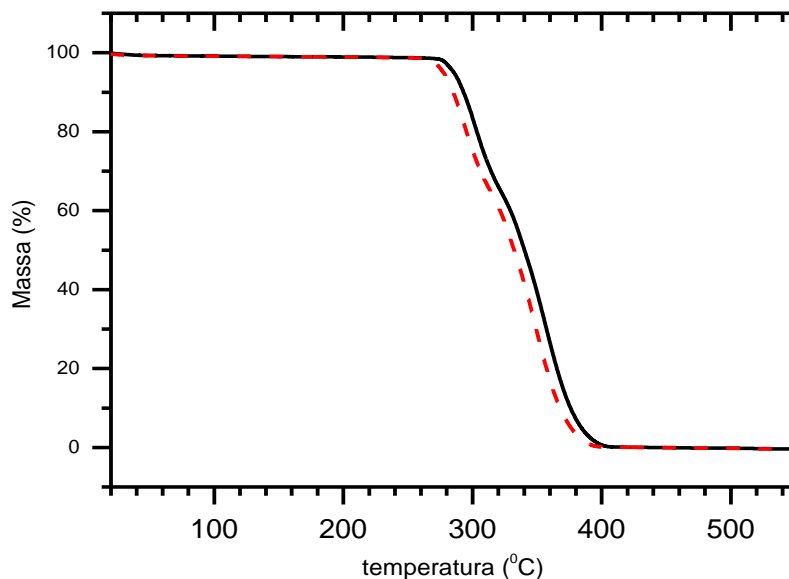
Figure 32: Courbe de distribution de taille des particules de PMMA



A análise termogravimétrica (TG) do polímero dopado com $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ (figura 33) sob atmosfera de ar não mostrou nenhuma mudança significativa com relação ao polímero puro¹²¹. Além disso, pode ser observado que a perda de massa mais importante ocorre em um único evento, no intervalo de temperatura (270-407°C). Este resultado indica que o comportamento de decomposição térmica do polímero foi pouco afetado pelo processo de dopagem. Não se observou a decomposição do complexo de Eu^{3+} que deve ocorrer por volta de 200°C ¹²². Logo o compósito é estável termicamente.

Figura 33: Curva termogravimétrica do polímero PMMA: $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ (preto) e do polímero PMMA (vermelho).

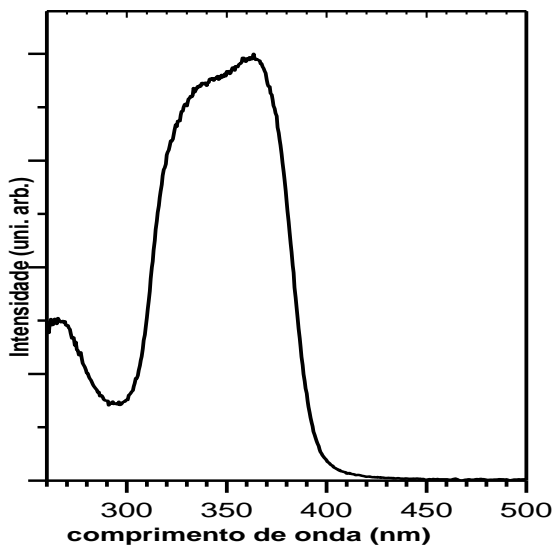
Figure 33: Courbes d'analyse thermogravimétrique de PMMA: $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ (noir) et du polymère PMMA (rouge).



A figura 34 apresenta o espectro de excitação da luminescência ($\lambda_{\text{em}} = 612 \text{ nm}$) obtido para o compósito. São observadas três bandas largas de excitação em 276, 340 e 362 nm que podem ser atribuídas à transferência de carga $\text{Eu}^{3+}-\text{O}^2$ e as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel contendo enxofre e nas carbonilas do sistema β -dicetona, sendo estas bandas observadas também no complexo puro¹²³. Nota-se que as bandas intra $4f^6$ não são observadas nestas condições, em particular a mais intensa ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$ a 394 nm, isto significa que esta transição é muito mais fraca que as bandas de excitação no ligante. O efeito de transferência de energia não radiativa (“efeito antena”) do ligante TTA ao íon Eu^{3+} é eficaz.

Figura 34: Espectro de excitação das partículas PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂]. A emissão foi fixada em 612nm, na emissão do ⁵D₀→⁷F₂ do íon Eu³⁺.

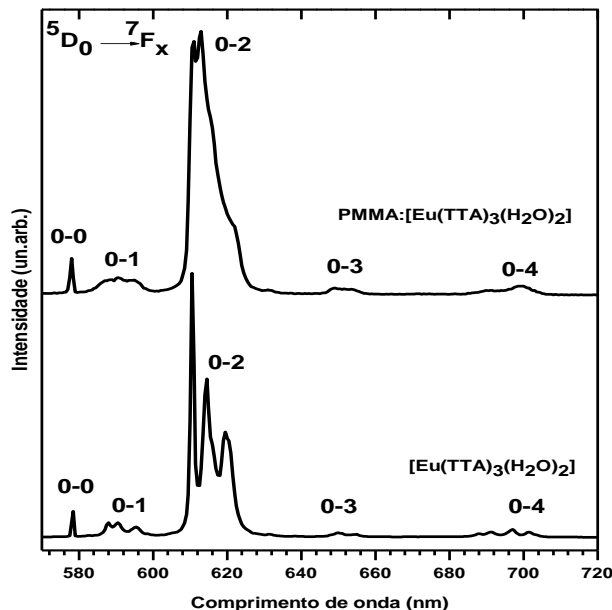
Figure 34: Spectre d'excitation de l'échantillon PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂]. $\lambda_{em} = 612 \text{ nm}$



A figura 35 apresenta os espectros de emissão do complexo e compósito. O complexo mostra as transições ⁵D₀→⁷F₀ (579nm), ⁵D₀→⁷F₁ (588, 591, e 595nm), ⁵D₀→⁷F₂ (610, 614 e 619 nm) ⁵D₀→⁷F₃ (651 nm) e a transição ⁵D₀→⁷F₄ (694, 697 e 700 nm) e as bandas são alargadas em relação ao complexo. A transição ⁵D₀→⁷F₀, que normalmente é utilizada na avaliação da presença de multi-sítios por ser não degenerada, aparece no complexo em 578,5 nm com largura a meia altura de 0,9 nm. No compósito a banda é ligeiramente deslocada para 578,0 nm com largura a meia altura de 1,3 nm.

Figura 35: Espectros de emissão do compósito PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂] e do complexo com excitação fixada em 394 nm (Eu³⁺).

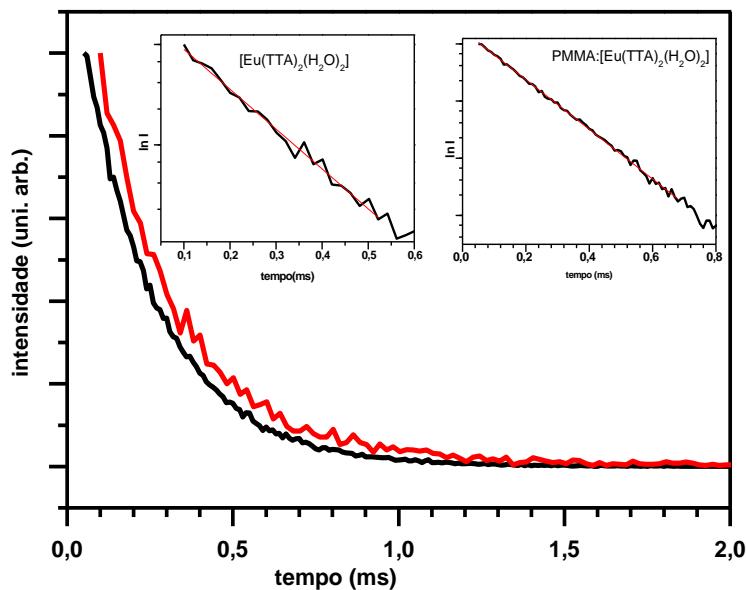
Figure 35: Spectre d'émission de l'hybride PMMA:[Eu(tta)₃(H₂O)₂] et du complexe libre sous excitation à 394 nm



A figura 36 apresenta as curvas de decaimento de luminescência ($\lambda_{exc}=362$ nm e $\lambda_{em}=610$ nm, transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$) que puderam ser ajustadas a decaimentos exponenciais simples. Os valores de tempo de vida obtidos foram de $0,25 \pm 0,02$ ms para o compósito e $0,26 \pm 0,02$ ms para o complexo.

Figura 36: Curvas de decaimento para a luminescência do complexo [Eu(TTA)₂(H₂O)₂] (preta) e do compósito PMMA: [Eu(TTA)₂(H₂O)₂] (vermelha). Os insets mostram o decaimento na função ln(I) vs tempo (ms) para os mesmos.

Figure 36: Déclin de luminescence du niveau 5D_0 de l'ion europium(III) dans [Eu(TTA)₂(H₂O)₂] (noir) et PMMA: [Eu(TTA)₂(H₂O)₂] (rouge). L'encart montre le déclin en fonction ln(i) vs t (ms).



Conforme descrito na introdução desta tese (item 1) vários parâmetros importantes podem ser obtidos a partir das medidas experimentais de espectros de emissão e valores de tempo de vida. Desta maneira o coeficiente de emissão espontânea (A), o tempo de vida radiativo (τ_{rad}), a eficiência quântica (q), os parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt (Ω_λ) e (equações 10, 11, 14, 15 e 16) e o número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação do Eu^{3+} ($N_{\text{H}_2\text{O}}$) obtidos pela equação 19.

A figura 37 mostra as regiões espectrais utilizadas para as medidas de área dos picos de emissão, S_{0-J} com erro de 5%. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos e também resultados da literatura para o complexo e filmes de $\text{PMMA}:[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ ¹²¹

Figura 37: Espectro de emissão do composto $\text{PMMA}-[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ e as regiões espectrais utilizadas para os cálculos de área de cada transição.

Figure 37: Spectre d'émission des composites $\text{PMMA}:[\text{Eu}(\text{TTA})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et régions spectrales utilisées pour le calcul de l'aire de chaque transition.

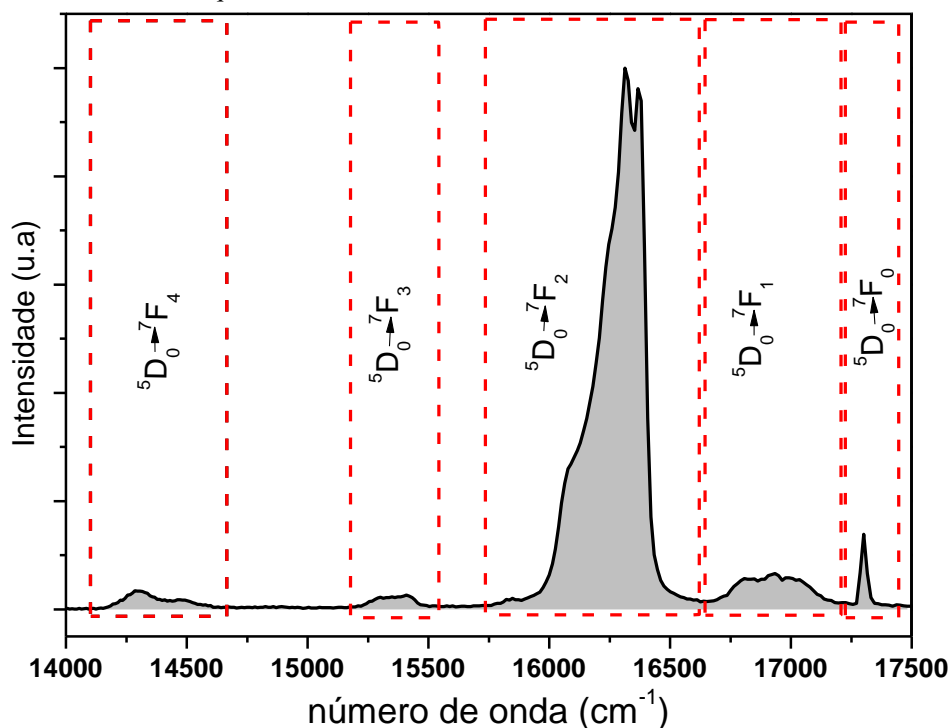


Tabela 2: Parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4), probabilidade de emissão espontânea de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q) e número de moléculas de água (N_{H_2O} equação 19).

Tableau 2: Paramètres d'intensité de Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4), probabilité d'émission spontanée d'Einstein (A_{rad}), durées de vie radiatives et expérimentales (τ_{RAD} , τ_{EXP}), efficacité quantique (q) et nombre de molécules d'eau (N_{H_2O} , l'équation 19)

AMOSTRAS	Ω_2 (10^{-20}cm^2)	Ω_4 (10^{-20}cm^2)	A_{RAD} (ms^{-1})	τ_{RAD} (ms)	τ_{EXP} (ms)	q	N_{H_2O}
$[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]^{12}$	33	4,6	0,793	1,26	0,26	0,21	3
PMMA:[Eu] 5% ¹²¹	43,6	10,3	1,49	0,67	0,32	0,47	1,5
$[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$	18.8±0,1	1,60±0,01	0,68±0,03	1,47±0,07	0,26±0,03	0,17±0,05	3,2
PMMA:[Eu]	19,9±1,0	2,38±0,12	0,67±0,03	1,50±0,07	0,25±0,03	0,16±0,03	3,4

Os valores obtidos para o complexo puro são da mesma ordem daqueles obtidos por H.F. Brito et al¹²³ (tabela 2). Estes mesmos autores observaram um aumento nos valores dos parâmetros de intensidade e eficiência quântica com a incorporação do complexo no polímero. Apesar do alargamento das bandas observado no espectro de emissão não foram observadas variações nos parâmetros de intensidade e eficiência quântica com a incorporação. Deve-se considerar na comparação que os métodos de preparação foram completamente diferentes sugerindo que a metodologia de preparação é importante na preparação destes compósitos.

Nota-se que os valores característicos do complexo puro são conservados no compósito PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂], em particular que as duas moléculas de água coordenadas ao centro metálico restam na esfera de coordenação, o que não ocorre no caso dos filmes xerogéis de Brito et al¹¹⁹.

Neste capítulo descrevemos metodologias para a síntese de partículas luminescentes para diferentes matrizes poliméricas, inorgânicas $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ e $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ por pirólise de aerossol, e também orgânicas com complexo de európio incorporado, PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂].

Os íons Eu^{3+} estão incorporados nas partículas do óxido e não podem ser liberados no meio de reação, a presença de grupos hidroxila na superfície destas partículas torna possível a sua modificação e funcionalização. A limitação da técnica de síntese, pirólise de aerossóis, é o da distribuição de tamanho variado das partículas

obtidas. Outra limitação é a baixa intensidade de emissão deste material quando excitados nas transições ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$ ou 5D_1 do próprio íon európio. A eficiência quântica é da ordem de 10%, pois a probabilidade de desexcitação não radiativa é elevada devido a acoplamentos com as moléculas de hidroxila e água.

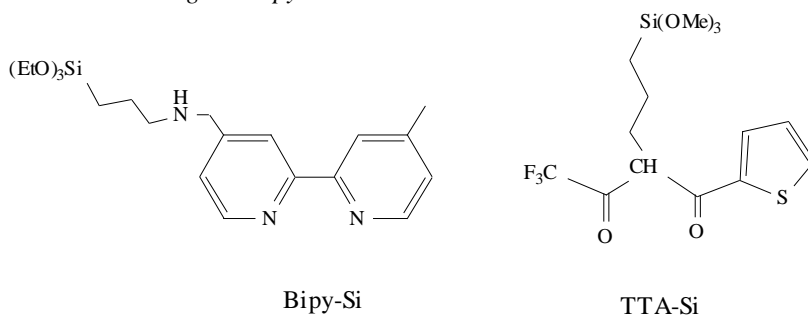
A eficiência quântica foi melhor para o composto $PMMA:[Eu(TTA)_3(H_2O)_2]$. Outra vantagem deste composto é a possibilidade de excitação na banda do ligante. Além disso, as partículas são monodispersas. Sua desvantagem é a sua instabilidade em meio orgânico que poderia ser compensado por recobrimento com uma camada de sílica.

Neste trabalho, exploramos uma metodologia diferente. A fim de combinar as boas propriedades de luminescências em excitação no UV próximo (355-365nm), e ter partículas estáveis cuja superfície pode ser quimicamente modificada, orientamos nosso trabalho para a síntese de partículas híbrida a base de sílica incorporando ou ancorando, por ligação covalente, complexo de európio altamente luminescente. Estes resultados são descritos no Capítulo 5

**5- SÍNTESES DE HÍBRIDOS
LUMINESCENTES À BASE DE SÍLICA E
COMPLEXOS DE EURÓPIO SILILADOS**

Neste capítulo será apresentada a síntese de complexos luminescentes capazes de ancorar e incorporar em matriz de sílica, por uma ligação covalente. Neste trabalho foram sintetizados complexos de európio, os quais devem apresentar ao menos um ligante com função alcóxissilano, e estes serem eficazes na transferência de energia para o íon európio. A revisão bibliográfica mostrou que são poucas as moléculas orgânicas com função alcóxissilano que podem atuar como ligantes eficazes na transferência de energia para o európio, formando complexos altamente luminescentes. Optamos por utilizar, inicialmente, o ligante bipyridina com função alcóxissilano (bpy-Si) sintetizado no laboratório CIRIMAT (figura 38). Este ligante completa a esfera de coordenação do íon európio nos complexos [Eu(TMHD)₃] e [Eu(TTA)₃]. Em seguida, consideramos a síntese de um novo ligante baseado no TTA, uma vez que os dados da literatura descrevem a eficácia na doação de energia deste ligante para o íon európio. O Ligante TTA-Si (figura 38) combina as boas propriedades eletrônicas do ligante dicetona, e também, a presença de grupo alcóxissilano para ligação covalente com a sílica.

Figura 38: Estrutura dos ligantes Bpy-Si e TTA-Si.
Figura 38: Structures des ligands Bpy-Si et TTA-Si



O interesse no estudo dos complexos de európio com ligantes com função alcóxissilano baseia-se na capacidade de ancoragem desses complexos à superfície de sílica. Assim, foram preparados híbridos: por ancoragem, onde dois tipos de partículas de sílica serão avaliados, partículas de sílica mesoporosa sintetizada por pirólise de aerossol e nanopartículas densa de sílica tipo Ludox AS-40; por incorporação, onde os complexos serão incorporados em sílica pela síntese de microemulsão inversa.

1. Complexos de európio com ligantes bipyridina com função alcóxidosilanos

1.1. Ligante 4-Metil-4'-(metilaminopropiltriétoxissilano)-2,2'-bipyridina, Bpy-Si

O ligante foi sintetizado em três etapas. A primeira etapa foi a adição de um grupo aldeído a 4,4'-dimetil,2,2'-bipyridina, segunda etapa, a transformação da função aldeído em uma imina. Em seguida, a redução com borohidreto de sódio em etanol obtendo o ligante 4-Metil-4'-(metilaminopropiltriétoxissilano)-2,2'-bipyridina (Bpy-Si) (figura 38), com 87% rendimento. A fim de obter um aminocomposto estável, todas as etapas de síntese foram controladas, com principal atenção a etapa de redução.

O ligante foi caracterizado por análise elementar, espectroscopia de massa, ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN e os dados obtidos confirmam a fórmula do composto preparado por Cousinié et al⁹⁸.

1.2. Complexo [Eu(TMHD)₃(Bpy-Si)], [Eu1]

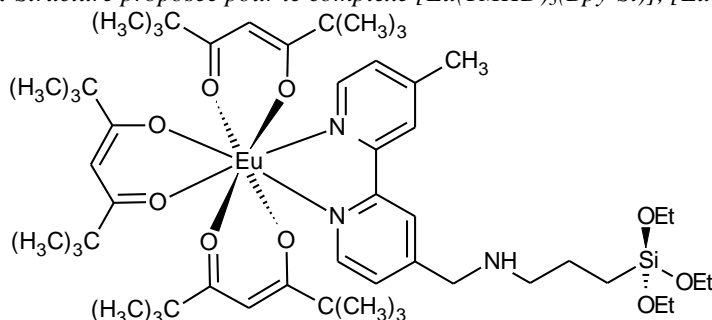
O complexo [Eu(TMHD)₃] foi utilizado como precursor de európio para a preparação do complexo [Eu1] por causa de sua conhecida afinidade por ligantes nitrogenados, e também pela estabilidade octacoordenada desses complexos. A síntese é baseada sobre o protocolo de Cousinié et al¹²⁴ onde um equivalente do complexo Eu(TMHD)₃ reagiu a temperatura ambiente com um equivalente do ligante bipyridina, obtendo um complexo com rendimento de 54%.

A presença da organossilanos é confirmada pelo espectro na região do infravermelho, que apresenta as bandas vibracionais do anel piridina, 1578 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N} \text{ anel})$, 790 $\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$; 580 $\nu(\text{Eu}-\text{N})$, as deformações CH_3 , CH_2 , e NH do grupo propil e amino secundário, e o vibrações e deformações do grupo Si-O-C 1222 $\nu(\text{Si}-\text{C})$; 1089 $\nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 962 $\delta(\text{Si}-\text{O})$). Os ligantes dicetona TMHD foram identificados pelas bandas em 1574, 1536, 1504 [$\nu(\text{CCO})$]. A espectroscopia de massa SM (FAB) mostra grandes picos em (m/z) 922 correspondente a [M-TMHD], em 702 correspondente a [M- Bpy-Si] e 519 [M-(TMHD+Bpy-Si)].

O espectro na região Uv-visível apresenta suas bandas de absorbância fortes em 283nm ($\epsilon = 39000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 250nm ($\epsilon = 21400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) correspondentes às transições $\pi-\pi^*$ do ligante Bpy-Si. Baseado na análise elementar (parte experimental, item 1.8) junto com as caracterizações citadas propomos uma estrutura ao complexo (figura 39).

Esse complexo foi sintetizado por S. Cousinié et al¹²⁴ e imobilizado em sílica comercial (Ludox AS-40), sendo referência neste trabalho, e realizando um estudo completo das propriedades de luminescência deste complexo.

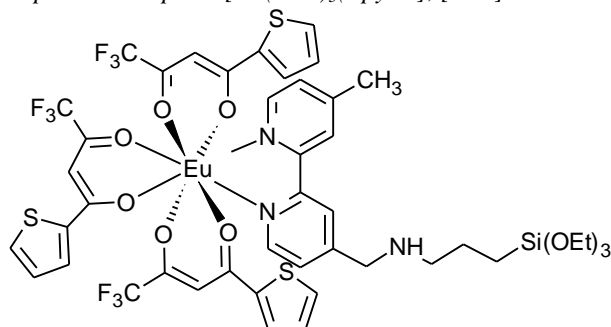
Figura 39: Estrutura proposta para o complexo [Eu(TMHD)₃(Bpy-Si)], [Eu1]
Figure 39: Structure proposée pour le complexe [Eu(TMHD)₃(Bpy-Si)], [Eu1]



1.3. Complexo [Eu(TTA)₃(Bpy-Si)], [Eu2]

A fim de obter um complexo com boa propriedade de luminescência, reagimos o complexo [Eu(TTA)₃(H₂O)₂] com um equivalente do ligante bpy-Si. A substituição de duas moléculas de água pelo ligante bpy-Si na esfera de coordenação do íon európio leva a um aumento da intensidade de luminescência, devido à perda de grupos de desexcitação (H₂O) e o a adição de um ligante que pode doar energia ao íon európio (“efeito antena”).

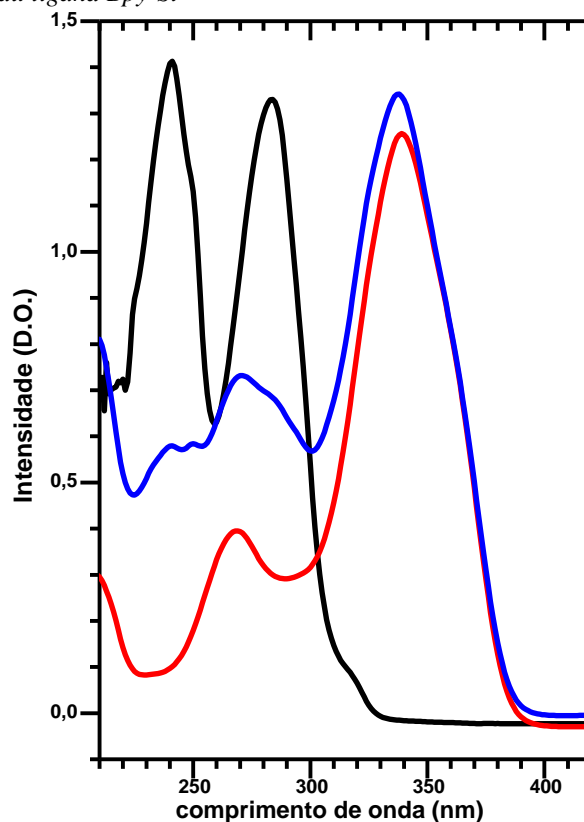
O complexo foi obtido com rendimento de 62%. A análise por espectroscopia na região do infravermelho mostrou as bandas características do ligante TTA, como por exemplo, a banda em 1627 $\nu_s(\text{C}=\text{O})$ e as bandas 1578, 1520, 1407 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$ do anel tiol e ainda as bandas do ligante piridina sililado, como 3431 $\nu_{\text{as}}(\text{NH})$, 1578 $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{N})$ anel), 1222 $\nu(\text{Si}-\text{C})$; 1089 $\nu(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$; 962 $\delta(\text{Si}-\text{O})$; 790 $\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$. A análise elementar esta de acordo com a fórmula (EuC₅₄H₉₀N₃O₉Si) que é confirmada por espectroscopia de massa (EM-FAB), onde observamos o pico do íon molecular [M⁺] = 1104 e um fragmento igual a [M-TTA]⁺ = 996. Além disso, o restante dos picos isotópicos está de acordo com a estequiometria proposta (figura 40).

Figura 40: Estrutura proposta para o complexo [Eu(TTA)₃(Bpy-Si), [Eu2]**Figure 40:** Structure proposée pour le complexe [Eu(TTA)₃(Bpy-Si), [Eu2]

A figura 41 mostra os espectros de absorção obtidos das soluções do ligante e dos complexos em acetonitrila. No espectro do ligante duas bandas são observadas com máximos em 283nm ($\epsilon=53650 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 240nm ($\epsilon= 56150 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que podem ser atribuídas a transições singleto-to-singleto referentes ao anel bipyridina^{98; 124}. Para o complexo [Eu(TTA)₃(H₂O₂)] as bandas de absorção ocorrem com máximos em 338nm ($\epsilon= 50.100 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e uma menos intensa em 270nm ($\epsilon = 15950 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹²³. No espectro do complexo [Eu2], observa-se as duas transições do ligante TTA à 338nm ($\epsilon= 54350 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e 281 nm ($\epsilon= 27150 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e também as transições atribuídas ao ligante Bpy-Si à 269 nm ($\epsilon= 30400 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e em 240 nm ($\epsilon= 23650 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 250nm ($\epsilon= 23850 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Figura 41: Os espectros de absorção na região do Uv-visível dos complexos (azul) [Eu2], (vermelho) [Eu(TTA)₃.2H₂O] e (preto) o ligante Bpy-Si.

Figure 41: Spectres d'absorption dans la région UV-visible des complexes (blue) [Eu2], (rouge) [Eu(TTA)₃.2H₂O] et (noir) du ligand Bpy-Si



2. Complexo de európio com ligante dicetona com função alcóxissilano ligante TTA-Si

2.1. Síntese do ligante TTA-Si

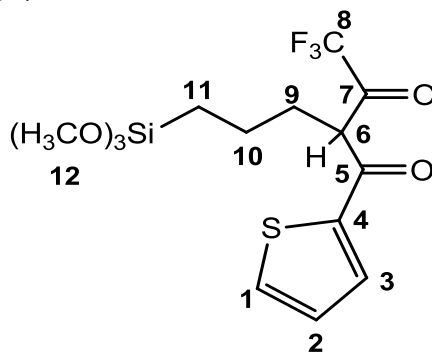
De acordo com a literatura, discutida anteriormente, nós introduzimos apenas um grupo trialcoxissilanos, com o propósito de minimizar a possibilidade de hidrólise e condensação do ligante e posteriormente o complexo. Também optamos por utilizar cloropropiltrimetoxissilano para dar origem ao alcóxissilanos e não isocianato-propiltrimetoxissilano (ICPTES) que dá origem a derivados amido, sendo os derivados alquilados mais estáveis a variação de pH que as amidas^{83,97,29}.

A adição de um grupo alcóxissilanos foi realizada como descrito na figura 16, utilizando apenas um equivalente de hidreto de sódio e CPTMS. Em condições experimentais controladas (solventes orgânicos secos), o ligante organossilil- β -dicetona, TTA-Si, foi sintetizado com um bom rendimento (87%).

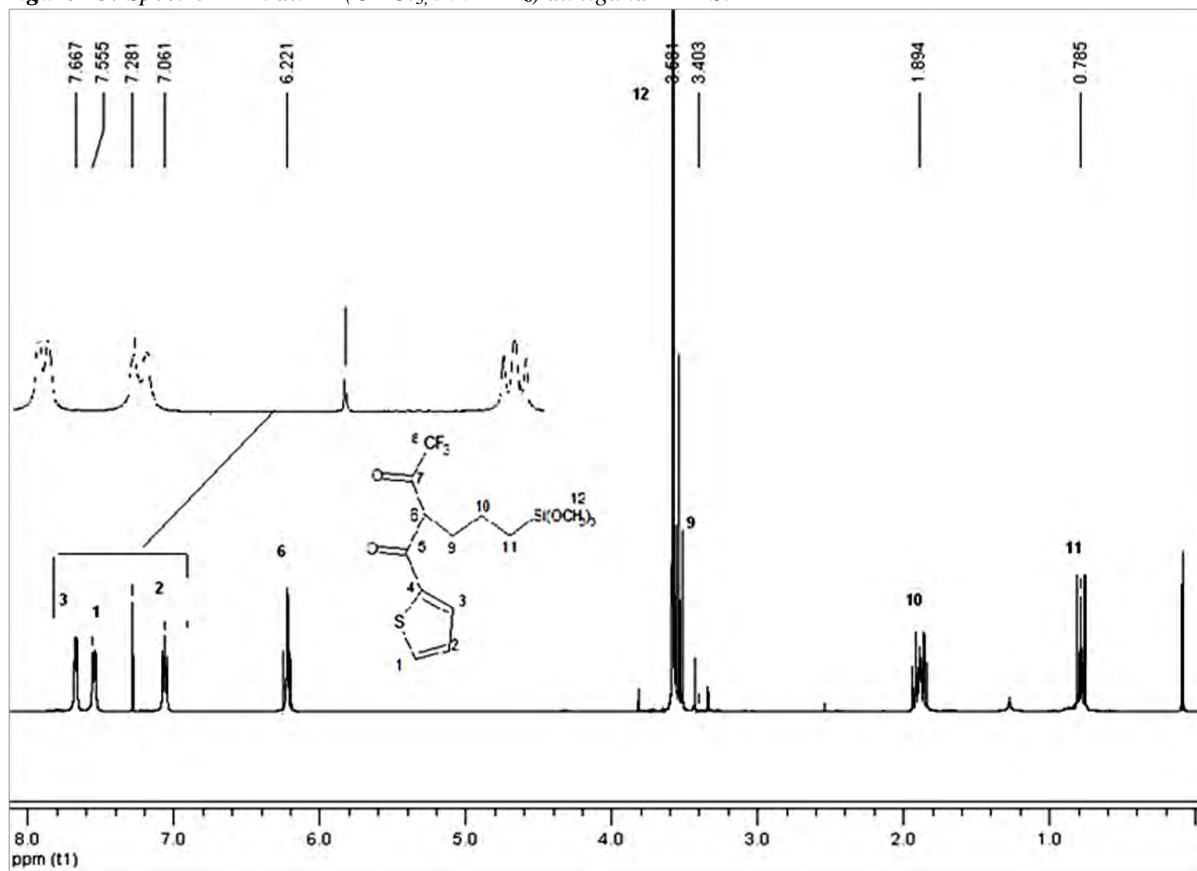
O ligante TTA-Si (figura 42) foi obtido da substituição de um hidrogênio do carbono α da β -dicetona por um grupo alcóxissilano, a formação foi confirmada pelos espectros de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN. As atribuições foram feitas de acordo com a numeração.

Figura 42: O ligante organosilil- β -dicetona (TTA-Si).

Figure 42: Structure du ligand organosilyl- β -dicétone (TTA-Si) et indexation des atomes pour la RMN

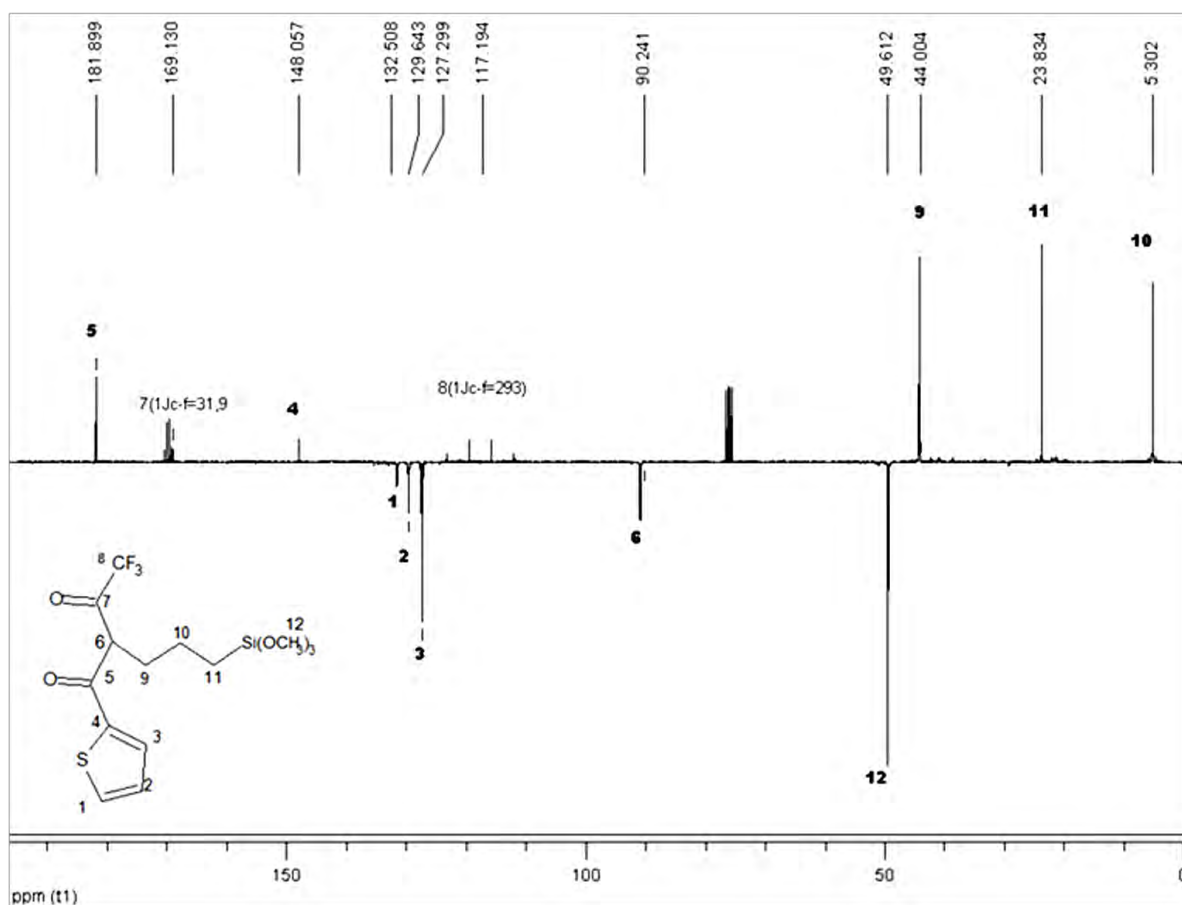


No espectro de ^1H RMN (figura 43), enquanto os sinais correspondentes aos três átomos de hidrogênio do ciclo tenoil são relativamente inalterados, a presença de três sinais em 0,78, 1,89 e 3,40 ppm correspondente aos átomos da cadeia propil confirmam o sucesso da reação de adição do grupo alcóxissilano. O sinal do átomo de hidrogênio na posição α da dicetona é um tripleto observado em 6,22 ppm como esperado, pois apresenta como vizinho o grupo metileno de acordo com a adição de um grupo alcóxissilano. Além disso, a integração dos sinais confirmam também que o ligante TTA-Si não é hidrolisado, com o sinal em 3,68 ppm atribuído ao átomos de hidrogênio metoxi, onde a integração há nove átomos de hidrogênio.

Figura 43: Espectro de ^1H RMN. (CDCl_3 , 300 MHz) do ligante TTA-Si.**Figure 43:** Spectre RMN du ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) du ligand TTA-Si

O espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN confirma a estrutura do ligante, exibindo um sinal para cada átomo de carbono magneticamente não-equivalentes (figura 44). O átomo de carbono na posição α aparece em 5,3 ppm, e os dois outros átomos de carbono da cadeia propil são de 23,8 e 44,0 ppm conforme o esperado para tal substituinte. O pico em 49,6 ppm é atribuído ao grupo metoxila indicando que a função silano está bem presente para a condensação sobre materiais de sílica. Os dois átomos de carbono carbonílicos aparecem em 169,1 (quadrupeto) com $^2J_{\text{CF}}$ constante de acoplamento de 32 Hz e 181,9 ppm, átomos de carbono heterocíclicos em 127,3, 129,6 e 132,5 ppm e 148,0 ppm para o átomo de carbono quaternário estão na faixa normal observado para os derivados tenoil. No substituinte trifluorometano mesma forma aparece em 117,2 ppm com uma constante de acoplamento $^1J_{\text{CF}}$ característica de 293 Hz. Como já foi observado no espectro de ^1H RMN, o átomo de carbono situado entre as duas funções é carbonila tendo um átomo de hidrogênio, e apareceu no intervalo do CH em 90,2 ppm, de acordo com a estrutura do nosso ligante neutro dicetona sililada tenoil⁷².

Figura 44: Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (CDCl_3 , 75,46MHz) do ligante TTA-Si
Figure 44: Spectre RMN du $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,46MHz) du ligand TTA-Si



A síntese de formação do ligante e a estabilidade dos grupos metoxi foram confirmadas com o espectro na região do infravermelho com a observação das bandas de vibração do grupo Si-O-CH₃ em 1191 e 1180 cm⁻¹ e deformação em 1.059 cm⁻¹. O grupo alcoxissilanos pode ser caracterizado por outras três bandas em 1244, 1149 e 933 cm⁻¹ para $\nu(\text{Si-C})$, $\nu(\text{Si-O})$ e $\delta(\text{Si-O-C})$ respectivamente. As bandas finas e intensas da TTA foram observadas em 1501, 1481, 1415 e 1355 cm⁻¹ referentes à $\nu(\text{C=C,C=S})$ do anel heterocíclico. Observou-se também, as bandas finas e intensa característica das vibrações $\nu(\text{C=O})$ em 1620 cm⁻¹, 1535 e 1516 $\nu(\text{C=O, C=C})$, 1280cm⁻¹ $\nu(\text{CF}_3)$, 704 e 712 cm⁻¹ $\delta(\text{CF}_3)$. Estes valores estão de acordo com Melby et al¹¹⁰. A análise elementar esta de acordo com a fórmula (EuC₅₄H₉₀N₃O₉Si) que é confirmada por espectroscopia de massa (EM-FAB), onde observamos o pico do íon molecular igual a m/z = 385 for [M⁺]. Além disso, os restantes picos isotópicos estão de acordo com a estequiometria proposta (figura 42).

Após bem caracterizado o ligante TTA-Si, foi realizada a síntese do complexo [Eu(TTA-Si)₃].

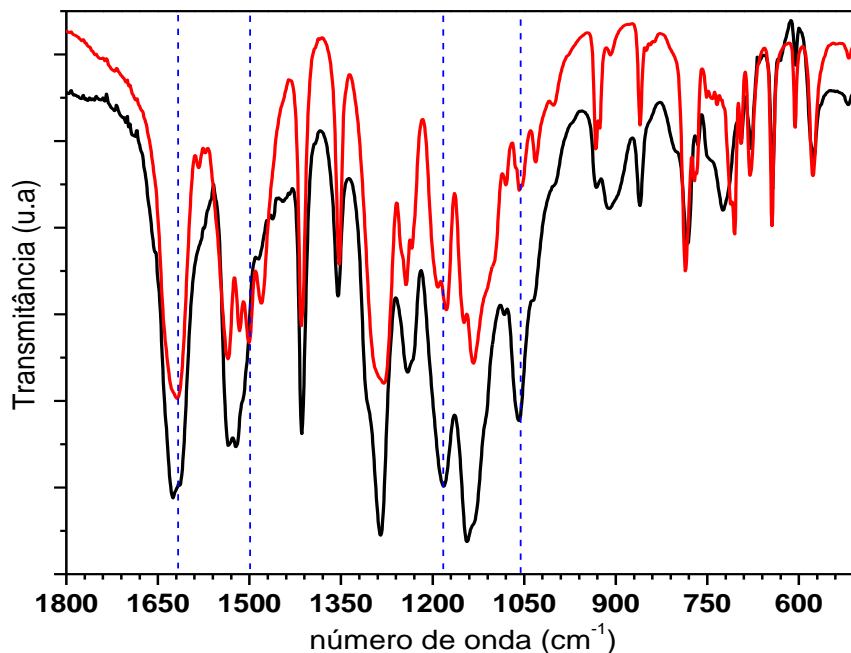
2.2. Complexo [Eu(TTA-Si)₃], [Eu³⁺]

O complexo európio (III) foi isolado quando três equivalentes do ligante TTA-Si reagiram com európio (III) em solução etanólica e temperatura ambiente. O complexo foi cristalizado como um sólido bege. Na presença de cloreto de európio a reação de desprotonação TTA-Si não requer adição de uma base, mas a reação de complexação é mantida por 18 horas.

A presença do ligante é confirmada por infravermelho (figura 45), com as vibrações de estiramento das funções da carbonila em 1627 e 1533 cm⁻¹ e dos grupos do anel tenoil em 1505, 1485, 1414 e 1355 cm⁻¹. No entanto, a complexação do ligante TTA-Si modificou a forma da região 1530-1480 cm⁻¹, onde as duas bandas finas e intensas em 1501 e 1481 cm⁻¹ observadas no espectro do ligante aparecem como dois ombros no espectro do complexo (1505 e 1481 cm⁻¹), o que é observado também para o complexo [Eu(TTA)₃(H₂O)₂]. As bandas em 1184 cm⁻¹ e 1059 cm⁻¹ da vibração do grupo Si-O-CH₃ mostra que o ligante permanece estável depois da complexação. Bandas de vibração carbonil, propilalcoxisilano e CF₃ são pouco afetadas pelo processo de complexação.

Figura 45: Comparação entre os espectros na região do infravermelho para o complexo [Eu3] (linha preta) e ligante TTA-Si (linha vermelha).

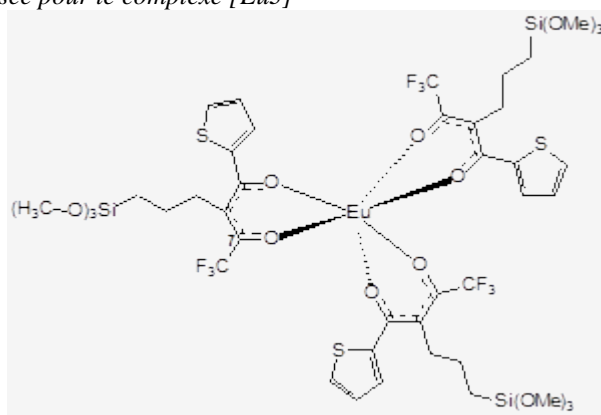
Figure 45: Spectres IRTF du ligand TTA-Si (ligne rouge) et du complexe [Eu3] (ligne noire)



A análise elementar esta de acordo com a fórmula ($\text{EuC}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_{15}\text{F}_9\text{S}_3\text{Si}_3$) que é confirmada por espectroscopia de massa (EM-FAB), onde observamos o pico do íon molecular (m/z) à 1300 [M^+], além dos picos isotópicos restantes que estão de acordo com a estequiometria proposta (figura 46).

Figura 46: estrutura proposta para o complexo [Eu3].

Figure 46: Structure proposée pour le complexe [Eu3]

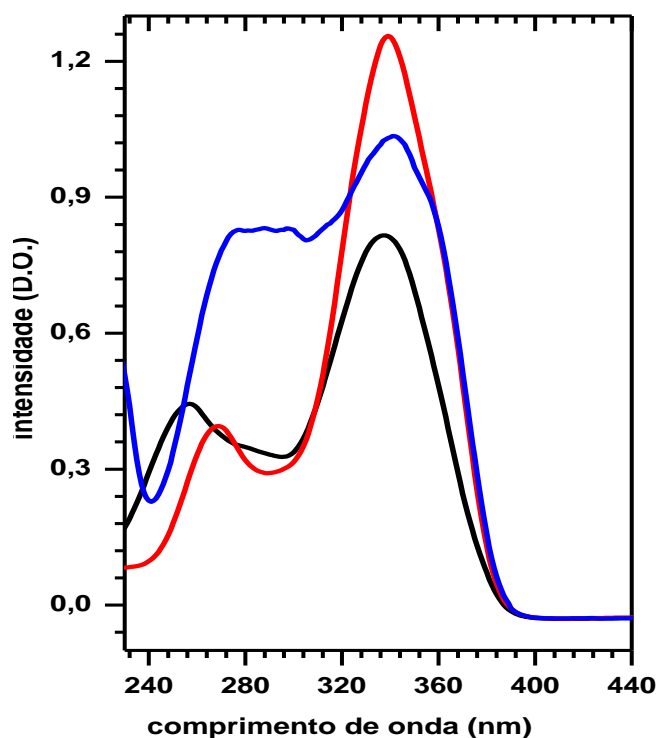


A figura 47 mostra os espectros de absorção obtidos das soluções do TTA-Si, $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ e do complexo [Eu3] (solução $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L em acetonitrila). O ligante TTA-Si apresentou uma banda de absorção forte centrada em 338nm ($\epsilon = 32800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

esta transição aparece no complexo [Eu3] deslocada para 341 nm ($\epsilon = 41350 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Outra banda de menor intensidade foi observada no ligante em 257 nm ($\epsilon = 14050 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), (figura 47, curva preta). O espectro do complexo [Eu(TTA)₃(H₂O)₂] em acetonitrila, também apresentado na figura 47 (curva vermelha), apresenta estas duas bandas em 269 e 339 nm, que foram atribuídas a transições singlete-singlete do ligante TTA^{122; 123}. As mesmas atribuições são feitas para o complexo [Eu3] à 339 nm ($\epsilon = 41350 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), e 276 nm ($\epsilon = 33400 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A absorção adicional na faixa de 280-300 nm do complexo [Eu3] com relação ao ligante é atribuída à transferência de carga O-Eu³⁺.

Figura 47: Espectros de absorção de soluções (preto) TTA-Si; (vermelho) [Eu(TTA)₃(H₂O)₂]; (azul) [Eu3] em acetonitrila ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)

Figure 47: Spectres d'absorption dans la région des UV-visibles: (noir) TTA-Si; (rouge) [Eu(TTA)₃,2H₂O] et (blue) [Eu3] dans acétonitrile ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)



Três complexos de európio foram, portanto preparados apresentando as funções trietoxissilano e trimetoxissilano. Dois complexos com o ligante Bpy-Si, e um com o ligante TTA-Si. Após bem caracterizados foi possível ancorar e incorporar estes em partículas de sílica, obtendo híbridos luminescentes.

3. Híbridos de sílica e complexos de európio

Utilizando como base, as metodologias citadas na figura 12(a, b) os complexo de európio com ligantes com função alcoxisilano foram covalentemente incorporados na partícula de sílica (a) ou ancorados na superfície da sílica densa ou mesoporosa (b), com isso, reações posteriores destes materiais podem ser realizadas sem a liberação dos complexos. Descreveremos inicialmente, as duas matrizes de sílica que utilizamos para realizar a ancoragem e em seguida, as sínteses de ancoragem e incorporações dos complexos.

3.1. Descrição das matrizes de sílica

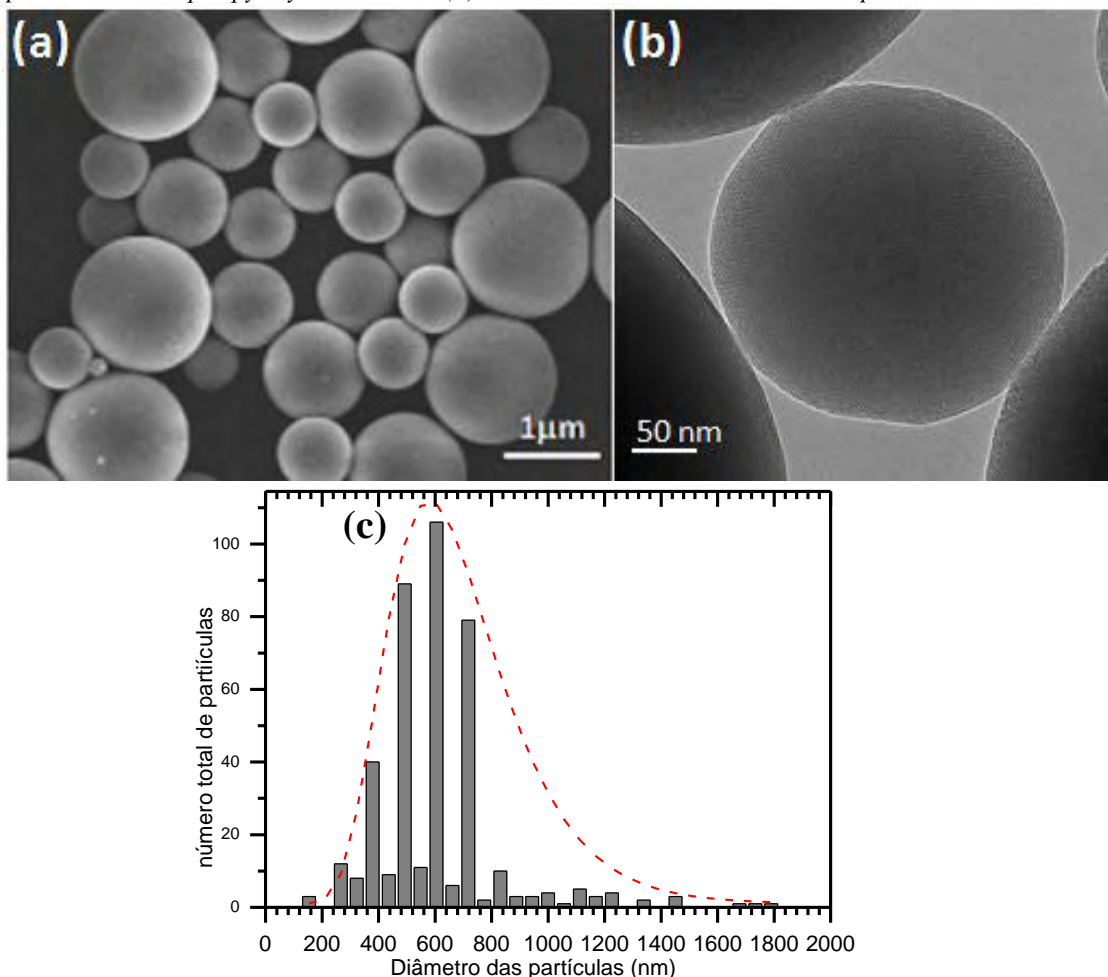
Sílica mesoporosa tem sido objeto de intensiva investigação durante as últimas décadas^{125; 126; 127; 128}, devido à suas propriedades únicas, incluindo estrutura mesoporosa estável, porosidade controlada, alta área superficial específica, e boa modificação de superfície. Essas características conferem elevado potencial em aplicações nos domínios da catálise, sensoriamento, e materiais opticamente ativos¹²⁹. Recentemente, tem-se dado atenção considerável em modificar quimicamente os poros das matrizes. A combinação de sílica mesoporosa com grupos funcionais apresentando propriedades de magnetismo e/ou luminescência é sem dúvida, de interesse especial em diagnósticos, imobilização de enzimas, bioseparação, e liberação controlada de fármacos. Os materiais obtidos podem apresentar resposta magnética, luminescência, baixa citotoxicidade, e boa biocompatibilidade.

A preparação de sílica mesoporosa tem sido tratada em nosso grupo de pesquisa¹⁰⁹. Estruturas mesoporosas ordenadas são bastante interessantes para a incorporação de metais, íons lantanídeos, complexos de íons lantanídeos, possibilitando o desenvolvimento de materiais multifuncionais. Estes materiais podem combinar de maneira interessante, a estabilidade relativamente elevada dos sistemas inorgânicos, a organização das espécies dopantes e mecanismos de adsorção em poros bem definidos.^{127; 130; 131}

A figura 48 mostra imagens de MEV e MET de esferas de sílica mesoporosa de tamanho variado obtidas por pirólise de aerossol. A microscopia eletrônica de transmissão (48b) mostra que as partículas esféricas apresentam poros ordenados.

Figura 48: Fotos de Microscopia de varredura (a) e transmissão (b) de sílica mesoporosa obtida pela metodologia de pirólise de aerossol. (c) curva de distribuição de tamanho de partículas obtida a partir da imagem de MEV.

Figure 48: Photos de microscopie électronique à balayage MEB (a) et à transmission TEM (b) de la silice mesoporeuse obtenue par pyrolyse d'aérosol. (c) courbe de distribution de taille des particules.



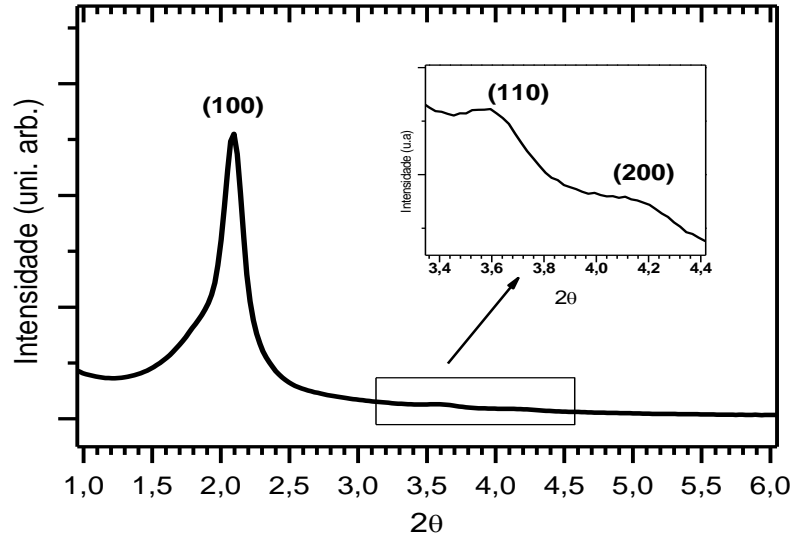
A figura 48(c) mostra ainda uma curva de distribuição de tamanho de partículas obtido a partir da imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O eixo y representa o número de partículas ($n = 350$) e o eixo x o diâmetro em nanômetros. Observaram-se partículas esféricas uniformes de dimensões entre 0,1 e 1,8 μm , com um tamanho médio de cerca de 600 nm.

O difratograma de raio-X é apresentado na figura 49. Observa-se perfil de difração típico de rede de poros ordenada, com pico principal em baixo em torno de 2θ igual a $2,5^\circ$ e demais reflexões com intensidade menor e normalmente abaixo de 2θ igual a $5,5^\circ$ para a amostra. Pelo menos três sinais de difração correspondentes aos planos com Índice de Miller (hkl) de (100), (110) e (200) foram observados. Estes sinais são característicos da rede

hexagonal, mas os sinais largos mostram que o material não apresenta os poros bem ordenados.

Figura 49: Difratoograma de raios-X das amostras de sílica mesoporosas obtidas por pirólise de aerossol. Índice (hkl).

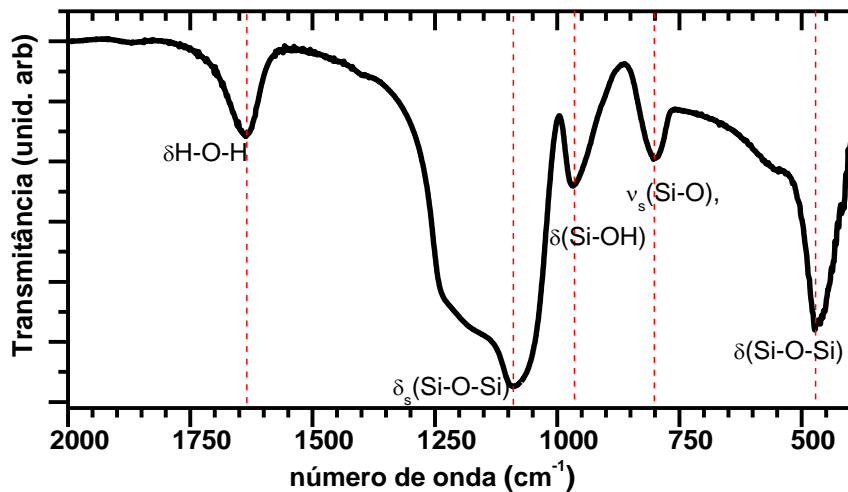
Figure 49: Diffractogramme de Rayons-X des échantillon de silice mesoporeuse. Índice (hkl).



A espectroscopia vibracional na região do Infravermelho também apresentou as bandas referentes às vibrações fundamentais da rede de sílica em 465 cm^{-1} correspondente a $\delta(\text{Si-O-Si})$, 800 cm^{-1} $v_s(\text{Si-O})$, 965 cm^{-1} $\delta(\text{Si-OH})$ e 1085 cm^{-1} $v_{as}(\text{Si-O-Si})$ (figura 40)¹⁰⁹. Bandas na região de 3476 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , também foram observadas, indicando a presença de água adsorvida na superfície (figura 50).

Figura 50: Espectro vibracional no infravermelho para amostras de SiO_2 mesoporosa.

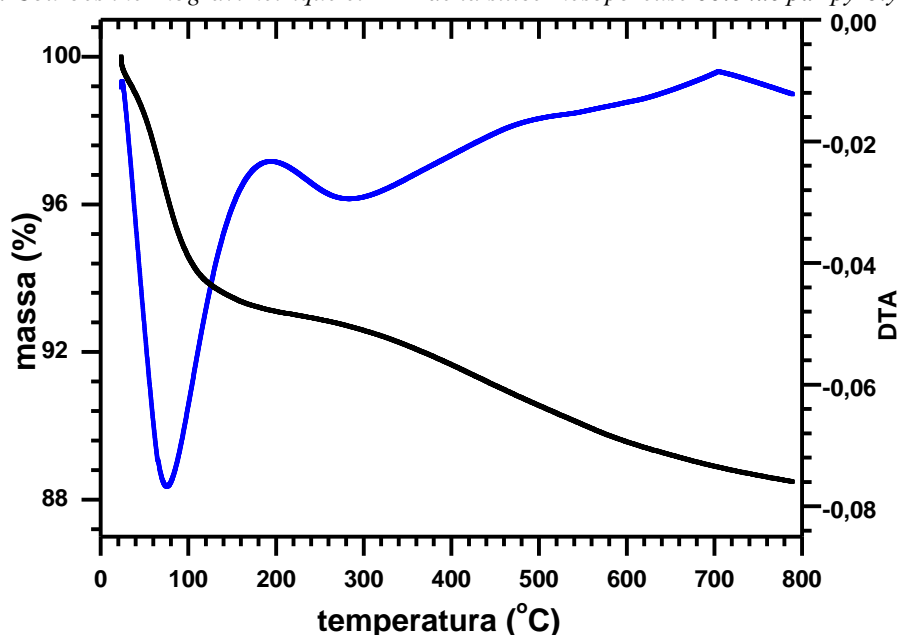
Figure 50: Spectre IRTF des particules de silice mesoporeuse.



A estabilidade térmica do material foi analisada através da termogravimetria (TG) (figura 51). Observa-se uma perda de massa total de 12%. O evento inicial que ocorre entre 22°C e ~150°C se deve a perda de moléculas de água adsorvida no material. O restante é uma reação de desidroxilação que consideramos na faixa de 200-700°C. A curva DTA apresenta somente eventos de perdas de massa, e nota-se que, acima de 700°C há ainda perda de massa, característico da desidratação total da sílica, que é superior a 1200°C.

Figura 51: Análise termogravimétrica de sílica mesoporosa.

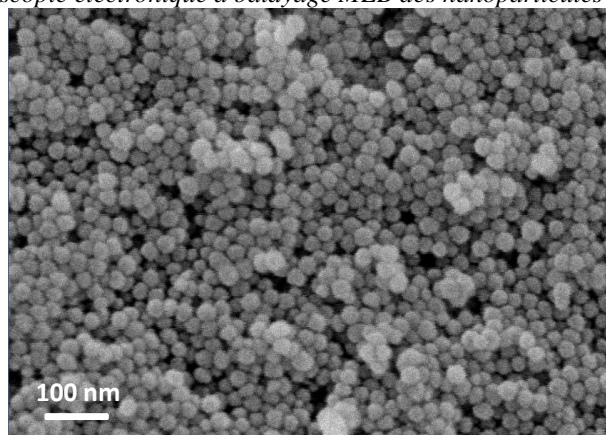
Figure 51: Courbes thermogravimétrique et ATD de la sílice mesoporeuse obtenue par pyrolyse d'aérosol



A sílica Ludox AS-40 (figura 52) apresentasse na forma de uma solução coloidal pH9 com 40% em água, e uma superfície específica de 138m²/g.

Figura 52: Microscopia eletrônica de varredura das partículas de sílica Ludox AS-40.

Figure 52: Cliché de microscopie électronique à balayage MEB des nanoparticules de sílice Ludox AS-40



Para a preparação dos híbridos utilizou-se as duas matrizes de sílica citadas acima. Suas características morfológicas bem definidas e as propriedades são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Característica da sílica mesoporosa e da sílica comercial Ludox AS-40.

Tableau 3: Caractéristiques des matrices de silice utilisées dans ce travail

Partícula	Diâmetro das partículas (nm)	Grupos silanóis por nm ²	Superfície específica (m ² /g)
SiO ₂ -mesoporosa	600	2	860 ± 3
SiO ₂ - ludox AS40	24 ± 2	5	138 ± 1

O número de silanóis por nanômetro quadrado foi obtido por TG. O valor obtido para a sílica Ludox AS-40 foi de 5 silanóis por nm² e esta de acordo com o valor encontrado na literatura¹³². Para a sílica mesoporosa obtemos 2 silanóis por nm² calculado a partir de uma perda de massa de 4,4% e área superficial obtida por BET. O baixo valor é devido a elevada temperatura de preparação da sílica mesoporosa, mas a grande área superficial deste material, ainda o torna de grande interesse para a síntese de ancoragem dos complexos sililados.

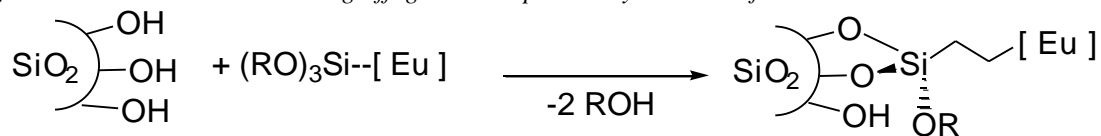
Sendo assim, as amostras pelo processo de pirólise de aerossol apresentaram bom resultados, possibilitando a obtenção de um material com alto grau de organização dos poros, sem resíduos orgânicos e com plenas condições de posteriores funcionalização de sua superfície. A sílica comercial Ludox As-40 apresenta-se na forma de partículas monodispersas a pH = 9 e também, apresenta as características satisfatórias para a utilização como matrizes para a ancoragem de complexos com função alcoxilanos.

3.2. Ancoragem de complexos de európio em partículas de sílica mesoporosa e Ludox AS-40

A metodologia de ancoragem de complexos de európio com função alcoxilano em sílica amorfa, mesoporosas ou Ludox-AS40 foi baseado no trabalho de Cousinié et al^{98; 109}, e o mesmo protocolo foi utilizado, independentemente da matriz de sílica usada. A ligação covalente entre o complexo e a sílica é obtida por hidrólise e condensação das funções alcoxilano sobre os grupos silanóis da sílica (figura 53).

Figura 53: Esquema de síntese dos complexos de európio sililados na superfície de sílica.

Figure 53: Schéma réactionnel du greffage des complexes silylés à la surface de la silice.



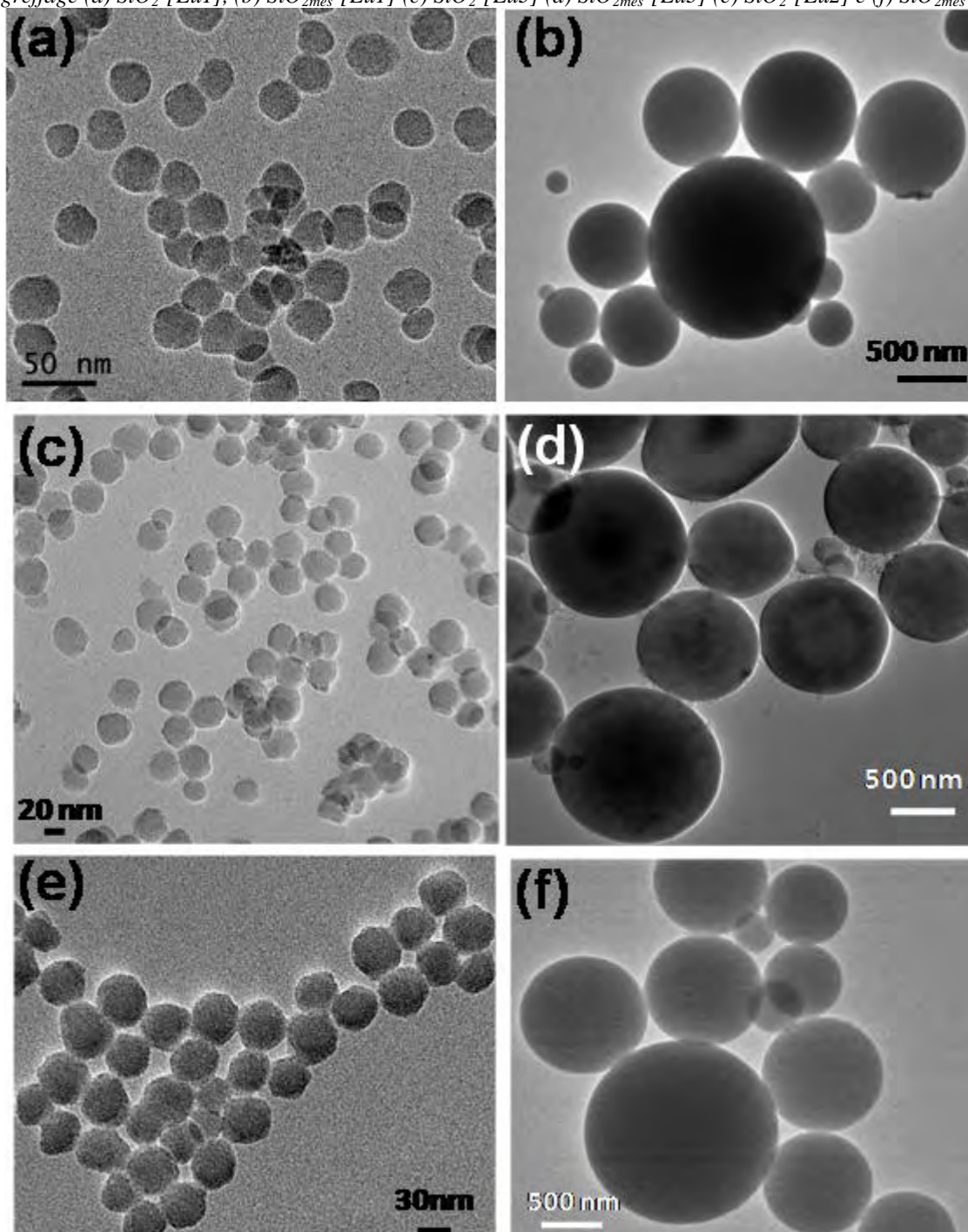
R = Me, Et, H

A razão de complexo adicionado pela massa de sílica foi de 0,9 mmol/g [Eu1], 0,8 mmol/g [Eu2] e 0,75 mmol/g [Eu3], estes valores são suficientes para obtenção de uma monocamada de complexo, evitando a polimerização destes, como mostra Cousinie et al⁹⁸.

Em todos os casos, os híbridos resultantes mantêm a sua morfologia original, como mostrado na figura 54. A ancoragem sob Ludox AS-40 leva à produção de nanohíbrido monodispersos com um tamanho inferior a 30 nm e, independentemente do complexo (figura 54 **a**, **c** e **e**). Para os híbridos de sílica mesoporosa, o tamanho e distribuição também são preservados, como mostra a figura 54(**b**, **d** e **f**).

Figura 54: Fotos de MET das partículas de sílica com os complexos ancorados sendo: (a) $\text{SiO}_2\text{-[Eu1]}$, (b) $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu1]}$ (c) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ (d) $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu3]}$ (e) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ e (f) $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]}$

Figure 54: Clichés de microscopie électronique à transmission MET des particules des hybrides obtenus par greffage (a) $\text{SiO}_2\text{-[Eu1]}$, (b) $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu1]}$ (c) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ (d) $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu3]}$ (e) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ e (f) $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]}$



Os resultados de análise elementar (parte experimental; item 1.12) permitiram obter a quantidade de complexo ancorado na superfície da sílica. Observa-se que a quantidade incorporada não é em função do tipo de complexo e sim da natureza do grupo alcoxissilanos empregado. Vale ressaltar também, que segundo Cousinié et al⁹⁸, quando a quantidade de

ancoragem é menor que 1 mmol/g o impedimento estérico do complexo previne a formação de oligômeros, ocorrendo assim só a formação de uma monocamada.

A tabela 4 apresenta a eficiência de ancoragem, R, expressa em mmol de complexo por grama de sílica. Estes valores são calculados a partir da análise elementar baseado nas quantidades de nitrogênio ([Eu1] e [Eu2]) e enxofre ([Eu3]). Estes valores estão na faixa de 0,21-0,44 mmol/g que estão de acordo com a literatura para a formação de uma monocamada de complexo sobre as partículas de sílica.

Tabela 4: Tamanho, eficiência de ancoragem (em mmol do complexo por grama de sílica) e número de complexos por nm² dos híbridos à base de sílica.

Tableau 4: Taille, taux de greffage (en mmol du complexe par gramme de silice) et le nombre de complexes par nm² caractérisants les hybrides à base de silice.

Partículas	Tamanho (nm)	R (mmol/g de SiO ₂)	Número de complexo por nm ²
SiO ₂ -[Eu1]	29±3	0,26	1,1
SiO ₂ ^{meso} -[Eu1]	60 – 2000	0,52	0,4
SiO ₂ -[Eu2]	28±2	0,30	1,3
SiO ₂ ^{meso} -[Eu2]	60 – 1000	0,64	0,5
SiO ₂ -[Eu3]	28 ± 3	0,21	0,9
SiO ₂ ^{meso} -[Eu3]	60 – 1000	0,41	0,3

Na comparação entre as duas matrizes escolhidas neste trabalho, pode-se observar que a eficiência de ancoragem em mmol de complexo por grama de sílica é maior na sílica mesoporosa que na sílica Ludox AS-40. Isto pode ser justificado pela maior superfície específica da sílica mesoporosa (860m²/g) em relação a As40 (138 m²/g).

O número de complexos ancorados por nm² podem ser calculado observando-se a eficiência de ancoragem e a superfície específica das matrizes antes da ancoragem. Aproximadamente um complexo de európio por nm² é ancorado em sílica Ludox AS-40, enquanto uma faixa de 0,3-0,5 de complexo de európio por nm² é ancorado em sílica mesoporosa. Esta diferença pode ser devido à presença de hidroxilas disponível para ancoragem, podendo ser menor na sílica mesoporosa, pois este material é submetido a tratamento térmico para ativação dos grupos, que não ocorre para a solução aquosa de Ludox AS-40, e outra razão que pode justificar este fenômeno é que a ancoragem na mesoporosa pode indisponibilizar alguns poros.

A relação de ancoragem observada para a sílica mesoporosa é significativamente maior que do exemplo citado na literatura de ancoragem de európio em MCM-41 já com o ligante alcóxissilanos, onde apresenta uma eficiência de 0,13 mmol/g¹³³. Esta metodologia é bastante citada na literatura, onde é inicialmente ancorado na superfície de sílica (partículas mesoporosa, wafers, filmes) moléculas de β -dicetonas modificadas com grupos alcóxissilanos. E em seguida, estas são adicionadas em soluções de sais ou complexos de lantanídeos^{83; 89; 134}.

Os dados obtidos para medidas de reflectância difusa no IV (DRIFT, do inglês Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform) nos permitem encontrar os sinais específicos dos complexos. Na região de 1000-1400 cm⁻¹ é possível observar as vibrações características dos ligantes. A Banda de vibração ν C=C (ligante bipyridina) e ν C=O dos ligantes dicetonatos são observados na região de 1600 cm⁻¹.

A Tabela 5 mostra as posições de bandas e respectivas atribuições para as vibrações características dos complexos encontrados nos espectros obtidos por reflexão difusa.

Tabela 5: Dados DRIFT para cada um dos híbridos.

Tableau 5: Nombre d'ondes (DRIFT) des vibrations principales observées pour chacun des hybrides.

Partículas	Bandas na região do Infravermelho (cm ⁻¹)		
	ν_s (C=O)	δ (NH)	ν (Si-O-Si)
SiO ₂ -[Eu1]	1607	1488	1120
SiO _{2meso} -[Eu1]	1612	1492	1126
SiO ₂ -[Eu2]	1517	1460	1151
SiO _{2meso} -[Eu2]	1519	1456	1153
SiO ₂ -[Eu3]	1635	--	1231
SiO _{2meso} -[Eu(3)]	1632	--	1239

Foi possível, portanto ancorar complexos de európio a matrizes de sílica, conservando o tamanho e forma da partícula, com uma eficiência de ancoragem entre 0,21-0,64 mmol/g.

Os mesmos complexos foram incorporados a sílica obtida in-situ pela metodologia de microemulsão inversa (W/O) com descrito a seguir.

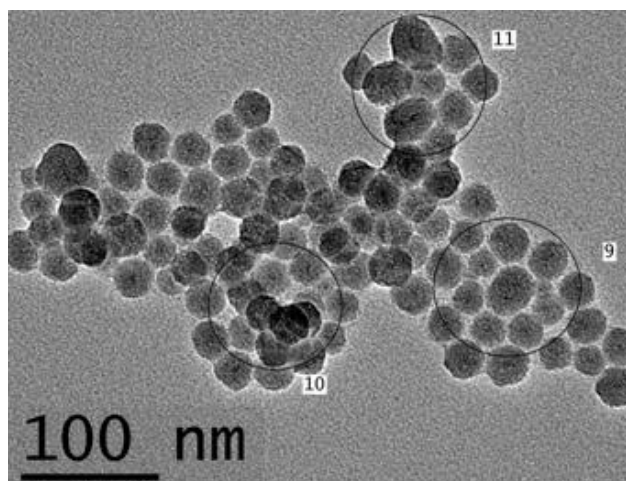
3.3. Incorporação de complexos de európio em sílica pela metodologia de microemulsão inversa (W/O)

A incorporação em sílica de luminóforos inorgânicos como o complexo tris(bipiridina)rutenio(II) é relatada na literatura^{51; 53; 135}, mas poucos exemplos de incorporação de complexos de európio em sílica usando a metodologia Stöber podem ser encontrados⁹⁷. Podemos citar o trabalho de Lourenço et al¹⁵⁸ que apresenta o processo de obtenção de partículas de sílica amino-funcionalizadas incorporando complexos de TR³⁺ com os ligantes benzenotricarboxilatos (EMA, TLA) utilizando os métodos de Stöber e por micro-ondas. A limitação deste método é a obtenção de partículas sem uma morfologia definida.

Inicialmente, realizou-se a incorporação de complexos de európio em nanopartículas de sílica utilizando como base a metodologia de Tan et al^{53; 76} uma microemulsão inversa utilizando Triton X-100, hexanol, ciclohexano e água. Obtivemos partículas esféricas (40-50 nm) (figura 55), mas, análises de EDX (regiões marcadas na microscopia) e luminescência mostraram que não havia a presença de európio no material.

Figura 55: Microscopia de transmissão as partículas de sílica preparadas pela metodologia de Tan et al^{53; 76}

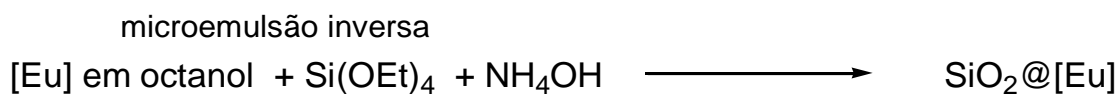
Figure 55: Cliché de microscopie électronique à transmission MET des particules obtenues par la méthode de Tan^{53; 76}



Então, diversos parâmetros como temperatura, concentração de amônia (0,15-0,40 mmol), surfactante (TritonX100, AOT), co surfactante (hexanol, octanol), foram variados na adaptação da metodologia. As condições otimizadas levaram a substituição de hexanol por octanol e diminuição na relação molar do co-surfactante e surfactante para 5-4,1. O complexo foi adicionado juntamente com o co-surfactante (figura 56).

Figura 56: Esquema da reação de incorporação dos complexos sililados em nanopartículas de sílica por microemulsão inversa (W/O)

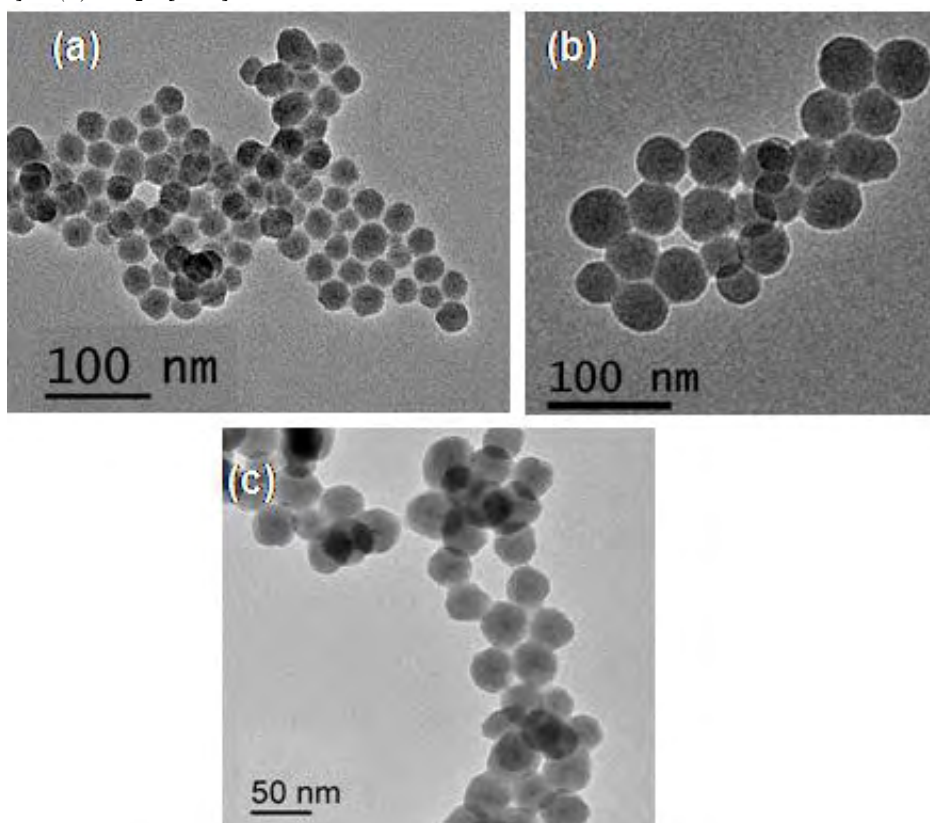
Figure 56: Schéma réactionnel de synthèse de nanoparticules de silice incorporant le complexe silylé



Nessas condições foram obtidas partículas esféricas, de tamanho uniforme e com os complexos incorporados. A figura 57 apresenta as fotos de microscopia eletrônica de transmissão dos híbridos, $\text{SiO}_2@[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{bpy-Si})]$, $\text{SiO}_2@[\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{Bpy-Si}]$ e $\text{SiO}_2@[\text{Eu}(\text{TTA-Si})_3]$.

Figura 57: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos seguintes híbridos: (a) $\text{SiO}_2@[\text{Eu}1]$, (b) $\text{SiO}_2@[\text{Eu}2]$ e (c) $\text{SiO}_2@[\text{Eu}3]$

Figure 57: Image de microscopie électronique à transmission MET des hybrides. a) $\text{SiO}_2@[\text{Eu}1]$, (b) $\text{SiO}_2@[\text{Eu}2]$ et (c) $\text{SiO}_2@[\text{Eu}3]$



A eficiência de incorporação do complexo é mostrada em mmol do complexo por grama de sílica, determinada a partir de análise elementar (Tabela 6).

Tabela 6: Tamanho e eficiência de incorporação (em mmol do complexo por grama de sílica) dos híbridos à base de sílica.

Tableau 6: Taille et taux d'incorporation (en mmol du complexe par gramme de silice) des hybrides à base de silice.

Partículas	Tamanho (nm)	Eficiência de incorporação (mmol /g de SiO ₂)
SiO ₂ @[Eu1]	45 ± 5	0,31
SiO ₂ @[Eu2]	45 ± 5	0,31
SiO ₂ @[Eu3]	45 ± 5	0,12

O processo de incorporação foi bem sucedido permitindo a incorporação de uma quantidade interessante dos complexos. Este valor está de acordo e ligeiramente superior à observado por Yuan et al⁷⁶ na incorporação do complexo [Tb(BPTA)]. Neste último, avaliaram a reação de incorporação de aproximadamente 1500 complexos por nanopartículas de 42 nm de diâmetro, que pode ser representado por 0,034 mmol/g.

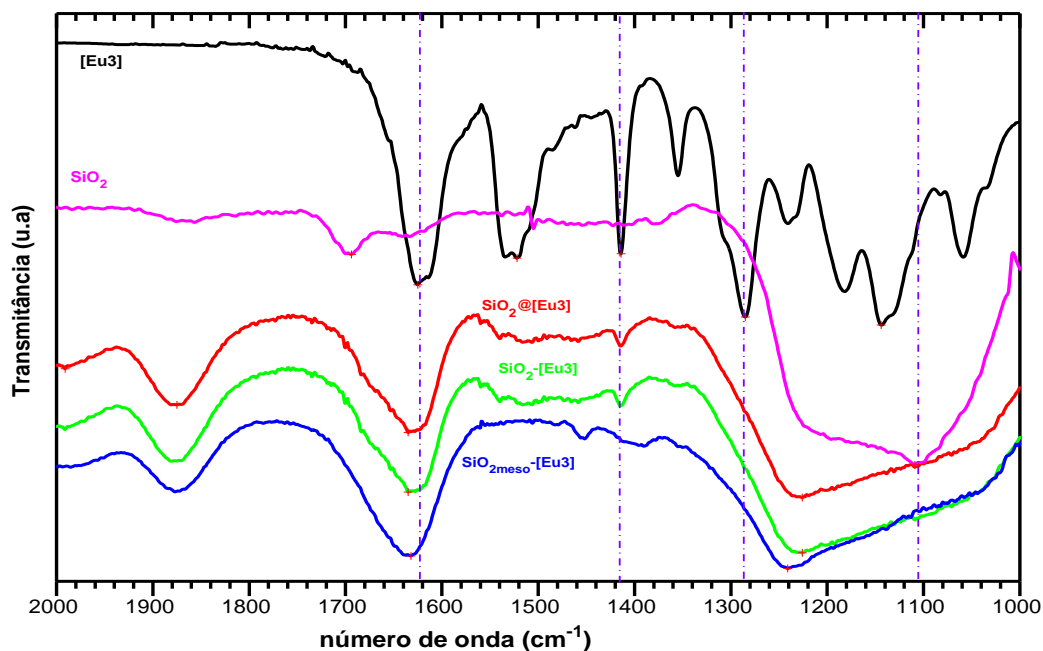
Nos espectros DRIFT podem-se observar as bandas de vibração dos complexos. Um exemplo é mostrado na figura 58 (do complexo [Eu3] e os híbridos). O espectro DRIFT mostrar a presença do complexo de európio em cada matriz de sílica com a banda de estiramento C=O da dicetona em 1630 cm⁻¹ juntamente com uma 1414 cm⁻¹ $\nu(\text{C}=\text{C} + \text{C}=\text{S})$. A banda larga em $\nu_{\text{as}}(\text{Si}-\text{O}-\text{Si})$ da sílica é deslocada para maior energia devido a presença das bandas 2230-1050 $\nu(\text{Si}-\text{C}) + \nu(\text{Si}-\text{O}) + \delta(\text{Si}-\text{O}-\text{C})$ dos complexos. As bandas são menos intensas no híbrido incorporado devido a baixa quantidade de complexo incorporado comparado a quantidade de complexos ancorados.

Tabela 7: Dados DRIFT para cada um dos híbridos

Tableau 7: Nombre d'ondes (DRIFT) des vibrations principales observées pour chacun des hybrides.

Partículas	Bandas na região do Infravermelho (cm ⁻¹)	
	$\nu_{\text{S}}(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{Si}-\text{O}-\text{Si})$
SiO ₂ @[Eu1]	1630	1126
SiO ₂ @[Eu2]	1521	1154
SiO ₂ @[Eu3]	1627	1128

Figura 58: Espectro na região do infravermelho para o complexo [Eu3] e DRIFT para os híbridos.
Figure 58: Spectre infrarouge DRIFT du complexe [Eu3] et des hybrides correspondants.

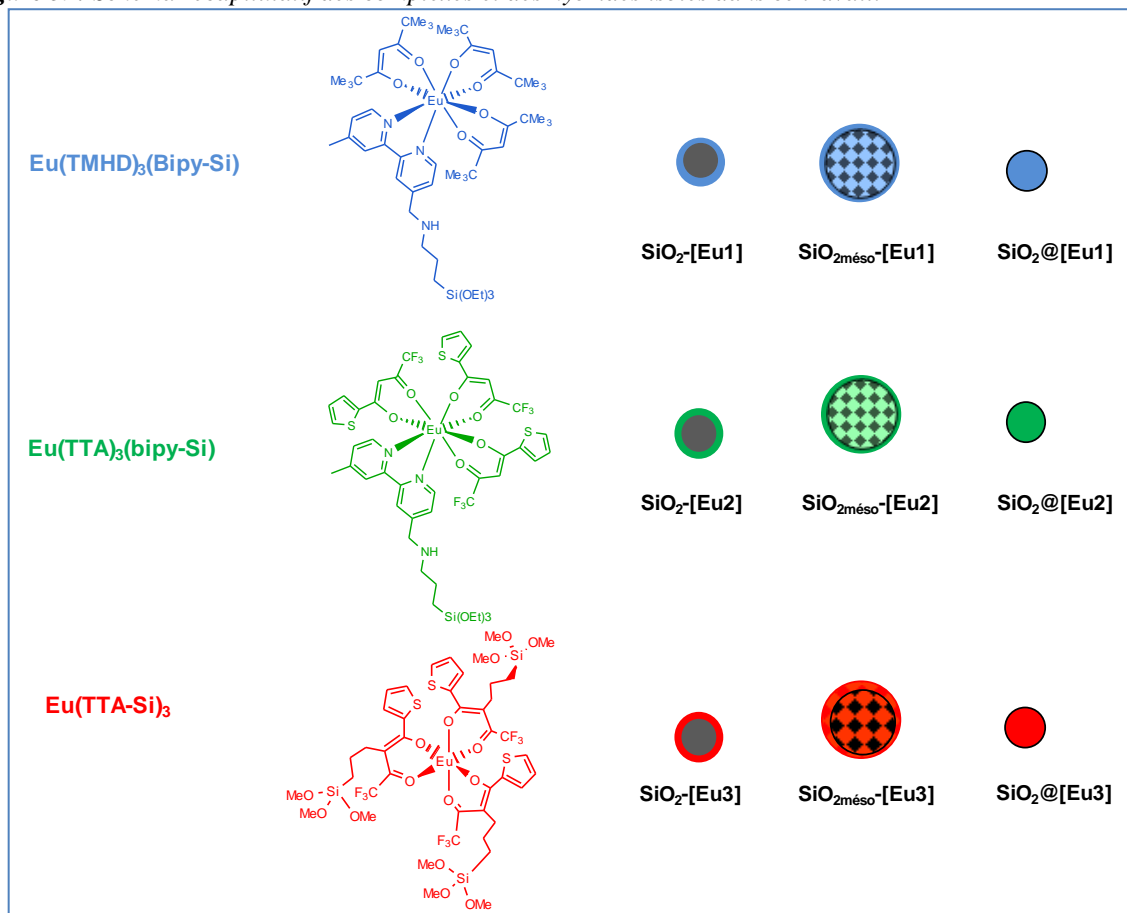


Com o método de microemulsão inversa foi possível sintetizar nanopartículas de tamanho homogêneo (45 nm) incorporando por ligação covalente, os complexos de európio [Eu1], [Eu2] e [Eu3]. O interesse nestes híbridos é devido à possibilidade de funcionalização da superfície.

Baseando-se nas metodologias de ancoragem e incorporação, nove híbridos foram preparados e caracterizados, e suas propriedades de luminescência serão avaliadas e comparadas.

Figura 59: Esquema dos complexos e híbridos obtidos neste trabalho.

Figure 59: Schéma récapitulatif des complexes et des hybrides isolés dans ce travail.



4. Propriedades de luminescência

4.1. Luminescência dos Complexos [Eu1], [Eu2] e [Eu3]

A fotoexcitação direta dos íons lantanídeos (Ln^{3+}) não é muito eficiente, como mostrado no capítulo 4 (resultados e discussão) devido à seção de choque de absorção reduzida ($\sigma_{\text{abs}} < 4,0 \times 10^{-20} \text{ cm}^2$). Essa dificuldade pode ser superada, como conhecido há décadas, pelo desenvolvimento de complexos de íons lantanídeos onde os ligantes além de proporcionarem o aumento da absorção de luz, transferindo energia para o Ln^{3+} , protegem o íon ativo de possíveis interações com moléculas de solvente que eventualmente levem a supressão da emissão¹³.

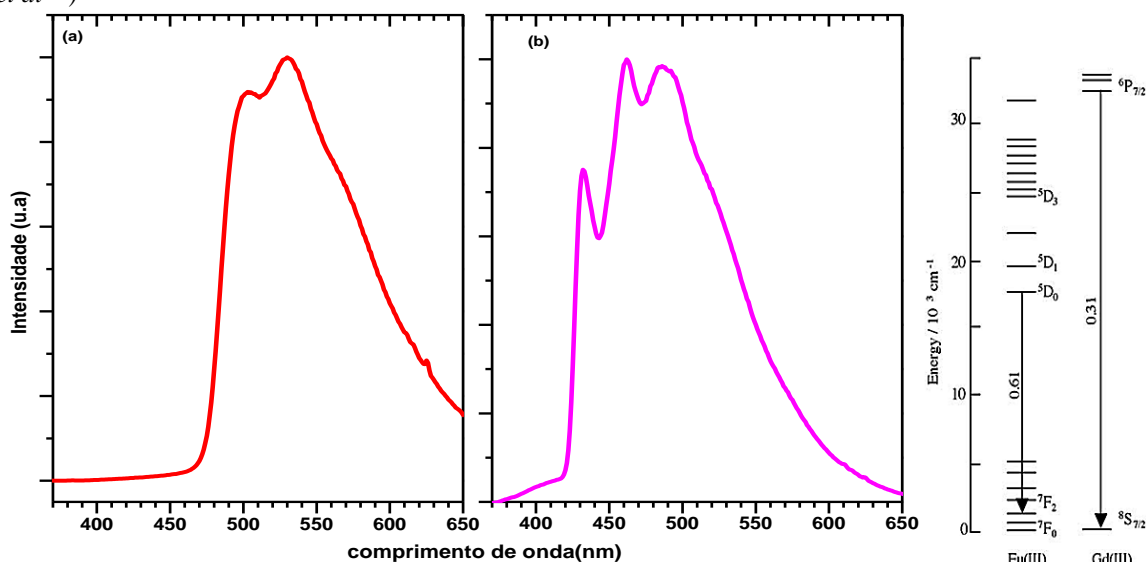
Para conhecer o nível de energia do estado tripleto dos ligantes utilizados, nós partimos do estudo de complexos similares de gadolínio. O primeiro estado excitado do íon Gd^{3+} (${}^6\text{P}_{7/2}$) é observado em 32000 cm^{-1} , então não há emissão desse íon na região do visível e

também, esta energia é mais elevada do que o estado T_1 da grande maioria dos ligantes. Logo toda a luminescência observada se refere aos ligantes.

Detalhes sobre os estados singleto e tripleto dos ligantes TTA-Si e bpy-Si foram obtidos dos espectros de emissão e excitação dos complexos de gadolínio $[Gd(TTA)_3(Bpy-Si)]$, $[Gd2]$ e $[Gd(TTA-Si)_3]$, $[Gd3]$ à temperatura do nitrogênio líquido. Os espectros de emissão e excitação são apresentados na figura 60.

Figura 60: Espectros de emissão obtidos a 77K para os complexos (a) $[Gd(TTA)_3(Bpy-Si)]$ ($\lambda_{em} = 530nm$; $\lambda_{ex} = 320 nm$, l) (b) $[Gd(TTA-Si)_3]$ ($\lambda_{em} = 462nm$; $\lambda_{ex} = 336 nm$). (c) Níveis de energia dos íons Eu^{3+} e Gd^{3+} . (Hasegawa et al¹³⁶)

Figure 60: Spectre d'émission obtenu à 77K pour le complexes (a) $[Gd(TTA)_3(Bpy-Si)]$ ($\lambda_{em} = 530nm$; $\lambda_{ex} = 320 nm$) (b) $[Gd(TTA-Si)_3]$ ($\lambda_{em} = 462nm$; $\lambda_{ex} = 336 nm$). (c) Les niveaux d'énergie des ions Eu^{3+} e Gd^{3+} . (Hasegawa et al¹³⁶)



As emissões dos complexos $[Gd2]$ e $[Gd3]$ são observadas entre 400-600 nm e atribuída as transições à partir do estado tripleto dos ligantes. Os estados tripletos dos ligantes TTA e Bpy-Si para o complexo $[Gd2]$ estão localizados em energias iguais a 19920 e 18832 cm^{-1} . Para o complexo $[Gd3]$, bandas bem definidas a 23255, 21739 e 20830 cm^{-1} também podem ser observadas.

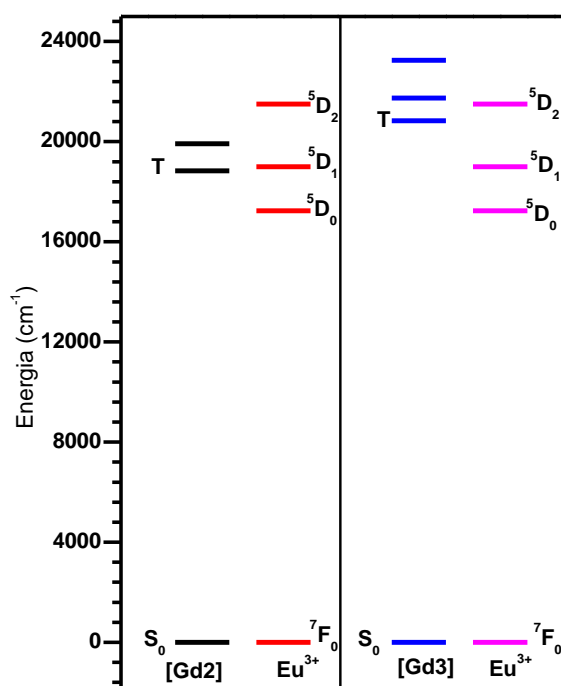
Estas bandas podem ser atribuídas a diferentes emissões dos estados tripleto, ou também podem ser devido a replicas vibrônicas observadas quando a superposição das bandas de emissão do tripleto¹³⁷. A posição relativa dos níveis de energia dos ligantes obtidos a partir do espectro dos complexos de gadolínio comparados aos níveis de energia conhecidos para o íon Eu^{3+} pode ser representado na figura 61. Nos dois casos a transferência de energia do

ligante para os níveis de energia do európio são possíveis, isso justifica o interesse de utilizar estes ligantes para excitar a luminescência do íon európio.

As energias nos níveis tripleto dos ligantes TTA-Si é comparável aos ligantes TTA¹³⁸ sem o grupo alcoxisilano. O fato de as bandas de emissão dos estados tripleto dos ligantes não serem observados nos espectros de [Eu2] e [Eu3] sugere uma transferência de energia não radiativa eficiente dos ligantes para os íons Eu³⁺.

Figura 61: Representação dos níveis de energia dos ligantes baseado nos complexos de gadolínio, e os níveis de energia do íon európio.

Figure 61: Représentation des niveaux d'énergie des ligands basés sur les complexes de gadolinium, et des niveaux d'énergie de l'ion Eu³⁺.



Os complexos e híbridos foram caracterizados nos item 1 e 2 deste capítulo e aqui são apresentadas as propriedades de luminescência destes materiais no estado sólido e em solução (2,5x10⁻⁵ mol/L em acetonitrila), à temperatura ambiente.

Os espectros de emissão dos complexos e precursores são apresentados na figura 62, e todas as transições atribuídas na tabela 8.

Os espectros de emissão dos complexos [Eu1], [Eu2] e [Eu3] no estado sólido, apresentam os picos característicos das transições intraconfiguracional (4f⁶→4f⁶) dos níveis ⁵D₀ para ⁷F₀₋₄, com excitação a 365 nm. Comparando com os precursores [Eu(TTA)₃(H₂O)₂] e [Eu(TMHD)₃] a transição ⁵D₀ → ⁷F₂ tem um desdobramento menos característico, sugerindo

uma maior distorção de geometria do complexo. A transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ tem uma intensidade considerável e apresenta apenas uma linha, que é consistente com um único sítio a ser ocupado pelo íon Eu^{3+} .

Os complexos similares a [Eu1] e [Eu2], sem os grupo alcoxisilano são conhecidos na literatura $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy})]^{139}$ e $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{Bpy})]^{140}$ e os espectros de emissão são similares, e segundo Binnemans et al ²⁹, a adição da biperidina.

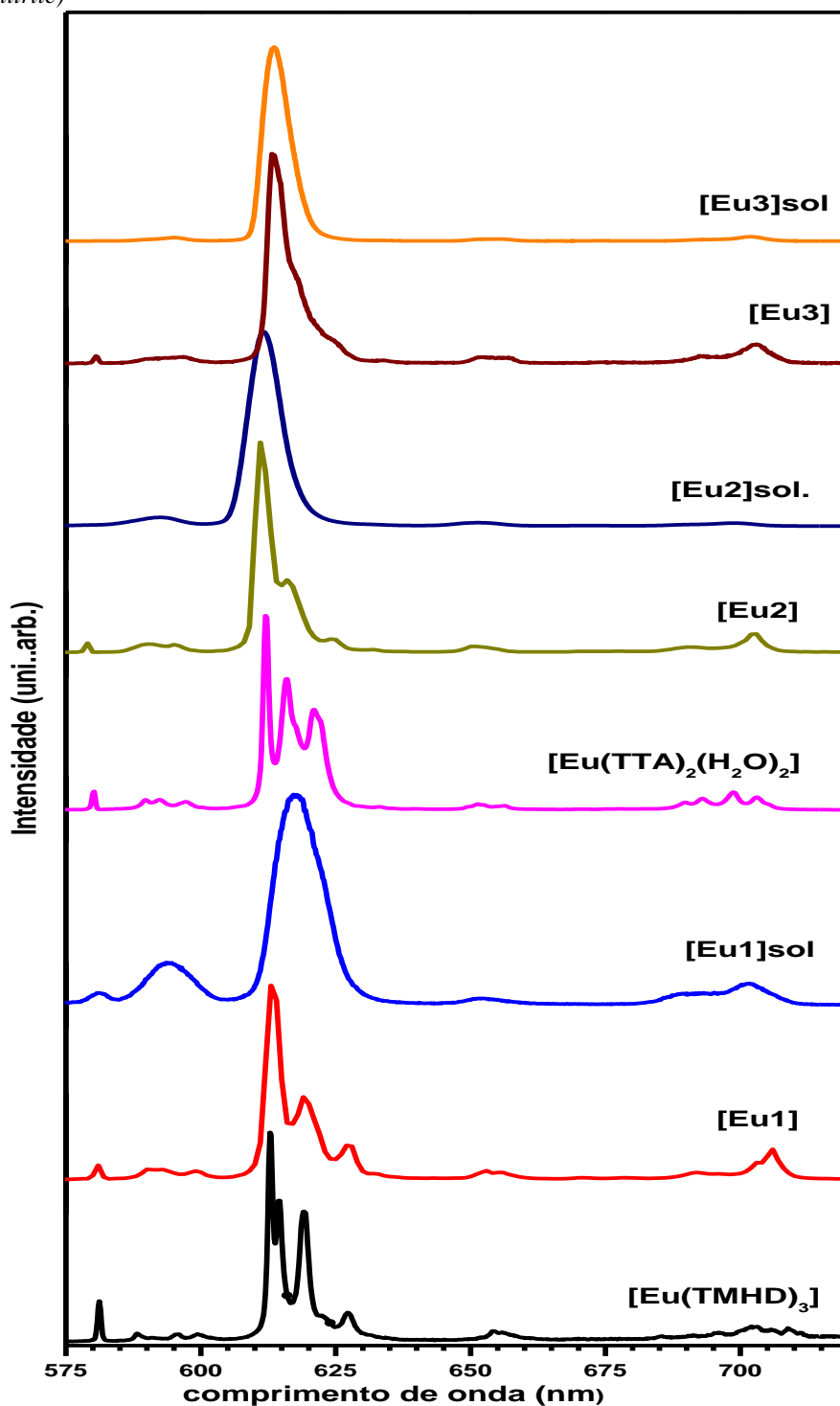
Tabela 8: Atribuição das transições características dos complexos sintetizados.

Tableau 8: Attribution des transitions caractéristiques des complexes synthétisés à l'état solide et en solution

COMPLEXOS	Comprimento de onda das transições (nm)				
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$
Eu(TMHD) ₃	581	588; 595; 599	612; 614; 619;	654	696; 704; 709
[Eu1]	581	591; 599	613; 619; 627	652	698; 703;
[Eu1] solução	580	594	615	650	701
[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂]	580	589; 592; 597	612; 615; 620	650	689; 693; 698; 702
[Eu2]	580	590; 595	611; 615; 624	650	690, 702
[Eu2] solução	581	592	611	650	698
[Eu3]	580	591; 596	613	653	696; 703;
[Eu3] solução	580	595	613	652	702

Figura 62: Espectros de emissão ($\lambda_{ex}=365\text{nm}$) dos complexos no estado sólido e em solução (2,5mol/L em acetonitrila)

Figure 62: Spectres d'émission ($\lambda_{em}=365\text{nm}$) des complexes à l'état solide et en solution (2,5mol/L, acétonitrile)

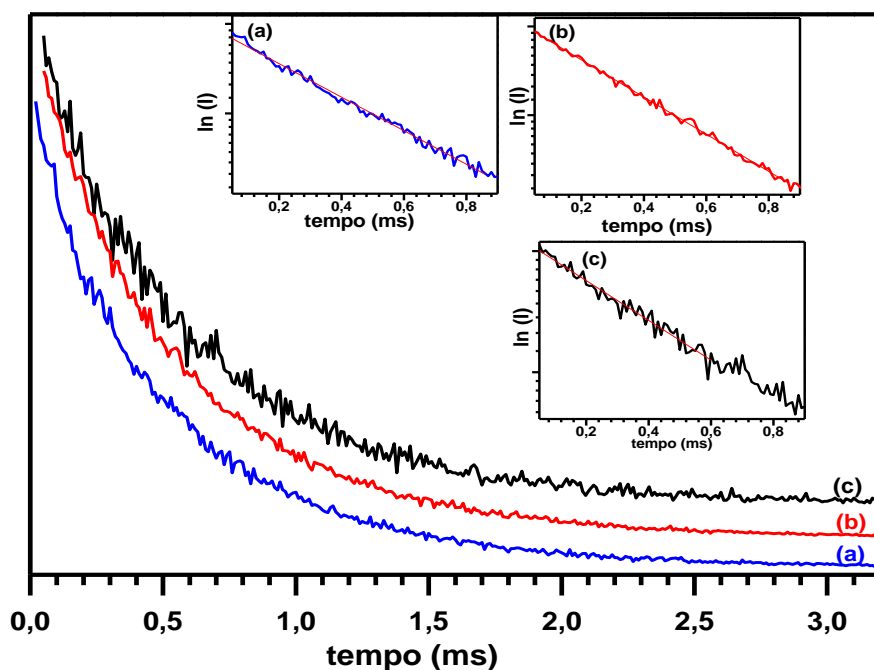


As curvas de decaimento de luminescência, figuras 63, com emissão monitorada em ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$, podem ser ajustadas com uma função exponencial simples (equação 8). Os valores

obtidos para tempo de vida experimental são: [Eu1] $0,50 \pm 0,05$ ms; [Eu2] $0,60 \pm 0,06$ ms e [Eu3] $0,56 \pm 0,06$.

Figura 63: Curva de Decaimento da luminescência do nível emissor do nível 5D_0 do complexo (a) [Eu1] medido a emissão a 609 nm e excitação a 365 nm; (b) [Eu2] medido a emissão de 613 nm e excitação a 365 nm; (c) [Eu3] medido a emissão de 611 nm e excitação a 365 nm. Os insets mostram o decaimento na função $\ln(I)$ vs tempo (ms) para os mesmos.

Figure 62: Déclins de la luminescence du niveau émetteur 5D_0 des complexes (a)[Eu1] mesurée $\lambda_{em}=609$ nm ; (b) [Eu2] mesurée $\lambda_{em}=613$ nm ; (c) [Eu3] mesurée $\lambda_{em}=611$ nm ; $\lambda_{ex}=365$ nm. Les encarts montrent la décroissance $\ln(I)$ vs le temps (ms).



Como descrito no capítulo 4 (item 2), a partir dos espectros de emissão pode-se obter os valores do tempo de vida radiativo (τ_{RAD}), necessários para os cálculo de eficiência quântica de emissão e parâmetros de intensidade Judd-Ofelt (Ω_λ). Os valores são apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Probabilidade de emissão espontânea de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q), número de osciladores OH (N_{OH} e N_{H_2O}) e rendimento quântico (ϕ) dos complexos.

Tableau 9: Probabilités d'émission spontanée d'Einstein (A_{RAD}), durées de vie radiatives et expérimentales (τ_{RAD} , τ_{EXP}), efficacité d'émission (q); nombre d'oscillateurs OH (N_{OH} e N_{H_2O}) et de 5D_0 rendement quantique (ϕ) des complexes.

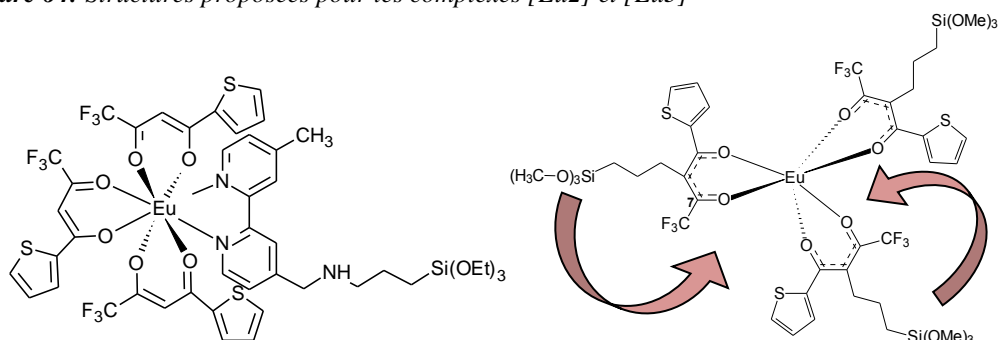
Complexo	A_{RAD} (ms^{-1})	τ_{RAD} (ms)	τ_{EXP} (ms)	q	N_{OH}	N_{H_2O}	ϕ
[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂]	0,79	1,26	0,26	0,21	5,5	3	
[Eu1]	0,79 ± 0,04	1,26 ± 0,06	0,50 ± 0,05	0,40 ± 0,06	0	1	-
[Eu2]	1,02 ± 0,05	0,98 ± 0,05	0,60 ± 0,06	0,61 ± 0,12	0	0	-
[Eu3]	1,15 ± 0,06	0,87 ± 0,04	0,56 ± 0,06	0,64 ± 0,10	0	0,4	-
[Eu1] sol.	1,11 ± 0,05	0,89 ± 0,04	0,35 ± 0,03	0,39 ± 0,05	1,2	1,6	-
[Eu2] sol.	1,30 ± 0,06	0,77 ± 0,04	0,51 ± 0,05	0,66 ± 0,09	0,9	0,4	0,53 ± 0,07
[Eu3] sol.	0,75 ± 0,04	1,33 ± 0,07	0,60 ± 0,06	0,45 ± 0,05	0,6	0,7	0,30 ± 0,03

A eficiência quântica (q) dos complexos [Eu2] e [Eu3], respectivamente de 61 e 64% são bem superiores aos relatados na literatura para o complexo [Eu(TTA)₃(H₂O)₂]¹²², isto é devido a substituição das águas coordenadas ao íon európio pela biperidina. Se utilizarmos a equação 19²⁶, podemos estimar o número de moléculas de água ou osciladores OH na esfera de coordenação do íon európio. Baseado nisso, o complexo [Eu2] não possui moléculas de água na esfera de coordenação do európio, já para o complexo [Eu3] o valor obtido foi $N_{H_2O} = 0,40$, e menor comparado com o complexo [Eu(TTA)₃(H₂O)₂] apresenta $N_{H_2O} = 3$. Estes valores são apresentados na tabela 9.

O modelo de cálculo de N_{H_2O} não é adequado para ambientes não hidratados, mas devemos considerar que fornece o acesso a uma série de "equivalente OH" em casos de desexcitação não radiativa. Os valores calculados para N_{H_2O} , no entanto, são úteis para comparar diferentes amostras como fazemos aqui.

Os resultados mostram que o complexo [Eu2] é octacoordenado, através da coordenação de três ligantes dicetona e a dipiridina. Outras técnicas mostram que não a água coordenada ao európio. Observa-se também, que o valor encontrado para [Eu2] em solução é substancialmente o mesmo, o que confirma que o ambiente é inalterado quando o complexo esta em acetonitrila. A figura 64 mostra as estruturas propostas para [Eu2] e [Eu3].

Figura 64: Estruturas propostas para os complexos [Eu2] e [Eu3]
Figure 64: Structures proposées pour les complexes [Eu2] et [Eu3]



Para o complexo [Eu3], por comparação, podemos dizer que os caminhos da desexcitação não radiativa são pouco eficazes (0,8 equivalentes OH). No entanto, neste caso, o európio é coordenado a três ligantes dicetona (figura 64), portanto, um número de coordenação baixo para este lantanídeo. Nós propomos que a esfera de coordenação pode ser estabilizada neste sólido por interações intramoleculares com os átomos de oxigênio de grupos metoxi da função de trimetoxisilano. Isto é possível devido a flexibilidade da cadeia propil podendo considerar, no ponto de vista estrutural (comprimentos de ligação e ângulos), esta estabilização. A diferença entre os valores obtidos para o complexo [Eu3] estado sólido e em solução ($N_{\text{H}_2\text{O}} = 0,67$) reflete a existência, neste último caso de interações intermoleculares entre o centro emissor e moléculas de solvente.

Para o complexo [Eu1], como no complexo [Eu2], podemos considerar que o complexo é estável, pois têm na esfera de coordenação do íon európio três ligantes TMHD e a bipyridina. O cálculo de N não possui moléculas de água na esfera de coordenação do európio.

Um resultado importante que suporta a interação do íon Eu^{3+} com os ligantes TTA, TMHD, Bpy-Si e TTA-Si é o espectro de excitação com emissão monitorada na transição ${}^7\text{F}_2 \rightarrow {}^5\text{D}_0$.

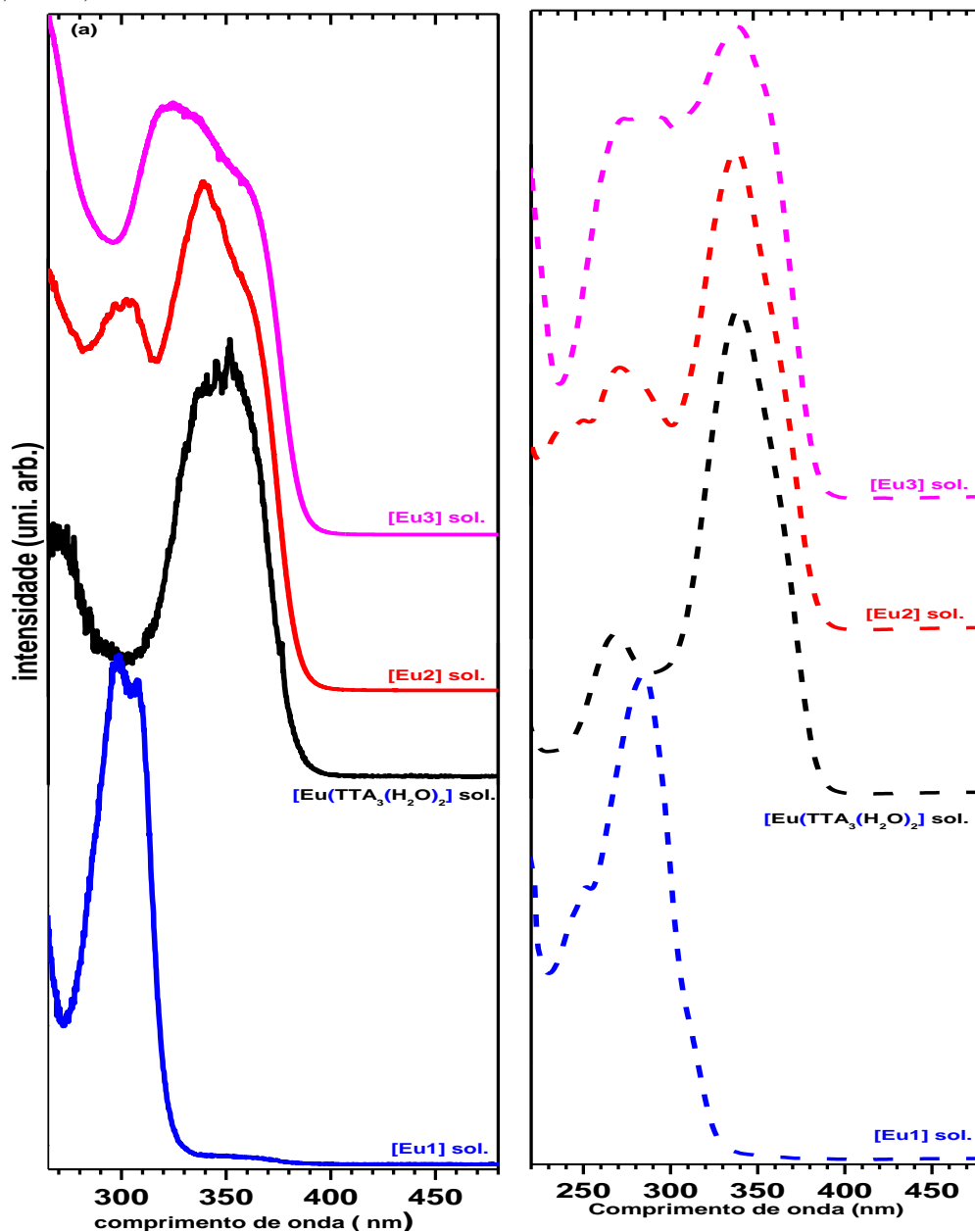
Nos sólidos dos complexos puros, a alta absorção de luz na região do UV (<370nm) leva a efeitos de saturação que resultam em distorções do espectro de excitação, como já foi relatado por Blasse et al¹⁴¹ no estudo de transições vibrônicas. Transições mais fracas aparecem com intensidades artificialmente aumentadas devido a saturação de transições mais fortes. Nos híbridos este efeito de concentração não é observado pela diluição do complexo na matriz e, portanto as bandas no UV aparecem mais intensas. No entanto, nos espectros de excitação em solução podem-se observar as bandas melhor definidas com deslocamento para maior energia (figura 65a).

Os espectros de excitação do complexo em solução apresentam em : [Eu2] duas bandas largas em 338, 304 nm, [Eu3] apresenta uma banda larga em 330nm, e [Eu1] apresenta uma banda em 290 nm.

Note-se também, que os espectros de excitação dos complexos em solução apresentam as bandas similares às bandas largas obtidas nos espectros de absorção (na faixa de 250- 380 nm) (figura 65b), onde são observados os máximos em: [Eu1] 284 nm e 250 nm; [Eu2] 336 nm, 270 nm e 240 nm; [Eu3] 352 nm e 326 nm, referente as transições singleto-singleto do anel de enxofre do sistema β -dicetonas e bipyridina e a banda de transferência de carga $\text{Eu}^{3+}-\text{O}^{2-}$ ^{25; 123}. Segundo Binnemans et al²⁹ a β -dicetona TMHD, não transfere eficazmente para o íon európio, logo só observamos a transferência de energia do ligante Bpy-Si.

Figura 65: (a) Espectros de excitação (monitoradas na transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$) e (b) absorção dos complexos em solução 2,5 mol/L em acetonitrila.

Figure 65: (a) Spectres d'excitation (monitorés à ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$) et (b) spectres d'absorption des complexes en solution 2,5 mol/L, acétonitrile.



O rendimento quântico (ϕ) é a relação entre o número de fótons emitidos e os fótons absorvidos, portanto, leva em conta a transferência não radiativa do ligante para estado excitado do íon Eu^{3+} , o decaimento não radiativo e a emissão resultante.

O rendimento quântico (ϕ) é obtido utilizando-se uma espécie conhecida como referência. Neste trabalho o ϕ dos complexos foi obtido de uma solução dos complexos em acetonitrila, usando o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ como referência ($\phi' = 2,8\%$ em água, $\lambda_{\text{exc}} = 400\text{nm}$). Utilizamos como base para os cálculos (equação 12) os espectros dos

complexos em solução a concentração de $2,5 \times 10^{-6}$ mol/L em acetonitrila para obter o valor *Em* que é a intensidade de emissão obtida pela integração do espectro de emissão com excitação em 365 nm, e *Abs* é a absorvância máxima obtida pelo espectro de absorção da solução a concentração de $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L.

O rendimento quântico obtido para os complexos foi de $\phi_{[Eu2]} = 53\%$ et $\phi_{[Eu3]} = 30\%$. Valores de ϕ podem ser considerados como o produto da eficiência de transferência de energia do ligante para o európio para a eficiência de emissão do Eu^{3+} (q 5D_0) indicado na tabela 9. A razão de ϕ / q indica a eficiência da transferência: que é de 81% em [Eu2] contra 67% em [Eu3]. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Binnemans²⁹, a eficiência da transferência é primariamente relacionadas com a o espectro de emissão de $T_1 \rightarrow S_0$ da parte molecular, medido aqui, no espectro de emissão dos complexos de gadolínio com o espectro de absorção intra- $4F^6$ do íon central.

Como o rendimento quântico foi medido em relação a $[Ru(bipy)_3]Cl_2$, com excitação em 365nm, o complexo [Eu1] não tem banda de excitação eficaz nesta região então o desconsideramos para os cálculos de rendimento quântico.

4.2. Híbridos de sílica com complexos de európio.

Os complexos [Eu1], [Eu2] e [Eu3] foram estudados em sílica mesoporosa, sílica Ludox AS-40 e incorporados em sílica por microemulsão inversa. As figuras 66, 67 e 68 apresentam os espectros de excitação e emissão obtidos para estes híbridos.

O espectro de excitação do complexo [Eu1] sólido (figura 66 (Ia)) está bastante distorcido comparada com o da solução (figura 65), particularmente na região de absorção de bpy (em torno de 280nm) que aparece muito fraco, sugerimos aqui novamente que os espectros são distorcidos por efeitos de saturação. Este efeito, embora não completamente cancelado, por definição, é reduzido quando se considera os espectros dos híbridos, onde nota-se que a excitação é eficaz na banda da bpy para os três híbridos. A banda centrada em 360 nm é atribuída à excitação de transferência de carga $Eu^{3+} \rightarrow O^{2-}(TCML)^{87; 89; 124}$.

Para os três híbridos obtidos com o complexo [Eu2] encontramos nos espectros de excitação (figura 67 (I)) uma banda de excitação eficaz em comprimentos de onda inferior a 380nm, onde observamos nesta região a absorção da banda $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante TTA.

Para os híbridos com o complexo [Eu3], os espectros de excitação (figura 68(I)) apresentam, essencialmente, uma banda eficaz em comprimentos de onda abaixo de 380 nm,

embora atribuímos esta como de absorção $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante TTA-Si, é essencialmente, a mesma do ligante TTA sem o grupo alcoxisilano.

Nos espectros de emissão, as transições características do íon Eu^{3+} foram observadas. Um alargamento inomogêneo de todas as linhas é observado para os híbridos, como consequência de uma distribuição de sítios ocupados pela do íon terra rara.

As curvas de decaimento da luminescência não são exponenciais para os híbridos. Os tempos de vida experimentais (τ_{exp}) foram calculados pela equação 22 e baseado na integral das transições ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_{0-4}$ do espectro de emissão, podemos determinar os valores de tempo de vida radiativo (τ_{rad}).

$$\tau_{\text{exp}} = \frac{\int_0^{\infty} I(t) t dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (22)$$

Os valores de Ω_2 , Ω_4 , A_{RAD} , τ_{EXP} e q são apresentados na tabela 10 e 11.

Os espectros de emissão para os complexos ancorados são similares entre si, o que é comparado com o fato de Ω_2 e Ω_4 serem próximos. Observa-se um moderado alargamento das bandas, especialmente da transição ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$ comparado com os complexos livres, podendo-se atribuir a uma distribuição diferente dos sítios ocupados pela do íon Eu^{3+} . Este alargamento é mais característico quando os complexos são incorporados na matriz de sílica, apresentando-se bem diferente do espectro do complexo livre, como se pode observar no baixo valor de Ω_2 . A diminuição dos valores do parâmetro Ω_2 é observada para todas as partículas incorporadas comparada com os complexos livres. Este parâmetro nos fornece a contribuição total dos efeitos de simetria em conjunto com a polarizabilidade do campo ligante, pode-se dizer que um campo ligante fraco é observado para o complexo incorporado, levando a menores valores de A_{RAD} . As eficiências quânticas medidas para os híbridos dos complexos [Eu1] e [Eu2] diminuem seguindo a sequência $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu]} \sim \text{SiO}_2\text{-[Eu]} > \text{SiO}_2\text{@[Eu]}$. Para [Eu3] o híbrido $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ é o menos eficaz (tabela 10). Podemos relacionar essas observações para a estrutura dos híbridos e discutir o número de grupos OH, que são a causa dos efeitos observados. Isto pode ser comprovado com os cálculos de $N_{\text{H}_2\text{O}}$ na primeira esfera de coordenação do íon európio (equação 19). Os valores são apresentados na tabela 11.

$$N_{\text{H}_2\text{O}} = 1,11 \left[(\tau_{\text{exp}})^{-1} - (\tau_{\text{rad}})^{-1} - 0,31 \right] \quad (19)$$

Figura 66: Resultados de luminescência para as partículas de sílica modificadas. (I) espectros de excitação ($\lambda_{em} = 611 \text{ nm}$) e (II) espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) para as diferentes amostras do sólido, (a) [Eu1] (b) $\text{SiO}_2\text{-[Eu1]}$, (c) $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu1]}$, e (d) $\text{SiO}_2\text{@[Eu1]}$.

Figure 66 : (I) : Spectres d'excitation normalisés ($\lambda_{em} = 611 \text{ nm}$) et (II) : spectres d'émission normalisés ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) des échantillons (a) [Eu1], (b) $\text{SiO}_2\text{-[Eu1]}$, (c) $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu1]}$ et (d) $\text{SiO}_2\text{@[Eu1]}$

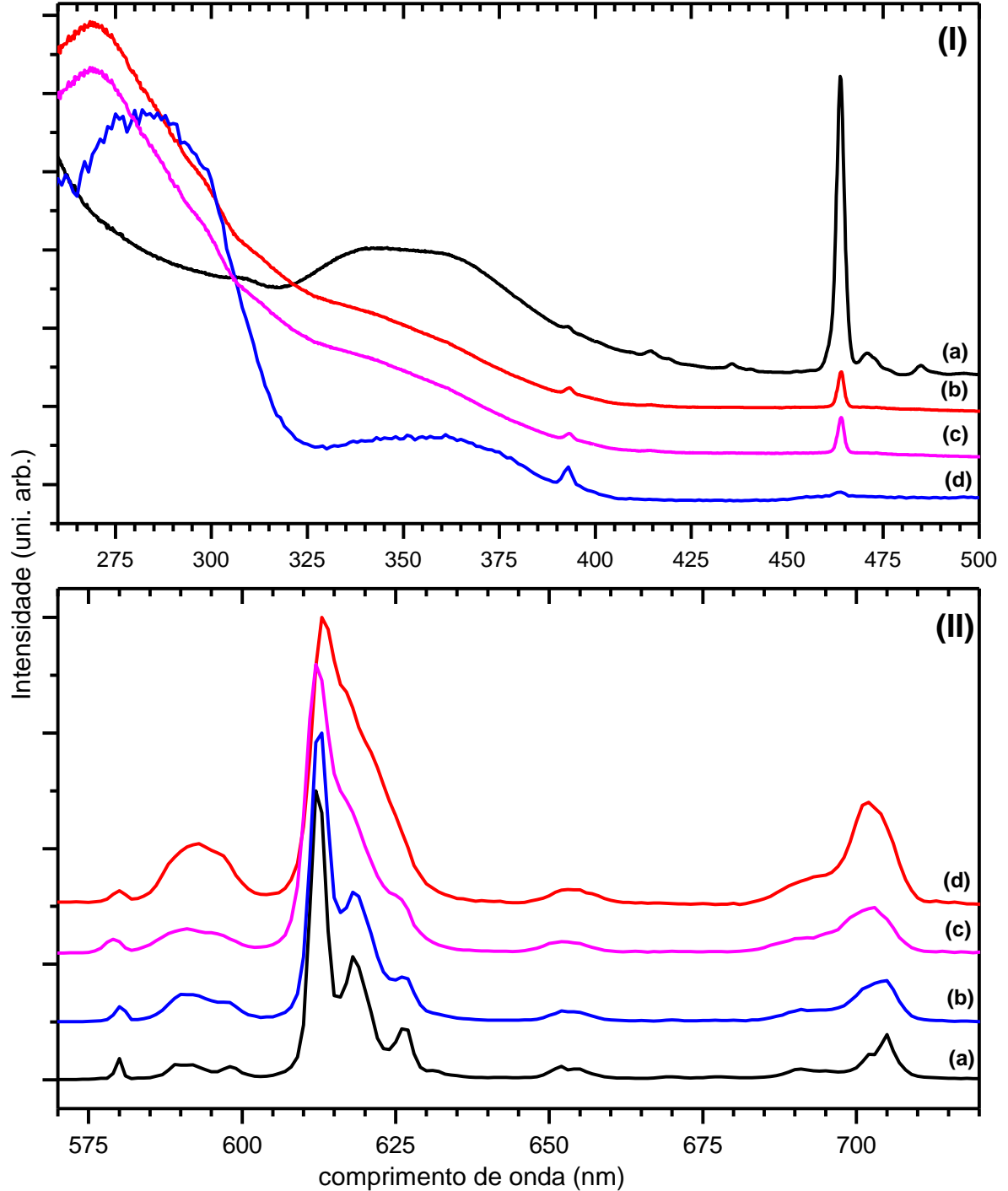


Figura 67: Resultados de luminescência para as partículas de sílica modificadas. (I) espectros de excitação ($\lambda_{em} = 611 \text{ nm}$) e (II) espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) para as diferentes amostras do sólido, (a) [Eu2] (b) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$, (c) $\text{SiO}_{2\text{meso-[Eu2]}}$, e (d) $\text{SiO}_2\text{@[Eu2]}$.

Figure 67 : (I): Spectres d'excitation normalisés ($\lambda_{em} = 611 \text{ nm}$) et (II) : spectres d'émission normalisés ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) des échantillons (a) [Eu2], (b) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$, (c) $\text{SiO}_{2\text{meso-[Eu2]}}$ et (d) $\text{SiO}_2\text{@[Eu2]}$

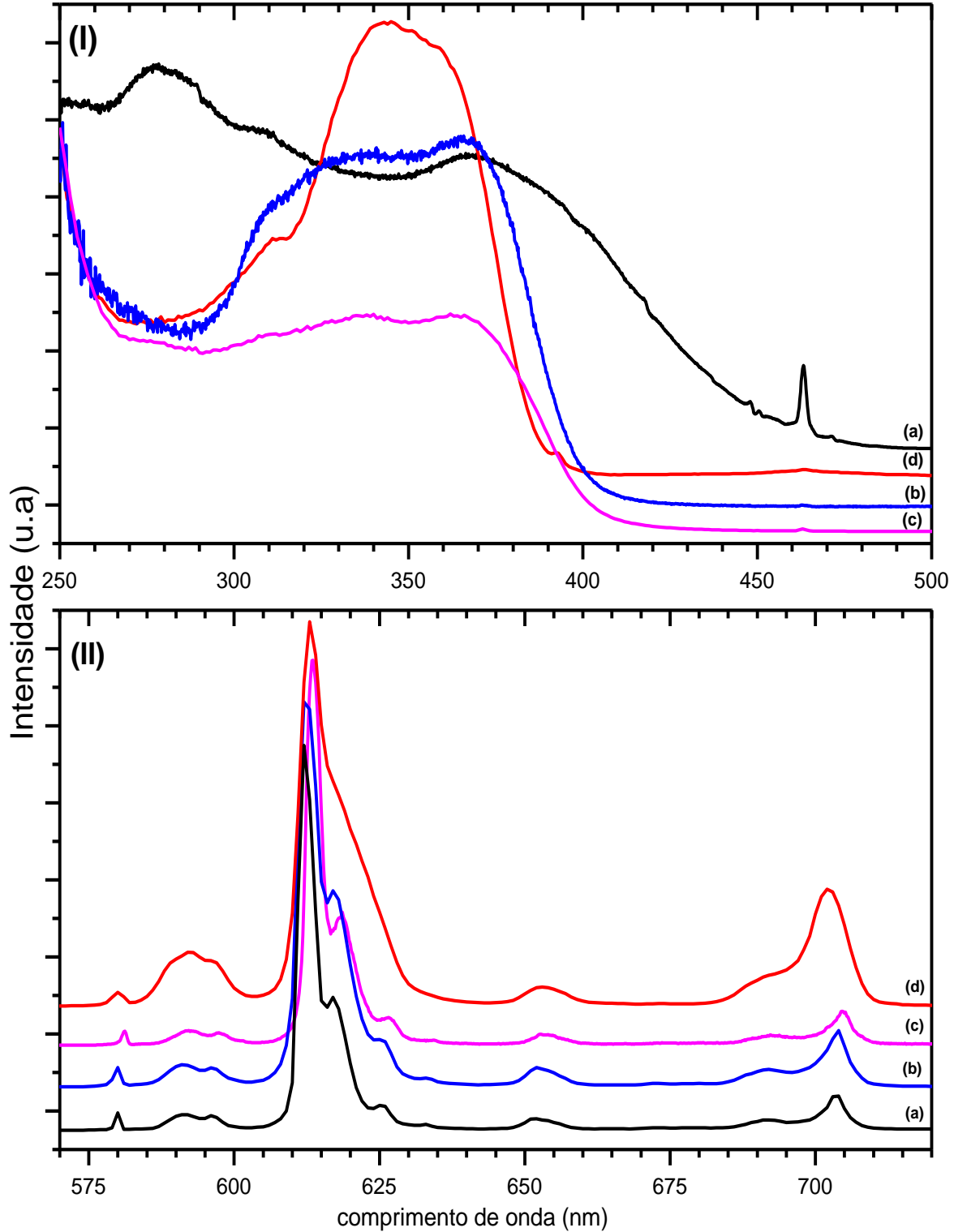


Figura 68: Resultados de luminescência para as partículas de sílica modificadas. (I) espectros de excitação ($\lambda_{em} = 612 \text{ nm}$) e (II) espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) para as diferentes amostras do sólido, (a) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$, (b) $\text{SiO}_2\text{meso-[Eu3]}$, (c) $\text{SiO}_2\text{@[Eu3]}$, e (d) $[\text{Eu3}]$.

Figure 68 : (I) : Spectres d'excitation normalisés ($\lambda_{em} = 611 \text{ nm}$) et (II) : spectres d'émission normalisés ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$) des échantillons (a) $[\text{Eu3}]$, (b) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$, (c) $\text{SiO}_2\text{meso-[Eu3]}$ et (d) $\text{SiO}_2\text{@[Eu3]}$

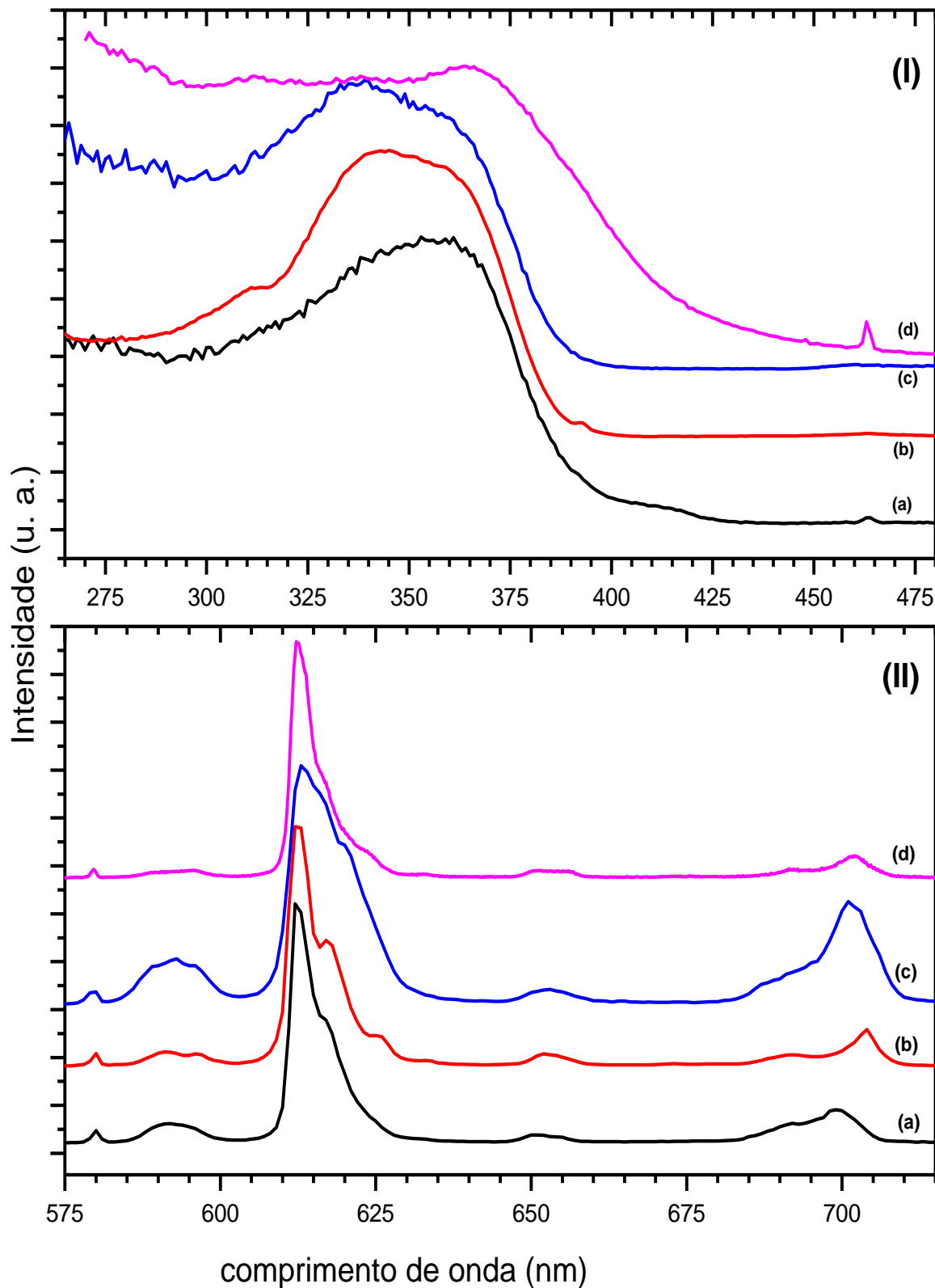


Tabela 10: Probabilidade de emissão de Einstein (A_{RAD}), tempos de vida radiativo e experimental (τ_{RAD} , τ_{EXP}), eficiência quântica (q) dos complexos e híbridos sintetizados e referências.

Tableau 10: Probabilités d'émission spontanée d'Einstein (A_{RAD}), durées de vie radiatives et expérimentales (τ_{RAD} , τ_{EXP}), efficacité d'émission de 3D_0 (q) des complexes et des hybrides.

Complexos e Híbridos	A_{RAD} (ms^{-1})	τ_{RAD} (ms)	τ_{EXP} (ms)	q
[Eu1]	0,79±0,04	1,26±0,06	0,50±0,05	0,40±0,06
SiO _{2meso} - [Eu1]	0,76±0,04	1,32±0,07	0,44±0,04	0,33±0,05
SiO ₂ - [Eu1]	0,70±0,03	1,43±0,06	0,46±0,05	0,32±0,05
SiO ₂ @ [Eu1]	0,44±0,02	2,41±0,12	0,52±0,05	0,21±0,03
[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂]	0,68±0,03	1,47±0,07	0,25±0,03	0,17±0,03
[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂] ¹²³	0,793	1,26	0,26	0,21
[Eu2]	1,02±0,05	0,98±0,05	0,60±0,10	0,61±0,14
SiO _{2meso} -[Eu2]	0,63±0,03	1,58±0,08	0,65±0,06	0,41±0,06
SiO ₂ - [Eu2]	0,62±0,03	1,61±0,08	0,66±0,07	0,41±0,06
SiO ₂ @ [Eu2]	0,48±0,02	2,10±0,09	0,55±0,05	0,26±0,04
[Eu3]	1,15 ± 0,06	0,87 ± 0,04	0,56 ± 0,06	0,64 ± 0,1
SiO _{2meso} -[Eu3]	0,82 ± 0,04	1,22 ± 0,06	0,26 ± 0,03	0,21 ± 0,03
SiO ₂ - [Eu3]	0,66 ± 0,03	1,52 ± 0,08	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,01
SiO ₂ @[Eu3]	0,45 ± 0,02	2,2 ± 0,1	0,43 ± 0,04	0,19 ± 0,03

Tabela 11: Parâmetros de intensidade Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4) e números de N_{H2O} (equação 19) e N_{OH} (equação 24).

Tableau 11: Paramètres d'intensité de Judd-Ofelt (Ω_2 , Ω_4), nombre de N_{H2O} (eq. 19) et N_{OH} (eq. 24) pour les hybrides

Complexos e Híbridos	Ω_2 ($\cdot 10^{-20} cm^2$)	Ω_4 ($\cdot 10^{-20} cm^2$)	N _{H2O}	N _{OH}
[Eu1]	19,6 ± 1,0	5,6 ± 0,3	1,0	0,0
SiO _{2meso} - [Eu1]	17,5 ± 0,9	5,2 ± 0,3	1,3	0,7
SiO ₂ - [Eu1]	16,7 ± 0,8	3,9 ± 0,2	1,0	0,6
SiO ₂ @ [Eu1]	8,1 ± 0,4	4,0 ± 0,2	1,3	0,7
[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂] ¹²³	33	4,6	3,0	
[Eu(TTA) ₃ (H ₂ O) ₂]	22 ± 1	5,4±0,3	3,0	
[Eu2]	26 ± 1	5,7 ± 0,3	0,1	0
SiO _{2meso} -[Eu2]	17,2 ± 0,8	1,6 ± 0,1	0,7	0,6
SiO ₂ - [Eu2]	18,3 ± 0,9	1,9 ± 0,1	0,6	0,6
SiO ₂ @ [Eu2]	9,6 ± 0,4	5,5 ± 0,3	1,1	1,6
[Eu3]	40 ± 2	5,9 ± 0,3	0,4	0,0
SiO _{2meso} -[Eu3]	13,5 ± 0,7	4,3 ± 0,2	3,0	5,4
SiO ₂ - [Eu3]	13,8 ± 0,7	5,8 ± 0,3	6,9	13,3
SiO ₂ @[Eu3]	9,0 ± 0,4	6,2 ± 0,3	1,7	2,8

Outro método foi proposto para estimar o número de grupos hidroxila que estão diretamente ligados ao európio, durante a formação de híbridos. Para fazer isso, comparamos a probabilidade de desexcitação não radiativa nos híbrido com a probabilidade medida para os complexos, o qual é anidro, se consideramos as condições de síntese, e isto é confirmado por diferentes técnicas. Propomos então, considerar que em cada complexo:

$$\frac{1}{\tau_{\text{ñ-radcomplexo}}} = \frac{1}{\tau_{\text{exp}}} - \frac{1}{\tau_{\text{rad}}} \quad (23)$$

E este é, essencialmente, devido ao acoplamento de nível eletrônico 5D_0 com as vibrações dos ligantes orgânicos. A desexcitação não radiativa adicional, nos híbridos, é devido ao acoplamento com as vibrações de alta energia dos grupos hidroxilas. Assim, utilizamos a equação (24) para calcular o número de grupos OH na primeira esfera de coordenação do európio.

$$n_{\text{OH}} = \frac{1}{1/\tau_{\text{ñ-rad OH}}} \left[(\tau_{\text{exp}})^{-1} - (\tau_{\text{rad}})^{-1} - (\tau_{\text{ñ-rad complexo}})^{-1} \right] \quad (24)$$

Nesta equação, os valores de $1/\tau_{\text{rad complexo}}$ para os complexos são: [Eu1]= 1,206; [Eu2] = 0,651; [Eu3] = 0,636 e $1/\tau_{\text{ñ-rad OH}}$ 0,44. Estes valores são a taxa de desexcitação do nível 5D_0 por o acoplamento com um grupo OH. Tem sido proposto por Supkowski e Horrocks²⁶ para o OH de alcoóis, e é semelhante à uma que era deduzida a partir de matrizes inorgânicas altamente hidratadas¹⁴². Esta equação foi utilizada para calcular o número de OH (N_{OH}) na esfera de coordenação do európio nos híbridos (tabela 11).

Os números equivalente de osciladores OH calculados por cada um dos dois métodos (N_{OH} é $2 \cdot N_{\text{H}_2\text{O}}$), estão em razoável concordância, e é a média dos valor que serão consideradas para comparar os híbridos. Nós discutiremos em detalhe os híbridos do complexo [Eu3] que apresentam maior variação de N ¹⁴³.

Para o híbrido $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu3]}$, obteve-se 5,4 osciladores OH. Após a ligação do complexo [Eu3] na superfície da sílica mesoporosa, este mantêm a estrutura com três grupos dicetonas ligadas ao európio. Algumas moléculas de hidroxila também podem se ligar ao európio, por exemplo, o etanol do meio reacional ou metanol produzido pela reação.

Quando o complexo foi ancorado na superfície de sílica AS-40, o número calculado de equivalentes de osciladores OH (13,3) é elevado. Embora o número equivalente de

osciladores OH é sempre superestimado, eles podem, todavia, ser comparados. Conclui-se que neste híbrido a maior número de osciladores OH ligados a Eu^{3+} comparado com o híbrido $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu3]}$. Isto está de acordo com o procedimento de ancoragem, pois a matriz precursora (Ludox AS-40) é um sol aquoso de nanopartículas de sílica. Sendo assim, esta água residual pode coordenar-se ao íon Eu^{3+} e também, pode hidrolisar os grupos metoxi não ancorados do complexo. A cadeia propil do ligante permite uma interação intramolecular entre esses silanóis terminais e o íon európio, aumentando finalmente o número de hidroxilas capazes de desexcitar o estado emissor ${}^5\text{D}_0$ do íon európio.

Na incorporação dos complexos na síntese de microemulsão inversa, estes são hidrolisados juntamente com a TEOS, a fim de criar a rede de siloxano. Isto induz deformações da esfera de coordenação do íon európio o que é demonstrado pelas linhas de emissão largas como no vidro¹²⁰. Neste caso, os íons de európio são estabilizados por átomos de oxigênio mais próximos da rede de siloxano, e apresenta menor quenching dos grupos hidroxila ($N_{\text{OH}} = 3,2$) em comparação com os híbridos ancorados.

Para os híbridos dos complexos [Eu2] e [Eu1], as variações de N e q são muito menores, o que comprova que as adições dos grupos bipy e dicetonas completam a esfera de coordenação do íon, protegendo das interações com o meio durante as reações e, em seguida, com a matriz de sílica.

Os híbridos dos complexos [Eu1] e [Eu2] apresentam valores comparáveis, no entanto, o complexo [Eu3] é menos eficaz. Quando houve a incorporação dos complexos em sílica, as partículas apresentaram valores de A_{rad} e q comparados com da literatura, como por exemplo, os híbridos PCL(530)/siloxane:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂] ($A_{\text{rad}}=0,595$ e $q=0,37$) e PCL(530)/siloxane:[Eu(TTA)₃(phen)] ($A_{\text{rad}}=0,651$ e $q=0,44$)¹⁴⁴.

Os valores de A_{rad} e q, (tabela 10) são características importantes para a aplicação destes materiais como sondas luminescentes. No entanto, a característica mais relevante para a definição dessa partícula é sua capacidade de emitir luz quando submetidos a uma excitação. No tipo de materiais que sintetizamos e estudamos, a emissão depende da quantidade de luz incidente (365 nm) absorvida, a eficiência dos processos intramoleculares nos ligantes, a eficiência da transferência não radiativa para Eu^{3+} , processos de desexcitação do estado emissor ${}^5\text{D}_0$ do íon, da probabilidade de desexcitação radiativa de ${}^5\text{D}_0$ e, finalmente, da eficiência quântica (q) deste nível.

Como não é possível analisarmos a maioria dessas características separadamente, vamos comparar as intensidades emitidas, obtidas sob as mesmas condições experimentais.

Nas Figuras 65-67, os espectros de emissão sob excitação a 365 nm, foram normalizados. Mas para a comparação entre os híbridos obtivemos a área total do espectro de emissão, não normalizado e em número de onda na região de 18180 e 14000 cm^{-1} (S_T). Para os valores serem comparável, é necessário que os caminhos ópticos do feixe incidente /emitidos sejam o mesmo para todas as amostras. Por esta razão, nós comparamos apenas os nove híbridos que têm aproximadamente a mesma concentração de complexo por metro quadrado. A área total do espectro de emissão de cada híbrido, e a razão das intensidades é apresentada na tabela 12.

Entre as três classes de híbridos, a que apresenta menor eficiência é com o complexo [Eu1], isto é devido a excitação realizada em 365nm, que está fora da absorção do ligante. Os híbridos [Eu2] e [Eu3] são efetivamente excitados na banda do ligante, observando que o híbrido do complexo [Eu2] emite de forma mais eficiente.

Se considerarmos somente os híbridos de tamanho similar, ou seja, desconsiderando os híbridos obtidos na sílica mesoporosa, podemos concluir que o híbrido SiO_2 -[Eu2] pode ser empregado, a priori, como emissor mais eficiente, e que o híbrido SiO_2 @[Eu2] é promissor, pois tem boas propriedades de emissão e toda a superfície livre para funcionalização.

Tabela 12: Comparação dos híbridos: ζ é a quantidade de complexo incorporada e ancorada na sílica; S_T área total do espectro de emissão e S_T/S é a razão de S_T do híbrido sobre o menor S_T de menor valor, que é do híbrido $\text{SiO}_{2\text{meso}}$ [Eu1].

Tableau 12: Comparaison des hybrides: R est la quantité de complexe incorporé ou greffé dans la silice; S_T aire du spectre d'émission et valeurs relatives de S_T par rapport à $\text{SiO}_{2\text{meso}}$ [Eu1]

HÍBRIDOS	R (mmol/g)	$S_T(\text{cm}^{-1})$	$S_T/S_{\text{SiO}_{2\text{meso}}}$ [Eu1]
$\text{SiO}_{2\text{meso}}$ -[Eu1]	0,52	$1,1 \times 10^6$	1
SiO_2 -[Eu1]	0,26	$1,0 \times 10^7$	9
SiO_2 @[Eu1]	0,31	$3,0 \times 10^7$	27
$\text{SiO}_{2\text{meso}}$ -[Eu2]	0,64	$4,3 \times 10^8$	391
SiO_2 -[Eu2]	0,30	$1,1 \times 10^{10}$	10 000
SiO_2 @[Eu2]	0,31	$5,8 \times 10^9$	5 273
$\text{SiO}_{2\text{meso}}$ -[Eu3]	0,41	$3,8 \times 10^8$	345
SiO_2 -[Eu3]	0,21	$1,3 \times 10^8$	118
SiO_2 @[Eu3]	0,12	$1,2 \times 10^8$	109

Neste capítulo apresentamos a síntese de complexos de európio (III) com ligantes que apresentam funções alcoxisilano. Além do ligante bipyridina (bpy-Si) conhecido na literatura, desenvolvemos um novo ligante dicetona (TTA-Si), obtendo a partir destes, uma família de três complexos de európio (III): [Eu(TMHD)₃(bpy-Si)], [Eu1]; [Eu (TTA)₃(bpy-Si)], [Eu2] e [Eu (TTA-Si)₃], [Eu3]

Para a obtenção de híbridos à base de sílica utilizamos duas metodologias:

- reação de ancoragem de complexos na superfície de partículas de sílica, para isso duas matrizes foram sintetizadas: nanopartículas densas de sílica (ludox AS-40) que permitiram obter três tipos de híbridos, onde a morfologia inicial foi conservada (28 ± 3 nm) e também, partículas de sílica mesoporosa, que também mantiveram sua morfologia inicial (média de 600nm) As quantidades de complexos ancorados, 0,2 et 0,6 mmol/g estão de acordo com os resultados descritos para estes tipos de híbridos.

- A incorporação por microemulsão inversa Stoeber, nos permitiu preparar nanopartículas de sílica densa, com três complexos de európio incorporados por ligação covalente. Estas partículas de tamanho controlado, a 45 nm, apresentam taxa de incorporação muito interessante, muito mais elevado do que aqueles relatados até o momento na literatura, até mesmo no caso de menor quantidade de incorporação (SiO₂ @ [Eu3]).

Finalmente as propriedades de luminescência dos complexos puros no estado sólido e em solução, bem como aquelas dos nove híbridos foram estudadas usando espectros de emissão, excitação e absorção. Os valores de eficiência quântica, q , e rendimento quântico, Φ , que levam em conta tanto a eficiência de transferência de energia ligante-Eu e a eficiência de emissão do lantanídeo, puderam ser avaliados.

O interesse em sintetizar complexos com ligantes derivados de bipyridina ou Tenoiltrifluoroacetona foi devido ao conhecido efeito de transferência de energia não radiativa destes para o íon Eu³⁺. Entre os três complexos obtidos, o complexo [Eu2] parece o mais promissor com eficiência quântica de 60% no estado sólido e solução.

Estas propriedades de luminescência associada à morfologia desses híbridos e sua estabilidade, sugerem que estes híbridos são bons candidatos como ferramentas de análise de meios biológicos. Testes exploratórios em equipamento de análise de rotina serão apresentados no capítulo seguinte (VI), deste trabalho.

**6. HÍBRIDOS LUMINESCENTES-TESTES
EXPLORATÓRIO DE APLICAÇÃO COMO
SONDAS E BIOMARCADORES**

Na intenção de demonstrar a potencial aplicabilidade dos novos híbridos a base de európio como sondas luminescentes, foram realizados testes de detecção destes materiais por técnicas comuns à processos de reconhecimento celular em imunocitoquímica.

As técnicas de Microscopia confocal, Microscopia de fluorescência e Citometria de fluxo se destacam entre as muitas análises utilizadas para detecção e reconhecimento de materiais biológicos, pois permitem detectar a fluorescência emitida por partículas em um meio biológico.

1. Microscopia Confocal

1.1 Exploração de Biofilme

A microscopia confocal é uma ferramenta para obtenção de imagens tridimensionais com boa resolução do meio biológico. Através da microscopia confocal é possível fazer imagens em meio aquoso, graças a utilização de objetivas de imersão, com resolução que somente seria possível anteriormente por técnicas de microscopia eletrônica, que necessitavam de uma prévia desidratação da amostra. Desta forma, esta técnica permite preservar e estudar, por exemplo, biofilmes em seu estado natural, sem a necessidade de preparação da amostra¹⁴⁵.

Biofilmes são resultados do desenvolvimento de micro-organismos de modo organizado em ambientes úmidos e não estéreis. Estes microrganismos são um desafio à saúde pública, pois a formação do biofilme é um meio de proteção que dificulta a penetração de agentes estranhos. Isto faz com que estes micro-organismos tornem-se muito resistentes à antibióticos clássicos. Por isso, é importante desenvolver estudos para entender a formação e desenvolvimento do biofilme, de forma não destrutiva, *in situ*. Esta fase do trabalho ocorreu em colaboração com a doutoranda Leila Mauline (CIRIMAT – UPS, Toulouse), que estudou a preparação de biofilmes bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* e a incorporação de partículas de sílica dopadas com complexo de rutênio.

Estudou-se a capacidade de incorporação dos híbridos luminescentes, preparados neste trabalho, em biofilme bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* através da microscopia confocal. As amostras de biofilme foram cedidas por L. Mauline.

Os híbridos SiO₂-[Eu2] e SiO₂-[Eu3] foram suspensos em água, a solução é filtrada e em seguida adicionadas sobre os biofilme. Após 12 horas os biofilmes foram lavados para a

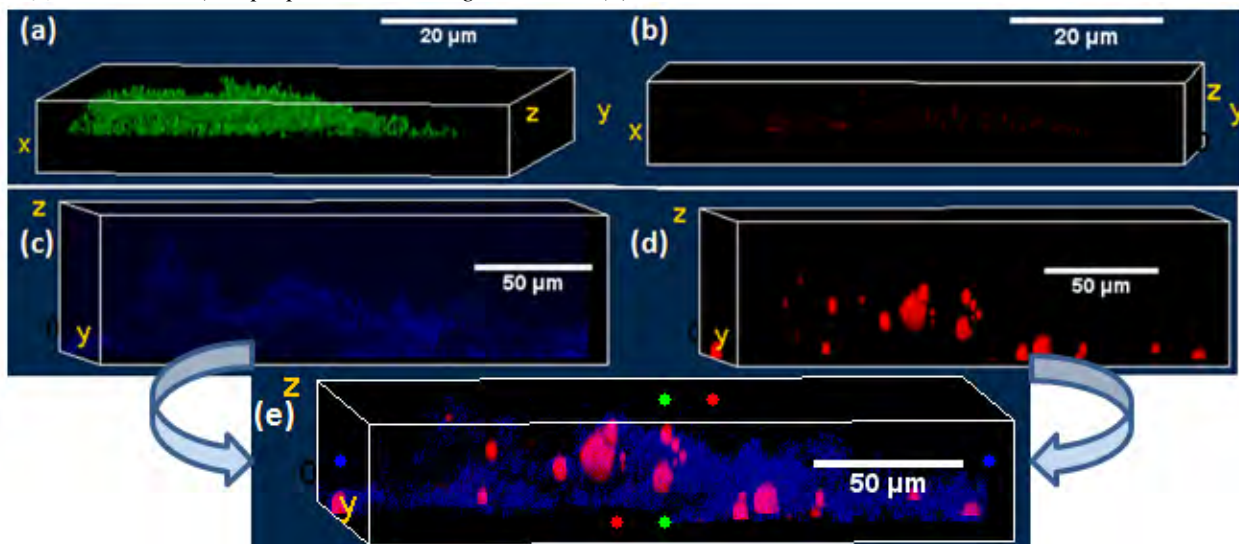
retirada dos híbridos que não incorporaram na amostra. Foi adicionado um marcador biológico comercial, SYTO 9® ($\lambda_{ex}= 488 \text{ nm}$ e $\lambda_{em}= 498\text{-}520 \text{ nm}$) ou SYTO 45® ($\lambda_{ex}= 452 \text{ nm}$ e $\lambda_{em}= 484\text{nm}$) sobre o biofilme. Desta forma, via microscopia confocal pudemos observar a espessura e crescimento do biofilme bacteriano no meio de cultura (figura 69 (a) marcação com SYTO 9®, (c) marcação com SYTO 45®). O biofilme que foi colocado em contato com o híbrido $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ apresentou uma espessura de $10 \mu\text{m}$ (a) e o que foi colocado em contato com $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ a espessura foi de $63 \mu\text{m}$ (c).

As imagens também foram adquiridas sob excitação em 405 nm (o laser disponível a menor comprimento de onda), início das bandas de excitação dos ligantes (figura 67 e 68), com a emissão monitorada dos híbridos em $580\text{-}630 \text{ nm}$, característico das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_{0,2}$ do íon európio, onde se observa a emissão dos híbridos no interior do biofilme.

As imagens tridimensionais (figura 69) foram obtidas com o auxílio do software *Image J*, com a sobreposição de 450 imagens variando os planos xy .

Figura 69: Imagens obtidas pelo software *ImageJ* de 450 microscopias (variação do plano xy) obtidas pelo Microscópio confocal do biofilme de *Pseudomonas Aeruginosa* marcadas com SYTO 9® (a) ($\lambda_{ex}= 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em}= 498\text{-}520 \text{ nm}$) ou SYTO 45® (c e e) ($\lambda_{ex}= 452\text{nm}$ et $\lambda_{em}= 484\text{nm}$) e dos híbridos luminescentes $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ (b) e $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ (d) incorporados no biofilme ($\lambda_{ex}= 405\text{nm}$ e $\lambda_{em}= 610\text{nm}$). (e) imagem da sobreposição das imagens c e d.

Figure 69: Clichés de microscopie confocale traités avec *ImageJ* (450 balayages dans le plan xy) de biofilms *Pseudomonas aeruginosa* marqués avec SYTO 9® (a) ($\lambda_{ex}= 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em}= 498\text{-}520 \text{ nm}$) ou SYTO 45® (c et e) ($\lambda_{ex}= 452\text{nm}$ et $\lambda_{em}= 484\text{nm}$) après contact avec l'hybride $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ (b) et $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ (d et e) ($\lambda_{ex}= 405 \text{ nm}$ et $\lambda_{em}= 580\text{-}630 \text{ nm}$). Superposition des images c et d en (e)



Os resultados mostram que os híbridos apresentam intensidade de emissão suficiente para a detecção em microscópio confocal mesmo quando a excitação não é na região de maior energia (350 nm). Comparando os fotos a e b da figura 69 podemos observar, mesmo em

intensidade baixa de sinal, que ocorre a penetração do híbrido SiO₂-[Eu2] no interior do biofilme. O que observado mais claramente para o caso do híbrido SiO₂-[Eu3] (c ,d) mostra que o híbrido penetra no biofilme, mas observamos que encontram-se em regiões específicas, na forma de aglomerados (figura 69 e).

Estes resultados iniciais são muito interessantes porque sugerem uma penetração diferente dos dois híbridos no biofilme bacteriano Pseudomonas aeruginosa. As condições experimentais deve ser otimizadas, mas estas experiências exploratórias abrem novas aplicações para esses híbridos como sondas em ambientes biológicos.

A Microscopia confocal permite também o reconhecimento de materiais que respondem a uma excitação multifóton. Com o objetivo de gerar novos marcadores biológicos baseados nesse processo de absorção, os híbridos obtidos com os complexos [Eu2] [Eu3] foram estudados via excitação bifóton.

1.2 Excitação Multifóton

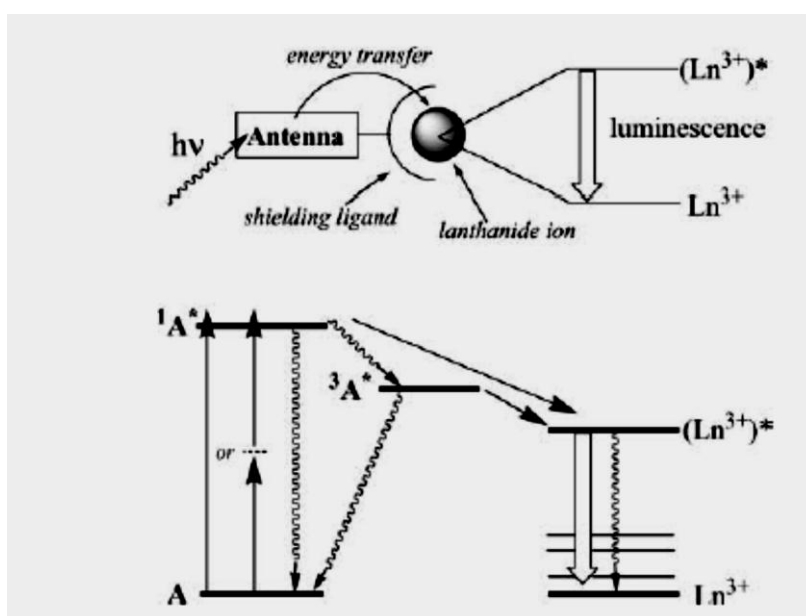
Em meios biológicos a excitação no UV pode levar a observação indesejada, pois evidencia a luminescência de todas as espécies do meio que emitam luz como, como por exemplo, aminoácidos. Esta radiação se constitui em sinal de fundo que pode inclusive encobrir a radiação que se deseja detectar. Além disso, a penetração da radiação UV no meio é reduzida o que pode limitar a observação à superfície do meio. A radiação de alta energia pode também levar a danos do meio biológico.

Estes aspectos indesejáveis podem ser diminuídos ou mesmo suprimidos pela utilização de excitação com radiação de menor energia (IV). O mecanismo de excitação dos luminóforos (figura 70), neste caso, dependerá da absorção sucessiva de dois ou mais fótons, que comparado a excitação direta demonstra-se ter menor probabilidade de ocorrência. A seção de choque de absorção reduzida requer na excitação a utilização de *lasers* pulsados com pulsos ultracurtos (normalmente na faixa de fentosegundos) que permite que a potência em cada pulso tenha valor elevado. Esta é a base dos chamados “processos de excitação multifóton” que vêm sendo muito utilizados nos últimos anos^{2; 146; 147}. Este processo ocorre quando: (a) as bandas de absorção para o processo de 1 fóton são relativamente largas e não

estruturadas (b) a absorção de um fóton ocorre acima de 350 nm, uma vez que a emissão do laser de Ti:safira normalmente utilizado ocorre acima de 700 nm e (c) apresentar boas propriedades de luminescência como rendimento quântico e fotoestabilidade. O terceiro critério também se aplica a uma excitação monofóton de complexos de lantanídeos ¹⁴⁸.

Figura 70: Esquema de diagrama de energia das possíveis excitações dos ligantes orgânicos e transferência de energia para o íon lantanídeo.

Figure 70: Schéma des excitations possibles de ligands organiques en vue d'un transfert d'énergie à l'ion lanthanide.



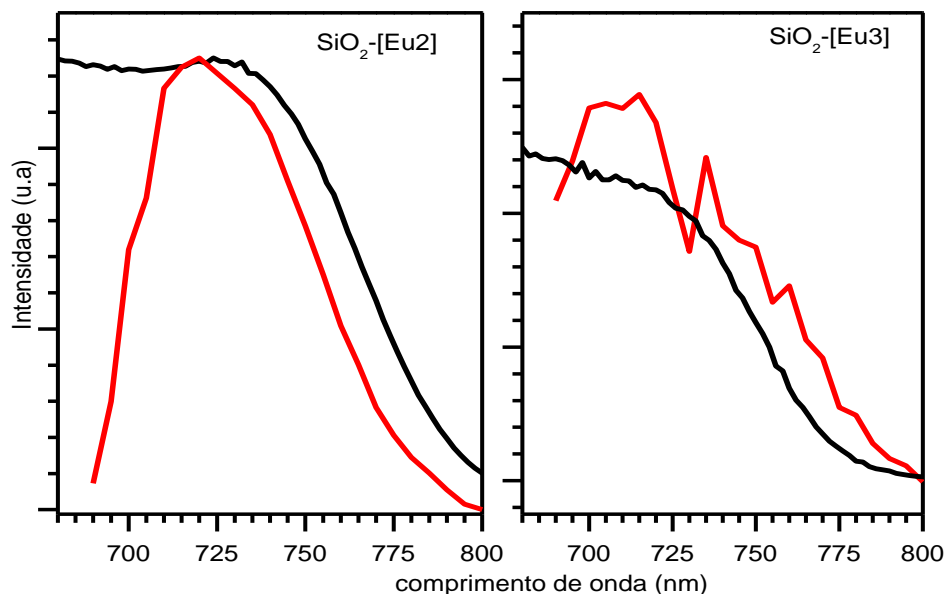
Fonte: Werts et al¹⁴⁸

Como visto ao longo desta tese os híbridos obtidos com os complexos [Eu2] [Eu3] apresentam boas propriedades de luminescência quando excitados próximo ao ultravioleta nas bandas dos ligantes (350 nm, figura 67 e 68). A alternativa da excitação multifotônica foi utilizada aqui.

Nota-se que o espectro de excitação de dois fótons não mostra diferenças significativas nas posições e formas das bandas comparadas com os espectros de excitação monofóton (figura 71), sugerindo que os mesmos estados dos ligantes são excitados, tanto por excitação de um ou dois fótons, isto é normalmente observado em cromóforos¹⁴⁹.

Figura 71: Espectro de excitação bifóton (vermelho) e monofóton (preto, multiplicação da escala) dos híbridos $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ e $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$.

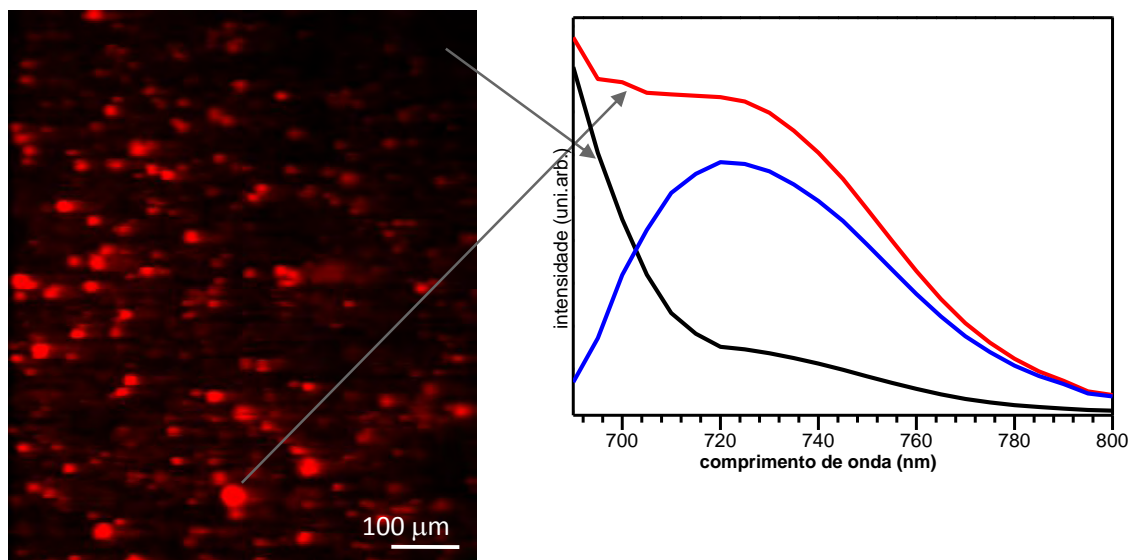
Figura 71: Spectres d'excitation biphotons (rouge) et monophóton (noir, la multiplication de l'échelle) des hybrides $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ et $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$.



A figura 72 mostra o espectro de excitação do híbrido $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ com emissão monitorada a 615 nm em diferentes regiões. A curva em vermelho foi obtida de uma região com alto sinal de fluorescência, e a curva em preto uma região que não apresenta fluorescência. Baseado nisso, fizemos o cálculo de subtração, para excluir a luminescência de fundo, obtendo assim somente o espectro de excitação do híbrido $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ (curva em azul).

Figura 72: Espectro de excitação bifóton do híbrido $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ obtido pelo software *ImageJ* sobre a microscopia.

Figure 72: Spectres d'excitation biphotons de l'hybride $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ avec le software *ImageJ* sous le microscope

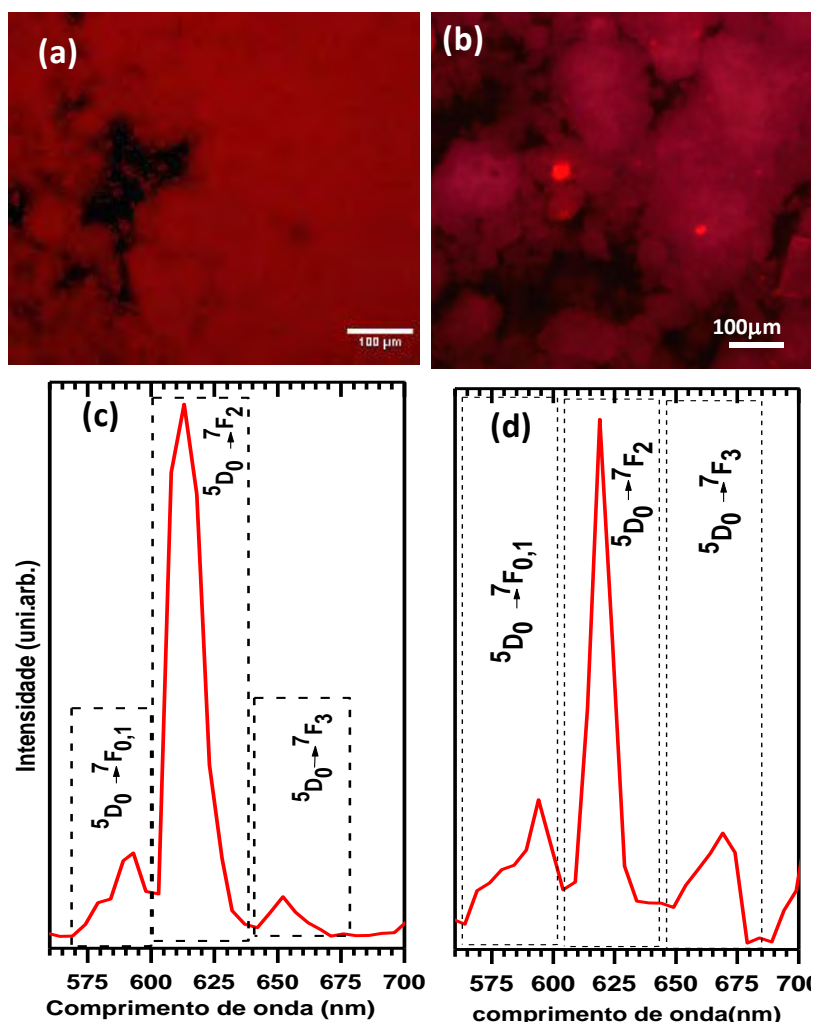


Os espectros de emissão para os híbridos foram obtidos via excitação à 700 nm, ou seja excitação bifotón do ligante (figura 73). As bandas observadas são características das transições

$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ para o íon Eu^{3+} , à 592 nm e 615 nm para o complexo [Eu2] e 591nm e 611nm para o complexo [Eu3]. Nota-se que as transições características do íon európio e os espectros são similares a excitação monofóton (figura 67 e 68).

Figura 73: Imagens dos híbridos (a) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ e (b) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ com excitação a 700 nm. Espectros de emissão obtidos da imagem pelo software *ImagemJ* dos híbridos (c) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ e (d) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$.

Figure 73: Image des hybrides (a) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ e (b) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ sous excitation à 700 nm. Spectre d'émission obtenu en microscopie des hybrides (c) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ et (d) $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$.



A possibilidade de excitação bifotón destes híbridos os torna utensílios interessantes para a aplicação como sondas e biomarcadores, pois evita a utilização de excitação na região do UV, tornando-se menos agressivo ao meio biológico.

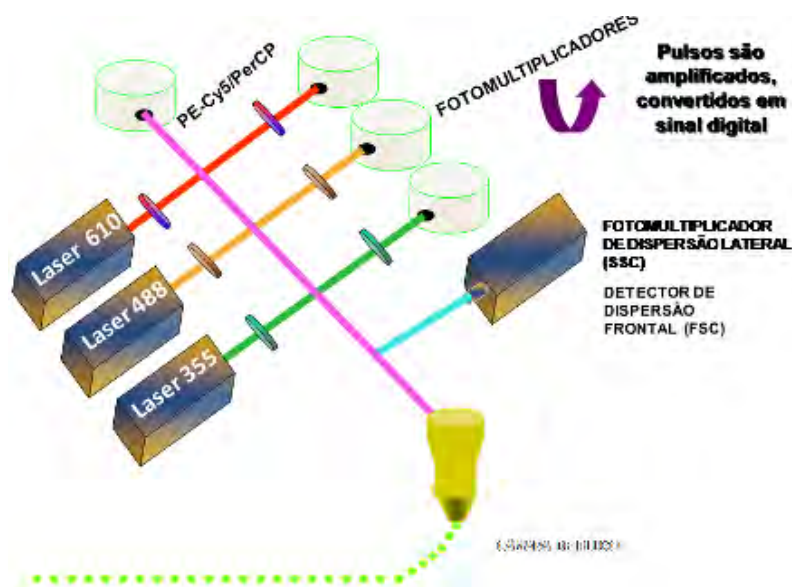
2. Marcação celular

2.1. Detecção por citometria de fluxo

Uma das propostas desse trabalho era a aplicação das partículas híbridas (após funcionalização de superfície) como marcadores biológicos para análise em Citometria de fluxo. Diferente dos sistemas comerciais, nós propomos análises resolvidas no tempo, uma vez que, a resolução temporal no tratamento do sinal leva a um aumento significativo na razão sinal/ruído. Isso só foi possível, pois os sistemas híbridos dopados com íons Eu(III) apresentam elevado tempo de vida para o estado excitado quando comparados aos marcadores comerciais, que possuem tempo de vida da ordem de nanosegundos. O tempo de vida da luminescência de fundo, em amostras biológicas, é menor que 10 ns, desta forma, para medidas sem interferência deste ruído, o marcador utilizado deve ter um tempo de vida no mínimo 10 vezes maior que o ruído detectado.

A Citometria de fluxo é um método que permite verificar características físico-químicas em células ou partículas individualmente, como tamanho, morfologia permitindo caracterizar variações destas^{106; 150; 151}

O citometro de fluxo escolhido neste trabalho foi o equipamento existente no Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS) em Toulouse- França. Esse equipamento possui 03 fontes lasers (355, 488, 610 nm, figura 74), e um sistema de detectores que permite analisar todo espectro na região do visível, com a possibilidade de adaptação para análises resolvidas no tempo na ordem de microsegundos.

Figura 74: Esquema Óptico do citômetro de fluxo do IPBS de Toulouse-FR.*Figure 74: Schéma optique du cytomètre de flux de IPBS Toulouse-FR*

2.1.1. Funcionalização da superfície dos híbridos com moléculas de disuccinimidilteftalato (DTP)

O disuccinimidilteftalato (DTP) reage com grupos N-H presente na parede celular de diferentes organismos e células, logo pode ser utilizado com um grupo de reconhecimento biológico não específico.

A funcionalização dos híbridos foi realizada em duas etapas. A primeira foi à adição de APTS na superfície da sílica luminescente, onde a quantidade de ancoragem de APTS foi determinada em função da quantidade de nitrogênio, baseado em análise elementar, apresentando um valor de 1,12 mmol/g de sílica. A segunda etapa, realizamos a adição do grupo DTP.

As partículas dos híbridos ($\text{SiO}_2\text{-[Eu1]}$, $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu1]}$, $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$, $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]}$, $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$, $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu3]}$), funcionalizados com DTP, como descrito acima, foram utilizadas para marcar as células P815 (mastócitos de ratos). Esse sistema P815 + Híbrido-DTP foram analisados via Citometria de fluxo, sob excitação laser à 355 nm, e a detecção na fotomultiplicadora ajustada para a janela 610 ± 10 nm, região espectral compatível a emissão do íon Eu^{3+} (transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, figura 61, 62 e 63). Dentre os híbridos-DTP funcionalizados, somente os sistemas a partir dos híbridos $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$, $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]}$ apresentaram intensidade de luminescência detectável pelo equipamento. O tempo para o material percorrer a distancia

entre o laser de excitação e a fotomultiplicadora (20 μ s), consideramos a emissão com resolução temporal.

Os espectros obtidos por Citometria de fluxo indicam no eixo x a intensidade de fluorescência obtida para a amostra versus o número de eventos (neste caso, células marcadas com o sistema híbrido-DTP) no eixo y. Nos sistemas utilizados, partículas de sílica sem luminóforos foram utilizadas como referência, figura (75a, 76a), com intensidade de luminescência nula.

As análises, dos sistemas híbridos-DTP (isolados), apresentaram um deslocamento no eixo x, indicativo de luminescência detectável pelo equipamento (figura 75b, 76b). Entretanto, na avaliação dos sistemas híbrido-DTP-P815, existe uma intensidade de luminescência detectável, mas em menor intensidade (Figura 75c, 76c).

Figura 75: Diagrama de intensidade de luminescência obtido por Citometria de fluxo para (a); o branco SiO_2 (Zero de emissão) e os híbridos $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ (b) e $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]-Cel}$ com uma resolução temporal.

Figure 75: Histogrammes obtenus par analyse en cytométrie de flux de (a); le Blanc SiO_2 (Zero d'émission) (b) l'hybride $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ et (c) $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]-Cellule}$ en temps résolu.

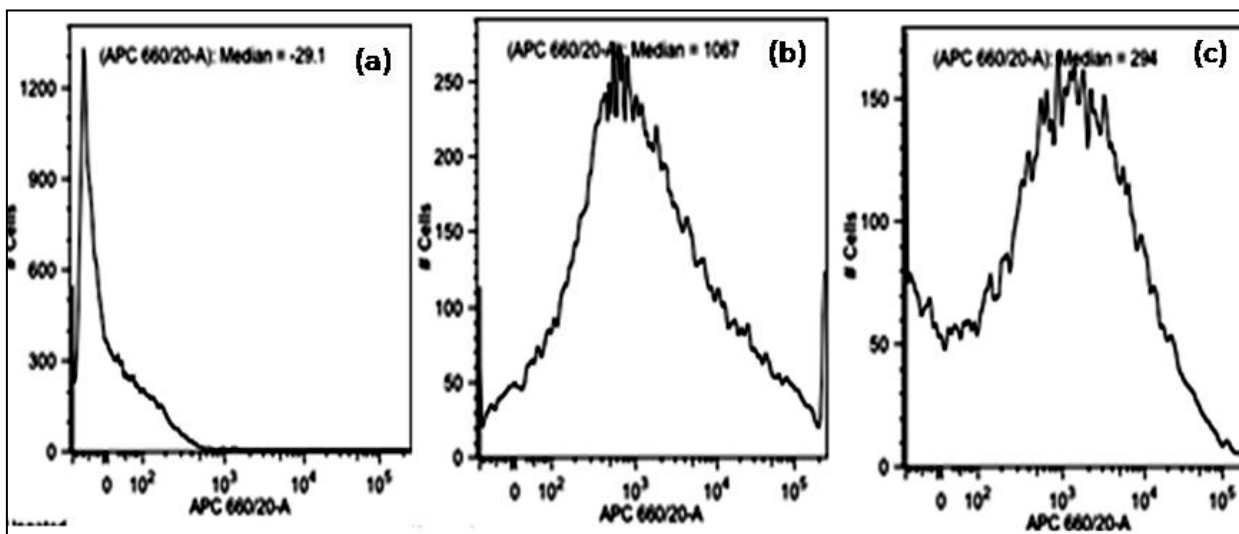
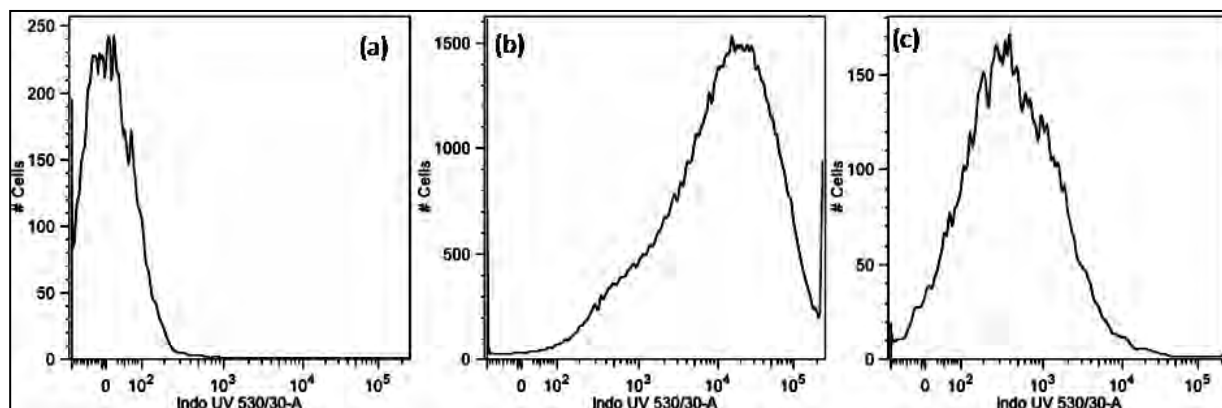


Figura 76: Diagrama de intensidade de luminescência obtido por Citometria de fluxo para (a); o branco SiO_2 (Zero de emissão) e os híbridos SiO_2 (Zero de emissão, (a)); $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]}$ (b) e $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]-Cel}$ com resolução temporal.

Figure 76: Histogrammes obtenus par analyse en cytométrie de flux (a); le Blanc SiO_2 (Zero d'emission)(b) l'hybride $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu2]}$ (c) $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu2]-Cellule}$ en temps résolu..



Cabe ressaltar que existe uma limitação, que não deve ser negligenciada, na observação de marcadores a base de íons lantanídeos pela técnica de Citometria de fluxo; esta é o tempo de observação do material luminescente. Conforme o princípio de funcionamento do citometro, o analito passa pela janela de detecção da luminescência num intervalo de tempo compreendido de 1 a $10\mu\text{s}$, dependendo das condições de fluxo. Assim, o número de fótons detectados será muito menor que da quantidade de fótons emitida pela amostra, como consequência, é natural que essas amostras apresentem baixa intensidade de emissão, quando analisados por Citometria de fluxo.

Enfim, o objetivo que propusemos era de utilizar os híbridos como marcadores luminescentes em Citometria de fluxo com resolução temporal. D. Jin et al.¹⁵⁴ descrevem um dispositivo, onde o fotomultiplicador de detecção da luminescência é obtido $30\mu\text{s}$ após a excitação. Neste trabalho, também observamos uma emissão com resolução temporal, mas em condições menos favoráveis (fenda de $1\mu\text{s}$ e $\Delta t=20\mu\text{s}$).

2.2. Detecção por Microscopia de fluorescência

2.2.1. Adição de aminoácido (Fmoc- ϵ Ahx-OH)

Com o objetivo de obter um marcador biológico a partir de uma partícula luminescente mais anticorpo monoclonal, outra rota de funcionalização superficial das nanopartículas foi testada. Esta metodologia é conhecida como síntese peptídica em fase sólida. E está baseada na adição de aminoácidos à um suporte insolúvel que, inerte as condições de reação empregadas, fornece o suporte físico as moléculas ancoradas e possuem regiões definidas de alta reatividade química, denominadas sítios de reação. Sendo o suporte os híbridos preparados, e os sítios ativos os grupos hidroxilas da superfície.

O aminoácido utilizado na síntese foi o N- ϵ -Fmoc- ϵ -ácido aminocaprílico (Fmoc- ϵ -Ahx-OH). O aminoácido tem seu grupo N-terminal bloqueado pelo Fmoc, sendo que a reação de funcionalização ocorre entre os sítios ativos das partículas e o grupo C-terminal do aminoácido (COOH).

Após a síntese de funcionalização foi realizado o desbloqueio do aminoácido reagindo o material com piridina. Pois a piridina reage com o Fmoc, liberando CO₂ e dibenzofulveno. Após a separação das partículas, a solução resultante foi analisada em um espectro de absorção no UV-visível, monitorando em comprimento de onda de 290 nm, onde o grupo Fmoc absorve neste comprimento de onda, sendo possível sua quantificação. O grau de incorporação do aminoácido nas partículas foi calculado pela equação (19), e é apresentado na tabela 13.

Tabela 13: Valor da quantidade de aminoácido por grama de partícula, determinada pela quantidade de fmoc liberada após desbloqueio.

Tabela 13: *Quantité d'acide aminé par gramme d'hybride, valeur déterminée par dosage du Fmoc libéré.*

Híbrido	Quantidade de aminoácido por grama de partícula (mmol/g)
SiO _{2meso} -[Eu1] -NH ₂	0,15
SiO ₂ -[Eu1] -NH ₂	0,27
SiO ₂ @[Eu1] -NH ₂	0,31
SiO _{2meso} -[Eu2-NH ₂]	0,24
SiO ₂ -[Eu2] -NH ₂	0,31
SiO ₂ @[Eu2] -NH ₂	0,19
SiO _{2meso} -[Eu3]-NH ₂	0,12
SiO ₂ -[Eu3] -NH ₂	0,21
SiO ₂ @[Eu3] -NH ₂	0,17

Os valores de aminoácidos ancorados na superfície dos híbridos são satisfatórios para posterior adição do anticorpo. Esta etapa é importante, pois a adição de grupos espaçadores entre o luminóforo e o material a ser marcado é fundamental na estrutura de um marcador biológico.

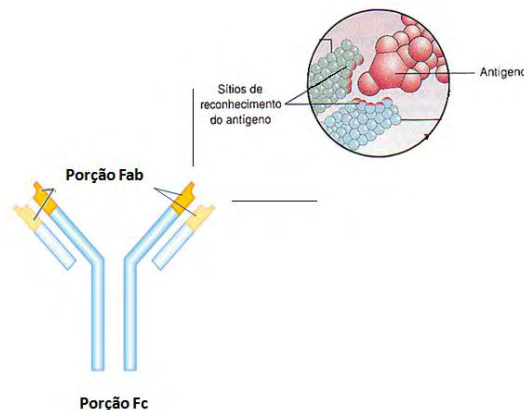
2.2.2. Acoplagem de Anticorpo monoclonal (IgG) sobre micro e nanopartículas obtidas no processo de síntese peptídica em fase sólida e estudos preliminares de marcação de bactérias.

A proposta de síntese escolhida, para o crescimento do grupo espaçador e posterior acoplagem do anticorpo monoclonal, foi a reação frente anidrido glutárico. Artigos ilustram que a espécie glutaraldeído é comumente utilizada na funcionalização de nanopartículas^{152; 153; 154; 155}, pois a ligação covalente entre um grupo amino e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a extremos de pH e temperatura.

O anidrido glutárico apresenta reatividade similar ao glutaraldeído e possui a vantagem de adicionar ao espaçador um grupo carboxílico terminal, criando condições adicionais para a acoplagem do anticorpo final.

Teoricamente, a etapa seguinte pode ser a acoplagem direta ao anticorpo monoclonal, mas alguns cuidados devem ser tomados. A figura 77 esquematiza a estrutura do anticorpo. Nesse sistema (comumente ilustrado em Y) existem regiões de reconhecimento de antígeno, conhecida como porção F_{ab}, e uma região chamada porção F_c que pode interagir com outras estruturas complementares, por exemplo, um substrato¹⁵⁵.

Figura 77: Estrutura esquematizada de um anticorpo, localizando as posições F_{ab} e F_c
Figura 77: Schéma du mode de reconnaissance antigène-anticorps : positions F_{ab} e F_c



A reação direta do grupo carboxila proveniente do anidrido glutárico, adicionado ao sistema partícula-aminoácido pode ocorrer indiscriminadamente sobre a porção F_{ab} ou F_c . No caso da acoplagem ocorrer sobre os sítios F_{ab} , o anticorpo terá sua atividade de reconhecimento de antígeno destruída, restando como única opção a reação de ligação anticorpo – partícula sobre a porção F_c .

Existem duas propostas para direcionar a acoplagem da partícula luminescente sobre a porção F_c : na primeira, o antígeno específico ao anticorpo liga-se a porção F_{ab} e o sistema resultante Anticorpo + Antígeno será utilizado na metodologia de acoplagem a partícula luminescente. Entretanto, neste sistema pode ocorrer a reação da partícula funcionalizada sobre a porção F_c do anticorpo ou mesmo sobre o antígeno. Além disso, este processo envolveria uma dificuldade adicional ao trabalho que é a manipulação de bactérias *Escherichia coli*. Na segunda proposta, uma estrutura que tenha afinidade reacional a porção F_c do anticorpo deve ser adicionada à partícula luminescente previamente funcionalizada via aminoácido + anidrido glutárico. Isto proporcionaria a partícula luminescente uma reação de acoplagem direcionada sobre a porção de interesse no anticorpo.

Neste projeto, optou-se pela segunda proposta. Escolhemos a “Proteína A” como a estrutura a ser adicionada sobre a partícula previamente funcionalizada. A Proteína A é uma proteína inerte originária de componentes da parede celular do *Staphylococcus aureus* que apresenta especificidade de ligação à porção F_c de imunoglobulinas originárias de mamíferos^{155; 156}. Desta forma, a ligação proteína A-anticorpo não interfere na reação antígeno-anticorpo, preservando a atividade da IgG.

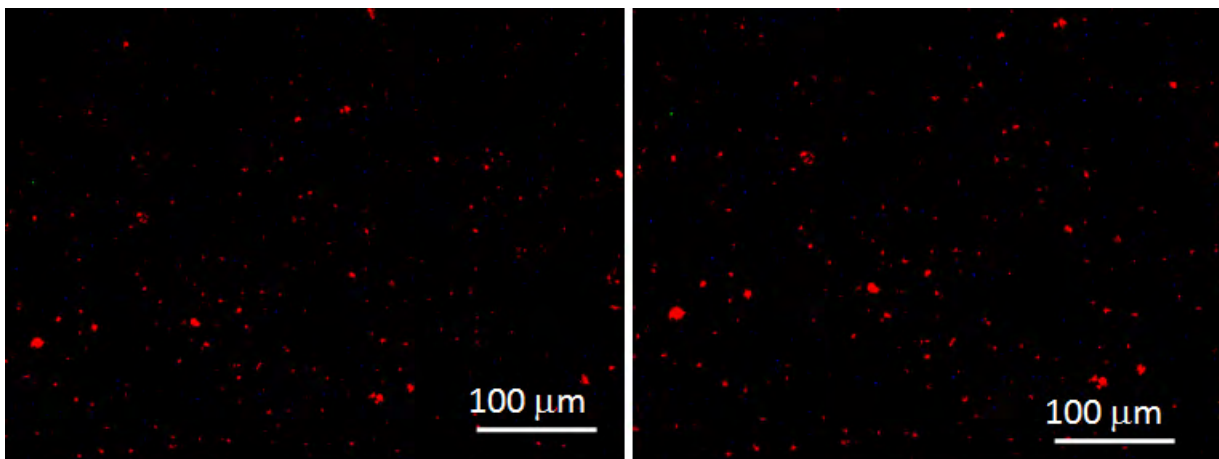
Para os testes de marcação biológica específica, funcionalizamos as partículas como descrito. Após a ancoragem do anticorpo IGg, específico do reconhecimento das bactérias

Escherichia coli, realizou-se os teste de reconhecimento, tendo o auxílio um microscópio de luminescência.

O híbrido $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]:IgG}$ foi disperso em uma solução de de tampão PBS (pH=7,0), e adicionadosobre uma placa onde a colônia de bactérias *Escherichia coli* foi fichada. Depois de 15 minutos, a placa foi lavada com solução IPBS para retirar o material que não reagiu com a bactéria. As laminas foram analisadas no microscópio de fluorescência.

As ligações específicas entre o anticorpo e a bactéria ocorrem via região Fab da imunoglobulina, que é responsáveis pela especificidade antigênica. Então foi possível observar a luminescência do material, podendo identificar grupos de bactérias marcadas, mostrando a eficiência na funcionalização e a possibilidade de utilização como marcadores biológicos (figura 78).

Figura 78: Fotos de microscopia de luminescencia das bactérias *Escherichiacoli* marcada com os híbridos: $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]-NH-Glu-pA-IgG1-Bac}$.
Figure 78: Photo de microscopie de luminescence des bacteries *Escherichia coli* marquées avec l'hybride $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]-NH-Glu-pA-IgG1-Bac}$.



Os híbridos $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$, $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu2]}$, $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ e $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu3]}$ apresentaram resultados satisfatório para todas as técnicas testadas.

Pela técnica de microscopia confocal é possível observar a luminescência dos híbridos tanto com excitação monofóton, caso da marcação do biofilme bacteriano, como também o teste de excitação bifóton.

Na Citometria de fluxo, observamos a luminescência com um atraso temporal dos híbridos $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$, $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu2]}$ e também das células de mastócitos marcadas com estes

híbridos. Mas comparado com a literatura, nosso sistema apresenta condições menos favoráveis (fenda de $1\mu\text{s}$ e $\Delta t=20\mu\text{s}$).

Na técnica de microscopia de fluorescência, observamos que a funcionalização dos híbridos para adição de anticorpo monoclonal proposta nesse trabalho é eficiente. Estudos para confirmar a ligação antígeno anticorpo é uma das etapas que serão estudadas em trabalhos futuro.

Os resultados preliminares mostram que estes híbridos são materiais com alto potencial para serem usados como biomarcadores e sondas em biologia.

7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Conclusões

Este trabalho descreveu a síntese, caracterização e estudo das propriedades de luminescência de híbridos a base de sílica e complexos de európio(III). Estes híbridos são organicamente modificados para testes de potencial aplicação como sondas ou biomarcadores.

Nos últimos anos o uso de quelatos de európio (III) em matrizes inorgânicas (sílica, alumina) e orgânicas (PMMA) foi o objetivo de muitos trabalhos para os quais as sínteses não estão bem controladas, cujas propriedades físico-químicas incluindo propriedades de luminescência devem ser melhoradas. Esta foi a primeira parte de nosso trabalho, onde obtivemos partículas de sílica e alumina dopadas com Eu^{3+} preparadas pela metodologia de pirólise de aerossol, que apresentavam propriedades de luminescência insatisfatórias para futuras aplicações. As partículas de PMMA dopadas com o complexo $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$, apresentam boas propriedades de luminescência, mas estas são solúveis nos solventes utilizados para posterior funcionalização. Para superar as deficiências destes materiais, desenvolvemos a síntese de dois tipos de híbridos à base de sílica na qual os luminóforos estão covalentemente ligados à matriz para impedir a liberação do mesmo durante as aplicações futuras. Para isto, complexos de európio (III) com ligantes com função alcoxisilanos foram sintetizados e completamente caracterizados. Os ligantes devem possuir além dos sítios de coordenação ao íon európio, com a característica de transferir energia ao lantanídeo (“efeito antena”), também um grupo capaz de ancorar o complexo na matriz inorgânica. Além do ligante bipyridina (bpy-Si) conhecido na literatura, desenvolvemos um novo ligante dicetona (TTA-Si), obtendo a partir destes uma família de três complexos de európio (III) $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{bpy-Si})]$, [Eu1]; $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{bpy-Si})]$, [Eu2] e $[\text{Eu}(\text{TTA-Si})_3]$, [Eu3].

Devido à versatilidade da sílica, obter partículas onde se pode incorporar luminóforos e também modificar sua superfície, este material foi escolhido para obter dois tipos de híbridos. Estes híbridos foram obtidos por ancoragem dos complexos de európio na superfície da sílica, ou por incorporação dos complexos durante a síntese de nanopartículas utilizando a metodologia de Stöber em uma microemulsão inversa.

Estas duas metodologias foram exploradas neste trabalho. A metodologia de microemulsão inversa foi utilizada para obter nanopartículas de tamanho entre 40 e 50 ± 5 nm com os três complexos incorporados. No entanto, estas partículas foram isoladas após avaliar um grande número de parâmetros (temperatura, surfactantes, co-solvente, a taxa de hidrólise,

a quantidade de amônia ...), incluindo fatores que são importantes para controlar o tamanho de acordo com o trabalho descrito na literatura para a incorporação de rutênio complexo (II). Finalmente os três híbridos foram caracterizados e sua morfologia foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, MET). A taxa de incorporação, expressa em mmol de complexo por grama de sílica, foram bastante satisfatórios e bem acima dos valores descritos até agora na literatura.

A ancoragem dos complexos na superfície de partículas de sílica foi realizada utilizando nanopartículas de sílica comercial, tipo Ludox, 24 ± 2 nm, e também sílica mesoporosa sintetizada por pirólise de aerossol. A peculiaridade deste método é a produção de partículas de sílica mesoporosa em uma única etapa, muito mais rápido que o método convencional sol-gel. O tamanho de partícula não é uniforme, entre 0,05 e 2,5 microns, mas devido a porosidade apresenta uma área superficial elevada $860 \text{ m}^2/\text{g}$ comparado a partículas densas de Ludox $380 \text{ m}^2/\text{g}$

Assim, os três complexos de európio foram ancorados na matriz de sílica comercial e mesoporosa para fornecer seis novos híbridos de tamanhos (0,025 a 2,5 m), caracterizada por uma taxa de ancoragem entre 0,1 e 0,6 mmol de complexo por grama de suporte.

Obtivemos espectros de emissão e excitação destes dos híbridos e complexos puros em fase sólida e a temperatura ambiente. Os espectros de excitação obtidos no caso dos híbridos mostram transições deslocadas em relação aos precursores, sugerindo a existência de interações entre a matriz de sílica e complexo. As características das transições de európio são observadas em todos os espectros de emissão. Alargamento não homogêneo de todas as linhas é observado para o híbrido como uma consequência de uma distribuição diferente dos sítios de simetria ocupado pelo íon európio. Os espectros correspondentes às nanopartículas ancoradas funcionalizados são muito próximos aos do complexo livre de acordo com o fato de que o complexo com função alcoxilano permanece na superfície das nanopartículas. Quando são incorporados na matriz, maiores restrições estão mudando o ambiente do centro metálico, resultando em um maior alargamento destas transições no espectro de emissão. Estes resultados são muito interessantes porque mostram que os complexos são estáveis após o processo de imobilização. Estas propriedades de luminescência associada à morfologia desses híbridos e sua estabilidade sugerem que estes híbridos são bons candidatos como ferramentas de análise de meios biológicos. Todos os híbridos luminescentes foram testados ainda sem funcionalização por microscopia confocal e os resultados indicam que estes híbridos poderiam ser usados como uma ferramenta para exploração de biofilmes ou também como uma sonda

em espectroscopia multifotônica. Finalmente, nove híbridos foram bio-funcionalizadas (por um anticorpo ou um grupo N-hidroxisuccinimida) para alcançar um sistema de marcação de células e detecção por Citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, técnicas amplamente utilizadas em laboratorial de biologia. Os primeiros resultados mostram que estes híbridos, especialmente os obtidos por ancoragem do complexo [Eu(TTA)₃(bpy-Si)], são bons candidatos adaptado para análise em testes biológicos e, portanto, interessante para o aplicações como biomarcadores.

2. Perspectivas Futuras

Partindo das propriedades fotoluminescentes dos complexos e híbridos apresentados neste trabalho, podem-se sugerir as seguintes etapas como propostas de trabalhos futuros:

- Teste em diferentes matrizes, e matrizes de sílica mesoporosa de diâmetro de poros variados;
- Analisar por Microscopia confocal com excitação monofóton e bifóton os híbridos funcionalizados com anticorpos monoclonais e materiais biológicos. Com estudo do mecanismo de excitação bifóton em complexos de európio;
- Realizar metodologias que comprovem as reações antígeno-anticorpo nos materiais.

REFERÊNCIAS

- 1 PRASAD, P. N. **Introduction to biophotonics**. New Jersey: J. Wiley Interscience, 2003.
- 2 PRASAD, P. N. **Nanophotonics**. New Jersey: Wiley Interscience, 2004.
- 3 BRUCHEZ, M. Jr. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. **Science**, v. 281, p. 2013-2016, 1998.
- 4 BUNZLI, J-C. G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. **Chem. Rev.**, v. 110, p. 2729-2755, 2010.
- 5 ABRÃO, A. **Química e tecnologia das terras-raras**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, 1994.
- 6 BLASSE, G.; BRIL, A. Characteristic luminescence. I. Absorption and emission spectra of some important activators. **Philips Tech. Rev.**, v. 31, p. 304-314, 1970.
- 7 BINNEMANS, K. Lanthanide-based luminescent hybrid materials. **Chem. Rev.**, v.109, n. 9, p. 4283-4374, 2009.
- 8 SASTRI, V. S. et al. **Modern aspects of rare earth and their complexes**. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- 9 MALTA, O. L.; CARLOS, L. D. Intensities of 4f-4f transitions in glass materials. **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 889-895, nov./dez. 2003.
- 10 CAIUT, J. M. D. A. **Estudo de aluminóxanos dopados com íons Eu^{3+} e preparação de híbridos orgânicos-inorgânicos**. 2006. 144 f (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- 11 JUDD, B. R. Optical absorption intensities of rare earth ions. **Phys. Rev.**, v. 127, p. 750-761, 1962.
- 12 JOERGENSEN, C. K.; JUDD, B. R. Hypersensitive pseudoquadrupole transitions in lanthanides. **Mol. Phys.**, v. 8, p. 281-290, 1964.
- 13 CARLOS, L. D. et al. Lanthanide-containing light-emitting organic-inorganic hybrids: a bet on the future. **Adv. Mater.**, v. 21, n. 5, p. 509-534, 2009.
- 14 CARNALL, W. T. **Optical spectroscopy of f-element compounds**. Baltimore: Argonne Natl. Lab., 1978. p. 29.

- 15 CARNALL, W. T.; CROSSWHITE, H.; CROSSWHITE, H. M. **Energy level structure and transition probabilities in the spectra of the trivalent lanthanides in lanthanum fluoride**. Baltimore: The Johns Hopkins University, 1978. (Relatório).
- 16 CROSBY, G. A.; DEMAS, J. N. Quantum efficiencies on transition metal complexes. II. Charge-transfer luminescence. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 93, p. 2841-2847, 1971.
- 17 VAVILOV, S. I. The fluorescence efficiency of dye solutions. **Z. Phys.**, v. 22, p. 266-272, 1924.
- 18 PORRES, L. et al. Absolute measurements of photoluminescence quantum yields of solutions using an integrating sphere. **J. Fluoresc.**, v. 16, p. 267-273, 2006.
- 19 GUDMUNDSEN, R. A.; MARSH, O. J.; MATOVICH, E. Fluorescence of europium thenoyltrifluoroacetate. II. Determination of absolute quantum efficiency. **J. Chem. Phys.**, v. 39, p. 272-274, 1963.
- 20 NAKAMURA, S. et al. Synergic extraction of lanthanoids by mixtures of LIX 54 (high molecular weight beta-diketone) and bidentate neutral amines. **Anal. Sci.**, v. 18, n. 3, p. 319-323, Mar. 2002.
- 21 WU, A. H. B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. **Clin. Chim. Acta.**, v. 369, p. 119-124, 2006.
- 22 CHINOL, M.; HNATOWICH, D. J. Generator-produced yttrium-90 for radioimmunotherapy. **J. Nucl. Med.**, v. 28, p. 1465-70, 1987.
- 23 SASTRI, V. S. et al. **Modern aspects of rare earth and their complexes**. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- 24 WOLBERS, M. P. O. et al. Novel preorganized hemispherands to encapsulate rare earth ions: shielding and ligand deuteration for prolonged lifetimes of excited Eu^{3+} ions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, p. 138-144, 1997.
- 25 MALTA, O. L. et al. Intensity parameters of 4f-4f transitions in the $\text{Eu}(\text{dipivaloylmethanate})_3 \cdot 1,10\text{-phenanthroline}$ complex. **J. Lumin.**, v. 69, p. 77-84, 1996.
- 26 SUPKOWSKI, R. M.; HORROCKS, W. D. Jr. On the determination of the number of water molecules, q, coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 340, p. 44-48, 2002.
- 27 DIAS, F. A. et al. Spectroscopic study and local coordination of polyphosphate colloidal systems. **Langmuir**, v. 21, n. 5, p. 1776-1783, Mar. 2005.
- 28 LENAERTS, P.; GOERLLER-WALRAND, C.; BINNEMANS, K. Luminescent europium(III) and terbium(III) nicotinate complexes covalently linked to a 1,10-phenanthroline functionalised sol-gel glass. **J. Lumin.**, v. 117 p. 163-169, 2006.

- 29 BINNEMANS, K. Rare-earth beta-diketonates. In: GSCHNEIDNER, K. A.; BÜNZLI, J.-C. G.; PECHARSKY, V. K. **Handbook on the physics and chemistry of rare earths**. Amsterdam: Elsevier, 2005. v.35, p. 208-457.
- 30 WEISSMAN, S. I. Intramolecular energy transfer. The fluorescence of complexes of europium. **J. Chem. Phys.**, v. 10, p. 214-217, 1942.
- 31 SABBATINI, N. et al. Lanthanide complexes of encapsulating ligands: luminescent devices at the molecular level. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 135-140, 1995.
- 32 SABBATINI, N.; GUARDIGLI, M.; LEHN, J. M. Luminescent lanthanide complexes as photochemical supramolecular devices. **Coord. Chem. Rev.**, v. 123, p. 201-228, 1993.
- 33 MAYER, A.; NEUENHOFER, S. Luminescence labels - an alternative to radioisotopes? **Angew. Chem.**, v. 106, p. 1097-1126, 1994.
- 34 NAUMANN, S. et al. **Nanotechnologies for the life**. Kumar: Wiley-VCH, 2005.
- 35 TAYLOR, J. R.; FANG, M. M.; NIE, S. Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. **Anal. Chem.**, v. 72, p. 1979-1986, 2000.
- 36 GENETET, N. **Immunologie**. 4th ed. Paris: Tec & Doc, 2002.
- 37 ECKERT, H. G. Radioimmunoassay. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 15, p. 525-533, 1976.
- 38 ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.
- 39 ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labeled antigen and antibody-coated tubes. **Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.**, v. 251, p. 427-434, 1971.
- 40 BEVERLOO, H. B. et al. Inorganic phosphors as new luminescent labels for immunocytochemistry and time-resolved microscopy. **Cytometry**, v. 11, p. 784-792, 1990.
- 41 LE, G. X. et al. Formation of fluorescent metal (Au, Ag) nanoclusters capped in bovine serum albumin followed by fluorescence and spectroscopy. **J. Phys. Chem. C.**, v. 115, p. 10955-10963, 2011.
- 42 CAI, W. et al. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnol. Sci. Appl.**, v. 1, p. 17-32, 2008.

- 43 WENSELEERS, W. et al. Five orders-of-magnitude enhancement of two-photon absorption for dyes on silver nanoparticle fractal clusters. **J. Phys. Chem. B**, v. 106, p. 6853-6863, 2002.
- 44 YIN, X. et al. Near-field two-photon nanolithography using an apertureless optical probe. **Appl. Phys. Lett.**, v. 81, p. 3663-3665, 2002.
- 45 GERION, D. et al. Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots. **J. Phys. Chem. B**, v. 105, p. 8861-8871, 2001.
- 46 ROGACH, A. L. et al. "Raisin bun"-type composite spheres of silica and semiconductor nanocrystals. **Chem. Mater.**, v. 12, p. 2676-2685, 2000.
- 47 MEDINTZ, I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nat. Mater.**, v. 4, p. 435-446, 2005.
- 48 FARIAS, P. M. et al. Hybrid organic/II-VI quantum dots: highly luminescent nanostructures for bioimaging. **Proc. SPIE**, v. 6867, p. 68670G/1-68670G/6, 2008.
- 49 BURNS, A.; OW, H.; WIESNER, U. Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, p. 1028-1042, 2006.
- 50 BELE, M.; SIIMAN, O.; MATIJEVIC, E. Preparation and flow cytometry of uniform silica-fluorescent dye microspheres. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 254, p. 274-282, 2002.
- 51 SANTRA, S. et al. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 4988-4993, 2001.
- 52 ROSSI, L. M. et al. Fluorescent silica nanospheres for digital counting bioassay of the breast cancer marker HER2/neu. **Biosens. Bioelectron.**, v. 21, p. 1900-1906, 2006.
- 53 ZHAO, X.; BAGWE, R. P.; TAN, W. Development of organic dye-doped silica nanoparticles in a reverse microemulsion. **Adv. Mater.**, v. 16, n. 3-4, p. 173-176, 2004.
- 54 YANG, P. et al. A magnetic, luminescent and mesoporous core-shell structured composite material as drug carrier. **Biomaterials**, v. 30, p. 4786-4795, 2009.
- 55 SIVAKUMAR, S. et al. Silica-coated Ln³⁺-doped LaF₃ nanoparticles as robust down- and upconverting biolabels. **Chem.--Eur. J.**, v. 12, p. 5878-5884, 2006.

- 56 CHATTERJEE, D. K.; RUFAlHAH, A. J.; ZHANG, Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. **Biomaterials**, v. 29, p. 937-943, 2008.
- 57 ASAKURA, R. et al. Tagging of avidin immobilized beads with biotinylated YAG:Ce³⁺ nanocrystal phosphor. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 386, p. 1641-1647, 2006.
- 58 KONG, D. Y. et al. Biofunctionalization of CeF₃:Tb³⁺ nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, p. 075601-075608, 2007.
- 59 DOAT, A. et al. Europium-doped bioapatite: a new photostable biological probe, internalizable by human cells. **Biomaterials**, v. 24, p. 3365-3371, 2003.
- 60 DOSEV, D. et al. Application of luminescent Eu:Gd₂O₃ nanoparticles to the visualization of protein micropatterns. **J. Biomed. Opt.**, v. 10, p. 064006-064010, 2005.
- 61 BEAUREPAIRE, E. et al. Functionalized fluorescent oxide nanoparticles: artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level. **Nano Lett.**, v. 4, p. 2079-2083, 2004.
- 62 NICHKOVA, M. et al. Eu³⁺-doped Gd₂O₃ nanoparticles as reporters for optical detection and visualization of antibodies patterned by microcontact printing. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 384, p. 631-637, 2006.
- 63 NICHKOVA, M. et al. Microarray immunoassay for phenoxybenzoic acid using polymer encapsulated Eu:Gd₂O₃ nanoparticles as fluorescent labels. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 6864-6873, 2005.
- 64 BUNZLI, J-C. G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. **Chem. Rev.**, v. 110, n. 5, p. 2729-2755, May 2010.
- 65 LAW, G-L. et al. Emissive terbium probe for multiphoton in vitro cell imaging. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, p. 3714-3715, 2008.
- 66 PICOT, A. et al. Long-lived two-photon excited luminescence of water-soluble europium complex: applications in biological imaging using two-photon scanning microscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, p. 1532-1533, 2008.
- 67 BUENZLI, J-C. G.; FIGUET, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. **Chem. Soc. Rev.**, v. 34, p. 1048-1077, 2005.
- 68 KOROVIN, Y.; RUSAKOVA, N. Infrared 4f-luminescence of lanthanides in the complexes with macrocyclic ligands. **Rev. Inorg. Chem.**, v. 21, p. 299-329, 2001.

- 69 PETOUD, S. et al. Stable lanthanide luminescence agents highly emissive in aqueous solution: multidentate 2-hydroxyisophthalamide complexes of Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} . **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 13324-13325, 2003.
- 70 YANG, C. et al. A highly luminescent europium complex showing visible-light-sensitized red emission: direct observation of the singlet pathway. **Angew. Chem. Int. Ed.** v. 43, p. 5010-5013, 2004.
- 71 QUICI, S. et al. Visible and near-infrared intense luminescence from water-soluble lanthanide [Tb(III), Eu(III), Sm(III), Dy(III), Pr(III), Ho(III), Yb(III), Nd(III), Er(III)] complexes. **Inorg. Chem.**, v. 44, p. 529-537, 2005.
- 72 QUICI, S. et al. Highly luminescent Eu^{3+} and Tb^{3+} macrocyclic complexes bearing an appended phenanthroline chromophore. **Inorg. Chem.**, v. 41, p. 2777-2784, 2002.
- 73 HUHTINEN, P. et al. Synthesis, characterization, and application of Eu(III), Tb(III), Sm(III), and Dy(III) lanthanide chelate nanoparticle labels. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 2643-2648, 2005.
- 74 HEMMILAE, I.; LAITALA, V. Progress in lanthanides as luminescent probes. **J. Fluoresc.**, v. 15, p. 529-542, 2005.
- 75 SOUKKA, T. et al. Utilization of kinetically enhanced monovalent binding affinity by immunoassays based on multivalent nanoparticle-antibody bioconjugates. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 2254-2260, 2001.
- 76 YE, Z. et al. Preparation, characterization, and time-resolved fluorometric application of silica-coated terbium (III) fluorescent nanoparticles. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 513-518, 2004.
- 77 CHEN, Y.; LU, Z. Dye sensitized luminescent europium nanoparticles and its time-resolved fluorometric assay for DNA. **Anal. Chim. Acta**, v. 587, p. 180-186, 2007.
- 78 RICHARDSON, F. S. Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. **Chem. Rev.**, v. 82, p. 541-52, 1982.
- 79 ESCRIBANO, P. et al. Photonic and nanobiophotonic properties of luminescent lanthanide-doped hybrid organic-inorganic materials. **J. Mater. Chem.**, v. 18, p. 23-40, 2008.
- 80 ELISEEVA, S. V.; BUNZLI, J-C. G. Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, p. 189-227, 2010.
- 81 ZHANG, C. et al. Rare earth upconversion nanophosphors: synthesis, functionalization and application as biolabels and energy transfer donors. **J. Rare Earths**, v. 28, p. 807-819, 2010.

- 82 LI, H. R. et al. Preparation and luminescence properties of hybrid materials containing europium(III) complexes covalently bonded to a silica matrix. **Chem. Mater.**, v. 14, p. 3651-3655, 2002.
- 83 BINNEMANS, K. et al. A luminescent tris(2-thenoyltrifluoroacetato) europium(III) complex covalently linked to a 1,10-phenanthroline-functionalised sol-gel glass. **J. Mater. Chem.**, v. 14, p. 191-195, 2004.
- 84 WANG, Q. et al. Synthesis of water soluble quantum dots for monitoring carrier-DNA nanoparticles in plant cells. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 11, p. 2208-2214, 2011.
- 85 LI, H. R. et al. Preparation and luminescence properties of in situ formed lanthanide complexes covalently grafted to a silica network. **New J. Chem.**, v. 28, n. 9, p. 1137-1141, 2004.
- 86 LENAERTS, P. et al. Thin films of highly luminescent lanthanide complexes covalently linked to an organic-inorganic hybrid material via 2-substituted imidazo[4,5-f]-1,10-phenanthroline groups. **Chem. Mater.**, v. 17, p. 5194-5201, 2005.
- 87 MENG, Q. et al. Luminescence properties of Eu^{3+} β -diketonates incorporated in cubic mesoporous silica. **J. Lumin.**, v. 124, p. 15-22, 2007.
- 88 CIDES, D. S. L. C. et al. Luminescent europium complexes encapsulated in cage-like cubic ordered mesoporous silica. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 92, p. 94-100, 2006.
- 89 OLIVEIRA, E. de. et al. Antenna effect in highly luminescent Eu^{3+} anchored in hexagonal mesoporous silica. **Chem. Mater.**, v. 19, p. 5437-5442, 2007.
- 90 YAN, B.; ZHOU, B. Two photoactive lanthanide (Eu^{3+} , Tb^{3+}) hybrid materials of modified β -diketone bridge directly covalently bonded mesoporous host (MCM-41). **J. Photochem. Photobiol. A**, v. 195, n. 2-3, p. 314-322, Apr. 2008.
- 91 LI, Y.; YAN, B.; YANG, H. Construction, characterization, and photoluminescence of mesoporous hybrids containing europium(III) complexes covalently bonded to SBA-15 directly functionalized by modified β -diketone. **J. Phys. Chem. C**, v. 112, p. 3959-3968, 2008.
- 92 GAGO, S. et al. Highly luminescent tris(β -diketonate)europium(III) complexes immobilized in a functionalized mesoporous silica. **Chem. Mater.**, v. 17, p. 5077-5084, 2005.
- 93 CHARBONNIERE, L. J. et al. Spatial and temporal discrimination of silica particles functionalised with luminescent lanthanide markers using time-resolved luminescence microscopy. **New J. Chem.**, v. 28, n. 7, p. 777-781, 2004.

- 94 GULINO, A. et al. Tunable luminescent properties of a europium complex monolayer. **J. Mater. Chem.**, v. 19, p. 3507-3511, 2009.
- 95 LI, H. R. et al. Preparation and luminescence properties of hybrid materials containing europium(III) complexes covalently bonded to a silica matrix. **Chem. Mater.**, v. 14, p. 3651-3655, 2002.
- 96 QIAO, X. F.; YAN, B. Covalently bonded assembly of lanthanide/silicon-oxygen network/polyethylene glycol hybrid materials through functionalized 2-thenoyltrifluoroacetone linkage. **J. Phys. Chem. B**, v. 113, p. 11865-11875, 2009.
- 97 ZHANG, H. et al. Dual-lanthanide-chelated silica nanoparticles as labels for highly sensitive time-resolved fluorometry. **Chem. Mater.**, v. 19, p. 5875-5881, 2007.
- 98 COUSINIE, S. et al. Silica-based nanohybrids containing dipyridine, urethan, or urea derivatives. **Chem. Mater.**, v. 19, p. 6492-6503, 2007.
- 99 ROCHA, L. A. et al. Non-leachable highly luminescent ordered mesoporous SiO₂ spherical particles. **Nanotechnology**, v. 21, p. 155603/1-155603/6, 2010.
- 100 CAREL, J. et al. **Immunochemistry**. New York: Wiley, 1994.
- 101 KOEHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.
- 102 HUDSON, P. J.; SOURIAU, C. Engineered antibodies. **Nat. Med.**, v. 9, p. 129-134, 2003.
- 103 ODABAS, S. et al. Separation of mesenchymal stem cells with magnetic nanosorbents carrying Cd105 and Cd73 antibodies in flow-through and batch systems. **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 861, p. 74-80, 2008.
- 104 SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. 2nd ed. New York: Liss, 1988.
- 105 BRINKLEY, M. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents. **Bioconjugate Chem.**, v. 3, p. 2-13, 1992.
- 106 BRUIN, H. G.; LEUR-EBELING, I.; AAIJ, C. Quantitative determination of the number of FITC-molecules bound per cell in immunofluorescence flow cytometry. **Vox Sang.**, v. 44, p. 373-377, 1983.
- 107 GURAV, A. et al. **Aerosol processing of materials**. Chemical Engineering Department, University of New Mexico, Albuquerque, 1993. p. 428-440.

- 108 REUGE, N. et al. Modeling of spray pyrolysis - why are the synthesized Y_2O_3 microparticles hollow? **AIChE J.**, v. 54, p. 394-405, 2008.
- 109 ROCHA, L. A. **Materiais meso-estruturados luminescentes**. 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 110 MELBY, L. R. et al. Synthesis and fluorescence of some trivalent lanthanide complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, p. 5117-5125, 1964.
- 111 KATO, T. et al. Preparation of hollow alumina microspheres by ultrasonic spray pyrolysis. **J. Ceram. Soc. Jpn.**, v. 110, p. 146-148, 2002.
- 112 VALLET-REGI, M. et al. Control of structural type and particle size in alumina synthesized by the spray pyrolysis method. **Solid State Ionics**, v. 101-103, p. 197-203, 1997.
- 113 MONTEIRO, M. A. F. et al. Photoluminescence behavior of Eu^{3+} ion doped into γ - and α -alumina systems prepared by combustion, ceramic and Pechini methods. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 108, p. 237-246, 2008.
- 114 KANG, H. S. et al. Morphology of particles prepared by spray pyrolysis from organic precursor solution. **Mater. Lett.**, v. 57, p. 1288-1294, 2003.
- 115 TAGAYA, M. et al. Synthesis and luminescence properties of Eu(III)-doped nanoporous silica spheres. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 363, p. 456-464, 2011.
- 116 HUANG, C. Q.; CAI, Q.; TIAN, W. J. Fluorescence properties of RE-doped silica spheres. **Proc. SPIE**, v. 7847, p. 78472V/1-78472V/6, 2010.
- 117 MARQUES, R. F. C. et al. Nanocomposites materials generated from a spray. **Braz. J. Phys.**, v. 39, p. 176-181, 2009.
- 118 CAIUT, J. M. A. et al. Aluminoxane-epoxi-siloxane hybrids waveguides. **J. Non-Cryst. Solids**, v. 354, n. 42-44, p. 4795-4799, 2008.
- 119 CAIUT, J. M. A. et al. Luminescent nano-composites generated from a spray. **J. Non-Cryst. Solids**, v. 354, p. 4860-4864, 2008.
- 120 MORITA, M. et al. Photoluminescence and excitation energy transfer of rare earth ions in nanoporous xerogel and sol-gel SiO_2 glasses. **Struct. Bonding**, v. 107, p. 115-143, 2004.

- 121 KAI, J. et al. Intermolecular energy transfer and photostability of luminescence-tuneable multicolour PMMA films doped with lanthanide-beta-diketonate complexes. **J. Mater. Chem.**, v. 21, n. 11, p. 3796-3802, 2011.
- 122 TEOTONIO, E. E. S. et al. Luminescence investigations on Eu(III) thenoyltrifluoroacetate complexes with amide ligands. **J. Coord. Chem.**, v. 56, p. 913-921, 2003.
- 123 MALTA, O. L. et al. Spectroscopic properties of a new light-converting device Eu(thenoyltrifluoroacetate)₃ 2(dibenzyl sulfoxide). A theoretical analysis based on structural data obtained from a sparkle model. **J. Lumin.**, v. 75, p. 255-268, 1997.
- 124 COUSINIE, S. et al. Europium(III) complexes containing organosilyldipyridine ligands grafted on silica nanoparticles. **Langmuir**, v. 24, p. 6208-6214, 2008.
- 125 ZHAO, D. et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. **Science**, v. 279, p. 548-552, 1998.
- 126 WIRNSBERGER, G. et al. Mesostructured materials for optical applications: from low-k dielectrics to sensors and lasers. **Spectrochim. Acta, Part A**, v. 57A, p. 2049-2060, 2001.
- 127 PROUZET, E. et al. Roughness of mesoporous silica surfaces deduced from adsorption measurements. **Microporous Mesoporous Mater.**, v. 119, p. 9-17, 2009.
- 128 HARBUZARU, B. V. et al. A miniaturized linear pH sensor based on a highly photoluminescent self-assembled europium(III) metal-organic framework. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 48, p. 6476-6479, 2009.
- 129 KRESGE, C. T. et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**, v. 359, p. 710-12, 1992.
- 130 TRIANTAFYLIDIS, K. S. et al. Gas-oil cracking activity of hydrothermally stable aluminosilicate mesostructures (MSU-S) assembled from zeolite seeds: effect of the type of framework structure and porosity. **Catal. Today**, v. 112, p. 33-36, 2006.
- 131 HOFFMANN, F. et al. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 45, p. 3216-3251, 2006.
- 132 VANSANT, E. F.; VAN DER VOORT, P.; VRANCKEN, K. C. Characterization and chemical modification of silica surface. In: _____ . **Studies in surface science and catalysis**. Amsterdam: Elsevier, 1995. v.93.
- 133 BRUNO, S. M. et al. Synthesis, characterisation and luminescence properties of MCM-41 impregnated with an Eu³⁺ β-diketonate complex. **Microporous and Mesoporous Mater.**, v. 113, n. 1-3, p. 453-462, Aug. 2008.

- 134 FRANCIS, B.; AMBILI, R. D. B.; REDDY, M. L. P. Highly efficient luminescent hybrid materials covalently linking with europium(III) complexes via a novel fluorinated β -diketonate ligand: synthesis, characterization and photophysical properties. **Dalton Trans.**, v. 39, p. 8084-8092, 2010.
- 135 WANG, L. et al. Watching silica nanoparticles glow in the biological world. **Anal. Chem.**, v. 78, n. 3, p. 646-654, Feb. 2006.
- 136 HASEGAWA, Y.; WADA, Y.; YANAGIDA, S. Strategies for the design of luminescent lanthanide(III) complexes and their photonic applications. **J. Photochem. Photobiol., C**, v. 5, p. 183-202, 2004.
- 137 LAMANSKY, S. et al. Highly phosphorescent bis-cyclometalated iridium complexes: synthesis, photophysical characterization, and use in organic light emitting diodes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, p. 4304-4312, 2001.
- 138 SATO, S.; WADA, M. Relations between intramolecular energy transfer efficiencies and triplet state energies in rare earth β -diketone chelates. **Bull. Chem. Soc. Jap.**, v. 43, p.1955-1962, 1970.
- 139 CHEN, X-F. et al. Triboluminescence and crystal structures of non-ionic europium complexes. **J. Mater. Chem.**, v. 9, p. 2919-2922, 1999.
- 140 MOSER, D. F.; THOMPSON, L. C.; YOUNG, V. G. Structures of the 1,10-phenanthroline and 2,2'-dipyridyl adducts of tris(2,6-dimethylheptane-3,5-dionato)europium(III). **J. Alloys Compd.**, v. 303-304, p. 121-124, 2000.
- 141 BLASSE, G.; MEIJERINK, A.; DONÉGA, C. M. de. Vibronic rare earth spectroscopy: results and pitfalls. **J. Alloys Compd.**, v. 225, p. 24-27, 1995.
- 142 CAIUT, J. M. A. et al. Synthesis and luminescence properties of water dispersible Eu^{3+} -doped boehmite nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, p. 455605/1-455605/8, 2007.
- 143 DUARTE, A. P. et al. Structural and luminescence properties of silica-based hybrids containing new silylated-diketonato europium(III) complex. **J. Phys. Chem. C**, v. 116, n. 1, p. 505-515, 2011.
- 144 FERNANDES, M. et al. Highly photostable luminescent poly(ϵ -caprolactone)siloxane biohybrids doped with europium complexes. **Chem. Mater.**, v. 19, p. 3892-3901, 2007.
- 145 CLAXTON, N. S.; FELLERS, T. J.; DAVIDSON, M. W. **Laser scanning confocal microscopy**. Disponível em: <<http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2011.

- 146 HE, G. S. et al. Asymmetric properties between the forward and backward stimulated emission generated by ultrafast three- and four-photon excitation. **Phys. Rev. A: At., Mol. Opt. Phys.**, v. 73, p. 033815/1-033815/10, 2006.
- 147 HE, G. S. et al. Observation of stimulated emission by direct three-photon excitation. **Nature**, v. 415, p. 767-770, 2002.
- 148 WERTS, M. H. V. et al. Action cross sections of two-photon excited luminescence of some Eu(III) and Tb(III) complexes. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 4, p. 531-538, 2005.
- 149 XU, C.; WEBB, W. W. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. **J. Opt. Soc. Am. B**, v. 13, p. 481-491, 1996.
- 150 JOHNSON, G. Antibodies: a practical approach. In: CATTY, D. **Immunofluorescence**. Birmingham: URL Press, 1989. v. 2, p.176-189.
- 151 WALLER, A. et al. Validation of flow cytometric competitive binding protocols and characterization of fluorescently labeled ligands. **Cytometry**, v. 45, p. 102-114, 2001.
- 152 ZHANG, Y.; ZHANG, J. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 283, p. 352-357, 2005.
- 153 MUELLER, R. et al. Protecting nanoscaled non-oxidic particles from oxygen uptake by coating with nitrogen-containing surfactants. **Langmuir**, v. 20, p. 2598-2606, 2004.
- 154 BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, p. 877-882, 2006.
- 155 BABACAN, S. et al. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. **Biosens. Bioelectron.**, v. 15, p. 615-621, 2000.
- 156 KANNO, S. et al. Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization. **J. Biotechnol.**, v. 76, p. 207-214, 2000.
- 157 JIN, D. R.; CONNAL, Y. J. PIPER. Practical time gated luminescence flow cytometry. I: concepts. **Cytometry**, v.71A, p. 783-796, 2002.
- 158 LOURENÇO, A. V. S. et al. Preparation and photoluminescence properties of functionalized silica materials incorporating europium complexes. **Optical Materials**, v.33 p. 1548–1552, 2011.

RÉSUMÉ DE THÈSE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	193
1. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	194
1. Les lanthanides	194
2. Structure générale d'un marqueur biologique et détection.....	202
3. Hybrides à base de silice et de chélate d'euporium.....	205
OBJECTIFS	210
1. Objectifs spécifiques.....	210
3- ETUDE EXPLORATOIRE DE PARTICULES LUMINESCENTES A BASE D'EUROPIUM(III)	212
1. Matrices d'Alumine et de silice dopées avec Eu^{3+} obtenues par pyrolyse d'aérosol, $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$	212
2. Composite PMMA: $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$	214
4. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION D'HYBRIDES A BASE DE SILICE ET DE COMPLEXES SILYLES D'EUROPIUM(III)	216
1. Complexes d'euporium à ligand bipyridine silylé	217
2. Complexes d'euporium à ligand thénoltrifluoroacétone silylé.....	217
3. Hybrides à base de silice et de complexes d'euporium.....	219
4. Propriétés de luminescence	221
5. SONDÉS LUMINESCENTES : ESSAIS EXPLORATOIRES D'ANALYSE DE MILIEUX BIOLOGIQUES.....	225
1. Observation en microscopie confocale (CLSM)	225
2. Marquage cellulaire.....	227
CONCLUSION GÉNÉRALE	228

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Associer la luminescence des ions lanthanides avec les propriétés physico-chimiques des nanoparticules de silice constitue une alternative intéressante pour l'obtention de marqueurs luminescents de biomolécules. Les nanoparticules de silice jouent un rôle excellent en tant que matrice protectrice, en isolant les ions actifs des perturbations extérieures qui tendent à diminuer le phénomène de luminescence. Enfin, la possibilité de fonctionnaliser chimiquement la surface des particules est intéressante pour rendre ces matériaux biocompatibles^{1,2}.

Depuis une dizaine d'année, la recherche dans le domaine de l'analyse biomédicale nécessite l'élaboration de nano-objets spécifiques pour le marquage de cellules, l'identification et la séparation de gènes, de tissus permettant ainsi d'avancer dans la compréhension de nombreuses maladies³. La recherche, tant en chimie moléculaire qu'en chimie des matériaux, s'applique à développer de nouveaux systèmes organique-inorganiques pour des applications en bionanotechnologie.

Les composés organiques sont le plus largement utilisés en tant que biomarqueurs dans les analyses de routine et sont disponibles sous forme de kits. Toutefois, ces biomarqueurs ont quelques limitations telles que leur photostabilité réduite, le fait que leur émission de luminescence se produit dans la région de l'autofluorescence des matériaux biologiques et avec une durée de vie très courte (quelques nanosecondes). Une façon de surmonter ces désavantages est le développement de matériaux luminescents stables dont la durée de vie d'émission est suffisante pour pouvoir mesurer l'émission de lumière après l'extinction de la luminescence de l'environnement biologique. Les matériaux à base de lanthanides sont de bons candidats pour de telles mesures⁴. Dans ce contexte le sujet de cette thèse vise la préparation de nouveaux hybrides organique-inorganiques submicroniques luminescents qui pourront être fonctionnalisés par des groupes de reconnaissance biologique et être utilisés dans les processus de marquage de systèmes biologiques.

1. Contexte bibliographique

1. Les lanthanides

Les lanthanides, en tant que métaux de transition internes, possèdent la configuration électronique $[\text{Kr}] 4d^{10} 4f^n 5s^2 5p^6$, où la sous couche électronique $4f^n$ se remplit tout au long de la série. Les sous couches électroniques saturées $5s^2$ et $5p^6$ protègent la couche $4f^n$ interne, en conséquence les électrons $4f$ sont peu affectés par l'environnement chimique lorsque l'ion est introduit dans un champ de ligands⁷.

À l'exception des ions La^{3+} et Lu^{3+} qui possèdent la sous couche électronique $4f$ respectivement vide ou pleine, la plupart des ions lanthanides ont des propriétés de luminescence dans un domaine allant de l'UV à l'IR. Les ions Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} et Dy^{3+} présentent des propriétés de luminescence dans le visible, alors que les ions Pr^{3+} , Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} émettent dans le visible et dans le proche IR, l'ion Yb^{3+} n'émet que dans le proche IR et l'ion Gd^{3+} émet dans le proche UV.⁷

Dans ce travail nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'euporium comme centre luminescent. En effet la sensibilité extrême de la luminescence de Eu^{3+} à son environnement permet d'utiliser cet ion comme sonde optique ponctuelle. Le spectre d'émission de cet ion est relativement simple et se situe dans le domaine du visible. Il existe quatre niveaux émetteurs 5D_0 , 5D_1 , 5D_2 , 5D_3 (notés globalement 5D_J) situés respectivement à 17 300, 19 000, 21 500 et 24 500 cm^{-1} environ du niveau fondamental 7F_0 , mais c'est l'émission provenant de l'état 5D_0 qui prédomine. L'éclatement des niveaux d'énergie est grand aussi bien à l'intérieur d'un même niveau (c'est le cas pour le niveau fondamental 7F_J et les niveaux excités 5D_J) qu'entre les niveaux de base 7F_J et les niveaux excités 5D_J . Cet écart énergétique important permet d'isoler les niveaux de départ et d'arrivée les uns des autres. Les niveaux inférieurs 7F_J correspondant à des valeurs de J faibles donc à une dégénérescence des niveaux peu élevée permettent d'attribuer les différentes transitions observées sans ambiguïté. L'ion euporium présente généralement une intense luminescence dans le rouge correspondant à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ située vers 620 nm, la bande d'absorption prédominante est située vers 390 nm et correspond à la transition $^7F_0 \rightarrow ^5L_6$.

- *Niveaux électroniques*

L'interprétation des spectres électroniques de terres rares est basée sur l'établissement d'un Hamiltonien permettant de satisfaire au mieux l'équation de Schrödinger $H\Psi=E\Psi$. Cet Hamiltonien peut s'écrire sous la forme d'une somme de trois termes :

$$H_{\text{ion libre}} = H_0 + H_{\text{RE}} + H_{\text{SO}} \quad (1r)$$

- L'Hamiltonien de configuration H_0 correspond à la somme des énergies cinétiques et potentielles des n électrons. Il a pour effet de séparer la configuration de base ($4f^6$ pour l' Eu^{3+}) de la première configuration excitée ($4f^5 5d^1$)
- L'Hamiltonien interaction électrostatique H_{RE} est associé à la répulsion coulombienne entre les électrons $4f$. Il décompose la configuration $4f$ en différents termes notés ^{2S+1}L qui sont $(2S+1)(2L+1)$ fois dégénérés. Dans cette notation, L est un nombre entier égal à $0, 1, 2, 3, \dots$ auquel correspondent les termes S, P, D, F et S est un nombre entier ou demi-entier qui traduit la multiplicité du terme ^{2S+1}L . S et L sont des nombres quantiques associés aux vecteurs $\vec{S} = \sum_{i=1}^n \vec{s}_i$ et $\vec{L} = \sum_{i=1}^n \vec{l}_i$
- Enfin l'Hamiltonien H_{SO} décrit les interactions entre le spin et le moment orbital de chaque électron. L'interaction spin-orbite est représentée par le moment angulaire total $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$ et vérifie $|L - S| \leq J \leq |L + S|$. Ce couplage spin-orbite, aussi appelé couplage L-S ou Russel-Saunders décompose chaque terme spectral ^{2S+1}L en $2S+1$ ou $2L+1$ (selon que $S < L$ ou $S > L$ respectivement) niveaux notés $^{2S+1}L_J$.

Toutefois ces trois termes caractérisant l'ion libre ne suffisent pas à décrire totalement les spectres de luminescence de l'ion introduit dans une matrice inorganique ou un champ de ligands. Un quatrième terme doit être introduit : l'Hamiltonien de champ cristallin noté H_{LF} . Il décrit l'influence de champ électrique crée par les charges (ligands) entourant l'ion dans le complexe ou la matrice hôte. L'expression de cet Hamiltonien est la suivante

$$H_{\text{LF}} = \sum_{kq} (B_q^k) (C_q^k)_i \quad (2r)$$

Dans cette expression C_q^k sont les opérateurs tensoriels qui se transforment comme les harmoniques Y_q^k lesquels sont les parties angulaires des fonctions d'onde calculées dans le cas simple d'ions monoélectroniques ; B_q^k sont les paramètres de champ cristallin.

Sous l'effet du champ cristallin il y aura levée de dégénérescence partielle ou totale, selon la symétrie, et les niveaux $^{2S+1}L_J$ vont être décomposés au maximum en $2J+1$ niveaux Stark (si J est entier) ou en $\frac{1}{2}(2J+1)$ niveaux Stark (si J est demi-entier)⁹.

La figure 1 (p. 35) présente l'ordre de grandeur des principaux Hamiltoniens responsables de l'éclatement de la configuration $4f^n$ de l'ion Ln^{3+} .

La configuration électronique de Eu^{3+} ($Z = 63$) est $[Kr] 4d^{10} 4f^6 5s^2 5p^6$ et les énergies des niveaux de la configuration $4f^6$ sont présentées sur le diagramme de la figure 2 (p. 40) avec la notation $^{2S+1}L_J$. L'interprétation qualitative des spectres d'émission $^5D_{0-2} \rightarrow ^7F_{0-6}$ est intéressante, dans les matrices cristallines, car on peut remonter à la symétrie ponctuelle du site de l'euporium. D'autre part, les niveaux 5D_0 et 7F_0 ne sont pas décomposés par le champ cristallin. Il y a donc au maximum une transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ par site. Le nombre de raies observées donne ainsi le nombre minimum de sites cristallographiques ou de types d'environnements pour l' Eu^{3+} .

- *Transition entre niveaux : règles de sélection et force des raies spectrales*

L'interaction des ions avec le rayonnement électromagnétique peut alors donner naissance à des transitions radiatives entre les niveaux énergétiques. L'opérateur associé au champ électromagnétique peut être décomposé en deux termes : un opérateur dipolaire électrique (DE) et un opérateur dipolaire magnétique (DM). Quelle que soit la nature de l'opérateur, il n'agit qu'entre états de même multiplicité ($\Delta S = 0$)

Dans le cas de l'ion libre, les transitions sont régies par les règles de Laporte. Ces règles impliquent que les transitions DE entre niveaux de même parité (définie par $\sum_{i=0}^n l_i$) sont interdites. Ceci interdit théoriquement toute transition DE intra-configurationnelle (par exemple intra $4f$), par contre les transitions dipolaires magnétiques sont permises. Entre configuration de parités opposées ($4f^n 5d^0 \rightarrow 4f^{n-1} 5d^1$), les transitions DE sont permises alors que les transitions DM ne le sont pas.

Cependant certaines transitions dipolaires électriques intra- $4f$ sont permises grâce à l'effet du champ cristallin. Ainsi pour Eu^{3+} le champ cristallin mélange les configurations $4f^6$ et $4f^5 5d^1$, de parités opposées. On parle de transitions forcées, qui obéissent à la théorie de Judd Ofelt¹¹.

L'intensité d'une raie d'absorption $J \rightarrow J'$ est exprimée par la force d'oscillateur qui peut être déterminée expérimentalement à partir des spectres d'absorption en utilisant la formule¹³:

$$f_{J \rightarrow J'} = \frac{2303mc^2}{N_a \pi e^2} \frac{1}{\chi} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} = 4,32 \times 10^{-9} \frac{1}{\chi} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (3r)$$

avec N_a : Nombre d'Avogadro, $\chi = (n^2 + 2)^2 / 9n$: facteur correctif du champ électrique local induit par la matrice hôte caractérisée par n son indice de réfraction et ε : coefficient d'absorption molaire ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Des valeurs de l'ordre de 10^{-6} sont observées pour $f_{J \rightarrow J'}$.

S'agissant d' Eu^{3+} , très peu de mesures par absorption sont reportées à cause de la faiblesse des raies ; au contraire les auteurs utilisent plus fréquemment une méthode basée sur la forme des spectres d'émission ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ pour déterminer la probabilité de désexcitation radiative du 5D_0 , A_{RAD} , que nous appliquerons également dans ce travail.

A_{RAD} (coefficient d'émission spontanée d'Einstein) en sec^{-1} peut s'écrire :

$$A_{0-J} = \frac{64\pi^4 \bar{\nu}^3}{3h(2J+1)} \left[\frac{n(n^2+2)^2}{9} D_{ED} + n^3 D_{MD} \right] \quad (4r)$$

Avec h : constante de Planck, n indice du milieu, $(2J+1)$ dégénérescence du niveau 7F_J , et $\bar{\nu}$ le nombre d'onde moyen de la transition en cm^{-1} .

Suivant la théorie de Judd-Ofelt, la force d'oscillateur de la composante DE peut s'exprimer en fonction des trois paramètres de Judd, Ω_λ , avec l'équation (5r) où D_{ED} est exprimée en $\text{esu}^2 \text{cm}^2$, e est la charge de l'électron.

$$D_{ED} = e^2 \sum_{\lambda=2,4,6} \Omega_\lambda |\langle J \| U^{(\lambda)} \| J' \rangle|^2 \quad (5r)$$

Les transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ sont purement DE; les éléments de matrice réduits ne dépendent que de l'ion Ln^{3+} . Si $J = 0$, les éléments de matrice réduits sont nuls exceptés $|\langle 0 \| U^{(2)} \| 2 \rangle|^2 = 0,0032$ et $|\langle 0 \| U^{(4)} \| 4 \rangle|^2 = 0,0023$.

Les valeurs de A_{0-2} et A_{0-4} permettent de calculer Ω_2 et Ω_4 respectivement.

Il est important de noter qu'une valeur élevée de Ω_2 traduit une forte intensité de l'émission rouge ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$. Elle signifie que le site occupé par Eu^{3+} n'est pas centrosymétrique et que le champ des ligands est fortement polarisant.

La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ est purement dipolaire magnétique, sa probabilité d'émission ne dépend pas du champ local imposé par l'environnement, sa force d'oscillateur a été établie théoriquement²⁴ est de $D_{DM} = 9,6 \cdot 10^{42} \text{ esu}^2 \text{cm}^2$ soit considérant l'équation (4r) $A_{0-1} = 14,65 \text{ n}^3$.

L'intensité expérimentale $I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J)$, qui est l'aire sous le pic de la transition, est directement proportionnelle à la probabilité d'émission A_{0-J} , au nombre d'ions excités et à un grand nombre de paramètres expérimentaux difficiles à estimer. Cette difficulté est contournée en considérant les intensités relatives à la transition $I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1)$, prise comme référence. Ainsi les probabilités d'émission peuvent être calculées à partir des spectres d'émission avec l'équation :

$$\frac{I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J)}{I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1)} = \frac{A_{0-J}}{A_{0-1}} \cdot \frac{\bar{\nu}_{0-1}}{\bar{\nu}_{0-J}} = \frac{A_{0-J}}{15,65 \text{ n}^3} \cdot \frac{\bar{\nu}_{0-1}}{\bar{\nu}_{0-J}} \quad (6r)$$

On calcule également la somme des probabilités d'émission A_{RAD}

$$A_{RAD} = \sum_{J=0}^6 A_{0j} = \frac{A_{01} h c \nu_{01}}{S_{01}} \sum_{J=0}^6 \frac{S_{0J}}{h c \nu_{0J}} \quad (7r)$$

Cette valeur de probabilité d'émission permet de calculer la durée de vie purement radiative de cette transition avec :

$$\tau_{RAD} = \frac{1}{A_{RAD}} \quad (8r)$$

- *Désexcitations non radiatives*

Après absorption, le retour depuis l'état excité jusqu'au niveau fondamental peut se faire : - soit en émettant un photon d'énergie $h\nu$: la transition est dite radiative
- soit en transférant son énergie au sein du système ; la transition est dite non-radiative.

En régime transitoire, lorsque chaque ion se comporte indépendamment les uns des autres, l'intensité varie avec t suivant :

$$d \frac{N}{dt} = WN_{(t=0)} \Rightarrow N_{(t)} = N_{(t=0)} e^{-wt} \quad (9r)$$

$$I_{(t)} = I_{(t=0)} e^{-wt} \Rightarrow w = \frac{1}{\tau} \quad (10r)$$

Dans le cas où le déclin est exponentiel, on peut mesurer une valeur de τ_{EXP} avec

$$W = W_{RAD} + W_{NRAD} \quad (11r)$$

$$W = \frac{1}{\tau_{EXP}} = \frac{1}{\tau_{RAD}} + \frac{1}{\tau_{NRAD}} \quad (12r)$$

Toutes les possibilités de désexcitations non-radiatives sont considérées dans $\frac{1}{\tau_{NRAD}} = W_{NRAD}$.

Si l'excitation est réalisée dans le niveau 5D_0 et que le déclin observé ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ est exponentiel alors l'équation $W^{obs} = W_{RAD} + W_{NRAD}$ s'applique. La probabilité de déclin non-radiatif W_{NRAD} englobe plusieurs processus liés aux phonons de la matrice et à leur couplage avec les photons. Un des processus de désexcitation non-radiative du 5D_0 les plus étudiés provient du couplage avec les vibreurs ν_{OH} . En effet $\nu_{OH} = 3400 \text{ cm}^{-1}$, et il suffit de 4 ν_{OH} pour compenser l'énergie ΔE du ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_6$ ($\approx 12000 \text{ cm}^{-1}$). A partir des travaux de Horrocks comparant des complexes d'euprium liés à des molécules H_2O ou D_2O , de nombreux auteurs ont relié la durée de vie expérimentale du 5D_0 au nombre de molécules d'eau ou de groupements hydroxyle dans la sphère de coordination.

Dias Filho et al²⁷ ont calculé le nombre de molécules d'eau liées à Eu^{3+} suivant la méthode d'Horrocks (substitution H_2O/D_2O) et aussi en considérant le τ_{RAD} calculé comme décrit ci-dessus à partir des spectres d'émission. Ils obtiennent ainsi l'équation ci-dessous, que nous emploierons également dans la suite de ce travail :

$$N_{H_2O} = 1,11 \left[(\tau_{exp})^{-1} - (\tau_{rad})^{-1} - 0,31 \right] \quad (13r)$$

En ce qui concerne les hybrides, nous proposons une autre méthode pour estimer le nombre de groupements hydroxyle, N_{OH} , liés à l'euprium. Pour cela nous comparons la probabilité de désexcitation non radiative dans l'hybride avec la probabilité mesurée pour le complexe, lequel est anhydre si on considère les conditions de synthèse. Ainsi $\frac{1}{\tau_{NRAD}(\text{complexe})}$ est la désexcitation non radiative due au couplage du niveau électronique 5D_0 avec les

vibrations des ligands organiques dans le complexe. Les chemins de désexcitations non radiatives additionnels dans les hybrides sont dus au couplage avec les vibrations à haute énergie des hydroxyles.

$$N_{OH} = \frac{1}{0,44} \left[(\tau_{EXP})^{-1} - (\tau_{RAD})^{-1} - (\tau_{NRAD(complexe)})^{-1} \right] \quad (14r)$$

Dans cette formule 0,44 ms est la probabilité de désexcitation par un vibreur OH estimée de façon concordante dans plusieurs types de systèmes par Horrocks³⁸ ou Caiut³⁹. Nous verrons que les deux types d'estimation de N_{OH} et N_{H_2O} sont en bon accord.

- *Effet d'antenne*

La bande d'absorption prédominante de l'euprimum est située vers 390 nm et correspond à la transition ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$. Son efficacité d'absorption est faible toutefois. Pour pallier à cette faiblesse on utilise des ligands organiques comme « antennes » absorbant efficacement la radiation incidente et transférant efficacement l'énergie absorbée sur l'ion émetteur. Ce mécanisme intramoléculaire connu sous le nom d'effet antenne ou processus « A.T.E.E. » (Absorption – Transfert d'énergie – Emission) fut décrit pour la première fois par S. I. Weissman en 1942³⁰. Il est décrit comme suit à l'aide d'un diagramme de Jablonsky simplifié (figure 3, p.43). Un des électrons du ligand est excité par une source lumineuse et atteint un état singulet dont l'énergie est élevée. Ensuite, cet électron se désexcite légèrement et, comme il change de spin, passe par un état triplet. L'énergie de cet électron est ensuite transférée sur un des niveaux accepteurs de l'ion lanthanide, puis elle est émise sous forme de lumière au cours de la transition entre le niveau excité de l'ion lanthanide et son état fondamental. Il en résulte, lorsque le transfert est efficace, une forte luminescence du complexe. Cette suite de transferts d'énergie implique une importante différence d'énergie entre l'absorption de photons par l'antenne et l'émission de photons lors de la relaxation du métal. Cela se traduit par un déplacement de Stokes important. Deux types de mécanismes sont possibles pour expliquer le transfert d'énergie de l'état triplet vers l'ion Ln(III). L'un est appelé mécanisme de type Dexter, ou mécanisme d'échange. L'autre mécanisme est appelé de type Förster et s'applique la plupart du temps aux complexes de lanthanides, puisque de type dipôle-dipôle. Il est démontré que le rendement du transfert d'énergie est proportionnel au

recouvrement des intégrales J entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur, et dépend de la distance ligand-métal.

- *Efficacité d'une sonde optique à base d'Eu³⁺*

Plusieurs valeurs peuvent être utilisées pour définir l'efficacité d'une sonde optique. Cependant il est important de considérer quels effets photo-physiques elles recouvrent, surtout si on souhaite comparer des marqueurs qui appartiennent à des classes différentes telles que les matrices dopées, les complexes, les hybrides tels qu'envisagés dans ce travail.

A partir des mesures des probabilités de désexcitations il est facile de définir l'efficacité d'émission depuis le ⁵D₀, q, , comme nous le ferons systématiquement pour tous les échantillons considérés, avec l'équation :

$$q = \frac{W_{RAD}}{W_{RAD} + W_{NRAD}} = \frac{\tau_{EXP}}{\tau_{RAD}} \quad (15r)$$

Mais, si l'efficacité d'un marqueur à base d'euporium est liée à l'efficacité quantique du niveau ⁵D₀, il y a plusieurs phénomènes importants qui interviennent dans le peuplement du niveau émetteur avant sa désexcitation.

Dans la suite nous déterminerons le rendement quantique de la photoluminescence ϕ pour les complexes en solution. En effet cette détermination nécessite que le milieu soit homogène et que l'excitation soit suffisamment efficace pour diminuer les erreurs expérimentales. La méthode utilisée est de comparer l'intensité de luminescence du composé à celle d'un fluorophore de référence dont le rendement quantique est connu. Le standard doit posséder des bandes d'absorption et d'émission proches de celles du matériau à caractériser. Pour être valides, les intensités doivent être mesurées dans des conditions d'excitation, de fentes et de détection identiques sur la référence et l'échantillon, et doivent être ramenées à un même nombre de photons incidents¹⁶ (eq. 16r)

$$\frac{\phi_{ech}}{\phi_{ref}} = \frac{I_{ech}}{I_{ref}} \cdot \frac{Abs_{ref}}{Abs_{ch}} \cdot \frac{n^2}{n_{ref}^2} \quad (16r)$$

avec n et n_{ref} les indices de réfractions.

On peut écrire que l'efficacité du marqueur est proportionnelle au nombre de photons émis $N_{Ph. \text{émis}}$, à la longueur d'onde d'émission λ_{em} sous excitation à λ_{ex} :

$$I \propto h \frac{c}{\lambda_{em}} \cdot K \cdot N_{Ph.incident} \cdot \epsilon \cdot \phi_{\lambda_{em}/\lambda_{ex}} \quad (17r)$$

Dans cette expression K regroupe tous les paramètres expérimentaux, $N_{Ph. incident}$ représente le nombre de photons de λ_{ex} arrivant sur l'échantillon, ϵ est le coefficient qui définit la partie absorbée du rayonnement incident et ϕ est le rendement quantique de la photoluminescence.

La réponse de l'échantillon est définie par le produit

$$\epsilon \cdot \phi_{\lambda_{em}/\lambda_{ex}} = \epsilon \cdot \frac{N_{Ph.émis}}{N_{Ph.absorbés}} \quad (18r)$$

Cette valeur est la plus pertinente pour caractériser l'efficacité puisqu'elle tient compte du phénomène d'absorption qui, dans le cas des marqueurs à base de lanthanides, peut être le phénomène limitant. Ramené au volume d'une nanoparticule, ce produit est la "brillance" du marqueur, sa détermination expérimentale n'est cependant pas aisée dans le cas des poudres en raison des nombreuses sources d'erreurs dans les mesures de luminescence par réflexion sur l'échantillon.

Nous proposerons toutefois, dans le cas des hybrides, de définir une « brillance relative » de nos échantillons : nous comparerons les intensités émises et mesurées dans les mêmes conditions expérimentales, en essayant de nous affranchir au mieux des sources d'erreurs.

2. Structure générale d'un marqueur biologique et détection

Un marqueur est une molécule ou un système chimique capable d'émettre un signal sous une excitation (thermique, photochimique, électrique, magnétique). Il est généralement constitué d'une partie génératrice du signal (GS) et d'une partie comportant une fonction de couplage (FC) spécifique de l'analyte visée. En principe les deux fonctions (GS) et FC) sont séparées par un espaceur pour éviter toute interaction néfaste lors du couplage du marqueur à l'analyte biologique³³. La réaction de couplage doit être à la fois suffisamment forte et ne pas

induire de modifications structurales ou chimiques trop importantes, généralement c'est la formation d'une liaison covalente ou d'interactions ioniques, qui ne perturbent pas le signal utilisé pour la détection. Trois conditions essentielles conditionnent les bonnes propriétés d'un marqueur : forte affinité marqueur-analyte pour avoir une bonne sensibilité ; la réaction analyte-marqueur doit être spécifique et le signal du marqueur doit pouvoir être quantifié.

L'élaboration de sondes luminescentes spécifiques en tant que marqueurs reste un challenge important encore aujourd'hui en recherche dans le domaine des bionanotechnologies. Il n'est pas question ici de faire une description exhaustive de tous les types de marqueurs utilisés, nous soulignerons seulement par quelques exemples de divers types de marqueurs avec quelques applications récentes.

Les marqueurs luminescents les plus utilisés peuvent être divisés en plusieurs catégories : les nanoparticules métalliques, les quantum dots (QDs), les colorants organiques et les marqueurs à base de lanthanides. Dans tous les cas le marqueur doit posséder de bonnes propriétés de luminescence (rendement quantique élevé, durée de vie) en solution aqueuse, il doit être stable en solution à pH proche de la neutralité et pouvoir être fonctionnalisé pour l'optimisation des propriétés telles que la stabilité accrue dans l'eau, l'interaction spécifique avec l'analyte³³.

Ainsi dans les nanoparticules métalliques, c'est l'interaction du champ électromagnétique et les plasmons de surface (oscillations collectives d'électrons de surface liés) qui est responsable de la réponse optique. Les nanoparticules d'argent ou d'or par exemple, sont bien connues pour leur émission dans le visible⁴¹⁻⁴⁴. Pour les QDs les phénomènes de luminescence sont dus à des transitions entre la bande de valence et la bande de conduction³, alors que dans les colorants organiques ce sont des transitions entre états moléculaires (singulets et /ou triplets) qui provoquent l'émission de lumière. Enfin, comme déjà décrit dans le paragraphe précédent (I.1), dans le cas des lanthanides, ce sont les transitions entre niveaux électroniques localisées sur l'ion lanthanide qui sont responsables de la luminescence.

De nombreux travaux démontrent que les QDs peuvent être utilisés comme marqueurs parce qu'ils présentent un bon rendement de luminescence et que leur bande d'absorption est large ce qui les rend leur excitation facile ; les plus utilisés sont à base de cadmium (CdSe, CdS, CdTe) ou de zinc (ZnSe, ZnS) car leur plage d'émission englobe tout le domaine du visible. Récemment un grand intérêt a été porté aux QDs possédant des propriétés d'émission dans le proche infrarouge tel que CdTe/CdSe ou PbS, utilisé pour

l'imagerie animale. Des systèmes hybrides organiques inorganiques⁴⁵⁻⁴⁹ sont obtenus par fonctionnalisation chimique de la surface des QDs. Ainsi P. M. Farias et al⁴⁸ décrit l'observation en microscopie de fluorescence et en microscopie confocale de systèmes biologiques marqués par des QdS fonctionnalisés (figure 5 et 6, p.47-48). L'intérêt de réaliser une croûte de silice autour des QDs ajoute une couche protectrice intéressante compte tenu de la toxicité connue de ce type de luminophore⁴⁹

Alternativement les molécules organiques comme la fluorescéine isothiocyanate (FITC), la rhodamine ou encore la cyanine sont également employées couramment en biologie. Leurs principales limitations proviennent de leur photostabilité réduite et du fait que leur luminescence propre est très voisine de l'autofluorescence du milieu biologique : même émission en bande large dans le visible, même probabilité de déclin de quelques nanosecondes. D'autre part seul un nombre restreint de molécules de fluorophore peut être attaché à la biomolécule ciblée sans interférer avec celle-ci. C'est là l'intérêt d'utiliser des nanoparticules qui mettent en jeu un très grand nombre de luminophores (quelques milliers par nanoparticules). Les colorants organiques ont alors été greffés en surface⁵⁰ ou bien incorporés⁵¹ à l'intérieur de nanoparticules de silice ou même de polymère organique type latex ou PMMA.

La silice s'avère une matrice intéressante de part ses propriétés physico-chimiques⁴⁹ (stabilité en température, sur une large gamme de pH, résistante d'un point de vue mécanique, présente sous diverses formes fibres particules, films...), de plus elle est considérée comme biocompatible. De part la présence de groupements silanol à sa surface, sa fonctionnalisation chimique est relativement aisée et en tout cas bien décrite⁹⁸. C'est donc une excellente matrice pour élaborer des marqueurs luminescents.

Les nanoparticules d'oxydes métalliques dopées aux lanthanides sont également de bons candidats grâce à leur bonnes propriétés optiques, leur stabilité chimique et leur faible toxicité⁵⁴. Dans ce cas l'ion Ln^{3+} est incorporé dans un site cationique de la matrice hôte (alumine, oxydes d'yttrium ou de gadolinium). L'intérêt de ces marqueurs, à base de silice ou d'oxyde métalliques incorporant un lanthanide vient du fait que l'on peut envisager des analyses par détection en temps retardé puisque le grâce à la durée de vie d'émission de luminescence de l'ordre de la milliseconde⁵⁵⁻⁶⁰.

Pour une utilisation en tant que biomarqueurs de ces matériaux, il est nécessaire d'adapter leurs propriétés de surface aux conditions de couplage, il est ainsi nécessaire de les

biofonctionnaliser c'est-à-dire de les modifier chimiquement par l'ajout d'une fonction de reconnaissance biologique qui peut être non spécifique ou spécifique.

La plupart du temps ce sont des interactions covalentes qui sont impliqués pour les réactions de couplage. Dans le cas d'interaction non spécifique, la formation d'une liaison peptidique entre les groupes amine et carboxyle est de loin la réaction la plus utilisée, le groupe réactif ester succinimide (NHS) est une alternative pour l'ancrage d'une fonction de couplage. Les organosilanes chloropropyl- aminopropyl-, vinyl- glycidoxypropylsilane sont largement utilisés dans la première étape de la biofonctionnalisation. Le glutaraldehyde est ensuite utilisé comme agent de couplage entre la sonde et la biomolécule.

Les critères d'affinité et de spécificité soient entièrement satisfaits par l'utilisation d'anticorps. Les anticorps sont des glycoprotéines endogènes qui jouent un rôle crucial dans le système immunitaire mettant en jeu des constantes d'affinité allant de 10^{10} à 10^{12} L.mol⁻¹. Ils sont capables de reconnaître des différences structurelles mineures au niveau moléculaire, et distinguer les substances exogènes et endogènes³³.

3. Hybrides à base de silice et de chélate d'euporium

Comme cela a été décrit précédemment les bonnes propriétés de luminescence des complexes de lanthanides justifient leur utilisation pour le développement de matériaux luminescents dans de nombreux domaines (optique, électronique) et de plus en plus en tant que marqueurs biologiques^{7, 13, 68, 79, 80, 81, 82}. Dans ces derniers développements l'excitation du lanthanide est réalisée par le biais de l'effet d'antenne.^{13, 79, 80} La liste des ligands décrits est très vaste et a été relevée par de nombreux auteurs^{13, 65, 68}. Parmi eux les ligands β -dicétonates se révèlent d'excellents candidats notamment ceux comportant des hétérocycles et/ou groupements fluorés a proximité du site de complexation.

Récemment l'introduction de ces chélates de lanthanides, notamment d'euporium, dans des matrices hybrides obtenues par voie sol-gel a conduit à l'obtention de verres ou de films minces très luminescents. Le procédé sol-gel s'impose pour la préparation d'hybride organiques-inorganiques parce qu'il permet de mieux contrôler les propriétés mécaniques, thermiques, chimiques et physiques du matériau par un contrôle des conditions de synthèse. Ainsi la microstructure, la forme et le degré de connexion de deux réseaux peuvent être contrôlés.

Afin d'améliorer les propriétés optiques du matériau final par une meilleure dispersion des centres luminescents des auteurs ont proposé, dans des travaux relativement récents, de fixer le luminophore à la matrice par lien covalent. Ceci a été tout d'abord réalisé de façon aisée par voie sol-gel en introduisant dans la synthèse un organosilane qui aura pour rôle de lier le complexe métal à la matrice comme décrit (figure 10a, p. 54). L'autre méthodologie décrite consiste à faire réagir le lanthanide, sous forme de sel ou de complexe, avec une matrice de silice organiquement modifiée. Par un choix judicieux de l'organosilane, le luminophore se lie à la matrice de silice par complexation. Cette voie, décrite figure 10b, a nécessité l'utilisation de ligands à fonction alcoxysilane. Ces ligands bidentes par deux atomes d'oxygène ou par deux atomes d'azote type phenantroline, pyrozolyl ou bipyridine ne sont pas très nombreux, la figure 11 (p. 55) présente les ligands reportés dans la littérature. Cette voie a été bien décrite par Carlos et al⁹³ en utilisant des dérivés pyridyl-pyrazole monosilylé, PyPy-Si, pour fonctionnaliser silice mésoporeuse MCM41 ; Gulino et al⁹⁵ Zhang et al⁸³ ont décrit des matrices modifiées par des dérivés de la phénanthroline, Phen-Si et Phen Si₂ respectivement. Dans les deux cas la silylation est réalisé en faisant réagir un ou deux équivalents d'isocyanatopropyltriéthoxysilane (IPTS) avec le pyrozolyl ou la phénanthroline aminée pour former un dérivé amide. Les ligands dicétones (DBM⁹⁰, acac^{90, 97} ou TTA⁹⁷) ont été utilisés respectivement, par Yan et Serra pour la synthèse de hybrides polymères à base de lanthanides. Dans ce dernier cas le ligand TTA possède deux fonctions alcoxysilanes et est noté TTA-Si₂ figure 11 (p. 55).

Figure 10: Représentation des différentes méthodologies utilisées pour les matériaux à base de silice et de complexes d'euporium(III) lié de façon covalente (a) l'introduction d'un sel ou d'un chélate d'Eu³⁺ dans une réaction en une étape, (b) Complexation de l'ion Eu³⁺ ou d'un complexe sur une matrice de silice organiquement modifiée.

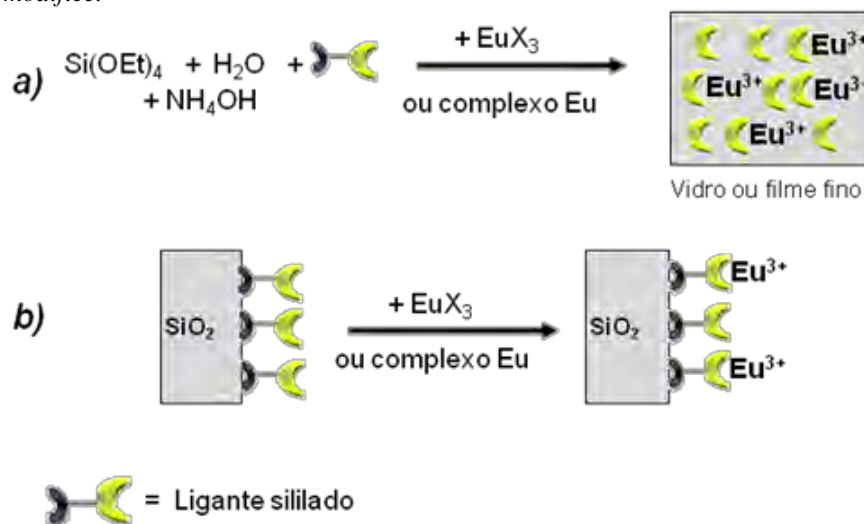
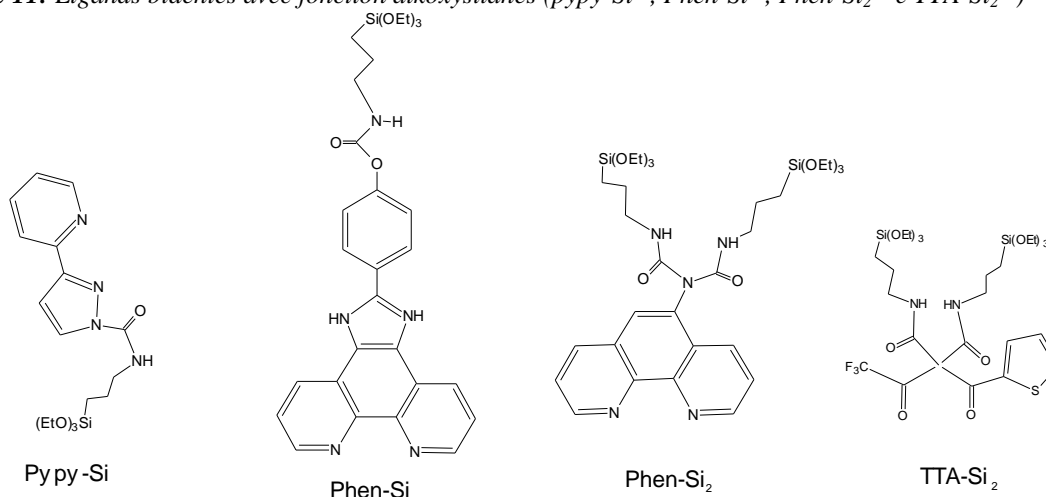


Figure 11: Ligands bidentés avec fonction alkoxy-silanes (pypy-Si⁹², Phen-Si⁹⁴, Phen-Si₂⁹⁵ e TTA-Si₂⁹⁶)

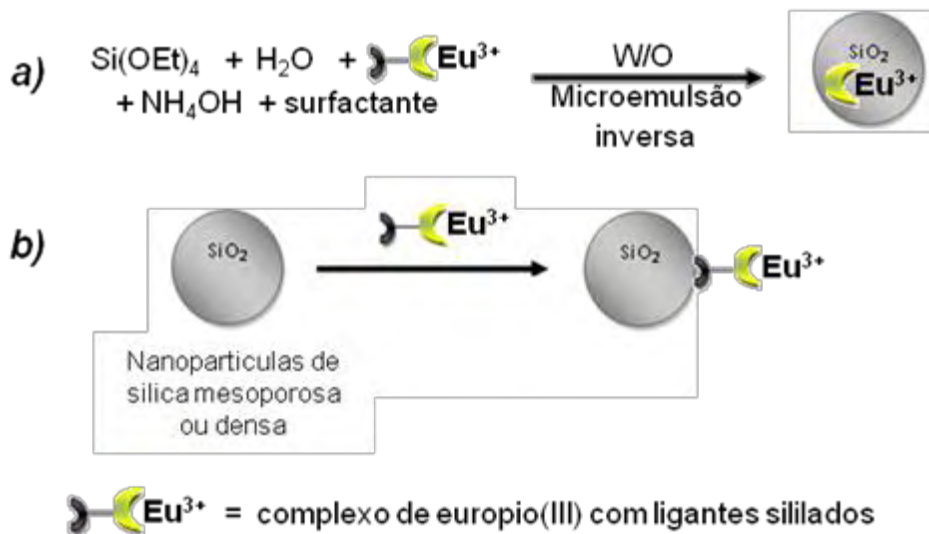


L'inconvénient majeur de ces méthodologies (a et b) est l'inhomogénéité qui reste encore importante dans le matériau et qui est inhérente à la méthode de synthèse, chaque ion lanthanide ne pouvant pas être dans un environnement identique au sein du matériau.

Binnemans et Driesen^{84 87} montrent que l'incorporation de complexes de lanthanides dans la préparation des films minces et de verres apporte une distribution plus homogène du luminophore qui justifie les meilleures propriétés de luminescence.

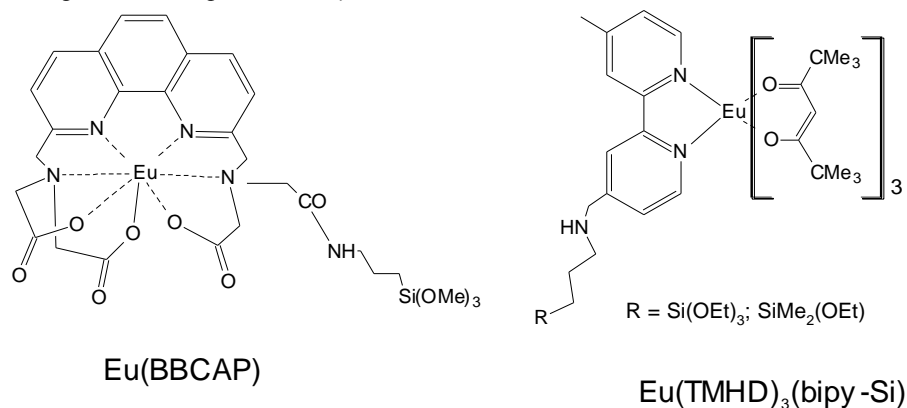
Récemment ce principe est appliqué à la préparation de nanoparticules de silice luminescentes et les deux méthodologies de la figure 10 (incorporation ou complexation à la surface) peuvent être transposées. La figure 12 (p. 56) décrit la préparation de nanoparticules de silice luminescentes par incorporation du complexe de lanthanide à fonction alkoxy-silane (figure 12a) ou bien par réaction de greffage du même complexe à la surface de la silice, la matrice de silice pouvant être dense ou mésoporeuse.

Figure 12: (a) Incorporation de complexes silylés d'euporium(III) dans une synthèse par microémulsion inverse « Water in Oil » ; (b) Greffage de complexes d'euporium (III) silylés à la surface des nanoparticules de silice mesoporeuse ou dense.



A notre connaissance et à l'origine de ce travail deux types de complexes silylés d'euporium étaient reportés et sont décrits figure 13 (p. 57). Des complexes de terbium et d'euporium (III) (Ln (BBCAP) ont été préparés par Li et al⁹⁷. et incorporé de façon covalente dans des nanoparticules de silice de 40 nm en utilisant la méthodologie de microémulsion inverse (W /O) (figure 12a). Cousinié et al^{98 109} ont proposé l'obtention d'hybrides luminescents par greffage d'une monocouche de complexe à ligand bipyridine silylé $[\text{Eu}(\text{TMHD})_3(\text{bipy-Si})]$ avec bipy-Si $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{-bipy}$ ou $(\text{EtO})(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{bipy}$ (figure 13) à la surface de nanoparticules denses de type Ludox (figure 12b).

Figure13: Complexes d'euporium(III) silylés décrits



Dans ce contexte nous avons choisi de développer de nouveaux hybrides à base de silice et de complexes d'euporium comportant dans leur sphère de coordination des ligands efficaces pour l'effet d'antenne et capable de se lier de façon covalente à la matrice de silice. Nous avons concentré nos efforts sur deux ligands : le ligand Bipy-Si synthétisé récemment au CIRIMAT et un nouveau ligand dérivé du ligand thénoyltrifluorodictone connu pour ses très bonnes propriétés d'antenne. Deux matrices de silice seront évaluées, tout d'abord des nanoparticules de silice dense de type Ludox intéressantes pour leur petite taille, très homogène, et adaptée à l'analyse des milieux biologiques envisagée. Nous avons également souhaité tester une matrice de silice caractérisée par une surface spécifique beaucoup plus grande obtenue par pyrolyse d'aérosol, dont la synthèse est maîtrisée au LMF de l'UNESP Araraquara.

Pour être exploités comme marqueurs ou sondes d'analyse de milieux biologiques une fonctionnalisation chimique de la surface de ces hybrides est nécessaire. La silice s'avère être une matrice de choix pour réaliser cette étape indispensable.

Nous aborderons dans ce travail des expériences exploratoires d'utilisation de nos hybrides pour le marquage cellulaire avec observation en cytométrie de flux ou en microscopie de fluorescence. Pour cela deux types de fonctionnalisation chimique de la surface seront réalisés. Tout d'abord pour réaliser le marquage de mastocytes de souris, les hybrides seront chimiquement modifiés en deux étapes par une fonction succinimide afin réagir ultérieurement avec les protéines des cellules. Nous avons également fonctionnalisés tous les hybrides par un anticorps monoclonal et ce par une succession de réactions de couplage.

L'observation en microscopie confocale des hybrides dans un milieu biologique particulier, que sont les biofilms, sera également explorée.

Enfin des tests préliminaires d'excitation biphotons de quelques uns des hybrides silice-complexe d'euporium, isolés dans ce travail, ont été évalués et donnent des résultats prometteurs. Ils ouvrent d'intéressantes perspectives d'applications.

Objectifs

L'objectif général de cette thèse est l'élaboration de particules luminescentes submicroniques dans le but d'en faire des sondes en vue d'applications dans l'analyse de milieux biologiques.

1. Objectifs spécifiques

- Préparer et caractériser différentes matrices polymériques, inorganiques et organiques dopées à l'euporium(III). Etude de leur propriétés de photoluminescence : $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{PMMA}:[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$
- Préparer et caractériser des complexes d'euporium(III) possédant des ligands présentant à la fois un bon effet d'antenne et capable de se lier de façon covalente à une matrice de silice. Etude des propriétés de photoluminescence.
- Explorer deux voies d'élaboration d'hybrides à base de silice et de complexes d'euporium à fonction alcoxysilane :
 - Greffage de complexes silylés à la surface de particules de silice. Deux matrices seront évaluées, des particules nanométriques et dense de type Ludox ; des particules mésoporeuses obtenues par pyrolyse d'aérosol
 - Incorporation des mêmes complexes silylés dans le bulk de nanoparticules de silice par une réaction de type Stöber en milieu microémulsion inverse.
- Fonctionnaliser la surface des hybrides pour le marquage cellulaire. Deux exemples seront abordés.
 - Fonctionnalisation spécifique par couplage avec un anticorps monoclonal IgG spécifique pour la reconnaissance des bactéries *Escherichia coli*, et analyse en microscopie de fluorescence.
 - Fonctionnalisation de la surface par un groupement NHS pour le couplage avec des protéines membranaires

- Détection des cellules marquées par cytométrie de flux, microscopie confocale et microscopie de luminescence.

3- Etude exploratoire de particules luminescentes à base d'euporium(III)

1. Matrices d'Alumine et de silice dopées avec Eu^{3+} obtenues par pyrolyse d'aérosol, $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$

L'avantage de la méthode de pyrolyse d'aérosol (PA) est d'obtenir par un processus simple et rapide des matériaux en quantités relativement importantes. Le schéma du processus et la photographie du montage expérimental sont donnés (figure 14, p.68).

Nous avons choisi d'utiliser AlCl_3 comme précurseur d'alumine, le chlorure d'euporium étant ajouté à la solution avec le rapport $\text{Eu}/\text{Al} = 5\%$. Le processus a été mené à $T=150^\circ\text{C}$ et 850°C respectivement dans la première zone (dite de séchage) et la deuxième (dite de décomposition). A partir des spectres de diffraction RX (Figure 21, p. 90) et d'IR (Figure 22, p. 90), le matériau obtenu est une alumine de transition de type γ ., assez fortement hydratée. La PA, dans nos conditions opératoires, produit toujours des particules sphériques sub-microniques. Nous observons par microscopie électronique des particules sphériques constituées de sous-particules nanométriques (figure 23, p.91). La dispersion de taille est relativement importante entre 0,1 et 2,5 μm (moyenne ~ 550 nm), et par BET nous mesurons une surface spécifique de 430 m^2/g .

Pour obtenir des particules de silice par pyrolyse d'aérosol, nous avons choisi d'utiliser une solution de TEOS dans un mélange 95 :5 (V :V) eau : ethanol contenant 5% de chlorure d'euporium. Les températures ont été fixées à $T=150^\circ\text{C}$ et 800°C respectivement dans les zones de séchage et de décomposition. Le spectre IR présente toutes les bandes caractéristiques de la silice amorphe (figure 24, p.92).

Des particules de silice avec une morphologie sphérique ont été obtenues, (figure 25, p. 93) avec une taille moyenne de 650 nm. Contrairement aux particules d'alumine, les images TEM pour le $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ montrent un aspect homogène des sphères, laissant penser qu'elles sont denses. Toutefois la surface spécifique BET par adsorption-désorption d'azote est de 320 m^2/g , il ne s'agit donc pas de particules denses, ce qui n'a d'ailleurs jamais été obtenu par PA à des températures modérées telles que celles utilisées dans ce travail.

- *Etude spectroscopique de l'euporium Eu^{3+} .*

La Figure 27 (p. 95) présente les spectres d'excitation des matrices $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$, mesurés à ($\lambda_{\text{em}} = 612 \text{ nm}$). Les bandes des transitions 4f-4f sont observées et leur identification est donnée sur la figure. La bande de transfert de charge O—Eu apparait à $\lambda < 325 \text{ nm}$ pour $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $< 300 \text{ nm}$ pour $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ indiquant que l'interaction europium-oxygène est plus forte dans la matrice d'alumine.

Les spectres d'émission (Figure 28, p.96) sous excitation ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$ sont montrés. Des pics caractéristiques ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ sont identifiés sur la figure. Les raies d'émission élargies, démontrant des environnements légèrement différents pour les Eu^{3+} comme on le voit pour les verres ou les matrices désordonnées. Des spectres d'émission similaires à celui de $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ont été observés pour $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ préparé par la méthode Pechini¹¹³, ou par PA à 700°C à partir d'un sol de boemite¹¹⁸.

Pour la silice, les raies d'émission sont également larges. Des spectres similaires ont été observés pour des particules de $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$ par pyrolyse d'aérosol d'une solution de silice Ludox AS-40^{117, 119} ou encore dans des verres dopés à l'euporium par voie sol-gel¹²⁰. Les courbes de décroissance du ${}^5\text{D}_0$ pour les deux matrices sont présentées Figure 29 (p.97). La décroissance ne suit pas une loi exponentielle simple, confirmant une distribution de sites. La durée de vie moyenne (τ_{exp}) suivant l'expression 19r est de $0,22 \pm 0,02 \text{ ms}$ pour $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ et $0,26 \pm 0,02 \text{ ms}$ pour $\text{SiO}_2:\text{Eu}^{3+}$.

$$\tau_{\text{EXP}} = \frac{\int_0^\infty I(t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt} \quad (19r)$$

A partir de ces données, les valeurs caractéristiques que nous avons définies au début de ce résumé de thèse ont été calculées et sont rassemblées dans le Tableau 1(p.97). Les faibles valeurs de Ω_2 confirment que l'euporium est dans des environnements chimiques différents. Le rendement quantique faible que nous observons pour l'échantillon $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, comparé aux données de Brito et al¹¹³, est attribué à un plus grand nombre de groupements hydroxyles (ou de molécules d'eau) résultant de nos conditions de synthèse.

2. Composite PMMA: [Eu (TTA)₃(H₂O)₂]

Un composite constitué d'une matrice polymère polyméthacrylate encapsulant le complexe [Eu (TTA)₃(H₂O)₂] a un taux de 1% massique a été synthétisé avec un rendement de 64%. La Figure 30 (p. 98) montre le spectre infrarouge du PMMA pur et d'un composite PMMA:[Eu (TTA)₃(H₂O)₂]. En plus des bandes caractéristique du PMMA, seules sont observées en plus les vibrations (ν OH) et (δ HOH) du complexe hydraté. Les bandes caractéristiques du ligand TTA étant faibles et confondues sous les bandes de la matrice polymère.

Les particules de PMMA:[Eu (TTA)₃(H₂O)₂]. Figure 31(p. 99) observées par MEB sont sphériques et monodisperses. La distribution de taille est étroite avec une moyenne de 450 ± 50 nm. On note Figure 31 (c et d) que ces particules peuvent s'organiser en un arrangement ordonné.

Le spectre d'excitation de luminescence du composite PMMA :[Eu(TTA)₃(H₂O)₂], mesuré à $\lambda_{em} = 612$ nm (Figure 34, p.101) laisse apparaitre un massif de bandes larges pointant à 276 nm, 340 et 362 nm ; toutes attribuées à l'absorption dans le ligand TTA. Les raies d'excitation intra $4f^6$ ne sont pas visibles dans ces conditions, ce qui signifie qu'elles sont beaucoup plus faibles que les bandes d'excitation dans le ligand. L'effet de transfert d'énergie non radiatif («effet d'antenne») du ligand TTA à l'ion Eu^{3+} est donc bien efficace.

Les raies d'émission de l'euporium dans le composite sont un peu plus larges que dans le complexe pur (Figure 35, p. 102). Les courbes de décroissance du 5D_0 (Figure 36, p.102) sont identiques et mono exponentielles avec $\tau_{exp} = 0,25 \pm 0,02$ ms. A partir de ces données, les valeurs caractéristiques que nous avons définies au début de ce résumé de thèse ont été calculées et sont rassemblées dans le Tableau 2 (p. 104)

Nous notons que les valeurs caractéristiques pour le complexe sont très bien conservées dans le composite PMMA: [Eu (TTA)₃(H₂O)₂], en particulier, que les deux molécules d'eau coordonnées au centre métallique restent dans la sphère de coordination après incorporation, ce qui n'était pas le cas des films xérogel décrits par Brito et al.¹²¹

Dans ce chapitre nous avons décrit trois voies pour la synthèse de particules luminescentes en mettant en œuvre diverses matrices polymériques, inorganiques γ -Al₂O₃:Eu³⁺ et SiO₂:Eu³⁺, mais également organique PMMA:[Eu(TTA)₃(H₂O)₂] encapsulant un chélate d'euporium.

Les ions Eu^{3+} sont inclus dans les particules d'oxydes et ne peuvent être libérés dans le milieu réactionnel, de plus la surface des particules fortement hydroxylée pourra être facilement modifiée puis fonctionnalisée. La limitation de la technique de synthèse par pyrolyse d'aérosol, reste la grande dispersité en taille des particules obtenues. D'autre part il faudra utiliser une source laser suffisamment puissante et bien ajustée en longueur d'onde pour exciter la luminescence après absorption dans les transitions ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_2$ ou ${}^5\text{D}_1$ de l'ion Eu^{3+} . L'efficacité quantique est de l'ordre de 10%, les probabilités de desexcitation non radiatives par couplage avec les hydroxyles et les molécules d'eau sont élevées.

L'efficacité quantique est meilleure pour la matrice $\text{PMMA}:[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$. Un autre avantage de cet hybride organique-inorganique est la possibilité de l'exciter très efficacement dans la bande d'absorption large du ligand. De plus les particules sont bien monodisperses. Leur inconvénient est leur instabilité en milieu organique qui pourrait être neutralisée par un enrobage par une couche de silice.

Nous avons pour notre part exploré une autre voie. Afin de conjuguer de bonnes propriétés de luminescence sous excitation dans le proche UV à 355-365 nm, et de disposer de particules stables dont la surface pourrait être chimiquement modifiée, nous avons orienté nos travaux vers la synthèse de particules hybrides à base de silice incorporant par lien covalent des complexes d'euporium très luminescents. Ces résultats sont décrits dans le chapitre 4.

4. Synthèse et caractérisation d'hybrides à base de silice et de complexes silylés d'euporium(III)

Le but et l'originalité du travail présenté dans la première partie de ce chapitre est de synthétiser des complexes très luminescents adaptés au greffage ou à l'incorporation par lien covalent à une matrice de silice. Ainsi les complexes d'euporium devront présenter au moins un ligand à fonction alkoxy silane et un cortège de ligands efficaces pour que l'euporium bénéficie de l'effet d'antenne. L'étude bibliographique a montré que les molécules organiques à fonction alkoxy silane susceptibles de jouer le rôle de ligand vis-à-vis d'ion euporium(III) ne sont pas très nombreuses, nous avons choisi d'utiliser, dans un premier temps, un ligand bipyridine silylés synthétisé au CIRIMAT, Bipy-Si (figure 38, p. 109), ce ligand viendra compléter la sphère de coordination des complexes tridicetonato $\text{Eu}(\text{TMHD})_3$ et $\text{Eu}(\text{TTA})_3$. D'autre part nous avons envisagé la synthèse d'un nouveau ligand silylé à partir du ligand TTA puisque ce dernier est bien connu pour donner des complexes très luminescents illustrant un effet d'antenne significatif. Le ligand TTA-Si (figure 38 p. 109) combine donc à la fois de bonnes propriétés électroniques en tant que ligand dicétonate et un groupement alkoxy silane pour se lier à la matrice de silice.

L'intérêt des complexes d'euporium silylés réside dans la possibilité de greffer ces complexes à une surface de la silice ainsi trois types d'hybrides organique-inorganiques seront décrits selon les deux méthodologies présentée au chapitre I. Deux types de particules de silice seront évalués pour la réaction de greffage : des particules de silice mésoporeuses, synthétisées par pyrolyse d'aérosol, puis des nanoparticules de silice dense, de type LUDOX AS-40. L'incorporation de ces complexes luminescents au coeur de nanoparticules de silice dense a également été étudié et donne lieu à l'obtention de nanoparticules donc la surface pourra notamment être chimiquement modifiée pour l'application à l'analyse de milieux biologiques envisagée dans ce travail.

Nous organiserons ce chapitre en quatre parties en décrivant d'abord la synthèse des complexes à ligand Bipy-Si, puis TTA-Si. Les hybrides organique-inorganiques seront décrits dans une troisième partie et enfin les propriétés de luminescence seront soigneusement évaluées.

1. Complexes d'europlum à ligand bipyridine silylé

Le ligand Bpy-Si a été synthétisé selon le protocole mis au point par S. Cousinié au CIRIMAT. Il est obtenu en trois étapes à partir de la 4-4'-diméthyl-2,2'-bipyridine avec un rendement global qui atteint 50%. Les analyses physico-chimiques (analyse élémentaire, RMN ^1H et $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, IR et spectrométrie de masse confirme bien l'obtention du dérivé à fonction trialkoxysilane.

La réaction de $\text{Eu}(\text{TMHD})_3$ ou $\text{Eu}(\text{TTA})_3$ avec un équivalent de ligand Bipy-Si, conduit à la formation de deux complexes d'europlum silylé avec des rendements de 54 et 62%: respectivement, $[\text{EuTMHD})_3(\text{Bpy-Si})]$ noté [Eu1] et $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy-Si})]$ noté [Eu2]. La caractérisation physico-chimique par analyse élémentaire, spectroscopie infrarouge et spectrométrie de masse nous permet de proposer pour les deux complexes les structures décrites respectivement figures 39 et 40 (p. 111 et 112), dans lesquelles l'europlum est octacoordonné par les 6 atomes d'oxygènes des trois ligands dicétones et les deux atomes d'azote du ligand bipyridine silylé. Les spectres d'absorption dans la région UV-visible du ligand Bpy-Si et du complexe [Eu2] sont comparés à celui du complexe $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ synthétisé au préalable (figure 41, p. 113). Le spectre du complexe [Eu2] confirme bien la présence dans la sphère de coordination de l'europlum de la présence simultanée des ligands Bpy-Si (240, 250 et 269 nm) et TTA (338 et 281 nm).

2. Complexes d'europlum à ligand thényltrifluoroacétone silylé

- *Synthèse et caractérisation du ligand TTA-Si*

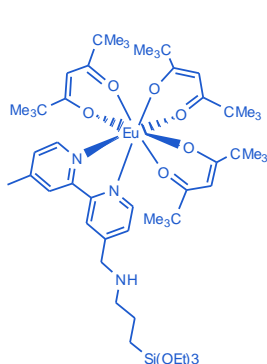
Nous avons synthétisé un nouveau ligand dérivé du ligand thényltrifluoroacétone, TTA, comportant une fonction alcoxysilane afin de permettre le lien covalent à la matrice de silice par l'intermédiaire, cette fois, du ligand dicétone. De plus nous avons choisi de ne pas passer par l'intermédiaire amide comme décrit dans la littérature^{29,83,97} mais nous avons opté plutôt pour une alkylation sur l'atome de carbone en α des fonction cétones de façon à isoler un ligand stable sur une plus large gamme de pH. Ainsi après réaction avec l'hydrure de sodium, le TTA^-Na^+ réagit avec le chloropropyltrialcoxysilane pour donner un ligand dont la structure développée est présentée figure 42 (p. 114). Cette structure a été déterminée à partir

des spectres de RMN, ^1H et $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (fig. 43 et 44, p. 115 et 116) ; spectres de masse et infrarouge de TTA-Si.

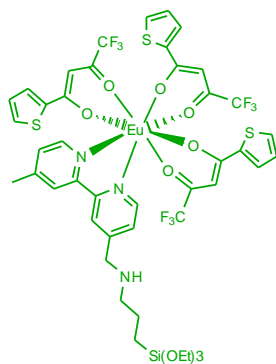
- Complexes $[\text{Eu}(\text{TTA-Si})_3]$, $[\text{Eu3}]$

La réaction de trois équivalents de ligand TTA-Si avec un équivalent de chlorure d'euprium est réalisée dans l'éthanol à température ambiante. Après 18 heures de réaction le complexe $[\text{Eu}(\text{TTA-Si})_3]$ noté $[\text{Eu3}]$ est isolé avec 76% de rendement. Le spectre infrarouge du complexe présente les bandes de vibration caractéristiques du ligand TTA-Si comme présente que la figure 45 (p. 118). La formule du complexe est confirmée par analyse élémentaire et spectrométrie de masse avec un pic moléculaire à $m/z = 1300$ correspondant au motif $[\text{M}^+]$. L'allure du massif isotopique du pic moléculaire est en accord avec la formule proposée confirmant l'expulsion des ligand chloro. Le spectre d'absorption dans la région UV-visible du ligand TTA-Si et du complexe $[\text{Eu3}]$, mesurés en solution dans l'acétonitrile, sont présentés figure 47 (p. 119). Les bandes d'absorption du ligand TTA-Si à 338nm ($\epsilon = 32800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et 257 nm ($\epsilon = 14050 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) sont observées à 339 nm ($\epsilon = 41\ 350 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), et 276 nm ($\epsilon = 33\ 400 \text{ L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) dans le complexe $[\text{Eu3}]$. Le spectre de $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ est superposé sur cette figure pour comparaison. Il présente deux bandes à 269 and 339 nm en accord avec les résultats décrits^{122, 123}. La transition dans le domaine 280-300 nm pour $[\text{Eu3}]$ est attribuée à une bande de transfert de charge O-Eu³⁺.

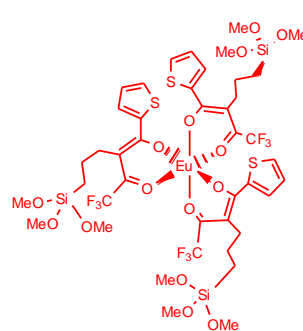
Ainsi trois complexes d'euprium silylés ont été isolés et entièrement caractérisés : $[\text{EuTMHD})_3(\text{Bpy-Si})]$, $[\text{Eu1}]$; $[\text{Eu}(\text{TTA})_3(\text{Bpy-Si})]$, $[\text{Eu2}]$ et $[\text{Eu}(\text{TTA-Si})_3]$. Leur propriétés de luminescence seront évaluées dans la partie 4 de ce chapitre.



[Eu1]



[Eu2]



[Eu3]

3. Hybrides à base de silice et de complexes d'europlum

Nous avons entrepris la préparation d'hybrides à base de silice et de complexes d'europlum comportant au moins un ligand à fonction trialkoxysilane selon les deux méthodologies présentées ci dessus figure 12 (p.56).

La première consiste à lier de façon covalente les complexes à la surface de la silice par interaction avec les silanols. La seconde consistera à incorporer les mêmes complexes à l'intérieur de la matrice par une réaction de type stoeber en milieu microémulsion inverse. Si la première voie n'a pas montré de difficultés, la synthèse de nanoparticules incorporant des complexes d'europlum silylé ea été très peu décrite.

- *Description des matrices de silice utilisées dans ce travail*

La silice mésoporeuse a fait l'objet de recherches intensives depuis une vingtaine d'années¹²⁵⁻¹²⁸. Cette matrice conjugue les bonnes propriétés de la silice avec la possibilité d'obtenir des matériaux organisés, à porosité contrôlée et caractérisés par des surfaces spécifiques très grandes, approchant généralement 1 000 m²/g. En tant que silice, elle peut être chimiquement modifiée. Au laboratoire des matériaux photoniques à l'UNESP, Araraquara, la synthèse de particules de silice mésoporeuses est maîtrisée en utilisant la technique de pyrolyse d'aérosol.

En plus de cette matrice de silice organisée, nous avons travaillé avec des nanoparticules de silice dense, disponibles commercialement sous la forme de sol aqueux. Nous avons donc choisi d'utiliser deux supports qui se différencient à plusieurs niveaux, ceci pour montrer que la méthodologie de greffage peut être adaptée quelque que soit la mise en forme de la silice. Ceci nous permettra également, lors de l'étude des propriétés de luminescence des hybrides, de préciser les avantages et inconvénients de chacun de ces supports.

Après avoir caractérisé la morphologie des particules par microscopie à balayage (MEB) et à transmission (TEM) (figures 48 et 52, pg. 121-123). La quantité de silanol a été calculé à partir des données d'analyse de thermogravimétrie. Les caractéristiques des deux matrices ont été reportées dans le tableau 3 (p.124). Les spectres IR sont également présentés fig 50 (p. 122).

- *Greffage des complexes d'euporium sur les matrices de silice*

La réaction de greffage consiste à condenser l'alkoxysilane sur les sites silanol présents à la surface de la silice (figure 53, p. 125), elle est menée à température ambiante pendant trois jours, dans l'éthanol indépendamment du type de silice. Les quantités de complexes introduits restent faibles (inférieurs à 1 mmol/g de support) pour minimiser le greffage d'oligomères.

Dans les deux cas la morphologie des particules de départ est conservée, des particules d'environ 600 nm pour les échantillons $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu1]}$, $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu2]}$ et $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu3]}$ avec une grande dispersion de taille. Des nanoparticules de $28 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ pour les silice $\text{SiO}_2\text{-[Eu1]}$, $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ et $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ obtenus à partir des nanoparticules de Ludox. Les clichés TEM des 6 hybrides sont présentés figure 54 (p. 126). Les taux de greffage sont calculés à partir des analyses élémentaires. Les taux observés pour les hybrides mésoporeux (0,41-0,64 mmol/g) sont supérieurs à ceux obtenus sur la silice Ludox (0,21-0,30 mmol/g). Ce résultat était attendu compte tenu de la différence de surface spécifique. Cependant la différence observée n'est pas si importante indiquant que la dimension des pores (dans notre cas 5 nm avec le CTAB comme surfactant) est un facteur limitant au greffage. En effet si on ramène le taux de greffage à un nombre moyen de complexe greffé par unité de surface, la silice de type Ludox apparaît être, à priori, un support plus favorable ($N_{\text{Cx-Ludox}} = 3 \cdot N_{\text{Cx-mésoporeux}}$ pour une surface spécifique 6 fois plus petite). Ceci est également en accord avec la quantité de silanol disponibles : il est plus grand pour la Ludox, qui est en sol aqueux, que pour la silice mésoporeuse dont la porosité est libérée à haute température. Les valeurs de taille de particules, taux de greffage et nombre de complexe par nm^2 sont reportés dans le tableau 4 (p.127). Ces résultats sont encourageants et laissent présager des propriétés de luminescence intéressantes puisque les taux de greffage sont supérieurs à ceux reportés dans la littérature¹³³.

- *Incorporation des complexes d'euporium en milieu microémulsion inverse*

Si la réaction d'incorporation de complexes de ruthénium(II), silylés ou pas, est bien décrite^{51 ;53 ;135}, l'incorporation des complexes d'euporium est beaucoup plus limitée. Nous décrivons les premiers exemples d'incorporation de complexes silylés. La difficulté mise à jour provient certainement de la grande affinité de l'euporium pour les molécules oxygénées largement présentes dans les systèmes de microémulsions inverses par rapport à l'affinité du

ruthenium(II) pour ces mêmes molécules. Les premiers essais réalisés au CIRIMAT dans le cadre de la thèse de S. Cousinié avait montré l'impossibilité d'incorporer le complexe [Eu1] dans un système identiques à celui proposé par Tan et al ⁵³ pour les complexes de Ru(II). Nous avons donc réalisé un travail exploratoire concernant les conditions de synthèse en faisant varier un grand nombre de paramètres (température, surfactant Triton X100 ou AOT, cosurfactant hexanol ou octanol, quantité d'ammoniaque (0,15-0,40 mmol), pour enfin réussir à isoler les hybrides visés. La différence essentielle a été d'introduire le complexe d'euporium dans le cosolvant et non dans la phase aqueuse.

La réaction écrite figure 56 (p.130) nous a permis d'isoler des nanohybrides SiO₂@[Eu1], SiO₂@[Eu2], et SiO₂@[Eu3] incorporant respectivement les complexes [Eu(TMHD)₃(Bpy-Si)], [Eu(TTA)₃(Bpy-Si)] et [Eu(TTA-Si)₃]. Ces nanohybrides sont des nanoparticules de 45 ± 5 nm très monodisperses comme en atteste les clichés TEM de la figure 57 (p. 130). Les taux d'incorporation des complexes sont de 0,31 mmol/g de support pour les complexes [Eu1] et [Eu2]. Le taux obtenu après plusieurs essais pour l'incorporation du complexe [Eu3] reste plus faible, à priori à cause d'une moins bonne solubilité du complexes dans l'octanol. Les taux obtenus sont cependant largement supérieurs aux valeurs décrits par Yuan⁷⁶ (0,034 mmol/g) pour un travail très récent avec des complexes de lanthanides silylés du type [Ln(BPTA)].

La spectroscopie infrarouge par réflexion diffuse, bien adapté à l'étude de surface, nous permet de caractériser l'empreinte des complexes que les différents hybrides. Un exemple est montré avec la figure 58 (p. 132).

Ainsi trois hybrides à base de silice incorporant des complexes d'euporium silylés ont pu être isolés et caractérisés. La figure 59 (p 133) présente de façon schématique les neuf hybrides obtenus au cours de ce travail. Les propriétés de luminescence des complexes et des hybrides ont été soigneusement étudiées.

4. Propriétés de luminescence

- *Propriétés de luminescence des complexes*

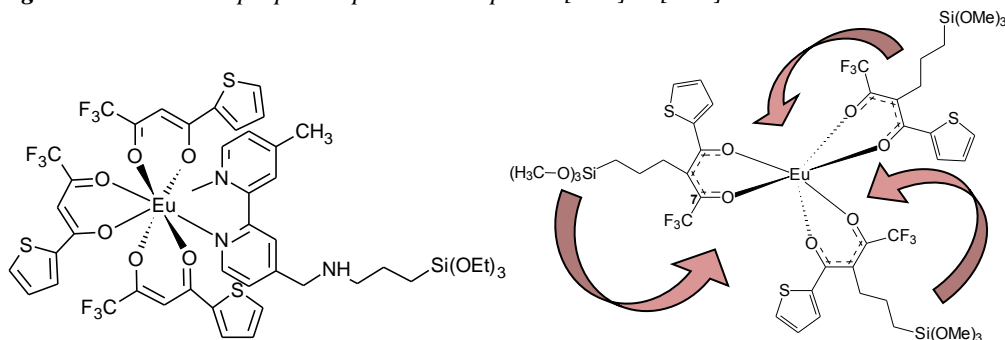
L'énergie des niveaux S des ligands est connue par les spectres d'absorption. Pour localiser les niveaux T, nous avons synthétisé les complexes analogues [Gd(TTA)₃(Bpy-Si)] et [Gd(TTA-Si)₃], respectivement notés [Gd2] et [Gd3] et mesuré leur émission dans le

visible à 77K (figure 60 a, b, p. 134). L'émission observée ne provient que de la partie organique. Les énergies des niveaux T sont supérieures à celles des $^5D_{0-2}$ de Eu^{3+} et le transfert ligand-Eu est possible, ce qui est confirmé expérimentalement car l'émission due aux ligands est éteinte dans les spectres des complexes [Eu2] et [Eu3].

En appliquant la méthodologie décrite précédemment aux spectres d'émission des complexes solides et en solution (figure 62 p. 137), et les déclin de luminescence (tels que figure 63, p. 138), nous obtenons les valeurs caractéristiques rassemblées dans les Tableaux 8 et 9 (p. 136 et 139).

Nous considérons la moyenne de N_{OH} et $2N_{\text{H}_2\text{O}}$ comme un nombre d'oscillateurs équivalents liés à l'euprium. Sa valeur permet de confirmer la structure des complexes. Le complexe [Eu2] est octocoordiné par les trois ligands dicetone et la dipyridine : la coordination de l'euprium est saturée ($N=0$) et n'est pas modifiée par la mise en solution dans l'acetonitrile. Pour [Eu3], il n'y a que trois ligands dicetone par Eu, cependant la valeur de N est très faible (0,4). Nous proposons que la coordination est saturée par liaison intramoléculaire avec les methoxy pendants des triméthoxysilane. Ces considérations confirment les structures que nous proposons pour les deux nouveaux complexes synthétisés dans ce travail.

Figure 64: Structures proposées pour les complexes [Eu2] et [Eu3]



Les efficacités quantiques q pour [Eu2] et [Eu3] sont élevées : 61 et 64%, en concordance avec l'absence d'eau coordinant l'euprium. Les spectres d'excitation des solutions sont analogues à leurs spectres d'absorption (figure 65, p. 142), confirmant un bon effet d'antenne dans les trois complexes. Aux longueurs d'ondes d'excitation qu'imposent les applications visées (environ 365 nm) c'est bien le ligand TTA (ou TTA-Si), présent dans [Eu2] et [Eu3], qui est l'antenne efficace. Nous avons mesuré les rendements quantiques ϕ de

ces deux complexes en solution par comparaison avec $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, observant un meilleur rendement pour $[\text{Eu}2]$ que pour $[\text{Eu}3]$: 53% et 30%, respectivement.

- *Propriétés de luminescence des hybrides*

Nous avons étudié systématiquement les propriétés de luminescence des neuf hybrides obtenus à partir de ces trois complexes. Les spectres d'excitation et d'émission de luminescence sont rassemblés dans les figures 66, 67 et 68. (p. 145, 146, 147) respectivement. Les données expérimentales ont été traitées comme pour tous les échantillons précédents, conduisant aux valeurs caractéristiques rassemblées dans les tableaux 10 et 11 (p. 148). Les raies d'émission sont toujours plus larges dans les hybrides que dans le complexe pur correspondant, particulièrement visible pour les trois $\text{SiO}_2@[\text{Eu}]$, ce qui signifie que l'interaction entre la silice et le complexe y est plus importante. La diminution des valeurs des Ω_2 et de A_{RAD} traduit numériquement ces modifications du champ des ligands après insertion des complexes dans les hybrides. Pour les hybrides des complexes $[\text{Eu}1]$ et $[\text{Eu}2]$, les valeurs de q évoluent suivant la séquence : $\text{SiO}_{2\text{meso}}-[\text{Eu}] \sim \text{SiO}_2-[\text{Eu}] > \text{SiO}_2@[\text{Eu}]$ et demeurent élevées dans tous les cas. Le nombre des vibreurs OH (moyenne des N_{OH} et $2N_{\text{H}_2\text{O}}$) reste faible parce que dans ces hybrides l'euporium est très bien « engagé » par les ligands. Pour le complexe $[\text{Eu}3]$, la coordination par les trois dicétones n'est pas complète, ce qui cause une plus grande versatilité des environnements en fonction des conditions de greffage sur les supports de silice ou de synthèse par émulsion W/O. Nous avons détaillé ces effets dans notre article¹⁴³.

Dans les spectres d'excitation de luminescence des hybrides on retrouve très nettement les bandes d'absorption des ligands organiques. On voit bien l'excitation efficace dans la bande de ligand Bpy (vers 280nm) pour les trois hybrides de $[\text{Eu}1]$. Pour les trois hybrides avec le complexe $[\text{Eu}2]$, on observe une composante très efficace entre 320 et 390 nm : c'est la bande $\pi - \pi^*$ du ligand TTA. La réponse est sensiblement la même pour les ligands TTA-Si dans les hybrides de $[\text{Eu}3]$

Une bonne sonde luminescente doit avoir : i) une valeur élevée de A_{RAD} ii) une valeur élevée de q et iii) un fort coefficient d'absorption de la lumière incidente. La troisième donnée est très difficile à obtenir sur les solides : nous proposons donc de définir une « brillance relative » des 9 hybrides. Pour cela nous intégrons l'intensité émise sur tout le spectre sous l'excitation à $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm. Les valeurs numériques sont rassemblées dans le

Tableau 12 (p. 151). Les brillances des hybrides SiO₂-[Eu²⁺] et SiO₂@[Eu²⁺] dépassent de très loin les autres. Les très faibles valeurs pour les hybrides de [Eu¹⁺] s'expliquent par la faible absorption à 365 nm. Les hybrides à partir de [Eu³⁺] sont intermédiaires à cause des effets de structure plus importants.

Ces nanohybrides à base de silice et de complexes d'euporium silylés présentent des propriétés de luminescence intéressantes, ils ont été évalués pour des applications dans l'analyse de divers milieux biologiques.

5. Sondes luminescentes : essais exploratoires d'analyse de milieux biologiques

Afin d'illustrer des applications potentielles des hybrides obtenus en tant que sondes luminescentes, des tests de détection de ces matériaux par des techniques couramment utilisées en analyse biologique ont été réalisés.

1. Observation en microscopie confocale (CLSM)

- *Exploration de biofilms bactérien Pseudomonas aeruginosa*

Les hybrides SiO₂-[Eu2] e SiO₂-[Eu3] ont été testés en tant qu'outils d'exploration de biofilms bactériens. L'intérêt de la microscopie confocale vient du fait qu'elle permet d'étudier les systèmes biologiques particuliers, que sont les biofilms, dans leur état naturel c'est-à-dire vivants ou *in situ*. En effet pour avancer dans la compréhension de mécanisme de résistance des biofilms vis-à-vis des bactéricides ou antibiotiques, il est important d'explorer la structure de des systèmes. La CLSM permet une reconstitution en trois dimensions des systèmes étudiés moyennant le marquage sélectifs des bactéries et des sondes. Le travail de thèse de L. Mauline, au CIRIMAT à porté sur l'utilisation de nanoparticules de silice bifonctionnelles comme outils d'exploration des biofilms bactériens *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons donc testé dans les conditions mises au point dans le cadre de ce travail les deux hybrides SiO₂-[Eu2] e SiO₂-[Eu3]. Les hybrides sont mis en suspension aqueuse puis filtrés. La solution est ensuite déposée sur le biofilm. Après 12 heures les biofilms sont rincés pour enlever l'excès d'hybrides qui n'a pas pénétré l'échantillon. Après marquage des bactéries au SYTO 9® ($\lambda_{ex}= 488 \text{ nm}$ e $\lambda_{em}= 498\text{-}520 \text{ nm}$) ou SYTO 45® ($\lambda_{ex}= 452 \text{ nm}$ e $\lambda_{em}= 484 \text{ nm}$) l'observation par microscopie confocale est réalisée. L'épaisseur du biofilm peut être mesurée, généralement compris entre 10 et 50 μm . Les images ont été acquises également sous excitation à 405 nm, avec la longueur d'onde la plus petite disponible, donc correspondant à des conditions peu favorables. L'émission est mesurée entre 580 et 630 nm, caractéristique des transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0,2}$ des ions europium dans les hybrides. Les figures 69 (a à e) (p.156) présentent des représentations 3D du biofilm bactérien *Pseudomonas aeruginosa* marqué au SYTO9® (a) ou SYTO 45® (c,d)). Après 12 heures de contact on peut voir que les nanoparticules ont pénétré le biofilm dans les deux cas, SiO₂-

[Eu2] e SiO₂-[Eu3]. Les images (figure 69) ont été obtenues à l'aide du logiciel *imageJ*, avec la superposition des images 450 plans enregistrés en xy.

Ces premiers résultats sont très intéressants car ils suggèrent un taux de pénétration différent des deux hybrides dans le biofilm de Pseudomonas aeruginosa. Les conditions expérimentales doivent être optimisées, mais ces expériences exploratoires ouvrir de nouvelles applications pour ces hybrides en tant que sondes dans les milieux biologiques.

- *Excitation multiphoton*

Les récents développements technologiques notamment des sources laser à impulsions ultrabrèves ont permis l'avènement de la microscopie biphotonique. Ses applications sont depuis en plein essor. Elle possède plusieurs avantages sur les techniques classiques de fluorescence à un photon, qui rendent son utilisation intéressante pour l'imagerie biologique. Tout d'abord, la longueur d'onde d'excitation est située dans l'infra-rouge proche, typiquement vers 800-1000 nm, qui est une plage de plus grande transparence des tissus biologiques. Les photons infra-rouge sont moins diffusés par le tissu que les photons UV ou visibles utilisés dans les techniques d'excitation à un photon. Le faisceau exciteur pénètre donc mieux dans le tissu et permet une imagerie de couches plus profondes. Mais l'avantage de l'excitation bi-photonique réside surtout dans le confinement de l'excitation à un volume focal. Cette résolution tridimensionnelle de l'excitation augmente de manière drastique le rapport signal/bruit dans un milieu épais. Nous avons donc souhaité tester nos hybrides à l'excitation biphotonique. Ces expériences réalisées ont été réalisées à l'IPBS, Toulouse.

Les figures 71 et 72 (p. 159) présentent les spectres sous excitation biphotonique et monophotonique pour les hybrides SiO₂-[Eu2] et SiO₂-[Eu3]. On voit que les spectres d'excitation ne montrent pas de différences significatives dans la forme et les positions des bandes par rapport aux spectres d'excitation monophoton, suggérant que ce sont des états excités des ligands, soit par l'excitation d'un ou deux photons, ce qui est normalement observé dans le chromophore¹⁴⁹. Le spectre d'émission, avec excitation à 700 nm, montre les transitions caractéristiques de l'ion Eu³⁺ (figure 73, p. 160). Le spectre est similaire au spectre d'excitation monophoton (figure 67 et 68 p. 146-147).

Ainsi ces hybrides sont de bons candidats pour la microscopie biphotonique.

2. Marquage cellulaire

- *Détection en Cytométrie de flux*

Nous avons mis en œuvre nos sondes luminescentes dans un premier test de marquage cellulaire (P815, mastocytes de souris). Après avoir fonctionnalisé les hybrides en deux étapes par un groupement succinimide (Cf. réaction figure 20 p.81), ils ont été mis en incubation avec les cellules et analysés en cytométrie de flux dans les conditions suivantes (figure 74 , p. 162) : excitation laser à 355 nm et la détection dans la fenêtre 610 ± 10 nm, région spectrale correspondant à l'émission de l'ion Eu^{3+} . Seuls les hybrides les plus luminescents, $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]}$ et $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]}$, ont été détectés dans nos conditions d'analyse. Ceci peut s'expliquer par le fait que 20 μs séparent l'excitation et la détection. Nous sommes donc en condition d'analyse en temps retardé.

Les résultats de cytométrie sont présentés sous la forme d'histogrammes portant sur l'axe des x l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'événements (dans notre cas nombre de cellule ou de particules). Les figures 75 et 76 (p. 163 et 164) reportent les résultats obtenus pour les hybrides greffés et fonctionnalisés par le succinimide, $\text{SiO}_2\text{-[Eu2]-NH-DTP}$ et $\text{SiO}_{2\text{mes}}\text{-[Eu2]-NH-DTP}$ respectivement. Les histogrammes 75a et 76a correspondent au blanc constitué de SiO_2 Ludox. Les histogrammes 75b et 76b indiquent que nos marqueurs sont effectivement très luminescents puisque les signaux de luminescence atteignent $10^3\text{-}10^4$ sur l'axe des x donc très supérieurs au signal obtenu pour l'autofluorescence des cellules qui est comparable au signal obtenu en a). Enfin le marquage cellulaire est mis en évidence dans le troisième histogramme (75c et 76c) qui concerne les cellules après incubation. On note, pour les deux hybrides, des intensités de luminescence significatives indiquant que le marquage est réalisé avec succès.

- *Détection en microscopie de fluorescence – marquage spécifique*

Nous avons enfin entrepris de fonctionnaliser nos hybrides pour en faire des marqueurs spécifiques de la bactérie *Escherichia coli*. Dans ce but nous les avons fonctionnalisés en quatre étapes (paragraphe 1.14-1.18, p. 78-80). Les hybrides ainsi modifiés sont notés $\text{SiO}_2\text{-[Eu]-Amin-Glu-protA-IgG1}$. L'étape finale consistant à greffer, à une distance assez grande du luminophore, un anticorps monoclonal spécifique de la bactérie visée.

Le couplage marqueur-bactérie a été réalisé en dispersant l'hybride biofonctionnalisé dans une solution tampon phosphate, cette suspension est mise en contact avec une plaque imprégnée de bactéries *Escherichia coli*. Après rinçage, les plaques ont été observées en microscopie de fluorescence. L'observation de la luminescence de la matière (Figure 78, p.168) montrant l'efficacité de la fonctionnalisation et la possibilité d'utilisation de nos hybrides en tant que marqueurs biologiques

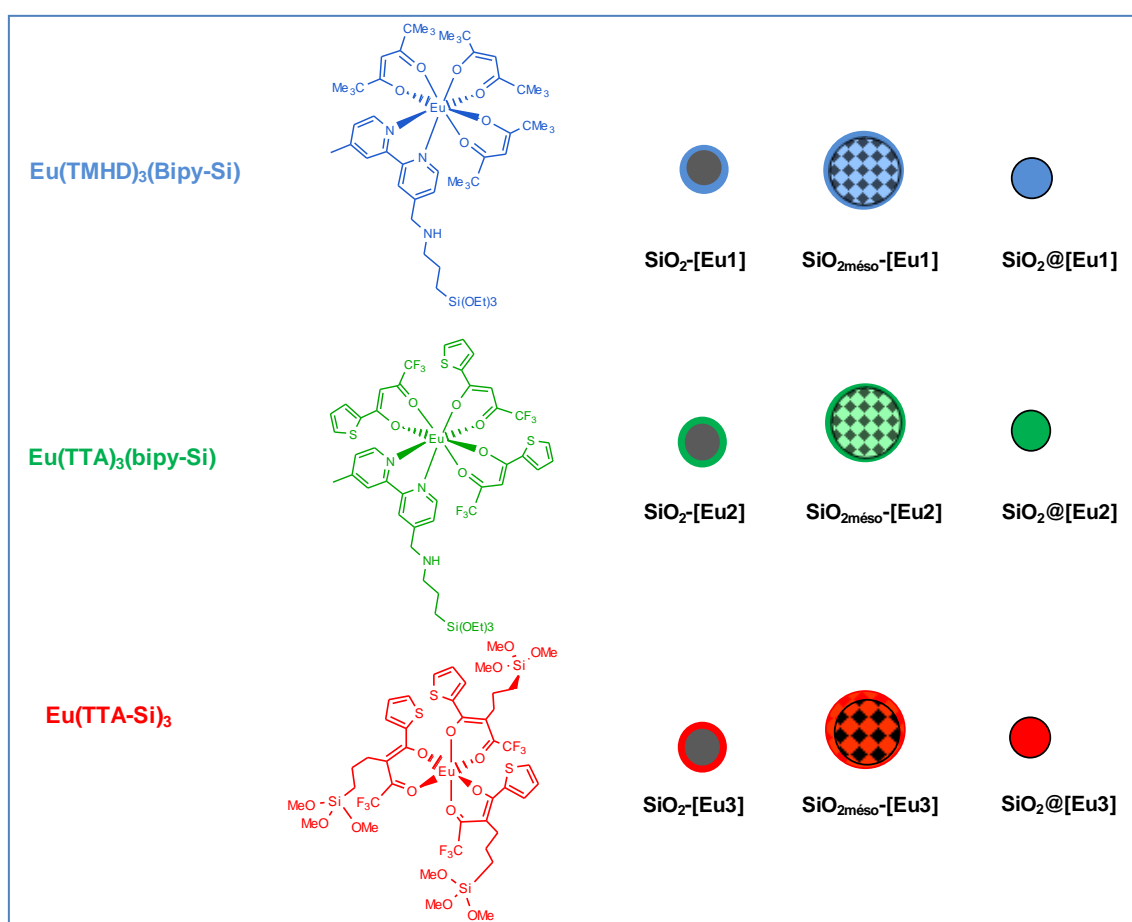
Conclusion générale

En conclusion de ce travail de thèse, nous avons fait le choix de synthétiser trois complexes d'euprium(III) comportant au moins un ligand à fonction alcoxysilane ceci dans le but d'élaborer des hybrides luminescents à base de silice et de chélate d'euprium(III).

Deux méthodologies ont été abordées pour la préparation des hybrides :

➤ *Réaction de greffage des complexes à la surface de particules, pour cela deux matrices ont été utilisées. Tout d'abord des nanoparticules de silice denses (Ludox AS-40) qui ont permis d'obtenir trois hybrides dont la morphologie initiale, qui est conservée (28 ± 3 nm) est intéressante pour les applications envisagées en biologie. Les réactions ont également été menées avec des particules de silice submicroniques obtenues par pyrolyse d'aérosol. Ces particules, si elles conservent bien sur la morphologie initiale, gardent l'inconvénient de mettre en évidence une très grande dispersité en taille (60-1000 nm) avec une moyenne à 600 nm. L'intérêt de ce dernier support reste dans la très grande surface spécifique apportée par la mésoporosité. Les quantités de complexes greffés, comprises entre 0,2 et 0,6 mmol de complexe par gramme de silice, sont en accord avec les résultats décrits pour ce type d'hybrides. Les taux observés pour les nanoparticules de Ludox modifiées qui apparaissent plus faibles que ceux obtenus pour les particules mésoporeuses traduisent cependant un rendement du greffage supérieur. Ceci est indiqué par le nombre de complexe ramené par unité de surface (nm^2). Une perspective intéressante est la possibilité de modifier la taille des pores pour les particules mésoporeuses ouvrant une voie prometteuse pour l'obtention d'hybrides à fort taux de charge. Dans notre cas la porosité d'environ 5 nm pour un matériau de type MCM 41 peut justifier le rendement plus faible de la réaction de greffage. L'obstruction des pores pouvant en être la raison la plus plausible.*

➤ Nous avons utilisé la réaction de Stöber en milieu microémulsion inverse pour préparer des nanoparticules de silice denses incorporant par lien covalent les trois complexes d'euporium à fonction alcoxysilane. Ces particules de taille contrôlée, 45 nm, très monodisperses, comportent des taux d'incorporation très intéressants, largement supérieurs à ceux décrits à ce jour dans la littérature et ce même dans le cas où le taux d'incorporation est le plus faible ($\text{SiO}_2@[\text{Eu}3]$). Ce résultat sur l'obtention de ce type d'hybride est un des points forts de ce travail. En effet l'intérêt de ces hybrides réside dans leur versatilité compte tenu de type de complexe que l'on peut incorporer, du nombre de complexe et de la possibilité d'en modifier chimiquement la surface.



Enfin les propriétés de luminescence des complexes libres, à l'état solide et en solution, ainsi que celles des neuf hybrides ont été soigneusement étudiées à partir des spectres d'émission, d'excitation et d'absorption. Les efficacités d'émission, q , et les rendements quantiques, ϕ , qui prennent en compte à la fois l'efficacité de transfert d'énergie ligand-Eu et l'efficacité d'émission du lanthanide, ont pu être évalués. Tout l'intérêt de synthétiser des complexes à ligands dérivés de la bipyridine ou du thénoyltrifluoroacétone, connus pour leur bon effet d'antenne vis-à-vis de l'ion Eu^{3+} a pu être mis en évidence. Des

trois complexes, le complexe [Eu2] apparaît le plus prometteur avec des efficacités d'émission de 60% à l'état solide et en solution. Dans les conditions de travail mises en oeuvre c'est ce même complexe qui met en évidence l'efficacité quantique la plus grande (81%) devant le complexe [Eu3] (67%).

Dans le cas des hybrides avec [Eu1] et [Eu2] les efficacités quantiques mesurées, q , évoluent suivant la séquence $\text{SiO}_{2\text{meso}}\text{-[Eu]} \sim \text{SiO}_2\text{-[Eu]} > \text{SiO}_2\text{@[Eu]}$. Pour ceux impliquant le complexe [Eu3], l'hybride greffé sur Ludox $\text{SiO}_2\text{-[Eu3]}$ est le moins efficace. Nous relierons ces résultats à la structure des hybrides en discutant le nombre des vibrateurs OH qui seraient à l'origine des effets observés. La coordinance élevée de l'euporium dans les complexes [Eu1] et [Eu2] semble mieux protéger le centre métallique même au sein des hybrides qu'ils soient obtenus par greffage ou incorporation.

Enfin la dernière partie de ce travail a pu montrer l'intérêt des tels hybrides luminescents pour des applications à l'analyse de divers milieux biologiques en mettant en oeuvre des techniques d'analyse couramment employées dans les laboratoires d'analyse clinique (cytométrie de flux, microscopie de fluorescence) ou des techniques microscopiques en pleine expansion comme l'excitation multiphoton.

Par notre approche "pas à pas" dans laquelle différents choix s'imposent tels que :

- le système ligand-cation métallique
- la matrice inorganique
- sa morphologie : matrice mésoporeuse, dense, nanométrique ou submicronique
- le type d'hybride : incorporation ou greffage du luminophore
- la diversité des biofonctionnalisations possibles

nous avons accès à des sondes luminescentes très efficaces dont les perspectives en tant que nouveaux marqueurs biologiques sont prometteuses et que l'on se propose maintenant de développer.

RÉSUMÉ

Ce travail décrit la synthèse, la caractérisation et l'étude des propriétés de photoluminescence d'hybrides à base de silice et de complexes d'euporium(III). Ces hybrides sont ensuite organiquement modifiés pour illustrer leur application potentielle en tant que sondes ou biomarqueurs. Associer les très bonnes propriétés de luminescence des complexes de lanthanides avec les propriétés physico-chimiques d'une matrice inorganique telle que la silice est une voie prometteuse pour l'obtention de nouveaux outils d'analyse pour la biologie. La versatilité de la silice vient du fait qu'il est possible d'en modifier le cœur mais aussi la surface ainsi deux types d'hybrides ont été envisagés. Ils sont obtenus soit par greffage des complexes silylés d'euporium à la surface des particules de silice, soit par incorporation des complexes pendant la synthèse de la nanoparticule en utilisant notamment la méthode de Stoeber en milieu microémulsion inverse. Ces deux voies ont été explorées dans ce travail. Les nouveaux hybrides organiques-inorganiques, obtenus dans ce travail, présentent un comportement de luminescence intéressant, indépendamment de la localisation de complexes Eu(III), c'est à dire en surface ou à l'intérieur des nanoparticules. Les hybrides obtenus ont la dimension nanométrique et le complexe est lié de façon covalente. Les analyses ont été réalisées pour décrire les propriétés de luminescence, au-delà des caractéristiques de surface et de structure. Les premiers résultats montrent que les nouveaux hybrides sont des candidats prometteurs pour leur utilisation en tant que biomarqueurs luminescents, en particulier pour l'analyse en temps résolu.

Mots-Clés : *Complexes d'Euporium(III) silylés, Nanoparticules de silice, hybrides organiques-inorganiques, Incorporation, Greffage, Luminescence, Biomarqueur luminescents.*

ABSTRACT

The association of the very interesting luminescence properties of the lanthanide chelates with the physicochemical properties of inorganic matrix such as silica is a promising way to obtain new probes or luminescent markers for biology analyses.

In this idea, this work focuses on the preparation of new hybrid materials based on the grafting of new europium(III) complexes on silica nanoparticles. These europium complexes were developed in our group using bifunctional ligands containing both complexing and grafting sites. Intrinsic characteristic of the ligands gives us the ability to make a covalent bond between the material surface and the complex. Two different methodologies were used; the first one is the direct grafting reaction involving the complex and silica nanoparticles (i.e. dense or mesoporous particles). The second one is the Stöber reaction, where the SiO₂ nanoparticles were prepared in presence of the europium complex. The last methodology has an additional difficulty, because of the presence of silylated europium complex, it needs a closer control of the physicochemical conditions. The new organic-inorganic hybrid materials, obtained in this work, present an interesting luminescence behavior and this one is depending on the localization of the europium complex, i.e. on the surface or within the nanoparticles. In addition, the obtained hybrids present the nanometric dimension and the complex is not leachable. Analyses were realized to describe the luminescence properties, beyond surface and structural characteristics. Initial results show that the new hybrids are promising candidates for luminescent biomarkers, particularly for the time-resolved analysis.

Key words: *Silylated europium(III) complexes, silica nanoparticles, organic/inorganic hybrids, Incorporation, Grafting, Luminescence, Luminescent biomarkers*