

# MATERIAIS HÍBRIDOS FLUORESCENTES

Tânia Ribeiro\*

CQFM – Centro de Química-Física Molecular e IN – Institute of Nanoscience and Nanotechnology  
Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa  
tania.ribeiro@tecnico.ulisboa.pt

As nanopartículas fluorescentes têm sido um dos principais focos de pesquisa e desenvolvimento devido às suas propriedades ópticas e químicas. Neste trabalho foram preparadas e caracterizadas várias nanopartículas fluorescentes, incluindo nanopartículas de sílica que foram internalizadas com sucesso em células HEK293, indicando o seu excelente potencial para bioimagem *in vivo*. Quanto mais luz emitirem as nanoestruturas, mais interessante se torna o seu uso em bioimagem. Para amplificar a intensidade de luz emitida por um sistema coloidal foram estudadas estruturas com nanopartículas de ouro na proximidade de cromóforos. A preparação destes sistemas é extremamente importante para o desenvolvimento de novos dispositivos coloidais tais como nanosensores e sondas.

## A ESCALA NANO

Os nanomateriais são estruturas cuja dimensão, situada entre um e algumas centenas de nanómetros, é mais facilmente quantificável se pensarmos na espessura de um cabelo ou de uma folha de papel que é, em média, 150 000 nm (Figura 1A).

Na nanoescala, as propriedades da matéria são diferentes das observadas em átomos ou moléculas individuais e em materiais em grande escala. O estudo e a compreensão das propriedades electrónicas, químicas e estruturais destes materiais são a chave para o *design* e construção de engenhos funcionais para aplicar em diferentes áreas como a biotecnologia, as ciências biomédicas, as ciências dos materiais e a engenharia. Dadas as suas propriedades únicas, e principalmente devido à razão superfície-volume que é tanto maior quanto menores as nanopartículas (NPs), estas são um dos componentes fundamentais no fabrico destes engenhos. Os metais, semicondutores e polímeros orgânicos são exemplos de materiais que podem ser integrados na composição das

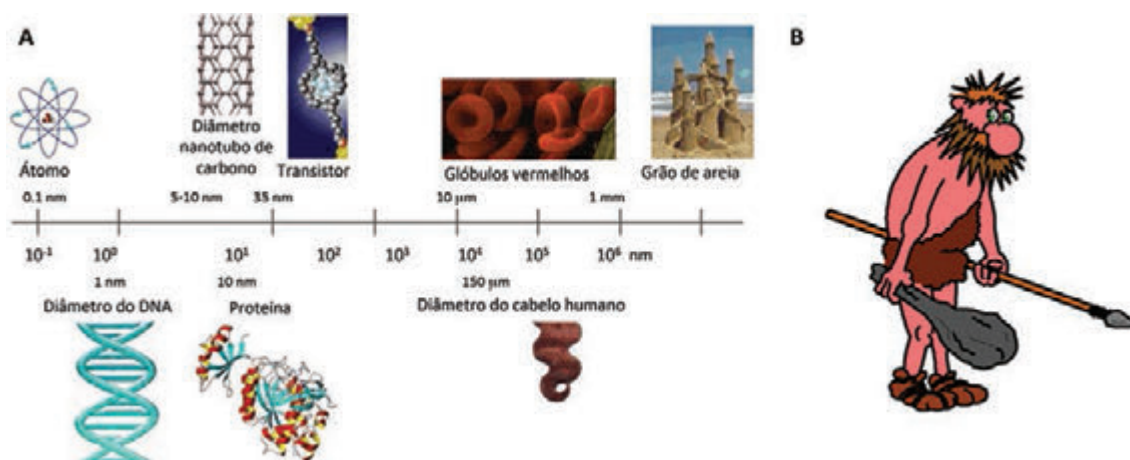
NPs. Esta composição determina a sua utilidade para diferentes aplicações, tais como catálise, bioimagem, reconhecimento molecular e revestimentos.

## MATERIAIS HÍBRIDOS: 1+1>2

Os materiais híbridos conjugam as principais vantagens de dois ou mais componentes num só material, com características e propriedades não encontradas nas partes individuais. O Homem primitivo já usufruía deste tipo de materiais. Exemplo disso é a utilização de uma lança constituída por um cabo de madeira e uma ponta de pedra afiada, beneficiando da resistência da pedra e do maior alcance proporcionado pelo cabo de madeira (Figura 1B).

## NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA COLORIDAS

A sílica é um material versátil, isolante e bastante estável, sendo o principal componente do vidro e do granito. Devido às suas características e à fácil funcionalização da sua superfície, a sílica pode ser usada como núcleo rodeado



**Figura 1** – A) Comparação entre os tamanhos perceptíveis aos nossos olhos e a nanoescala; B) Inventor primitivo de um material híbrido (lança com cabo de madeira e ponta de pedra - patente não registada)

\* Menção honrosa do PYCA-Gradiva 2014

por outros materiais, como coroa ou ainda como matriz de incorporação de espécies moleculares. As características das nanopartículas de sílica (SiNPs) podem ser facilmente ajustadas durante a sua preparação de modo a obter partículas de diferentes diâmetros (20-500 nm), poros de diferentes tamanhos e estrutura bem como diferentes modos de incorporar moléculas, tais como fármacos, fluoróforos e catalisadores [1].

Fluoróforos são moléculas fluorescentes, ou seja, que absorvem energia de uma luz incidente e emitem parte dessa energia em forma de luz de cor diferente. Incorporar fluoróforos no interior das SiNPs tem muitas vantagens. Uma delas é a protecção dos fluoróforos contra elementos que os degradam, como o oxigénio. A limitada difusão do oxigénio dentro das SiNPs faz com que o fluoróforo esteja mais protegido dentro das mesmas. Outra vantagem é a elevada quantidade de luz que é emitida por cada NP face à luz emitida por um só fluoróforo, visto que cada SiNP pode conter milhares de moléculas fluorescentes.

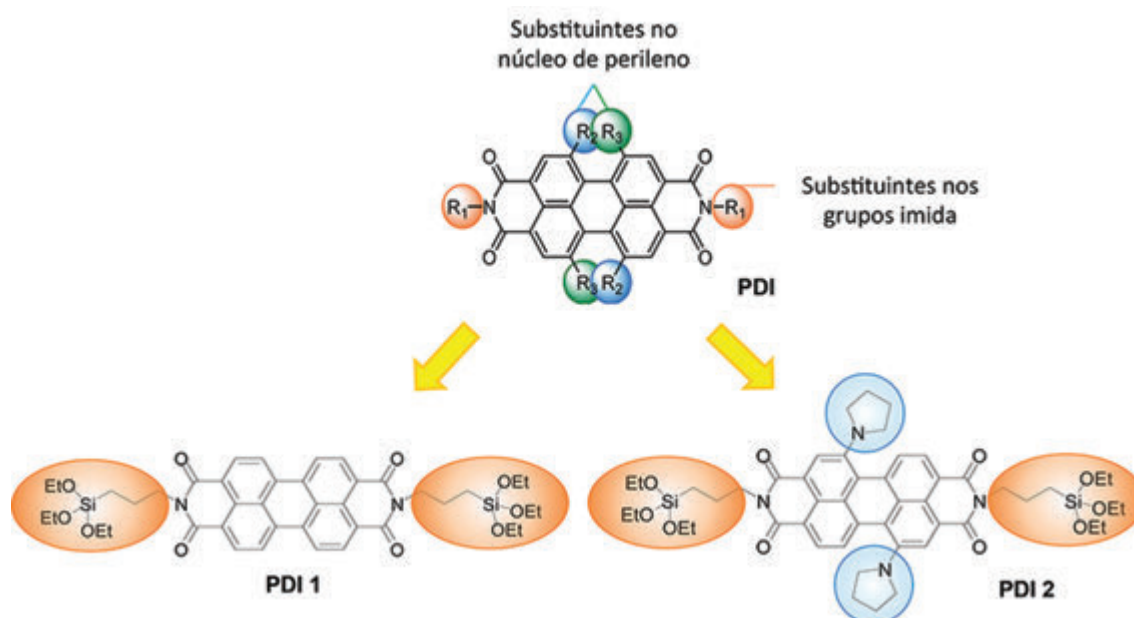
Para preparar SiNPs fluorescentes, utilizámos fluoróforos derivados da molécula perilenodiimida (PDI). As PDIs têm elevada estabilidade fotofísica e as suas propriedades podem ser modeladas através da introdução de substituintes em diferentes partes da molécula (Figura 2). No nosso caso, os derivados de PDI usados, PDI 1 e PDI 2, têm dois grupos terminais trietoxi silano (representados a laranja na Figura 2) que permitem a incorporação destas moléculas na rede de sílica durante a síntese das SiNPs. Adicionalmente, a molécula PDI 2 tem dois substituintes pirrolidina no núcleo de perileno (representados a azul na Figura 2) responsáveis pela emissão desta molécula na região de infra-vermelho (IV) próximo. As moléculas PDI 1 e PDI 2 foram incorporadas em nanopartículas de sílica fluorescentes a que chamámos SiNP1 e SiNP2, respectivamente [2,3].

## REVESTIMENTOS AVANÇADOS AMIGOS DO AMBIENTE

É cada vez mais importante o revestimento de diversos materiais, quer seja para evitar estragos como para efeitos de decoração. Por exemplo, muitos dos comprimidos que tomamos têm um revestimento resistente ao ácido que existe no nosso estômago para que o fármaco não seja libertado antes de chegar ao local pretendido. As tintas que usamos para pintar as paredes das nossas casas ou os nossos carros são também exemplos de revestimentos.

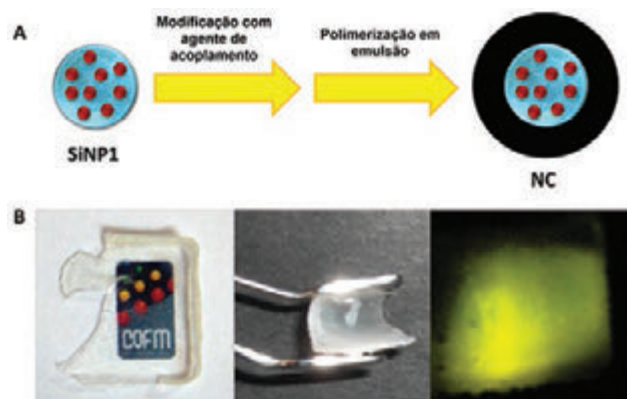
A necessidade de substituir revestimentos baseados em solventes orgânicos por sistemas mais amigos do ambiente deu origem ao desenvolvimento de diferentes estratégias para obter revestimentos à base de água. A preparação de materiais híbridos com uma parte orgânica (polimérica) e outra inorgânica (sílica), mostrou ser uma estratégia com resultados promissores. Assim, é possível combinar a flexibilidade e fácil processamento do polímero com a rigidez dos materiais inorgânicos. Os revestimentos preparados com SiNPs modificadas na superfície são particularmente interessantes devido à redução de agregação de NPs. Esta redução significa na prática que as NPs ficam mais bem dispersas, aumentando a resistência destes revestimentos. A nossa estratégia passou por preparar partículas do tipo “núcleo-coroa” (NC), com núcleo de sílica e coroa polimérica de modo a obter filmes com uma distribuição homogênea do componente inorgânico e sem agregação. As SiNP1 foram modificadas na sua superfície com uma molécula designada de agente de acoplamento que serve para melhorar a adesão entre dois materiais, neste caso, entre as SiNPs e a coroa polimérica (Figura 3A).

De modo a conferir resistência mecânica aos filmes, estes são submetidos a uma temperatura superior à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero. Quando o polímero



**Figura 2** – Estrutura geral de um derivado de perilenodiimida (PDI) e dos derivados PDI 1 e PDI 2. Grupos terminais trietoxi silano representados a laranja e substituintes pirrolidina representados a azul

é arrefecido abaixo desta temperatura, torna-se rígido e quebradiço como o vidro. Quando o polímero é aquecido acima desta temperatura, fica num estado “borrachudo”, tornando-se macio e flexível. Ao submeter os nossos filmes a uma temperatura superior à  $T_g$  do polímero, permitimos a interdifusão (*i.e.* o entrelaçamento) das cadeias poliméricas, obtendo filmes híbridos transparentes, flexíveis e fluorescentes (Figura 3B) [2,4].



**Figura 3** – A) Representação esquemática da síntese de partículas híbridas “núcleo-coroa” (NC) a partir da modificação da superfície das SiNP1 seguida do crescimento da coroa polimérica; B) Transparência, flexibilidade e fluorescência de filmes preparados com as partículas NC

### BIOIMAGEM: A UNIÃO DÁ MAIS LUZ

Como referido anteriormente, uma vantagem de incorporar moléculas fluorescentes nas SiNPs é a possibilidade de concentrar a luz emitida por muitos fluoróforos numa só NP, facto especialmente importante em bioimagem. Este tipo de NPs pode, por exemplo, ajudar cirurgiões a localizar um nervo ou tumor, incidindo luz sobre a zona afectada.

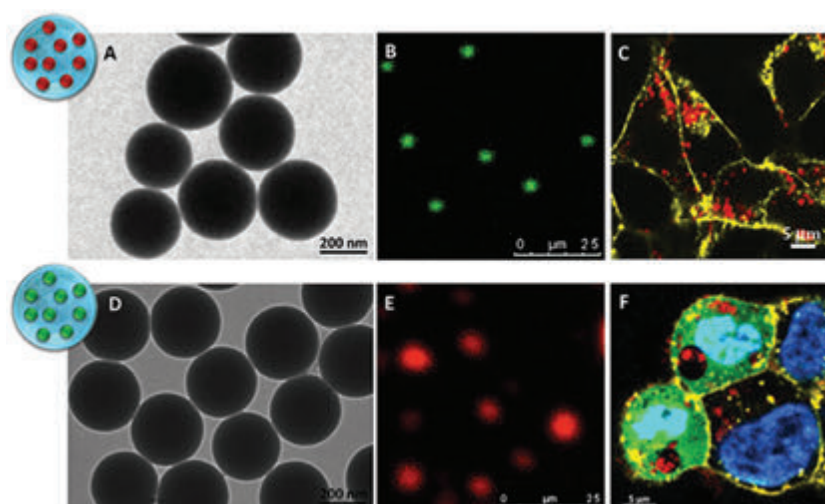
As SiNP1 e SiNP2 foram preparadas com dimensões próximas do limite de resolução de um microscópio óptico (cerca de 300 nm), sendo por isso possível visualizá-las utilizando esta técnica (Figura 4B e 4E) [5]. Adicionalmen-

te, foram observadas utilizando o microscópio de transmissão electrónica (TEM, Figura 4A e 4D).

Enquanto que as SiNP1 emitem luz na região do verde, as SiNP2 emitem luz na região do IV próximo e, em bioimagem, a possibilidade de emitir luz nesta região apresenta vantagens face à luz visível. Por exemplo, a luz do IV próximo consegue penetrar a pele com maior facilidade, [6] e isto acontece porque a estes comprimentos de onda existe menos absorção e autofluorescência por parte dos tecidos biológicos e a dispersão de luz é menor. Para além disso, as nanoestruturas que fluorescem na zona do IV próximo podem ser visualizadas utilizando *lasers* mais baratos e podem ser usadas em sistemas com múltiplos fluoróforos, uma vez que a maioria dos fluoróforos disponíveis para utilização em bioimagem (incluindo a maioria das proteínas fluorescentes, como a *green fluorescent protein* (GFP)) emitem na zona do visível. Uma vez que existem poucos exemplos de fluoróforos funcionalizados para uso na incorporação de SiNPs a emitir nesta zona, consideramos bastante importante a síntese do PDI 2 e a sua incorporação nas SiNP2 [3]. Para ilustrar o uso das SiNP1 e SiNP2 como marcadores para imagem *in vivo* em microscopia de fluorescência confocal, ambas foram internalizadas com sucesso em células (Figura 4C e 4F). No caso das SiNP2, é possível visualizá-las em simultâneo com a GFP, uma vez que emitem luz em diferentes comprimentos de onda.

### NANOPARTÍCULAS DE OURO: AS CONCENTRADORAS DE LUZ

Quanto mais luz emitirem as nanoestruturas, mais interessante se torna o seu uso em imagem. Quando comecei o doutoramento, existiam alguns exemplos do uso de NPs metálicas, essencialmente de ouro e prata, na proximidade de fluoróforos, com o intuito de aumentar a intensidade de luz que estes emitiam. Os exemplos existentes referiam-se à ocorrência deste efeito em superfícies. No entanto, e apesar deste fenómeno estar muito pouco desenvolvido, surgiu a ideia de tentar aplicá-lo num sistema coloidal.



**Figura 4** – Imagens de TEM e microscopia óptica de fluorescência (confocal) obtidas para as SiNP1 (A e B) e SiNP2 (D e E). Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HEK293 onde foram internalizadas as SiNP1 (C) e as SiNP2 (F), representadas a vermelho. Em ambos os casos as células foram coradas com um marcador de membrana plasmática AF594-WGA (amarelo). As células onde as SiNP2 foram internalizadas (F) foram também coradas com um marcador de núcleo Hoechst 33258 (azul) e foram transfectadas de modo a expressar a proteína GFP (verde)



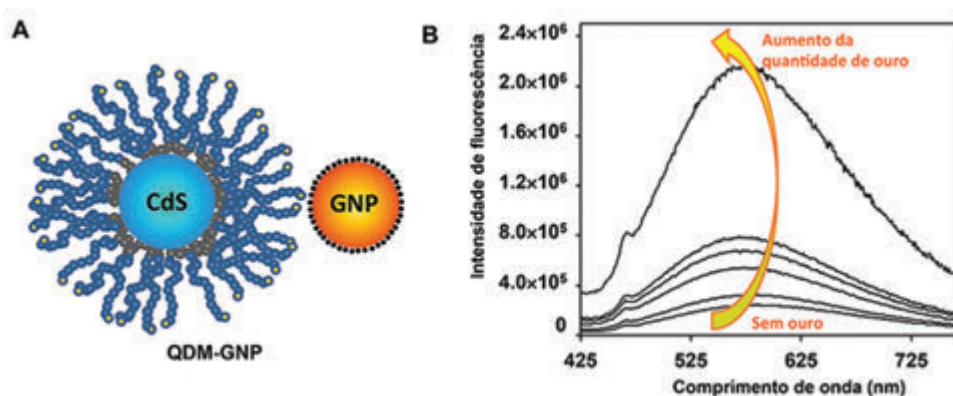
Nanopartículas de ouro (GNPs) exibem propriedades únicas. Não apresentam a cor amarela como num anel de ouro, podem ser vermelhas ou mesmo violetas, dependendo do seu tamanho e da sua forma. Este efeito ocorre nos metais condutores e deve-se ao confinamento do movimento dos electrões que se situam à superfície dos átomos do metal e à interacção destes com a luz incidente. A este efeito chama-se o plasmão do metal que pode ser afectado pela forma e tamanho das NPs, tipo de metal que as constitui e o ambiente que as rodeia. Para haver um aumento na intensidade de luz emitida pelo fluoróforo é necessário que o plasmão das GNPs se sobreponha à absorção do fluoróforo e também que a distância entre eles seja bastante pequena (entre 5 a 15 nm). Contudo, se o fluoróforo estiver em contacto com a GNP, deixa de haver emissão de luz.

Nós estudámos um sistema composto por um *Quantum-Dot* (QD) na proximidade de uma GNP. QDs (nanocristais semicondutores) são compostos por átomos dos grupos II-VI, III-V ou IV-VI da tabela periódica e têm diâmetros entre 2 e 20 nm. É possível ajustar o comprimento de onda de emissão destas estruturas ajustando o seu tamanho ou a composição, ou seja, é possível que os QDs emitam luz de diferentes cores. No geral, estas estruturas possuem elevado brilho e são fotoestáveis. No entanto, devido à toxicidade dos metais pesados que as compõem, estas estruturas devem ser protegidas por coroas biocompatíveis para aplicações *in vivo*. Preparámos

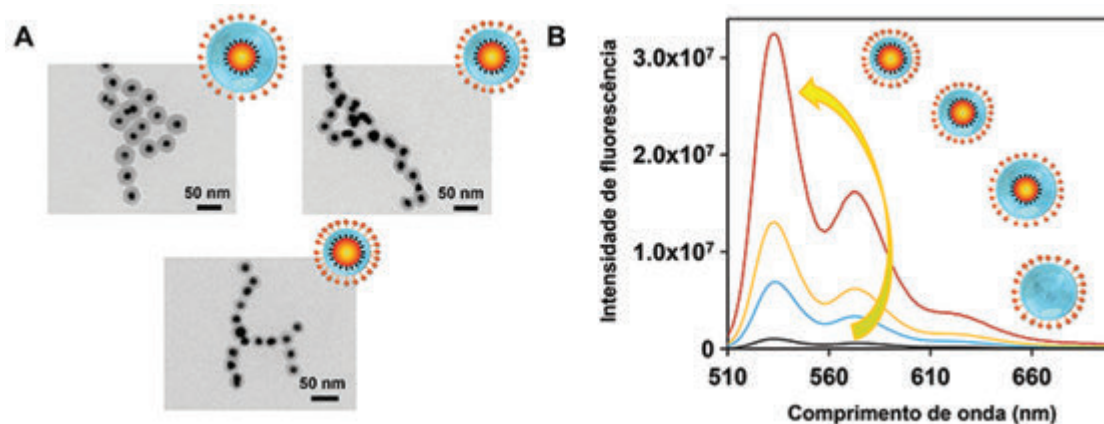
um sistema coloidal (QDM-GNP) em que o núcleo é um QD de sulfureto de cádmio (CdS) rodeado por uma coroa polimérica, que na sua extremidade tem grupos tióis (SH) que permitem a ligação a GNPs (Figura 5A) [7]. Na estrutura de QDM-GNP, a GNP situa-se a cerca de 20 nm de distância do QD. Esta distância é dada pelo comprimento da cadeia polimérica que estabiliza o QD e é essencial para que não haja o desaparecimento de emissão de luz. Foram preparadas amostras com diferentes quantidades de GNPs e observou-se um aumento na intensidade de luz do QD com o aumento da quantidade de GNPs (Figura 5B). Para a amostra com a maior quantidade de GNPs obteve-se uma intensidade de luz 8 vezes superior à intensidade de luz da amostra sem ouro [7].

Como nos foi possível aumentar a intensidade de luz de um fluoróforo (QD) na presença de uma GNP, surgiu a ideia de amplificar ainda mais a intensidade de luz emitida ao colocar vários fluoróforos, em vez de um só, na proximidade de uma GNP. Para isso, preparámos NPs híbridas cujo núcleo é uma GNP de 15 nm de diâmetro e com coroa de sílica. À superfície da coroa ligaram-se covalentemente moléculas fluorescentes (derivado de PDI).

Estas NPs foram preparadas com diferentes espessuras de sílica (7, 9 e 13 nm) com o intuito de estudar a dependência do aumento na intensidade de luz com a distância entre o fluoróforo e a GNP (Figura 6A).



**Figura 5** – A) Representação do sistema coloidal (QDM-GNP) em que o núcleo é um QD de sulfureto de cádmio (CdS) rodeado por uma coroa polimérica, que na sua extremidade tem grupos tióis (amarelo) que permitem a ligação a nanopartículas de ouro (GNPs). B) Espectros de fluorescência de emissão dos sistemas coloidais QDM (sem ouro) e QDM-GNP com diferentes quantidades de ouro



**Figura 6** – A) Imagens de TEM das NPs de ouro-sílica (com diferentes espessuras). B) Espectros de emissão das dispersões coloidais das NPs de sílica sem ouro, e das NPs ouro-sílica, onde se observa o aumento da intensidade de fluorescência para as NPs com menor espessura de sílica

Foi observado um aumento de intensidade de fluorescência com a diminuição da espessura de sílica, ou seja, com a proximidade dos fluoróforos à GNP (Figura 6B). Para a amostra das NPs híbridas de espessura mais fina observou-se uma intensidade de fluorescência trinta vezes superior à intensidade obtida para as NPs de sílica sem ouro.

#### O MELHOR ESTÁ PARA VIR

O aumento de intensidade de luz desejado num sistema coloidal pode ser afectado por vários factores, tais como a distância entre o fluoróforo e a GNP, a quantidade de fluoróforos utilizados e a localização do plasmão da GNP. Apesar das dificuldades em controlar estes factores, estas estruturas são muito promissoras para variadas aplicações, não só em bioimagem mas também em células solares cuja eficiência pode vir a ser aumentada com o uso deste tipo de NPs.

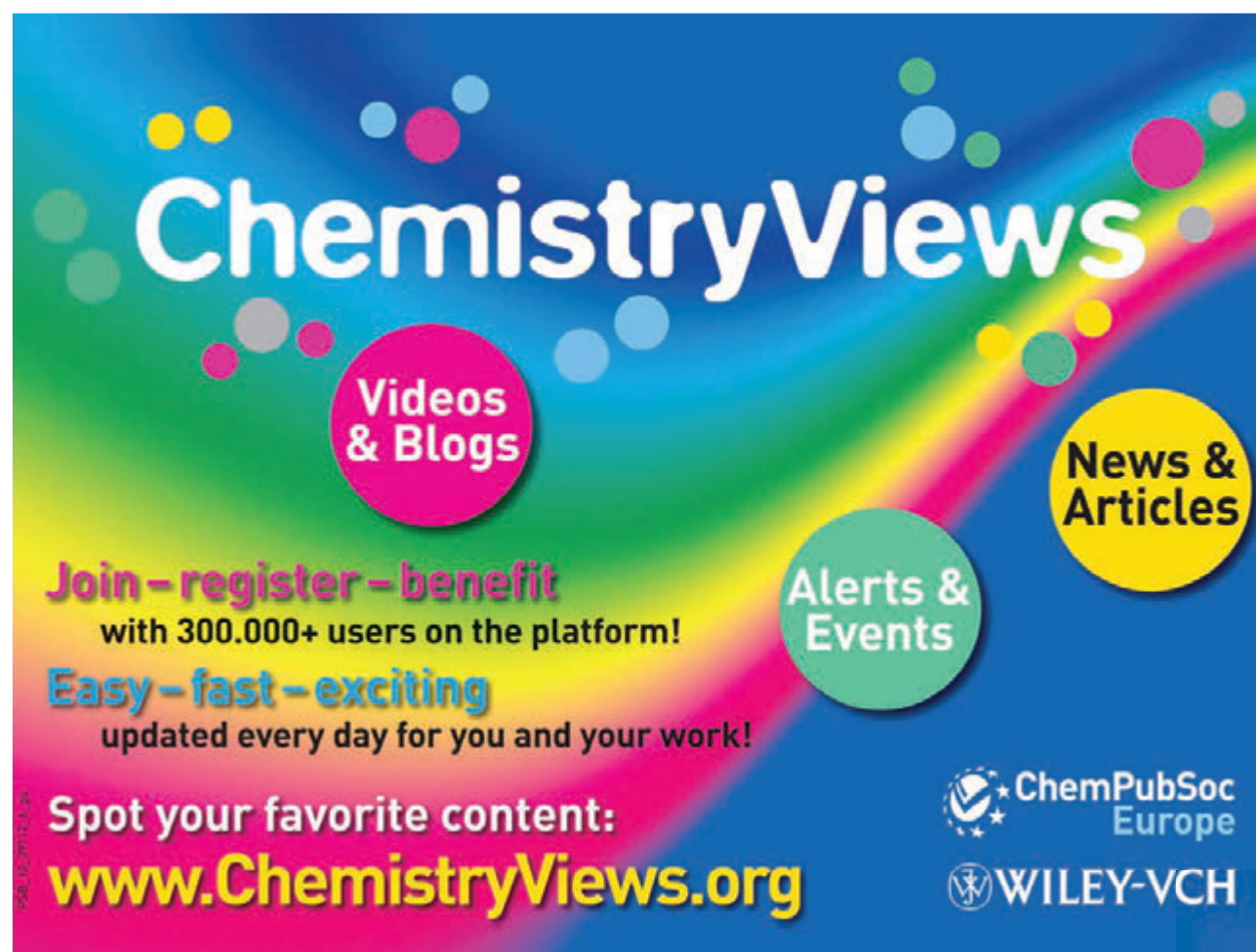
#### AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. José Paulo Sequeira Farinha e Prof. José Manuel Gaspar Martinho, ao Doutor Carlos

Baleizão, a todos os que me ajudaram na concretização dos trabalhos, e à FCT pela concessão da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/64702/2009).

#### REFERÊNCIAS

- [1] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, *Angew. Chem. Int. Ed.* **50** (2011) 4056-4066
- [2] T. Ribeiro, C. Baleizão, J.P.S. Farinha, *J. Phys. Chem. C* **113** (2009) 18082-18090
- [3] T. Ribeiro, S. Raja, A.S. Rodrigues, F. Fernandes, J.P.S. Farinha, C. Baleizão, *RSC Advances* **3** (2013) 9171-9174
- [4] T. Ribeiro, A. Fedorov, C. Baleizão, J.P.S. Farinha, *J. Colloid Interf. Sci.* **401** (2013) 14-22
- [5] T. Ribeiro, R. Sebastian, A.S. Rodrigues, F. Fernandes, C. Baleizão, J.P.S. Farinha, *Microsc. Microanal.* **19**(S4) (2013) 105-106
- [6] R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.* **19** (2001) 316-317
- [7] T. Ribeiro, T. Prazeres, M. Moffitt, J.P.S. Farinha, *J. Phys. Chem. C* **117** (2013) 3122-3133



**ChemistryViews**

Videos & Blogs

News & Articles

Alerts & Events

**Join – register – benefit**  
with 300.000+ users on the platform!

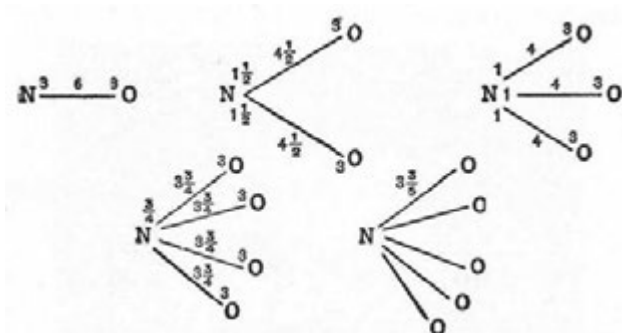
**Easy – fast – exciting**  
updated every day for you and your work!

Spot your favorite content:  
**www.ChemistryViews.org**

ChemPubSoc Europe  
WILEY-VCH

## PIONEIROS DA REPRESENTAÇÃO DA LIGAÇÃO QUÍMICA

O pioneirismo da utilização de linhas nas fórmulas estruturais para representar a ligação entre átomos (Figura 1) é comumente atribuído ao químico irlandês William Higgins (1763-1825).



**Figura 1** – Representação das combinações de “partículas fundamentais” (*ultimate particles*) de William Higgins, tal como surgiram em *A Comparative View of the Phlogistic and Antiphlogistic Theories* (Londres, 1789), de alguma forma antecipando o conceito de valência na ligação química. [fonte: Wikipédia]

A sua obra *A Comparative View of the Phlogistic and Antiphlogistic Theories*, impressa em Londres em 1789, teve duas edições. Hoje alguns autores reconhecem-lhe igualmente o mérito de se ter antecipado a Dalton na questão do atomismo [1,2]. A notação de Higgins, porém, nunca se conseguiu implantar, o que em parte se terá devido ao facto de as suas estruturas serem bastante especulativas.

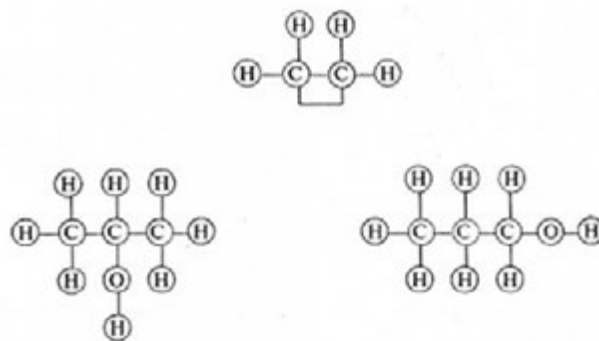


**Figura 2** - Alexander Crum Brown (1838-1922)

Embora o químico escocês Archibald Scott Couper (1831-1892), num artigo de 1858 sobre a formação de cadeias e

anéis em compostos de carbono, tenha recorrido a linhas tracejadas para o mesmo fim, o uso correcto de linhas a cheio para representar ligações químicas é normalmente imputado ao escocês Alexander Crum Brown (1838-1922) (Figura 2), em 1864, e ao alemão Julius Lothar Meyer (1830-1895), que também as usou em algumas das fórmulas que constavam na primeira edição da sua famosa monografia *Die modernen Theorien der Chemie*, publicada no mesmo ano [3].

Ao contrário de Meyer, Crum Brown, nas suas fórmulas, rodeou os símbolos químicos de círculos (Figura 3).



**Figura 3** – Exemplos da simbologia “ball and stick” de Crum Brown (1864) [3]

Esta prática foi repetida por Edward Frankland (1825-1899) no seu manual de 1866 *Lecture Notes for Chemical Students*, que acabaria por desempenhar um papel crucial na popularização da simbologia química de Crum Brown. No final da década, o círculo tinha, todavia, sido eliminado por ser considerado desnecessário, começando assim as fórmulas estruturais a aparecer finalmente na forma que hoje conhecemos. Frankland é igualmente reconhecido como um precursor da disseminação do termo “ligação química” [3].

### REFERÊNCIAS

- [1] J.R. Partington, *Annals of Science* **4** (1939) 245-282
- [2] M.I. Grossman, *Notes Rec. R. Soc.* **64** (2010) 417-434
- [3] W.B. Jensen, *J. Chem. Educ.* **86** (2009) 791

João Paulo André  
(jandre@quimica.uminho.pt)

## Sociedade Portuguesa de Química

Ⓢ SOCIEDADE Ⓢ PRÉMIOS Ⓢ BOLETIM Ⓢ OLIMPIADAS Ⓢ CONGRESSOS Ⓢ NOTÍCIAS Ⓢ REVISTAS EUROPEIAS Ⓢ CONTATOS

visite-nos  
www.spq.pt

