



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS**

**Cristiane Miranda Furtado**

**EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO COM QUITOSANA E GLUTARALDEÍDO PARA  
OBTENÇÃO DE MATERIAIS HÍBRIDOS A PARTIR DO  
 $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$ , VISANDO APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.**

**Campina Grande - PB**

**2013**

**CRISTIANE MIRANDA FURTADO**

**EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO COM QUITOSANA E GLUTARALDEÍDO PARA  
OBTENÇÃO DE MATERIAIS HÍBRIDOS A PARTIR DO  
 $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$ , VISANDO APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

Tese apresentada ao programa de Doutorado em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande-PB, em cumprimento às exigências necessárias para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Processos, na área de Desenvolvimento de Processo.

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa**

**Campina Grande - PB**

**2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

- F992e Furtado, Cristiane Miranda.  
Efeito da funcionalização com quitosana e glutaraldeído para obtenção de materiais híbridos a partir do  $ZnAl_{1,95}(Yb:Er)_{0,05}O_4$  / Cristiane Miranda Furtado. -- 2013.  
108 f. : il. color.
- Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2013.
- "Orientação: Profa. Dra. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa."  
Referências.
1. Aluminato de Zinco. 2. Híbridos Orgânico-inorgânicos.  
3. Lantanídeos. I. Costa, Ana Cristina Figueiredo de Melo.  
II. Título.

CDU 669.712(043)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **CRISTIANE MIRANDA FURTADO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE.

Tese de Doutorado **Aprovada** em 11 de Julho de 2013.



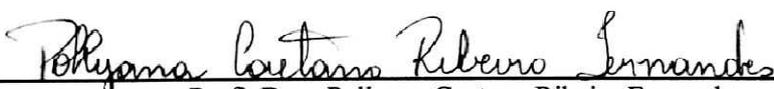
---

Prof. Dra.: Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa  
Orientador – UFCG



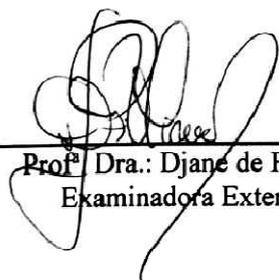
---

Prof. Dr.: Oscar Manoel Loureiro Malta  
Examinador Externo - UFPE



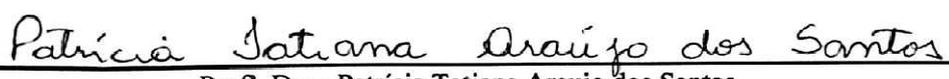
---

Prof. Dra.: Pollyana Caetano Ribeiro Fernandes  
Examinadora Externa – UFPB



---

Prof. Dra.: Djane de Fátima Oliveira  
Examinadora Externa – UEPB



---

Prof. Dra.: Patrícia Tatiana Araujo dos Santos  
Examinadora Externa – UFCG

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa, pela orientação, compreensão e grande apoio, sem os quais este trabalho não se realizaria;

A amiga Patrícia, por todas as ajudas e ensinamentos durante todas as etapas de realização deste trabalho;

Aos amigos do laboratório que ajudaram de alguma forma para realização deste trabalho;

Ao Professor Cid Bartolomeu de Araújo e ao pós-doutorando Whualkuer Bartra pela ajuda nos ensaios de excitação e emissão realizados no Departamento de Física (DF) da UFPE;

A Dra. Elíria Maria de Jesus Agnolon Pallone pela realização das análises de MET.

Ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Materiais – CERTBIO, da Universidade Federal de Campina Grande, especialmente ao prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, pela realização dos testes de citotoxicidade.

Ao programa de pós-graduação em engenharia de processos: coordenadores, professores e colegas por toda atenção e dedicação;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Nanotecnologia para Marcadores integrados (Inct-INAMI) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A CAPES pela bolsa concedida;

A meu filho Isaac e marido Abraão, por todo amor, conforto e estímulo que encontro quando chego em casa;

A meus pais, por toda educação, amor, confiança e incentivo;

Aos meus irmãos, por estarem sempre ao meu lado me apoiando para que continue sempre seguindo em frente na busca de conhecimento;

A todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram e colaboraram para realização deste trabalho sou bastante grata;

E a Deus acima de tudo por mais uma etapa vencida!!!

## LISTA DE PUBLICAÇÕES

**FURTADO, C. M.;** ARAÚJO, P. M. A. G.; SANTOS, P.T. A.; COSTA, A. C. F. M. Synthesis and characterization nanoparticles  $ZnAl_{1.94}(Yb:Er)_{0.06}O_4$  functionalized with chitosan. **Journal Materials Science Forum**, v. 727 – 728, p. 263-268, 2012.

SANTOS, P. T. A.; **FURTADO, C. M.;** RODRIGUES, M. O.; COSTA, A. C. F. M.; FURTADO, C. M. Characterization optical of  $ZnAl_2O_4$  doped with  $Eu^{3+}$  functionalized with chitosan. **Journal Materials Science Forum**, v. 727 – 728, p. 1119-1124, 2012.

**FURTADO, C. M.;** ARAÚJO, P. M. A. G.; SANTOS, P. T. A.; COSTA, A. C. F. M. Synthesis and characterization nanoparticles  $ZnAl_{2-x}(Yb:Er)_xO_4$ . IN: **Eighth International Latin American Conference on Powder Technology - PTECH, Florianópolis – SC, 2011.**

**FURTADO, C. M.;** SANTOS, P.T.A.; SANTOS, P.T. A; TAVARES, M. M.; COSTA, A. C. F. M. Synthesis and characterization of  $Er^{3+}:Yb^{3+}$  doped  $ZnAl_2O_4$ . IN: **IX Brazilian MRS Meeting e IX Encontro da SBPMat**, Ouro Preto – MG, 2010.

SANTOS, P. T. A; **FURTADO, C. M.;** SANTOS, P. T. A; TAVARES, M. M.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Synthesis and characterization of  $Eu^{3+}$ -doped  $ZnAl_2O_4$  nanocrystals via a combustion reaction. IN: **IX Brazilian MRS Meeting e IX Encontro da SBPMat**, Ouro Preto – MG, 2010.

SANTOS, P. T.A.; **FURTADO, C. M.;** TAVARES, M. M.; SANTOS, P. T. A.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Surface modification of spinel  $ZnAl_{1.95}Eu_{0.05}O_4$  using Silane Coupling Agents. IN: **IX Brazilian MRS Meeting e IX Encontro da SBPMat**, Ouro Preto – MG, 2010.

## RESUMO

A utilização de nanopartículas inorgânicas contendo propriedades luminescentes (NPLs) tem recebido uma atenção especial devido a sua utilização para aplicações biológica, tais como marcadores ópticos *in vitro* e *in vivo*, em diagnósticos clínicos e como carreadores de fármacos. No entanto, para tais aplicações biotecnológicas as nanopartículas inorgânicas devem ser funcionalizadas com materiais orgânicos que forneçam grupos de ligações com o meio biológico tornando estas nanopartículas biocompatíveis. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo sintetizar por reação de combustão o  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$ , modificar a superfície com o agente silano 3-amonipropiltrimetoxisilano, e avaliar o efeito da funcionalização destas NPLs com quitosana e glutaraldeído, de forma a se obter um material híbrido que possa ser utilizado em aplicações biotecnológicas, como possíveis marcadores ópticos. As NPLs e o material híbrido foram caracterizados por difração de raio-X, distribuição granulométrica, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, tensão superficial, teste de solubilidade, análise termogravimétrica e análise térmica diferencial, espectroscopia de excitação e de emissão e citotoxicidade. Os resultados morfológicos demonstram que antes e após a funcionalização com quitosana e com glutaraldeído os tamanhos das partícula foram de 12, 13,2 e 12,8 nm, respectivamente. Bandas de absorção abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , característica da estrutura em espinelio e bandas múltiplas em torno de  $1100\text{ cm}^{-1}$  e  $1040\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao alongamento assimétrico Si-O, confirmaram a funcionalização das nanopartículas. Os resultados de luminescência indicam a presença das transições características dos íons  $\text{Yb}^{3+}$  e  $\text{Er}^{3+}$ , com um aumento da luminescência observada quando a amostra foi funcionalizada com a quitosana. Pelo teste de citotoxicidade foi observado que as NPLs não funcionalizadas apresentam uma viabilidade celular de 50%, sendo este valor limitante para que se considere este material como não tóxico, contudo ao utilizar a quitosana como agente funcionalizante esta viabilidade celular aumentou para 72%, confirmando um considerável aumento na biocompatibilidade do material. Para o híbrido funcionalizado com glutaraldeído, observou-se que houve diminuição da viabilidade celular para 48%, tornando este material citotóxico. Dessa forma, para obtenção de um marcador óptico as NPLs funcionalizadas com quitosana são mais promissoras devido a sua característica luminescente mais pronunciada, além de que, não é considerado um material citotóxico, o que pode confirmar uma possível aplicação biotecnológica.

Palavras-Chave: aluminato de zinco, híbridos orgânicos-inorgânicos, lantanídeos.

## ABSTRACT

The use of inorganic nanoparticles containing luminescent properties (NPLs) has received a special attention because of their use for biological applications, such as optical markers *in vitro* and *in vivo*, in clinical diagnostics and as drug carriers. However, for such biotechnological applications inorganic nanoparticles must be functionalized with organic materials that provide groups of connections with the biological environment making these nanoparticles biocompatible. Therefore, this study aimed to synthesize the combustion reaction  $\text{ZnAl}_{1.95}(\text{Yb:Er})_{0.05}\text{O}_4$ , modify the surface with silane agent 3-aminopropyltrimethoxysilane, and to evaluate the functionalization effect of these NPLs with chitosan and glutaraldehyde, in order to obtain a hybrid material that can be used in biotechnological applications as possible optical markers. The NPLs and hybrid materials were characterized by X-ray diffraction, particle size distribution, spectroscopy in infrared zone with Fourier transform, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, surface tension, solubility test, thermogravimetric analysis and differential thermal analysis, excitation and emission spectroscopy and cytotoxicity. Morphology results show that before and after functionalization with chitosan and glutaraldehyde particle sizes were of 12.0, 13.2 and 12.8 nm, respectively. Absorption bands below  $1000\text{ cm}^{-1}$ , characteristic of the spinel structure and multiple bands around  $1100\text{ cm}^{-1}$  and  $1040\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the asymmetric stretching Si-O confirmed the functionalization of the nanoparticles. The luminescence results demonstrate the presence of transitions characteristic of the ions  $\text{Er}^{3+}$  and  $\text{Yb}^{3+}$ , with an increase of luminescence observed when the sample was functionalized with chitosan. By the cytotoxicity test it was observed that the non functionalized NPLs have a cell viability of 50% and this is limiting value to considerate that material as non toxic, but when using chitosan as the functionalizing agent that cell viability increased to 72%, confirming a considerable increase in biocompatibility of the material. For hybrid functionalized with glutaraldehyde, it is observed that there was a decreased cell viability to 48%, which makes this material cytotoxic. Thus, for an optical marker obtaining the NPLs functionalized with chitosan are more promising because of its luminescence characteristic more pronounced, and is not considered a cytotoxic material which can confirm a possible biotechnological application.

**Keywords:** zinc aluminate, organic-inorganic hybrids, lanthanide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Ilustração das inter-relações da nanobiotecnologia e outras tecnologias que contribuem para nanodiagnósticos clínicos.....	05
<b>Figura 2</b> - Estrutura química primária da quitina e da quitosana, onde n é o grau de polimerização.....	12
<b>Figura 3</b> - Estrutura do glutaraldeído.....	15
<b>Figura 4</b> - Reações químicas do glutaraldeído com polímeros da parede celular: ligações cruzadas, formando inicialmente um hemiacetal e em seguida um acetal.....	16
<b>Figura 5</b> - Estrutura do espinélio $ZnAl_2O_4$ .....	19
<b>Figura 6</b> - Bandas de energia para um semicondutor: (a) antes; (b) depois de uma excitação dos elétrons da banda de valência para banda de condução.....	19
<b>Figura 7</b> - Diagrama esquemático dos níveis de energia do sistema de co-dopagem com $Yb^{3+}/Er^{3+}$ .....	23
<b>Figura 8</b> - Imunomarcagem de células HeLa utilizando UCNPs.....	26
<b>Figura 9</b> - Fluxograma de síntese por reação de combustão para a obtenção da amostra AZC.....	35
<b>Figura 10</b> - Representação da medida do ângulo de contato ( $\theta$ ), formado entre a gota e a superfície.....	39
<b>Figura 11</b> - Representação de uma superfície hidrofílica ( $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ), predominantemente hidrofílica ( $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ) e hidrofóbica ( $\theta = 180^\circ$ ).....	40
<b>Figura 12</b> - Placa de cultura de tecidos de 96 poços utilizada para ensaio de citotoxicidade.....	42

<b>Figura 13</b> - Difractogramas de raios X: (a) NPLs de AZC, (b)NPLs de AZC/SiO <sub>2</sub> , (c) NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ) e (d) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ).....	45
<b>Figura 14</b> - Espectro vibracional na região do infravermelho com Transformada de Fourier:(a) NPLs de AZC, (b)NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ) e (c) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ).....	54
<b>Figura 15</b> - Distribuição granulométrica para as NPLs de AZC: (a) histograma e (b) curva de distribuição.....	57
<b>Figura 16</b> - Distribuição granulométrica para as NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ): (a) histograma e (b) curva de distribuição.....	58
<b>Figura 17</b> - Distribuição granulométrica para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ): (a) histograma e (b) curva de distribuição.....	58
<b>Figura 18</b> - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as NPLS de AZC: (a) escala de 20 μm e (b) escala de 5 μm.....	59
<b>Figura 19</b> - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as NPLS funcionalizada com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ): (a) escala de 20 μm e (b) escala de 5 μm.....	60
<b>Figura 20</b> - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as NPLS funcionalizada com glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ): (a) escala de 20 μm e (b) escala de 5 μm.....	60
<b>Figura 21</b> - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para NPLs de AZC: (a) fotomicrografia e (b) padrão de difração (SADPs).....	61
<b>Figura 22</b> - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para NPLs funcionalizadas: (a) AZC <sub>Q</sub> e (b) AZC <sub>G</sub> .....	62
<b>Figura 23</b> - Medida do ângulo de contato: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ) e (c) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ).....	63
<b>Figura 24</b> - Teste de solubilidade das NPLs AZC, AZC <sub>Q</sub> e AZC <sub>G</sub> utilizando água como solvente.....	65

<b>Figura 25</b> - Teste de solubilidade das NPLs AZC, AZC <sub>Q</sub> e AZC <sub>G</sub> utilizando etanol como solvente.....	65
<b>Figura 26</b> - Teste de solubilidade das NPLs AZC, AZC <sub>Q</sub> e AZC <sub>G</sub> utilizando ácido acético como solvente.....	66
<b>Figura 27</b> - Análises termogravimétricas para as nanopartículas obtidas por reação de combustão para as NPLs de AZC: (a) TGA/DrTGA; (b) Curva DTA.....	67
<b>Figura 28</b> - Análises termogravimétricas para as nanopartículas obtidas por reação de combustão para as NPLs funcionalizadas com quitosana AZC <sub>Q</sub> : (a) TGA/DrTGA; (b) Curva DTA.....	69
<b>Figura 29</b> - Análises termogravimétricas para as nanopartículas obtidas por reação de combustão para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído AZC <sub>G</sub> : (a) TGA/DrTGA; (b) Curva DTA.....	71
<b>Figura 30</b> - Espectro de conversão ascendente: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ) e (c) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ).....	74
<b>Figura 31</b> - Dependência da intensidade de emissão verde e vermelha em função da potência: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ) e (c) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ).....	76
<b>Figura 32</b> - Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das NPLS antes da funcionalização (AZC), após funcionalização com a quitosana (AZC <sub>Q</sub> ) e com o glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ) e CONTROLE = controle negativo.....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Materiais utilizados para síntese das NPLs de $ZnAl_{1,95}(Yb:Er)_{0,05}O_4$ e funcionalização.....	31
<b>Tabela 2</b> - Quantidade em gramas dos materiais utilizados na síntese das NPLs de AZC.....	34
<b>Tabela 3</b> – Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para as NPLs de AZC.....	48
<b>Tabela 4</b> – Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para as NPLs de AZC/SiO <sub>2</sub> .....	49
<b>Tabela 5</b> – Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para a amostra AZC <sub>Q</sub> .....	51
<b>Tabela 6</b> - Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para a amostra AZC <sub>G</sub> .....	52
<b>Tabela 7</b> - Tamanho de cristalito referente a fase majoritaria para a família de planos {311} e a cristalinidade das NPLs de AZC antes e após funcionalização com quitosana (AZC <sub>Q</sub> ) e glutaraldeído (AZC <sub>G</sub> ).....	53
<b>Tabela 8</b> - Resultados dos ensaios de tensão superficial realizado para as amostra AZC antes e após a funcionalização.....	64
<b>Tabela 9</b> - Temperatura de decomposição e perda de massa durante a análise termogravimétrica para as amostras antes e após a funcionalização com quitosana e glutaraldeído.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - Estrutura do tipo espinélio normal
- Ac - Anticorpo
- Ag – Antígeno
- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido de alumínio
- APTS - Agente silano 3-aminopropiltrimetoxisilano
- ARPE-19 - Células epiteliais da retina humana
- AZC – Espinélio ZnAl<sub>1,95</sub>(Yb:Er)<sub>0,05</sub>O<sub>4</sub>
- AZC<sub>Q</sub> - ZnAl<sub>1,95</sub>(Yb:Er)<sub>0,05</sub>O<sub>4</sub> modificado a superfície com o agente silano 3-aminopropiltrimetoxisilano e funcionalizado com quitosana
- AZC<sub>G</sub> - ZnAl<sub>1,95</sub>(Yb:Er)<sub>0,05</sub>O<sub>4</sub> modificado a superfície com o agente silano 3-aminopropiltrimetoxisilano e funcionalizado com glutaraldeído
- Anti-BSA – Anticorpo para albumina do soro bovino
- B16F10 – Células de melanomas de ratos
- CFC - Cúbica de face centrada
- C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> – Fórmula molecular do glutaraldeído
- DG – Distribuição granulométrica
- DRX - Difração de raios X
- EDX - Espectroscopia de fluorescência de raios X
- FAB – Fragmento de ligação ao antígeno
- FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier
- GlcNAc - 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose
- GlcN - 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose
- Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido de *gadolínio*
- HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MET - Microscopia eletrônica de transmissão
- NPLs – Nanopartículas luminescentes
- PDMS - polissilicona
- PbTiO<sub>3</sub> - Titanato de chumbo
- PMAA - *Poli(ácido metacrílico)*
- QDs - Pontos quânticos

TEOS - tetraetilortosilicato

*TiO<sub>2</sub> - Dióxido de titânio*

UAEMa – Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais

UV - Ultra-violeta

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – Aluminato de zinco

ZnO – Óxido de zinco

kDa- quilo Dalton

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>03</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	
<b>2.1 Nanobiotecnologia.....</b>	<b>04</b>
<b>2.2 Materiais Híbridos Orgânicos e Inorgânicos.....</b>	<b>06</b>
2.2.1 Funcionalização.....	08
<b>2.3 Quitosana.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Glutaraldeído.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Nanopartículas de <math>ZnAl_{1,95}(Yb:Er)_{0,05}O_4</math> (NPLs).....</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Sistemas <i>Upconversion</i> para obtenção de marcadores biológicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7 Reação de Combustão.....</b>	<b>27</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Síntese das NPLs.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Funcionalização das NPLs.....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Funcionalização das NPLs/SiO <sub>2</sub> com Quitosana(QT).....	36
3.3.2 Funcionalização das NPLs/SiO <sub>2</sub> com Glutaraldeído (GT).....	36
<b>3.4 Caracterização.....</b>	<b>37</b>
3.4.1 Difração de Raios X (DRX) .....	37
3.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	38
3.4.3. Distribuição Granulométrica.....	38

3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
3.4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	38
3.4.6 Tensão Superficial.....	39
3.4.7 Teste de Solubilidade.....	40
3.4.8 Análise Termogravimétrica.....	41
3.4.9 Espectroscopia de Excitação e de Emissão.....	41
<b>3.5 Avaliação da Viabilidade Celular pelo MTT.....</b>	<b>41</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
<b>4.1 Difração de Raio X.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 Distribuição Granulométrica.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>59</b>
<b>4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....</b>	<b>60</b>
<b>4.6 Tensão Superficial.....</b>	<b>62</b>
<b>4.7 Teste de solubilidade.....</b>	<b>64</b>
<b>4.8 Análise Termogravimétrica.....</b>	<b>67</b>
<b>4.9 Espectroscopia de Excitação e Emissão.....</b>	<b>73</b>
<b>4.10 Avaliação da Viabilidade Celular pelo MTT.....</b>	<b>78</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de técnicas para detecção de imagens com utilização de marcadores fluorescentes tem sido um importante e desafiador estudo para aplicações biológicas “*in vitro*” e “*in vivo*”. Deste modo, na última década estudos têm sido dedicados para o desenvolvimento de nanopartículas inorgânicas luminescentes com o intuito de substituir os corantes orgânicos normalmente usados na marcação de materiais biológicos devido a necessidade de uma detecção biomolecular ultra-sensível.

Esta substituição dos corantes orgânicos está baseada em algumas de suas limitações, e o uso de nanopartículas luminescentes possibilita melhorias que ultrapassem estas limitações para que haja, por exemplo, uma maior amplificação de sinal e uma valorização na fotoestabilidade, fatores estes que são essenciais para o aumento da eficiência dos marcadores biológicos (KODAIRA *et al.*, 2007).

Dentre as nanopartículas inorgânicas com características luminescentes (NPLs) que apresentam fotoestabilidade e rendimento quântico elevado, as mais estudadas são as nanopartículas de sílica, os pontos quânticos (QD), os metais nobres e os óxidos lantanídeos (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2012). Destas NPLs, as dopadas com íons lantanídeos se destacam por proporcionar vantagens quando comparados a métodos mais convencionais para aplicação biomédica, tais como: (1) maior profundidade de penetração nos tecidos sobre excitação NIR (NIR = *Near Infra Red* = radiação infravermelha próxima) (CHATTERJEE, RUFAlHAH e ZHANG, 2008); (2) diminui o fotodano para amostras biológicas em virtude da baixa energia de excitação de NIR (JIANG e ZHANG, 2010); (3) alta resolução espacial durante a bioimagem (SUDHAGAR *et al.*, 2011); (4) baixa citotóxica para uma ampla variedade de linhas de células (PARK *et al.*, 2009).

Dentre os íons lantanídeos mais estudados para serem utilizados como possíveis marcadores luminescentes destacam-se o európio (Eu<sup>3+</sup>) e térbio (Tb<sup>3+</sup>), materiais capazes de emitir radiação no visível quando excitados por radiação ultravioleta, e os íons érbio (Er<sup>3+</sup>), itérbio (Yb<sup>3+</sup>) e túlio (Tm<sup>3+</sup>), através de excitação na região do infravermelho por mecanismos de conversão ascendente de energia. As matrizes mais utilizadas para incorporar os íons lantanídeos, são Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, TiO<sub>2</sub>, PbTiO<sub>3</sub>, YVO<sub>4</sub>, sílica e ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Entre estas, o aluminato de zinco (ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) é bastante atraente como rede hospedeira para íons capazes de gerar luminescência,

tais como íons de metais de transições e íons de terras raras, devido a sua alta estabilidade térmica, transparência na região do visível (VRANKIĆ *et al.*, 2012), ser um semicondutor com *gap* de energia largo em torno de 3,8 eV, apresentando transparência para a luz com comprimento de onda superior a 320 nm. Estas características, o torna um material promissor para utilização como hospedeiro em aplicações ópticas (SILVA, 2006). O  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  codopado com íons itérbios e érbios, por exemplo, resulta em um material com características ópticas promissoras para obtenção de materiais híbridos para aplicações biotecnológicas.

Para se obter um material híbrido, estes materiais luminescentes precisam minimamente apresentar grupos funcionais na superfície das nanopartículas de modo a ter interação com as biomoléculas. Para isto, se faz necessário a modificação da superfície ou simplesmente funcionalização das nanopartículas, com o auxílio de um agente de acoplamento que pode ser, por exemplo, um silano, tornando o material compatível às moléculas biológicas, e assim, poder ser utilizado em processos de bioimobilização. Nessa direção, a incorporação de íons lantanídeos em uma matriz inorgânica, combina características óptico dos lantanídeos com as propriedades dos óxidos inorgânico, que ao serem funcionalizadas resultam em materiais híbridos orgânico-inorgânicos.

Como material orgânico que podem ser utilizados para funcionalização de nanopartículas luminescentes (NPLs), algumas moléculas poliméricas se destacam, como pode-se citar o poli(álcool vinílico) (PVAL), dextran, metilmetracrilato, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose, glutaraldeído e quitosana. Dentre estas, a quitosana e o glutaraldeído são promissores, visto estas moléculas apresentarem sítios reativos adequados para modificações químicas da superfície, o que permite a interação com biomoléculas, podendo resultar em aplicações biotecnológicas, biomédicas ou farmacêuticas (BAÑULS *et al.*, 2010; XIA *et al.*, 2011).

Diante deste contexto, esta tese tem como desafio, investigar as propriedades óticas das nanopartículas de  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  e sua funcionalização com glutaraldeído e quitosana, com o intuito de obter um híbrido orgânico – inorgânico com características promissoras para aplicações como marcadores biológicos.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um material híbrido inorgânico e orgânico a partir de nanopartículas de  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  (NPLs), funcionalizadas com glutaraldeído e com quitosana, visando obter um material com características luminescentes de forma que possa ser utilizado em aplicações biotecnológicas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar as nanopartículas de  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  por reação de combustão, visando a obtenção de material luminescente;
- Avaliar o efeito da funcionalização das nanopartículas de  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  utilizando a quitosana e o glutaraldeído na obtenção de um material híbrido;
- Caracterizar estruturalmente as nanopartículas, e os materiais híbridos obtidos por difração de raios X (DRX), espectrometria vibracional de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a afinidade a um meio aquoso para as nanopartículas e os materiais híbridos obtidos mediante a análise de tensão superficial por determinação do ângulo de molhamento.
- Testar a solubilidade das nanopartículas e dos materiais híbridos em diferentes solventes;
- Caracterizar termicamente as nanopartículas e os materiais híbridos obtidos, por termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA).
- Avaliar a luminescência das nanopartículas e os materiais híbridos obtidos mediante técnicas emissão e excitação;
- Realizar testes de citotoxicidade do marcador luminescente em células.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Nanobiotecnologia

Na última década, a capacidade dos cientistas de manipular materiais em nível atômico e molecular utilizando nanotecnologia passou de ficção científica para um fato científico. Esta nanotecnologia pode ser utilizada para a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas mediante o controle da matéria na escala de nanômetro de comprimento, utilizando-se de nanopartículas (MORRIS, 2009).

Estas partículas em nanoescalas ou nanopartículas são geralmente definidos como estruturas entre 1 nm e 100 nm de diâmetro (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2012). Em geral são de grande relevância e apresentam propriedades determinadas pelo tamanho e pela morfologia, obtendo uma correlação adequada em suas propriedades físico-químicas (SOUZA FILHO e FAGAN, 2007).

A nanobiotecnologia é a aplicação das nanopartículas, na área de biotecnologia. Desta forma nanotecnologia fornece as condições necessárias, as plataformas da tecnologia para a investigação e as transformações de sistemas biológicos, enquanto a biologia oferece modelos de inspiração e componentes biossintetizados à nanotecnologia (JAIN, 2011).

De acordo com Roco (2003), a nanobiotecnologia é definida como um campo que aplica os princípios e as técnicas de nanoescalas para compreender e transformar biossistemas, e que usa princípios e materiais biológicos para criar novos dispositivos com sistemas integrados em nanoescalas. Desse modo, pesquisas têm demonstrado a possibilidade da utilização dos conhecimentos da química e informações biológicas para diagnósticos clínicos (JAIN, 2007). As Inter-relações da nanotecnologia, o diagnóstico molecular e seu papel na nanomedicina, bem como a medicina personalizada são ilustradas esquematicamente na Figura 1. A biotecnologia tem se desenvolvido extensivamente e levou a um aumento significativo no número de produtos obtidos na área de bioengenharia (YALÇIN e ÇAVUŞOĞLU, 2008).



características de materiais orgânicos e inorgânicos dá-se o nome de materiais híbridos. Embora o estudo destes híbridos seja consideravelmente novo, se pode constatar que estes materiais apresentam inúmeras aplicabilidades, tais como: catálise (BORDOLOI *et al.*, 2008), aplicações ópticas (ZELAZOWSKA *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2010), revestimento (GRAZIOLA *et al.*, 2012), aplicações biomédicas (HSIAO *et al.*, 2012), e preparação de membranas (SINGH *et al.*, 2012).

Para as possíveis aplicações na área biomédica, que é o foco deste trabalho de pesquisa, podem ser destacados: diagnóstico, terapêutica, biologia molecular e bioengenharia (SOUZA *et al.*, 2011). Desta forma, estes materiais híbridos desempenham avanços médicos inovadores para a descoberta de genes e entrega de drogas. Além de que, dentre os grandes avanços desempenhados por estes novos materiais estão inclusos a descoberta de biomarcadores (SEKHON e KAMBOJ, 2010).

## **2.2 Materiais Híbrido Orgânico e Inorgânico**

Tecnologias mais recentes requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais, cujas aplicações atendam a uma crescente demanda e as necessidades tecnológicas. Os materiais híbridos combinam características vantajosas de diferentes materiais em um único material que apresentará propriedades mais interessantes do que as propriedades individuais de cada um.

Com relação à composição destes materiais híbridos, é sempre constituído por componentes inorgânicos e orgânicos, o que permite designá-los como materiais híbridos orgânico-inorgânico. Os materiais híbridos orgânicos-inorgânicos são materiais muito versáteis que combinam a estabilidade química e térmica dos materiais inorgânicos com as propriedades mecânicas e ópticas dos polímeros orgânicos, dando origem a um único material com propriedades diferenciadas daquelas que lhe deram origem.

José e Prado (2005) classificam os materiais híbridos orgânicos e inorgânicos de acordo com o tipo de ligações que os unem como:

- Híbridos de classe I – materiais unidos por ligações químicas fracas como forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio ou forças eletrostáticas;

- Híbridos de classe II - materiais unidos por ligações fortes, sendo estas ligações covalentes ou iônicas;
- Híbridos de classe III – possuem interações descritas pelas classes I e II.

Os híbridos classificados como de classe I corresponde aos sistemas onde as moléculas orgânicas, oligômeros, ou polímeros de baixo peso molecular são simplesmente incorporados em uma matriz inorgânica, ou seja, apresentam ligações físicas entre as fases (SCHOTTNER, 2001).

De acordo com José e Prado (2005), estes materiais híbridos de classe I podem ser obtidos de diferentes formas: 1) componentes orgânicos como corantes e catalisadores podem ser imobilizados numa rede inorgânica, basicamente pela mistura homogênea destas moléculas, em solução, com precursores inorgânicos da rede, em um solvente comum; 2) monômeros orgânicos podem ser embebidos nos poros de uma matriz inorgânica e, então, polimerizados, em processos iniciados por radiação UV, por aquecimento ou por iniciadores de polimerização; 3) pela formação simultânea de duas redes independentes, a partir de precursores orgânicos e inorgânicos, adequadamente funcionalizados, sem ligação química entre as fases.

Para os híbridos de classe II, os componentes orgânicos e inorgânicos são ligados por meio de ligações covalentes ou iônicas-covalente. Esses materiais podem ser sintetizados pela incorporação de polímeros orgânicos a redes de sílica gerada *in situ*, utilizando o processo sol-gel (CHENG *et al.*, 2009). Materiais preparados a partir do tetraetoxissilano (TEOS) e do poli(dimetilsiloxano) (ZARRAGA *et al.*, 2010), polissilicona (PDMS) (ZHOU *et al.*, 2010), enquadram-se nesta classificação.

Os híbridos de classe III que consistem basicamente em fusão da classe I com os híbridos de classe II, reunindo as propriedades de adesão de uma com a rede inorgânica-orgânica fornecida pela outra (SCHOTTNER, 2001). Um exemplo deste híbrido é o material obtido por um polímero orgânico contendo grupos alcoxissilanos,  $(\text{SiOR})_3$ , hidrolisáveis, e grupos aceptores de hidrogênio (carbonila, amina, e imida) (JOSÉ e PRADO 2005).

Este trabalho de pesquisa objetivou sintetizar um híbrido de classe II, e uma importante forma de obtenção deste material é por modificação da superfície com materiais orgânicos, em um processo chamado de funcionalização do material. Esta modificação da superfície favorece o ajuste de propriedades de interesse, como por

exemplo, a hidrofobicidade, hidrofiliçidade e a interaçãõ entre materiais a um determinado hospedeiro (matriz), reduzir toxicidade dos materiais, servir como ponto de conjugaçãõ biolõgica entre as nanopartículas e uma biomolécua (BORDOLOI *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Funcionalizaçãõ

A funcionalizaçãõ é um método de modificaçãõ da superfície de nanopartículas, mediante uma ligaçãõ química entre as nanopartículas e um meio orgânico, de forma a ajustar as propriedades globais destas nanopartículas para se adequar a uma aplicaçãõ específica. De acordo com Dios e García (2012) a modificaçãõ da superfície das nanopartículas por moléculas/ partículas/ polímeros, tem diferentes objetivos:

- (a) fornecer grupos funcionais na superfície das nanopartículas para posterior utilizaçãõ biolõgica;
- (b) aumentar a solubilidade das nanopartículas em vários solventes para ampliar a capacidade de sua aplicaçãõ;
- (c) poder modificar as camadas de nivelamento eletrônico, óptica, espectroscopia e as propriedades químicas das nanopartículas, fornecendo uma nanoferramenta controlável;
- (d) melhorar o desempenho mecânico e químico da superfície das nanopartículas, por exemplo, proteçãõ contra oxidaçãõ;
- (e) reduzir a toxicidade das nanopartículas.

O uso sistemático da bioimobilizaçãõ utilizando superfície organofuncionalizadas tem despertado o interesse em diversas áreas da biomedicina, pois permite desenvolver novos materiais que aumentem a eficiênciã e rapidez nos sistemas de detecçãõ.

Desta forma, sistemas com propriedades luminescentes para possíveis aplicações como marcadores ópticos, a funcionalizaçãõ é importante, pois permite a manutençãõ da fotoestabilidade elevada, alta luminescênciã, biocompatibilidade e principalmente baixa toxicidade (YAO e TONG, 2012).

A baixa toxicidade garante que estas nanopartículas luminescentes funcionalizadas nãõ tenham qualquer efeito sobre o sistema imunolõgico e pode executar a sua funçãõ pretendida, sem provocar quaisquer efeitos secundários

locais ou sistêmicos em células, tecidos ou organismos inteiros, tanto no curto quanto no longo tempo de utilização. A modificação de superfície de nanopartículas inorgânicas é crucial para torná-las adequadas para o uso futuro em bioensaios (GNACH e BEDNARKIEWICZ, 2012), propiciando condições adequadas para marcações em materiais biológicos, que permite monitoramento por meio da luminescência das nanopartículas (CHAVES, 2006).

A funcionalização melhora a interação entre superfícies das nanopartículas inorgânicas e biomoléculas, tendo por resultado formação de ligações estáveis, como ligações covalentes. Os grupos funcionais comuns incluem carboxila (-COOH), tióis (-SH) ou aminas (-NH<sub>2</sub>). Os grupos carboxila e amina são especialmente úteis porque é parte integrante de todos os aminoácidos que fazem parte da estrutura dos peptídeos. As aminas são muito versáteis em unir biomoléculas, pois podem reagir com um grupo carboxila (ARROYO-HERNÁNDEZ, PÉREZ-RIGUEIRO e MARTÍNEZ-DUART, 2006).

Moléculas orgânicas poliméricas ou não poliméricas, têm sido utilizados como agentes funcionalizantes, e como exemplos podem ser citados o ácido mercaptoacético, proteínas como imunoglobulinas (CHAVES, 2006), albumina (FU *et al.*, 2002), um derivado do polissacarídeo quitina, a quitosana (KHAN e DHAYAL, 2008), um dialdeído como o glutaraldeído (YANG *et al.*, 2004; HELALI, 2008). Estas moléculas têm sido utilizadas para funcionalizar materiais inorgânicos com uma propriedade específica desejável a uma determinada aplicação tecnológica, como por exemplo, materiais luminescentes, que apresentam propriedades ópticas.

Dentre as moléculas orgânicas, a quitosana que é uma molécula polimérica, e o glutaraldeído que é uma molécula não polimérica pequena contendo apenas 5 átomos de carbono, têm indicado serem materiais eficientes na funcionalização de nanopartículas.

Shirosaki *et al.*, (2009), apresentaram em seu trabalho sobre regeneração do tecido ósseo, que ao utilizar híbridos de sílica funcionalizados com quitosana houve estímulo para proliferação e diferenciação de osteoblastos cultivados na superfície de híbridos, o que auxiliou na regeneração do tecido. Estes resultados demonstram a biocompatibilidade da quitosana com o meio biológico.

Hsiao *et al.*, (2012), desenvolveram um nano-híbrido anfipático utilizando carboximetil-hexanoilo com quitosana e por modificação química da superfície hidrofílica contendo COOH, com o agente silano 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES)

como um agente de acoplamento para obtenção de nanocapsulas em um ambiente aquoso. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que o material obtido é estável e com boa citocompatibilidade, indicando que este material apresenta um potencial para funcionar como um carreador de fármaco.

Li *et al.*,(2008a), imobilizaram a enzima álcool desidrogenase (YADH, EC1.1.1.1) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> funcionalizadas com a quitosana, e observaram que o YADH imobilizado tinha uma boa durabilidade e estabilidade térmica e que este pode ser facilmente isolados das nanopartículas por separação magnética.

Nanopartículas magnéticas também tem sido funcionalizadas com o glutaraldeído para imobilização enzimática. Sulek *et al.*, (2010), conseguiram imobilizar a enzima colesterol oxidase ao utilizar nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> funcionalizada com o glutaraldeído. Os autores sugeriram que a imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas modificadas quimicamente através funcionalização com glutaraldeído é um método promissor para o desenvolvimento de componentes biosensoriamento em biomedicina.

Segundo Yang *et al.*,(2004) a funcionalização de nanopartículas de sílica fluorescente com glutaraldeído em testes imunológicos permitiu a imobilização do anticorpo (Ag) da hepatite B, o HBsAg, sem influenciar na luminosidade do material, e desta forma tem mostrado que este material não é tóxico e que apresenta uma boa compatibilidade com o meio biológico.

Os resultados descritos na literatura demonstram a grande potencialidade que a quitosana e o glutaraldeído apresentam como materiais para funcionalização de nanopartículas inorgânicas visando a obtenção de materiais híbridos.

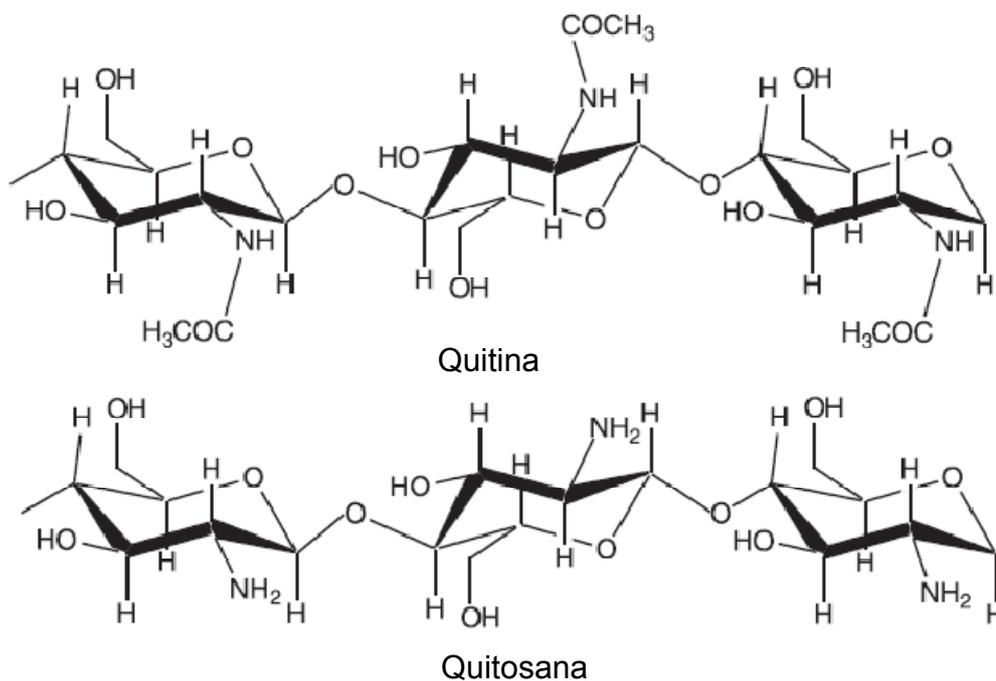
### 2.3 Quitosana

A quitosana é o principal derivado da quitina, que é o segundo biopolímero natural mais abundante na face da terra, ficando atrás somente da celulose. Este precursor da quitosana é componente do exoesqueleto alguns invertebrados como, insetos, crustáceos e moluscos e das paredes celulares de alguns fungos e algas (SERVICE, 2000).

A quitina é um homopolissacarídeo formado pela união de unidades repetidas de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose (GlcNAc) mediante ligação glicosídica

$\beta(1 \rightarrow 4)$ . A quitosana, derivada da desacetilação da quitina é um heteropolissacarídeo, e corresponde a um copolímero constituído de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) também unidas por ligação glicosídica  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , com um teor de GlcN superior a 50% (SAJOMSANG, 2010). A diferença estrutural dos monômeros que compreendem a quitina e a quitosana podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química primária da quitina e da quitosana.



Fonte: JAYAKUMAR *et al.*, 2011

Por ser um polímero muito cristalino, e conseqüentemente insolúvel na maioria dos solventes orgânicos e meios aquosos, a quitina possui aplicações limitadas. Por outro lado, o copolímero quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos tais como ácido acético, clorídrico, fórmico, succínico e ácido láctico e com pH abaixo de 6,5 (SAJOMSANG *et al.*, 2010). A alta hidrofiliabilidade da quitosana, devida ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permite sua utilização como biomaterial em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens, géis injetáveis, membranas periodontais (TONHI e PEPLIS, 2002).

O termo quitosana compreende um grande grupo de polímeros, que diferem em seu grau de desacetilação (40-98%) e peso molecular (50-2000 kDa) (CASETTARI *et al.*, 2011). O parâmetro mais importante para o comportamento químico da quitosana, suas aplicações e características é o grau de desacetilação. No entanto, o peso molecular e a distribuição média dos grupos acetil ao longo da cadeia também são importantes (RINAUDO e DOMARD, 1989). Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, ácido sulfúrico e epícloridrina, são usados para aumentar a sua estabilidade química e a resistência mecânica (CUI *et al.*, 2008).

A quitosana contém três tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amino/acetamido, bem como grupos hidroxilas primário e secundário nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente (XIA *et al.*, 2011). O grupamento amino é a principal razão para as diferenças estruturais e propriedades físico-químicas da quitosana, bem como são correlacionados com suas funções biológicas (XIA, 2003).

A literatura reporta um número significativo de trabalhos com a quitosana, bem como seu potencial uso em inúmeras aplicações industriais ou biomédicas (DASH *et al.*, 2011, JAYAKUMAR *et al.*, 2010a;. MURAKAMI *et al.*, 2010). Este grande número de aplicações ocorre principalmente, por a quitosana ser um biomaterial que apresenta compatibilidade com organismos vivos, ser economicamente viável, e por ser obtida de materiais abundantes na natureza, por exemplo, crustáceos como caranguejo, camarão e lagosta (XIA *et al.*, 2011).

Estudo de materiais orgânico-inorgânico a base de quitosana é atualmente um objeto de pesquisa importante para integrar diversas funções em um nanomaterial para aplicações avançadas. Seria altamente desejável tirar vantagem da biocompatibilidade de polímeros naturais, como por exemplo, quitosana ou seus derivados análogos, e combinar isso com as funções originais do componente inorgânico (HSIAO *et al.*, 2012).

A quitosana pode ser facilmente utilizada para várias aplicações, como: na síntese de hidrogéis (WU *et al.*, 2010), filmes (SPIRKA *et al.*, 2012; LEI *et al.*, 2011), membranas (MELLO *et al.*, 2006;. LOPES *et al.*, 2010), nanofibras (WANG e ZHAO, 2012; JAYAKUMAR *et al.*, 2010b), micro/nanopartículas (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; NAFEE *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012), esponjas (LIN *et al.*, 2009; GU *et al.*, 2010), para vários tipos de aplicações.

Na área biomédica, a quitosana está sendo cada vez mais estudada para diferentes aplicações por ser biodegradável, biocompatível e bioativa, não antigênico, habilidade de formar filme e alta permeabilidade em água. Em conjunto com suas interações específicas com componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, tem levado ao aumento de sua utilização em engenharia de tecidos, como no reparo da pele, osso e cartilagens (DRURY e MOONEY, 2003). Biomateriais baseados em quitosana passaram por diversos testes clínicos e não demonstram qualquer inflamação ou reação alérgica aplicadas de forma tópica ou por injeção no corpo humano (KHOR e LIM, 2003).

A quitosana pode servir também como uma matriz para o crescimento de tecidos, fornecendo potencialidade para as células dos tecidos em reconstrução sofrerem proliferação. Chatelet *et al.*, (2001) em seus estudos demonstraram que a proliferação de queratinócitos sobre membranas de quitosana está relacionado com o grau de acetilação das mesmas, sendo favorecido a multiplicação destas células de tecido epitelial em membranas contendo quitosana menos acetilada. Já os estudos realizados por Howling *et al.*, (2001), demonstraram que há favorecimento para o crescimento de fibroblastos, que são células de tecido conjuntivo, em meio de cultura contendo quitosana com grau de acetilação de 15%. Assim sendo, a quitosana possui propriedades em cura de feridas por favorecer a regeneração de tecidos.

Hsiao *et al.*, (2012), desenvolveu uma macromolécula híbrida a base de quitosana e moléculas de 3-aminopropiltrióxilano (APTS), e em suas análises os autores sugeriram a utilização potencial dos híbrido sem aplicações biomédicas, especialmente como veículos de entrega de drogas, pois este híbrido apresentou citocompatibilidade excelente em testes com células epiteliais da retina humana (ARPE-19).

Wu *et al.*, (2010) prepararam nanogéis híbridos utilizando quitosana, Poli(ácido metacrílico) (PMAA) e pontos quânticos (QDs) CdSe, e observaram que ocorreu uma reticulação covalente no material, o que lhe garantiu estabilidade e uma baixa citotoxicidade quando testados em células de melanomas (B16F10) de ratos. Desta forma, os autores sugeriram uma aplicação dos nanogéis híbridos, tanto para biossensoriamento, bioimagens, carreamento de fármacos, como para o monitoramento nas respostas ao tratamento utilizando fármacos para patologias específicas.

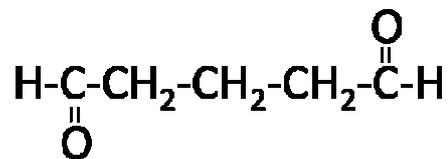
Este biopolímero também foi reportado como uma biomolécula que apresenta grande potencial como um sistema de carreador de drogas injetável termosensível para ser administrado em células cancerígenas (HAN *et al.*, 2008). Segundo Olson *et al.*, (2003), o hidrogel de quitosana pode reduzir a imunotoxicidade das drogas aplicados no tratamento da doença e, podendo ser o melhor sistema de carreador, para os agentes quimioterapêuticos e quimioimunoterapia no tratamento de tumores.

## 2.4 Glutaraldeído

O glutaraldeído é uma molécula orgânica biocompatível, hidrofílica, passível de biodegradação rápida que o faz muito atrativo para aplicações em medicina e farmácia. É um material de custo relativamente baixo e facilmente encontrado no mercado (YANG *et al.*, 2004).

Esta molécula é relativamente pequena e apresenta dois grupamentos aldeído funcional separado por uma cadeia contendo três pontes de metileno (-CH<sub>2</sub>-), cuja fórmula molecular é C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (Figura 3) (KIERNAN, 2000). Apresenta-se na forma de líquido incolor ou amarelo pálido viscoso, usualmente encontrado em solução aquosa a 50%. Os produtos denominados: 1,5-pentanodial; 1,3-diformylpropane; glutaral; dialdeído glutárico são alguns sinônimos do glutaraldeído (GLUTARALDEÍDO, 2012).

Figura 3 - Estrutura do glutaraldeído.



Fonte: Própria, 2013

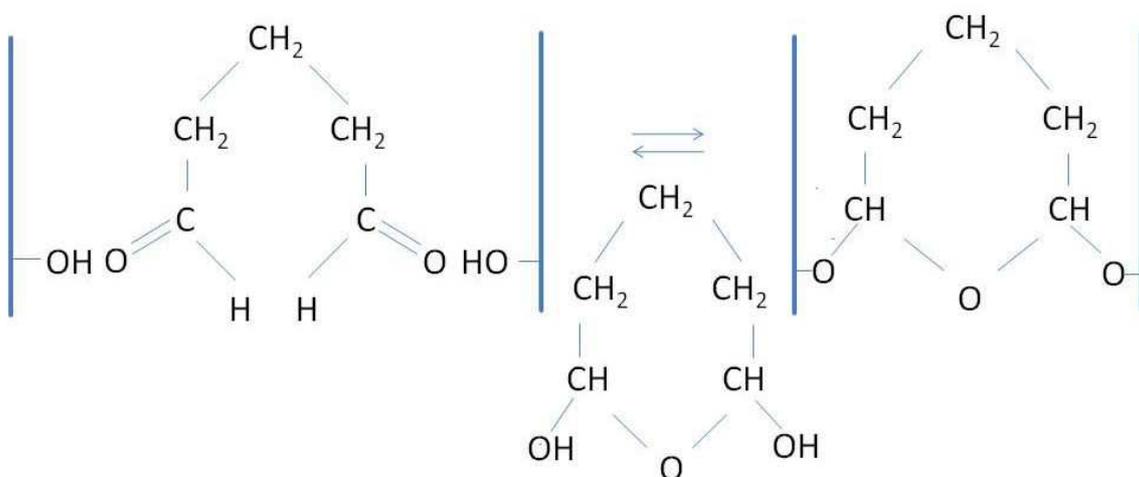
Os seus grupamentos aldeído podem se ligar a amins primárias presentes nas biomoléculas (proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, etc.). Reações entre aldeídos podem gerar as bases de Schiff (R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>C=N-R<sub>3</sub>, onde R<sub>3</sub> é um grupo aril ou alquil) que, após redução, resulta em amins secundárias estáveis (CHAVES, 2006). Esta interação com proteínas e enzimas se dá pelo fato de que na cadeia lateral de aminoácidos como a lisina está presente um grupamento amina, permitindo que se

formem ligações estáveis com o glutaraldeído, e este aminoácido está presente na estrutura de diferentes enzimas e proteínas (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

A albumina e o colágeno são proteínas que realizam a formação de ligação covalente com o glutaraldeído. Moléculas de mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos como a heparina sulfato, que contém grupamentos carboxila em sua estrutura, são relatadas como moléculas que formam ligações estáveis com o glutaraldeído (THORSLUND *et al.*, 2005). Esta ligação com proteínas e polissacarídeos permite controle na aplicação de drogas e imobilização enzimática (YALÇIN e ÇAVUŞOĞLU, 2008; SILVA *et al.*, 2004).

A utilização do glutaraldeído na interação com as biomoléculas possibilitam a formação de ligações covalentes cruzadas muito estáveis e irreversíveis, permitindo ao material resistir a oscilações no pH e temperatura numa faixa ampla de valores (GONDIM e SILVA, 2005). Estas ligações cruzadas podem acontecer mediante interação dos grupos aldeído do glutaraldeído com grupos hidroxilas de polímeros presentes na membrana celular. Os seus grupamentos aldeído podem reagir com um grupamento hidroxila e formar um hemiacetal e com um segundo para produzir um acetal (Figura 4), na presença de um catalisador e aquecimento (XIAO *et al.*, 2010).

Figura 4 - Reações químicas do glutaraldeído com polímeros da parede celular: ligações cruzadas, formando inicialmente um hemiacetal e em seguida um acetal.



Fonte: Adaptada de JAYAKRISHNAN e JAMEELA, 1996.

Desta forma, as propriedades do glutaraldeído podem ser combinadas na produção de híbridos inorgânico-biológicos para estudos de sistemas biológicos. Sabendo-se da capacidade de conjugação do glutaraldeído a proteínas e outras estruturas que possuam grupamentos amino, o glutaraldeído pode ser então utilizado como agente funcionalizante inespecífico, permitindo a ligação de nanopartículas, por exemplo, a qualquer estrutura protéica; ou como agente intercalante entre as nanopartículas e biomoléculas capazes de se ligar especificamente a certas estruturas biológicas (MENEZES, 2006). Com isso, a molécula de glutaraldeído tem se apresentado eficiente na funcionalização de nanopartículas de sílica em testes de imunológicos e como biosensores (BÑNULS *et al.*, 2010).

Helali *et al.*, (2008) construíram um biosensor impedimétrico, com base eléctrodos de nióbio, para a detecção de atrazina. Para isto, os autores funcionalizaram óxido de nióbio utilizando o agente silano  $\gamma$ -aminopropiltrimetoxilano (APTES) e glutaraldeído como um agente de reticulação, imobilizando de forma covalente o fragmento de ligação ao antígeno (Ag) (FAB) do anticorpo K47 sobre a superfície dos eléctrodos, onde desta forma obtiveram uma interação entre antígeno-anticorpo, permitindo a detecção da atrazina.

Bañuls *et al.*, (2010) utilizaram o glutaraldeído para modificar a superfície de nanoestruturas a base de nitrato de silício e óxido de silício para aplicação como biosensores, e obtiveram uma interação adequada do material funcionalizado com o anticorpo anti-BSA (Albumina de Soro Bovino) e uma maior seletividade ao utilizar o glutaraldeído, obtendo bons resultados de sensibilidade e demonstrando que este material é realmente adequado para aplicações nanofotônicas.

Zhu e Sun (2012), prepararam membranas a base de nanofibras de álcool polivinílico co-etileno (PVA-co-PE) e funcionalizaram com glutaraldeído com o objetivo de imobilizar enzimas lipases para que este híbrido fosse utilizado em aplicações de biocatálise. Estes autores observaram que houve interação entre os grupamentos aldeído do glutaraldeído através de ligações covalentes com as moléculas de lipases isoladas de *Cândida rugosa*, confirmando o sucesso da imobilização das enzimas sobre a superfície das membranas. Os autores testaram diferentes concentrações de glutaraldeído, variando em soluções de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 %, e observaram que com o aumento da concentração do glutaraldeído houve uma aumento na imobilização das enzimas nas membranas e desta forma

concluíram que a funcionalização utilizando o glutaraldeído é promissora para imobilização de enzimas.

## 2.5 Nanopartículas de $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$ (NPLs)

Em anos recentes, o desenvolvimento de diferentes tipos de nanopartículas inorgânicas (NPLs) que estão sendo utilizadas como marcadores em imunoenaios, substituindo os fluoróforos ou partículas orgânicas, têm sido alvo de inúmeras pesquisas. Basicamente, NPLs inorgânicas são caracterizadas por apresentar boas propriedades ópticas, tais como fotoestabilidade e rendimento quântico elevado (CHÁFER-PERICÁS *et al.*, 2012).

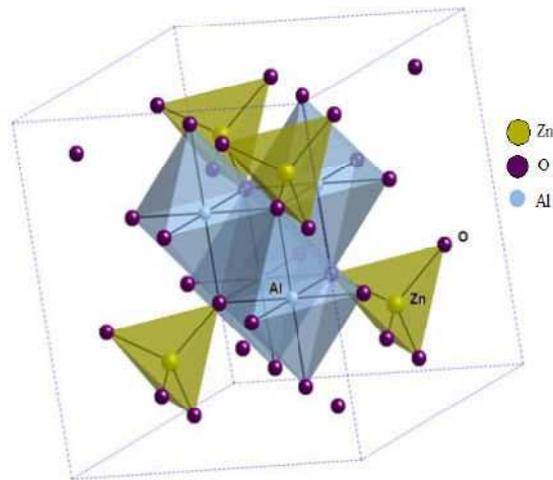
Para obtenção de NPLs inorgânicas com propriedades luminescentes, a utilização de matrizes cerâmicas semicondutores co-dopada com íons lantanídeos, tem se apresentado promissora, principalmente devido à qualidade da luminescência observada. Entre os materiais inorgânicos com estrutura distinta e características geométricas, as nanoestruturas receberam crescente atenção devido às suas propriedades e ampla aplicações em catálise, sensoriamento, carreamento de fármacos, detecção biológica e dispositivo óptico (LOU, ARCHER e YANG, 2008). Entre os tipos de matrizes mais comuns, pode-se citar,  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  (LIN, LIN E LI, 2006),  $\text{ZnO}$  (MONTEIRO *et al.*, 2006),  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  (MARTINS e SERRA, 2010),  $\text{TiO}_2$  (CHI, VICTORIO e JIN, 2006),  $\text{PbTiO}_3$  (LEMONS, MELO, SILVA, 2005), sílica (REPO *et al.*, 2011).

Dentre as diferentes matrizes, o aluminato de zinco ( $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ ) tem sido utilizado devido a sua alta estabilidade térmica e transparência na região do visível, sendo um material promissor para fabricação de dispositivos luminescentes dopados com íons lantanídeos (CHEN e MA, 2010; VRANKIĆ *et al.*, 2012). De acordo com Strek *et al.*, (2000), íons com valência +3, como por exemplo, os íons lantanídeos podem substituir parcialmente íons como o  $\text{Al}^{3+}$ . Isso pode ser explicado por causa do tamanho do raio iônico do alumínio que é 0,75 Å, ser bem próximo ao raio iônico dos íons lantanídeos, por exemplo, do itérbio ( $\text{Yb}^{3+}$ ) e érbio ( $\text{Er}^{3+}$ ) que apresentam respectivamente 0,85 e 0,88 Å, além de suas cargas elementares que é 3+.

Na Figura 5 pode ser observado que o  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  apresenta estrutura típica de espinélio ( $\text{AB}_2\text{O}_4$ ) e consiste em um arranjo de empacotamento fechado CFC de átomos de oxigênio, com dois sítios cristalograficamente não equivalentes

tetraédricos (A) e octaédricos (B), onde A e B são íons de metais bivalentes ( $\text{Zn}^{2+}$ ) e trivalentes ( $\text{Al}^{3+}$ ), respectivamente (SINGH *et al.*, 2008; PHANI, PASSACANTANDO e SANTUCCI, 2001). Este material é muito conhecido por sua grande estabilidade térmica e por sua inércia química, por isso sua importância como material resistente à altas temperaturas (YANG, CHEN e CHENG, 2004).

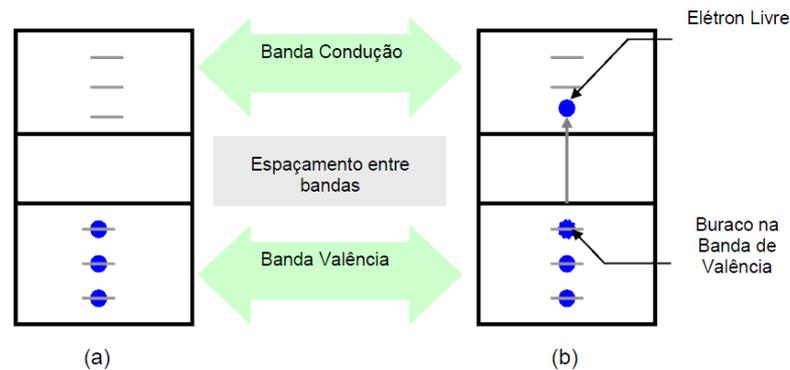
Figura 5 - Estrutura do espinélio  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ .



Fonte: STANCIU e AVRAM, 2010

Este óxido é um semicondutor, caracterizado por apresentar larga energia de espaçamento entre as bandas de valência e de condução. Na banda de valência encontra-se elétrons na temperatura 0 Kelvin. Neste estado eletrônico o semicondutor tem características de um isolante, e, não conduz eletricidade. A medida que sua temperatura aumenta, os elétrons absorvem energia passando para a banda de condução. Estas bandas são separadas por uma região proibida para elétrons caracterizada por uma descontinuidade de energia ou espaçamento entre bandas, chamada “banda *gap*” (Figura 6) (SINGH *et al.*, 2008).

Figura 6 - Bandas de energia para um semiconductor: (a) antes; (b) depois de uma excitação dos elétrons da banda de valência para banda de condução.



Fonte: IRION, 2006

O espaçamento de energia do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  é de 3,8 eV indica que o material é transparente para a luz possuindo comprimentos de onda 320 nm (MATHUR *et al.*, 2001). Esta característica, torna o  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  um material promissor como rede hospedeira (matriz inorgânica) para íons capazes de gerar luminescência, tais como íons de metais de transições e íons lantanídeos (SILVA, 2006). Os semicondutores podem ter o seu número de cargas e a sua condutividade alterada pela adição de dopantes no material puro, pois estes agem como ativadores de defeitos e com isso alteram a estrutura de banda do sólido (CÂMARA, 2004).

Devido a estas importantes características e ao vasto campo de aplicação do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  apresenta quando dopado ou codopado com íons de transição ou lantanídeos, a seguir será abordado um breve resumo sobre alguns trabalhos mais relevantes sobre este tema.

Menon *et al.*, (2008) avaliaram a luminescência do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  dopado com o  $\text{Tb}^{3+}$  sintetizado por reação de combustão e constataram a presença de picos que confirmam as transições deste lantanídeo. Estes autores também afirmam que a intensidade da luminescência é influenciada positivamente pelo aumento da temperatura.

Chen *et al.*, (2010) doparam o  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  com o íon lantanídeo  $\text{Eu}^{3+}$  e prepararam por síntese hidrotermal utilizando nanoesferas de carbono como um modelo rígido para formação de uma material oco em escala nanométrica. Os resultados obtidos por estes autores indicam a obtenção de nanoesferas ocas de

ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, com área superficial elevada e uma propriedade luminescente excelente em emissão na cor vermelha em comprimento de onda de 393 nm e 254 nm.

Kumar *et al.*, (2012) reportaram a síntese de ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dopado com Eu<sup>3+</sup> através do método sol-gel e observaram através da espectroscopia de emissão e excitação bandas características das transições do Eu<sup>3+</sup>. Estes autores relatam que este material apresenta uma boa estabilidade térmica e mesmo submetido a altas temperaturas (900°C) a luminescência do material foi preservada.

Tshabalala *et al.*, (2012) sintetizaram o ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e co-doparam com os íons lantanídeos Ce<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup> por reação de combustão e obtiveram uma estrutura típica de espinélio cúbico, observando-se que a emissão na cor verde foi aumentada pela energia transferida do Ce<sup>3+</sup>. A emissão verde foi aumentada pela energia transferida de Ce<sup>3+</sup> para o Tb<sup>3+</sup>, possibilitado pelo mecanismo de transferência de energia. Os autores também observaram que houve uma estabilidade na luminescência, com redução da intensidade apenas após 10 horas de irradiação de feixes de elétrons, justificada pela presença da fase Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> que formou uma camada protetora para os lantanídeos.

O estudo da matriz de ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foram realizados por Costa *et al.*, (2013), quando avaliaram as características morfológicas e luminescentes de nanopartículas de ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> codopado com Yb<sup>3+</sup> e Er<sup>3+</sup>, preparado mediante o método de síntese por reação de combustão, com o objetivo de avaliar o mecanismo de emissão *upconversion* em três co-dopagens diferentes. Os autores reportaram que a co-dopagem de 5:1 em mols de Yb<sub>0,05</sub>:Er<sub>0,01</sub> causou uma forte influência das propriedades óticas do ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> com predominância da cor vermelha em relação a verde, e que a intensidade de emissão foi diretamente influenciada com a intensidade infravermelha do diodo laser. Estes resultados indicaram que o ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> codopado com íons terras raras Yb<sup>3+</sup> e Er<sup>3+</sup> são materiais promissores para obtenção de luminescência mediante a conversão ascendente de energia (*upconversion*).

Nesta perspectiva, observa-se que o interesse em aplicar os íons lantanídeos (terras raras) para alterar as propriedades de partículas orgânicas e inorgânicas, na investigação de funções de sistemas bioquímicos e na determinação de substâncias biologicamente ativas, tem aumentado cada vez mais. Estes íons têm sido utilizados principalmente como sondas espectroscópicas no estudo de biomoléculas, como marcadores em imunologia (fluoroimunoensaios) e, também, como agentes de

contraste em diagnóstico não invasivo de patologias em tecidos por imagem de RMN (ressonância magnética nuclear). Estão sendo pesquisados também lantanídeos radioativos para aplicação médica nuclear, como no tratamento do câncer (MARTINS e ISOLANI, 2005).

Complexos de lantanídeos têm sido apresentados para ser uma classe de materiais muito promissores para uso como dispositivos de emissão. Isto se deve principalmente a constatação de que a intensidade de luminescência dos terra rara (TR) pode ser melhorada utilizando transferência de energia, isto é, efeito da antena (MARTINS *et al.*, 2010).

O fenômeno de *upconversion* em íons lantanídeos ocorre quando a radiação emitida por um material apresenta uma energia superior àquela da radiação que gerou a excitação. Quando um meio é excitado com uma radiação incidente com determinado comprimento de onda, a radiação emitida apresenta, geralmente, um comprimento de onda maior, ou seja, uma energia menor. No entanto, em determinadas circunstâncias, pode ocorrer *upconversion*, fazendo com que o comprimento de onda da radiação emitida seja menor que o da radiação incidente e, portanto, a radiação emitida apresente uma energia maior (RONDA, 2008).

A pesquisa de processos de *upconversion* com o íon lantanídeo  $\text{Er}^{3+}$  utilizado como dopante tem sido de grande interesse desde sua primeira utilização em 1965 (SNITZER e WOODCOCK, 1965). Devido à luminescência forte na região visível com transições que podem ser realçadas pela escolha adequada de uma matriz para incorporação de lantanídeos. Além de que, a utilização de outro íon lantanídeo como o  $\text{Yb}^{3+}$  ( $4f^{13}$ ), acrescido a este material contendo  $\text{Er}^{3+}$  ( $4f^{11}$ ), constituindo os materiais chamados codopados, trazem a possibilidade de novas interações íon-íon entre os doadores e os aceptores, tendo por resultado processos eficientes de *upconversion* (CANTELAR e CUSSÓ, 2003).

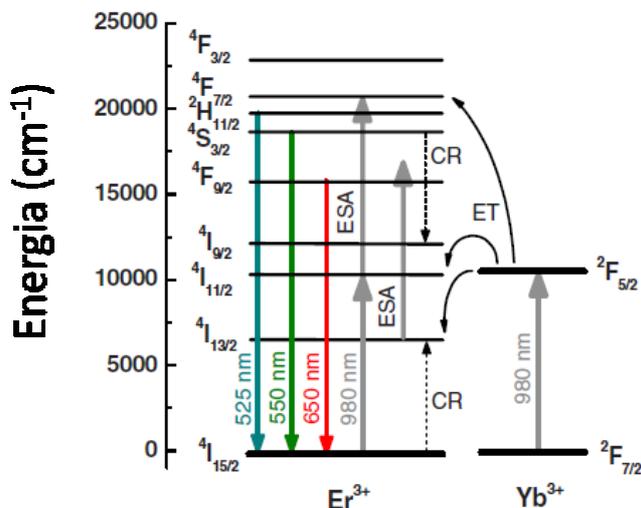
Lemos, Melo e Silva, (2005) afirmaram que os processos de *upconversion* envolvem uma absorção sequencial de dois fótons com emissão para comprimento de onda na região do vermelho e do verde, e em alguns casos envolvendo uma emissão *upconversion* de três fótons, quando utilizado a energia transferida dos íons  $\text{Yb}^{3+}$  à  $\text{Er}^{3+}$ .

Na Figura 7 as setas de linha contínua de cor cinza, indicam as transições da emissão para o íon de  $\text{Er}^{3+}$  e, as linhas pontilhadas representam as energias de transferência do íon  $\text{Yb}^{3+}$  ao íon  $\text{Er}^{3+}$ . Observam-se as três transições de radiação

emitidos dos fótons vermelhos e verdes:  ${}^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$  (525 nm),  ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$  (550 nm) e  ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$  (660 nm) para os íons de  $Er^{3+}$ . A geração destas transições é possível devido a um processo eficiente de transferência de energia que envolve íons de  $Yb^{3+}-Er^{3+}$  (LEMOS, MELO e SILVA, 2005).

Observa-se que o itérbio absorve radiação a um comprimento de onda próximo dos 980 nm (nível  ${}^2F_{7/2}$ ), sendo excitado ao nível  ${}^2F_{5/2}$  (1030 nm) (Figura 7). Assim, excitando uma amostra codopada com érbio e itérbio, neste comprimento de onda, o itérbio irá absorver a radiação e transferir energia de forma não-radiativa para o érbio, que por sua vez, poderá emitir radiação visível, de acordo com os comprimentos de onda especificados na Figura 7 para três transições radiativas ( ${}^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ ;  ${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ ;  ${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ ), que correspondem ao azul (525 nm), verde (550 nm) e vermelho (650 nm) (LEMOS, MELO E SILVA, 2005).

Figura 7 - Diagrama esquemático dos níveis de energia do sistema de co-dopagem com  $Yb^{3+}/Er^{3+}$ .



Fonte: GÓMEZ *et al.*, 2011

Desta forma, a combinação de diversas inovações na ciência dos materiais, ciências biológicas, síntese inorgânica e bioinorgânica, química do estado sólido, métodos preparativos em escala industrial e caracterização analítica é a chave para desenvolvimento de novas aplicações dos íons lantanídeos em diversas áreas (MARTINS e ISOLANI, 2005).

Diante do exposto pode ser observado que a utilização de uma matriz  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  e funcionalizadas com quitosana e glutaraldeído, se apresenta bastante promissora para possíveis aplicações como marcadores luminescentes.

## 2.6 Sistemas *Upconversion* para obtenção de Marcadores Biológicos

Devido à falta de luminescência nas moléculas naturais presentes em meio biológico quando expostos a radiação infravermelha, além de um baixo rendimento quântico, a monitorização em tempo real “*in vivo*” de múltiplas moléculas alvo, depende de marcadores externos que podem conduzir a um sinal de luminescência a ser medido. De acordo com Yao e Tong (2012), estes marcadores específicos devem apresentar:

- (1) estabilidade;
- (2) ausência de efeitos sobre a função do organismo;
- (3) características espectrais que significam que o sinal visível pode ser sintonizado ajustando aos componentes marcados;
- (4) faixa de comprimento de onda variável laser para evitar a destruição do tecido biológico.

A criação de novos dispositivos depende em geral, da obtenção de materiais que possam ser sintetizados, sem que haja a necessidade de utilização de métodos específicos de síntese. Desta forma, o crescente emprego de marcadores ópticos, deve-se a possibilidade destes atenderem algumas exigências que os métodos clássicos de análises não conseguem, sendo as características mais relevantes: simplicidade de construção, resposta rápida, redução de custo, seletividade, sensibilidade, miniaturização, precisão, facilidade de uso e pequeno volume de amostra (ROSATTO *et al.*, 2001).

Outro fator relevante para que as nanopartículas (NPLs) dopadas com lantanídeos estejam sendo evidenciadas, é por apresentarem luminescência com um tempo de meia vida na escala dos milissegundos, o que é um tempo de meia vida longo quando comparado com a fluorescência de compostos orgânicos como a fluoresceína, que também são utilizados como marcadores e apresentam um tempo de meia vida na escala dos nano aos microssegundos (YANG *et al.*, 2008).

Além de que, os tradicionais corantes orgânicos são excitados por radiação ultra-violeta (UV) que é potencialmente prejudicial a célula e cancerígeno (WANG *et al.*, 2009), enquanto que as NPLs dopadas com lantanídeos podem ser excitadas por radiações não iônizante como a luz infravermelha (NIR), o que demonstra sua grande potencialidade para utilização em muitos campos da ciência biológica, incluindo marcação de células e tecido (WANG *et al.*, 2009; BOUZIGUES *et al.*, 2011).

Estas nanopartículas fluorescentes a base de íons lantanídeos que utilizam mecanismos de conversão ascendente de energia (*upconversion*) podem converter uma radiação de comprimento de onda maiores (por exemplo, luz infravermelha) em uma fluorescência com comprimento de onda mais curto (por exemplo, luz visível) e, portanto, têm emergido como uma nova classe de marcadores fluorescentes para imagens biomédicas (WANG *et al.*, 2009). Desta forma, a irradiação infravermelha apresenta uma forte capacidade de penetração no tecido biológico e é também menos prejudicial às células (LI *et al.*, 2008b).

Contudo, apesar do enorme potencial dos nanomateriais luminescente que utilizam o mecanismo de *upconversion* em aplicações na biociência, algumas melhorias ainda são necessárias para otimizar e melhorar suas propriedades para possíveis aplicações comerciais. Relatos sugerem que estas melhorias devem ser obtidas para o rendimento quântico da luminescência *upconversion*. Infelizmente, nanopartículas de *upconversion* contém luminescência de baixo a médio brilho quando comparada à biomarcadores convencionais. Assim, a emissão *upconversion* deve ser ainda mais otimizado e melhorado, para atender a requisitos de sensibilidade extremamente elevadas indispensável para bioensaios e bioimagem (ZHU *et al.*, 2011).

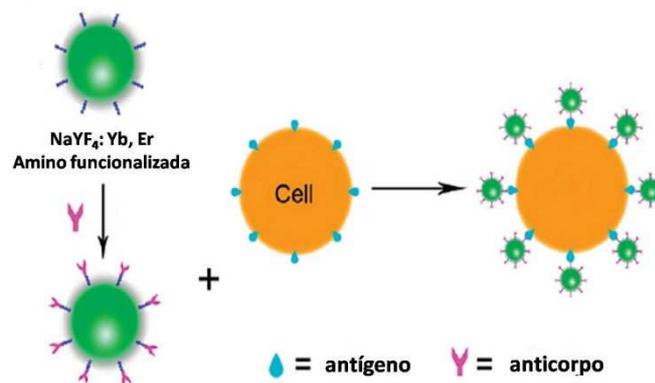
Ainda de acordo com Zhu *et al.*,(2011) existem maneiras para melhorar o rendimento quântico de luminescência *upconversion* como: otimizar a concentração do dopante; modificar quimicamente a matriz hospedeira; controlar a distribuição dos íons no material hospedeiro; e variar a composição, estrutura e morfologia das nanopartículas *upconversion*.

Neste contexto, recentes trabalhos que reportam o uso de nanopartículas co-dopadas com lantanídeos utilizados em mecanismos *upconversion* para aplicações como biomarcadores têm-se destacado, com o intuito de se obter um marcador otimizado com rendimento quântico adequado para sua aplicabilidade. Diferentes

lantânídeos têm sido utilizados dopados em diferentes matrizes para se alcançar este objetivo, e dentre estes íons podem ser citados o  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ , e particularmente muitos trabalhos contendo os pares de íons lantânídeos (Yb-Tm), (Yb-Er), onde os diversos mecanismos de transferência de energia têm sido investigados no sentido de aumentar a eficiência quântica dos sistemas. Contudo, a seguir serão destacados alguns trabalhos de *upconversion* que utilizam a codopagem utilizando apenas os íons Yb e Er, que é o foco da presente tese.

Na tentativa de obter uma nanopartícula fluorescente *upconversion* (UCNPs) para marcação de células cancerígenas, Wang *et al.*, (2009) prepararam, mediante a síntese solvotérmica, nanocristais de  $\text{NaYF}_4$  codopados com os lantânídeos Yb e Er e modificaram a superfície deste material com o agente silano APTES para torná-lo biocompatível. Após a silanização, estas nanopartículas forma ligadas covalentemente ao anticorpo de coelho CEA8, para detecção de antígenos carcinoembrionários e em seguida foram colocados em contato com as células HeLa. Os autores observaram uma forte luminescência nas células marcadas quando excitadas em 980nm e detecção das células HeLa, levando a conclusão de que estas nanopartículas são eficientes para biomarcação “*in vitro*”. Este mecanismo de marcação das células HeLa foi demonstrado de forma esquemática na Figura 8.

Figura 8 - Imunomarcação de células HeLa utilizando UCNPs.



Fonte: WANG *et al.*, 2009.

Jing *et al.*, ( 2012), também realizaram ensaios de *upconversion* a partir de um nanocompósito contendo  $\text{NaYF}_4$ : Yb, Er e superfície silanizada ligados covalentemente a nanotubos de carbono (SWNH). Este nanocompósito foi caracterizado por espectroscopia de luminescência, sendo observado que o mesmo

apresenta, sob excitação 980 nm, fluorescência na cor verde brilhante. Estes autores também observaram que o sistema tem potencial para aplicações como marcação celular e carreamento de fármacos, pois o nanocompósito obtido foi conjugado com anticorpo de coelho anti-CEA8 (Ac) e, em seguida, usado com sucesso para imunomarcação de célula HeLa.

Hemmer *et al.*, (2013) desenvolveram nanopartículas de óxido de gadolínio codopado com os lantanídeos  $\text{Er}^{3+}$  e  $\text{Yb}^{3+}$  utilizando métodos de precipitação e de síntese hidrotérmica. Estes autores confirmaram através da técnica de excitação e emissão que estas nanopartículas de  $\text{Gd}_2\text{O}_3: \text{Er}^{3+}$  apresentam emissão up-conversion em verde (550 nm) e vermelho (670 nm), sobre excitação de 980 nm, o que faz com que essas estruturas sejam interessantes para aplicações como biomarcadores. No que diz respeito à sua potencial aplicação em bioimagem, a citotoxicidade foi um aspecto importante a ser analisado, onde através da análise em células B não fagocitárias e de macrófagos, foi observado que para os macrófagos estas nanopartículas se apresentaram citotóxicas sob condições ácidas, justificada pelo autor devido a instabilidade química do óxido de gadolínio nestas condições. Contudo, quando a superfície das nanopartículas foram modificadas com poli(etileno-glicol)-b-poli(ácido acrílico) (PEG-b-PAAC), esta toxicidade pode ser superada, resultando em uma boa biocompatibilidade das nanopartículas com os macrófagos.

## 2.7 Reação de Combustão

Existem diversos métodos para síntese de pós cerâmicos que objetivam a obtenção de pós altamente puros, com tamanho de partícula fino, e pequena agregação e aglomeração, além da necessidade do material obtido possuir baixo custo. A maioria dos métodos varia em eficiência, pois não atendem todos esses níveis. Um método interessante para obtenção de pós de elevada pureza e homogêneos e que apresenta um custo relativamente baixo é a síntese por combustão (TONIOLO, 2004).

O método de combustão, também conhecido como síntese auto propagante, é uma maneira fácil, segura e rápida de produzir pós cerâmicos, e suas principais vantagens são que elas requerem menos energia que os processos de síntese de materiais cerâmicos convencionais e, que o tempo de processamento é reduzido

para poucos minutos. Uma vez que não necessita de múltiplas etapas, este método é bastante simples, levando normalmente a produtos com estrutura e composição desejadas (KIMINAMI *et al.*, 2008).

A síntese de materiais por reação de combustão, atualmente tem se destacado por ser um método que tem se apresentado eficaz na produção de partículas nanométricas (CHINARRO *et al.*, 2007), sendo um processo de preparação através de reações exotérmicas utilizadas para a produção de pós cerâmicos multicomponentes, cristalino, muito fino e homogêneo sem decomposição e/ou etapas de calcinação intermediárias. Esta reação exotérmica tem seu início na temperatura de ignição e gera determinada quantidade de calor que é manifestada na temperatura máxima, ou temperatura de combustão. O processo é baseado no princípio de que uma vez iniciada por uma fonte externa, uma reação exotérmica muito rápida ocorre, tornando-se auto-sustentável e gerando um produto final (óxido) dentro de um curto período de tempo (COSTA *et al.*, 2007).

Baseados em conceitos da termodinâmica usados na química dos propelentes e explosivos, esta técnica de síntese por reação de combustão envolve a reação de uma mistura redox, contendo íons metálicos de interesse como reagentes oxidantes, e um combustível como agente redutor (JAIN, ADIGA e PAI VERNEKER, 1981). Assim, um método alternativo para uso dessa técnica na síntese de pós foi desenvolvido por meio da utilização de reagentes de fácil oxidação (como nitratos) e de combustíveis que atuam como reagente redutor (como a uréia [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (COSTA *et al.*, 2002, YANG *et al.*, 2012), hidrazina maléica (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (ANTONIO, 2006), carboidrazina [CO(N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (FU, 2007), glicina (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) (HWANG *et al.*, 2005, JIANG *et al.*, 2012). As propriedades dos pós preparados pela combustão de misturas redutoras, tais com o tamanho de cristalito, área superficial específica, morfologia, fases, grau e natureza da aglomeração, irão depender, entretanto, do combustível usado e da chama de combustão (TAHMASEBI e PAYDAR, 2008).

Contudo, os principais parâmetros de combustão, difundidos pela literatura, que têm sido investigados são: tipo de chama, temperatura, gases gerados, atmosfera, razão combustível-oxidante, composição química e pureza dos reagentes precursores (TONIOLO, 2009).

O tipo de chama gerado durante a reação de combustão em solução, em geral, sob condições controladas, gera dois tipos de chama, a incandescente

relativamente quente, e a do tipo *smoldering* (chama lenta e branda ou sem chama), dependendo do combustível e da razão combustível-oxidante empregados. A chama incandescente pode demorar segundos, ou inclusive, minutos, enquanto que no *smoldering* a chama não surge ou se extingue em poucos segundos. O tipo de chama na combustão exerce um papel importante no controle do tamanho da partícula dos pós, como sinterizados (LI *et al.*, 2010).

A temperatura da chama obtida pela combustão é dependente da força redutora do combustível e da quantidade de gases formado. Temperaturas elevadas favorecem a cristalização e sintetização das partículas do pó e quanto maior a quantidade de gases gerados maior será a dissipação de energia, ou seja, menor será a quantidade de energia disponível para a sintetização e cristalização e formação da fase desejada o que requer mais oxigênio da atmosfera para combustão (FUMO, 1997).

Na síntese por combustão, a morfologia do pó, o tamanho da partícula e a área superficial são diretamente relacionados à quantidade de gases que escapam durante a combustão (GANESH *et al.*, 2002). Os gases quebram grandes aglomerados e criam poros entre as partículas. De fato, os aglomerados são desintegrados à medida que aumenta a geração de gases e mais calor é liberado do sistema, dificultando o crescimento das partículas (MCCRITTRICK *et al.*, 1999).

O tipo de combustível influencia diretamente na temperatura e tempo de combustão, que são parâmetros importantes na reação de combustão e que determinam na maioria das vezes as características finais dos pós produzidos. No entanto, o aumento de temperatura de combustão além de está baseado no tipo de combustível utilizado, também sofrem influência de variações nas condições da síntese, tais como tipo de recipiente e forma de aquecimento externo utilizado para as reações de combustão (TONIOLO *et al.*, 2004).

Durante a combustão o calor gerado pela reação aumenta a temperatura causando a formação de uma espuma suavemente aglomerada e bem-cristalizada (GANGULI E CHATTERJEE, 1997). Esta reação gera calor que é manifestado pela temperatura de combustão ( $T_c$ ), capaz de volatilizar impurezas de baixo ponto de ebulição e, portanto resultar em produtos mais puros do que aqueles produzidos pelas técnicas convencionais (MOORE, 1995). Temperaturas elevadas favorecem a cristalização e sinterização do pó e quanto maior a quantidade de gases gerados

maior será a dissipação de energia, ou seja, menor será a quantidade de energia disponível para a sinterização e cristalização (FUMO, 1997).

A escolha do combustível ideal para a preparação de um pó cerâmico depende vários fatores importantes, tais como, a valência, quantidade de agente oxidante e/ou redutor, facilidade de utilização e comercialização, baixo custo. Entre os combustíveis usados na reação de combustão, a uréia ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) pode ser considerada a mais utilizada na síntese por reação de combustão, por apresentar vantagens tais como: baixa capacidade redutora devido a sua valência total 6+, menor tamanho da cadeia orgânica, produz um pequeno volume de gases, disponibilidade comercial, baixo custo, e o fato de gerar baixas temperaturas de combustão, porém suficiente para a formação das fases desejadas nos produtos finais (SEGADÃES *et al.*, 1998).

Costa *et al.*,(2013), utilizaram o método de reação de combustão utilizando como reagentes químicos o nitrato de alumínio, nitrato de zinco, óxido de itérbio e óxido de érbio como agentes oxidantes e a uréia como agente redutor, obtendo os melhores resultados quando utilizou uma proporção de 5:1 de óxido de itérbio e óxido de érbio de uma co-dopagem com o total de 0,06 moles, seguindo a seguinte estequiometria:  $\text{ZnAl}_{1,94}\text{Yb}_{0,05}:\text{Er}_{0,01}\text{O}_4$ . Durante esta síntese realizada, foram adicionados a mistura de pós, 5 mL de água, e a reação foi realizada em placa de aquecimento que atinge no máximo 480°C. O trabalho realizado por estes autores utiliza os mesmos precursores utilizados na presente tese, além de que o método de síntese por reação de combustão também foi o mesmo para obtenção de pós com características nanométricas, sendo desta forma uma síntese altamente reprodutível, que possibilita a obtenção de nanopartículas que podem ser utilizadas com diferentes finalidades, inclusive para aplicações biotecnológicas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais

Para a síntese das nanopartículas (NPLs) de  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$ , foram utilizados os reagentes descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Materiais utilizados para síntese das NPLs de  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$ , e funcionalização.

Reagente	Fórmula química	Fabricante	Massa Molar(g/mol)	Pureza (%)
Nitrato de zinco	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Vetec	297,48	98,0
Nitrato de alumínio	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Aldrich	375,13	99,0
Óxido de itérbio	$\text{Yb}_2\text{O}_3$	Aldrich	394	99,9
Óxido de érbio	$\text{Er}_2\text{O}_3$	Aldrich	382,6	99,9
Uréia	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	Vetec	60,06	98,5
3-aminopropil-trimetoxissilano	$[\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3]$	Aldrich	179,29	98,0
Quitosana	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$	Aldrich	-	98,0
Glutaraldeído	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	Vetec	100,12	25,0

Fonte: PRÓPRIA, 2013.

#### 3.2 Síntese das NPLs

Neste trabalho de pesquisa as NPLs de  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  foram sintetizadas na proporção de 5:1 em mol de Yb:Er, seguindo a metodologia proposta por Silva (2006) com mudança no tipo de recipiente e na forma de aquecimento. A estequiometria da composição foi definida com base no resultado mais promissor de Silva (2006), em termos de resposta da intensidade da luminescência *upconversion*.

Deste modo, para a síntese das NPLs utilizou-se as seguintes condições: i) todas as reações foram realizadas sem diluição com água destilada; ii) a fonte de aquecimento utilizada foi uma base cerâmica com resistência em espiral

(temperatura da resistência 600°C); e iii) foi utilizada a concentração molar de 0,05 mol (Yb:Er)<sup>3+</sup> em substituição aos íons de Al<sup>3+</sup>, em uma proporção molar de 5:1 de Yb<sup>3+</sup>:Er<sup>3+</sup>, tendo-se o sistema:

- ZnAl<sub>1,95</sub>Yb<sub>0,04116</sub>:Er<sub>0,00833</sub>O<sub>4</sub>, onde a quantidade de Yb:Er codopados foi equivalente a 0,05 mol, podendo representar o sistema também como: ZnAl<sub>1,95</sub>(Yb:Er)<sub>0,05</sub>O<sub>4</sub>, o qual foi designado por NPLs de AZC.

A composição inicial da fase na estequiometria desejada foi estabelecida com base a teoria dos propelentes e explosivos, que utiliza a valência total dos reagentes oxidantes e redutores, de modo a favorecer a relação estequiométrica oxidante/combustível,  $\Phi_e = 1$  (JAIN *et al.*, 1981), como apresentado a seguir.

$$\Phi_e = 1 = \sum (\text{coef. dos elementos oxidantes} \times \text{valência}) / (-1) \sum (\text{coef. dos elementos redutores} \times \text{valência})$$

$$\sum (\text{coef. do oxidante} \times \text{valência}) + (\text{coef. do redutor} \times \text{valência}) = 0$$

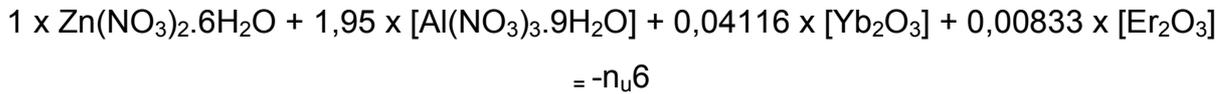
Tomando como base as massas molares descritas na Tabela 2, para os reagentes nitratos de alumínio e zinco, os óxidos de itérbio e érbio e o combustível uréia, determinou-se a quantidade estequiométrica (em gramas) dos reagentes, multiplicando-se a quantidade de material (em mol) de cada elemento pela massa molar do seu respectivo reagente, de modo a se obter a estequiometria das NPLs de AZC, tem-se:

- Nitrato de zinco  $\rightarrow 1 \text{ mol} \times 297,47 \text{ g/mol} = 297,48 \text{ g}$ ;
- Nitrato de alumínio  $\rightarrow 1,95 \text{ mol} \times 429,096 \text{ g/mol} = 836,737 \text{ g}$ ;
- Óxido de itérbio  $\rightarrow 0,04166 \text{ mol} \times 394 \text{ g/mol} = 16,414 \text{ g}$ ;
- Óxido de érbio  $\rightarrow 0,0083 \text{ mol} \times 382,6 \text{ g/mol} = 3,175 \text{ g}$ .

A quantidade de combustível empregado na obtenção da composição estequiométrica foi determinada com base na quantidade de material (em mol) dos elementos metálicos e na valência total dos nitratos desses elementos. Carbono (+4), hidrogênio (+1), alumínio (+3) e zinco (+2) foram considerados como elementos redutores. O oxigênio foi considerado como elemento oxidante com valência (-2), e o nitrogênio foi considerado neutro com valência igual a zero, uma vez que ele não

reage com outros elementos. A quantidade de uréia ( $n_u$ ) (em mol) calculada de acordo com sua valência total igual a 6:

Sendo assim, baseado na equação, tem-se:



(1 mol de zinco x valência total do nitrato de zinco) + (1,95 moles de alumínio x valência total do nitrato de alumínio) + (0,04116 mol de óxido de itérbio x valência total do óxido de itérbio) + 0,00833 mol de óxido de érbio x valência total do óxido de érbio) = -  $n_u 6$

$$1 [2+(-12)] + 1,95 [3+(-18)] + 0,04116 [+6-6] + 0,00833 [+6-6] = - n_u 6 \\ n_u = 6,54 \text{ mols.}$$

Para determinar a quantidade estequiométrica (em gramas) da uréia, também multiplicou sua quantidade em mol pela sua respectiva massa molar. Logo, tem-se:

- Massa de uréia:  $6,54 \text{ mol} \times 60,06 \text{ g/mol} = 392,79 \text{ g}$ .

A quantidade de reagente total (RT) estabelecida na estequiometria e a quantidade de reagentes total utilizado para síntese das NPLs de AZC encontram-se apresentada na Tabela 2.

Para não haver desperdícios de reagentes durante a reação de combustão, devido à capacidade do cadinho de sílica vítrea ser de apenas 200 mL, todos os valores encontrados para as quantidades estequiométricas (em gramas) dos reagentes (nitratos, óxidos e combustíveis) foram divididos por 150 (m/150), antes de serem misturados no cadinho.

Tabela 2 - Quantidade em gramas dos materiais utilizados na síntese das NPLs de AZC.

<i>Reagente</i>	Quantidade de RT na estequiometria	Quantidade de RT utilizado nas reações
Nitrato de zinco	297,48	2,592
Nitrato de alumínio	836,737	1,963
Uréia	392,79	5,522
Óxido de itérbio (III)	16,414	0,108
Óxido de érbio (III)	3,175	0,021
Peso total (g)	1546,596	10,2074

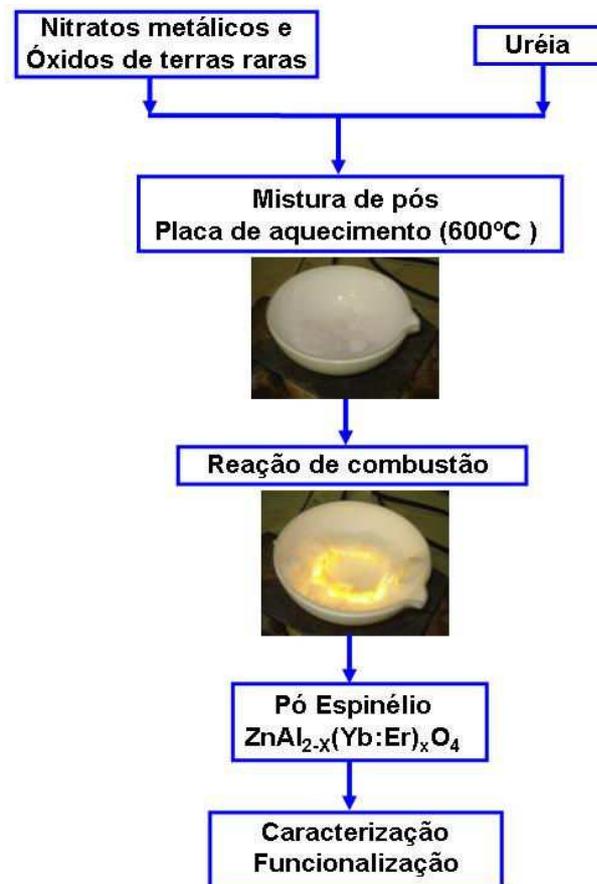
Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Deste modo, utilizou-se apenas 0,66% da quantidade total de reagentes (RT) calculado na estequiometria para as NPLs de AZC, o que equivale a 10,207 g. Logo após, o cadinho contendo todos os reagentes foi colocado sobre a base cerâmica com resistência espiral, onde se formou uma solução devido à desidratação dos nitratos (agentes oxidantes), óxidos de itérbio e érbio e do combustível (agente redutor).

Com o aquecimento ocorreu um aumento da viscosidade, formando bolhas e dando início à volatilização de gases e posteriormente a combustão. Ao término da reação de combustão, o produto resultante (flocos porosos) foi mantido no forno tipo mufla a 500°C por 10 minutos para a eliminação dos resíduos de voláteis remanescentes, que surgem devido à formação de bolhas e ao inchamento do volume da mistura nas bordas do cadinho. Depois, apenas o produto que entrou em combustão foi retirado e desaglomerado em um almofariz, peneirado em peneira malha #325 (abertura de 44 µm), e por fim, as NPLs de AZC foram caracterizadas.

A Figura 9 ilustra o fluxograma do processo de síntese adotado para obtenção das NPLs de AZC.

Figura 9 - Fluxograma de síntese por reação de combustão para a obtenção das NPLs de AZC.



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

### 3.3. Funcionalização das NPLs

Inicialmente as superfícies das NPLs de AZC foram modificadas a com o agente silano de acoplamento, o 3-aminopropiltrimetoxisilano [H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] (APTS) seguindo a metodologia proposta por Feng *et al.*, (2003).

Inicialmente, 50 mL de etanol e 1 g das NPLs de AZC foram colocados em banho ultrassom por 30 minutos. As NPLs em suspensão foram separadas em uma centrífuga FANEM modelo baby com velocidade 500 rpm por 30 minutos e em seguida, secas em estufa FANEM modelo 315 a 150°C/12 horas.

Duas porções de 0,1 g de NPLs secas da amostra AZC foram pesadas, e adicionadas em 2 mL do agente silano. Para homogeneização dos materiais, utilizou-se um banho ultrassom modelo 712 da marca Fisatom XE100 rpm por 15 minutos. Em seguida, as NPLs foram submetidas ao aquecimento em forno micro-

ondas (Eletrolux, 28 L) na potência de 900 W, por 2 minutos, sendo, posteriormente colocadas novamente no banho ultrassom por 5 minutos. Esta etapa de aquecimento no forno micro-ondas e homogeneização no banho ultrassom foram repetidas por cinco vezes, deixando em temperatura ambiente por 12 horas.

As NPLs foram secas em estufa modelo FANEM Modelo 315, SE a 150°C por 30 minutos, e em seguida foi adicionado água destilada para serem centrifugadas em uma centrífuga FANEM modelo baby, com rotação de 600 rpm por 20 minutos. As NPLs foram lavadas por cinco vezes com água destilada, e em seguida, permanecendo na estufa por 24 horas (110°C), obtendo-se assim, as NPLs de AZC modificada a superfície com o agente silano (AZC/SiO<sub>2</sub>).

### 3.3.1 Funcionalização das AZC/SiO<sub>2</sub> com quitosana (QT)

Para funcionalização com quitosana, inicialmente, 0,1 g de quitosana (QT) (Sigma Aldrich, 84,7% de desacetilação) foram adicionadas a 5,0 mL de uma solução de ácido acético a 1 %, sob agitação em uma placa BIOSTAR sem aquecimento, por 24 horas. Para tanto, 0,5 grama das NPLs de AZC/SiO<sub>2</sub> foram introduzidas na solução de quitosana, perfazendo uma proporção de 5:1 de NPLs de AZC/SiO<sub>2</sub>:QT, respectivamente. Em seguida esta mistura foi colocada em placa de petri e seca em estufa a 60°C por 24 horas. Os filmes de quitosana formados foram então adicionados em uma solução de hidróxido de sódio a 1 molar por duas horas para neutralizar o pH, e logo após ficaram imersos em água deionizada por 24 horas. As NPLs funcionalizadas com quitosana foram designadas por AZC<sub>Q</sub>.

### 3.3.2 Funcionalização das ACZ/SiO<sub>2</sub> com Glutaraldeído (GT)

Nesta etapa, 0,5 gramas das NPLs de AZC/SiO<sub>2</sub> foram adicionadas em 10 ml de uma solução tampão salina (PBS) contendo 8,1 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,9 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4 mol/l NaCl, e 0,05% Tween-20. A esta solução tampão também foi adicionado 20 ml de glutaraldeído, seguindo o procedimento proposto por Yang *et al.*, 2004.

A mistura foi colocada em centrífuga por 25 minutos com velocidade 600 rpm. Posteriormente, desprezou-se o líquido e a água destilada foi colocada nos tubos (sempre agitando com uma espátula) para a lavagem da mistura final. Esse

processo de lavagem foi repetido por cinco vezes, onde foi recolhida em um vidro de relógio e submetida à secagem em estufa por 24 horas a temperatura de 60 °C. As NPLs funcionalizadas com glutaraldeído foram designadas por AZC<sub>G</sub>.

### 3.4 Caracterização

#### 3.4.1 Difração de Raios X (DRX)

Para avaliar a estrutura e fases presentes, foi usado um difratômetro de raios X Siemens (modelo D6000, radiação Cu K) que opera com tubo de alvo de cobre a uma voltagem de 40 kV e 40 mA de corrente. Os difratogramas de raios X foram obtidos na faixa 2θ de 5 a 75° em passo de 0.02° com tempo de passo de 1 segundo, na temperatura ambiente de 25°C. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Engenharia de Materiais da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da UFCG

O tamanho de cristalito foi calculado a partir da linha de alargamento de raios X ( $d_{311}$ ) por meio da deconvolução da linha de difração secundária do cério policristalino (utilizado como padrão) utilizando-se a equação de Scherrer:

$$d = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (1)$$

Onde,  $d$  é o diâmetro médio das partículas;  $k$  é a constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas, assumida como sendo esférica (0,89);  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação do CuK $\alpha$  (1,5418 Å); e,  $\beta$  a largura à meia altura do pico.

Para identificação das fases foi utilizado o programa (Pmgr) da Shimadzu e para obtenção das fichas cristalográficas padrões foi acessado o banco de dados JCPDS. A cristalinidade foi obtida no programa (Pmgr) da Shimadzu cristality que utiliza o coeficiente de correção de Lorentz, para calcular a percentagem de fase cristalina.

### *3.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de FTIR foram obtidos usando um espectrômetro modelo 400 FT-IR/FT-NIR da marca Perkin Elmer, entre 4000 e 650  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 20 varreduras. Esta técnica foi utilizada para observar as bandas características dos materiais avaliados. A presença de bandas vibracionais, localizadas na região de um número de onda, indica o tipo de grupos funcionais presente na estrutura de uma molécula.

### *3.4.3 Distribuição Granulométrica*

As medidas de tamanho mediano e distribuição dos aglomerados foram realizadas utilizando um analisador de partícula Malven modelo Mastersize 2000 do Laboratório de Engenharia de Materiais da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da UFCG. Antes da análise as NPLs antes e após a funcionalização foram submetidas a 5 minutos de ultrasson.

### *3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A análise morfológica das NPLs antes e após funcionalização foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. Para análise foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura, marca Philips, modelo XL30 FEG do laboratório de Caracterização Estrutural (LEC) do DEMA/UFSCar.

### *3.4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

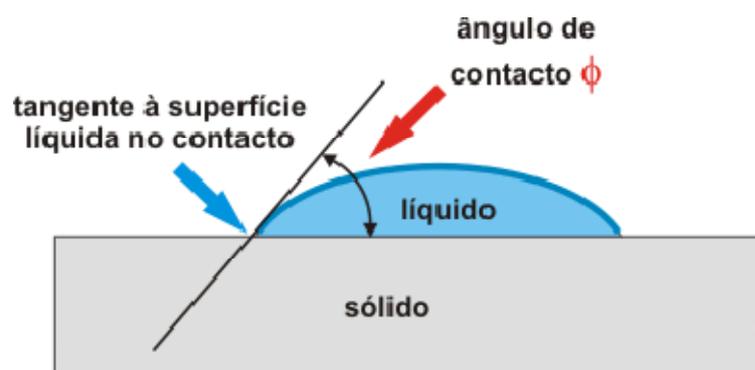
O tamanho e a morfologia das partículas e/ou aglomerados das NPLs antes e após funcionalização também foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a análise foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão modelo EM420, marca Philips (voltagem de 120KV) do laboratório de Caracterização Estrutural (LEC) do DEMA/UFSCar.

### 3.4.6 Tensão Superficial

Para avaliação da interação entre as fases sólido/líquido das NPLs antes e após a funcionalização, foi empregado o método da gota séssil. Neste método, uma gota de água de aproximadamente 4  $\mu\text{L}$  foi colocada suavemente sobre a superfície dos materiais como está ilustrado na Figura 10, e foi registrada a imagem de 5 gotas diferentes dispostas sob as superfícies das amostras para obtenção da média dos ângulos obtidos.

A análise foi realizada no Laboratório de CERTBIO/CCT/UFCG utilizando um goniômetro. Para isto foram efetuados gotejamentos de água deionizada na superfície das pastilhas prensadas das NPLs de AZC, AZC<sub>Q</sub> e AZC<sub>G</sub>. Utilizou-se uma câmara digital para capturar a imagem que foi, posteriormente, remetida a um computador para ser feita a medição do ângulo de contato entre a gota e a superfície por análise de imagem através do *software Angle Calculator*. A medida do ângulo de contato, assim obtida, foi utilizada para caracterizar o grau de hidrofiliicidade das superfícies.

Figura 10 - Representação da medida do ângulo de contato ( $\theta$ ), formado entre a gota e a superfície.

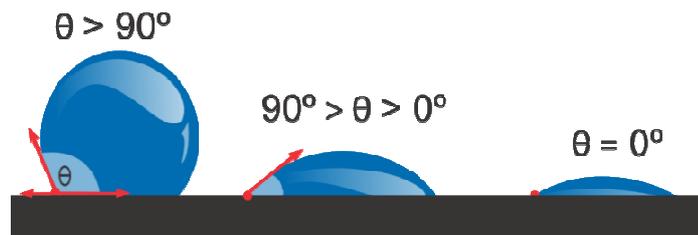


Fonte: ALHANATI, 2012.

A hidrofiliicidade está relacionada com o molhar, que envolve a interação de um líquido com a superfície. A molhabilidade é afetada pela presença de grupos polares na superfície do material. O comportamento da gota sobre a superfície indica diferentes situações de molhabilidade de uma superfície: para ( $\theta = 0$ ) podemos dizer

que a superfície apresenta alta molhabilidade ou que é hidrofílica, para ( $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ) afirma-se que a superfície é predominantemente hidrofílica, para ( $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ) a superfície é predominantemente hidrofóbica e para ( $\theta = 180^\circ$ ) a superfície é totalmente hidrofóbica ou não molhável (Figura 11).

Figura 11 - Representação de uma superfície hidrofílica ( $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ), predominantemente hidrofílica ( $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ) e hidrofóbica ( $\theta = 180^\circ$ ).



Fonte: Própria, 2013.

#### 3.4.7 Teste de Solubilidade

Aproximadamente 0,01 g de cada uma das amostras a serem testadas foram colocadas em um tubo de ensaio e a este foi adicionado 1 mL dos solventes utilizados (água, etanol 95 % e ácido acético 1 %), estes tubos foram vigorosamente agitados por 20 minutos. Todos os testes realizados foram acompanhados de um teste em branco contendo apenas o solvente. As medidas de solubilidade foram feitas em temperatura ambiente. Se uma pequena quantidade da amostra não se dissolver no solvente é considerado insolúvel naquele solvente. Esta análise foi realizada no Laboratório de Engenharia de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da UFCG.

#### 3.4.8 Análise Termogravimétrica

Técnicas de análise térmica diferencial (DTA) e termogravimétrica (TG/DTG) foram utilizadas para avaliar os eventos endotérmicos e exotérmicos e perda de massa, respectivamente para as amostras antes e após funcionalização. Foi utilizado o equipamento SHIMADZU D50 do Laboratório de Engenharia de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da UFCG.

### 3.4.9 Espectroscopia de Luminescência

O comprimento de onda de excitação foi determinado pela espectroscopia de excitação com as transições eletrônicas e suas respectivas intensidades foram determinadas por espectroscopia de emissão e excitação. Os espectros de emissão e excitação foram obtidos utilizando um laser de diodo em 978 nm com potência máxima de 165 mW, com lente convergente de 100 mm para focalizar a amostra, monocromador de 25 cm para dispersar o sinal, fotomultiplicadora Hamamatsu H5783-20 para detectar o sinal, um modulador mecânico (chopper), um amplificador lock-in SR530.

Este sinal amplificado foi então enviado para um computador e captado em um programa em Labview para aquisição dos dados. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente. Esta análise foi realizada no laboratório de Óptica Não Linear do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife - PE.

### 3.5 Avaliação da Viabilidade Celular pelo MTT

Para avaliação da viabilidade celular dos macrófagos foi utilizado o método de MTT que se baseia na capacidade apresentada por células de reduzir o sal tetrazólio[brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], baseado na capacidade que as células viáveis têm de clivar o anel tetrazólico presente no MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa das células, formando cristais de formazana, a partir da redução do tetrazólio MTT.

Avalia-se a viabilidade celular partindo do princípio que as células viáveis, uma vez em contato com o MTT, metabolizam o tetrazólio de metiltiazol na mitocôndria, utilizando enzimas ativas. Isto produz um acúmulo de cristais de tetrazólio ou formazana, e estes se acumulam no interior da célula e após a lise celular confere ao meio uma coloração azul, que pode ser detectado pela leitura da absorvância em 540 nm, com filtro de referência em 620 nm, conforme recomendado por Mosmann (1983), utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção na região do visível. Sendo assim, quanto maior a leitura no espectrofotômetro maior o percentual de células viáveis, em relação as não viáveis.

### 3.6.1 Preparo de Amostras para Teste de Citotoxicidade

As nanopartículas de AZC antes e após funcionalização com quitosana (AZC<sub>Q</sub>) e com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) foram prensadas em prensa hidráulica marca Carver com 5 toneladas para obtenção de pastilhas com diâmetro de 4 mm, tamanho adequado para placa de cultura de tecidos de 96 poços (Figura 12).

As amostras foram então esterilizadas em autoclave vertical modelo Phoenix, a uma temperatura de 120° C por vinte minutos, para eliminação de toda vida microbiana ou viral, e em seguida foram secas em estufa FANEN 315 SE, a uma temperatura de 120° C por uma hora.

Figura 12 - Placa de cultura de tecidos de 96 poços utilizada para ensaio de citotoxicidade.



Fonte: PRÓPRIA, 2013

### 3.6.2 Obtenção das Células do Exsudato Peritoneal

Para a realização desta etapa, fez-se necessário a obtenção das células do exsudato peritoneal utilizando-se 5 camundongos Swiss, previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de Tioglicolato de Sódio (Difco Lab. LTDA) a 3,0 %, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO<sub>2</sub>. Na câmara de fluxo laminar, os animais foram colocados em suporte e imobilizados pelas patas com o abdômen voltado para cima para retirada da pele na parte peritoneal com o auxílio de pinças dente de rato, expondo o peritônio.

Em seguida foi injetado na cavidade abdominal do animal 5,0 mL de uma solução salina tamponada de fosfato (PBS), estéril, com pH 7,2, a 4° C. Após uma massagem vigorosa na região abdominal, os macrófagos aderidos ao tecido são liberados para o líquido peritoneal, que foi coletado para preparação da suspensão celular. Estas células coletadas foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS, e

centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos a 4° C em centrífuga refrigeradora modelo Universal 32R, marca Hettich Zentifugen.

Após a centrifugação as células sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol ( $2 \times 10^{-5}$  M) (Sigma), penicilina (100 U/ml) (Sigma), estreptomicina (100 U/ml) (Sigma), L-glutamina (2mM) (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab), sendo o meio assim composto designado por RPMI-1640-C. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) em uma diluição 1:100 do líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração de  $5 \times 10^{-6}$  células em meio RPMI-1640-C.

Em uma placa estéril de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídas 1,0 mL da suspensão celular do exsudato peritoneal de camundongos, e incubadas a 37° C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 5% CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA). Após a incubação, as células não aderentes foram retiradas e os macrófagos que ficaram aderidos a placa foi adicionado um volume igual ao inicial de RPMI-1640-C em presença das amostras a serem analisadas.

Em outras cavidades da referida placa, com as mesmas condições anteriores, foram adicionadas 100 µL de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*), adquirido da Sigma Aldrich a uma concentração de 10 mg/mL como controle positivo, ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa contendo tensão constante de 5 % de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA). Após esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 µL de uma solução de MTT (*Across Organics*) a 1,0 mg/mL em RPMI-1640.

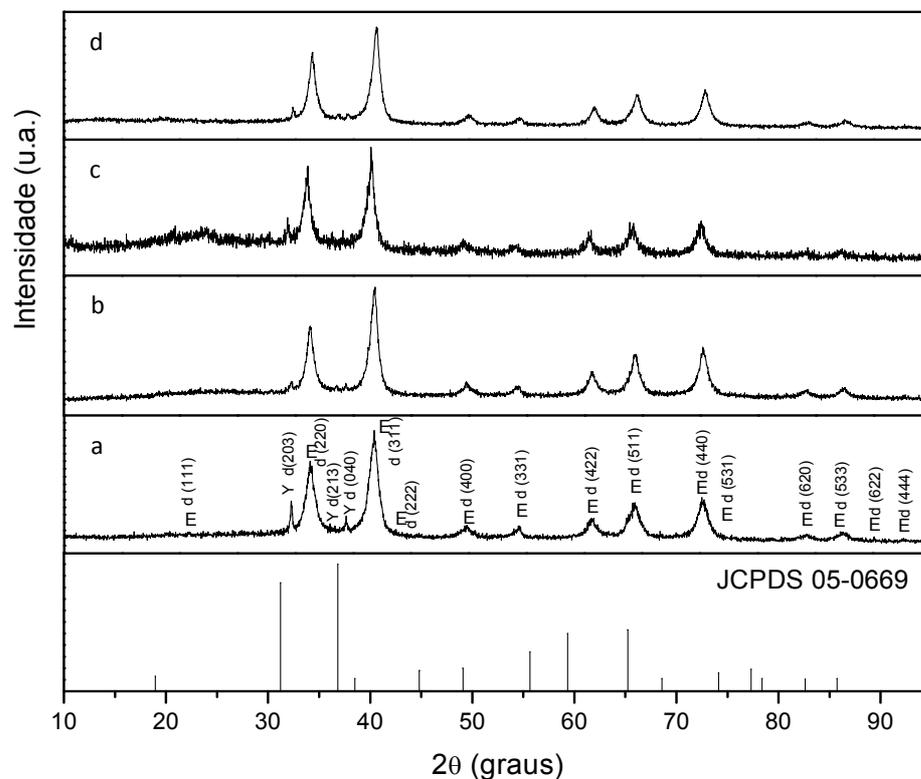
A placa foi então incubada por mais 3 horas, nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 µL de isopropanol (*Mallinckrodt Chemical*) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland*) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100 % de viabilidade. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Materiais (CERTBIO), da Universidade Federal de Campina Grande, PB.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Difração de Raios X

Na Figura 13 pode ser visualizado os difratogramas de raios X para as NPLs (amostra AZC), as NPLs silanizadas ( $AZC/SiO_2$ ), e as NPLs antes e após funcionalização com quitosana ( $AZC_Q$ ) e glutaraldeído ( $AZC_G$ ) respectivamente. Mediante as curvas de difração, observa-se para as NPLs de AZC, a amostra silanizadas e as funcionalizadas, a presença de 14 picos referentes à fase majoritária cristalina cúbica do espinélio normal  $ZnAl_2O_4$  identificado pela ficha cristalográfica JCPDS 05-0669, e presença de 3 picos referente a fase secundária do  $Al_2Yb_4O$  identificada mediante a ficha cristalográfica JCPDS 32-0029.

Figura 13 - Difratogramas de raios X: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs de  $AZC/SiO_2$ , (c) NPLs funcionalizadas com quitosana ( $AZC_Q$ ) e (d) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído ( $AZC_G$ ).



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

A presença da segunda fase possivelmente surge por consequência da diferença dos raios iônicos dos íons  $\text{Yb}^{3+}$  (0,75 Å) e  $\text{Er}^{3+}$  (0,85 Å) em relação ao raio iônico dos íons de  $\text{Al}^{3+}$  (0,88 Å) que é 15 e 3%, respectivamente. Como a diferença entre o tamanho dos raios iônicos dos íons  $\text{Yb}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  é 15%, o que é o limite de diferença para que possa ocorrer substituição entre estes íons para formar uma solução sólida parcial e também, como a quantidade dos íons  $\text{Yb}^{3+}$  utilizado para co-dopagem é consideravelmente mais elevado do que a quantidade dos íons  $\text{Er}^{3+}$ , a substituição é limitada e tende a ter um baixo limite de solubilidade na rede do espinélio  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ , conduzindo à formação da fase secundária  $\text{Al}_2\text{Yb}_4\text{O}$ . No caso dos íons de  $\text{Er}^{3+}$  facilmente substituem os íons de  $\text{Al}^{3+}$  na rede do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ , pois os raios iônicos possuem tamanho muito próximos.

Esta mesma característica estrutural foi reportada por Costa *et al.*, (2013), quando avaliaram a co-dopagem de 0,06 mol de (Yb:Er) na proporção de 2:1, 5:1 e 10:1 em uma matriz de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  por reação de combustão, cuja as fases secundárias relatadas foram  $\text{Yb}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$  e  $\text{ZnO}$ . Comparando os resultados obtidos por estes autores, com os resultados reportados neste trabalho para as NPLs de AZC sintetizada por reação de combustão na proporção de co-dopagem (Yb:Er) de 0,05 mol, verifica-se uma melhor eficiência no processo de síntese por reação de combustão, comprovada pela existência da presença da fase majoritária  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  e de apenas uma fase secundária  $\text{Al}_2\text{Yb}_4\text{O}$ .

A maior eficiência no processo de síntese por combustão é considerada, pelo fato de que neste trabalho de pesquisa a síntese foi realizada com uma fonte de aquecimento com resistência espiral (temperatura de 600 °C), e no trabalho reportado por Costa *et al.*,(2013) os autores utilizaram uma placa cerâmica com temperatura de 480 °C. A maior temperatura da fonte de aquecimento usada na síntese favorece a uma maior homogeneidade na reação e, possivelmente, a uma maior temperatura de combustão, que deve ter favorecido o aumento do limite de solubilidade dos íons Yb:Er na co-dopagem.

A influência da temperatura na característica estrutural do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  foi reportada por Garcia-Hipólito *et al.*, (2003), quando sintetizaram filmes de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  dopado com európio na concentração de 30 % em mol pelo processo deposição spray pirólise ultrasônica. Os autores reportaram que quando o material foi calcinado na temperatura de 500 °C, formou-se a fase hexagonal referente ao  $\text{ZnO}$  e com o

aumento da temperatura de calcinação para 550°C houve a formação apenas da fase cúbica do espinélio  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ .

Para as NPLs funcionalizadas com quitosana ( $\text{AZC}_Q$ ), Figura 14c, pode ser observado uma banda larga entre 15° e 25°, com pico centralizado em  $2\theta = 22^\circ$  referente à quitosana (ficha JCPDS 40-1518), e que todos os demais picos identificados do espinélio e da fase secundária sofreram um leve deslocamento para ângulos  $2\theta$  maiores e menores quando comparado com os picos identificados para a NPLs sem funcionalização. Analisando o pico referente à família de plano {311} observa-se um deslocamento de 0,27° para um ângulo  $2\theta$  menor. Isto é consequência da difusão do polímero quitosana na estrutura do espinélio, o que tende a causar um pequeno deslocamento estrutural, comprovando assim que as NPLs foram funcionalizadas.

Segundo Santos *et al.*, (2012), a quitosana apresenta três picos de difração próximos a 10°, 20° e 26°, bastante largos, o que indica que a quitosana possui uma estrutura sem ordenamento cristalino a longas distâncias interatômicas, gerando uma estrutura aleatória desordenada. Este polímero a ser incorporado pela funcionalização em nanopartículas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  dopadas com o íon  $\text{Eu}^{3+}$  apresentou nos difratogramas de raios X também o surgimento de uma banda em torno de 22° com deslocamento dos picos para ângulos menores comparado a amostra do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  sem funcionalização.

Ali *et al.*, (2011), utilizando a técnica de gelificação iônica construíram híbridos utilizando tripolifosfato de sódio e íons de prata e quitosana, os autores reportaram também a presença de um pico localizado em  $2\theta = 21,8^\circ$  correspondente a estrutura da quitosana. Isto comprova que o pico localizado em 22° observado neste trabalho corresponde a quitosana, o que indica a efetividade da funcionalização.

Para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído ( $\text{AZC}_G$ ), não foi identificado nenhum pico ou banda característico deste dialdeído, possivelmente pela sua característica mais amorfa que a quitosana. No entanto, foi observado também leve deslocamento para ângulos  $2\theta$  maiores e menores quando comparado com os picos identificados para a NPLs sem funcionalização. Analisando o pico referente à família de planos {311}, observa-se um deslocamento em torno de 0,19° para um ângulo  $2\theta$  maior, indicando também, que o glutaraldeído se difundiu na estrutura do espinélio, comprovando também que as NPLs foram funcionalizadas.

Na Tabela 3 encontram-se as intensidades, os planos (hkl), os respectivos ângulos de difração, e tamanho de cristalito calculados a partir dos dados de difração de raios X correspondente as NPLs de AZC. Observa-se que a fase majoritária  $ZnAl_2O_4$  apresentou dois conjuntos de planos que apresentam tamanho de cristalito na mesma ordem de tamanho. O primeiro conjunto de planos corresponde a 220, 311, 400, 511, 440, com tamanhos de cristalito de 9 e 10 nm. O segundo conjunto de planos corresponde a 331, 422, 620 e 533, com tamanhos de cristalito variando de 12 a 16 nm. Ainda foi observado que há cinco planos que não foram determinados o tamanho de cristalito devido ao “background” na análise da amostra.

Tabela 3 – Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para as NPLs de AZC.

<b>Fase Majoritária - <math>ZnAl_2O_4</math></b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b><math>2\theta</math></b>	<b>Tamanho cristalito</b>
3	111	19,19	n.d.
84	220	31,28	9
100	311	36,76	9
1	222	38,74	n.d.
8	400	44,74	10
10	331	49,28	14
24	422	54,92	16
40	511	59,26	9
43	440	65,24	10
1	531	66,42	n.d.
6	620	74,06	12
9	533	77,29	12
1	622	79,78	n.d.
<1	444	82,69	n.d.
<b>Fase Secundária - <math>Al_2Yb_4O</math></b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b><math>2\theta</math></b>	<b>Tamanho cristalito</b>
80	203	29,64	15
16	213	32,79	n.d.
25	040	34,47	15

n.d. – não determinado  
 Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Para a segunda fase verificou-se que os tamanhos de cristalito determinados são na mesma ordem de grandeza 15 nm e que estão dentro da faixa de valores do tamanho de cristalito calculado para a fase majoritária do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ . De modo geral, pode-se afirmar que todas as curvas de difração para as NPLs com elevada largura basal e baixa intensidade, o que indica um material com característica de partículas em escala nanométrica. Isto é comprovado pelos valores de tamanho de cristalito determinados na faixa de 9 a 16 nm.

Na Tabela 4 pode ser observado as intensidades, os palnos (hkl), os respectivos ângulos de difração, e tamanho de cristalito calculados a partir dos dados de difração de raios X correspondente as NPLs silanizadas  $\text{AZC/SiO}_2$ .

Tabela 4 – Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para as NPLs de  $\text{AZC/SiO}_2$ .

<b>Fase Majoritária - <math>\text{ZnAl}_2\text{O}_4</math></b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b><math>2\theta</math></b>	<b>Tamanho cristalito</b>
3	111	19,19	n.d.
84	220	31,26	11
100	311	36,77	11
1	222	38,74	n.d.
8	400	44,80	11
10	331	49,28	n.d.
24	422	55,61	11
40	511	59,30	11
43	440	65,21	11
1	531	66,46	22
6	620	74,01	12
9	533	77,28	12
1	622	79,78	n.d.
<1	444	82,69	n.d.
<b>Fase Secundária - <math>\text{Al}_2\text{Yb}_4\text{O}</math></b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b><math>2\theta</math></b>	<b>Tamanho cristalito</b>
80	203	29,64	n.d.
16	213	32,79	n.d.
25	040	34,47	n.d.

n.d. – não determinado  
 Fonte: PRÓPRIA, 2013.

A partir dos dados visualizados na Tabela 4, pode ser observado que a fase majoritária  $ZnAl_2O_4$  apresentou dois conjuntos de planos que apresentam tamanho de cristalito na mesma ordem de tamanho. O primeiro conjunto de planos corresponde a 220, 311, 400, 422, 511, 440, 620 e 533 com tamanhos de cristalito de 11 e 12 nm. O segundo conjunto de planos corresponde apenas ao plano 531, com tamanhos de cristalito de 22 nm. Da mesma forma que para as NPLs AZC, as amostras silanizadas também apresentaram cinco planos que não foram determinados o tamanho de cristalito devido ao “background” na análise da amostra.

Para a segunda fase desta amostra  $AZC/SiO_2$  não foram detectados os tamanhos de cristalito para nenhum dos planos identificados também possivelmente devido ao *background* na análise da amostra.

Nas Tabelas 5 e 6 encontram-se as intensidades, os planos (hkl), os respectivos ângulos de difração, e tamanho de cristalito calculados a partir dos dados de difração de raios X correspondente as NPLs funcionalizadas com quitosana  $AZC_Q$  e glutaraldeído  $AZC_G$ , respectivamente.

Os conjuntos de planos observados para as NPLs funcionalizadas com a quitosana  $AZC_Q$  (Tabela 5) para a fase majoritária  $ZnAl_2O_4$ , que apresentam tamanho de cristalito na mesma ordem de tamanho, foram divididos em três conjuntos. O primeiro conjunto de planos corresponde a 311, 511 e 440, com tamanhos de cristalito de 12 e 13 nm. O segundo conjunto de planos corresponde a 400 e 422, com tamanhos de cristalito variando de 16 a 17 nm. O terceiro corresponde apenas ao plano 220 com tamanho de cristalito igual a 28 nm. Para esta amostra foi observado que há oito planos que não foram determinados o tamanho de cristalito devido ao *background* na análise da amostra.

Para a segunda fase verificou-se o tamanhos de cristalito apenas para o plano 203, com tamanho de 15 nm. Para os planos 213 e 040 o tamanho de cristalito não foi calculado devido ao *background* das amostras. Ainda nesta Tabela 5, pode ser observada a presença de um  $2\theta$  em torno de  $22,07^\circ$ , que foi relacionada a presença da quitosana na amostra, com tamanho de cristalito de 10nm.

Para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído  $AZC_G$  pode ser observado na Tabela 6 para fase majoritária  $ZnAl_2O_4$  a presença de dois conjuntos de planos que apresentam tamanho de cristalito na mesma ordem de tamanho. O primeiro conjunto de planos corresponde a 220, 311, 400, 331, 422, 511, 440, 620 e 533 com tamanhos de cristalito de 9 e 12 nm. O segundo conjunto é formado por único plano

531, que corresponde a um tamanho de cristalito de 18nm. Quatro dos planos observados não foram determinados o tamanho de cristalito devido ao “background” na análise da amostra.

Tabela 5 – Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para a amostra AZC<sub>Q</sub>.

<b>Fase Majoritária - ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b>2θ</b>	<b>Tamanho de cristalito (nm)</b>
3	111	19,68	n.d.
84	220	31,78	28
100	311	36,49	12
1	222	38,74	n.d.
8	400	44,49	16
10	331	49,28	n.d.
24	422	55,38	17
40	511	59,06	12
43	440	64,97	13
1	531	66,42	n.d.
6	620	74,06	n.d.
9	533	77,34	n.d.
1	622	79,78	n.d.
<1	444	82,41	n.d.
<b>Fase Secundária - Al<sub>2</sub>Yb<sub>4</sub>O</b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b>2θ</b>	<b>Tamanho de cristalito</b>
80	203	29,32	21
16	213	32,79	n.d.
25	040	34,47	n.d.
<b>Quitosana - QS</b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b>2θ</b>	<b>Tamanho de cristalito</b>
20	-	22,07	10

n.d. – não determinado  
 Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Para a segunda fase desta amostra AZC<sub>G</sub> não foram detectados os tamanhos de cristalito para nenhum dos planos identificados também devido ao *background* na análise da amostra.

Estes resultados sugerem que mesmo após a funcionalização as amostras contêm elevada largura basal e baixa intensidade, indicando que o material apresenta característica de partículas em escala nanométrica, comprovado pelos valores de tamanho de cristalito determinados na faixa de 9 a 28 nm.

Tabela 6 – Dados estruturais obtidos a partir dos resultados de DRX para a amostra AZC<sub>G</sub>.

<b>Fase Majoritária - ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b>2θ</b>	<b>Tamanho cristalito</b>
3	111	19,06	n.d.
84	220	31,44	11,07
100	311	36,95	10,74
1	222	38,74	n.d.
8	400	44,96	9,39
10	331	49,31	12,31
24	422	55,78	12,15
40	511	59,48	11,12
43	440	65,37	11,35
1	531	66,54	18,96
6	620	74,19	10,37
9	533	77,51	12,20
1	622	79,78	n.d.
<1	444	82,69	n.d.
<b>Fase Secundária - Al<sub>2</sub>Yb<sub>4</sub>O</b>			
<b>Intensidade</b>	<b>hkl</b>	<b>2θ</b>	<b>Tamanho cristalito</b>
80	203	29,78	n.d.
16	213	33,74	n.d.
25	040	34,46	n.d.

n.d. – não determinado  
Fonte: PRÓPRIA, 2013.

O tamanho de cristalito referente à fase majoritária para a família de planos {311} e a cristalinidade para as NPLs antes e após funcionalização encontram-se na Tabela 7. A partir destes dados pode ser observado que o tamanho de cristalito das NPLs sem funcionalizar (AZC) foi 12 nm. Comparando este valor com das NPLs silanizadas e NPLs após funcionalização com a quitosana (AZC<sub>Q</sub>) e com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>), que foi de 11, 9 e 11 nm, observou-se uma pequena diferença

de 8,33, 25 e 8,33 %, respectivamente, contudo observa-se que estes valores estão dentro da mesma ordem de grandeza.

Quanto a cristalinidade, observou-se que as NPLs sem funcionalizar foi 51 % e após a silanização e a funcionalização com quitosana e com glutaraldeído sofreram um decréscimo nesse percentual para 20 %, 9% e 11 %, respectivamente. Esta pequena diferença no tamanho do cristalito e na cristalinidade pode ser atribuída ao alargamento do pico e redução na intensidade devido à presença da quitosana e do glutaraldeído que são de característica amorfa.

Tabela 7 - Tamanho de cristalito referente à fase majoritária para a família de planos {311} e a cristalinidade das NPLs de AZC, NPLs de AZC/SiO<sub>2</sub> e após funcionalização com quitosana (AZC<sub>Q</sub>) e glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>).

<b>Amostra</b>	<b>Cristalinidade (%)</b>	<b>Tamanho de cristalito (nm)</b>
<b>AZC</b>	51	12
<b>AZC/SiO<sub>2</sub></b>	31	11
<b>AZC<sub>Q</sub></b>	42	9
<b>AZC<sub>G</sub></b>	40	11

Fonte: PRÓPRIA, 2013.

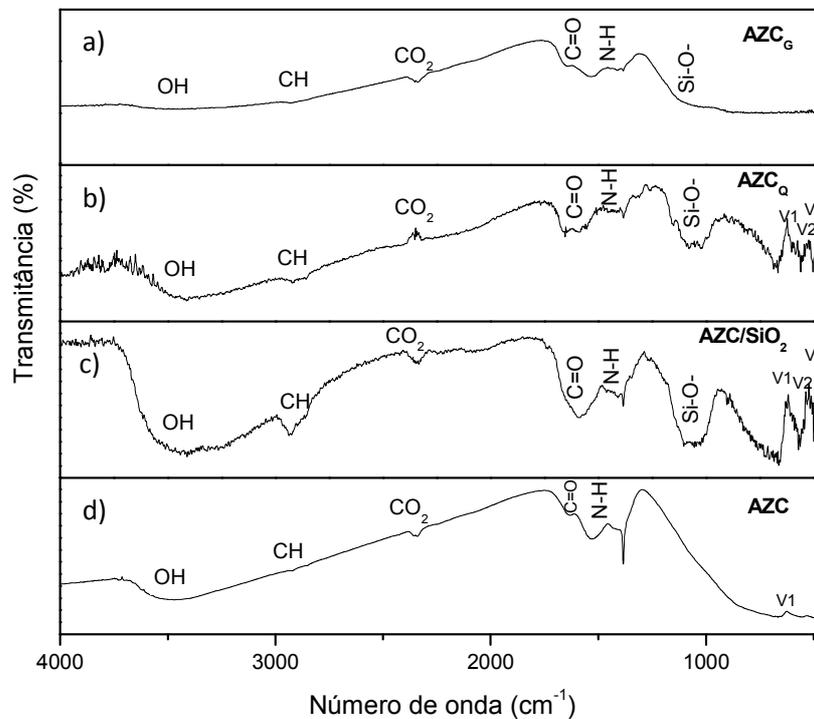
Costa Júnior e Mansur (2008), quando estudaram o efeito da reticulação de filmes de quitosana com o glutaraldeído, observaram que ocorre uma redução na cristalinidade a medida que se aumentou a concentração do glutaraldeído. Este resultado é semelhante aos resultados observado na amostra funcionalizada com glutaraldeído neste trabalho de pesquisa.

O tamanho de cristalito referente à fase majoritária ( $d_{311}$ ) para a amostra AZC foi de 12 nm. Kumar *et al.*, (2012), ao sintetizarem pelo método sol-gel nanopartículas de ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dopada com európio obtiveram tamanho médio de cristalito de 20 nm. Comparando este resultado com o resultado obtido neste trabalho pesquisa, verificou-se que a síntese por reação de combustão possibilitou a obtenção de material com tamanho aproximadamente 60 % menor que o material obtido pelo método sol-gel, que indica a eficiência do método de síntese por reação de combustão na produção de nanopartículas.

## 4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 14, encontram-se os espectros vibracionais na região do infravermelho na faixa de  $4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$  para as NPLs de AZC, as NPLs silanizadas ( $\text{AZC/SiO}_2$ ), e as NPLs antes e após funcionalização com quitosana ( $\text{AZC}_Q$ ) e glutaraldeído ( $\text{AZC}_G$ ) respectivamente, obtidos por reação de combustão.

Figura 14. Espectro vibracional na região do infravermelho com Transformada de Fourier: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs silanizadas ( $\text{AZC/SiO}_2$ ); (c) NPLs funcionalizadas com quitosana ( $\text{AZC}_Q$ ) e (d) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído ( $\text{AZC}_G$ ).



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Para as NPLs sem funcionalização ( $\text{AZC}$ ), observa-se uma banda de estiramento de ligações O-H em torno  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , referente à água adsorvida. Em torno de  $2326 \text{ cm}^{-1}$  e de  $2340 \text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda de estiramento  $\text{CO}_2$ . Esta banda pode ser atribuída aos gases remanescentes oriundo da combustão que não foi totalmente removido durante a síntese. Observa-se que há tendência para a formação das bandas  $v_1$ ,  $v_2$  e  $v_3$  referentes ao espinélio  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  abaixo de  $1000 \text{ cm}^{-1}$ . Waldron (1955) e Hafner (1961) atribuíram à banda  $v_1$  as vibrações intrínsecas dos

sítios tetraédricos e a banda  $\nu_2$  às dos sítios octaédricos. Para uma terceira banda  $\nu_3$  que foi observada na faixa abaixo de  $400\text{ cm}^{-1}$ , eles associaram com as vibrações do íon metal entre os campos de força dos seus vizinhos octaédricos ou tetraédricos.

Singh *et al.*, (2008), ao analisar o espectro de FTIR de amostras de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  dopado com manganês obtido por reação de combustão, utilizando mufla como fonte de aquecimento, também observaram bandas em torno de  $3435\text{ cm}^{-1}$ , que foram atribuídas a presença de estiramentos OH, e uma banda em  $1627\text{ cm}^{-1}$  identificada como deformações dos OH da molécula de água e bandas em 662, 555 e  $495\text{ cm}^{-1}$  atribuídas como vibrações intrínsecas dos sítios tetraédricos e octaédricos. Comparando os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa com os resultados dos autores citados verificam-se as mesmas características das vibrações, com exceção das três bandas referentes ao espinélio, que para NPLs AZC apenas observa-se uma tendência para formação das bandas.

Para as amostras silanizadas e para as funcionalizadas com quitosana além das bandas visualizadas para NPLs sem funcionalização (AZC) observa-se as bandas  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  e  $\nu_3$  abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  referente ao espinélio  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  e bandas em torno de  $1100\text{ cm}^{-1}$  e  $1032\text{ cm}^{-1}$  que correspondem ao estiramento assimétrico Si-O-, proveniente da modificação da superfície com agente silano 3-aminopropiltrimetoxisilano.

Ozmen *et al.*, (2009) ao caracterizar moléculas de pérolas vítreas silanizada com o agente 3-aminopropiltrióxido de silano e superfície modificada com o glutaraldeído observaram bandas entre  $900$  e  $1170\text{ cm}^{-1}$  e atribuíram a este mesmo estiramento Si-O-, sugerindo que houve silanização do material de forma semelhante ao que é sugerido neste trabalho.

Ainda pode ser observado para a NPLs AZC<sub>Q</sub> em torno de  $1646\text{ cm}^{-1}$  uma banda de grupamentos C=O, sendo uma contribuição da quitosana, e uma de  $1500\text{ cm}^{-1}$  correspondente à deformação angular assimétrica de N-H (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Essas bandas características da quitosana foram observadas por Sionkowska *et al.*, (2006), quando estudaram a influência da irradiação UV na superfície de filmes de quitosana.

Para as amostras funcionalizadas com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) observa-se que abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  há apenas uma tendência de formação de uma banda referente ao espinélio  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  e que, assim como para as NPLs AZC<sub>Q</sub>, existem a presença de

bandas em torno de  $1100\text{ cm}^{-1}$  e  $1032\text{ cm}^{-1}$  que correspondem ao estiramento assimétrico Si-O-, proveniente da modificação da superfície.

Na região em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , relacionada aos grupos aldeídos livres (C=O), não se observa variação desta banda entre os espectros das NPLs não funcionalizadas (AZC) com as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído  $AZC_G$ . Como o glutaraldeído é um dialdeído (com presença de dois grupos funcionais -CH=O), era esperado um aumento na percentagem de transmitância para as NPLs  $AZC_G$ , o que sugere que todo o glutaraldeído foi ligado as NPLs silanizadas. Mamiński e Pawlicki (2006), estudando o efeito da mistura entre o glutaraldeído e resina comercial, fizeram uma análise de FTIR do glutaraldeído isolado e acrescido da resina e observaram que quando o glutaraldeído está isolado se é observado uma banda em  $1720\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupamento C=O, no entanto, quando analisaram o glutaraldeído misturado com a resina ocorreu um desaparecimento desta banda, sendo este fato uma evidência de que provavelmente o glutaraldeído foi incorporado a estrutura da resina.

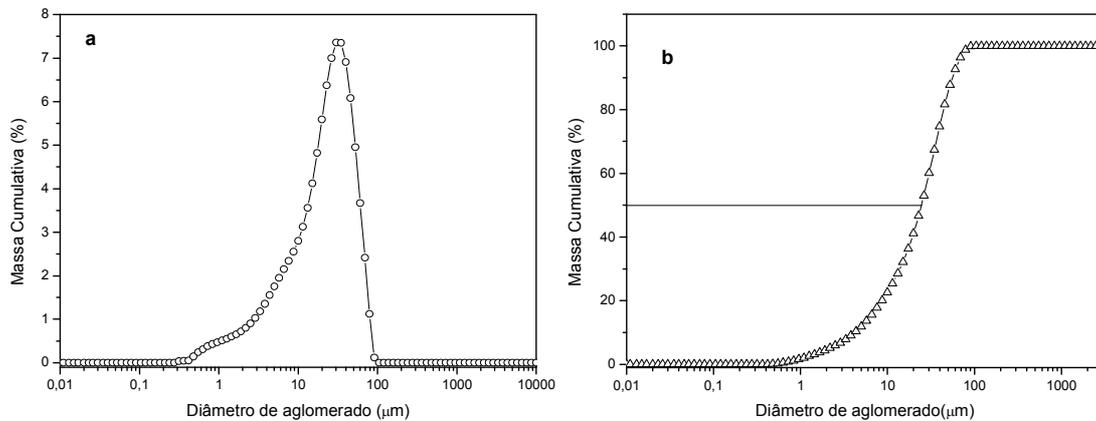
### 4.3 Distribuição Granulométrica

Nas Figuras 15, 16 e 17 encontra-se representada as curvas dos valores de diâmetro esférico equivalente de aglomerados em função da massa cumulativa para as NPLs de AZC, obtido por reação de combustão, e após funcionalização com a quitosana ( $AZC_Q$ ) e glutaraldeído ( $AZC_G$ ).

Na Figura 15a observa-se que o histograma para as NPLs de AZC, é do tipo monomodal, com distribuição assimétrica e relativamente estreita. Na Figura 15b pode ser visualizada a curva de distribuição das partículas onde se observa diâmetro de aglomerado mediano D50% de  $25\text{ }\mu\text{m}$  e D90% de  $56\text{ }\mu\text{m}$ , com tamanho médio de aglomerados de partículas de massa cumulativa de  $28\text{ }\mu\text{m}$ .

Silva (2006) quando estudou a influência das terras raras itérbio e érbio na luminescência do  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  observou uma distribuição granulométrica relativamente estreita, com aglomerados de tamanhos medianos e com diâmetro em torno de  $15\text{ }\mu\text{m}$ . Os resultados obtidos por Silva diferem dos obtidos nesse trabalho de pesquisa apenas por resultar em um diâmetro médio de aglomerado superior ( $28\text{ }\mu\text{m}$ ) ao diâmetro médio observado no trabalho deste autor.

Figura 15 - Distribuição granulométrica para as NPLs de AZC: (a) histograma e (b) curva de distribuição.

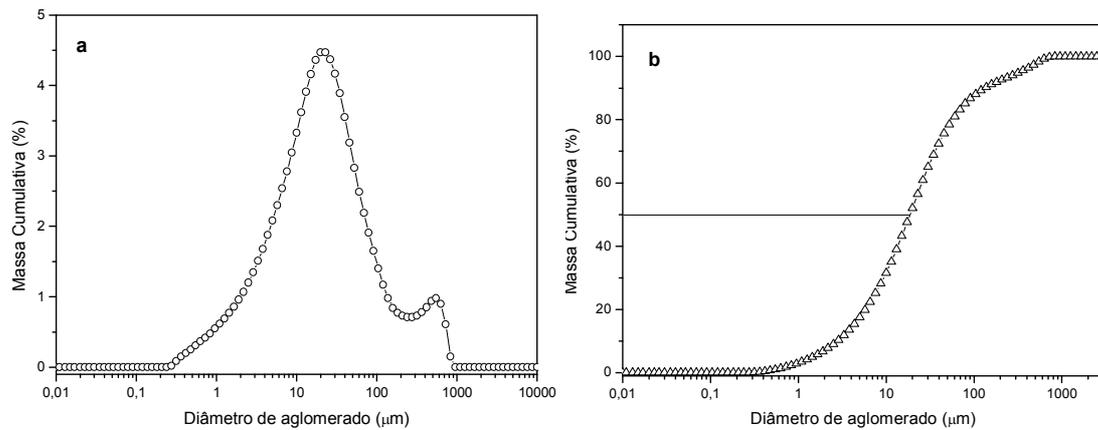


Fonte: PRÓPRIA, 2013.

A Figura 16a ilustra o histograma para as NPLs de  $AZC_Q$  onde se observa aglomerados de partículas com distribuição larga, bimodal e simétrica. Na Figura 16b pode ser visualizada a curva de distribuição das partículas onde se observa partículas com tamanho de diâmetro mediano  $D50\%$  de 18  $\mu\text{m}$ , e  $D90\%$  de 106  $\mu\text{m}$ , com tamanho médio de aglomerados de partículas de massa cumulativa de 44  $\mu\text{m}$ .

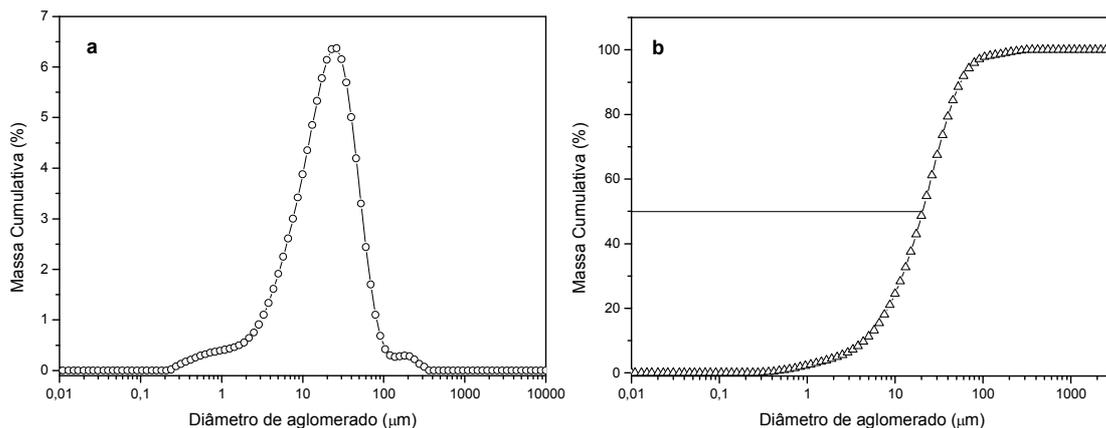
Para NPLs funcionalizada com glutaraldeído ( $AZC_G$ ) o histograma pode ser visualizado na Figura 17a, onde também se constata que há presença de aglomerados de partículas com distribuição relativamente estreita, bimodal e simétrica. Na Figura 17b visualiza-se a curva de distribuição das partículas onde se observa que o tamanho do diâmetro  $D50\%$  foi de 21  $\mu\text{m}$ , e  $D90\%$  foi de 56  $\mu\text{m}$ . O tamanho médio de aglomerados de partículas de massa cumulativa de 28  $\mu\text{m}$ .

Figura 16 - Distribuição granulométrica para as NPLs funcionalizadas com quitosana ( $AZC_Q$ ): (a) histograma e (b) curva de distribuição.



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Figura 17 - Distribuição granulométrica para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído ( $AZC_G$ ): (a) histograma e (b) curva de distribuição.



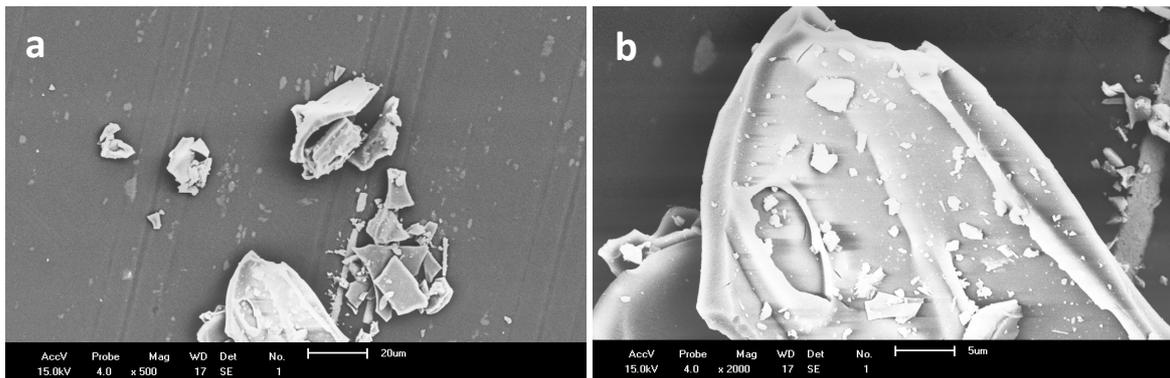
Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Comparando os histogramas das Figuras 15a, 16a e 17a observa-se que a amostra antes da funcionalização ( $AZC$ ) era do tipo monomodal e, após a funcionalização com quitosana ( $AZC_Q$ ) e com glutaraldeído ( $AZC_G$ ), esta distribuição tornou-se bimodal. Observa-se ainda que após a funcionalização com a quitosana ocorreu um considerável alargamento na distribuição quando comparado a amostra antes da funcionalização e funcionalizada com o glutaraldeído ( $AZC_G$ ), além de ter ocorrido um aumento considerável no tamanho mediano de partícula.

#### 4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das NPLs de AZC obtidas por reação de combustão e após a funcionalização pode ser observada nas Figuras 18, 19, e 20, visualizadas em escala de 20 e 5  $\mu\text{m}$ .

Figura 18 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as NPLS de AZC: (a) escala de 20 $\mu\text{m}$  e (b) escala de 5  $\mu\text{m}$ .

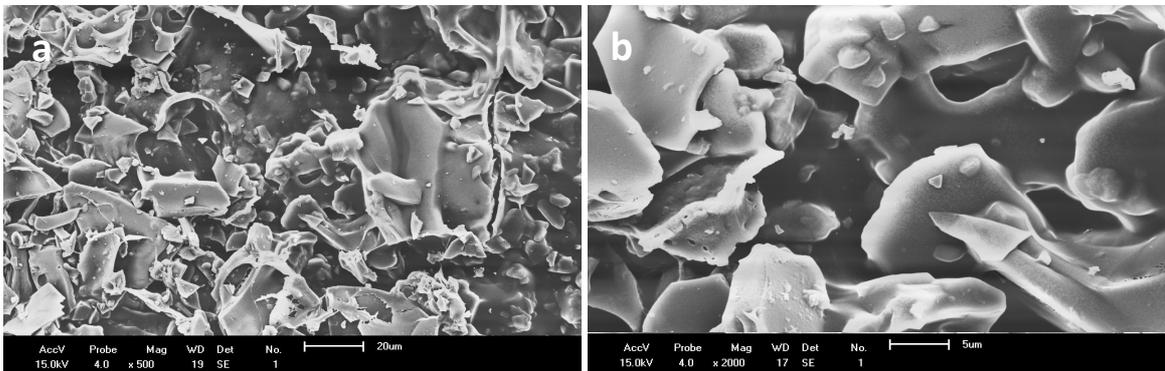


Fonte: PRÓPRIA, 2013.

As imagens obtidas por MEV para as NPLs AZC (Figura 18) demonstram a formação de aglomerados de partículas de formato irregular, não uniformes. Nesta fotomicrografia observa-se a presença de pequenos aglomerados provavelmente das fases secundárias sobre a superfície dos aglomerados maiores. Estes aglomerados são constituídos de partículas maiores e menores que 20  $\mu\text{m}$ .

Na Figura 19 observa-se a morfologia das nanopartículas funcionalizada com a quitosana (AZC<sub>Q</sub>), onde se visualiza uma morfologia não homogênea, composta por um filme e partículas impregnadas de formato irregulares, contendo fases amorfas e cristalinas. As partículas apresentaram tamanhos maiores e menores do que 20  $\mu\text{m}$ .

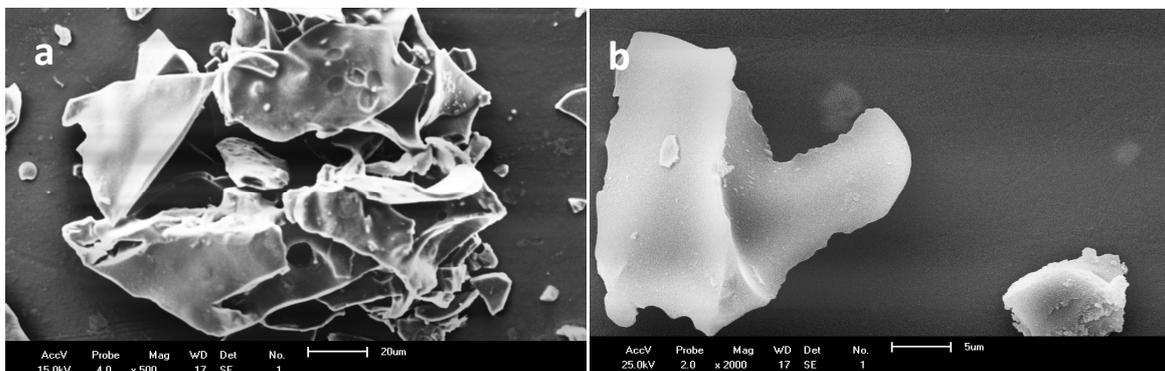
Figura 19 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as NPLS funcionalizada com quitosana ( $AZC_Q$ ): (a) escala de 20  $\mu\text{m}$  e (b) escala de 5  $\mu\text{m}$ .



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

A morfologia das nanopartículas funcionalizadas com glutaraldeído ( $AZC_G$ ) pode ser visualizada na Figura 20. A fotomicrografia indica a formação de aglomerados de partículas nanométricas compostas por fases amorfas e cristalinas. A maioria das partículas apresenta tamanhos maiores que 20  $\mu\text{m}$ .

Figura 20 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para as NPLS funcionalizada com glutaraldeído ( $AZC_G$ ):(a) escala de 20 $\mu\text{m}$  e (b) escala de 5  $\mu\text{m}$ .



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

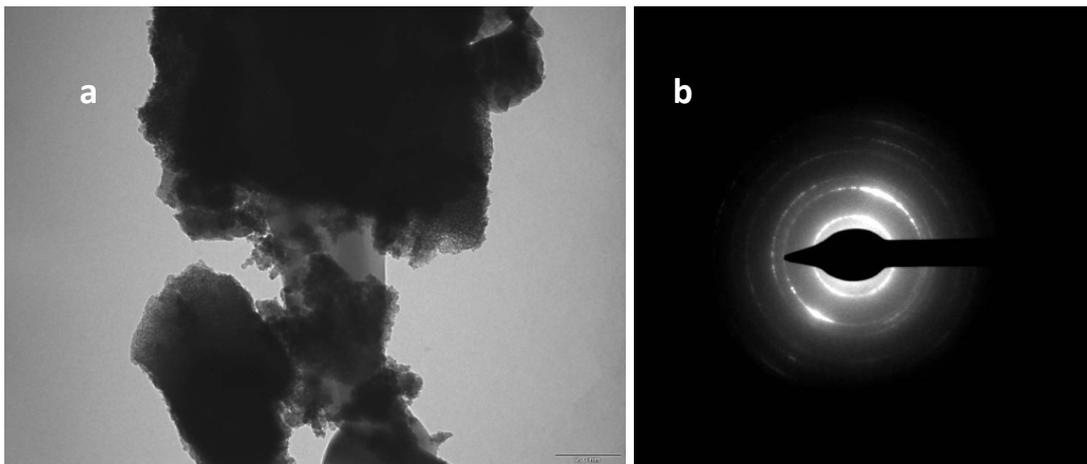
#### 4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na Figura 21 pode ser visualizada a morfologia das partículas determinadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em campo claro (DF), juntamente com o padrão de difração (SADPs) para as NPLs de AZC. Observa-se uma morfologia bastante heterogênea, constituída de aglomerados de partículas com formato aproximadamente esférico.

Para a amostra AZC, os tamanhos das partículas variam de 6 a 20 nm, e tamanho médio de 12 nm. Este mesmo padrão de partículas esféricas aglomeradas foi observado por Tshabalala *et al.*, (2012), quando analisaram nanopartículas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  codopado com os lantanídeos  $\text{Ce}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ , com tamanho médio de partículas de 20 nm de diâmetro. Visinescu *et al.*, (2011) ao sintetizar  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  por reação de combustão também observou uma tendência a formação de agregados não uniformes, com tamanho médio de partículas de 15,4 nm.

Desta forma, verifica-se que os resultados obtidos por estes autores estão em concordância com este trabalho de pesquisa pela formação de agregados heterogêneos, contudo observa-se um menor tamanho médio de partículas neste trabalho.

Figura 21 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para NPLs de AZC: (a) fotomicrografia e (b) padrão de difração (SADPs).

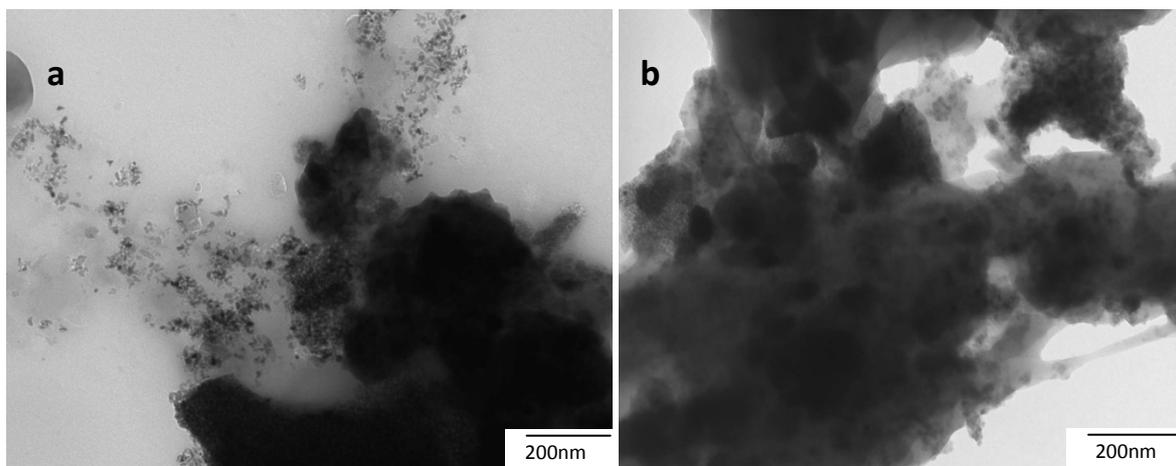


Fonte: PRÓPRIA, 2013.

No padrão de difração de elétrons se observa anéis concêntricos, com linhas bem definidas, que distam uma das outras por largas distâncias. Estes anéis que correspondem aos principais planos (hkl) pertencentes à fase do espinélio  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$ , comprovando a cristalinidade do material. A abertura selecionada permitiu revelar os principais anéis correspondentes a estrutura do espinélio. Zawadzki (2006), ao sintetizem amostras de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  por síntese micro-ondas/hidrotermal, afirmaram que as partículas por estarem aglomeradas não interferem na natureza cristalina do material confirmado pelo padrão de difração.

Na Figura 22a e 22b podem ser visualizadas a morfologia das partículas determinadas por MET, também em campo claro (DF) para as NPLs de  $AZC_Q$  e  $AZC_G$ . Em ambas as amostras também se observa uma morfologia bastante heterogênea, constituída de aglomerados de partículas com formato aproximadamente esférico.

Figura 22 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão para NPLs funcionalizadas: (a)  $AZC_Q$  e (b)  $AZC_G$ .



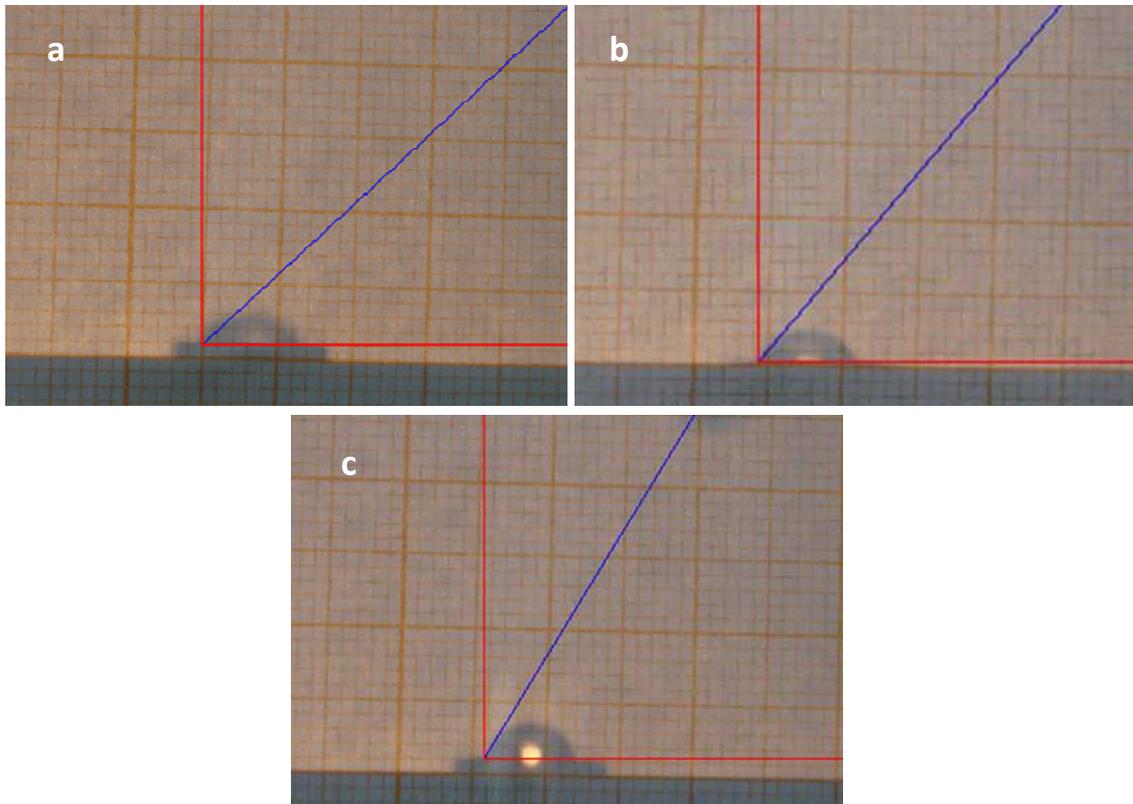
Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Os tamanhos de partículas para as amostras  $AZC_Q$  variam de 8,9 a 17,8 nm, e tamanho médio de 13,2 nm e para as amostras  $AZC_G$  variaram entre 10,7 nm e 17,8 nm e apresentaram tamanho médio de partícula de 12,8 nm. Comparando o tamanho médio de partículas das NPLs funcionalizadas com as NPLs  $AZC$ , se pode observar um aumento de 10 5% para  $AZC_Q$  e de 6,66 % para  $AZC_G$ .

#### 4.6 Tensão Superficial

O ângulo de contato para as NPLs de  $AZC$  antes e após a funcionalização com a quitosana ( $AZC_Q$ ) e com o glutaraldeído ( $AZC_G$ ) pode ser visualizados na Figura 23.

Figura 23 - Medida do ângulo de contato: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC<sub>Q</sub>) e (c) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>).



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Os resultados obtidos a partir de uma média obtida de cinco medidas para tensão superficial estão apresentados na Tabela 8. Verifica-se que tanto para as NPLs de AZC antes e após funcionalização com quitosana e com o glutaraldeído a medida obtida para o ângulo de contato foi menor que  $90^\circ$ , o que indicou o material possuir característica hidrofílica. No entanto, comparando os valores de ângulo de contato para as NPLs de AZC antes e após funcionalização, verifica-se que a funcionalização, seja com quitosana ou com glutaraldeído aumentou o valor do ângulo de contato em 10 e 21 %, respectivamente, indicando que as NPLs após funcionalização tendem a diminuir sua hidrofílicidade.

Tabela 8 - Resultados dos ensaios de tensão superficial realizado para as amostra AZC antes e após a funcionalização.

<i>Amostra</i>	<i>Ângulo de contato</i>
AZC	48°
AZC <sub>Q</sub>	53°
AZC <sub>G</sub>	58°

Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Segundo Macêdo *et al.*, (2011) a quitosana pura apresenta valores de ângulo de contato que vão de 60° a 83°. Então, o aumento do ângulo de contato nas NPLs quando funcionalizadas com quitosana é explicado pela presença da quitosana ligada as NPLs, o que comprova a efetividade da funcionalização.

Bañuls *et al.*, (2010) quando utilizaram o glutaraldeído para modificar quimicamente nitrato de silício, verificaram um aumento no valor do ângulo de contato após funcionalização e afirmaram que as nanopartículas tornaram-nas menos hidrofílicas. Deste modo, pode-se justificar o fato que a funcionalização das NPLs de AZC com o glutaraldeído resultou em um maior valor do ângulo de contato, tornando as NPLs ainda menos hidrofílicas que as NPLs funcionalizadas com quitosana, e aumentando sua tendência a ser hidrofóbica.

#### **4.7 Teste de Solubilidade**

Os resultados obtidos no teste de solubilidade para as NPLs AZC, AZC<sub>Q</sub> e AZC<sub>G</sub> utilizando o solvente água, etanol e ácido acético, levando em consideração a presença de um precipitado durante o teste, para o tempo de 20 minutos em agitação e em temperatura ambiente, demonstraram que as NPLs AZC e as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) apresentaram-se parcialmente solúveis nos diferentes solventes. Para as NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC<sub>Q</sub>) se apresentaram completamente insolúveis em água e etanol e parcialmente solúveis em ácido acético.

Nas Figuras 24, 25 e 26 estão ilustradas as NPLs AZC, AZC<sub>Q</sub> e AZC<sub>G</sub> quando colocadas nos diferentes solventes para o teste de solubilidade. A partir da visualização da Figura 24 pode ser confirmado que quando a água foi utilizada como solvente, para as amostras AZC e AZC<sub>G</sub>, houve formação de um precipitado, contudo estas nanopartículas apresentaram certa dispersão em água. Apenas as NPLs AZC<sub>Q</sub> não apresentaram qualquer dispersão de suas partículas em água.

Figura 24 - Teste de solubilidade das NPLs AZC, AZC<sub>Q</sub> e AZC<sub>G</sub> utilizando água como solvente.



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Quando o etanol foi utilizado como solvente, visualizado na Figura 25, também foi observado a formação de precipitados e o mesmo comportamento em relação à dispersão para as NPLs AZC, AZC<sub>G</sub> e AZC<sub>Q</sub>.

Figura 25 - Teste de solubilidade das NPLs AZC, AZC<sub>Q</sub> e AZC<sub>G</sub> utilizando etanol como solvente.



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Figura 26 - Teste de solubilidade das NPLs AZC, AZC<sub>Q</sub> e AZC<sub>G</sub> utilizando ácido acético como solvente.



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Contudo, quando as amostras foram colocadas no solvente ácido acético (Figura 26), as NPLs AZC<sub>Q</sub>, apresentaram dispersão das suas partículas neste solvente. Isto se deve ao fato de que a quitosana é um polímero natural solúvel em ácido acético. No entanto, como a quitosana está associada às NPLs AZC, a amostra AZC<sub>Q</sub> não foi totalmente solúvel, ficando ainda um pequeno precipitado observado no tubo. As demais amostras AZC e AZC<sub>G</sub> não apresentaram alterações na solubilidade quando colocadas em ácido acético, ou seja, também apresentaram dispersão e formação de um precipitado.

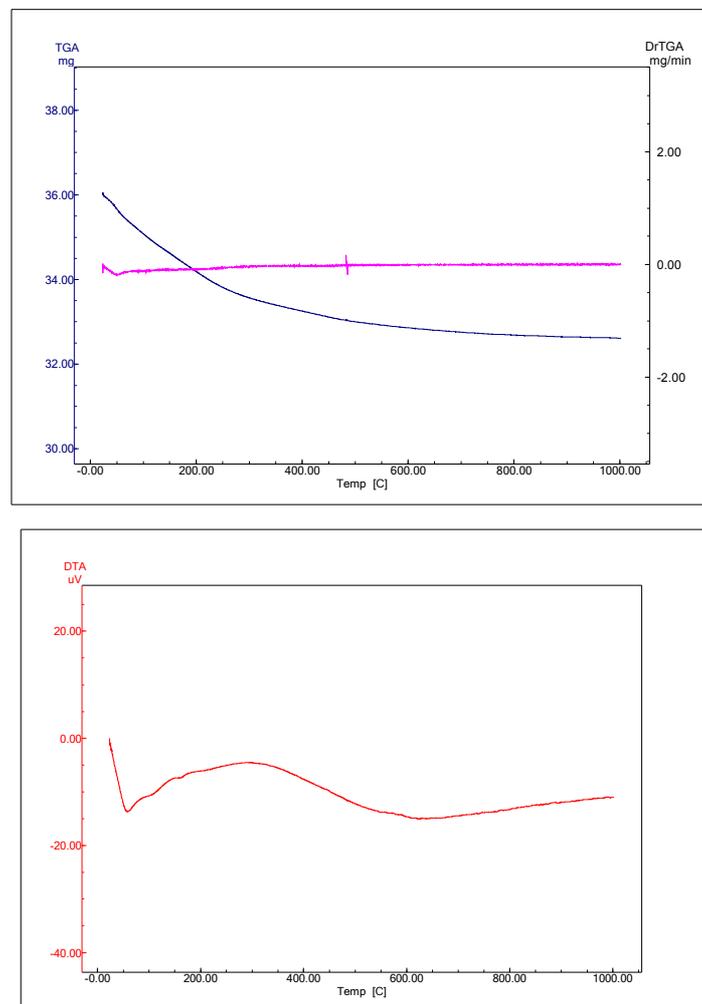
De acordo com Cho *et al.*, (2008), se as NPLs fossem completamente insolúveis em água ou outros solventes, poderiam gerar algumas preocupações ao nível da toxicidade e do risco para a saúde quando se deseja trabalhar com marcadores que serão introduzido por administração intravenosa. Pois se as NPLs fossem insolúveis em água, conseqüentemente, seriam insolúveis no sangue, assim dificultaria uma possível administração intravenosa. Contudo segundo o autor estes problemas podem ser minimizados com a modificação da superfície quimicamente utilizando moléculas solúveis em água, o que ajudará a solubilização no sangue, utilizando moléculas como peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. Além de que, é conhecido que para solutos que apresentam dispersão em diferentes solventes, pode-se inferir que um aumento do tempo em agitação mecânica e aumento de temperatura podem alterar o coeficiente de solubilidade do material. Deste modo, se aumentarmos estes parâmetros, as NPLs e os híbridos obtidos

poderiam se tornar completamente solúveis nestes solventes, e desta forma mais aptos para serem utilizados em meio biológico.

#### 4.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 27a e 27b ilustra os eventos observados a partir das curvas de TGA e DTA para as NPLs antes da funcionalização (AZC), a partir do quais pode determinar as temperaturas de decomposição e a perda de massa (%).

Figura 27 – Análises termogravimétricas para as nanopartículas obtidas por reação de combustão para as NPLs de AZC: (a) TGA/DrTGA; (b) Curva DTA.



(b)

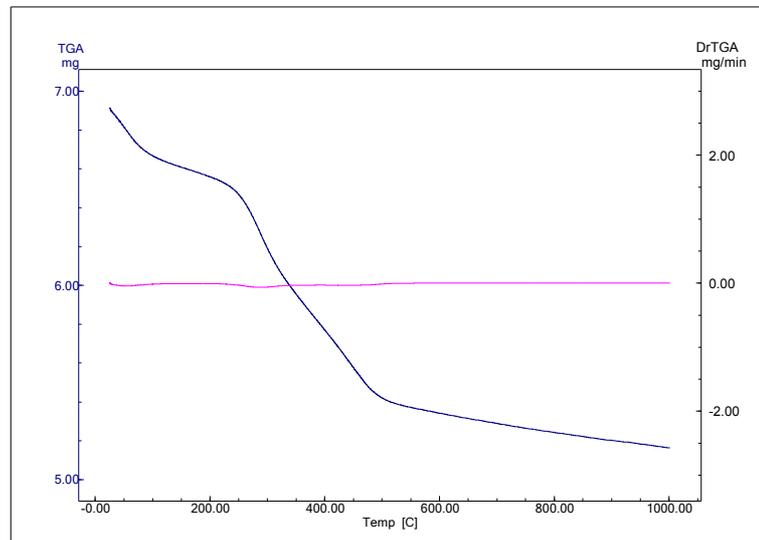
Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Ao visualizar as curvas relativas à TGA na Figura 28 a, pode-se observar que as NPLs de AZC apresentaram perda de massa total de 3,4 mg, equivalente a uma perda de massa percentual de 9,4 %, em três etapas de decomposição. A primeira etapa ocorre na faixa entre a temperatura ambiente (TA) e 170 °C com perda de massa de 4,4%, a segunda entre 170 e 608 °C também com perda de 4,4%, e a terceira de 608 até 1000 °C referente a uma perda de massa de 0,6%. A primeira perda de massa está associada a evaporação de água molecular adsorvida fisicamente, já que os reagentes são hidratados, e também à remoção de água residual do aluminato de zinco, conforme indica a literatura (GRABOSKA, ZAWADZKI e SYPER, 2006), sendo esta confirmada pelo pico endotérmico em 58 °C visualizado na curva DTA (Figura 28 b). Para a segunda perda de massa, se verifica a presença de um pico exotérmico em 291 °C, que está associado a recristalização do espinélio que pode ocorrer até 900 °C (PENG *et al.*, 2012)

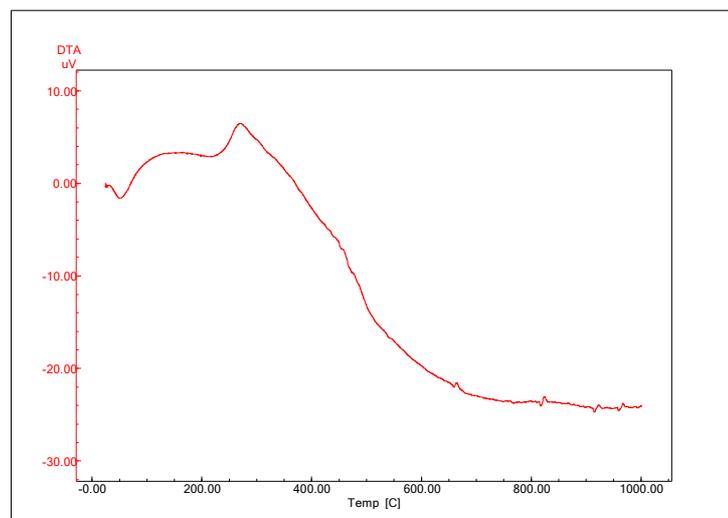
Zawadzki (2006) analisando curvas referentes a TGA de amostras de  $ZnAl_2O_4$  sintetizado pelo método micro-ondas/hidrotermal, observaram duas etapas de decomposição com perda de massa total de ~26 %, sendo a primeira decomposição iniciada na temperatura ambiente até 200°C e a segunda entre 220 e 350 °C. A primeira etapa de decomposição também foi associada a saída de água adsorvida e a segunda pela remoção de água impregnada na estrutura do aluminato de zinco. Este resultado difere dos obtidos neste trabalho de pesquisa por apresentar duas etapas de decomposição e também por não verificar a presença de um pico exotérmico na curva DTA sugerindo que não houve recristalização do espinélio formado.

A Figura 28 ilustra as curvas de DTA e TGA para as NPLs funcionalizadas com quitosana  $AZC_Q$ . Para esta mesma NPLs funcionalizada com quitosana ( $AZC_Q$ ) a perda de massa total ocorreu entre a temperatura ambiente (TA) e 1000 °C, sendo esta perda de aproximadamente 25 % em 3 etapas de decomposição. A primeira perda de massa ocorreu entre a temperatura ambiente e 126 °C, o que acarretou uma perda de massa de 0,284 mg, o que equivale a um percentual de massa de cerca de 4 % em relação a massa original. Na temperatura de 50 °C, observa-se um pico endotérmico na curva DTA, o que confirmando que a primeira fase de decomposição é relativa a saída de água adsorvida e gases remanescentes da combustão.

Figura 28 - Análises termogravimétricas para as nanopartículas obtidas por reação de combustão para as NPLs funcionalizadas com quitosana AZC<sub>0</sub>: (a) TGA/DrTGA; (b) Curva DTA.



(a)



(b)

Fonte: PRÓPRIA, 2013.

A segunda etapa de decomposição, ocorreu entre 126 à 515 °C, correspondente a uma perda de massa de 1,2 mg, equivalente a um percentual de 18 %, perda esta atribuída à degradação do material orgânico restante, bem como a condensação dos grupos silanóis. Neste intervalo observa-se na curva de DTA um pico exotérmico, que pode ser atribuído decomposição de grupos orgânicos e a desidratação de anéis de sacarídeos, de despolimerização e decomposição de unidades acetiladas e desacetiladas que formam a quitosana.

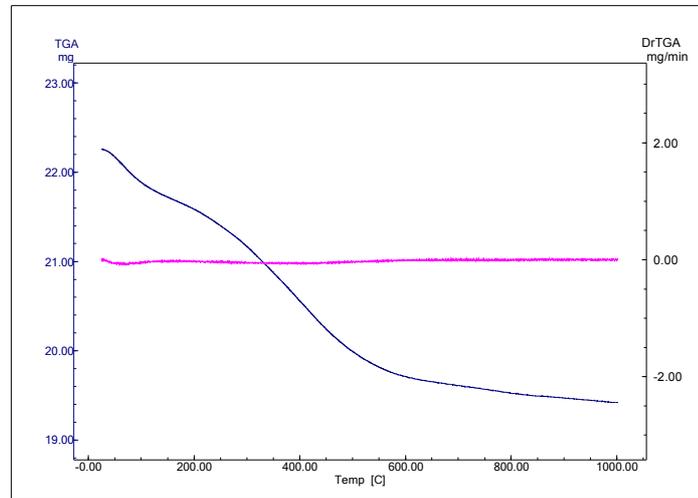
A terceira etapa de decomposição ocorreu na faixa de 515 -1000°C, onde se observa uma perda de massa de 0,237 mg, equivalente a aproximadamente 3%, associada as consecutivas reações de decomposição térmica da cadeia carbônica da quitosana.

Zawadzki e Kaczmarek, (2010) quando avaliaram o comportamento térmico da quitosana pura observaram três eventos de decomposição. O primeiro entre a temperatura ambiente e 100°C com perda de massa de 10 %, no qual foi atribuída a perda de água absorvida. A segunda perda de massa observada por este autor ocorreu entre 100 e 168°C com perda de aproximadamente 10%, que de acordo com os autores também é um evento típico da liberação de átomos de hidrogênio da molécula de água. A última etapa de perda de massa ocorreu entre 230 e 400° com perda de 43 %, que está relacionado à degradação da quitosana e perda de massa volátil, com quebra aleatória da cadeia polimérica, resultando em quebras dos anéis de piranose através de desidratação, desaminação e, finalmente, reação de abertura de anel.

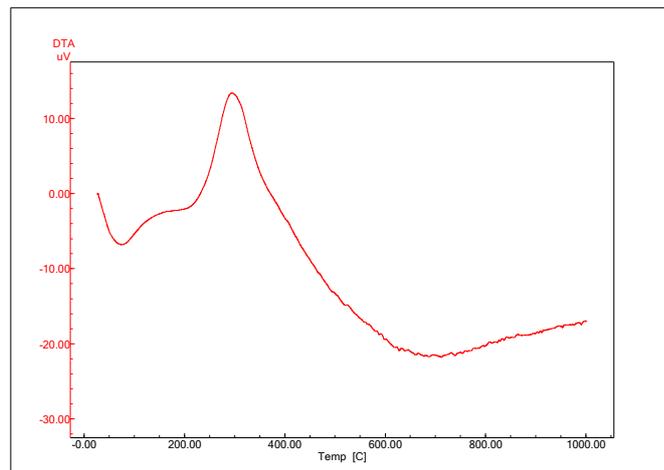
Comparando os resultados obtidos por estes autores com os dados de TGA obtidos no presente trabalho, observa-se que quando a quitosana está associada à matriz  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  a perda de massa total obtida neste trabalho foi de 25 %, sendo esta perda inferior a da quitosana pura que foi 63 %.

As curvas de TGA e DTA para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído  $\text{AZC}_G$  podem ser visualizadas na Figura 29 a e b. A curva termogravimétrica para amostra funcionalizada com glutaraldeído ( $\text{AZC}_G$ ) apresenta três etapas de decomposição, com perda de massa total 10,24 mg, correspondente a cerca de 12 % da massa inicial. A primeira etapa decomposição ocorreu a partir da temperatura ambiente (TA) até 213°C, com uma perda de massa de 0,722 mg, o que corresponde a 3 %, relativa a saída de água adsorvida. A segunda etapa de decomposição foi entre 213 à 597°C relativo a uma redução de massa de 1,825 mg, correspondente perda de 8 %, e a terceira etapa de decomposição entre 597 e 1000 °C, com redução de massa de 0,295 mg referente a uma perda de 1%, que podem ser atribuídas à decomposição da molécula carbônica do glutaraldeído. Ao comparar este resultado com o obtido para NPLs funcionalizadas com a quitosana ( $\text{AZC}_Q$ ), observa-se que houve uma leve redução na perda de massa, tornando as NPLs mais estáveis termicamente.

Figura 29 - Análises termogravimétricas para as nanopartículas obtidas por reação de combustão para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído  $AZC_G$ : (a) TGA/DrTGA; (b) Curva DTA.



(a)



(b)

Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Este mesmo comportamento foi observado por Anirudhan e Rijith (2009), quando reticularam a quitosana com o glutaraldeído para funcionar como um adsorvente para a remoção e recuperação de Cu (II) a partir de meios aquosos. Os autores verificaram um padrão diferente nas curvas termogravimétricas para quitosana pura e reticulada com o glutaraldeído. Para quitosana pura três etapas de decomposição entre 80–100, 230–310 e 430–590 °C com perda de massa total de 92 %, e para amostra reticulada estas etapas de decomposição ocorreram entre 80–100, 230–390 e 510–670 °C com perda de massa total de 82 %. Desta forma

constatarem uma redução na perda de massa quando utilizado o glutaraldeído na reticulação, tornando a quitosana mais estável termicamente.

A partir das curvas termogravimétricas observadas nas Figuras 24, 25 e 26, as temperaturas de decomposição dos diferentes eventos e a perda de massa (%) que ocorreram foram resumidas na Tabela 9.

Tabela 9 - Temperatura de decomposição e perda de massa durante a análise termogravimétrica para as amostras antes e após a funcionalização com quitosana e glutaraldeído.

<b>Amostra</b>	<b>Temperatura de Decomposição (°C)</b>	<b>Perda de Massa (%)</b>	<b>Perda de Massa Total (mg)</b>
<b>AZC</b>	TA -170	4,35	3,4
	170 - 608	4,40	
	608 - 1000	0,644	
<b>AZC<sub>Q</sub></b>	TA - 126	4,11	1,8
	126 -515	17,82	
	515-1000	3,43	
<b>AZC<sub>G</sub></b>	TA - 213,89	3,24	2,8
	213-597	8,2	
	597-1000	1,32	

Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Ao comparar os resultados obtidos para as NPLs antes e após a funcionalização observa-se que as NPLs funcionalizadas com a quitosana (AZC<sub>Q</sub>) apresentaram uma perda de massa superior a das NPLs antes da funcionalização (AZC) e das NPLs funcionalizadas com o glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>). Este fato pode ser justificado pelo fato da quitosana ser uma macromolécula polimérica que quando submetida a altas temperaturas tendem sofrer decomposição de sua cadeia liberando monômeros livres.

#### 4.9 Espectroscopia de luminescência

Na Figura 30 encontra-se ilustrado os espectros de emissão das amostras de espínélio  $\text{ZnAl}_{1,95}(\text{Yb:Er})_{0,05}\text{O}_4$  com proporções de co-dopante 5:1 de  $\text{Yb}^{3+}$  e  $\text{Er}^{3+}$

antes e após a funcionalização com quitosana e glutaraldeído sob excitação em 980 nm. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e usou-se uma lente de 100 mm para focalizar o feixe do laser, o qual produz uma densidade de excitação de  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

Emissões convertidas ascendentemente (UC) no verde e vermelho são observadas em  $\approx 525$  nm,  $\approx 549$  nm,  $\approx 574$  nm, e  $\approx 653$  nm, que correspondem às transições eletrônicas  ${}^2\text{H}_{11/2}$ ,  ${}^4\text{S}_{3/2}$ , e  ${}^4\text{F}_{9/2}$  para o estado fundamental do  $\text{Er}^{3+}$  ( ${}^4\text{I}_{15/2}$ ), respectivamente. Como as transições  ${}^4\text{I}_{15/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{11/2}$  ( $\text{Er}^{3+}$ ) e  ${}^2\text{F}_{7/2} \rightarrow {}^2\text{F}_{5/2}$  ( $\text{Yb}^{3+}$ ) são ressonantes com a frequência do laser, e a força do oscilador do  $\text{Yb}^{3+}$  é muito maior que do  $\text{Er}^{3+}$ , então o caminho dominante para a conversão ascendente de frequência inclui processos de transferência de energia (ET) envolvendo íons de  $\text{Yb}^{3+}$ .

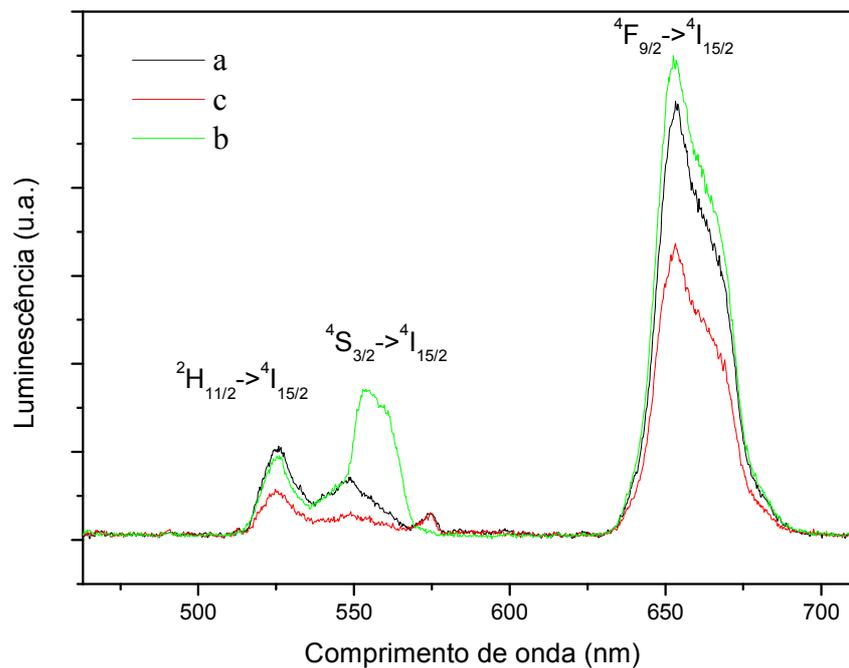
Lemos, Melo e Silva, (2005) quando analisaram espectros de emissão de uma matriz  $\text{PbTiO}_3$  codopada com os íons  $\text{Yb}^{3+}$  e  $\text{Er}^{3+}$  também observaram a presença destas 3 transições, confirmando a eficiência de transferência de energia no processo envolvendo os íons  $\text{Yb}^{3+} \leftrightarrow \text{Er}^{3+}$ . Lai *et al.*, (2010) estudando a co-dopagem com os íons  $\text{Yb}^{3+}$  e  $\text{Er}^{3+}$  em uma matriz de  $\text{YF}_3\text{-BaF}_2\text{-Ba}(\text{PO}_3)_2$  afirmaram que é possível perceber a ocorrência da relaxação cruzada provocada pela adição de um íon  $\text{Yb}^{3+}$  previamente excitado, o qual conduziu a uma excitação do íon érbio para níveis superiores pelo novo processo de transferência dado por  ${}^2\text{F}_{5/2} \leftrightarrow {}^2\text{F}_{7/2}$  ( $\text{Yb}^{3+}$ ) —  ${}^4\text{I}_{11/2} \leftrightarrow {}^4\text{F}_{7/2}$  ( $\text{Er}^{3+}$ ).

Ainda nesta Figura 30 pode ser observado que há variação das intensidades da luminescência UC das transições ( ${}^2\text{H}_{11/2}$ ,  ${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ ) e ( ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ ) quando se funcionaliza com quitosana e glutaraldeído. No entanto, a intensidade da luminescência alcança um nível máximo quando as NPLs são funcionalizadas com quitosana, onde a razão da intensidade máxima da luminescência da banda vermelha em 653 nm para a banda verde em 525/555 nm é  $\approx 4$ . A funcionalização das NPLs com quitosana e glutaraldeído, muda o campo cristalino circundante do  $\text{Er}^{3+}$  na matriz hospedeira do espinélio, o qual é observado claramente nos picos do espectro na Figura 30. Adicionalmente, o tamanho das partículas diminui com a funcionalização com quitosana (9 nm) e glutaraldeído (11 nm), como se pode observar na Tabela 8.

Para as NPLs funcionalizadas com quitosana ( $\text{AZC}_Q$ ) pode-se observar que a transição  ${}^4\text{F}_{9/2} - {}^4\text{I}_{15/2}$  ( $\sim 655\text{nm}$ ) para a cor vermelha foi mais intensa quando

comparado com a amostra antes da funcionalização (AZC). Com isso, sugere-se que houve a funcionalização das NPLs de AZC melhorando as propriedades luminescentes das NPLs. Por outro lado, a funcionalização utilizando glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) apresentou uma menor luminescência quando comparado com as NPLs antes de funcionalizar.

Figura 30 - Espectro de conversão ascendente: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC<sub>Q</sub>) e (c) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>).



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

Santos *et al.*, (2012) também confirmou este aumento de luminescência quando funcionalizou com quitosana nanopartículas de ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dopada com Eu<sup>3+</sup>. Os autores observaram que houve um aumento significativo na relação da intensidade de luminescência entre as NPLs antes e após a funcionalização, sugerindo que pode ter havido uma alteração na simetria ao redor do íon, com a possível migração dos íons para cavidades mais externas, de menor simetria.

Por outro lado, a funcionalização utilizando glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) apresentou uma menor luminescência quando comparado com a amostra antes de funcionalizar. Menezes (2006) sintetizou e caracterizou nanocristais de CdS/Cd(OH) sem e com funcionalização com glutaraldeído e observou nos espectros de emissão que o

processo de funcionalização como glutaraldeído não altera o perfil de banda de emissão dos nanocristais funcionalizados, embora resulte em uma diminuição considerável na intensidade da emissão destes. O autor atribui a esta diminuição na intensidade da emissão dos nanocristais à redução do pH da suspensão após a adição do glutaraldeído que pode ocasionar a corrosão parcial da camada de passivação dos nanocristais, interferindo diretamente na eficiência do processo de fotoluminescência.

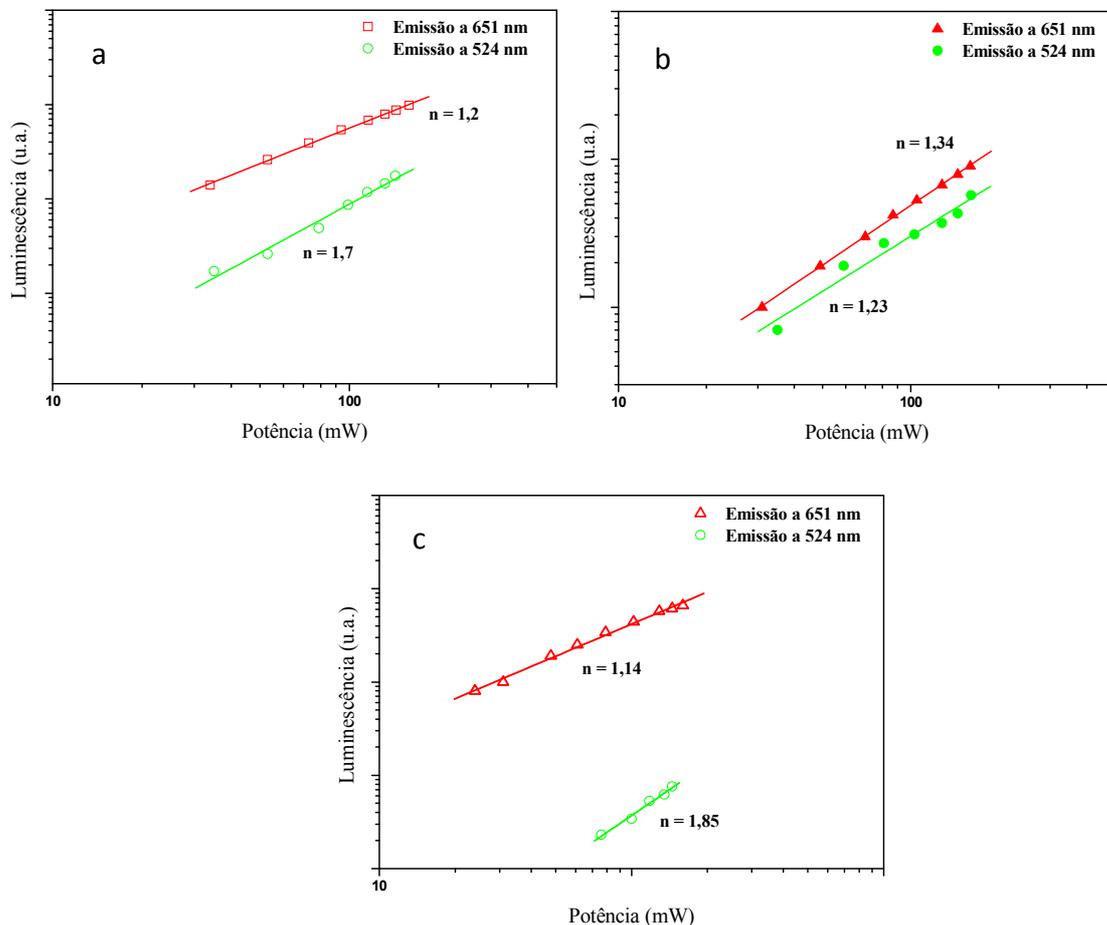
O processo de conversão ascendente de energia pode ser melhor entendido quando se refere a sua intensidade, para isso, utiliza-se os parâmetros de emissão ( $I_{up}$ ) com o aumento da potência infravermelha do diodo-laser ( $I$ ), e a intensidade de emissão *Up-Conversion* sendo proporcional ao valor “ $n$ ”. Tal mecanismo de excitações pode melhor representado por meio da equação 2:

$$I_{up} \propto I_{IR}^n \quad . \quad (2)$$

Onde ( $n = 2,3,4...$ ) representa o número de fótons absorvidos pelo infravermelho e o número de fótons visíveis emitidos. A partir desta equação construiu-se o gráfico  $\log(I_{up}) \times \log(I_{IR})$  resultando em uma linha reta com inclinação igual a  $n$ .

Na Figura 31 observa-se a dependência de intensidades verdes (~524 nm) e vermelhas (~651 nm) em função da potência para as NPLs de AZC antes e após a funcionalização com quitosana e com glutaraldeído. Para as NPLs de AZC (Figura 31a), pode-se observar que são dependências lineares com coeficientes de inclinação de 1,7 para o verde e de 1,2 para emissão vermelha. Estes resultados sugerem a absorção de dois fótons envolvidos nos processos de conversão ascendente de energia. Resultados semelhantes foram obtidos por Weng *et al.*, (2009) que sintetizaram uma matriz cerâmica de vidro contendo  $YF_3$  e co-dopadas com os íons lantanídeos Yb e Er e observaram o comportamento das bandas de emissão correspondentes 525, 546 e 657 nm sob a excitação de 975 nm, correspondentes as transições  $^2H_{11/2} - ^4I_{15/2}$ ,  $^2S_{3/2} - ^4I_{15/2}$  e  $^4F_{9/2} - ^4I_{15/2}$ , e obtiveram valores de  $n$  iguais a 1,74, 1,87 e 1,86.

Figura 31 - Dependência da intensidade de emissão verde e vermelha em função da potência: (a) NPLs de AZC, (b) NPLs funcionalizadas com quitosana (AZC<sub>Q</sub>) e (c) NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>).



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

A dependência de intensidades verdes (~524 nm) e vermelhas (~651 nm) em função da potência, para a amostra funcionalizada com quitosana, pode ser visualizado na Figura 31b, onde novamente observa-se que são dependências lineares, contudo apresentam coeficientes de inclinação de 1,23 para o verde e de 1,34 para emissões vermelhas.

Para as NPLs funcionalizadas com glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) pode ser visualizada na Figura 31c a dependência de intensidades verdes (~524 nm) e vermelhas (~651 nm) em função da potência, onde se observa que são dependências lineares com coeficientes de inclinação de 1,85 para o verde e de 1,14 para emissões vermelhas.

De modo geral, tanto para as NPLs sem e com funcionalização observou-se que a intensidade de luminescência verde não excedeu a emissão vermelha, isto significa que, o mecanismo de transferência de energia dos íons Yb para os íons Er

foi efetivo, visto que em todas as condições, a emissão vermelha excedeu a emissão verde.

Este mecanismo também foi reportado por outros pesquisadores e indicam que os resultados apresentados neste trabalho de pesquisa tese estão em concordância com a literatura. Entre alguns trabalhos que comprovam este mecanismo pode-se citar o trabalho de Liu, Wang e Chen (2007) que estudaram o efeito da concentração do  $\text{Yb}^{3+}$  no mecanismo de *up-conversion* do  $\text{Er}^{3+}$  dopados em uma matriz de óxido de lantânio e sintetizados por reação de combustão. Os autores observaram que quanto mais havia o aumento da concentração do íon  $\text{Yb}^{3+}$  mais intensa era a emissão em cor vermelha com concomitante redução da emissão em cor verde. Comprovando assim, a transferência de emissão entre dois fótons com predominância da emissão vermelha sobre a verde.

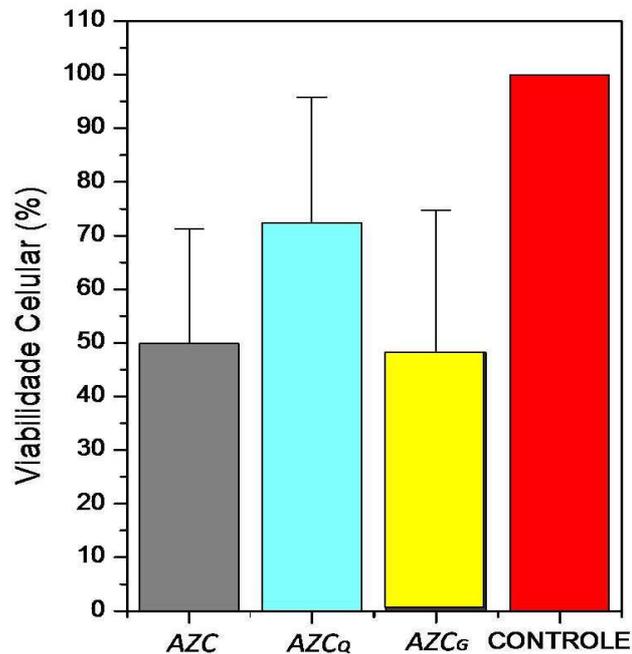
Outros processos podem também ocorrer e que não são explicados neste trabalho. Estes processos que dependem do ambiente atômico, das concentrações dos íons de  $\text{Er}^{3+}$  e  $\text{Yb}^{3+}$ , e das distâncias entre os íons podem levar a que outros processos de transferência de energia se tornem importantes.

#### **4.10 Avaliação da Viabilidade Celular pelo MTT**

O objetivo deste ensaio foi avaliar a viabilidade das células em face do material produzido (NPLs  $\text{AZC}$ ,  $\text{AZC}_Q$  e  $\text{AZC}_G$ ) para uso em organismos vivos. Se o material testado no ensaio não for citotóxico as células irão permanecer aderidas as cavidades de avaliação e irão proliferar ao longo do tempo, contudo se o material for citotóxico as células param de crescer, apresentando características citopáticas ou se descartam da cavidade (CRAIG e POWER, 2004).

A Figura 32 ilustra os resultados percentuais da viabilidade celular das NPLs antes e após a funcionalização testada e calculada pelo ensaio de MTT. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade e estão representadas na última coluna (CONTROLE = controle negativo).

Figura 32 - Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das NPLS antes da funcionalização (AZC), após funcionalização com a quitosana (AZC<sub>Q</sub>) e com o glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) e CONTROLE = controle negativo.



Fonte: PRÓPRIA, 2013.

A viabilidade celular obtida quando as células foram exposta as NPLs antes da funcionalização (AZC) foi de 50% como pode ser observado na Figura 32. De acordo com Bispo (2009), os valores mínimos requeridos para que o material em contato com a célula não seja citotóxico é de até 50% de células viáveis, desta forma, as NPLs estão dentro deste limite e podem ser considerados biocompatíveis.

Para as amostras funcionalizadas com quitosana esta porcentagem aumentou para 72 % de viabilidade celular, confirmando que a funcionalização das NPLs com a quitosana aumentou a biocompatibilidade. Desta forma, os valores obtidos neste teste, revelam as NPLs funcionalizadas com quitosana pode ser considerado compatível para uso como biomaterial, podendo-se, a partir dos resultados, pode ser inferido que as amostras são promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*.

Costa-Júnior *et al.*,(2009) sintetizaram partículas híbridas de PVA e quitosana nas proporções de 0:1, 1:3, 1:1, 3:1 e 1:0 respectivamente, reticuladas ou não com glutaraldeído a 1 e a 5 % e realizaram o teste de MTT para avaliar se este híbrido apresenta citotoxicidade. De acordo com os resultados obtidos por estes autores a viabilidade celular obtida após este ensaio variou entre 78 a 97 %, indicando que ambas as amostras analisadas não foram citotóxicas. Estes resultados confirmam

que o uso da quitosana associada a uma partícula inorgânica como o PVA ou isolada apresentam biocompatibilidade, não apresentando toxicidade a célula. Isto justifica que o uso da quitosana para funcionalizar as NPLs AZC utilizadas neste trabalho de pesquisa tenha aumentado a viabilidade celular e conseqüentemente melhorada a biocompatibilidade.

Para as amostras funcionalizadas com o glutaraldeído (AZC<sub>G</sub>) apresentou viabilidade celular de 48 %, sendo este resultado inferior aos 50% necessários para ser considerada como biocompatível. Contudo, de forma diferente ao resultado obtido neste trabalho de pesquisa, os resultados obtidos por Costa-Júnior *et al.*,(2009) quando utilizaram o glutaraldeído, não reportaram nenhum aumento na toxicidade do material, possivelmente porque o glutaraldeído não tenha sido utilizado como um agente funcionalizante e sim como um agente reticulador para interligar as duas cadeias poliméricas do PVA e da quitosana formando ligações cruzadas e constituindo uma molécula de alto peso molecular.

## 5 CONCLUSÕES

- As NPLs de AZC foram sintetizadas em escala nanométrica por reação de combustão de forma eficiente e reprodutível. As amostras apresentaram luminescência com transições características de energia do íon  $\text{Yb}^{3+}$  para o  $\text{Er}^{3+}$ , para as cores verde e para a cor vermelha;
- A obtenção do material híbrido foi confirmada através dos espectros de FTIR, onde se verifica a presença de bandas referentes a Si-O-Si observado apenas nas amostras silanizadas com o agente 3-aminopropiltrimetoxilano e funcionalizadas. Esta silanização sugere que houve a funcionalização da matriz inorgânica com quitosana e glutaraldeído a partir da ponte feita com o agente silano;
- Os híbridos obtidos neste trabalho de pesquisa utilizando glutaraldeído ou quitosana como agentes funcionalizantes não alteraram significativamente as características morfológicas, estruturais, térmicas e de hidrofiliabilidade das NPLs antes da funcionalização;
- As NPLs e os híbridos obtidos não são materiais completamente solúveis em água, etanol ou ácido acético, contudo as NPLs e o híbrido funcionalizado com glutaraldeído apresentaram certa dispersão de partículas em todos os solventes, enquanto que o híbrido funcionalizado com a quitosana só obteve esta maior dispersão quando utilizado como solvente o ácido acético;
- As NPLs funcionalizadas com quitosana foram mais eficazes tanto nos ensaios de excitação e emissão, apresentando uma maior intensidade luminescência, como também nos testes de citotoxicidade, demonstrando ser um material não tóxico em ensaios “*in vitro*”, e desta forma confirmando ser um material promissor para utilização como marcador óptico em aplicações biotecnológicas.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar diferentes concentrações do agente silano ou do agente funcionalizador, visando melhorar a solubilidade para possível utilização como carreador de fármaco;
- Avaliar o material por cromatografia líquida, objetivando verificar possíveis impurezas para posterior uso como um marcador biológico;
- Realizar estudos “*in vivo*” destes NPLs como marcadores ópticos;

## REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5–28, 2004.
- ALI, S. W., RAJENDRAN, S., JOSHI, M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 438–446, 2011.
- ALHANATI, L. S. Tensão Superficial. Alfa Virtual School – Física. Disponível em: [http://alfaconnection.net/pag\\_avsf/fqm0101.htm](http://alfaconnection.net/pag_avsf/fqm0101.htm). Acesso em 11/06/2012.
- ANIRUDHAN, T. S., RIJITH, S. Glutaraldehyde cross-linked epoxyaminated chitosan as an adsorbent for the removal and recovery of copper(II) from aqueous media. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 351, p. 52–59, 2009.
- ANTONIO, S. G.. **Aplicação do Método de Rietveld em caracterização estrutural e nanoestrutural do espinélio  $Ni_{1.5}Co_8Fe_2O_4$  preparado por Reação de Combustão**. Dissertação de mestrado - Ciência e Tecnologia de Materiais, UNESP, 2006.
- ARROYO-HERNÁNDEZ, M., PÉREZ-RIGUEIRO, J., MARTÍNEZ-DUART, J. M. Formation of amine functionalized films by chemical vapour deposition. **Materials Science and Engineering**, v. 26, p. 938-941, 2006.
- AZEVEDO, V. V. C., CHAVES, S. A., BEZERRA, D. C., LIA FOOK, M. V., COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.23, p. 27-34, 2007.
- BAÑULS, M. J., GONZÁLEZ-PEDRO, V., BARRIOS, C. A., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, Á. Selective chemical modification of silicon nitride/silicon oxide nanostructures to develop label-free biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1460–1466, 2010.
- BISPO, V. M. **Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em Suportes Biocompatíveis de Quitosana-PVA**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, 206p, 2009.
- BORDOLOI, A., MATHEW, N. T., LEFEBVRE, F., HALLIGUDI, S.B. Inorganic-organic hybrid materials based on functionalized silica and carbon: A comprehensive understanding toward the structural property and catalytic activity difference over mesoporous silica and carbon supports. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 115, p. 345–355, 2008.
- BOUZIGUES, C., GACOIN, T., ALEXANDROU, A. Biological applications of rare-earth based nanoparticles. **ACS Nano**, v.5, n.11 p.8488-8505, 2011.

BUGUNIA-KUBIK, K., SUSISAGA, M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. **Jornal Biosystems**, v. 65, p. 123–138, 2002.

CÂMARA, M. S. C. da. **Síntese e caracterização a nível nanométrico da fase  $\text{Li}_2(\text{M})\text{Ti}_3\text{O}_8$ ,  $\text{M}=\text{Zn}$ ,  $\text{Co}$  e  $\text{Ni}$  pelo método Pechini**. Tese de doutorado em Química, 2004.

CANTELAR, E., CUSSÓ, F., Competitive up-conversion mechanisms in  $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$  co-doped  $\text{LiNbO}_3$ . **Journal of Luminescence**, v. 102, p. 525–531, 2003.

CASETTARI, L., VLLASALIU, D., CASTAGNINO, E., STOLNIK, S., HOWDLE, S., ILLUM, L. PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. **Progress in Polymer Science**, p.1-27, 2011.

CHAVES, C. R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de cádmio: Aplicações biomédicas**. Dissertação de mestrado – Ciências de Materiais, UFPE, 2006.

CHÁFER-PERICÁS, C., MAQUIEIRA, A., PUCHADES, R. Functionalized inorganic nanoparticles used as labels in solid-phase immunoassays. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 144-156, 2012.

CHATELET, C., DAMOUR, O., DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

CHATTERJEE, D. K., RUFAlHAH, A.J., ZHANG, Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. **Biomaterials**, v. 29, n. 7, p. 937-943, 2008.

CHEN, H. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. **USDA Conference**: Washington, DC. p.18-19, 2002.

CHEN, X. Y., MA, C. Spherical porous  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{3+}$  phosphors: PEG-assisted hydrothermal growth and photoluminescence. **Optical Materials**, v. 32, p. 415–421, 2010.

CHEN, X. Y., MA, C., BAO, S. P., LI, Z. Synthesis and photoluminescence of  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{3+}$  hollow nanophosphors using carbon nanospheres as hard templates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 346, n.1, p. 8-11, 2010.

CHENG, S.; SHEN, D.; ZHU, X.; TIAN, X.; ZHOU, D., FAN, L. Preparation of nonwoven polyimide/silica hybrid nanofiberous fabrics by combining electrospinning and controlled in situ sol-gel techniques. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 2767-2778, 2009.

CHI, B., VICTORIO, E. S., JIN, T. Synthesis of Eu-doped photoluminescent titania nanotubes via a two-step hydrothermal treatment. **Nanotechnology**, v. 17, p.2234–2241, 2006.

CHINARRO, E., FIGUEIREDO, F. M., MATHER, G. C., JURADO, J. R., FRADE, J. R. Combustion synthesis and characterisation of Ni-MO-YSZ (M=Mg, Ca, Al<sub>2</sub>/3) cermet anodes for SOFCs. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 27, p. 4233–4236, 2007.

CHO, K., WANG, X., NIE, S., CHEN, Z., SHIN, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 1310-1316, 2008.

COSTA, A. C. F. M., KIMINAMI, R. H. G. A., SANTOS, P. T. A. DOS, SILVA, J. F. ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> co-doped with Yb<sup>+3</sup>/Er<sup>3+</sup> prepared by combustion reaction: evaluation of photophysical properties. **Journal of Nanomaterials Science**, v. 48, n. 1, p. 172-177, 2013.

COSTA, A. C. F. M.; VIEIRA, D. A.; LULA, R. P. T.; ANDRADE, H. M. C.; SOUZA, E. C.; VIEIRA, L. G.; SANTOS, P. T. A. Preparação do Suporte ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> via Reação de Combustão e sua Caracterização. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, p. 37 - 45, 2006.

COSTA, J. L. R., MARCHETTI, M.C., RANGEL, M. C. A thorium-doped catalyst for the high temperature shift reaction. **Catalysis Today**, vol. 77, p. 205, 2002.

COSTA JÚNIOR, E. de S., MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.

COSTA-JÚNIOR, E. S., BARBOSA-STANCIOLI, E. F., MANSUR, A.A.P., VASCONCELOS, W. L., MANSUR, H.S. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, 472–481, 2009.

CUI, Z.; XIANG, Y.; SI, J.; YANG, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, T.; Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. **Carbohydrate Polymers**, v.73, n.1, p. 111-116, 2008.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITEB, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v.36, n.8, p.981-1014, 2011.

DIOS, A. S. DE, GARCÍA, M. E. D. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. **Analytica Chimica Acta**, v. 666, p. 1–22, 2010.

DRURY, J. L., MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v.24, p. 4337 – 4351, 2003.

FAN, W., YAN, W., XUB, Z., NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21– 27, 2012.

FENG, J.; SHAN, G.; MAQUIEIRA, A.; KOIVUNEN, M. E.; GUO, B.; HAMMOCK, B. D.; KENNEDY, I. M. Functionalized Europium Oxide Nanoparticles Used as a

Fluorescent Label in an Immunoassay for Atrazine. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 5282-5286, 2003.

FU, Y. P. Preparation and characterization of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu phosphors by combustion process. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 5165–5169, 2007.

FU, K., HUANG, W., LIN, Y., ZHANG, D., HANKS, T. W., RAO, A. M., SUN, Y. P. Functionalization of Carbon Nanotubes with Bovine Serum Albumin in Homogeneous Aqueous Solution. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n 5, p. 457, 2002.

FUMO, D. A. **Cimentos em betões refratários LCC e ULCC: síntese e mecanismo de hidratação e interação com os microenchedores**. Dissertação (Doutorado em Ciências e Engenharia Cerâmica) – Departamento de Engenharia Cerâmica e Vidro. Aveiro, Portugal, 157p. 1997.

GANESH, I., SIRINIVAS, B., JOHNSON, R., SAHA, B. P., MAHAJAN, Y. R. Effect of fuel type on morphology and reactivity of combustion synthesized MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> powders. **British Ceramic Transactions**, v. 101, p. 247-254, 2002.

GANGULI, D.; CHATTERJEE, M. Ceramic Powder Preparation: A Handbook. **Kluwer Academic Publishers**, 1997, p. 221.

GARCÍA-HIPÓLITO, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, C. D.; ALVAREZ-FREGOSO, O.; MARTÍNEZ, E.; GUZMÁN-MENDOZA, J., FALCONY, C. Characterization of europium doped zinc aluminate luminescent coatings synthesized by ultrasonic spray pyrolysis process. **Optical Materials**, v. 22, p. 345-351, 2003.

GNACH, A., BEDNARKIEWICZ, A. Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges. **Nano Today**, v. 282, p. 1-32, 2012.

GRAZIOLA, F., GIRARDI, F., MAGGIO, R. D., CALLONE, E., MIORIN, E., NEGRI, M., MULLER, K., GROSS, S. Three-components organic–inorganic hybrid materials as protective coatings for wood: Optimisation, synthesis, and characterization. **Progress in Organic Coatings**, v.74, p. 479– 490, 2012.

GÓMEZ, L. A., MENEZES, L. de S., ARAÚJO, C.B. de, GONÇALVES, R. R., RIBEIRO, S. J. L. Upconversion luminescence in Er<sup>3+</sup> doped and Er<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> codoped zirconia and hafnia nanocrystals excited at 980 nm. **Journal of Applied Physics**, v. 107, 113508, p. 1-5, 2011.

GLUTARALDEÍDO, 2012. Busca na Integralidade na Prevenção. <http://www.acpo.org.br/campanhas/glutaraldeido/resumo.pdf>, acesso em **02 de julho de 2012**.

GONDIM, C. S.; SILVA, L. R. D. da. Efeito do glutaraldeído na adsorção de extrato proteico da *ipomoea batatas* (*I*) *lam* na superfície de uma zeólita analcima. **Cerâmica**, v. 51, p. 219, 2005.

GRABOSKA, H.; ZAWADZKI, M.; SYPER, L. Gas phase alkylation of 2-hydrosypyridine with methanol over dydthotermally synthesised zinc aluminate. **Applied Catalysis A: General**, vol. 314, n. 2, p. 226-232, 2006.

GU, R., SUN, W., ZHOU, H., WU, Z., MENG, Z., ZHU, X., TANG, Q., DONG, J., DOU, G. The performance of a fly-larva shell-derived chitosan sponge as an absorbable surgical hemostatic agent. **Biomaterials**, v. 31, p. 1270–1277, 2010.

HAFNER, S. The absorption of some metal oxides with spinel structure, **Zeitschrift für Kristallographie**, v. 115, p. 331-358, 1961.

HAN, H. D., SONG, C. K., PARK, Y. S., NOH, K. H., KIM, J. H., HWANG, T., KIM, T. W., SHIN, B. C. A chitosan hydrogel-based cancer drug delivery system exhibits synergistic antitumor effects by combining with a vaccinia viral vaccine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 27–34, 2008.

HELALI, S., ABDELGHANI, A., HAFIYEDH, I., MARTELET, C., PRODRONIDIS, M.I., ALBANIS, T., JAFFREZIC-RENAULT, N. Functionalization of niobium electrodes for the construction of impedimetric biosensors. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 826–830, 2008.

HEMMER, E, YAMANO, T., KISHIMOTO, H, VENKATACHALAM, N., HYODO, H., SOGA, K. Cytotoxic aspects of gadolinium oxide nanostructures for up-conversion and NIR bioimaging. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4734–4743, 2013.

HOWLING, G. I., DETTMAR, P. W., GODDARD, P. A. HAMPSON, F. C. DORNISH, M. WOOD, E. J. The effect of chitin and chitosan of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**, v.22, p. 2959-2966, 2001.

HSIAO, M. H., TUNG, T. H., HSIAO, C. S., LIU, D. M. Nano-hybrid carboxymethyl-hexanoyl chitosan modified with (3-aminopropyl)triethoxysilane for camptothecin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 632– 639, 2012.

HWANG, C. C., TSAI, J. S., HUANG, T. H. Combustion synthesis of Ni–Zn ferrite by using glycine and metal nitrates-investigations of precursor homogeneity, product reproducibility, and reaction mechanism. **Materials Chemistry and Physics**, v. 93, p. 330, 2005.

IRION, H. S. **Cerâmica Varistora à base de SnO<sub>2</sub> dopada com Pr<sub>6</sub>O<sub>11</sub>**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais – UEPG. 96p. 2006.

IVAKIN, Y. D., DANCHEVSKAYA, M. N., MURAVIEVA, G. P., KREISBERG, V. Synthesis of Eu-doped gahnite in water and water-ammoniac fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v.42, n.3, p. 425-429, 2007.

JAIN, S. R., ADIGA, K. C., PAI VERNEKER, V. Combustion studies on ammonium perchlorate trimethylammonium perchlorate mixtures. **Combustion and Flame**, v.40, p.71-79, 1981.

JAIN, K. K. Applications of Nanobiotechnology in Clinical Diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 53, n.11, p. 2002–2009, 2007.

JAIN, K. K. Nanobiotechnology. **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**, v. 1, p. 599-614, 2011.

JAL, P. K., PATEL, S., MISHRA, B. K. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. **Talanta**, v. 62, p. 1005-1028, 2004.

JAYAKRISHNAN, A., JAMEELA, S. R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v. 17, p. 471, 1996.

JAYAKUMAR, R., CHENNAZHI, K. P., MUZZARELLI, R. A. A., TAMURA, H., NAIR, S. V., & SELVAMURUGAN, N. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, v.79, n. 1, p.1–8, 2010a.

JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., NAIR, S.V., TAMURA, H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 142–150, 2010b.

JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., KUMAR, P.T. S., NAIR, S.V., TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 322–337, 2011.

JIANG, L., LIU, W., WUB, A., XU, J., LIU, Q., QIAN, G., ZHANG, H. Low-temperature combustion synthesis of nanocrystalline HoFeO<sub>3</sub> powders via a sol–gel method using glycine. **Ceramics International**, v. 38, p. 3667–3672, 2012.

JIANG, S., ZHANG, Y. Upconversion nanoparticle based FRET system for study of siRNA in live cells. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6689–6694, 2010.

JING, L., YEJU, H., ZHE, H., PING ZENG, S. X. Synthesis of NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er/single-walled carbon nanohorns nanocomposite and its application as cells label. **Analytical Biochemistry**, v. 428, p. 4–6, 2012.

JOSÉ. M. N.; PRADO. L. A. S. A. de. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n.2, p.281-288, 2005.

KHAN, R.; DHAYAL, M. Nanocrystalline bioactive TiO<sub>2</sub> –chitosan impedimetric immunosensor for ochratoxin-A. **Electrochemistry Communications**, v. 10, p. 492-495, 2008.

KHOR, E., LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, p. 2339-2349, 2003.

KICKELBICK, G. **Hybrid materials: synthesis, characterization, and applications**: Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

KIERNAN, J. A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. **Microscopy Today**, v. 00-1, p. 8-12, 2000.

KIMINAMI, R. H. G. A.; COSTA, A. C. F. M.; MORELLI, M. R. Combustion Synthesis Processing of Nanoceramics, **Handbook of Nanoceramics and Their Based Nanodevices**, Edited by Tseung-Yuen Tseng and Hari Singh Nalwa, Vol. XX: Chapter 80, p. 1–18, 2008.

KODAIRA, C. A., STEFANI, R., MAIA, A. S., FELINTO, M. C. F. C., BRITO, H. F. Optical investigation of  $Y_2O_3:Sm^{3+}$  nanophosphor prepared by combustion and Pechini methods. **Journal of Luminescence**, v. 127, p. 616–622, 2007.

KONG, L. L., YAN, B., LI, Y. J., LI, Y. Photoactive metallic ( $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Er^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ) mesoporous hybrid materials by functionalized 8-hydroxyquinolate linkage covalently bonded SBA-15. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 135, p. 45–50, 2010.

KUMAR, M., SESHAGIRI, T.K., MOHAPATRA, M., NATARAJAN, V., GODBOLE, S. V. Synthesis, characterization and studies of radiative properties on  $Eu^{3+}$ -doped  $ZnAl_2O_4$ . **Journal of Luminescence**, v. 132, p. 2810–2816, 2012.

LAI, B., FENG, L., WANG, J., SU, Q. Optical transition and upconversion luminescence in  $Er^{3+}$  doped and  $Er^{3+}$ - $Yb^{3+}$  co-doped fluorophosphate glasses. **Optical Materials**, v. 32, p. 1154–1160, 2010.

LEMOS, F. C. D., MELO, D. M. A., SILVA, J. E. C. da. Up-conversion luminescence in  $Er^{3+}/Yb^{3+}$  - codoped  $PbTiO_3$  perovskite obtained via Pechini method. **Materials Research Bulletin**, v. 40, p. 187, 2005.

LEI, L., CAO, Z., XIE, Q., FUA, Y., TANA, Y., MAA, M., YAO, S. One-pot electrodeposition of 3-aminopropyltriethoxysilane–chitosan hybrid gel film to immobilize glucose oxidase for biosensing. **Sensors and Actuators B**, v. 157 p. 282–289, 2011.

LI, J., YUAN H., LI G., LIU Y., LENG J. Cation distribution dependence of magnetic properties of sol-gel prepared  $MnFe_2O_4$  spinel ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, p 1-5, 2010.

LI, G. Y.; HUANG, K. L.; JIANG, Y. R.; DING, P.; YANG, D. L. Preparation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 405–412, 2008a.

LI, Z. Q.; ZHANG, Y.; JIANG, S. Multicolor Core/Shell-Structured Upconversion Fluorescent Nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 20, p. 4765–4769, 2008b.

LIN, Y. C., TAN, F. J., MARRA, K. G., JAN, S. S., LIU, D. C. Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 2591–2600, 2009.

LIN, K. M., LIN, C. C., LI, Y. Y. Luminescent properties and characterization of  $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$  @ $\text{SiO}_2$  and  $\text{Gd}_2\text{Ti}_2\text{O}_7:\text{Eu}^{3+}$  @ $\text{SiO}_2$  core-shell phosphors prepared by a sol-gel process. **Nanotechnology**, v.17, p. 1745–1751, 2006.

LIU, H., WANG, L, CHEN, S. Effect of  $\text{Yb}^{3+}$  concentration on the upconversion of  $\text{Er}^{3+}$  ion doped  $\text{La}_2\text{O}_3$  nanocrystals under 980 nm excitation. **Materials Letters**, v. 61, p. 3629–3631, 2007.

LOPES, A., LOPES-LIMA, M., BOBOS, I., FERREIRA, J., GOMES, S., REIS, R., MANO, J., MACHADO, J. The effects of *Anodonta cygnea* biological fluids on biomineralization of chitosan Membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 364, p. 82–89, 2010.

LÓPEZ-GALLEGO, F., BETANCOR, L., MATEO, C., HIDALGO, A., ALONSO-MORALES, N., DELLAMORA-ORTIZ, G., GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70-75, 2005.

LOU, X. W., ARCHER, L. A., YANG, Z. Hollow Micro-/Nanostructures: Synthesis and Applications. **Advanced Materials**, v.20, n. 21, p. 3971, 2008.

MACÊDO, M. de O. C., MACÊDO, H. R. A. de, BARBOSA, J. C. P., GERRA NETO, C. L. de B., PEREIRA, M. R., ALVES JÚNIOR, C. O uso do plasma de nitrogênio para modificação superficial em membranas de quitosana. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, On-Line, 2011.

MAKOWER, A., BARMIN, A., MORZUNOVA, T., EREMENKO, A., KUROCHKIN, I., BIER, F., SCHELLER, F. Affinity enzymometric assay for detection of organophosphorus compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 357, p. 13-20, 1997.

MAMIŃSKI, M. L., PAWLICKI, J. Improved Water Resistance and Adhesive Performance of a Commercial UF Resin Blended with Glutaraldehyde. **The Journal of Adhesion**, v. 82, p. 629–641, 2006.

MARTINS, R. F., SILVA, R. F., GONÇALVES, R. R., SERRA, O. A. Luminescence in Colorless, Transparent, Thermally Stable Thin Films of  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$ - $\beta$ -diketonates in Hybrid Inorganic–Organic Zinc-based Sol–Gel Matrix. **Journal Fluoresce**, v. 20, p. 739–743, 2010.

MARTINS, R. F., SERRA, O. A. Thin Film of  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{3+}$  Synthesized by a non-Alkoxide Precursor Sol-Gel Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p.1395-1398, 2010.

MARTINS, T. S., ISOLANI, P. C. Terras Raras: Aplicações Industriais e Biológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.111-117, 2005.

MATHUR, S., VEITH, M., HAAS, M., SHEN, H., LECERF, N., HUCH, V. Single-Source Sol–Gel Synthesis of Nanocrystalline  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ : Structural and Optical Properties. **Journal of the American Ceramic Society**, v.84, n. 9, p. 1921–1928, 2001.

MCCRITTRICK, J., SHEA, L. E., BACALSKI, C. F., BOSZE, E. J. "The influence of processing parameters on luminescent oxides produced by combustion synthesis". **Displays**, v. 19, p. 169-172, 1999.

MELLO, R. S., BEDENDO, G. C., NOME, F., FIEDLER, H. D., LARANJEIRA, M. C. M. Preparation of chitosan membranes for filtration and concentration of compounds under high pressure process. **Polymer Bulletin**, v. 56, n. 4-5, p. 447-454, 2006.

MENEZES, F. D. de. **Síntese e caracterização de nanocristais luminescentes baseados em semicondutores II-VI para fins de aplicação como biomarcadores**. Dissertação de mestrado – Química, UFPE, 2006.

MENON, S., DHABEKAR, B., RAJA, E. A., MORE, S. P., RAO, T. K. G., KHER, R. K. TSL, OSL and ESR studies in ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:Tb phosphor. **Journal of Luminescence**, v. 128, p. 1673–1678, 2008.

MONTEIRO, T., SOARES, M. J., NEVES, A. J., CARMO, M. C., PERES, M., CRUZ, A., ALVES, E., WAHL, U., RITA, E., MUNOZ-SANJOSE, V., ZUNIGA-PEREZ, J. Luminescence and structural properties of defects in ion implanted ZnO. **Physica status solidi (c)**, v. 3, p. 968–971, 2006.

MOORE, J., FENG, H. J. Combustion synthesis of advanced materials. **Progress of Materials Science**, v.39, p.243, 1995.

MORRIS, K. Nanotechnology crucial in fighting infectious disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v.9, n. 4, p. 215, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MURAKAMI, K., AOKI, H., NAKAMURA, S., NAKAMURA, S., TAKIKAWA, M., HANZAWA, M., KISHIMOTO, S., HATTORI, H., TANAKA, Y., KIYOSAWA, T., SATO, Y., ISHIHARA, M. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing impaired wound dressings. **Biomaterials**, v.31, n.1, p. 83–90, 2010.

NAFEE, N., SCHNEIDER, M., SCHAEFER, U. F., LEHR, C. M. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 130–139, 2009.

OLSON, L. E.; BEDJA, D.; ALVEY, S. J.; CARDOUNEL, A. J.; GABRIELSON, K. L.; REEVES, R. H. Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with an allele of carbonyl reductase 1. **Cancer Research**, v. 63, p. 6602– 6606, 2003.

OZMEN, M., CAN, K., AKIN, I., ARSLAN, G., TOR, A., CENGELGLOGLU, Y., ERSOZ, M. Surface modification of glass beads with glutaraldehyde: Characterization and their adsorption property for metal ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, p. 594–600, 2009.

PARK, K.; LEE, S.; KANG, E.; KIM, K.; CHOI, K.; KWON, I. New Generation of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy. **Advanced functional materials**, v. 19, p.1553-1566, 2009.

PENG, C., LI, G., GENG, D., SHANG, M., HOU, Z., LIN, J. Fabrication and luminescence properties of one-dimensional  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  and  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4: \text{A}^{3+}$  (A = Cr, Eu, Tb) microfibers by lectrospinning method. **Materials Research Bulletin**, v. 47, p. 3592–3599, 2012.

PHANI, A. R.; PASSACANTANDO, M.; SANTUCCI, S. Synthesis and characterization of zinc aluminum oxide thin films by sol-gel technique. **Materials Chemistry and Physics**, v. 68, p. 66, 2001.

REPO, E., WARCHOL, J. K., BHATNAGAR, A., SILLANPAA, M. Heavy metals adsorption by novel EDTA-modified chitosan–silica hybrid materials. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 358, p. 261–267, 2011.

RINAUDO, M., DOMARD, A. **Solution properties of chitosan**. In: Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., Sandford, P., editors. Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. London and New York: Elsevier; p. 71–86, 1989

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p.337-346, 2003.

RONDA, C. Emission and Excitation Mechanisms of Phosphors, in **Luminescence: From Theory to Applications**, edited by C. Ronda (Wiley-VCH), pp. 1–34, 2008.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.77-86, 2001.

SAJOMSANG, W. Synthetic methods and applications of chitosan containing pyridylmethyl moiety and its quaternized derivatives: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 631–647. 2010.

SANTOS, P. T. A. dos, FURTADO, C. M., RODRIGUES, M. O., COSTA, A. C. F. M.. Characterization optical of  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  doped with  $\text{Eu}^{3+}$  functionalized with chitosan. **Journal Materials Science Forum**, v. 727/728, p. 1119-1124, 2012.

SEGADÃES, A. M., MORELLI, M. R., KIMINAMI, R. G. A."Combustion Synthesis of Aluminium Titanate". **Journal of European Ceramic Society**, v. 18, p. 771, 1998.

SCHOTTNER, G. Hybrid sol-gel-derived polymers: applications of multifunctional materials. **Chemical Materials**, v.13, n. 10, p. 3422- 3435, 2001.

SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v.289, p.1498-1500, 2000.

SEKHON, B. S.; KAMBOJ, S. R. Inorganic nanomedicine- Part 1. Nanomedicine: Nanotechnology, **Biology and Medicine**, v.6, p. 516–522, 2010.

SHEN, H.; ASPINWAL, C. A.; KENNEDY, R. T.; Dual microcolumn immunoassay applied to determination of insulin secretion from single islets of Langerhans and insulin in serum. **Journal of chromatography B**, v. 689, p. 295-303, 1997.

SHIROSAKI, Y., TSURU, K., HAYAKAWA, S., OSAKA, A., LOPES, M. A., SANTOS, J. D., COSTA, M. A., FERNANDES, M. H. Physical, chemical and in vitro biological profile of chitosan hybrid membrane as a function of organosiloxane concentration. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 346–355, 2009.

SILVA, J. F. **Influência da co-dopagem de terras-raras (Yb e Er) na luminescência do  $ZnAl_2O_4$** , Dissertação de Mestrado em Engenharia de Química, UFCG. 50p. 2006.

SILVA, C. J. S. M., SOUSA, F., GÜBITZ G., CAVACO-PAULO, A. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. **Food Technology Biotechnology**, v. 42, n.1, p. 51–56, 2004.

SINGH, V., CHAKRADHARB, R. P. S., RAOC, J. L., KIMA, D. K. Characterization, EPR and luminescence studies of  $ZnAl_2O_4:Mn$  Phosphors. **Journal of Luminescence**, v. 128, p. 394–402, 2008.

SINGH, A. K., SINGH, P., MISHRA, S., SHAHI, V. K. Anti-fouling organic-inorganic hybrid membrane for water treatment. **Journal Materials Chemistry**, v.22, p. 1834-1844, 2012.

SIONKOWSKA, A., KACZMAREK, H., WISNIEWSKI, M., SKOPINSKA, J., LAZARE, S., TOKAREV, V. **The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films**, Surface Science, v.600, n.80, p. 3775-3779, 2006.

SNITZER, E., WOODCOCK, R.  $Yb^{3+}-Er^{3+}$  glass laser. **Applied Physics Letters**, v. 6, p. 45, 1965.

SOUZA, N.L.G.D., BRANDÃO, H. M., OLIVEIRA, L.F.C. Spectroscopic and thermogravimetric study of chitosan after incubation in bovine rumen. **Journal of Molecular Structure**, v. 1005, p. 186–191, 2011.

SOUZA FILHO, A.G. DE, FAGAN, S. B. Funcionalização de Nanotubos de Carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p.1695-1703, 2007.

SPIRKA, S., FINDENIGA, G., DOLISKAB, A., REICHEL, V. E., SWANSON, N. L., KARGLA, R., RIBITSCHA, V., STANA-KLEINSCHEK, K. Chitosan–silane sol–gel hybrid thin films with controllable layer thickness and morphology. **Carbohydrate Polymers**, p.1-6, 2012.

STANCIU, M. L., AVRAM, N. M. Calculation of the crystal field parameters of the  $ZnAl_2O_4:Eu^{3+}$ . **Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 4, n. 11, p. 1690–1692, 2010.

STREK, W., DERÉN, P., BEDNARKIEWICZ, A., ZAWADZKI, M., WRZYSZCZ, J. Emission properties of nanostructured  $\text{Eu}^{3+}$  doped zinc aluminate spinels. **Alloys & Composts**, v. 300, p.456, 2000.

SUDHAGAR S, SATHYA S, PANDIAN K, LAKSHMI BS. Targeting and sensing cancer cells with ZnO nanoprobe *in vitro*. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 9, p. 1891–1896, 2011.

SULEK, F., DROFENIK, M., HABULIN, M., KNEZ, Z. Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, p. 179–185, 2010.

TAHMASEBI, K., PAYDAR, M. H. The effect of starch addition on solution combustion synthesis of  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$  nanocomposite powder using urea as fuel. **Materials Chemistry and Physics**, v.109, p. 156–163, 2008.

THORSLUND, S., SANCHEZ, J., LARSSON, R., NIKOLAJEFF, F., BERGQUIST, J. Bioactive heparin immobilized onto microfluidic channels in poly(dimethylsiloxane) results in hydrophilic surface properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 46, p. 106–113, 2005.

TONHI, E., PEPLIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v.25, n.6, p.943-948, 2002.

TONIOLO, J. C., LIMA, M. D., TAKIMI, A. S., BERGMANN, C. P. Synthesis of alumina powders by the glycine-nitrate combustion process. **Materials Research Bulletin**, v. 40, p. 561, 2009.

TONIOLO, J. C. **Síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução**. Dissertação de mestrado em engenharia – UFRGS. 77p. 2004.

TSHABALALA, K. G., CHO, S. H., PARK, J. K., PITALE, S. S., NAGPURE, I. M., KROON, R. E., SWART, H. C., NTWAEABORWA, O.M. Luminescence properties of  $\text{Ce}^{3+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$  co-activated  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  phosphor. **Physical B**, v. 407, p. 1489-1492, 2012.

VISINESCU, D., JURCA, B., IANCULESCU, A., CARP, O. Starch – A suitable fuel in new low-temperature combustion-based synthesis of zinc aluminate oxides. **Polyhedron**, v. 30, p. 2824–2831, 2011.

VRANKIĆ, M., GRŽETA, B., MANDIĆ, V., TKALČEC, E., MILOŠEVIĆ, S., ČEH, M., RAKVIN, B. Structure, microstructure and photoluminescence of nanocrystalline Ti-doped gahnite. **Journal of Alloys and Compounds**, accepted for publication in 2012.

WALDRON, R. D. Infrared spectra of ferrites. **Physical Review A**, v. 99, p. 1727-1735, 1955.

WANG, S., ZHAO, G. Quantitative characterization of the electrospun gelatin–chitosan nanofibers by coupling scanning electron microscopy and atomic force microscopy. **Materials Letters**, v. 79, p. 14–17, 2012.

WANG, M., MI, C. C., WANG, W. X., LIU, C. H.; WU, Y. F., XU, Z. R., MAO, C. B., XU, S. K. Immunolabeling and NIR-Excited Fluorescent Imaging of HeLa Cells by Using NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er Upconversion Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 3, n. 6, p. 1580-1586, 2009.

WENG, F., CHEN, D., WANG, Y., YU, Y., HUANG, P., LIN, H. Energy transfer and up-conversion luminescence in Er<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> co-doped transparent glass ceramic containing YF<sub>3</sub> nano-crystals. **Ceramics International**, v. 35, p. 2619–2623, 2009.

WU, W., SHEN, J., BANERJEE, P., ZHOU, S. Chitosan-based responsive hybrid nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging and controlled drug delivery. **Biomaterials**, v. 31, p. 8371-8381, 2010.

XIA, W., LIU, P., ZHANG, J., CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 170- 179, 2011.

XIA, W. S. Physiological activities of chitosan and its application in functional foods. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p.77-81, 2003.

XIAO, Z., XIE, Y., MILITZ, H., MAI, C. Effect of glutaraldehyde on water related properties of solid wood. **Holzforschung**, v. 64, p. 483–488, 2010.

YALÇIN, E., ÇAVUŞOĞLU, K. Glutaraldehyde Cross-Linked Agarose Carriers: Design, Characterization and Insulin Release Behaviour. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 148–153, 2008.

YANG, P., QUAN, Z., LI, C., KANG, X., LIAN, H., LIN, J. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug Carrier. **Biomaterials**, v. 29, p. 4341–4347, 2008.

YANG, W., ZHANG, C. G., QU, H. Y., YANG, H. H., XU, J. G. Novel fluorescent silica nanoparticle probe for ultrasensitive immunoassays. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, p. 163–169, 2004.

YANG, K., SUA, J., ZHANG, L., LONGA, Y., LVB, X., WEN, Y. Urea combustion synthesis of LiNi<sub>0.5</sub>Mn<sub>1.5</sub>O<sub>4</sub> as a cathode material for lithium ion batteries. **Particuology**, v. 10, p. 765– 770, 2012.

YAO, C., TONG, Y. Lanthanide ion-based luminescent nanomaterials for bioimaging. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 60-71, 2012.

YAZGAN, N.N., BOYACI, İ. H., TEMUR, E., TAMER, U., TOPCU, A. A high sensitive assay platform based on surface-enhanced Raman scattering for quantification of protease activity. **Talanta**, v. 82, n. 2, p. 631–639, 2010.

ZARRAGA, R.; CERVANTES, J.; SALAZAR-HERNANDEZ, C.; WHEELER, G. Effect of the addition of hydroxyl-terminated polydimethylsiloxane to TEOS-based stone consolidants. **Journal of Cultural Heritage**, v. 11, n. 2, p. 138-144, 2010.

ZAWADZKI, M. Synthesis of nanosized and microporous zinc aluminate spinel by microwave assisted hydrothermal method (microwave- hydrothermal synthesis of  $ZnAl_2O_4$ ). **Solid State Sciences**, v.8, p. 14-18, 2006.

ZAWADZKI, J., KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 394–400, 2010.

ZELAZOWSKA, E., RYSIAKIEWICZ-PASEK, E., BORCZUCH-LACZKA, M., CHOLEWA-KOWALSKA, K. Sol-gel derived hybrid materials doped with rare earth metal ions. **Optical Materials**, v. 33, p. 1931–1937, 2011.

ZHOU, J., ELLIS, A. V., VOELCKER, N. H. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. **Electrophoresis**, v. 31, p. 2–16, 2010.

ZHU, J., SUN, G. Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities. **Reactive & Functional Polymers**, v. 72, p. 839–845, 2012.

ZHU, S., FISCHER, T., WAN, W., DESCALZO, A., RURACK, K. Luminescence Amplification Strategies Integrated with Microparticle and Nanoparticle Platforms. in: PRODI, L., MONTALTI, M., ZACCHERONI, N. (Eds.), **Luminescence Applied in Sensor Science**, Springer, Berlin/Heidelberg, v. 300, p. 51—91, 2011.