

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA QUÂNTICA DA FLUORESCÊNCIA DE *QUANTUM DOTS* DE CdTe PARA DIAGNÓSTICO: UM ESTUDO EM FUNÇÃO DO pH USANDO ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA

C. Estupiñán-López¹, C. Tolentino Dominguez¹, P. E. Cabral Filho^{1,2}, B. S. Santos^{1,3}, A. Fontes^{1,2},
R. E. de Araujo¹

¹Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens UFPE, Recife, Brasil

²Departamento de Biofísica e Radiologia UFPE, Recife, Brasil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas UFPE, Recife, Brasil

e-mail: carlos.lopez@ufpe.br

Resumo: Pontos quânticos ou *quantum dots* (QDs) são nanocristais fluorescentes de semicondutores que vêm sendo frequentemente utilizados em ciências da vida permitindo a identificação de estruturas biológicas (células e tecidos) e o entendimento de processos dinâmicos em células. As suspensões de QDs para aplicações em células vivas precisam de modificações químicas, tal como mudanças no pH que podem levar a perda da eficiência de fluorescência dessas nanopartículas. Assim, este trabalho teve como objetivo medir a eficiência quântica da fluorescência e avaliar as características de emissão de QDs de CdTe sintetizados em meio aquoso em função de diferentes pHs. Para este estudo foi explorada a técnica de espectroscopia de lente térmica de feixe único no modo eclipse. Os resultados obtidos forneceram uma melhor compreensão da influência do pH na modificação das características da emissão dos QDs, estabelecendo parâmetros para o uso de QDs de CdTe em variadas aplicações focadas no diagnóstico, tais como: geração de imagens de células e tecidos, fluoroimunoensaios e análises por citometria de fluxo.

Palavras-chave: Quantum Dots, Eficiência Quântica, Espectroscopia de fluorescência.

Abstract: *Quantum dots (QDs) are fluorescent semiconductor nanocrystals that have been frequently used in life sciences allowing the identification of biological structures (cells and tissues) and the understanding of dynamic processes in cells. The use of QDs in living cells requires chemical modifications, such as pH changes, which can lead to the loss of the fluorescence efficiency of these nanoparticles. Thus, this study aimed to evaluate the emission characteristics of CdTe QDs synthesized in aqueous medium, in function of different pH, and to determine the fluorescence quantum efficiency of the nanostructures. For this study we used the technique of single beam thermal lens spectroscopy in the eclipse mode. The results allowed a better understanding of the influence of pH on the emission characteristics of QDs, establishing parameters for its use*

in various biomedical applications such as: imaging of cells and tissues by optical techniques, immunoassays, flow cytometry and others.

Keywords: *Quantum Dots, Quantum yield, Fluorescence spectroscopy.*

Introdução

Em ciências da vida são de grande importância o desenvolvimento e a caracterização de novos insumos, que permitam o surgimento de formas inovadoras de diagnóstico e/ou terapia. Neste contexto, técnicas ópticas de imagem como microscopia de fluorescência, sistemas de imagens por fluorescência *in vivo*, citometria de fluxo e análise por fluoroimunoensaios [1-3], que exploram marcadores fluorescentes, têm se apresentado como importantes ferramentas na avaliação de sistemas biológicos [4]. Marcadores fluorescentes, como moléculas orgânicas e pontos quânticos (*quantum dots*-QDs), que emitem radiação eletromagnética após excitação óptica, são utilizados na identificação de biomoléculas em células, tecidos e no entendimento de processos dinâmicos que ocorrem nesses sistemas biológicos. Em particular, os QDs são nanoestruturas fluorescentes de semicondutores com características atraentes para sua utilização em técnicas ópticas de diagnóstico baseadas em fluorescência. Entre estas características se destacam: (1) largo espectro de absorção, permitindo que vários QDs sejam excitados apenas com uma fonte de luz; (2) alta resistência à fotodegradação, aproximadamente 100 vezes maior do que nos fluoróforos orgânicos, e (3) espectros estreitos de emissão permitindo múltiplas marcações [5-7].

Em geral, os QDs têm uma estrutura complexa, na qual o núcleo, responsável pela emissão da fluorescência, é revestido por uma camada de passivação que proporciona a fotoestabilidade da nanopartícula. Por fim, os QDs podem possuir uma camada funcionalizadora que contém grupamentos químicos funcionais que além de prover estabilidade

química, permitem a conjugação das nanoestruturas semicondutoras a biomoléculas. O uso da bioconjugação imprime especificidade às técnicas ópticas por fluorescência. O processo de conjugação de QDs a moléculas (anticorpo, antígenos, enzimas, etc.) exige o estabelecimento de condições físicas e químicas (temperatura, pH, concentrações de reagentes) [8]. É conhecido que o processo de conjugação pode modificar a capacidade das nanoestruturas fluorescerem [9]. Na conjugação, o ajuste do pH da suspensão de QDs faz-se necessário, o que pode acarretar na redução da capacidade da nanopartícula emitir luz. A eficiência quântica de fluorescência (η) é um parâmetro que quantifica a capacidade de um fluoróforo emitir radiação [10].

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência quântica de fluorescência de QDs de Telureto de Cádmio (CdTe) sintetizados em meio aquoso após o ajuste do pH com ácido mercaptosuccínico (AMS) ou ácido clorídrico (HCl).

Para a determinação do valor de η para as amostras de CdTe foi utilizada a técnica de espectroscopia de lente térmica de feixe único no modo eclipse (*Eclipse Thermal Lens*–ETL), a qual mostra maior sensibilidade que a lente térmica convencional [11]. Os resultados, além de fornecerem um melhor entendimento do processo de modificação da emissão de QDs em função do pH, ajudaram a estabelecer parâmetros para a aplicação dos mesmos na geração de imagens de células e tecidos por técnicas ópticas.

Materiais e métodos

Os QDs de CdTe foram sintetizados em meio aquoso com adaptações do método descrito por Andrade e coautores [12]. Resumidamente, os QDs foram preparados pela adição de telúrio reduzido, Te^{2-} , em uma solução de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (Perclorato de Cádmio) em pH alcalino maior que 10 na presença do estabilizante/funcionalizante AMS, em uma proporção molar de 5:1:6,2 Cd:Te:AMS. Todos os reagentes utilizados foram da *Sigma Aldrich*. A solução aquosa de Te^{2-} foi preparada a partir do telúrio metálico (Te^0), em um alto pH utilizando 100 μL de NaOH 2M e sob atmosfera inerte de nitrogênio. A reação procedeu por 5 horas em atmosfera inerte, constante agitação e aquecimento a 80°C. Após essa etapa, a suspensão foi diluída 1:6 (QD:Água – v:v), com pH final 10,3 e absorvância menor que 0,1 no comprimento de onda de 532 nm.

O ajuste dos pHs foi realizado de duas formas: (1) com uma solução aquosa de agente estabilizante AMS a 4,9% (m/v) obtendo amostras com pHs: 9,8; 9,1; 8,4; 7,3; 6,2 e 5,3 e (2) ajustando o pH da solução usando HCl a 1M, sendo obtidos QDs com pHs: 9,1; 8,4 e 8,0. Todas as amostras tiveram a mesma concentração de QDs ($8,45 \times 10^{-7}\text{M}$). O diâmetro estimado dos QDs foi de 3,1 nm.

Caracterização óptica– Os espectros de absorção e de emissão foram coletados usando um espectrofotômetro modelo 1800 UV-VIS (Shimadzu) e um

espectrofluorímetro modelo LS 55 (Perkin Elmer), respectivamente.

Espectroscopia de lente térmica– A lente térmica (LT) é um efeito transiente decorrente do aumento local de temperatura gerado pela absorção de luz na amostra e um subsequente decaimento não radiativo de fótons absorvidos, que resulta na mudança localizada do índice de refração, n , da amostra. A mudança localizada de n induz um efeito tipo lente óptica na amostra, que é detectado pelo feixe de luz que a atravessa [10,13].

Na técnica de LT um feixe gaussiano de um laser é focalizado na amostra e a dinâmica temporal da intensidade do feixe transmitido é avaliada. O modelo teórico para a LT é baseado na teoria de propagação de feixe gaussiano e difração de Fresnel na configuração de feixe único. Este modelo foi desenvolvido por Sheldon e colaboradores [14]. A expressão analítica para o comportamento temporal da intensidade do feixe transmitido pela amostra é:

$$I = I_0 \left[1 - \frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{2V}{[9+V^2](t_c/2t)+3+V^2} \right) \right]^2 \quad (1)$$

Com I_0 sendo a intensidade do feixe para $t = 0$, θ é o deslocamento de fase térmico e V é dado por: $V = z/z_R + (z_R/z_2)[1 + (z/z_R)^2]$. Considerando a posição da cintura do feixe como a origem da coordenada z , Z e Z_2 são as posições da amostra e do detector, respectivamente; Z_R é o comprimento Rayleigh; t_c é o tempo característico de difusão do calor, dado por, $t_c = \omega_{ex}/4D$, sendo $D = \kappa/\rho C_P$, a difusividade térmica, ρ a densidade volumétrica, C_P o calor específico da amostra e ω_{ex} a cintura do feixe de excitação na posição da amostra, Z .

A amplitude de θ , presente na Eq. 1, é determinada por:

$$\theta = - \frac{\varphi P_{abs}}{\kappa \lambda_{ex}} \frac{dn}{dT} \quad (2)$$

Sendo φ a fração de energia absorvida transformada em energia térmica, ou eficiência quântica absoluta não-radiativa; λ_{ex} é o comprimento de onda de excitação; κ é a condutividade térmica do solvente; dn/dT o coeficiente termo-óptico e P_{abs} a potência absorvida pela amostra obtida a partir da expressão $P_{abs} = P_{ex}(1 - e^{-\alpha L})$, α é o coeficiente de absorção linear óptico no comprimento de onda de excitação (λ_{ex}), P_{ex} a potência de excitação e L o caminho óptico da amostra. A eficiência quântica não-radiativa φ para materiais fluorescentes é dada na Eq. (3).

$$\varphi = 1 - \eta \frac{\lambda_{ex}}{\langle \lambda_{em} \rangle} \quad (3)$$

Com $\langle \lambda_{em} \rangle = \int \lambda_{em} dN(\lambda_{em}) / \int dN(\lambda_{em})$ sendo o comprimento de onda médio de emissão.

Assim a eficiência quântica de fluorescência, η , da amostra pode ser obtida medindo a dinâmica temporal do feixe de luz que atravessa o material, determinando a potência absorvida pelo material e usando as Eqs. 1, 2 e 3.

Arranjo experimental– A eficiência quântica das nanoestruturas foi avaliada usando o arranjo da Fig.1. Para excitar os QDs foi usado um laser cw, (Nd:YAG; Compass 215M-20; Coherent Inc.) de comprimento de onda 532 nm. As suspensões de QDs foram colocadas numa cubeta de vidro de $L = 1$ mm. Uma lente (L_3 na Fig. 1), de 10,0 cm de distância focal foi utilizada para focalizar o feixe na amostra. Um *chopper* foi usado para controlar o tempo de exposição do laser na amostra (*duty cycle* igual a 0,05, frequência de rotação de 110 Hz). Uma máscara opaca circular que bloqueia a região central do feixe transmitido foi usada para aumentar a sensibilidade da técnica de LT [11].

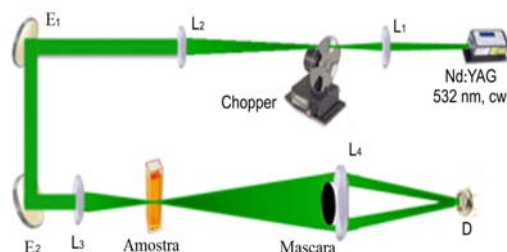


Figura 1: Arranjo do sistema de lente térmica no modo eclipse. L_1, L_2, L_3 e L_4 são lentes; E_1, E_2 são espelhos de alumínio; D é o fotodetector, o círculo preto representa a máscara espacial.

Resultados e discussões

Uma curva experimental mostrando a variação temporal da intensidade da luz transmitida pela amostra devido ao efeito de LT é apresentada na Fig. 2. A curva em vermelho representa o ajuste teórico usando-se a Eq. 1. A potência de excitação na amostra foi de 8,7 mW.

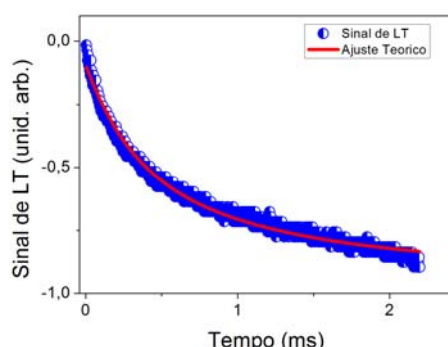


Figura 2: Sinal de LT (curva azul) e ajuste teórico (linha vermelha) para QDs de CdTe e pH = 10,3.

A mudança de pH da suspensão de QDs produz uma variação da emissão das nanoestruturas. Verifica-se que a modificação de pH do meio, pela adição de AMS (Fig. 3),

leva a alterações na intensidade da radiação eletromagnética emitida porém não modifica o perfil espectral da fluorescência.

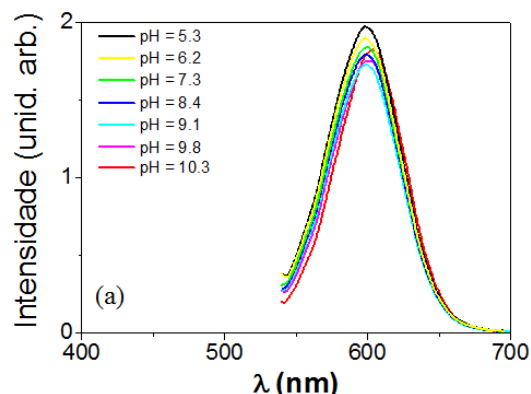


Figura 3: Espectro de emissão de QDs de CdTe para vários pHs, ajustados com AMS. $\lambda_{exc} = 532$ nm.

Na Fig. 4 são apresentadas as variações na eficiência quântica para cada amostra em função do pH ajustado com AMS ou HCl. Nota-se que para as suspensões com o pH modificado pela adição de AMS, η apresenta valores maiores que 50%. A redução do pH com AMS é acompanhada do aumento do valor η .

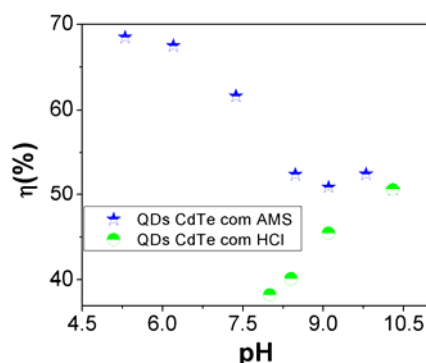


Figura 4: Variação na eficiência quântica para QDs de CdTe, para diferentes pHs ajustando com AMS ou HCl.

Com a modificação do pH das suspensões por adição do HCl, verificou-se que η decresce (Fig. 4) com a diminuição do pH, resultado similar ao obtido por Pilla e colaboradores [15]. Com o uso de HCl, não foi possível determinar valores de η em suspensões com pHs menores que 8, devido à instabilidade das amostras, que apresentaram separação de fase em menos de um dia após a síntese das mesmas. O comportamento de queda de η observado na Fig. 4, com o uso de HCl, é atribuído ao fato do ácido provavelmente remover ou degradar a camada de passivação dos QDs, e conseqüentemente expor defeitos de superfície e diminuir a eficiência da recombinação excitônica elétron-buraco. No caso do uso do AMS, acredita-se que a camada de passivação é aprimorada, pois o AMS participa ativamente da formação desta camada, através da associação dos

grupos tióis junto à superfície dos nanocristais minimizando defeitos relacionados à vacância de Te.

Ajustando as curvas experimentais de LT ao modelo teórico, obtêm-se os valores de η para nossas amostras.

Os valores da eficiência quântica de fluorescência para cada amostra em função do pH, ajustado com AMS, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Eficiência quântica de fluorescência dos QDs de CdTe em solução aquosa com pHs ajustados com AMS. $\lambda_{exc} = 532$ nm.

| pH | 5,3 | 6,2 | 7,3 | 8,4 | 9,1 | 9,8 | 10,3 |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| η_{AMS} [%] | 68,5 | 67,5 | 61,6 | 52,4 | 50,9 | 52,5 | 50,6 |

Conclusão

A eficiência quântica dos QDs de CdTe foi medida usando a técnica de ETL, a qual mostrou alta sensibilidade.

Desse estudo pode-se notar que para aplicações biológicas, onde é necessário pH neutro (próximo ao fisiológico) em torno de 7, deve ser utilizado o AMS para o ajuste de pH das suspensões de QDs. Pois além das amostras se manterem estáveis sem precipitação, apresentam uma maior eficiência quântica, até mesmo quando comparadas com as amostras tendo o pH original de síntese (10,3).

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro da Facepe, CNPq e CAPES. Os autores também agradecem o apoio do INCT de Fotônica.

Referências

- [1] De Grand AM, Frangioni JV. *An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery*. Technol. Cancer. Res. Treat. 2003; 2(6):1-10.
- [2] Szymanski CJ, Yi H, Liu JL, Wright ER, Payne CK. *Imaging intracellular quantum dots: fluorescence microscopy and transmission electron microscopy*. Methods. Mol. Biol. 2013; 1026:21–33.
- [3] Loken MR, Stall AL. *Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology*. J. Immunol. Methods. 1982; 50(3):R85-R112.
- [4] Deerinck TJ. *The application of fluorescent quantum dots to confocal, multiphoton, and electron microscopic imaging*. Toxicol Pathol. 2008; 38(1):112-116.
- [5] Sukhanova A, Nabiev I. *Fluorescent nanocrystal quantum dots as medical diagnostic tools*. Expert Opin. Med. Diagn. 2008; 2(4):429–447.
- [6] Michalet XF, Pinaud F, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics*. Science. 2005; 307(5709):538–544.
- [7] Medintz IL, Tetsouyeda H, Goldman ER, Mattoussi

H. *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*. Nature Mater, 2005; 4:435–446.

- [8] Guo P, Wei C. *Quantum dots for robust and simple assays using single particles in nanodevices*. Nanomed-Nanotechnol. 2005; 1(2):122-124.
- [9] Zhang Y, Wang TH. *Quantum dot enabled molecular sensing and diagnostics*. Theranostics. 2012; 2(7):631-654.
- [10] Brannon JH, Magde D. *Absolute Quantum yield determination by thermal blooming*. Fluorescein. J. Phys. Chem. 1978; 82(6):705-709.
- [11] Estupiñán-Lopez C, Tolentino Dominguez C, Araujo RE. *Eclipsing thermal lens spectroscopy for fluorescence quantum yield measurement*. Opt. Express 2013; 21 (15):18592 – 18601.
- [12] Andrade CG, Cabral Filho PE, Tenorio DPLA, Santos BS, Beltrao EIC, Fontes A, Carvalho Jr LB. *Evaluation of glyco phenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry*. Int. J. Nanomedicine 2013; 8:4623-4629.
- [13] Hu C, Whinnery JR. *New thermo optical measurement method and a comparison with others methods*. Appl. Opt. 1973; 12(1):72-79.
- [14] Sheldon SJ, Knight LV, Thorne JM. *Laser-induced thermal lens effect a new theoretical model*. Appl. Opt. 1982; 21(9):1663-1669.
- [15] Pilla V, Alves LP, de Santana JF, da Silva LG, Ruggiero R, Munin E. *Fluorescence quantum efficiency of CdSe/ZnS quantum dots embedded in biofluids: pH dependence*. J. Appl. Phys. 2012; 112(10):104704.