

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARIA IZABEL XAVIER SCAPOLAN

**FILMES FINOS LUMINESCENTES DE POLISSACARÍDEOS COM POTENCIAL
ATIVIDADE BACTERICIDA**

CURITIBA

2022

MARIA IZABEL XAVIER SCAPOLAN

**FILMES FINOS LUMINESCENTES DE POLISSACARÍDEOS COM POTENCIAL
ATIVIDADE BACTERICIDA**

Luminescent polysaccharides thin films with potential bactericidal activity

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Renata Danielle Adati

Co-orientador: Eloi da Silva Feitosa

CURITIBA

2022



MARIA IZABEL XAVIER SCAPOLAN

FILMES FINOS LUMINESCENTES DE POLISSACARÍDEOS COM POTENCIAL ATIVIDADE BACTERICIDA

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Química Inorgânica.

Data de aprovação: 15 de Dezembro de 2022

Dra. Renata Danielle Adati, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Alessandro Francisco Martins, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Ana Maria Pires, Doutorado - Fct - Faculdade de Ciências e Tecnologia - Câmpus de Presidente Prudente - Unesp

Eloi Da Silva Feitosa, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 03/01/2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pelo privilégio da vida. Agradeço a todos que lutaram para que qualquer pessoa pudesse ter acesso ao conhecimento. Aos que lutaram para que eu e tantos outros pudéssemos ter acesso à universidade pública, gratuita e de qualidade. E assim, permitindo que nos dias de hoje este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço também aos meus pais, Geraldo e Alessandra, que sempre me incentivaram, e têm sido alicerce em minha vida. Nunca hesitaram em contribuir para minha educação, mesmo com tão poucos recursos. Me sinto orgulhosa de ser a primeira graduada em universidade pública (e mestre) de nossa família, esta conquista é também de vocês.

À Prof. Dr. Renata Danielle Adati, obrigada por toda a orientação, conversas, discussões, paciência, amizade e empatia. Foram anos de iniciação científica e agora mestrado, dos quais sou muito grata.

Agradeço também a todos os professores, profissionais da área e colegas de trabalho que passaram pela minha vida, em especial os colegas que passaram e estão no LSinCOL, todos contribuíram de alguma forma não só na minha formação profissional, mas pessoal também.

Ao meu namorado e melhor amigo Lucas, por todo o apoio e carinho durante essa fase da minha formação. Foi quem esteve comigo desde o período conturbado de estudos para o processo seletivo, e que permanece comigo até o momento, não me deixando desistir do que acredito.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela infraestrutura e apoio financeiro. Ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ-UTFPR), ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, campus Araraquara (IQ-UNESP), ao Complexo de Centrais de Auxílio a Pesquisa (COMCAP - UEM), ao Grupo de Materiais Poliméricos e Compósitos – UEM, ao Laboratório de Materiais, Macromoléculas e Compósitos, da UTFPR-Apucarana e ao Instituto SENAI de Inovação em Eletroquímica (ISI-EQ), pela infraestrutura para realização das análises.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também à CAPES pela bolsa concedida durante parte da realização deste mestrado.

RESUMO

Os filmes produzidos pela técnica Layer-by-layer (LbL) à base de polissacarídeos possuem método simples de obtenção, fácil funcionalização e possibilidade de apresentar propriedades bactericidas. Filmes luminescentes podem ser usados como revestimentos que apresentam uma resposta luminosa ao ambiente químico e a utilização de Eu^{3+} como sonda espectroscópica pode ser útil para o entendimento da formação e estruturação dos filmes. Este trabalho tem como objetivo estudar o processo de montagem de filmes LbL luminescentes utilizando quitosana (CHI) e alginato de sódio (ALG) como polieletrólitos. Substratos de vidro ou poliestireno foram utilizados para produção de filmes. Foi utilizado soluções de polissacarídeos (10 mg/mL) para produzir amostras com 1, 3 e 5 bicamadas. O Eu^{3+} foi adicionado por duas metodologias distintas: método *ex-situ*, $(\text{AC})_n\text{Eu}$ ou método *in-situ*, $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n$. Foi ainda estudado coordenação e propriedades luminescentes frente ao ligante 2-tenoiltrifluoroacetona (tta 1 mmol/L). Todos os filmes exibem a emissão de CHI em 418 nm e a transição intraconfiguracional do Eu^{3+} . O método de deposição *ex-situ* produz filmes com mais íons disponíveis capazes de melhorar as propriedades luminescentes, pois apenas as amostras $(\text{AC})_3\text{Eu}$, $(\text{AC})_5\text{Eu}$ e $(\text{AC})_5\text{Eutta}$ apresentam a emissão ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ Eu^{3+} mais intensa que a matriz ALG/CHI. Amostras com tta apresentam maior tempo de vida de emissão e menor rugosidade na superfície do filme devido à substituição de moléculas de água na esfera de coordenação. Os filmes com mais camadas e os obtidos pelo método do *in-situ* apresentaram maior homogeneidade, indicando a reticulação de Eu^{3+} camada após camada. Os filmes produzidos em substrato de poliestireno (PS_nEu e PS_nEutta) apresentaram uniformidade e reprodutibilidade na formação das camadas, confirmado por elipsometria e microbalança de quartzo. As amostras PS_5Eu , PS_5Eutta , PS_{10}Eu e $\text{PS}_{10}\text{Eutta}$ apresentaram propriedade antiadesiva frente a bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e gram-positivas *Staphylococcus aureus*; dependente da presença de Eu^{3+} e do ligante orgânico, devido a mudanças de hidroflicidade e rugosidade dos filmes. Os materiais produzidos possuem multipotencial para serem utilizados em diversas aplicações como revestimentos inteligentes.

Palavras chave: lantanídeos, luminescência, atividade-bactericida, microbalança de quartzo, Judd-Ofelt.

ABSTRACT

Films based on polysaccharides produced by the Layer-by-Layer (LbL) technique have a simple method of obtaining, simple functionalization and the possibility of presenting antibacterial properties. Luminescent films can be used as coatings that exhibit a luminous response to the chemical environment and the use of Eu^{3+} as a spectroscopic probe can be useful to understand the formation and structure of these films. The present study aims to investigate the assembly process of LbL luminescent films using chitosan (CHI) and sodium alginate (ALG) as polyelectrolytes. Slide glass and polystyrene were used as substrates for the films. Polysaccharide solutions (10 mg/L) were used to manufacture samples with one, three and five bilayers. Eu^{3+} was added by two distinct methodologies: *ex-situ* $(\text{AC})_n\text{Eu}$ and *in-situ*, $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n$. Besides, coordination and luminescent properties along with the ligand 2-tenoiltrifluoroacetone (tta 1 mmol/L). All films exhibit the CHI emission in 418 nm and the intraconfigurational transition of Eu^{3+} . The *ex-situ* deposition method produces films with more available ions capable to enhance the luminescent properties, for only the $(\text{AC})_3\text{Eu}$, $(\text{AC})_5\text{Eu}$ and $(\text{AC})_5\text{Eutta}$ samples presented the ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ emission more intensely than the ALG/CHI matrix. Samples with tta present higher emission lifetime and lower surface roughness due to the substitution of water molecules in the coordination sphere. The films with more layers and those obtained by the *in-situ* method exhibited higher homogeneity, hinting the Eu^{3+} layer post layer reticulation. The films produced in polystyrene substrates showed uniformity and reproducibility in the layer formation, with this being supported by ellipsometry and quartz microbalance. The PS5Eu, PS5Eutta, PS10Eu and PS10Eutta samples presented antiadhesive properties when interacting with gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, and gram-positives as well, such as *Staphylococcus aureus*. Such property depends on the presence of Eu^{3+} and the organic ligand, due to the films' changes in hydrophilicity and roughness. The produced materials have a great potential to be applied in several applications.

Keywords: lanthanides, luminescence, bactericidal activity, quartz microbalance, Judd-Ofelt.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da quitosana e algina.	13
Figura 2: Função de distribuição radial de probabilidade dos níveis $4f$, $5s$, $5p$, $5d$, $6s$ e $6p$ do Cério.....	17
Figura 3: Desdobramento dos níveis de energia do íon Eu^{3+}	18
Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de transferência de energia de um ligante orgânico para o íon Ln^{3+} . Onde CI = Conversão intersistemas, TE = Transferência de energia e (1) = Estado emissor do íon.....	20
Figura 5: Métodos de obtenção de filmes LbL (a). Esquema para conformação de filmes LbL via <i>dip-coating</i> adaptado.	22
Figura 6: Fluxograma de obtenção das lâminas de vidro funcionalizadas.	26
Figura 7: Esquema para obtenção das amostras pelos métodos (a) e (b). Ligante 2-tenoiltrifluoroacetona, tta (c).....	27
Figura 8: Sistema montado para confecção dos filmes LbL, consistem em dois suportes universais, contendo mufas duplas em dois níveis de altura, que servem como apoio para uma barra fina de ferro com rosca, que contém vários pregadores de madeira fixados.	28
Figura 9: Esquema para obtenção das amostras para ensaio bactericida, onde n é o número de bicamadas (a). Detalhe do substrato de poliestireno utilizado (b) e microplaca de 48 poços contendo filmes produzidos (c).....	29
Figura 10: Imagem fotográfica dos pares de amostras, $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n\text{tta}$ (esquerda) e $(\text{AC})_n\text{Eu}\text{tta}$ (direita), nas condições de 1, 3 e 5 bicamadas, sob excitação em aproximadamente 365nm proveniente de lâmpada de luz negra.....	32
Figura 11.: Espectros de excitação e emissão de amostras contendo 1 (a, b), 3 (c, d) e 5 (e, f) bicamadas de ALG/CHI. $\lambda_{\text{em}}=418$ nm e $\lambda_{\text{ex}}=324$ nm para todas as amostras.	34
Figura 12.: Espectros de excitação e emissão de amostras contendo 1 (a, b), 3 (c, d) e 5 (e, f) bicamadas de ALG/CHI. $\lambda_{\text{em}}=612$ nm para todas as amostras; $\lambda_{\text{ex}}=324$ nm para $(\text{AC}_{\text{Eu}})_1$ e $(\text{AC})_1\text{Eu}$; $\lambda_{\text{ex}}=336$ nm para $(\text{AC}_{\text{Eu}})_1\text{tta}$ e $(\text{AC})_1\text{Eu}\text{tta}$; $\lambda_{\text{ex}}=343$ nm para $(\text{AC}_{\text{Eu}})_3$ e $(\text{AC}_{\text{Eu}})_3\text{tta}$; $\lambda_{\text{ex}}=348$ nm para $(\text{AC})_3\text{Eu}$ e $(\text{AC})_3\text{Eu}\text{tta}$; $\lambda_{\text{ex}}=336$ nm para $(\text{AC}_{\text{Eu}})_5$ e $(\text{AC}_{\text{Eu}})_5\text{tta}$; e $\lambda_{\text{ex}}=346$ nm para $(\text{AC})_5\text{Eu}$ e $(\text{AC})_5\text{Eu}\text{tta}$. Fendas de excitação e emissão de 1 nm.	35

Figura 13.: Diagrama CIE para as amostras (AC) ₃ Eu, (AC) ₃ Eutta, (AC) ₅ Eu e (AC) ₅ Eutta (a). Área das transições ⁵ D ₀ → ⁷ F ₂ para cada conjunto de amostras. (■)(AC _{Eu}) _n ; (●)(AC _{Eu}) _n tta; (▲)(AC) _n Eu e (▼)(AC) _n Eutta (b).	36
Figura 14: Estrutura química das unidades de ácido gulurônico (G) e manurônico (M) do alginato (a). Estrutura supramolecular formada em hidrogéis de alginato e cátions di e trivalentes (b e c).	38
Figura 15: Tempos de vida da emissão da transição ⁵ D ₀ → ⁷ F ₂ (614 nm) das amostras (AC) ₃ Eutta (a), (AC) ₅ Eu (b) e (AC) ₅ Eutta (c) sob excitação no comprimento de onda da matriz (346-348 nm).	39
Figura 16: Imagens 3D da morfologia das amostras (AC) ₅ Eu (a), (AC) ₅ Eutta (b), (AC) ₃ Eu (c), (AC) ₃ Eutta (d), (AC _{Eu}) ₅ (e), (AC _{Eu}) ₅ tta (f), (AC _{Eu}) ₃ (g) e (AC _{Eu}) ₃ tta (h); obtidas por microscopia de força atômica	42
Figura 17: Esquema da proposta das estruturas dos filmes produzidos.	43
Figura 18: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras (AC) ₅ Eu e (c, d) (AC) ₅ Eutta.	44
Figura 19: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras (AC) ₃ Eu e (c, d) (AC) ₃ Eutta.	45
Figura 20: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras (AC _{Eu}) ₅ e (c, d) (AC _{Eu}) ₅ tta.	45
Figura 21: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras (AC _{Eu}) ₃ e (c, d) (AC _{Eu}) ₃ tta.	46
Figura 22: Imagens 3D da morfologia das amostras PS ₅ Eu (a), PS ₅ Eutta (b), PS ₁₀ Eu (c), PS ₁₀ Eutta (d), PS ₅ (e), PS ₁₀ (f); obtidas por microscopia de força atômica em uma área de 5x5µm.	47
Figura 23: ângulo de contato de um líquido sobre superfície sólida.	48
Figura 24: Ângulos de contato de água ultrapura sobre a superfície dos filmes.	49
Figura 25: Microbalança utilizada durante os experimentos (a). Cristal de quartzo revestido por prata, utilizado como sensor na microbalança (b).	50
Figura 26: Formação de 5 bicamadas ALG/CHI com tempo de deposição de 20min. Detalhamento de cada adição. Variação de frequência acumulada.	51
Figura 27: Formação de 5 bicamadas ALG/CHI com tempo de deposição de 4min. Detalhamento de cada adição. Variação de frequência acumulada.	52
Figura 28: variação da frequência em relação ao tempo, após a adição do íon Eu ³⁺	52
Figura 29: Imagens de MEV dos filmes controle (apenas PS) (a,b); PS ₁₀ (c,d); PS ₁₀ Eu (e,f); PS ₁₀ Eutta (g,h); PS ₅ (i,j); PS ₅ Eu (k,l); PS ₅ Eutta (m); após ensaio de adesão e proliferação de bactérias frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54

Figura 30: Imagens de MEV dos filmes controle (apenas PS) (a,b); PS ₁₀ (c,d); PS ₁₀ Eu (e,f); PS ₁₀ Eutta (g,h); PS ₅ (i,j); PS ₅ Eu (k,l); PS ₅ Eutta (m,n); após ensaio de adesão e proliferação de bactérias frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
Figura 31: <i>Shield</i> circuito oscilador openQCM.	66
Figura 32: Microbalança de baixo custo e fonte aberta.....	67
Figura 33: Cristal oscilador HC49U.....	68
Figura 34: Interface de usuário da microbalança.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedência e pureza dos reagentes e solventes utilizados na preparação dos filmes.	25
Tabela 2: Valores experimentais de Ω_2 , Ω_4 , taxas radiativas (A_{rad}) e não radiativas (A_{nrad}) de emissão, tempo de vida (τ) e rendimento quântico (η) sob excitação no comprimento de onda da matriz (346 nm).....	41
Tabela 3: Rugosidade dos filmes confeccionados em substrato de vidro.	41
Tabela 4: Rugosidade dos filmes confeccionados em substrato de poliestireno.	46
Tabela 5: Espessura dos filmes confeccionados em substrato de poliestireno.....	49
Tabela 6: Conexão Arduino - openQCM	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos gerais	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Lantanídeos: Compostos de coordenação, efeito antena e propriedades fotoluminescentes	17
3.2. Filmes LbL e suas potenciais aplicações tecnológicas	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Materiais	25
4.2. Conformação dos filmes LbL em substrato de vidro para estudo espectroscópico	25
4.2.1. Preparação das lâminas	25
4.2.2. Preparação dos filmes	26
4.3. Conformação de filmes LbL para ensaios de adesão e proliferação de bactérias	28
4.4. Caracterização	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Filmes LbL confeccionados em substrato de vidro	32
5.1.1. Inspeção visual dos filmes LbL	32
5.1.2. Caracterização fotofísica.....	32
5.1.3. Caracterização morfológica.....	41
5.2. Filmes LbL confeccionados em substrato de poliestireno	46
5.2.1. Caracterização morfológica.....	46
5.2.2. Ângulo de contato	48
5.2.3. Elipsometria	49
5.3. Estudos com microbalança de quartzo	50
5.4. Ensaios de adesão e proliferação de bactérias	53

6. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE 1.....	66

1. INTRODUÇÃO

O interesse por novas tecnologias conduz pesquisadores a desenvolver materiais que superem os já existentes. Busca-se uma melhora na sensibilidade, durabilidade, custo, rapidez, facilidade de fabricação, entre outros quesitos. Geralmente os novos materiais são arquitetados para solucionar problemas no campo da indústria, das comunicações ou da saúde, e os terras raras, em especial os lantanídeos, são elementos presentes em diversas dessas aplicações [1–5].

Em aplicações que envolvem propriedades fotoluminescentes, alguns elementos desta série são muito atrativos, como Eu^{3+} , Sm^{3+} e Tb^{3+} , por exemplo, pois possuem características únicas oriundas das transições $f-f$, como emissão com espectro característico, monocromático, caracterizado por bandas estreitas e definidas. Os orbitais $4f$ são protegidos do ambiente químico por orbitais mais externos, isto faz com que haja pouca influência do meio nas energias desses níveis, e que várias de suas propriedades atômicas sejam mantidas, especialmente propriedades magnéticas e luminescentes. O íon európio (Eu^{3+}), por exemplo, possui emissão na região do vermelho, devido às transições ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$, onde $J=0-4$. Diferentes informações sobre o ambiente químico em torno do íon podem ser extraídas a partir dos espectros de emissão e excitação, como interações de longo alcance e simetria ao redor do íon metálico [6–8].

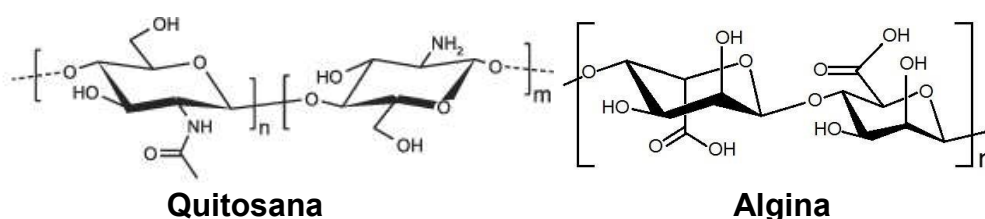
As propriedades luminescentes e similaridades da natureza das ligações e dos raios iônicos do íon Ca^{2+} e Ln^{3+} levaram à aplicação dos íons lantanídeos como sondas espectroscópicas em sistemas biológicos, principalmente no estudo de biomoléculas que se ligam ao cálcio [3,9]. Além disso, a forte interação de Ln^{3+} com átomos de oxigênio e nitrogênio, a estabilidade dos compostos de coordenação, os longos tempos de vida (da ordem de milissegundos), e sua intensa emissão fazem dos lantanídeos ótimos candidatos para serem utilizados em sistemas biológicos [2,10,11].

Porém, a aplicação desses compostos nestes sistemas pode ser limitada. Apesar de suas excelentes propriedades fotoluminescentes, muitos são hidrofóbicos e podem sofrer supressão de luminescência devido às moléculas de água [12,13]. Uma forma de contornar este problema é o desenvolvimento de materiais híbridos, que combinam as vantagens dos lantanídeos e a hidroflicidade e biocompatibilidade

de outras espécies [14]. Dentre os materiais que utilizam polímeros, uma vantagem se dá pelo fato desses compostos serem bastante versáteis, a diversidade de grupos funcionais permite diferentes estruturas, modulação de funcionalidades e aplicações. Por exemplo, a presença de grupos polares e apolares que pode gerar automontagem em meio aquoso [15,16], ou então de grupos amina ou carboxila que poderão facilitar o acréscimo de outros grupos funcionais devido à variedade de possíveis reações desses grupos [15,17,18].

Dentre os polímeros com potencial para estudo encontram-se alguns polissacarídeos já explorados nos campos da biologia (Figura 1) [19]. A quitosana é um biopolímero linear catiônico, formado pela desacetilação da quitina, proveniente de crustáceos, e é composta por unidades N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, e é bastante interessante devido sua baixa toxicidade, facilidade de funcionalização, biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana. Tem sido utilizada como agente carreador de fármacos [20], como sensor para determinação de íons em meio aquoso [21,22], e como agente fungicida e bactericida [23,24]. Donmez *et al.* confeccionou um sensor para ácido dipicolínico baseado em quitosana funcionalizada com EDTA e íon Eu^{3+} . O material se mostrou altamente seletivo frente a possíveis interferentes e também com alta sensibilidade, detectando concentrações da ordem de $\sim 10 \text{ nmolL}^{-1}$ [18]. Por outro lado, considerando a classe de polissacarídeos, a algina (ou alginato quando desprotonado), é obtida de algas marrons e é constituída de unidades de ácido- α -L-gulurônico e ácido- β -D-mannurônico. Possui propriedades e aplicações similares ao da quitosana, podendo formar hidrogéis, micro e nanopartículas [25]. Autores já descreveram a confecção de hidrogéis luminescentes baseados em alginatos e lantanídeos, onde o íon se complexa aos grupos carboxilatos do polímero no lugar de íons Ca^{2+} para formação do gel [26,27], e também a síntese de microesferas com potencial para utilização como agentes de contraste [28].

Figura 1: Estrutura química da quitosana e algina.



Além dessas aplicações, quitosana e alginato podem ser combinados para formação de filmes ou nanoestruturas, quimicamente estáveis, devido à forte interação eletrostática entre os polieletrólitos. Shunli, *et al.* confeccionou filmes automontados transparentes e mecanicamente resistentes, baseados nesses dois polissacarídeos com a presença de íons lantanídeos. Neste mesmo trabalho, a quitosana foi modificada com ácido succínico [29].

Filmes obtidos pela técnica *Layer-by-Layer* (LbL), são de baixo custo e fácil confecção. A técnica consiste na deposição sucessiva de camadas de polieletrólitos de cargas opostas sobre um substrato, garantindo a formação de filmes e cápsulas estáveis e com espessura controlável pela deposição de várias camadas. Zhang, *et al.* estudaram a influência de substituintes na cadeia da quitosana na confecção de nanocápsulas de alginato/quitosana utilizando a técnica LbL, ressaltando a estruturação oferecida pelo método em comparação com metodologias tradicionais de simples mistura desses polímeros [30]. Aston *et al.* estudaram diferentes composições para produção de filmes LbL, avaliando os efeitos de pH e força iônica das soluções. Esses autores observaram através de resultados de XPS e elipsometria que as três primeiras camadas de filmes LbL confeccionados sobre substrato de vidro são pouco dependentes da composição das soluções, e que pouco material é adsorvido. Entretanto, as demais camadas dependem fortemente das interações entre os polieletrólitos e íons presentes na solução [31].

Revestimentos baseados em polieletrólitos podem ser utilizados para aplicação antimicrobiana, e são interessantes para prevenir contaminação por bactérias, especialmente em embalagens alimentícias, e em aplicações biomédicas. Superfícies revestidas via técnica LbL baseadas em quitosana têm sido exploradas, na combinação com diferentes poliânions, e a ação antimicrobiana ou antiadesiva desses revestimentos depende de fatores como rugosidade, pH e composição [24,32–35]. Por outro lado, complexos de lantanídeos também atuam como agentes antimicrobianos, através do mecanismo de quelação, onde, devido a coordenação e deslocalização parcial de elétrons π , há um aumento da lipofilicidade e maior interação entre o ligante e a membrana celular, aumentando sua atividade bactericida [36,37]. A combinação de quitosana e alginato é bastante conhecida na literatura [25,38], entretanto, tem sido pouco explorada com lantanídeos na formação de filmes estruturados pela técnica LbL, especialmente visando aplicação como agente

bactericida. Assim, no presente trabalho, buscamos produzir filmes finos com diferentes graus de organização e estudar suas propriedades ópticas, morfológicas e potencial aplicação como agentes bactericidas utilizando íon Eu^{3+} e polissacarídeos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

No presente trabalho, tem-se por objetivo sintetizar e caracterizar materiais híbridos nanoestruturados na forma de filmes, contendo íons Eu^{3+} e os polissacarídeos naturais quitosana (CHI) e alginato (ALG), e investigar suas propriedades fotoluminescentes e potencial aplicação como agentes bactericidas.

2.2. Objetivos específicos

- Confeccionar filmes finos utilizando polissacarídeos e európio, a partir da técnica *Layer-by-Layer* (LbL);
 - Funcionalizar substratos de vidro para confecção dos filmes;
 - Estudar as diferentes formas de construção dos filmes, modificando a forma de deposição de Eu^{3+} (*ex-situ* e *in-situ*), número de camadas dos filmes e substrato utilizado (vidro ou poliestireno);
 - Caracterizar os materiais de partida e filmes produzidos estrutural, morfológica e espectroscopicamente, utilizando as seguintes técnicas: (i) Espectroscopia de fotoluminescência (EFL); (ii) Microscopia de força atômica (AFM); (iii) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); (iv) Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS); (v) Ângulo de contato; (vi) Elipsometria; (vii) Microbalança de quartzo; dentre outras;
 - Estudar as propriedades fotoluminescentes dos materiais, determinar tempos de vida de emissão e parâmetros de Judd-Ofelt;
 - Correlacionar as propriedades, principalmente espectroscópicas, dos materiais sintetizados com sua morfologia, composição e grau de organização;
 - Explorar as potenciais aplicações dos filmes confeccionados relacionados a propriedades bactericidas e fotoluminescentes.

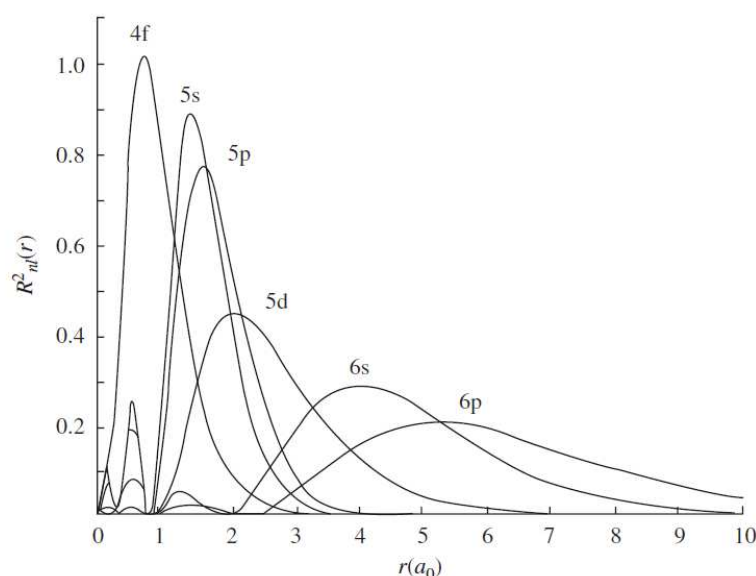
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Lantanídeos: Compostos de coordenação, efeito antena e propriedades fotoluminescentes

Os lantanídeos são elementos químicos pertencentes ao bloco *f* da tabela periódica e correspondem aos elementos de número atômico $Z=54$ ao $Z=71$, respectivamente lantânio e lutécio [39]. Estes elementos são os primeiros a terem os orbitais *4f* preenchidos, o que lhes confere propriedades singulares. À medida que os orbitais *f* (mais internos como podemos observar na Figura 2) são preenchidos ao longo da série e que prótons são adicionados ao núcleo, observa-se um aumento da carga nuclear efetiva e conseqüente diminuição dos raios atômicos, este efeito foi denominado como contração lantanídica [40].

Como os orbitais *f* são internos e blindados por outros mais externos (*5d* e *6s*), além de orbitais *5s* e *5p* do núcleo de Xe, há pouca influência do meio nas energias dos níveis *4f*. Desta forma, esses orbitais pouco participam de ligações químicas, fazendo com que as interações do lantanídeo com outras espécies sejam de baixa covalência. Além disso, esses metais sofrem pouco efeito do campo cristalino e diversas de suas propriedades atômicas são mantidas, em especial as propriedades magnéticas e luminescentes [40,41].

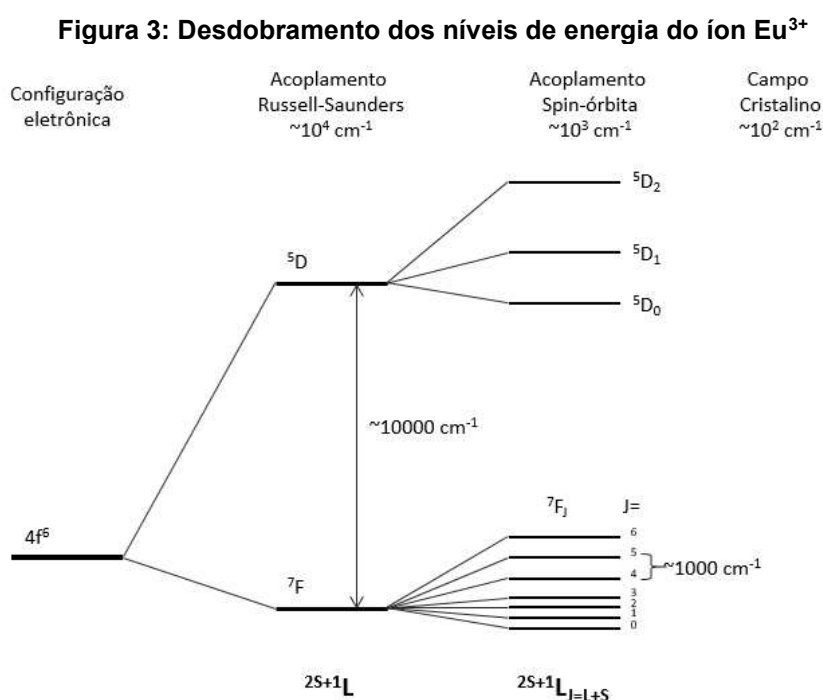
Figura 2: Função de distribuição radial de probabilidade dos níveis *4f*, *5s*, *5p*, *5d*, *6s* e *6p* do Cério.



Fonte: HUANG, 2010. [42]

Os lantanídeos são elementos altamente eletropositivos e possuem preferências pelo estado de oxidação Ln^{3+} . Neste estado de oxidação sua configuração eletrônica é $[\text{Xe}]4f^n$, onde $n=0, 1, 2, \dots, 14$. Por ser um sistema de muitos elétrons, uma quebra de degenerescência é observada para esses níveis de energia, que ocorre devido à repulsão eletrônica. Este efeito é chamado acoplamento Russell-Saunders e é da ordem de $\sim 10000 \text{ cm}^{-1}$. Para este acoplamento podemos calcular o momento de spin total (S) ao somar vetorialmente os momentos de spin dos elétrons, e também o momento angular orbital total ($L=0, 1, 2, \dots$ representados por S, P, D, F, G ... exceto J), calculado a partir da soma vetorial dos momentos angulares desses elétrons [6,40,43,44].

Os elétrons $4f$ também interagem com o campo magnético gerado por elétrons vizinhos em movimento, fenômeno chamado de acoplamento spin-orbita, que causa novas quebras de degenerescência. Ele é representado pela soma de L e S, e dá origem ao número quântico de momento angular total ($J=L+S$), que é da ordem de $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$. Estes desdobramentos levam à geração de termos espectroscópicos de fórmula geral $^{2S+1}L_J$. Por fim, a interação dos elétrons do metal e do ligante, que é de baixa intensidade devido à proteção dos elétrons $4f$, causa o desdobramento de $\sim 100 \text{ cm}^{-1}$ devido à presença do campo ligante [6,40,43,44]. Na Figura 3 podemos observar as quebras de degenerescência comentadas com maior clareza.



Fonte: Adaptado de BINNEMANS, 2015. [6]

As transições entre orbitais $f-f$ podem ocorrer por mecanismos de dipolo magnético ou elétrico, sendo este último proibido pela regra de Laporte [40], fazendo com que as intensidades de emissão sejam da ordem de $\sim 10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. No entanto, quebras de simetria, desdobramentos do campo cristalino e demais efeitos podem relaxar a regra, tornando essas transições mais intensas e até mesmo altamente sensíveis ao ambiente químico [43,45,46].

Segundo a classificação de Pearson, os lantanídeos são categorizados como ácidos duros, e por conta disso interagem bem com bases duras, principalmente espécies que possuem átomos de oxigênio e nitrogênio [40]. Graças a seus raios iônicos elevados, os compostos de coordenação de lantanídeos possuem números de coordenação (NC) altos, podendo chegar a até NC=12, sendo o mais comum NC=8 [39]. Devido ao caráter iônico de suas ligações e da baixa participação dos orbitais f nestas, a geometria dos compostos é determinada principalmente por fatores estéricos entre os ligantes [40].

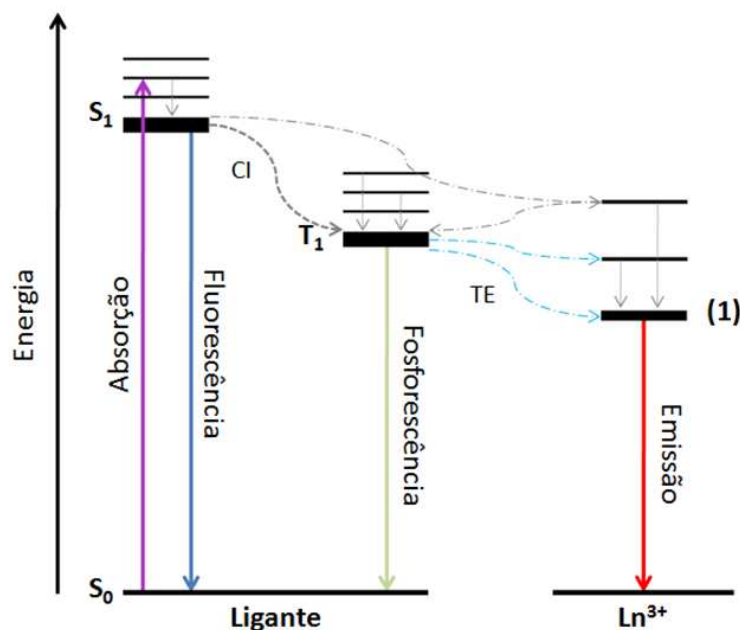
Diferentemente do íon Ln^{3+} livre, quando está coordenado a ligantes orgânicos o lantanídeo pode vir a emitir luz de forma intensa. O fenômeno de fotoluminescência em compostos de coordenação de lantanídeos só é possível devido a um mecanismo de excitação denominado efeito antena [47], que consiste na transferência de energia de estados excitados dos ligantes para o nível emissor do metal [48].

Na Figura 4 podemos observar o mecanismo de transferência, no qual radiação eletromagnética é absorvida pelos ligantes do complexo, que passam de um estado singleto fundamental (S_0) para um estado de singleto excitado (S_1). Esta energia é convertida para o estado tripleto e posteriormente transferida ao estado emissor do metal, que decai radiativamente. A energia pode também ser transferida diretamente do estado S_1 para estados excitados do metal, que decaem não-radiativamente até o estado emissor. Além disso, processos radiativos de fluorescência ou fosforescência do ligante também podem ocorrer.

Para que o efeito antena ocorra, é importante que o estado excitado do ligante seja maior em energia que o nível emissor do metal para que haja eficiente transferência de energia, assim como a ausência de grupos que contribuam com

perdas não radiativas (grupos O-H e N-H, por exemplo) e a presença de grupos fluoróforos, que aumenta a absortividade molar [46,47].

Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de transferência de energia de um ligante orgânico para o íon Ln^{3+} . Onde CI = Conversão intersistemas, TE = Transferência de energia e (1) = Estado emissor do íon.



Devido a característica única do íon Eu^{3+} de possuir níveis de energia não degenerados ($^5\text{D}_0$ e $^7\text{F}_0$), e a possibilidade de utilização da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ como uma referência interna, a relação de intensidades pode ser entendida e calculada a partir do espectro de emissão.

A intensidade de uma banda relacionada a uma transição no espectro de emissão é dada pela Equação 1 onde $\hbar\omega$ é a energia da transição, A é o coeficiente de emissão espontânea de Einstein e N é a população do estado emissor.

$$I = \hbar\omega AN \quad (1)$$

Se todos os estados J são populados igualmente, e N é igual para todas as transições, a equação pode ser rearranjada para determinar a expressão para A_{0J} de uma transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$ ($J = 2, 4$), de acordo com a Equação 2. Nesta equação toma-se como referência a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, insensível ao ambiente químico, pois é permitida somente por dipolo magnético. Portanto, ao admitir que $N_{01} = N_{0J}$, e que a

energia de transição experimentalmente é equivalente ao baricentro da banda referente à transição, ou seja, $\hbar\omega=\sigma$, temos que:

$$A_{0J} = A_{01} \left(\frac{I_{0J}}{I_{01}} \right) \left(\frac{\sigma_{01}}{\sigma_{0J}} \right) \quad (2)$$

Onde $A_{01}=50 \text{ s}^{-1}$, sob um índice de refração $n = 1,5$; I_{0J} é a intensidade da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ ($J = 2, 4$) e I_{01} corresponde a intensidade da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, obtidos pela área integrada de cada banda no espectro de emissão; e σ_{01} é o baricentro de cada banda correspondente. A partir do valor de A_{0J} é possível calcular o valor dos parâmetros de intensidade experimentais, Ω_J , de acordo com a equação 3. Em que a expressão correta para o fator de correção de Lorentz é $\chi = n(n^2 + 2) \frac{n^2+2}{9}$, $n=1,5$ é o índice de refração, e os elementos de matriz do operador unitário $\langle {}^7F_J \| U^J \| {}^5D_0 \rangle$ dos quais os valores são 0, 0032 e 0, 0023 para $J = 2$ e $J = 4$, respectivamente.

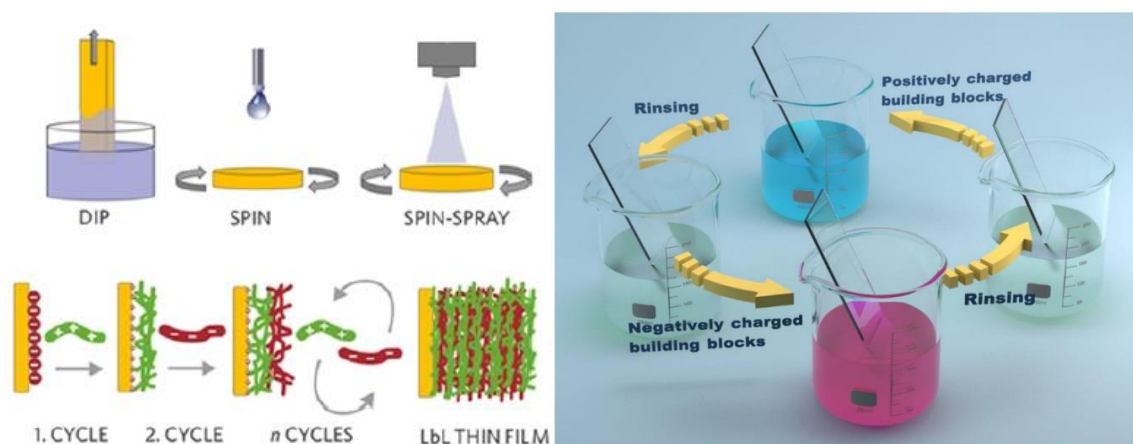
$$\Omega_J = \frac{3 \cdot \hbar \cdot c^3 \cdot A_{0J}}{4 \cdot e^2 \cdot \omega^3 \cdot \chi \cdot \langle {}^7F_J \| U^{(J)} \| {}^5D_0 \rangle^2} \quad (3)$$

3.2. Filmes LbL e suas potenciais aplicações tecnológicas

Os filmes LbL são formados pela deposição sequencial de ao menos dois componentes sobre um substrato. A conformação do filme geralmente se dá a partir de soluções aquosas das moléculas de interesse, e de ciclos de deposição, resultando em filmes finos com espessura da ordem de até micrometros. A força motriz que possibilita a adsorção das camadas são principalmente as interações eletrostáticas. Para produção do filme, soluções de moléculas com cargas opostas são preparadas separadamente, e o substrato é imergido de forma alternada nas soluções, para completo contato da superfície com as moléculas, conforme ilustrado na Figura 5 [49]. Todavia, interações não eletrostáticas abrem portas para diferentes áreas de pesquisa, envolvendo sistemas diferentes tipos de interações como ligações de hidrogênio, hidrofiliidade, ligações covalente, sistemas hóspede-hospedeiro, e a química de coordenação [49,50].

Para a deposição das camadas de moléculas, diferentes tipos de métodos podem ser empregados, dentre eles: *spin-coating*, *spray-coating* e *dip-coating*. Este último pode ser adaptado para que seja empregado com baixa complexidade (Figura 5) e baixo custo para produção de filmes. Béqueres, ou vidrarias similares, podem ser usadas para empregar esse método de forma manual, o que torna fácil a implementação de um sistema para produção de filmes LbL em qualquer ambiente laboratorial, sem a necessidade de um *dip-coater*. Todavia, visando aplicações industriais, outros métodos como *spray* e *spin-coating* são mais viáveis, apesar de oferecerem menor controle de homogeneidade e propriedades.

Figura 5: Métodos de obtenção de filmes LbL (a). Esquema para conformação de filmes LbL via *dip-coating* adaptado.



Fonte: <https://materialschemistry.utu.fi/research/layer-by-layer-assembly-of-thin-films/> e Ren et al., 2019.

Filmes de polissacarídeos preparados pela técnica LbL têm sido empregados em aplicações nos campos da biomedicina e bioengenharia. A estrutura dos polissacarídeos é composta por uma longa cadeia de unidades de monossacarídeos ligados covalentemente por ligações glicosídeas. Estas unidades podem possuir diferentes tipos de grupos funcionais, como grupos hidroxila, carboxila, amina, amida, dentre outros grupamentos hidrofílicos. Isto faz com que esses polímeros interajam bem com tecidos, paredes celulares e demais ambientes biológicos, ampliando as possibilidades de aplicação, como por exemplo na adesão de células, engenharia de tecidos, liberação de fármacos e revestimentos antimicrobianos [51]. As propriedades finais dos filmes podem ser moduladas alterando composição de camadas, espessura, rugosidade e número de camadas [34,51].

No que diz respeito à aplicação como revestimento antimicrobiano, a técnica LbL pode ser facilmente empregada. Fu *et al.* confeccionaram filmes multicamadas intercalando quitosana e heparina sob um substrato de PET. O número de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) aderidas ao filme de polieletrólitos foi muito inferior ao observado para a superfície de PET; além disso, o número de células viáveis após 7h de contato com filme diminuiu até 46-68%. Rufato e colaboradores estudaram diferentes composições de filmes LbL com o poliânion *iota*-carragenina. Os diferentes tipos de polímeros catiônicos originaram filmes com rugosidades e hidrofílicidades diferentes. Os filmes apresentaram atividade contra cepas de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*, além de citocompatibilidade [24].

Quanto à aplicação com lantanídeos na produção de filmes finos utilizando LbL, trabalhos demonstram a deposição de nanopartículas, polioxometalatos, sais e óxidos, combinados com polieletrólitos. A partir da técnica *layer-by-layer*, inúmeros trabalhos estudaram também a formação de cápsulas e nano-revestimentos [52–55].

Zhou e Li, confeccionaram filmes LbL alternando a deposição de moléculas de DNA e EuCl_3 . A partir de espectros de FTIR os autores observaram interação entre metal e grupos fosfatos e bases nitrogenadas das moléculas de DNA. A interação do filme com a beta-dicetona (2-tenoiltrifluoroacetona (tta)) conduziu à formação de filme homogêneo e luminescente, uma vez que foi identificada a relação linear da intensidade da emissão (transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) com a relação de número de camadas [56]. Camacho *et al.*, estudaram a inserção de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Er}$, Yb em filmes finos e suas propriedades espectroscópicas. Foram estudadas as propriedades do pó e de filmes produzidos pela técnica de *casting* e *layer-by-layer*, e observaram reprodutibilidade dos resultados. Por FTIR foi confirmada a presença de nanopartículas do luminóforo e do polímero utilizado, e por outras técnicas como mapeamento por Raman e microscopia foi possível determinar a distribuição desses componentes nos filmes [57].

Cui *et al.* sintetizaram nanopartículas do complexo luminescente $\text{Eu}(\text{DBM})_3$ utilizando polietilenoimina (PEI) como agente estabilizante, as cargas positivas formadas na superfície das nanopartículas foram combinadas com o poliânion poli(4-estirenosulfonato) de sódio para formação de filmes LbL estruturados em superfícies planares e esféricas [58]. O mesmo polímero, PEI, foi utilizado combinado ao polioxometalato $[\text{Eu}(\text{SiW}_4\text{Mo}_7\text{O}_{39})_2]^{13-}$ ($\text{EuSiW}_4\text{Mo}_7$), por Ma *et al.*, para formação de

filmes estruturados por LbL. A confecção dos filmes foi monitorada por UV-vis demonstrando um crescimento linear e reprodutível. Além disso o filme exibiu baixa rugosidade e uniformidade na distribuição de material fotoluminescente [59].

São poucos relatos na literatura de trabalhos onde têm sido explorados materiais bidimensionais contendo polissacarídeos e íons lantanídeos, especialmente avaliando propriedades fotoluminescentes e bactericidas simultaneamente. A avaliação da estruturação gerada por íons lantanídeos em sistemas LbL também são escassas na literatura, por mais que existam trabalhos avaliando outros cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} [31]. A utilização do Eu^{3+} como sonda espectroscópica, é uma ferramenta poderosa para este entendimento, visto que suas propriedades ópticas são sensíveis ao ambiente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para a preparação dos filmes foram utilizados os reagentes e solventes especificados na Tabela 1.

Tabela 1: Procedência e pureza dos reagentes e solventes utilizados na preparação dos filmes.

Reagente	Fórmula	Procedência
Quitosana baixa massa molecular (50-190 kDa, 75-85% desacetilada)	poli-(D-glucosamina)	Sigma-Aldrich
Alginato de sódio (120-190 kDa)	Poli-(muranato)sódico	Sigma-Aldrich
Óxido de Európio 99,9%	Eu_2O_3	Sigma-Aldrich
Ácido Clorídrico PA 37,77%	HCl	Neon
2-tenoiltrifluoroacetona (tta) 99%	$\text{C}_8\text{H}_5\text{F}_3\text{O}_2\text{S}$	Sigma-Aldrich
Ácido Acético 99,7%	CH_3COOH	Neon
Ácido nítrico 65%	HNO_3	Neon
Ácido sulfúrico 98%	H_2SO_4	Neon
Peróxido de hidrogênio 30%	H_2O_2	Alphatech
Glicerol 99,5%	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Alphatech
Acetona 99,5%	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	Neon
Etanol PA 99,8%	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Neon

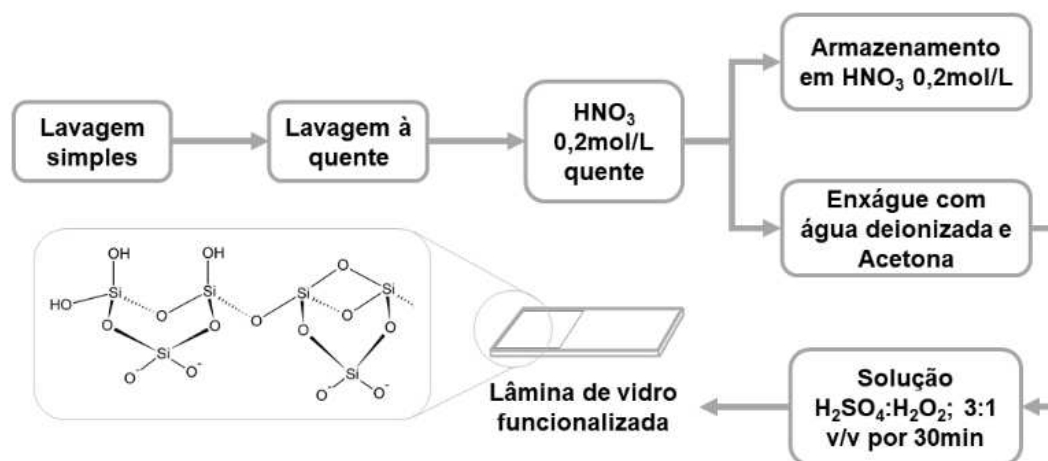
4.2. Conformação dos filmes LbL em substrato de vidro para estudo espectroscópico

4.2.1. Preparação das lâminas

A fim de otimizar a fixação dos polieletrólitos no substrato de vidro, as lâminas de microscopia foram lavadas e tratadas conforme fluxograma da Figura 6. Primeiramente foi feita uma lavagem simples com detergente e, em seguida, uma lavagem a quente por 1 h em solução de detergente. Após o enxague, o substrato de vidro foi fervido em solução de HNO_3 $0,2 \text{ molL}^{-1}$ e, posteriormente, foram armazenadas em solução de mesma composição, em frasco fechado. Imediatamente

antes do uso, as lâminas foram enxaguadas com água deionizada, acetona e secas com ar quente e, em seguida tratadas com solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$; 3:1 v/v) por 30min para formação de grupos Si-OH [60].

Figura 6: Fluxograma de obtenção das lâminas de vidro funcionalizadas.



Fonte: Autoria própria.

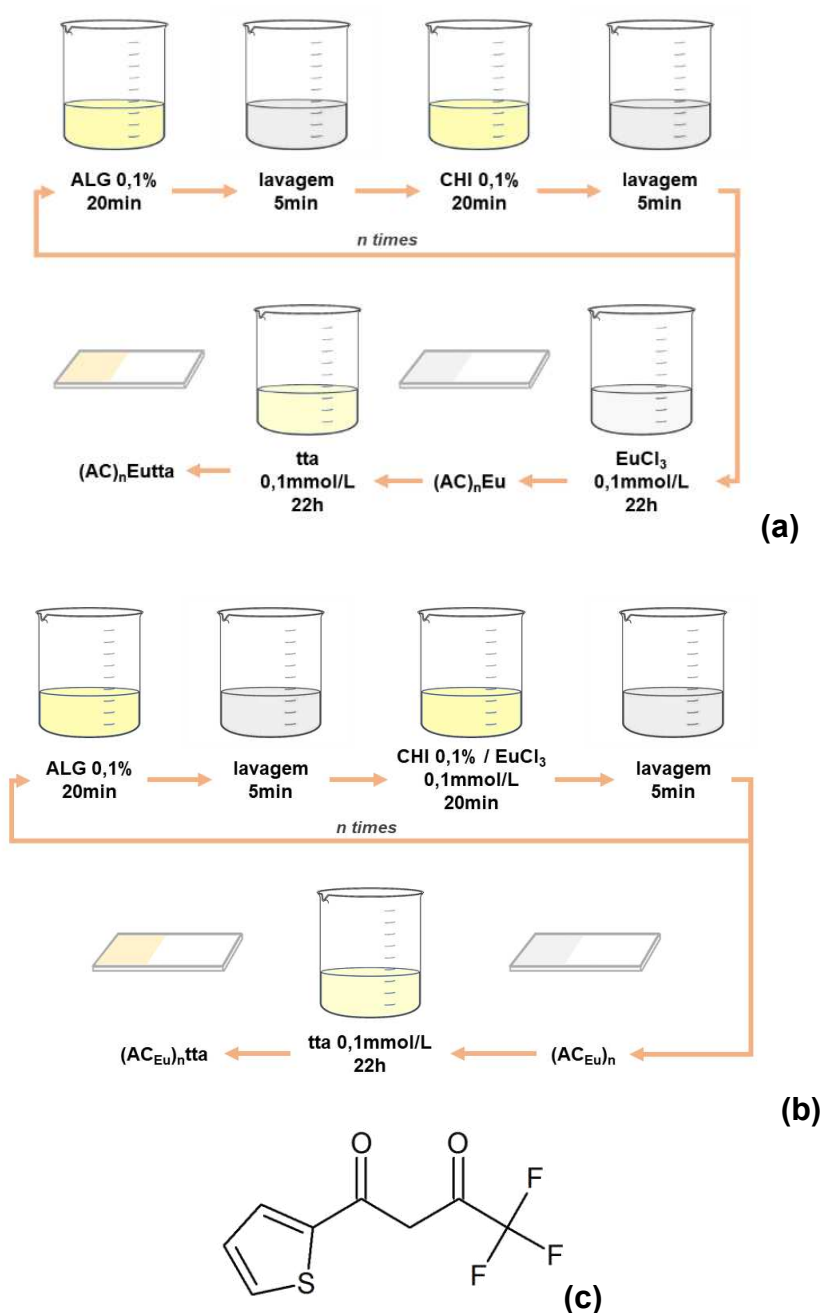
4.2.2. Preparação dos filmes

Soluções dos polímeros foram preparadas na concentração de 0,1% (m/v), sendo para alginato uma solução aquosa, e para a quitosana uma solução em ácido acético $0,02 \text{ molL}^{-1}$ (pH $\sim 4,0$). Os filmes foram confeccionados a partir da imersão, durante 20min, do substrato de vidro recém funcionalizado nas soluções de forma sucessiva, entre cada imersão em solução de polieletrólito o filme foi lavado com água deionizada por 5min. Foram confeccionados filmes com 1, 3 e 5 bicamadas, para estudo das propriedades espectroscópicas [31].

Para este estudo, a deposição de Eu^{3+} foi realizada de duas formas: (a) *ex-situ*, em que após a deposição de todas as bicamadas, o filme foi submerso em uma solução $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de $\text{EuCl}_3(\text{aq})$ por 22h, para obtenção de amostras $(\text{AC})_n\text{Eu}$, sendo n o número de bicamadas (Figura 7a). (b) *in-situ*, em que Eu^{3+} foi depositado concomitantemente à solução que contém o polycation, na concentração de $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, para obtenção das amostras $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n$ (Figura 7b). Foram também confeccionadas amostras controle $(\text{AC})_n$, sem Eu^{3+} , para comparação das propriedades dos filmes.

Com o objetivo de intensificar a emissão e explorar a permeabilidade de ligantes orgânicos e disponibilidade de íons Eu^{3+} nos filmes, os mesmos foram imersos, por 22h, em solução $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de 2-tenoiltrifluoroacetona (tta, Figura 7c), um ligante orgânico conhecido da literatura capaz de transferir energia ao európio de forma eficiente, para obtenção de amostras denominadas $(\text{AC})_n\text{Eutta}$ e $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n\text{tta}$, respectivamente representados em (a) e (b) da Figura 7.

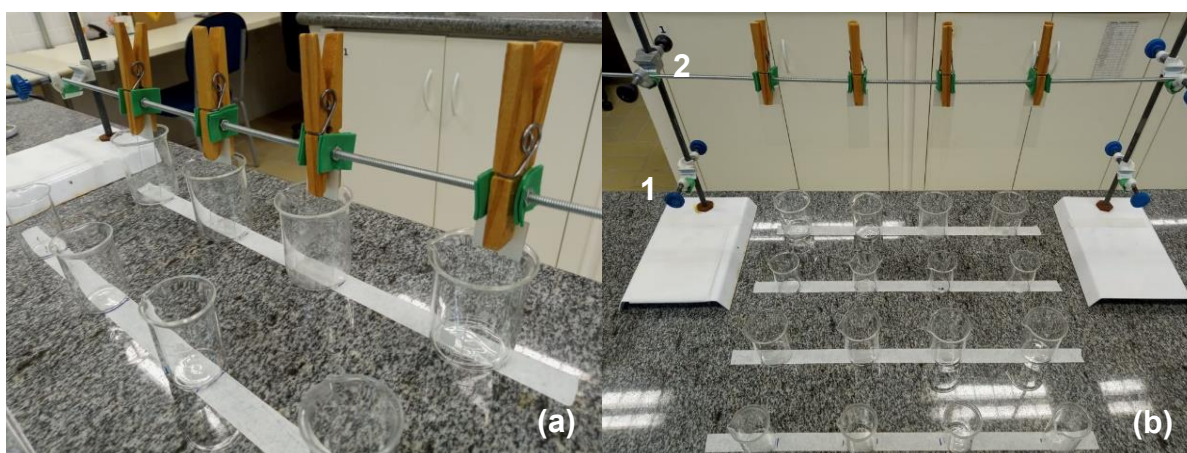
Figura 7: Esquema para obtenção das amostras pelos métodos (a) e (b). Ligante 2-tenoiltrifluoroacetona, tta (c).



Fonte: Autoria própria.

Para a conformação dos filmes LbL foi montado sistema que permite a obtenção de até 5 amostras simultaneamente (Figura 8). Os pregadores são usados como suporte para as lâminas de vidro, e o sistema como um todo permite movimentar, imergir e submergir todas as lâminas de uma só vez. O nível 1 de altura (Figura 8a), é tal que as lâminas fiquem submersas nas soluções dos béqueres de 25 ou 50 mL, e o nível 2 (Figura 8b) possibilita a movimentação dos suportes sem que as lâminas se choquem com os béqueres.

Figura 8: Sistema montado para confecção dos filmes LbL, consistem em dois suportes universais, contendo mufas duplas em dois níveis de altura, que servem como apoio para uma barra fina de ferro com rosca, que contém vários pregadores de madeira fixados.



Fonte: Autoria própria.

4.3. Conformação de filmes LbL para ensaios de adesão e proliferação de bactérias

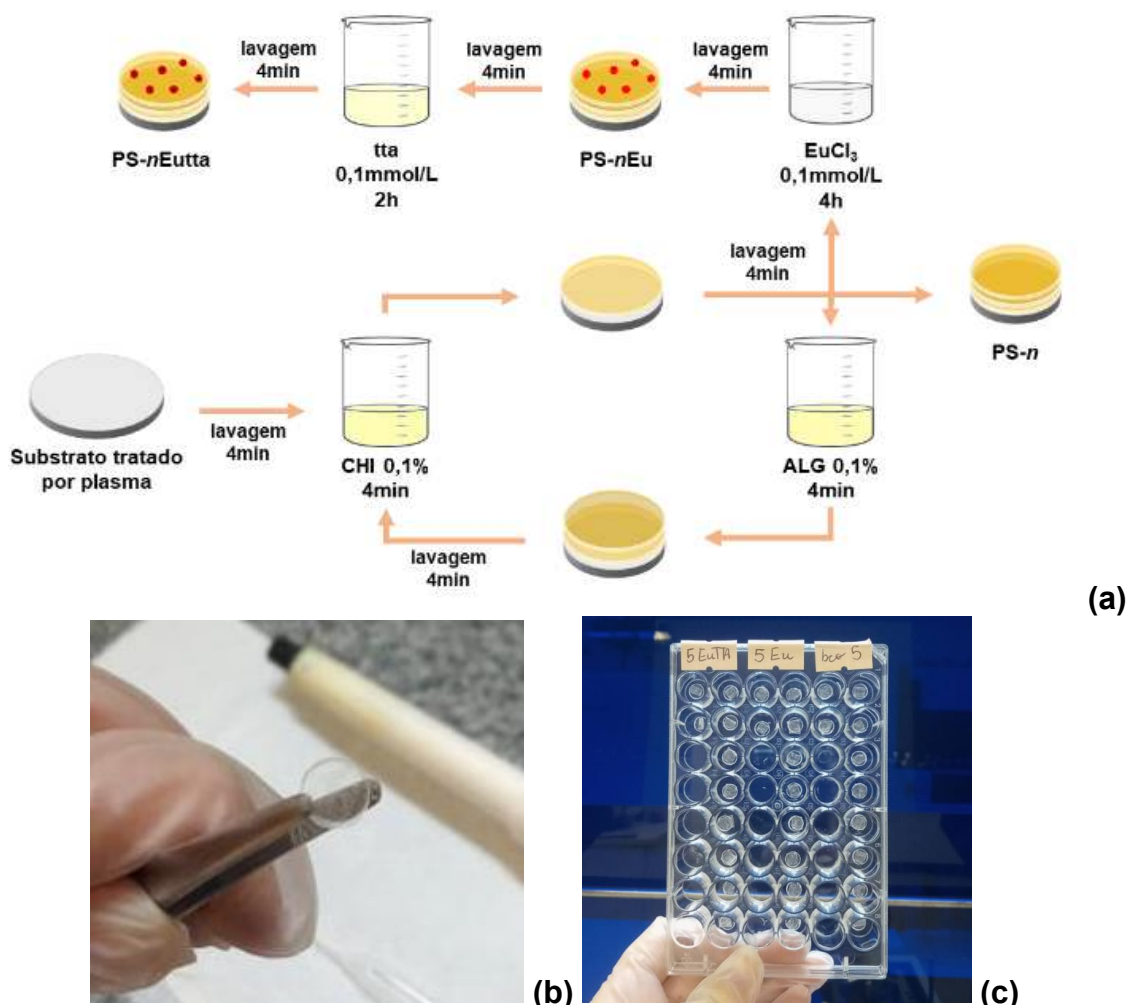
O esquema para obtenção das amostras está representado na Figura 9a. Os filmes foram preparados sobre discos de poliestireno (PS) de 6 mm de diâmetro (Figura 9b) previamente oxidados com persulfato de sódio, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Materiais, Macromoléculas e Compósitos, da UTFPR-Apucarana [24,61]. Os substratos foram acondicionados em microplacas de 48 poços (Figura 9c), e primeiramente foram lavados com 0,4 mL de água deionizada sob agitação de 100 rpm por 4min.

Em seguida, após aspirar a água de lavagem, 0,4 mL de solução de quitosana foi adicionada e agitada por 4min (100 rpm) e aspirada para em seguida adicionar a solução de lavagem [24,32,61]. Após aspiração da água de lavagem, a solução de

alginate foi adicionada sob as mesmas condições, lavado e aspirado. O processo foi repetido até atingir a quantidade requerida de camadas. Foram preparados filmes com 5 e 10 bicamadas, denominados PS₅ e PS₁₀, respectivamente.

Em seguida, uma solução de EuCl₃ (0,4 mL, 1 mmolL⁻¹), foi adicionada sobre os filmes, e permaneceram sob agitação de 50 rpm por 4 h, para obtenção dos filmes PS₅Eu e PS₁₀Eu. A fim de obter os filmes PS₅Eutta e PS₁₀Eutta, uma camada do ligante orgânico tta (0,4 mL, 1 mmolL⁻¹) foi adicionada sob agitação de 50 rpm por 2 h, em seguida lavado com etanol por 4 min.

Figura 9: Esquema para obtenção das amostras para ensaio bactericida, onde n é o número de bicamadas (a). Detalhe do substrato de poliestireno utilizado (b) e microplaca de 48 poços contendo filmes produzidos (c).



Fonte: Autoria própria.

Os ensaios de atividade bactericida foram conduzidos utilizando as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e gram-positivas *Staphylococcus aureus*,

seguindo procedimento descrito por Rufato e colaboradores [24], na UTFPR-Apucarana. Os ensaios foram realizados em duplicata, e, ao fim, as amostras foram liofilizadas para posterior caracterização.

4.4. Caracterização

As medidas de fotoluminescência foram realizadas em espectrofluorímetro VARIAN, modelo CaryEclipse do LAMAQ - UTFPR – CT, e em um espectrofluorímetro Fluorolog-3, modelo Horiba FL3-222, do IQ-Unesp de Araraquara, com lâmpada de xenônio livre de ozônio de 450 W. As medidas foram realizadas a partir do próprio filme em substrato de vidro, ou as amostras foram solubilizadas em solvente adequado, nas respectivas concentrações utilizadas no preparo dos filmes, e acondicionados em cubeta de quartzo.

Para a determinação dos tempos de vida de emissão dos filmes em substrato de vidro, as curvas de decaimento de emissão foram registradas em um espectrofluorímetro HORIBA JOBIN YVON, modelo FL3-222 do IQ-Unesp de Araraquara, com excitação na banda do ligante (350nm) utilizando como fonte de excitação lâmpada de Xenônio pulsada de 150 W. Os parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt (Ω_2 e Ω_4) foram calculados utilizando o *software* LUMPAC, a partir dos respectivos espectros de emissão das amostras.

As imagens de microscopia de força atômica foram adquiridas em modo fase em um equipamento Shimadzu, modelo SPM-9700 HT, utilizando a ponta NCHR do fabricante NanoWorld (constante de força 42 Nm^{-1} e frequência de ressonância de 320 kHz) disponível no LAMAQ – UTFPR – CT. A área de varredura foi de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, velocidade de scan 0,8 Hz, resolução de 512×512 pixels, P gain de 0,001, I Gain de 1500 e operating point de 0,2 V. Para a realização dessas medidas, foi identificada a sessão mais homogênea da amostra e esta foi cortada até a dimensão de $1 \times 1,5 \text{ cm}$, para os filmes em substrato de vidro, e diretamente na superfície para amostras em substrato de poliestireno.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura, foram adquiridas no equipamento Hitachi-3000 disponível no Instituto SENAI de Inovação em

Eletroquímica. As amostras foram metalizadas em equipamento Denton Vacuum DESK V, aplicando corrente de 35 mA por 120 s em folha de ouro.

O método da gota séssil foi usado para medir os ângulos de contato com a água (WCAs, 1 μ L) no PS, PS oxidado e filmes finos sobre estes substratos, usando um medidor de ângulo de contato Tanteq (EUA), do Grupo de Materiais Poliméricos e Compósitos – UEM, a 25° C (n = 3).

As espessuras dos filmes produzidos em substrato de PS foram determinadas por espectroscopia elipsometria (Uvisel Plus – Horiba, França) entre 190 e 2100 nm à temperatura ambiente. O tamanho do ponto da luz polarizada linear nas amostras utilizado esta entre 1 e 2 mm² nos ângulos de incidência de 55°, 60°, 65° e 70°. Um substrato PS limpo foi usado como referência para medir as espessuras dos filmes automontados. As medidas foram realizadas no Centrais de Auxílio a Pesquisa (COMCAP - UEM).

Para analisar o crescimento dos filmes LbL, foi utilizada uma microbalança de quartzo de baixo custo, produzida e disponibilizada pelo Prof. Dr. Luiz Marcos de Lira Faria do Departamento de Química e Biologia da UTFPR-Curitiba. Mais informações sobre a estrutura do equipamento estão presentes no Apêndice 1. O cristal utilizado nas medidas é revestido com prata e possui frequência de oscilação de 6,1 MHz. As soluções de polieletrólito foram depositadas diretamente sobre o cristal de quartzo, em uma gota com volume de 10 μ L com o auxílio de uma micropipeta, e permaneceram em contato com o cristal por 4 ou 20 min, de forma a mimetizar os sistemas produzidos neste trabalho. A adição da solução de cloreto de európio foi monitorada em função do tempo. Com exceção à adição do európio, após cada deposição de camada de polieletrólitos e a cada lavagem, o sensor foi seco com gás Argônio.

5. RESULTADOS

5.1. Filmes LbL confeccionados em substrato de vidro

5.1.1. Inspeção visual dos filmes LbL

Após a confecção dos filmes, foi verificado por inspeção visual (olho nu), maior homogeneidade das amostras contendo o maior número de camadas. Conforme esperado, a intensidade de luminescência também foi maior para estas condições, devido à maior quantidade de íons Eu^{3+} adsorvidos e/ou coordenados à superfície das camadas de polissacarídeos. Na Figura 10 vemos imagens das amostras $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n\text{tta}$ e $(\text{AC})_n\text{Eutta}$ sob excitação de $\sim 365\text{ nm}$ proveniente de lâmpada de luz negra.

Figura 10: Imagem fotográfica dos pares de amostras, $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n\text{tta}$ (esquerda) e $(\text{AC})_n\text{Eutta}$ (direita), nas condições de 1, 3 e 5 bicamadas, sob excitação em aproximadamente 365nm proveniente de lâmpada de luz negra.



Fonte: Autoria própria

Entretanto, para as amostras $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n$ e $(\text{AC})_n\text{Eu}$, a intensidade de emissão no vermelho é baixa, difícil observar a olho nu, exceto para a amostra $(\text{AC})_5\text{Eu}$. Para as amostras contendo o ligante tta foi possível observar emissão no vermelho de forma mais intensa.

5.1.2. Caracterização fotofísica

As transições entre orbitais $f-f$ podem ocorrer por mecanismos de dipolo magnético (insensíveis ao ambiente químico) ou elétrico forçado (sensível ao ambiente químico), proibidas pela regra de Laporte [40], fazendo com que as

intensidades de emissão sejam da ordem de $\sim 10 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. No entanto, quebras de simetria, desdobramentos do campo cristalino e demais efeitos podem relaxar essa regra, tornando as transições mais intensas e até mesmo altamente sensíveis ao meio [43,45,46]. O fenômeno de fotoluminescência em compostos de coordenação de lantanídeos só é possível devido a um mecanismo de excitação denominado efeito antena [47], que consiste na transferência de energia de estados excitados dos ligantes para o nível emissor do metal [48].

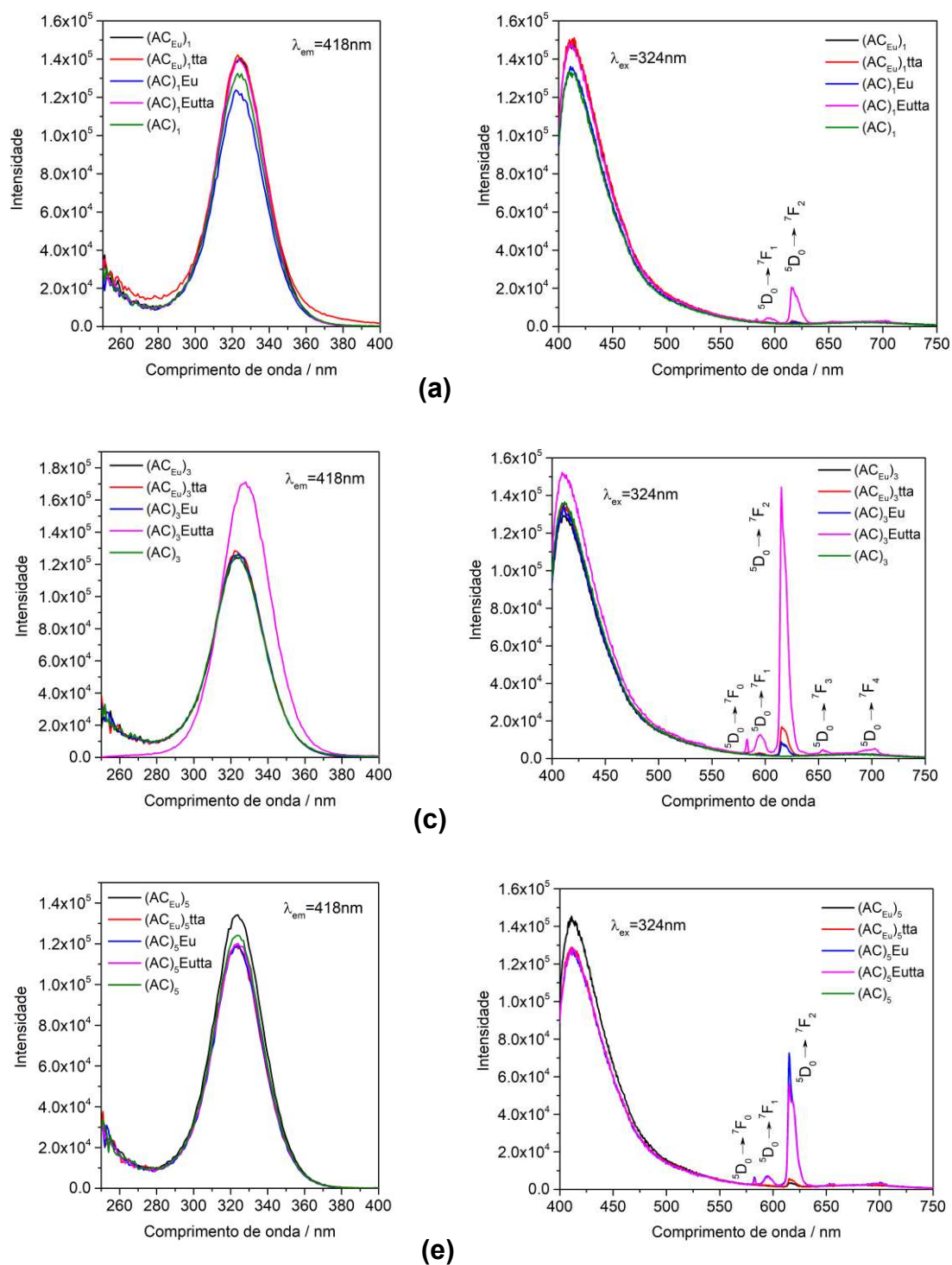
Os filmes LbL confeccionados neste trabalho, tiveram suas propriedades fotoluminescentes monitoradas nos comprimentos de emissão tanto da quitosana, em 418 nm, quanto da transição hipersensível $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ do Eu^{3+} . Os espectros de emissão e excitação obtidos são mostrados na Figura 11 e Figura 12.

Filmes contendo apenas polissacarídeos (amostras $(\text{AC})_n$) apresentaram banda de excitação em 324 nm quando monitorados no comprimento de emissão da quitosana em 418 nm (Figura 11a, 11c e 11e). A mesma banda de excitação é observada com menor intensidade ao monitorar a emissão em 612 nm nas amostras contendo Eu^{3+} (Figura 12b, 12d e 12f), e estas amostras apresentam emissão característica do metal quando excitadas em 324nm (Figura 11b, 11d e 11f), indício de que há transferência de energia de forma direta entre a matriz polimérica e o centro metálico através de efeito antena [62,63].

Para os filmes contendo Eu^{3+} observa-se banda de excitação em 330-350 nm quando monitorado no comprimento de onda da transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ (Figura 12a, 12c e 12e), que aumenta de intensidade com a deposição de mais bicamadas no filme, bem como na presença do ligante orgânico tta, devido à coordenação tanto dos polissacarídeos quanto do ligante orgânico com metal.

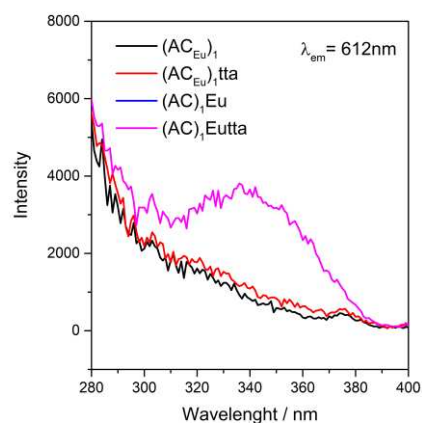
Para obtenção dos espectros de emissão, os comprimentos de onda de excitação utilizados foram aqueles referentes à absorção da matriz polimérica para as amostras $(\text{AC})_1\text{Eu}$ e $(\text{AC}_{\text{Eu}})_1$, que, devido à baixa concentração de íons não foi possível identificar outra banda de excitação na região de $\sim 350\text{nm}$ ao monitorar a emissão em 612nm. Nesta condição observa-se uma banda de emissão larga mais intensa da quitosana, em $\sim 418 \text{ nm}$ [62,64]. Os demais espectros de emissão foram obtidos utilizando o comprimento de onda das respectivas bandas de excitação observadas entre 330-350 nm.

Figura 11.: Espectros de excitação e emissão de amostras contendo 1 (a, b), 3 (c, d) e 5 (e, f) bicamadas de ALG/CHI. $\lambda_{em}=418\text{ nm}$ e $\lambda_{ex}=324\text{ nm}$ para todas as amostras.

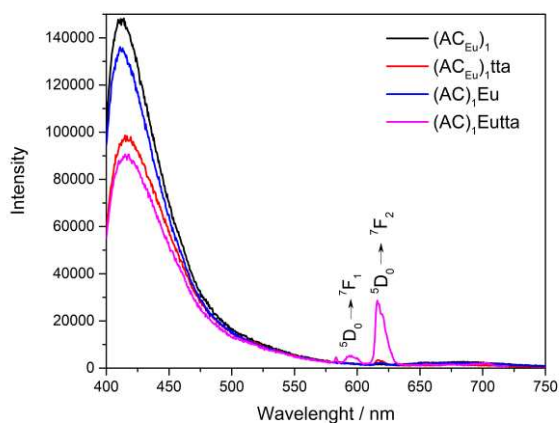


Fonte: Autoria própria

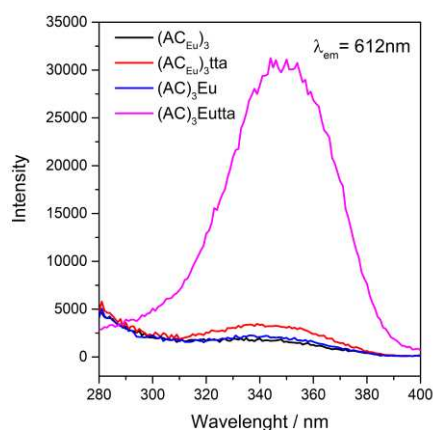
Figura 12.: Espectros de excitação e emissão de amostras contendo 1 (a, b), 3 (c, d) e 5 (e, f) bicamadas de ALG/CHI. $\lambda_{em}=612$ nm para todas as amostras; $\lambda_{ex}=324$ nm para $(AC_{Eu})_1$ e $(AC)_1Eu$; $\lambda_{ex}=336$ nm para $(AC_{Eu})_1tta$ e $(AC)_1Eutta$; $\lambda_{ex}=343$ nm para $(AC_{Eu})_3$ e $(AC_{Eu})_3tta$; $\lambda_{ex}=348$ nm para $(AC)_3Eu$ e $(AC)_3Eutta$; $\lambda_{ex}=336$ nm para $(AC_{Eu})_5$ e $(AC_{Eu})_5tta$; e $\lambda_{ex}=346$ nm para $(AC)_5Eu$ e $(AC)_5Eutta$. Fendas de excitação e emissão de 1 nm.



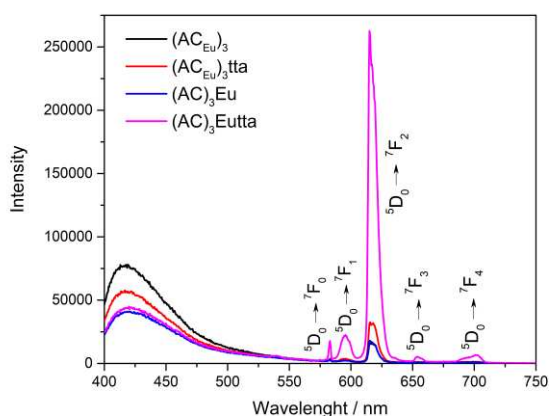
(a)



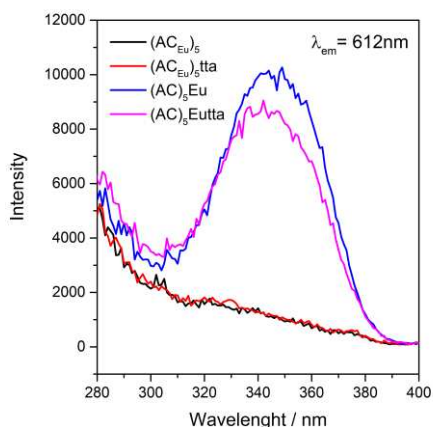
(b)



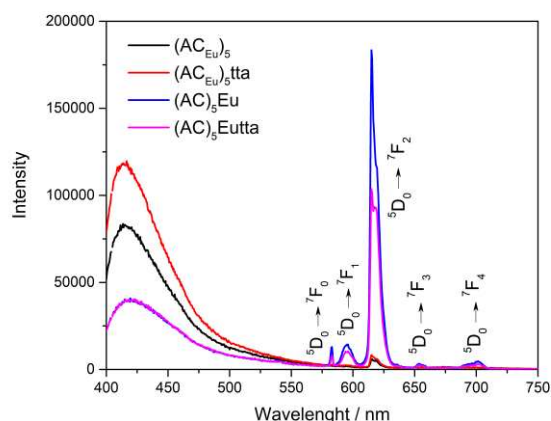
(c)



(d)



(e)



(f)

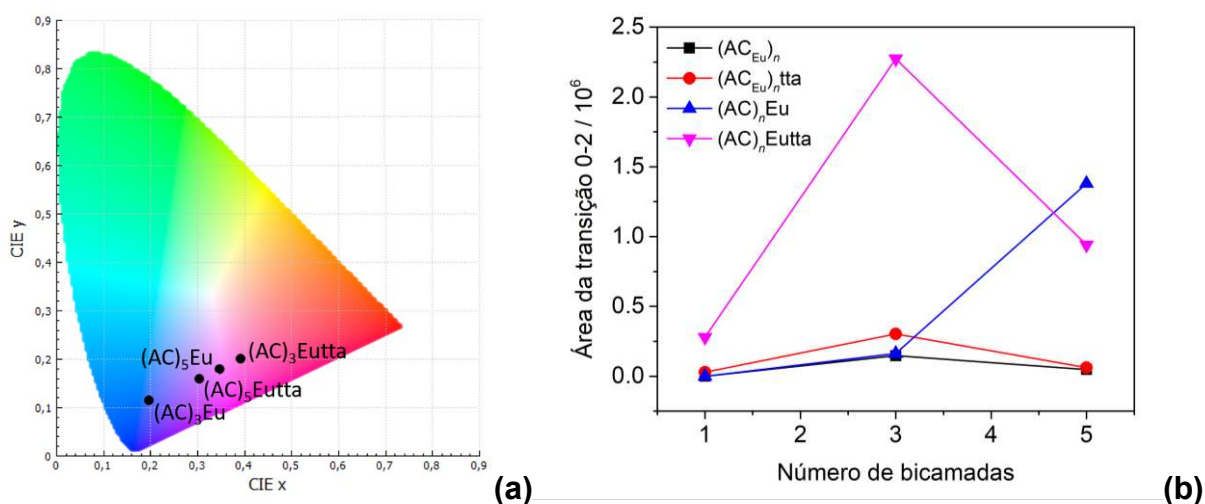
Fonte: Autoria própria.

Todas as amostras apresentaram emissão característica da quitosana em 418 nm, bem como as transições intraconfiguracionais de Eu^{3+} . A relação entre as intensidades das emissões da matriz e do Eu^{3+} , varia em função do aumento da quantidade de bicamadas, condição para a deposição das camadas do íon európio(III), bem como devido à presença do ligante tta.

Os espectros das amostras $(\text{AC})_5\text{Eu}$, $(\text{AC})_5\text{Eutta}$ e $(\text{AC})_3\text{Eutta}$ exibem emissão proveniente do európio de forma mais intensa que aumenta a pureza de cor na região do vermelho, conforme diagrama CIE da Figura 13a. E, para todas as amostras, a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ é a de maior intensidade dentre as emissões características do európio, indicando que o centro metálico está alocado em um ambiente de baixa simetria, sem centro de inversão.

As áreas das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, de maior intensidade para o íon Eu^{3+} , foram calculados. É possível comparar de forma qualitativa as intensidades de emissão na região do vermelho das amostras para identificar quais metodologias conferem filmes com maior quantidade de íons európio presentes em ambientes de baixa simetria e com efetiva transferência de energia para ocorrência de efeito antena. Os gráficos da Figura 13b mostram a área das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ de cada conjunto de amostras.

Figura 13.: Diagrama CIE para as amostras $(\text{AC})_3\text{Eu}$, $(\text{AC})_3\text{Eutta}$, $(\text{AC})_5\text{Eu}$ e $(\text{AC})_5\text{Eutta}$ (a). Área das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ para cada conjunto de amostras. (■) $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n$; (●) $(\text{AC}_{\text{Eu}})_n\text{tta}$; (▲) $(\text{AC})_n\text{Eu}$ e (▼) $(\text{AC})_n\text{Eutta}$ (b).



A comparação direta e quantitativa não pode ser feita para tais amostras por tratar-se de um sistema 2D. As intensidades medidas dependem não só da concentração de íons Eu^{3+} presentes na região analisada da amostra, mas também

do índice de refração, espessura do filme (caminho ótico), diferenças no substrato. Diferentemente de um sistema em solução, para os filmes finos não podemos admitir que há homogeneidade nas amostras e, portanto, uma análise quantitativa não é confiável, e só seria possível ajustando alguns parâmetros, como a utilização do mesmo substrato em todas as medidas, sempre no mesmo ponto, nas mesmas condições experimentais, etc. Entretanto, a partir da informação da área das transições, qualitativamente as amostras podem ser comparadas, para o entendimento das diferentes formas de distribuição dos íons európio nas amostras e fenômenos de transferência de energia.

A amostra (AC)₃Eu_{tta} apresenta maior intensidade da transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ em relação aos filmes obtidos pelas duas metodologias. As diferentes intensidades das amostras (AC_{Eu})₃tta e (AC)₃Eu_{tta} indicam que a deposição de Eu³⁺ após a confecção dos filmes garante maior quantidade de íons disponíveis para a coordenação com ligante tta.

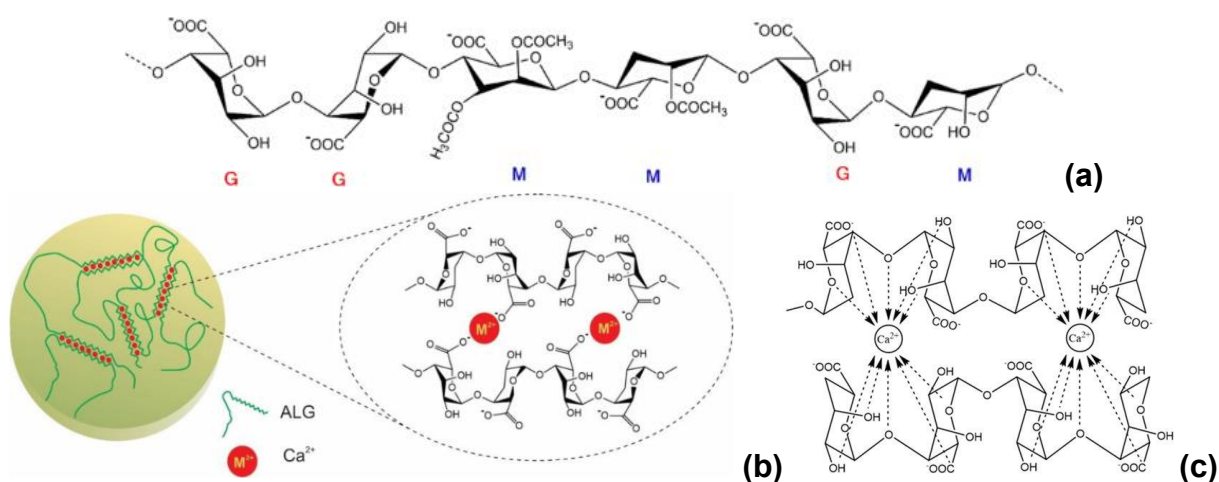
A pequena variação na emissão das amostras (AC_{Eu})₅ e (AC_{Eu})₅tta, e a ausência de cor da amostra em câmara UV, indicam que o tta não permeia a estrutura do filme de ALG/CHI para a efetiva coordenação com os íons európio nestas condições. Entretanto para amostra (AC)₅Eu, intensa emissão na região do vermelho é observada, nestas condições (5 bicamadas de polieletrólitos e deposição dos íons Eu³⁺ pelo método *ex-situ*, após formação das bicamadas) há favorecimento da coordenação, e transferência de energia da matriz polimérica ao centro metálico, conforme observado nos espectros de excitação e emissão. Ao coordenar-se a matriz, estruturas supramoleculares são geradas que atuam por efeito estéreo na proteção do centro metálico [27],

Na presença de íons o alginato pode gerar estruturas supramoleculares comumente denominadas de “caixa de ovo”, onde os grupos ácidos dos monômeros de ácido gulurônico coordenam-se aos metais, conforme esquemas da Figura 14 [65,66]. Devido à similaridade dos raios iônicos de Eu³⁺ e Ca²⁺, além da alta afinidade de ambas espécies com oxigênio devido a acidez de Lewis, Eu³⁺ e outros lantanídeos, são capazes de formar as mesmas estruturas já conhecidas [26,29,67].

Uma inversão da tendência é observada na comparação entre os espectros de (AC)₅Eu e (AC)₅Eu_{tta}, onde a amostra sem tta é mais intensa. Isto possivelmente ocorre, pois, ao coordenar-se ao tta ocasiona *quenching* por efeito de concentração.

Mais testes serão realizados para entendimento deste processo, como replicatas, estudo por microbalança de quartzo, e medidas do mesmo conjunto de amostras (antes e depois da deposição de tta), a fim de determinar se os processos observados são relacionados a *quenching* ou apenas diminuição da concentração de európio por lixiviação em solução etanólica, ou até mesmo a não homogeneidade dos filmes.

Figura 14: Estrutura química das unidades de ácido gulurônico (G) e manurônico (M) do alginato (a). Estrutura supramolecular formada em hidrogéis de alginato e cátions di e trivalentes (b e c).



Em suma, os resultados de fotoluminescência obtidos até o momento indicam que o método *ex-situ* produz filmes com maior disponibilidade de íons Eu³⁺, não necessariamente em ambientes de baixa simetria capazes de contribuir para propriedade luminescente, mas que na condição de maior número de camadas intensa emissão é observada devido transferência de energia da matriz para o íon metálico. E para as amostras produzidas pelo método *in-situ* há menor número de íons európio disponíveis, possivelmente por estarem totalmente coordenados a matriz polimérica, e estarem confinados no meio dos filmes, visto que houve menor intensificação da emissão ao adicionar o ligante orgânico no filme.

O tempo de vida reflete o tempo que o fluoróforo passa emitindo em um determinado comprimento de onda após cessar a excitação, e é obtido pela Equação 1, onde A_{rad} e A_{nrad} são, respectivamente, as taxas de energia radiativa e não-radiativa.

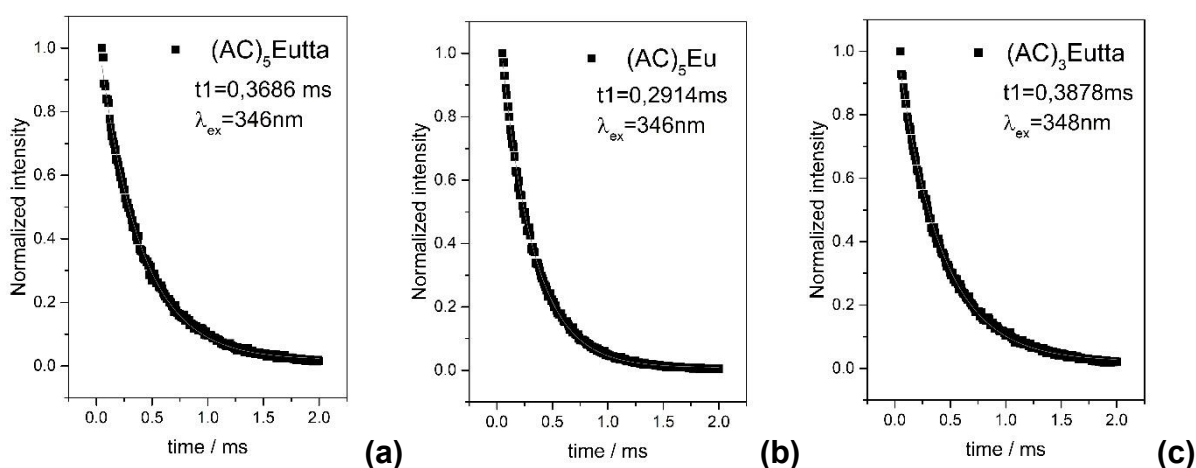
$$\tau = \frac{1}{A_{rad} + A_{nrad}} \quad (1)$$

Esta propriedade é interessante ao vislumbrar aplicação de materiais luminescentes como sensores, ou marcadores em meios biológicos, pois abre a possibilidade de medidas em função do tempo. Moléculas biológicas em geral tem tempo de vida de emissão da ordem de nano-segundos, enquanto complexos de lantanídeos podem ter tempo de vida superior em várias ordens de grandeza, chegando a mili-segundos (ms). Desta forma é possível realizar medidas sem interferência das emissões da matriz biológica [13,45,68].

Os valores de tempo de vida de emissão da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (614nm) dos filmes de maior intensidade estão mostrados na Figura 15. Observou-se tempos de vida da emissão da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ das amostras $(AC)_5Eu$, $(AC)_5Eutta$ e $(AC)_3Eutta$, da ordem de 0,29 ms, 0,37 ms e 0,39 ms, respectivamente. Todos os ajustes de função exponencial de primeira ordem realizados resultaram em valores de coeficiente de correlação, R^2 , maiores que 0,99. Apesar de haverem diferentes formas de coordenação, ou seja, diversos ambientes de simetria diferentes para o íon Eu^{3+} , um desses sítios possui uma intensidade de emissão superior, que dificulta a observação do decaimento dos outros sítios. Logo, o resultado esperado de um decaimento multiexponencial não é observado.

O aumento do tempo de vida ao comparar as amostras $(AC)_5Eu$ e $(AC)_5Eutta$, é possivelmente o resultado da substituição de moléculas de água coordenadas ao centro emissor, que diminuem a perda de energia de forma não radiativa. A amostra $(AC)_3Eutta$, apresenta o maior tempo de vida, que indica as maiores taxas de decaimento radiativo.

Figura 15: Tempos de vida da emissão da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (614 nm) das amostras $(AC)_3Eutta$ (a), $(AC)_5Eu$ (b) e $(AC)_5Eutta$ (c) sob excitação no comprimento de onda da matriz (346-348 nm).



Fonte: Autoria própria.

As intensidades relativas, e posições dos baricentros das transições $f-f$ dos lantanídeos são alteradas em função de vários fatores relacionados à presença de um campo ligante. Os ligantes coordenados ao metal quebram a simetria em volta do íon, relaxando regras de seleção, além de atuarem como sensibilizadores através de efeito antena. Os parâmetros de Judd-Ofelt [69,70], nos permitem avaliar simetria local, taxas radiativas e não-radiativas e efeitos de longo alcance. Estes parâmetros de intensidade (Ω_2 e Ω_4) podem ser obtidos para qualquer lantanídeo a partir do espectro de absorção, e através do espectro de emissão para o íon Eu^{3+} , devido a presença da transição ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$, que atua como uma referência interna [71]. A partir de tais parâmetros é possível também determinar taxas radiativas e não radiativas de energia, e o rendimento quântico intrínseco (η , Equação 2).

$$\eta = \frac{A_{rad}}{A_{rad} + A_{nrad}} \quad (2)$$

Na Tabela 2 são mostrados tais parâmetros para as amostras $(\text{AC})_5\text{Eu}$, $(\text{AC})_5\text{Eutta}$ e $(\text{AC})_3\text{Eutta}$. Como esperado, a amostra $(\text{AC})_3\text{Eutta}$ exibe maior rendimento quântico intrínseco e maior valor de Ω_2 que indica que o centro metálico está inserido em um ambiente de menor simetria, e, portanto, relaxa a proibição das transições $f-f$ e aumenta a perda de energia de forma radiativa.

Conforme também esperado, para as amostras contendo cinco bicamadas, apesar de $(\text{AC})_5\text{Eu}$ possuir uma taxa radiativa de emissão superior, a eficiência quântica em relação a $(\text{AC})_5\text{Eutta}$ é menor. Isto devido a presença de moléculas de água coordenadas que aumentam as taxas não radiativas, enquanto na amostra com ligantes coordenados a eficiência e o tempo de vida aumentam.

Os valores de Ω_4 são próximos entre si para as três amostras, que indica pouca variação nas interações de longo alcance entre o centro metálico e a matriz polimérica, ao comparar as diferentes amostras, resultado esperado, visto que os íons Eu^{3+} estão todos inseridos na matriz.

Tabela 2: Valores experimentais de Ω_2 , Ω_4 , taxas radiativas (A_{rad}) e não radiativas (A_{nrad}) de emissão, tempo de vida (τ) e rendimento quântico (η) sob excitação no comprimento de onda da matriz (346 nm).

	$\Omega_2 / 10^{-20} \text{ cm}^2$	$\Omega_4 / 10^{-20} \text{ cm}^2$	$A_{\text{rad}} / \text{s}^{-1}$	$A_{\text{nrad}} / \text{s}^{-1}$	τ / ms	$\eta (\%)$
(AC) ₅ Eu	16,97	1,78	595.50	2836.21	0,29	17.35
(AC) ₅ Eutta	14,79	1,69	578.31	2134.66	0,37	21.32
(AC) ₃ Eutta	18,51	1,87	639.84	1938.81	0,39	24.81

5.1.3. Caracterização morfológica

A característica morfológica das amostras confeccionadas em substrato de vidro contendo Eu^{3+} foi obtida por microscopia de força atômica (AFM), as imagens 3D das amostras são mostradas na Figura 16 e os valores de rugosidade média quadrática (R_z) estão listadas na Tabela 3. A superfície dos filmes se mostrou bastante homogênea, com formação de alguns aglomerados de polímero, presentes em maior quantidade nas amostras com três bicamadas.

Tabela 3: Rugosidade dos filmes confeccionados em substrato de vidro.

Amostra	R_z / nm	Amostra	R_z / nm
(AC) ₅ Eu	34,978	(AC _{Eu}) ₅	12,184
(AC) ₅ Eutta	17,764	(AC _{Eu}) ₅ tta	30,560
(AC) ₃ Eu	40,659	(AC _{Eu}) ₃	14,508
(AC) ₃ Eutta	30,044	(AC _{Eu}) ₃ tta	35,513

Amostras contendo tta apresentam menor rugosidade para a série de amostras com európio depositado após a formação do filme (amostras (AC)_nEutta, Figura 16b e 16d), que pode ser um indicativo de que a presença do ligante orgânico atua reticulando as cadeias poliméricas devido a coordenação com íon európio, expulsando moléculas de água do interior do retículo, e aumentando a interação polímero-metal e/ou polímero-polímero, que torna a superfície mais homogênea [38].

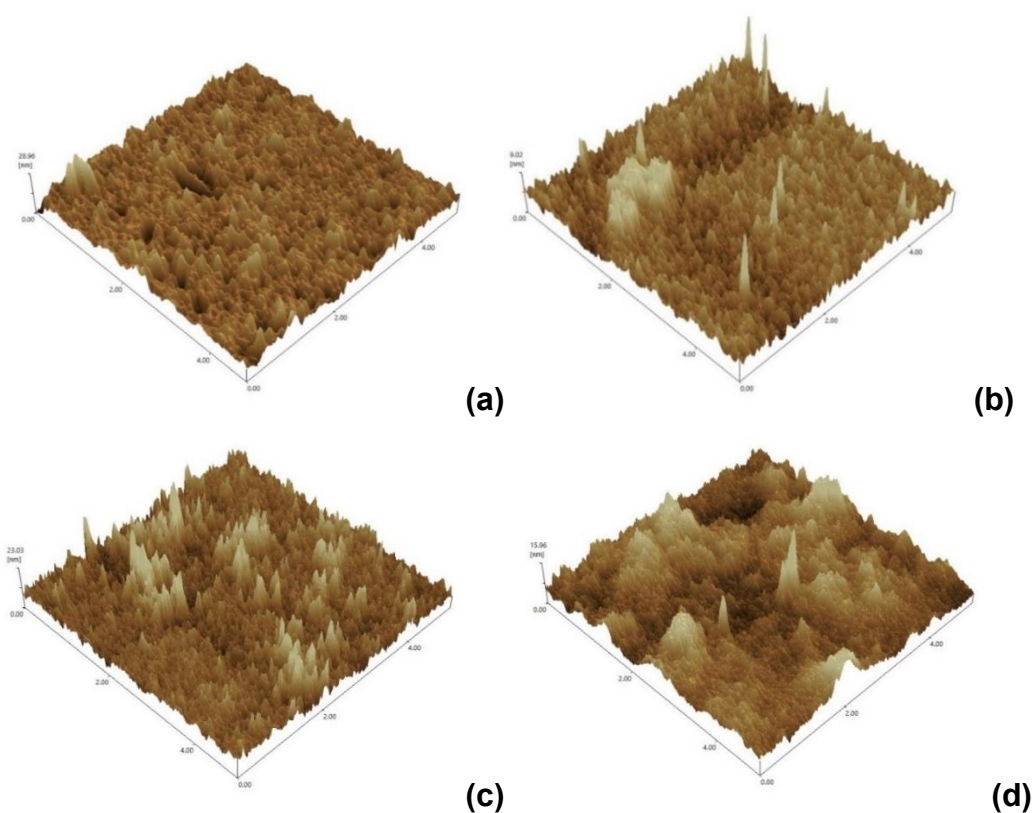
O contrário é observado para o conjunto de amostras com európio depositado camada após camada (amostras (AC_{Eu})_ntta, Figura 16f e 16h), e é um indicativo de que o ligante orgânico penetra pouco no filme. Pode haver dificuldade para coordenação devido as esferas de coordenação já estarem totalmente preenchidas

por ligações com a matriz polimérica. Isto gera acúmulo de tta na superfície das amostras, resultado que corrobora com a baixa intensidade de emissão na região do vermelho, observado para essas amostras.

O maior número de bicamadas no filme também ocasiona diminuição da rugosidade, possivelmente por preencher regiões vazias do substrato, diminuir a quantidade de aglomerados e ocasionar reticulação de forma mais homogênea na superfície. Para o conjunto de amostras obtidas pelo método *in-situ* (Figura 16e e 16g), menor rugosidade é observada possivelmente devido à intercalação de íons Eu^{3+} camada após camada, favorecendo reticulação [72].

Uma Figura 17 tem um esquema de uma proposta das estruturas dos filmes, ilustrando as diferenças dos filmes produzidos pelos métodos *in-situ*, com íon intercalados e maior organização das camadas; e *ex-situ*, com cadeias menos reticuladas e um gradiente de concentração de íon Eu^{3+} .

Figura 16: Imagens 3D da morfologia das amostras $(\text{AC})_5\text{Eu}$ (a), $(\text{AC})_5\text{Eutta}$ (b), $(\text{AC})_3\text{Eu}$ (c), $(\text{AC})_3\text{Eutta}$ (d), $(\text{AC}_{\text{Eu}})_5$ (e), $(\text{AC}_{\text{Eu}})_5\text{tta}$ (f), $(\text{AC}_{\text{Eu}})_3$ (g) e $(\text{AC}_{\text{Eu}})_3\text{tta}$ (h); obtidas por microscopia de força atômica



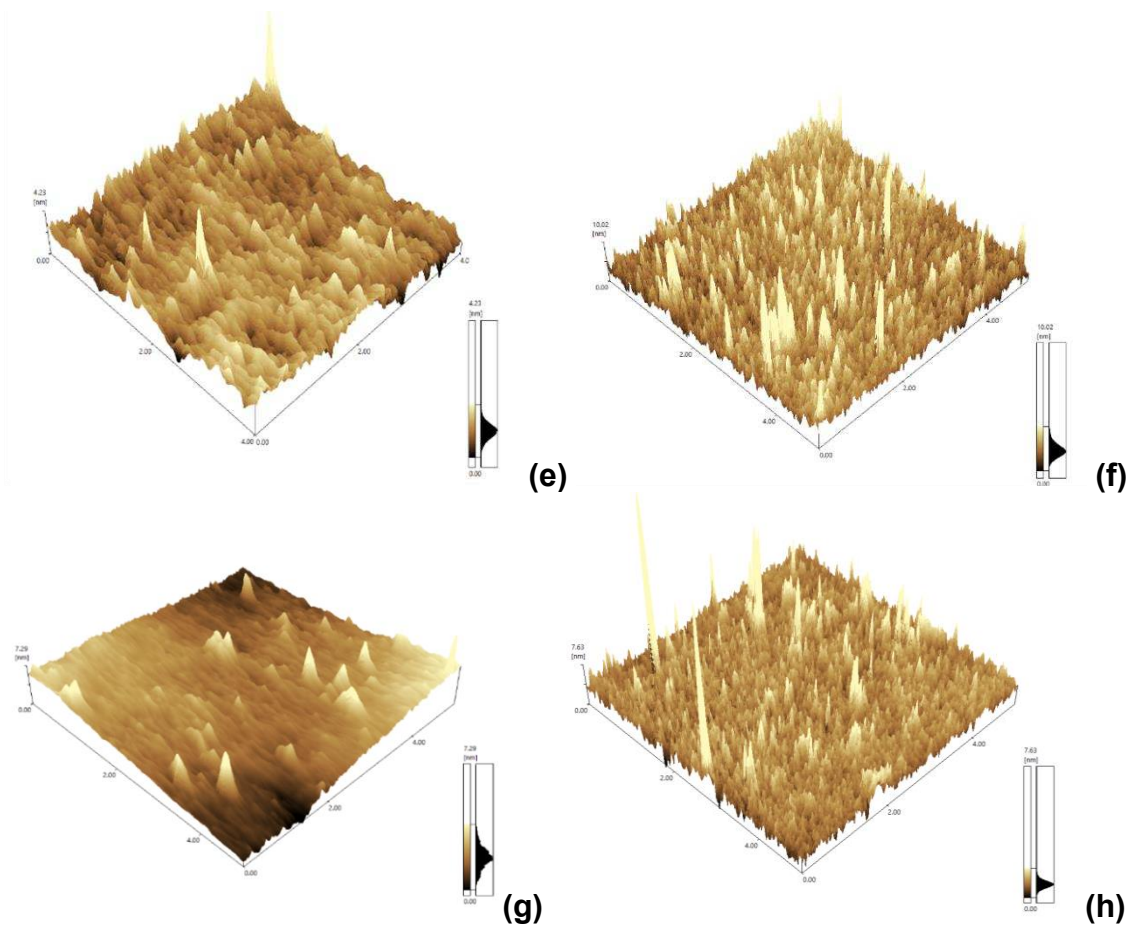
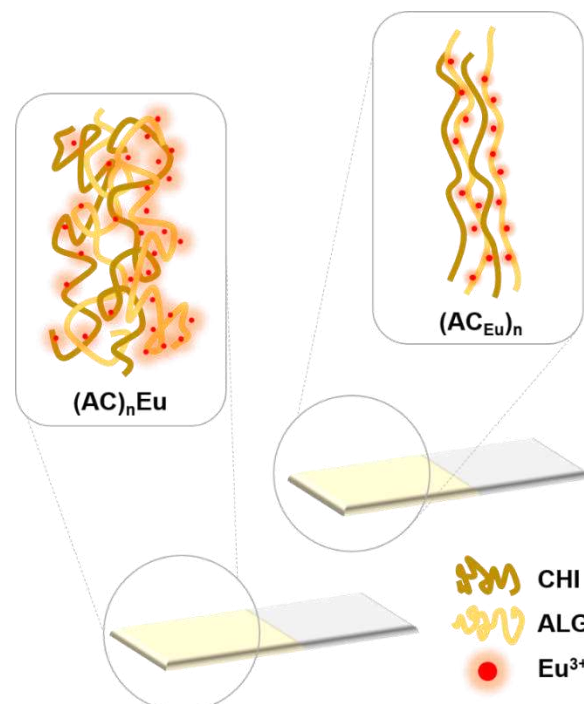


Figura 17: Esquema da proposta das estruturas dos filmes produzidos.



Fonte: Autoria própria.

Imagens obtidas no modo fase carregam informação da homogeneidade das estruturas presentes na superfície dos filmes através do contraste de cores, podendo diferenciar regiões cristalinas, orgânicas e inorgânicas. Estes resultados estão presentes nas Figura 18 a 21, juntamente com a imagem 2D de cada amostra.

Alguns pontos mais altos e de maior contraste (imagens em fase presentes em: Figura 18d; Figura 20b,e; Figura 21b,e) podem ser observados e estes pontos podem ser regiões de alta reticulação, que geram estruturas cristalinas aglomeradas devido a presença de íons Eu^{3+} , ou no caso das amostras com ligante orgânico tta, estruturas cristalizadas do mesmo.

Figura 18: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras $(\text{AC})_5\text{Eu}$ e (c, d) $(\text{AC})_5\text{Eutta}$.

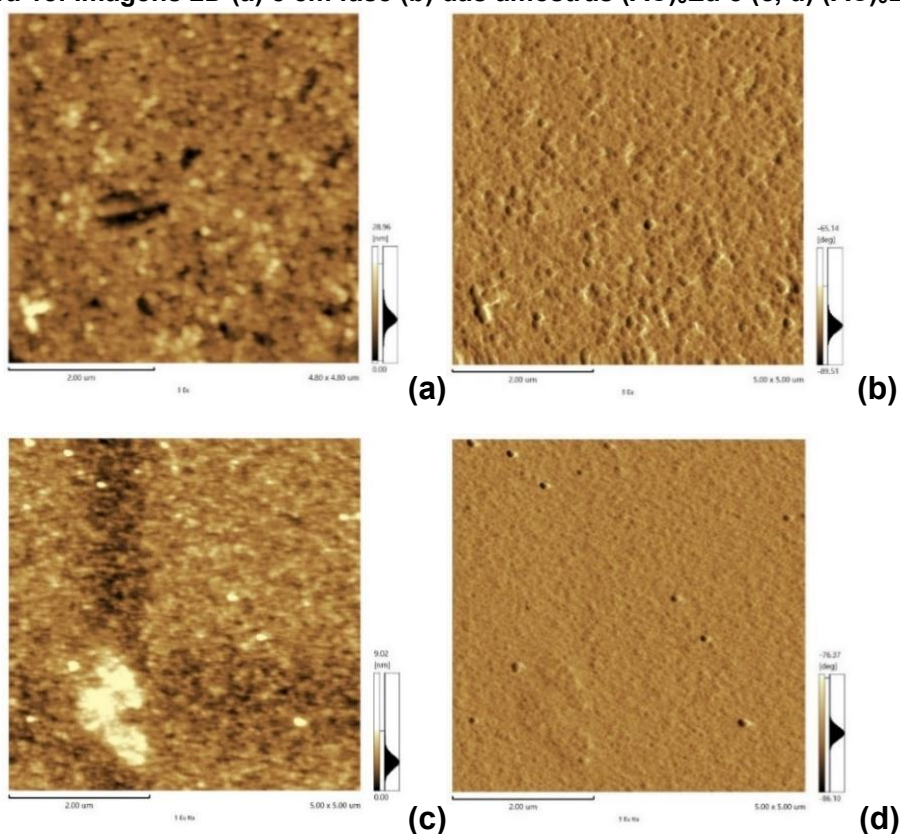


Figura 19: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras $(AC)_3Eu$ e (c, d) $(AC)_3Eutta$.

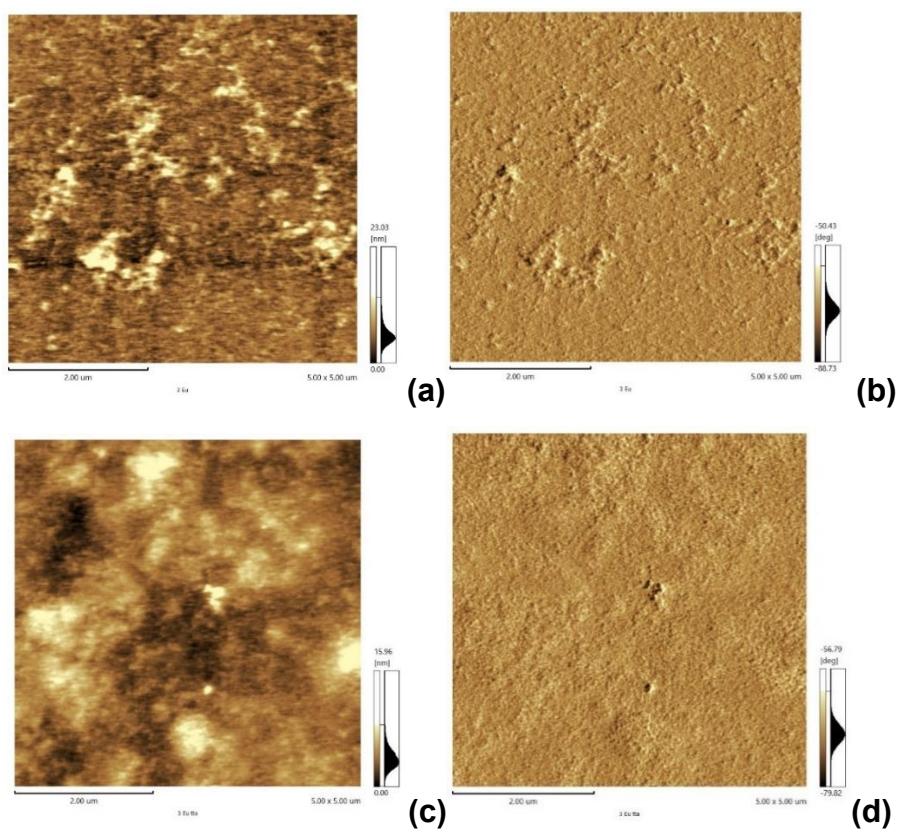


Figura 20: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras $(AC_{Eu})_5$ e (c, d) $(AC_{Eu})_5tta$.

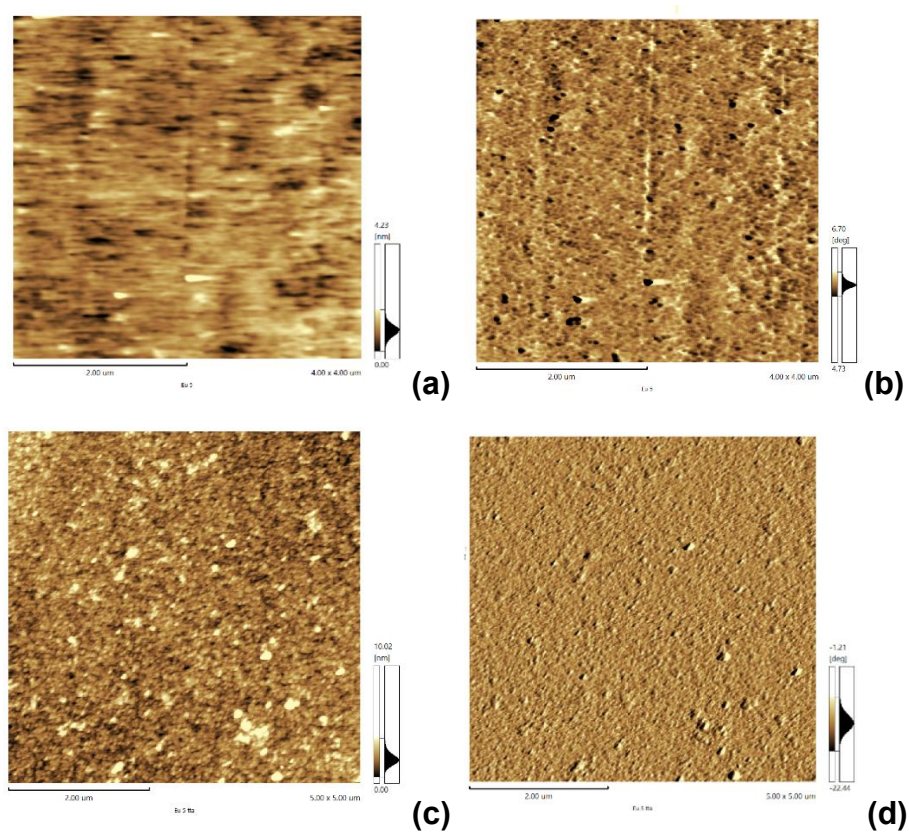
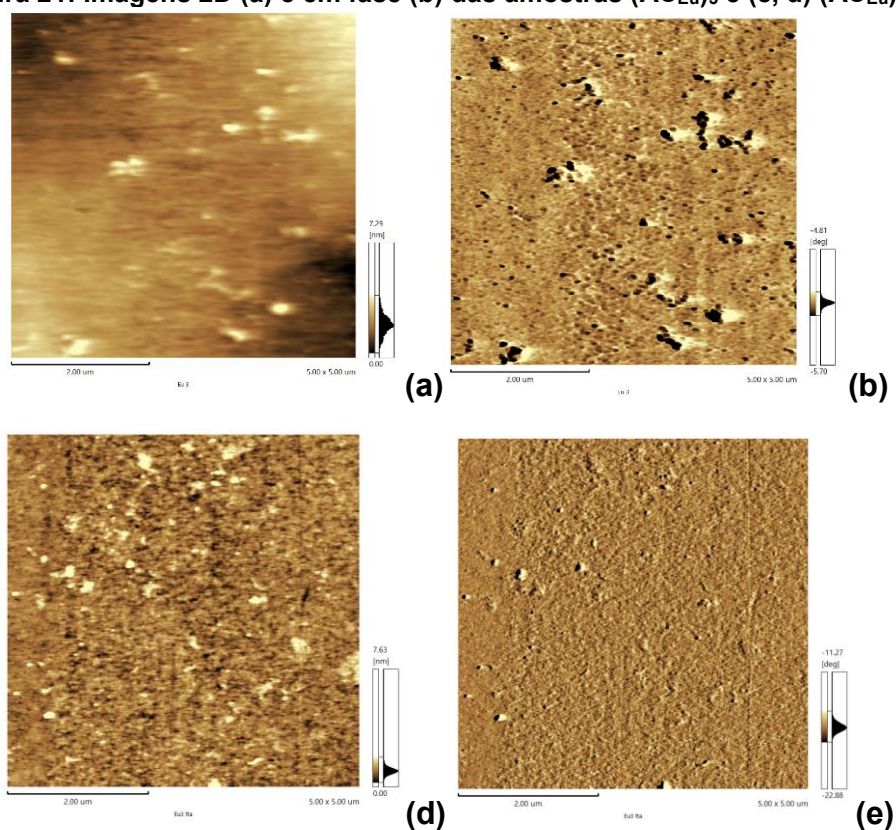


Figura 21: Imagens 2D (a) e em fase (b) das amostras $(AC_{Eu})_3$ e (c, d) $(AC_{Eu})_3tta$.



5.2. Filmes LbL confeccionados em substrato de poliestireno

5.2.1. Caracterização morfológica

A característica morfológica das amostras confeccionadas em substrato de poliestireno foi obtida por microscopia de força atômica; as imagens 3D das amostras estão presentes na Figura 22. Os valores de rugosidade média quadrática (R_z) estão presentes na Tabela 4.

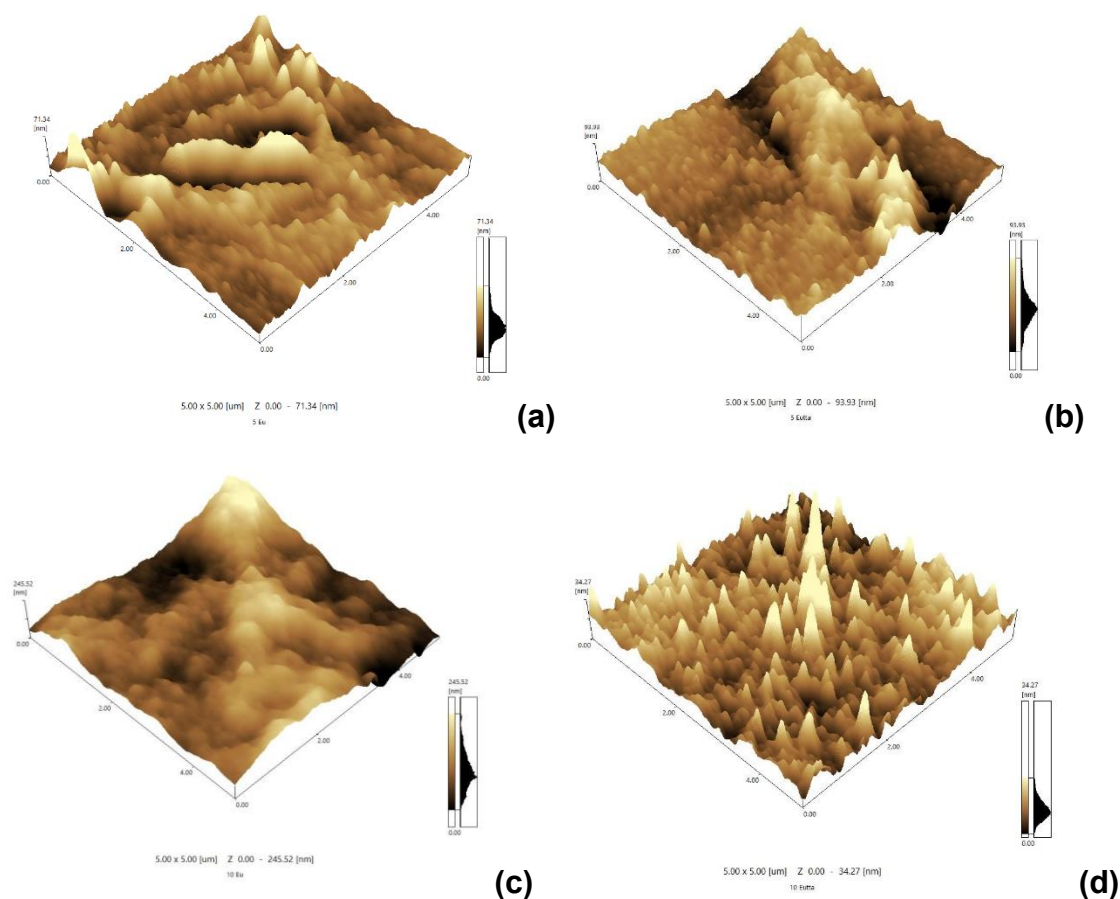
Tabela 4: Rugosidade dos filmes confeccionados em substrato de poliestireno.

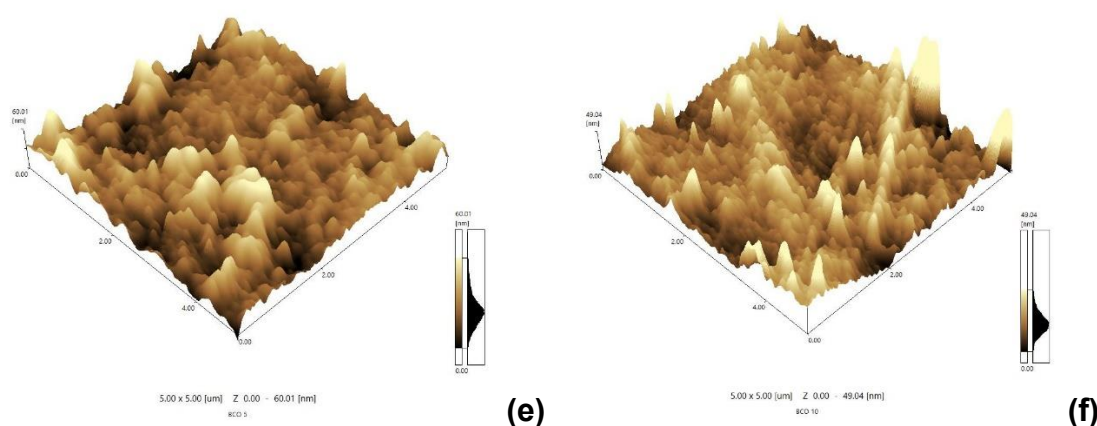
Amostra	R_z / nm
PS ₅ Eu	134,69
PS ₅ Eutta	129,94
PS ₁₀ Eu	329,98
PS ₁₀ Eutta	83,538
PS ₅	88,359
PS ₁₀	105,49

Os filmes apresentam rugosidades superiores aos dos filmes produzidos em substrato de vidro, e este resultado está correlacionado à própria natureza dos substratos. O disco de poliestireno possui superfície mais rugosa, fazendo com que o filme acompanhe esse perfil.

De forma similar ao obtido anteriormente, este conjunto de amostras com Eu^{3+} depositado pelo método *ex-situ*, obteve-se uma diminuição da rugosidade ao adicionar o ligante orgânico tta ao filme. Além disso, o perfil das amostras também mostrou ser bem semelhante aos obtidos para o substrato de vidro. Entretanto, para ter um resultado mais exato das rugosidades dos filmes, é necessário a medida de mais pontos e mais amostras para que seja possível fazer uma análise estatística.

Figura 22: Imagens 3D da morfologia das amostras PS_5Eu (a), PS_5Eutta (b), PS_{10}Eu (c), $\text{PS}_{10}\text{Eutta}$ (d), PS_5 (e), PS_{10} (f); obtidas por microscopia de força atômica em uma área de $5 \times 5 \mu\text{m}$.





5.2.2. Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato (está ligada à molhabilidade do líquido com a superfície testada, ou seja, a capacidade do líquido de manter contato com essa superfície sólida. Quando o ângulo é menor que 90° , o líquido possui alta molhabilidade e tende a se espalhar pela superfície, já quando o ângulo é maior que 90° , o líquido possui baixa molhabilidade e tende a se organizar em formato esférico para diminuir o contato com a superfície. Sendo assim, quanto menor o ângulo de contato, maior a molhabilidade do líquido e mais ele tende a se espalhar pela superfície. A água é solvente comumente utilizado para esta medida, pois fornece a informação da hidrofobicidade da superfície.

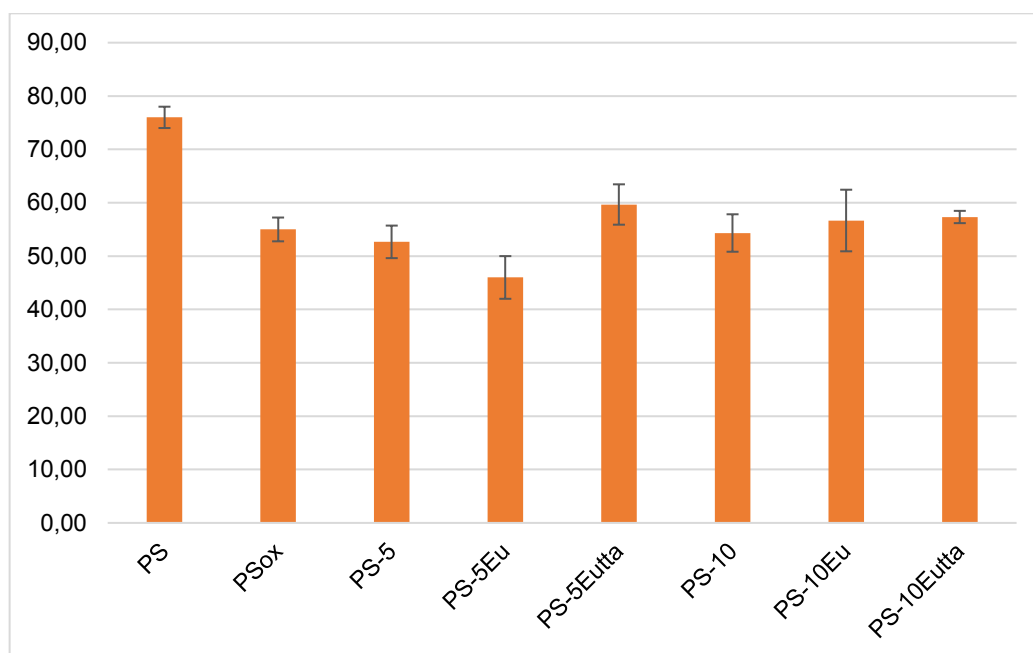
Figura 23: ângulo de contato de um líquido sobre superfície sólida.

Regime	Super-hidrofílico	Hidrofílico	Hidrofóbico	Super-hidrofóbico
Diagrama da gota				
Ângulo de Contacto	$\theta < 10^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$	$\theta > 150^\circ$

A medida foi realizada com água ultrapura e os ângulos de contato obtidos em todas as amostras, incluindo substrato virgem (PS) e oxidado (PSox), estão apresentados na Figura 24.

As amostras apresentaram caráter hidrofílico e os ângulos de contato foram semelhantes entre si. As amostras contendo 10 bicamadas apresentaram ângulos maiores e a amostra contendo filme polimérico menos hidrofílico foi a amostra PS₅Eutta, que é um indicativo da presença do ligante na superfície do filme.

Figura 24: Ângulos de contato de água ultrapura sobre a superfície dos filmes.



5.2.3. Elipsometria

A espessura dos filmes foi determinada através da técnica de elipsometria, e os resultados obtidos estão presentes na Tabela 5.

Tabela 5: Espessura dos filmes confeccionados em substrato de poliestireno.

Amostra	Espessura / nm	Amostra	Espessura / nm
PS ₅	3,692	PS ₁₀	8,538
PS ₅ Eu	7,646	PS ₁₀ Eu	14,512
PS ₅ Eutta	9,832	PS ₁₀ Eutta	18,569

Observa-se uma proporcionalidade nos resultados, que indicam a reprodutibilidade na deposição das camadas de polieletrólitos. A inserção do sal EuCl₃ no filme causa um aumento na espessura do filme, praticamente dobrando-o. Isto é um indicativo da entrada do sal nas cadeias de polímero, hidratação das cadeias

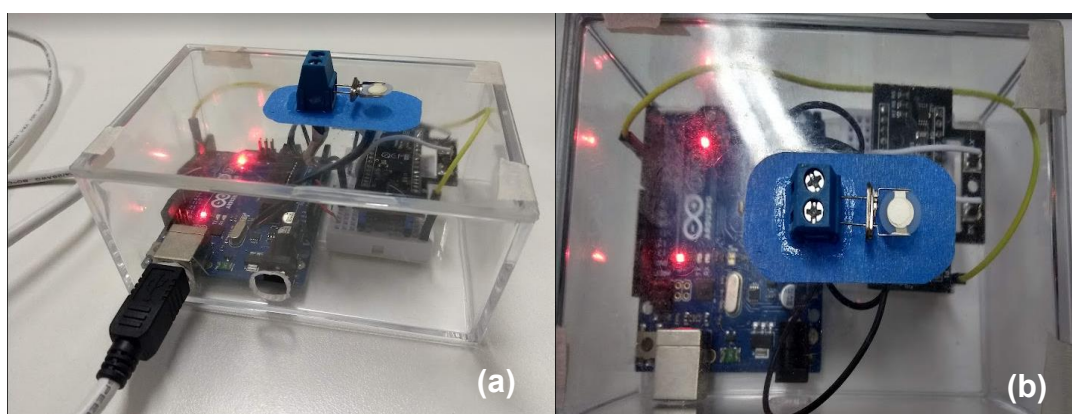
devido a solução aquosa, e/ou simples deposição da camada de Eu^{3+} na superfície do filme. Um aumento da espessura também é observado ao realizar deposição do ligante orgânico tta.

5.3. Estudos com microbalança de quartzo

A deposição dos filmes foi monitorada pela técnica de microbalança de quartzo (Figura 25a). Esta técnica consiste em um cristal que oscila em uma determinada frequência, a oscilação é dependente da viscoelasticidade do meio. Quando o cristal passa por processos de adsorção e conseqüente mudança de massa, ocorre uma mudança em sua frequência. Desta forma, a deposição e construção de camadas em filmes LbL podem ser monitoradas [73], bem como a adsorção de moléculas em um filme pronto [72].

Ambas composições de filmes, com deposição dos polieletrólitos por 20 e 4 min foram estudados. Gotas de $10\ \mu\text{L}$ de polieletrólito permaneceram em contato com a superfície de prata do cristal (Figura 25b), de forma a mimetizar o ambiente químico e os fenômenos de difusão presentes nos sistemas montados para confecção dos filmes, tanto em substrato de vidro (20 min de contato) quanto de poliestireno (4 min de contato).

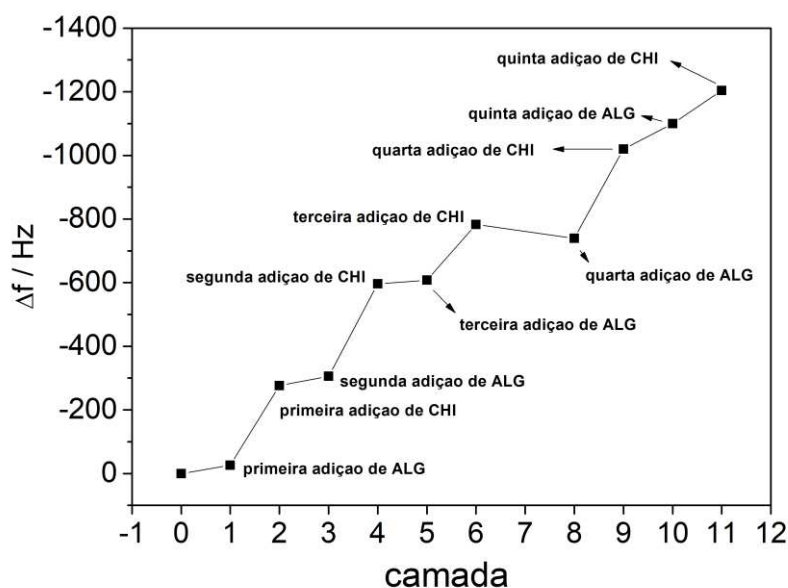
Figura 25: Microbalança utilizada durante os experimentos (a). Cristal de quartzo revestido por prata, utilizado como sensor na microbalança (b).



Na Figura 26 e Figura 27 são mostrados os resultados de variação de frequência acumulada em cada adição de camadas. Em ambos testes foi possível identificar a formação das bicamadas, ou seja, a deposição dos dois tipos de

polieletrólito, mesmo tratando-se de uma superfície sem tratamento; a metodologia utilizada para produção dos filmes garante a adsorção dos polissacarídeos na superfície.

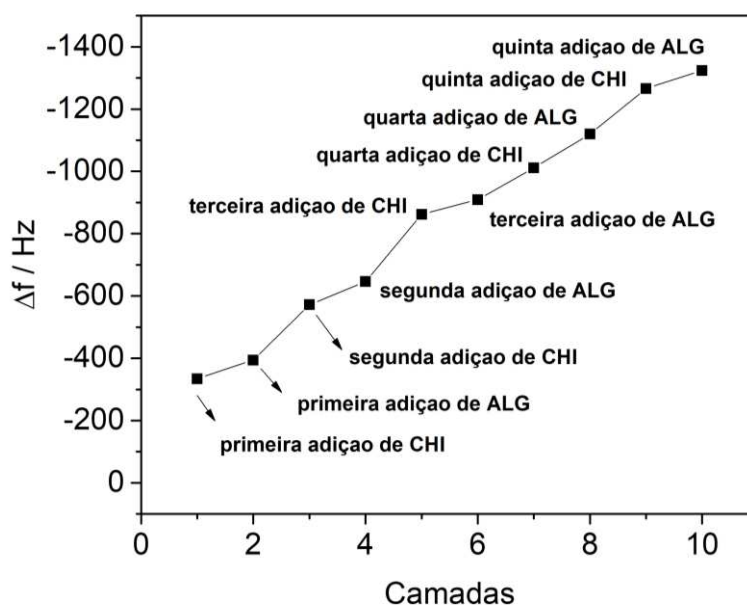
Figura 26: Formação de 5 bicamadas ALG/CHI com tempo de deposição de 20min. Detalhamento de cada adição. Variação de frequência acumulada.



Para a metodologia utilizando deposição de 20 min, observou-se uma maior variação de frequência para as deposições de quitosana, enquanto que a adição de alginato parece ter um limite. Isto pode ser um indicativo de que é necessária uma quantidade maior de quitosana para haver o balanço de cargas durante a formação do filme, ou que após completa adsorção do polication, moléculas de água ou ácido acético começam a ser adsorvidas pelo filme. A metodologia utilizando deposição de 4 min, apresenta um crescimento bastante linear do filme, resultado este que corrobora com as espessuras medidas por elipsometria.

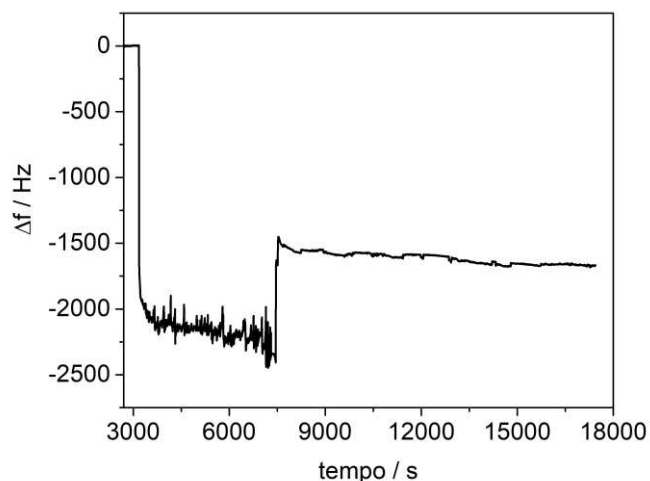
As linhas de tendência de diminuição de frequência possuem inclinações similares para os dois sistemas. As bicamadas produzidas com um intervalo de 4 min apresentam um coeficiente angular de -114 Hz, o qual equivale à aproximadamente 0,25 μg . Todavia, o coeficiente angular obtido a partir das bicamadas produzidas em 20 minutos teve um valor próximo em relação ao de menor tempo, apresentando um aumento de 10 Hz.

Figura 27: Formação de 5 bicamadas ALG/CHI com tempo de deposição de 4min. Detalhamento de cada adição. Variação de frequência acumulada.



A adição de európio nos filmes também foi monitorada com a técnica, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 28. A adição demonstrou uma grande variação de frequência no período da secagem da gota. Na etapa após a secagem, durante o tempo que ocorreu a estabilização, a frequência apresentada foi de aproximadamente -1500 Hz. Tal variação representa aproximadamente 5,4 μg , entretanto, há uma massa disponível de 0,26 μg do sal. Ou seja, além do íon, ocorreu também, a entrada de água nas bicamadas.

Figura 28: variação da frequência em relação ao tempo, após a adição do íon Eu^{3+}



5.4. Ensaios de adesão e proliferação de bactérias

A Figura 29 contém as imagens MEV, mostradas conforme obtidas, após ensaio de adesão e proliferação frente a cepas de bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*. As imagens demonstram alto recobrimento nas amostras controle (Figura 29a e 29b) e sem Eu^{3+} (Figura 29c e 29d). Entretanto, o recobrimento é diminuído nas amostras PS_{10}Eu (Figura 29e e 29f), $\text{PS}_{10}\text{Eutta}$ (Figura 29g e 29h) e PS_5Eu (Figura 29k e 29l), sendo o recobrimento mínimo para a amostra PS_{10}Eu .

A propriedade antiadesiva dos filmes foram avaliadas também frente a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, e as imagens MEV obtidas após o teste são mostradas na Figura 30. Os resultados demonstraram um alto recobrimento em todos os filmes, principalmente controle e sem Eu^{3+} (Figura 30a-30d). As amostras PS_{10}Eu , $\text{PS}_{10}\text{Eutta}$, PS_5Eu e PS_5Eutta (Figura 30e-30h, 30k-30o) demonstraram atividade frente a esta cepa de bactérias, confirmado pelo formato irregular de algumas bactérias e regiões sem adesão (Figura 30f, 30h e 30l).

A propriedade antiadesiva, e potencial atividade bactericida desses materiais pode ser explicada pela interação das cargas positivas da superfície dos filmes com as paredes bacterianas, em especial nas amostras PS_{10}Eu e PS_5Eu . É conhecida a ação das quitosanas como agentes antimicrobianos, e esta propriedade é dependente de fatores como massa molar, pH do meio, grau de desacetilação, tipo de microorganismo e concentração [23], porém, nota-se que para este conjunto de amostras, a presença de Eu^{3+} é fundamental para tal propriedade, visto que as amostras de controle apenas com filme de polissacarídeos não apresenta propriedades antiadesivas.

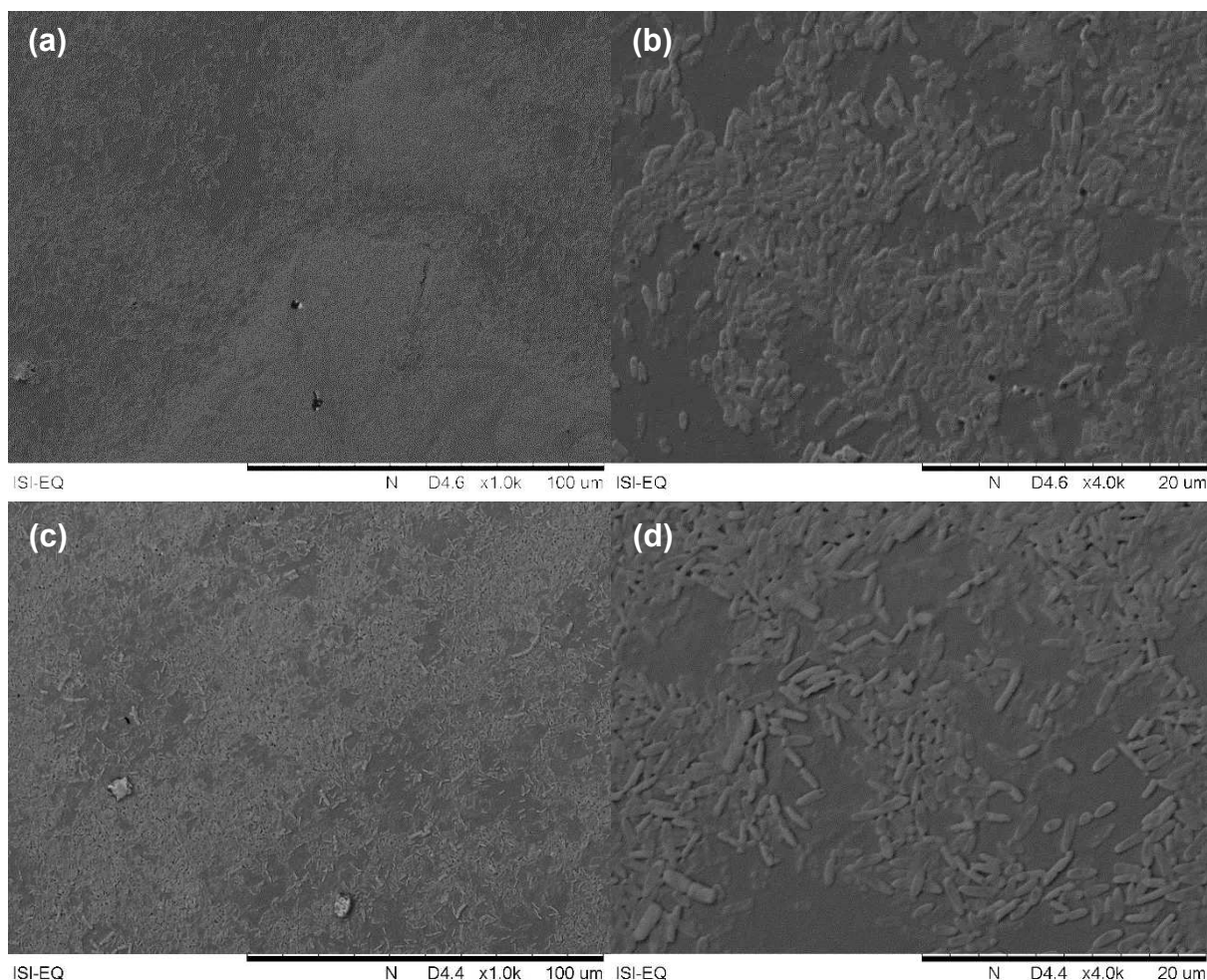
Quanto a ação frente a cepas de *Staphylococcus aureus* observa-se uma relação entre a hidrofiliicidade do filme e o recobrimento observado após os ensaios. Devido a característica lipofílica das paredes celulares dessa bactéria, os filmes menos hidrofílicos apresentaram menor adesão de bactérias. A presença do ligante tta, por exemplo, contribui para um menor recobrimento dessas bactérias após os ensaios na superfície dos filmes PS_5Eutta e $\text{PS}_{10}\text{Eutta}$.

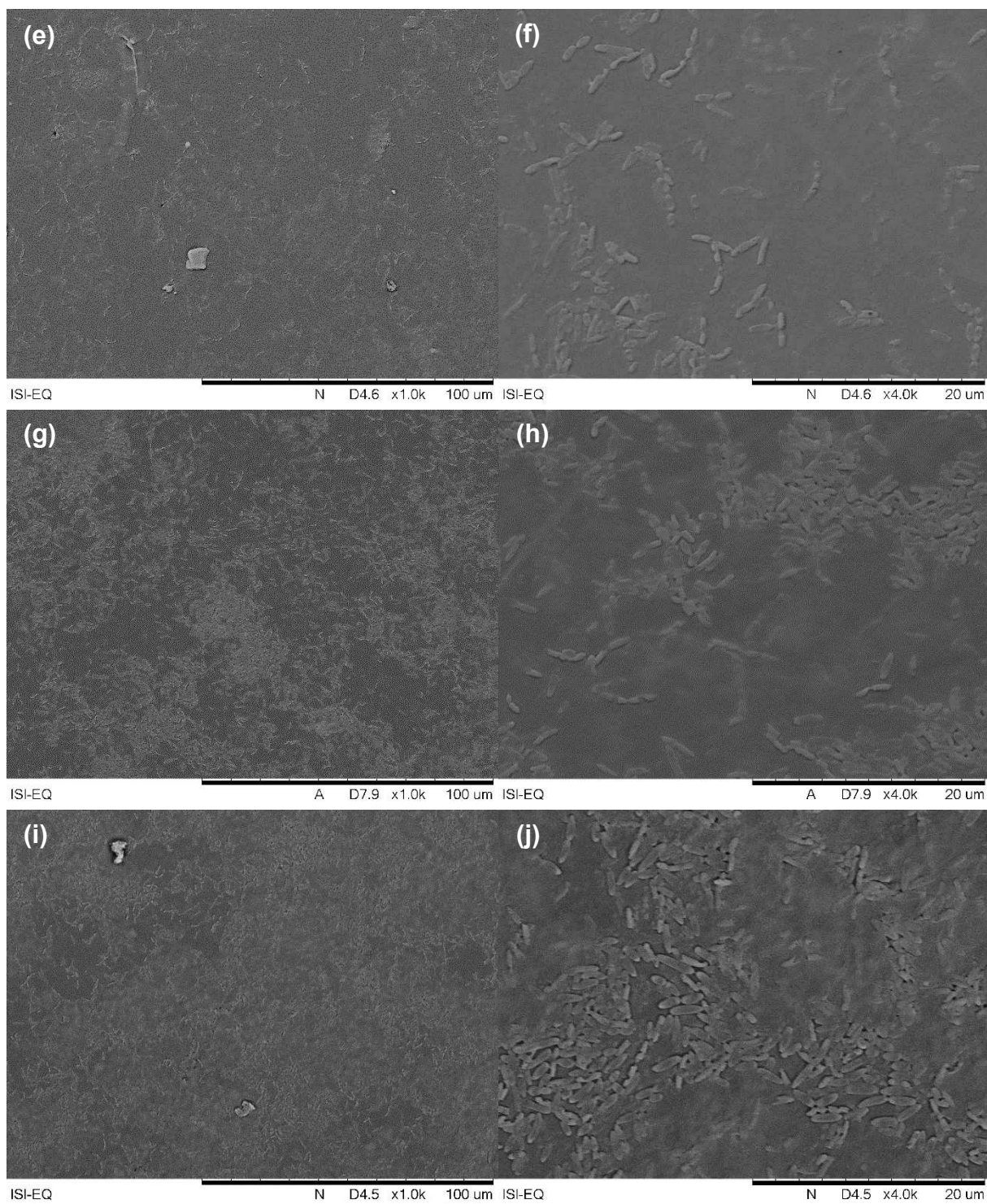
Diferentes mecanismos de ação são conhecidos na literatura: (i) alteração da permeabilidade da membrana ou parede celular, causando seu rompimento; (ii)

interação com o DNA afetando a síntese de proteínas; (iii) quelação de nutrientes (íons metálicos) ou (iv) impedimento de trocas gasosas e de nutrientes com o meio externo, levando à morte celular [23].

A combinação de filme polimérico com íon lantanídeo pode agir de diferentes formas, devido a compatibilidade das paredes celulares e polissacarídeos, combinado com o aumento da lipofilicidade causada pela coordenação com lantanídeo [36,37], há maior permeabilidade da membrana que permite a entrada de íons lantanídeos e sua possível interação com DNA. Além disso, a semelhança entre raios iônicos de Ln^{3+} e Ca^{2+} , pode levar ao bloqueio de canais de cálcio nas células, bem como inibir diferentes enzimas cálcio dependentes [36].

Figura 29: Imagens de MEV dos filmes controle (apenas PS) (a,b); PS_{10} (c,d); PS_{10}Eu (e,f); $\text{PS}_{10}\text{Eutta}$ (g,h); PS_5 (i,j); PS_5Eu (k,l); PS_5Eutta (m); após ensaio de adesão e proliferação de bactérias frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.





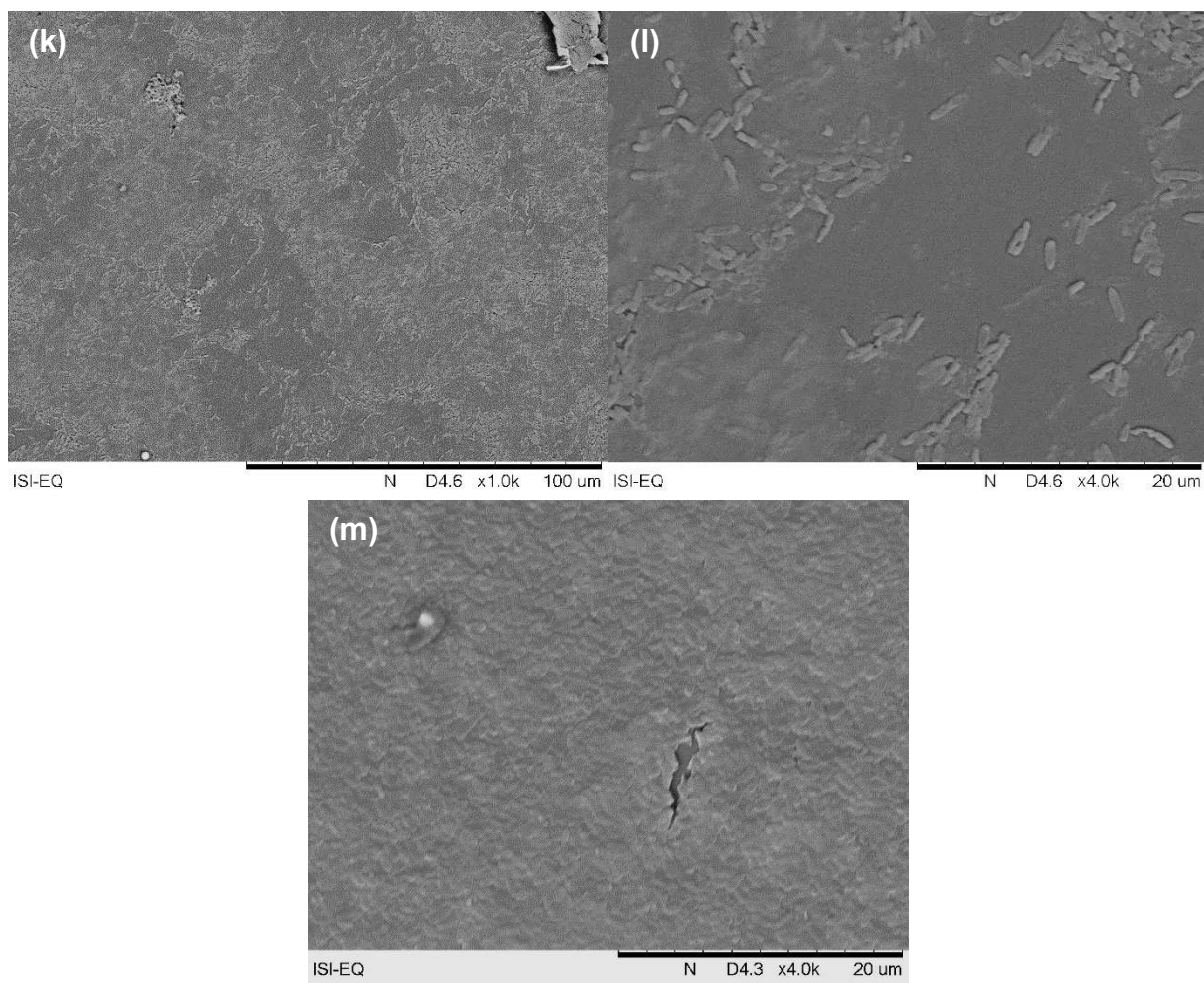
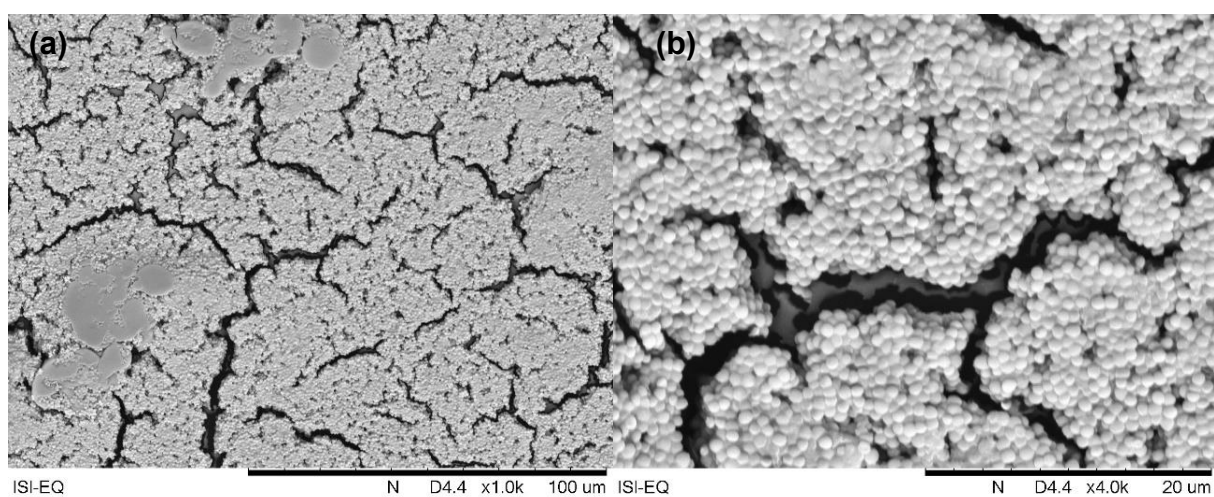
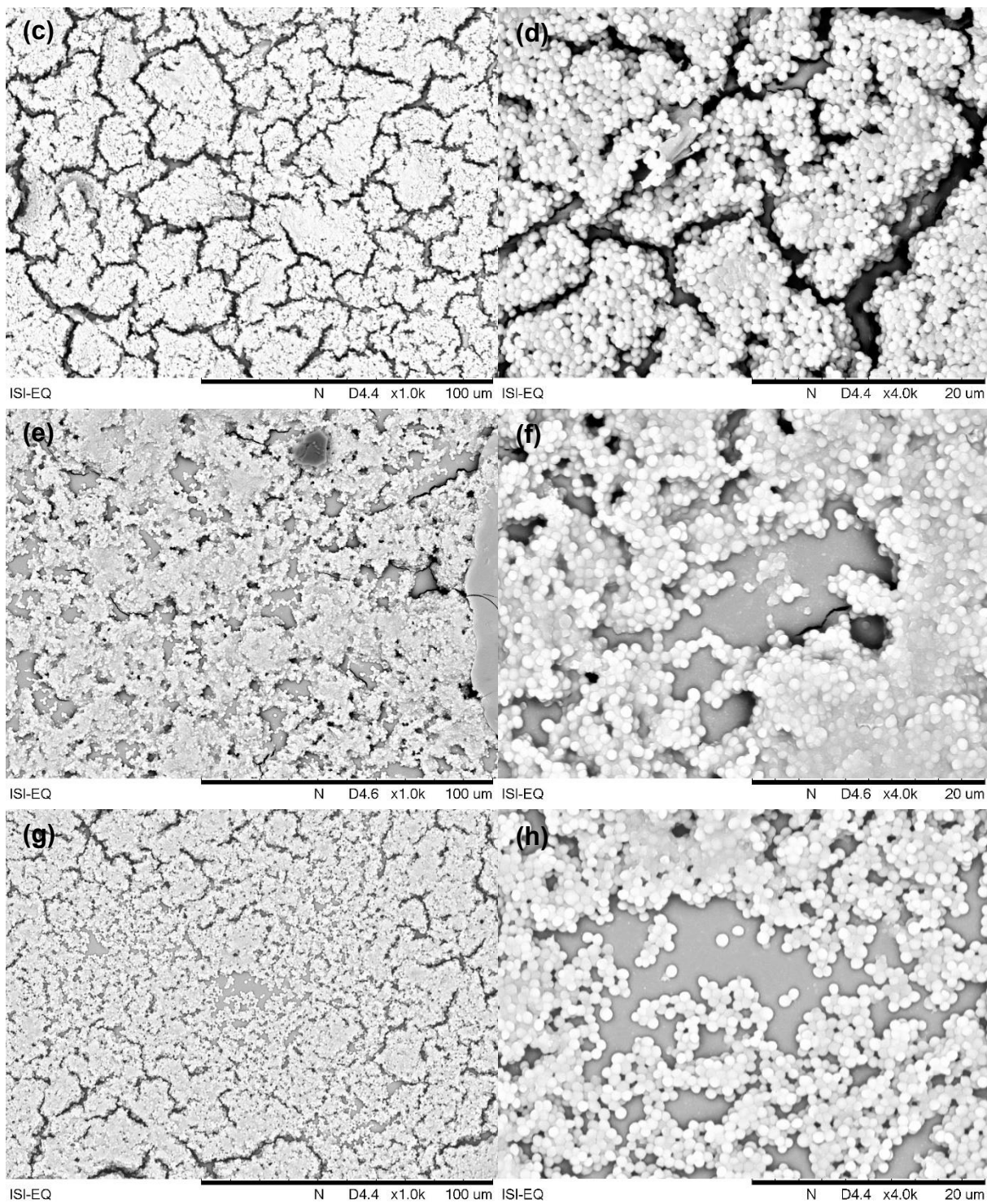
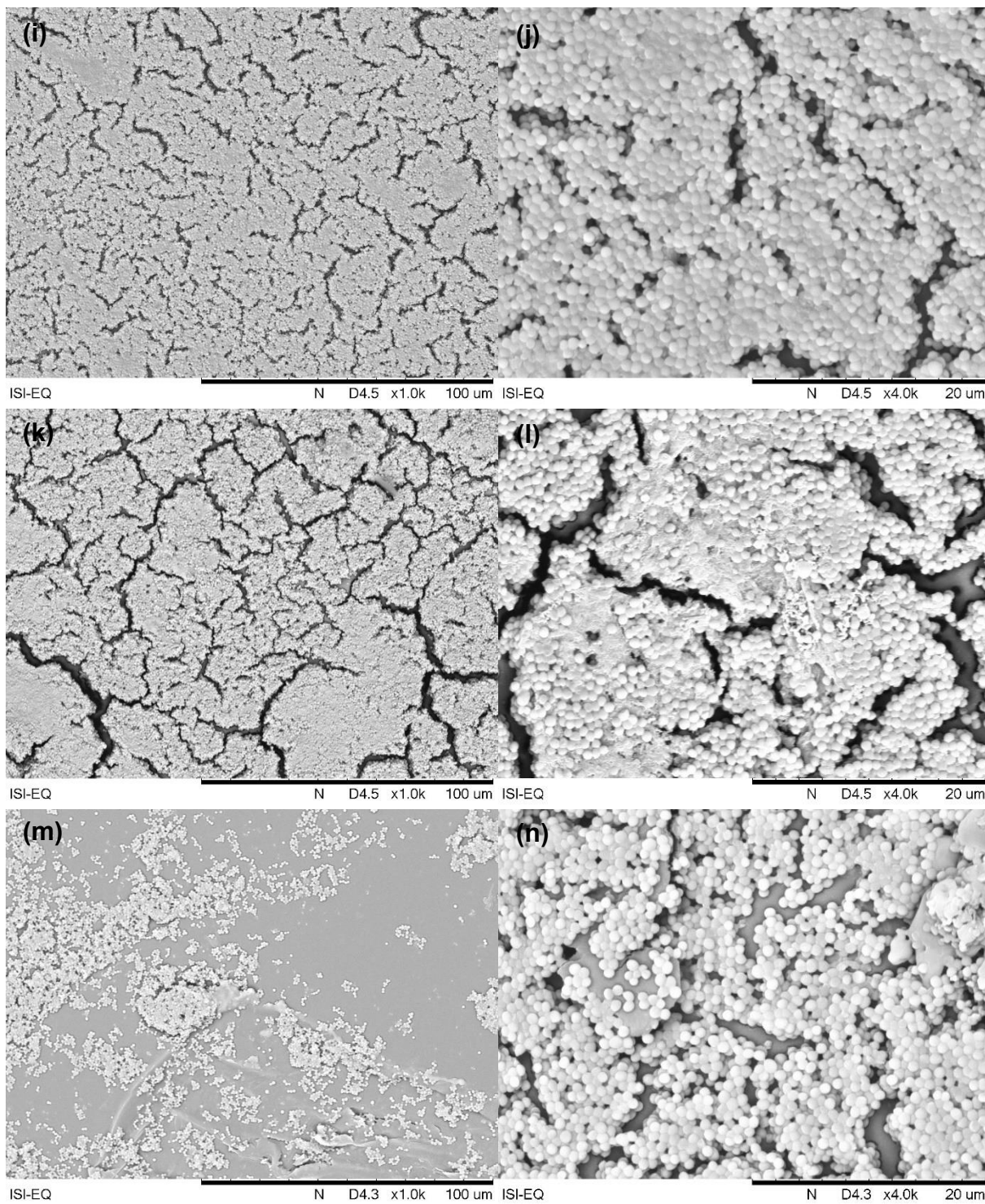


Figura 30: Imagens de MEV dos filmes controle (apenas PS) (a,b); PS₁₀ (c,d); PS₁₀Eu (e,f); PS₁₀Eutta (g,h); PS₅ (i,j); PS₅Eu (k,l); PS₅Eutta (m,n); após ensaio de adesão e proliferação de bactérias frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.







6. CONCLUSÕES

Os filmes produzidos neste trabalho apresentaram propriedades luminescentes, que confirmam coordenação do íon európio na matriz polimérica e transferência de energia do mesmo para centro metálico. Além disso, análises de AFM demonstram reticulação das cadeias de polissacarídeos, indicando interação química entre os grupos funcionais da quitosana, alginato e Eu^{3+} . As análises realizadas também demonstram a homogeneidade da deposição das camadas dos filmes, demonstrando ser um método adequado para sua preparação.

Os resultados obtidos até o momento revelam o potencial do sistema a ser utilizado para o sensoriamento de diferentes analitos, especialmente enzimas ou proteínas que se ligam ao cálcio e ligantes orgânicos de interesse, ou como um revestimento capaz de inibir crescimento de bactérias. O filme contendo 3 bicamadas poderá ser melhor investigado devido a maior intensidade de emissão, em contrapartida, o filme contendo 5 bicamadas poderá ser explorado por exibir *quenching* em resposta aos diferentes ambientes de coordenação.

Algumas composições de filmes contendo európio (PS_{10}Eu , PS_5Eu , $\text{PS}_{10}\text{Eutta}$ e PS_5Eutta) demonstraram atividade bactericida frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e podem ser utilizadas como revestimentos que podem atuar simultaneamente como proteção bactericida e sensor, e abre perspectivas para utilização de materiais similares nos campos da biomedicina, embalagens alimentícias e engenharia de tecidos. A presença do íon Eu^{3+} e suas propriedades luminescentes auxiliam no entendimento do ambiente químico formado após coordenação da matriz polimérica e torna-se um primeiro passo para aplicação de outros íons lantanídeos, que exibem diferentes propriedades luminescentes, visando aplicações que envolvem outros comprimentos de onda de emissão, ou otimizar as propriedades antimicrobianas do filme.

REFERÊNCIAS

- [1] SOUSA FILHO, P. C. DE; GALAÇO, A. R. B. S.; SERRA, O. A. Terras raras: Tabela periódica, descobrimento, exploração no Brasil e aplicações. **Química Nova**, v. 42, n. 10, p. 1208–1224, 2019.
- [2] AFZAL, S.; MAITRA, U. Sensitized Lanthanide Photoluminescence Based Sensors—a Review. **Helvetica Chimica Acta**, v. 105, n. 2, 2022.
- [3] MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras Raras: Aplicações industriais e biológicas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 111–117, 2005.
- [4] TRUPP, L.; MARCHI, M. C.; BARJA, B. C. Lanthanide-based luminescent hybrid silica materials prepared by sol-gel methodologies: a review. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 102, n. 1, p. 63–85, 2022.
- [5] HUANG, Z. et al. **A review of lanthanide-based fluorescent nanofiber membranes by electrospinning and their applications**. [s.l.] Springer US, 2022. v. 57
- [6] BINNEMANS, K. Interpretation of europium(III) spectra. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 295, p. 1–45, 2015.
- [7] TEOTONIO, E. E. S. et al. Synthesis, crystalline structure and photoluminescence investigations of the new trivalent rare earth complexes (Sm 3+ , Eu 3+ and Tb 3+) containing 2-thiophenecarboxylate as sensitizer. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 2, p. 451–460, 2004.
- [8] BINNEMANS, K. Rare-earth beta-diketonates. In: **Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths**. [s.l.] Elsevier B.V., 2005. v. 35p. 107–272.
- [9] KACZMAREK, M. T. et al. Lanthanides: Schiff base complexes, applications in cancer diagnosis, therapy, and antibacterial activity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 370, p. 42–54, 1 Sep. 2018.
- [10] HEWITT, S. H.; BUTLER, S. J. Application of lanthanide luminescence in probing enzyme activity. **Chem. Commun**, v. 54, p. 6635, 2018.
- [11] ELISEEVA, S. V.; BÜNZLI, J. C. G. Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 189–227, 2010.
- [12] FENG, J.; ZHANG, H. Hybrid materials based on lanthanide organic complexes: a review. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 1, p. 387–410, 2013.
- [13] ZHOU, Z. et al. Two novel sol-gel-derived nanostructures and their hemoglobin sensing features. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 77, 2016.
- [14] GUO, J. et al. Europium(III)-induced water-soluble nano-aggregates of hyaluronic acid and chitosan: Structure and fluorescence. **MRS Communications**, v. 8, n. 3, p.

1224–1229, 2018.

[15] LI, Q. et al. Europium-complex-grafted polymer dots for amplified quenching and cellular imaging applications. **Langmuir**, v. 30, n. 28, p. 8607–8614, 2014.

[16] XU, D. et al. Facile fabrication of biodegradable lanthanide ions containing fluorescent polymeric nanoparticles: Characterization, optical properties and biological imaging. **Materials Chemistry and Physics**, v. 207, p. 226–232, 2018.

[17] AGUIAR, F. P. et al. Luminescent hybrid materials functionalized with lanthanide ethylenediaminetetraacetate complexes containing β -diketonate as antenna ligands. **Journal of Luminescence**, v. 170, p. 538–546, 1 Feb. 2016.

[18] DONMEZ, M.; OKTEM, H. A.; YILMAZ, M. D. Ratiometric fluorescence detection of an anthrax biomarker with Eu^{3+} -chelated chitosan biopolymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 226–230, 2018.

[19] SOUZA, P. R. et al. Polysaccharide-based materials created by physical processes: From preparation to biomedical applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, 2021.

[20] WANG, Y. et al. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. **Nanomaterials**, v. 6, n. 2, 2016.

[21] REPO, E. et al. Adsorption of $\text{Co}(\text{II})$ and $\text{Ni}(\text{II})$ by EDTA- and/or DTPA-modified chitosan: Kinetic and equilibrium modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 161, n. 1–2, p. 73–82, 2010.

[22] REPO, E. et al. Heavy metals adsorption by novel EDTA-modified chitosan-silica hybrid materials. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 358, n. 1, p. 261–267, 2011.

[23] MACEDO, J. B. et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE QUITOSANAS E SEUS DERIVADOS: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS. **Química Nova**, v. 45, n. 6, p. 690–704, 2022.

[24] RUFATO, K. B. et al. Antimicrobial and cytocompatible chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan, and tanfloc-based polyelectrolyte multilayers on gellan gum films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 727–742, 2021.

[25] PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163–171, 2014.

[26] KANG, M. et al. Characterization and study of luminescence enhancement behaviour of alginate-based hydrogels. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 17486–17491, 2018.

[27] MA, Q.; WANG, Q. Lanthanide induced formation of novel luminescent alginate hydrogels and detection features. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 19–23, 2015.

- [28] OERLEMANS, C. et al. Alginate–lanthanide microspheres for MRI-guided embolotherapy. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 1, p. 4681–4687, Jan. 2013.
- [29] LIU, S. et al. Lanthanide ions-induced formation of hierarchical and transparent polysaccharide hybrid films. **Carbohydrate Polymers**, v. 163, p. 28–33, 1 May 2017.
- [30] ZHANG, R. et al. Shell modulation by tailoring substituents in chitosan for LbL-assembled microcapsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 372, n. 1, p. 40–44, 15 Apr. 2012.
- [31] ASTON, R. et al. Interactions between chitosan and alginate dialdehyde biopolymers and their layer-by-layer assemblies. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 6, p. 1807–1817, 2015.
- [32] MARTINS, A. F. et al. Chitosan/iota-carrageenan and chitosan/pectin polyelectrolyte multilayer scaffolds with antiadhesive and bactericidal properties. **Applied Surface Science**, v. 502, n. July 2019, p. 144282, 2020.
- [33] FACCHI, S. P. et al. Polycationic condensed tannin/polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers prevent microbial adhesion and proliferation. **European Polymer Journal**, v. 130, n. March, p. 109677, 2020.
- [34] LICHTER, J. A.; VLIETPA, K. J. VAN; RUBNER, M. F. Design of antibacterial surfaces and interfaces: Polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform. **Macromolecules**, v. 42, n. 22, p. 8573–8586, 2009.
- [35] FU, J. et al. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6684–6692, 2005.
- [36] COTA, I.; MARTURANO, V.; TYLKOWSKI, B. Ln complexes as double faced agents: Study of antibacterial and antifungal activity. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 396, p. 49–71, 1 Oct. 2019.
- [37] MĂCIUCĂ, A. M.; MUNTEANU, A. C.; UIVAROSI, V. Quinolone complexes with lanthanide ions: An insight into their analytical applications and biological activity. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020.
- [38] SILVA, J. M. et al. Tailored Freestanding Multilayered Membranes Based on Chitosan and Alginate. v. 15, p. 3826, 2014.
- [39] BUENZLI, J.-C. G. Review: Lanthanide coordination chemistry: From old concepts to coordination polymers. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, n. 23–24, p. 3706–3733, 2014.
- [40] COTTON, S. **Lanthanide and Actinide Chemistry**. 1. ed. Rutland: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [41] SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. A. **Química inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre:

Bookman, 2008.

[42] HUANG, C. **Rare Earth Coordination**. 1. ed. Singapura: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

[43] BÜNZLI, J. C. G. On the design of highly luminescent lanthanide complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 293–294, 2015.

[44] MONTEIRO, J. H. S. K.; MAZALI, I. O.; SIGOLI, F. A. Determination of Judd-Ofelt intensity parameters of pure samarium(III) complexes. **Journal of Fluorescence**, v. 21, n. 6, p. 2237–2243, 2011.

[45] BÜNZLI, J.-C. G.; ELISEEVA, S. V. Basics of Lanthanide Photophysics. In: **Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects**. 1. ed. [s.l.] Springer-Verlag, 2010. p. 1–45.

[46] MONTEIRO, J. H. S. K.; FORMIGA, A. L. B.; SIGOLI, F. A. The influence of carboxylate, phosphinate and seleninate groups on luminescent properties of lanthanides complexes. **Journal of Luminescence**, v. 154, p. 22–31, 2014.

[47] WEISSMAN, S. I. Intramolecular Energy Transfer The Fluorescence of Complexes of Europium. **The Journal of Chemical Physics**, v. 10, n. 4, p. 214–217, Apr. 1942.

[48] BLASSE, G.; GRABMAIER, B. C. **Luminescent materials**. [s.l.] Springer-Verlag, 2017.

[49] REN, K. FENG et al. Layer-by-layer assembly as a robust method to construct extracellular matrix mimic surfaces to modulate cell behavior. **Progress in Polymer Science**, v. 92, p. 1–34, 2019.

[50] FAN, Y. et al. Natural polysaccharides based self-assembled nanoparticles for biomedical applications – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, n. October, p. 1240–1255, 2021.

[51] CRIADO-GONZALEZ, M. et al. Local and controlled release of tamoxifen from multi (layer-by-layer) alginate/chitosan complex systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, n. July 2018, p. 428–434, 2019.

[52] SHCHUKIN, D. G.; SUKHORUKOV, G. B.; MO, H. Fabrication of Fluorescent Rare Earth Phosphates in Confined Media of Polyelectrolyte Microcapsules. 2004.

[53] ZHANG, R.-J. et al. Effect of temperature on the morphology of rare earth-doped microcapsules. **Physicochem. Eng. Aspects**, v. 321, p. 281–284, 2008.

[54] ZHANG, R. J. et al. Study on high-efficiency fluorescent microcapsules doped with europium β -diketone complex by LbL self-assembly. **Chemical Communications**, n. 15, p. 1547–1549, 3 Apr. 2007.

[55] ZHANG, R. et al. Self-assemblies of luminescent rare earth compounds in capsules and multilayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 207, n. 1,

p. 361–375, 2014.

[56] ZHOU, Y.; LI, Y. Layer-by-layer self-assembly of multilayer films containing DNA and Eu 3+: Their characteristics and interactions with small molecules. **Langmuir**, v. 20, n. 17, p. 7208–7214, 2004.

[57] CAMACHO, S. A. et al. Nanostructured hybrid films containing nanophosphor: Fabrication and electronic spectral properties. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 541, p. 365–371, 2012.

[58] CUI, F. et al. Nanoassembly of photoluminescent films containing rare earth complex nanoparticles on planar and microspherical supports. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 278, n. 1–3, p. 39–45, 2006.

[59] MA, H. et al. Luminescent multilayer film based on mixed-addenda polyoxometalates and polyethyleneimine by layer-by-layer assembly. **Applied Surface Science**, v. 233, n. 1–4, p. 14–19, 2004.

[60] TEIXEIRA, R. R. **CRESCIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS FORMADOS POR NANOPARTÍCULAS DE PRATA E COMPLEXO LUMINESCENTE ANCORADOS EM SUBSTRATO DE SÍLICA PARA APLICAÇÃO EM SENSORES ÓPTICOS**. 2017. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2017.

[61] SOUZA, P. R. et al. Poly(ethylene terephthalate) films coated with antimicrobial gelatin/chondroitin sulfate polyelectrolyte multilayers containing ionic liquids. **Progress in Organic Coatings**, v. 170, n. March, 2022.

[62] COSTA, I. F. et al. Luminescence properties of the Ln–EDTA complexes covalently linked to the chitosan biopolymers containing β -diketonate as antenna ligands. **Luminescence**, v. 35, n. 3, p. 365–372, 1 May 2020.

[63] OLIVEIRA, R. S. et al. Preparation, characterization and luminescence study of chitosan membrane and powder forms with Eu³⁺ and Tb³⁺. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 392–398, 2010.

[64] CARVALHO, L. G. A. DE et al. Facile synthesis of chitosan membrane containing Eu³⁺ complex with intense emission in the red region. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 12, p. 2247–2256, 1 May 2021.

[65] ABASALIZADEH, F. et al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. **Journal of Biological Engineering 2020 14:1**, v. 14, n. 1, p. 1–22, 13 Mar. 2020.

[66] ZHANG, H.; CHENG, J.; AO, Q. Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. **Marine Drugs**, v. 19, n. 5, 1 May 2021.

[67] LIU, S. et al. Hierarchical alginate biopolymer papers produced: Via lanthanide ion coordination. **RSC Advances**, v. 6, n. 68, p. 63171–63177, 1 Jul. 2016.

[68] BÜNZLI, J. C. G. Lanthanide light for biology and medical diagnosis. **Journal of Luminescence**, v. 170, p. 866–878, 1 Feb. 2016.

[69] JUDD, B. R. Optical Absorption Intensities of Rare-Earth Ions. **Physical Review**, v. 197, n. 3, 1962.

[70] OFELT, G. S. Intensities of Crystal Spectra of Rare-Earth Ions. **A Theory of Sensitized Luminescence in Solids The Journal of Chemical Physics**, v. 37, n. 3, p. 4412, 1962.

[71] SCAPOLAN, M. I. X. et al. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DOS PARÂMETROS DE JUDD-OFELT DE COMPOSTOS β -DICETONATOS DE Eu(III) OU Sm(III). **Quim. Nova**, v. 44, n. 10, 1261, 2021.

[72] KYUNG, K.-H.; KIM, S.-H.; SHIRATORI, S. Preparation and characterization of antithrombogenic chitosan/alginate films with enhanced physical stability by cross-linking using layer-by-layer method. **MATEC Web of Conferences**, v. 4, 05008, 2013.

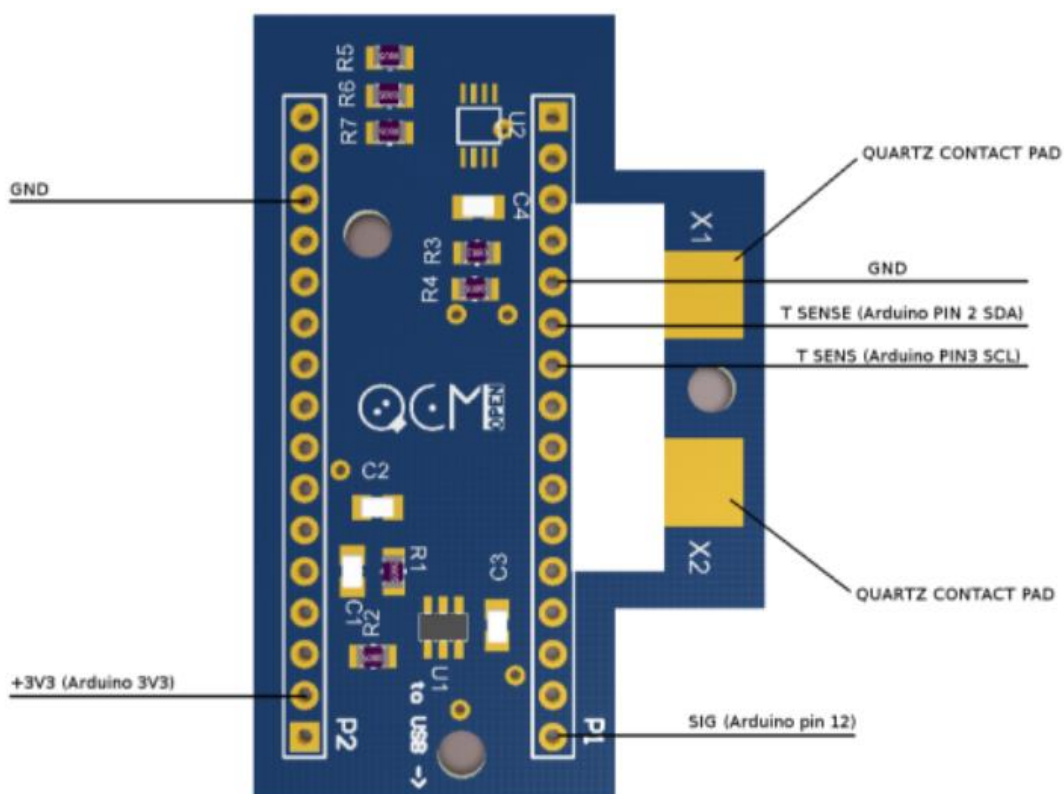
[73] SHIRATORI, S.; FUKAO, N.; KYUNG, K. H. Fully automatic spray-LBL machine with monitoring the real time growth of multilayer films using quartz crystal microbalance. **MATEC Web of Conferences**, v. 4, 03003, 2013.

APÊNDICE 1

Uma microbalança a cristal de quartzo de baixo custo e fonte aberta foi desenvolvida e disponibilizada pelo Prof. Dr. Luiz Marcos de Lira Faria do Departamento de Química e Biologia da UTFPR-Curitiba.

Foi produzida utilizando-se o Arduino UNO como microcontrolador e um *shield* openQCM, Figura 31, como *driver* oscilador para cristais de quartzo de 1 à 25 MHz. Este oscilador tem a configuração de um circuito oscilador de Pierce e otimiza a oscilação do cristal devido à incorporação de dois amplificadores operacionais inversores, sendo um deles *unbuffered*. Embora este *shield* seja próprio para acoplamento direto num Arduino Micro, neste projeto será utilizado um Arduino UNO, uma mini placa de prototipagem de 170 pontos, *jumpers* e um *borne* para montagem da microbalança conforme mostra a imagem da Figura 32. A conexão entre o microcontrolador e o *shield* openQCM está resumida na Tabela 6.

Figura 31: *Shield* circuito oscilador openQCM.



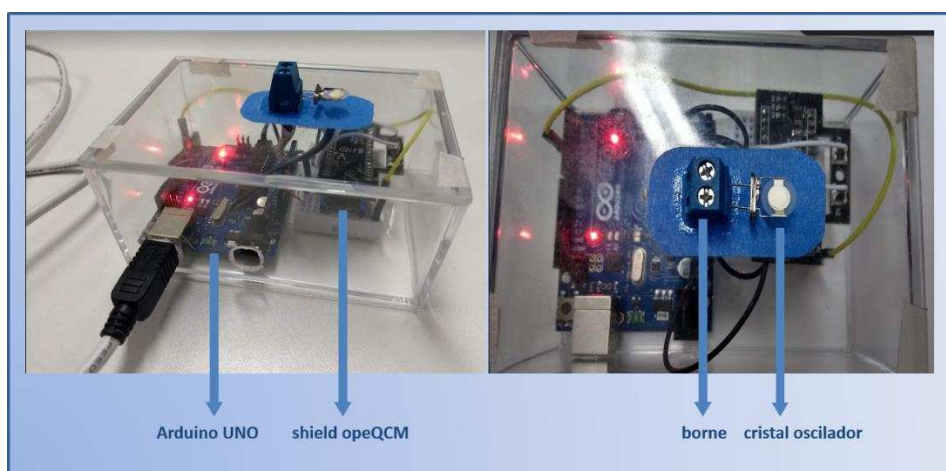
Fonte: <https://openqcm.com/electronics>.

Tabela 6: Conexão Arduino - openQCM

Arduino	Shield openQCM
GND	GND
+3V3	3V3
A0	P1

Fonte: autoria própria.

Figura 32: Microbalança de baixo custo e fonte aberta.



Fonte: autoria própria.

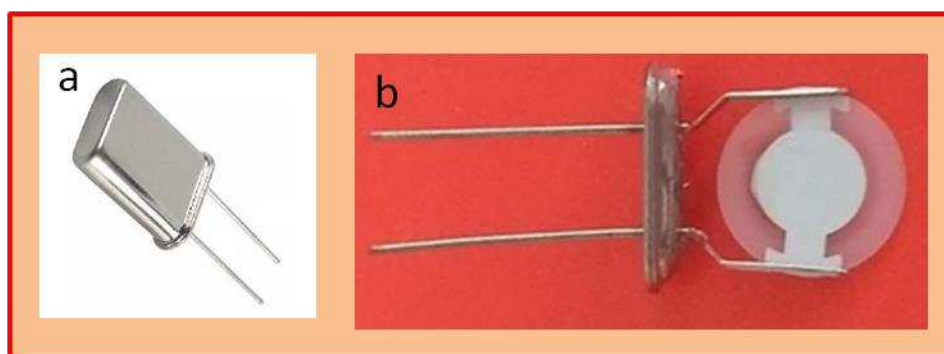
Os terminais X1 e X2 do *shield* são soldados a fios e estes conectados diretamente num borne que receberá os contatos do cristal oscilador. Embora o circuito oscilador seja projetado para manter a oscilação de cristais de até 25 MHz, o Arduino UNO possui um oscilador de 16 MHz, o que limita sua capacidade de medição de frequência abaixo de 8 MHz, dessa forma serão utilizados cristais osciladores de 6 MHz como sensores piezoelétricos.

Cristais de quartzo

Os cristais de quartzo descartáveis e de baixo custo são utilizados como sensores piezoelétricos, são obtidos pela abertura de cristais osciladores do tipo HC49U, perfil alto de dois pinos, conforme a Figura 33a. A abertura do invólucro metálico destes cristais é realizada com o auxílio de uma micro retífica e mini disco de corte fino.

Após a abertura, a superfície piezoelectricamente ativa recoberta com prata, e útil para os processos de adsorção e desenvolvimento de sensores ficará acessível para as devidas modificações conforme pode ser visto na figura 33b. O cristal de quartzo aberto é limpo em acetona e banho ultrassônico por 1 hora antes de sua utilização.

Figura 33: Cristal oscilador HC49U.



Fonte: a) https://www.betacomercial.com.br/loja/img/prod/cristal-5-760000-mhz_11535.jpg. b) autoria própria.

Aquisição de dados

Para aquisição de dados de frequência da microbalança são utilizados dois programas. O primeiro é o *sketch* ou *firmware* do arduino para envio da frequência de oscilação para um terminal serial. A conversão de dados do *shield* openQCM para o arduino será realizada utilizando-se a biblioteca FreqCount do Arduino conforme mostra o quadro 1.

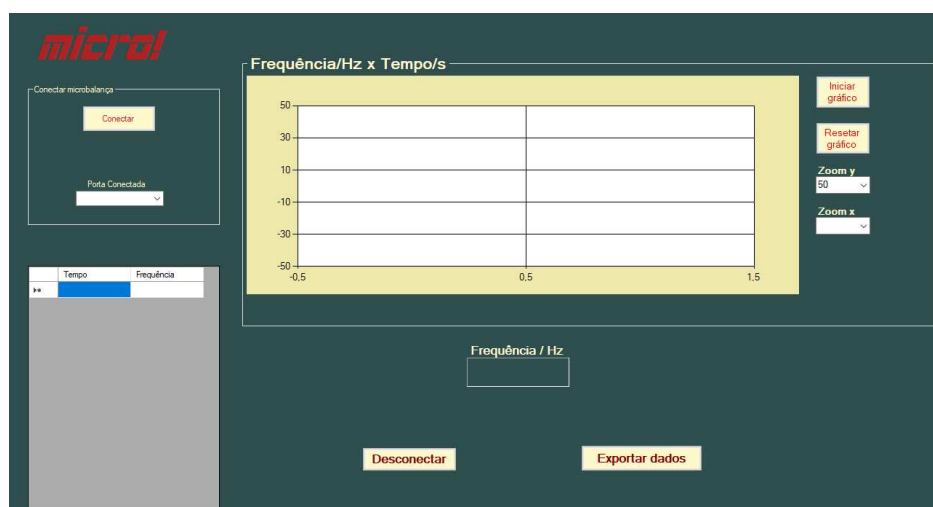
Quadro 1. Firmware do arduino.

```
#include <FreqCount.h>
String b;
void setup() {
  Serial.begin(9600);
  FreqCount.begin(1000);
}
void loop() {
  if (FreqCount.available()) {
    unsigned long count = FreqCount.read();
    b = String(count);
    Serial.println(b);
  }
}
```

Fonte: autoria própria.

Uma vez enviados, os dados de frequência poderão ser lidos diretamente no terminal serial do próprio IDE (*Integrated Development Environment*) do Arduino ou na interface de usuário desenvolvida em Visual Basic no Visual Studio para computador (Figura 34). Esta interface fornece fácil visualização gráfica dos dados, assim como seu armazenamento em tabela.

Figura 34: Interface de usuário da microbalança.



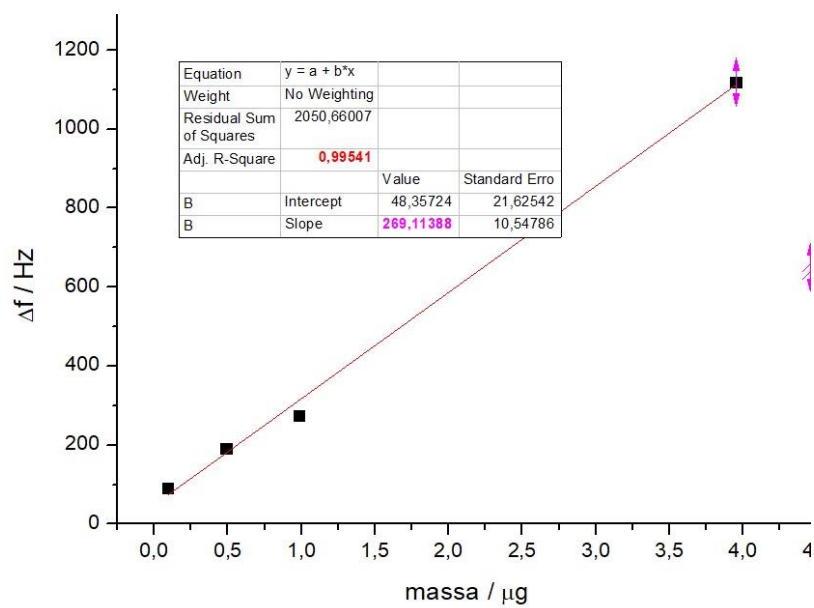
Fonte: autoria própria.

Quando a perturbação elétrica tem as características adequadas (amplitude e frequência), as quais são determinadas pela geometria e propriedades do cristal, este oscilará mecanicamente em um modo ressonante. E pode-se aproveitar essa vibração para a construção de uma microbalança.

Com uma excitação de 1 V e utilizando frequências entre 5 e 15 MHz, com um dos eletrodos conectado a terra, se cria uma onda de cisalhamento do cristal com um deslocamento físico paralelo ao plano da superfície e perpendicular ao campo elétrico aplicado. A frequência da onda acústica está relacionada com a espessura do cristal, de acordo com:

$$f_0 = \frac{v}{2t_c} \quad v = \left(\frac{\mu C}{\rho C} \right)^{\frac{1}{2}}$$

<https://www.youtube.com/watch?v=kzmBK9mONq8>



Calibração da microbalança com Au. Depositado com metalizadora.