



**RAFAEL DA SILVA FERNANDES**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSENSORES FLUORESCENTES  
REUTILIZÁVEIS BASEADOS EM SÍLICA DE STÖBER**

**CAMPINAS  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**RAFAEL DA SILVA FERNANDES**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSENSORES FLUORESCENTES  
REUTILIZÁVEIS BASEADOS EM SÍLICA DE STÖBER**

**ORIENTADOR: PROF. DR. IVO MILTON RAIMUNDO JÚNIOR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
RAFAEL DA SILVA FERNANDES, E ORIENTADA PELO PROF. DR. IVO MILTON RAIMUNDO  
JÚNIOR.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS**

**2014**

**iii**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

F391d Fernandes, Rafael da Silva, 1988-  
Desenvolvimento de nanossensores fluorescentes reutilizáveis baseados em sílica de Stöber / Rafael da Silva Fernandes. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ivo Milton Raimundo Júnior.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanopartículas. 2. Sílica de Stöber. 3. Nanossensores. 4. Fluorescência. 5. Cobre. I. Raimundo Júnior, Ivo Milton. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development of reusable fluorescent nanosensor based on Stöber silica

**Palavras-chave em inglês:**

Nanoparticles

Stöber Silica

Nanosensors

Fluorescence

Copper

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:**

Ivo Milton Raimundo Júnior [Orientador]

Alexandre Fonseca

José Alberto Fracassi da Silva

**Data de defesa:** 18-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Química



## Dedicatória

A minha família, por todo amor incondicional, dedicação, carinho e ensinamentos. Em especial ao meu pai (Francisco de Assis) e a minha mãe (Antônia Maria).



## **Agradecimentos**

- ✓ A Deus pela oportunidade de ter chegado onde estou, pelas pessoas que existem na minha vida e pela força e coragem para viver longe da minha família.
- ✓ Aos meus pais Francisco e Antônia, como também aos meus demais familiares por todo amor, atenção, carinho e incentivo.
- ✓ Ao Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Jr. pela grande oportunidade, orientação, paciência, confiança e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Aos professores Jarbas Rohwedder e Celio Pasquini por suas respectivas contribuições no andamento desse projeto.
- ✓ Ao meu melhor amigo Sergio Ruschi por todo companheirismo criado durante esse período dentro e fora da universidade.
- ✓ A todos os meus amigos dos grupos GIA, LQA e GEATOM.
- ✓ Aos professores Nelson Duran, Heloise Pastore e Celso Bertran por tornarem possível algumas análises necessárias para complemento do trabalho.
- ✓ A professora Maria Fernanda Pimentel pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.
- ✓ Ao técnico e amigo Daniel Razzo (sala de Microscopia) por toda dedicação e grandiosa ajuda com as micrografias das minhas tão desejadas esferas.
- ✓ A agência de fomento à pesquisa CAPES e ao INCTAA (CNPq 573894/2008-6 e FAPESP 2008/57808-1) pelo apoio financeiro.



## **Currículo**

**Nome:** Rafael da Silva Fernandes

**E-mail:** rafael.fernandes@iqm.unicamp.br

**Lattes:** <http://lattes.cnpq.br/0271263232319722>

### **Formação Acadêmica**

2012 – 2014      **Mestrado em Química Analítica**  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP  
Desenvolvimento de Nanossensores Fluorescentes  
Reutilizável Baseado em Sílica de Stöber

2009 – 2012      **Graduação em Química Bacharelado**  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

### **Atividades Acadêmicas**

Programa de Estágio Docente (2013)  
Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas

### **Produção Bibliográfica**

#### ***Artigos Completos Publicados em Periódicos***

Fernandes, R. S.; Costa, F. S. L.; Valderrama, P.; Março, P. H.; Lima, K. M. G. Non-destructive detection of adulterated tablets of glibenclamide using NIR and solid-phase fluorescence spectroscopy and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 66, p. 85-90, 2012.

### ***Trabalhos Apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais***

Fernandes, R. S.; Raimundo JR, I. M.; Revisiting the synthesis of Stöber silica nanoparticles. XVII International Sol-Gel Conference, 2013, Madrid, Spain.

Fernandes, R. S.; Raimundo JR, I. M.; Otimização de um nanossensor fluorescente baseado em sílica de Stöber seletivo a íons Cu(II). 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte, Brasil.

Fernandes, R. S.; Lima, K.M.G.; Detecting counterfeit diabetes tablets by near-infrared spectroscopy. 15<sup>th</sup> International Conference on Near Infrared Spectroscopy, 2011, Cape Town, South Africa.

Fernandes, R. S.; Lima, K.M.G.; Costa, F.S.L.; Non-destructive detection of adulterated tablets of glibenclamide using solid-phase fluorescence spectroscopy and unfolded partial least squares regression with discriminant analysis. Conférence chimométrie, 2011, Marseille, France.

### **Cursos**

Inovações Tecnológicas Aplicadas às Indústrias Farmacêutica – (UFRN – 2009)

Teoria da Modelagem Molecular – (UFRN – 2010)

Química Medicinal – (UFRN – 2011)

Fundamentos da Nanociência – (UFSCAR – 2013)

## Resumo

Neste trabalho, foram desenvolvidos nanossensores fluorescentes reutilizáveis para determinação de íons Cu(II) através do encapsulamento da rodamina B em nanopartículas de sílica (NPSRB – 5), sintetizadas com base no método de Stöber. Objetivando identificar, compreender e, conseqüentemente, controlar todos os parâmetros envolvidos na síntese, foram realizados estudos uni e multivariado. No estudo univariado foram avaliados os efeitos da temperatura, velocidade de agitação, concentração do catalisador (hidróxido de amônio), concentração de água, razão molar  $[H_2O] / [TEOS]$  e  $[EtOH] / [TEOS]$ . No estudo multivariado foram avaliados os efeitos da água, TEOS, etanol e hidróxido de amônio. Os resultados do estudo univariado mostraram que todos os parâmetros estudados apresentaram influência no tamanho e morfologia das nanopartículas. No estudo multivariado foi possível identificar que as variáveis envolvidas na síntese apresentam tais efeitos somente em condições específicas. Após a identificação e, conseqüentemente, um maior controle dos parâmetros envolvidos na síntese de nanopartículas, iniciou-se o desenvolvimento dos nanossensores fluorescentes reutilizáveis. Neste trabalho, dois nanossensores foram desenvolvidos com concentração do catalisador ( $NH_3$ ) de  $0,18 \text{ mol L}^{-1}$  para o nanossensor 1, e  $0,70 \text{ mol L}^{-1}$  para o nanossensor 2. O nanossensor 2, produzido em uma síntese de 2 h, não apresentou resposta a íons Cu(II) (supressão de fluorescência), isso porque as nanopartículas não possuíam porosidade, o que impediu o acesso dos íons Cu(II) à rodamina B encapsulada. O nanossensor 1, desenvolvido em uma síntese de 7 h, apresentou resposta a íons Cu(II). O reagente luminescente foi adicionado em diferentes estágios da síntese (2, 3, 4 e 5 h), onde o nanossensor com a adição da rodamina B em 5 h de síntese apresentou os melhores resultados. O nanossensor apresentou faixa linear entre  $2,0 - 12,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , limite de detecção de  $0,40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , limite de quantificação de  $1,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , tempo de resposta de 50 s e seletivo a íons Cu(II) podendo ser reutilizado 3 vezes. O nanossensor foi aplicado na determinação de íons Cu(II) em cachaça, produzindo resultados que não diferiram significativamente ao nível de confiança de 95 % dos resultados obtidos por espectrometria de absorção atômica.



## Abstract

In this work, a reusable fluorescent nanosensor for determination of Cu(II) ions was developed by encapsulating rhodamine B in silica nanoparticles synthesized based on Stöber method. In preliminary studies, it was possible to identify a relationship between the performance of nanosensor and the properties of the silica nanoparticles. In order to identify, understand and thus control all the parameters involved in the synthesis, univariate and multivariate studies were performed. In the univariate study, it was evaluated the effect of temperature, stirring speed, catalyst concentration (ammonium hydroxide), water concentration, and  $[\text{H}_2\text{O}] / [\text{TEOS}]$  and  $[\text{EtOH}] / [\text{TEOS}]$  molar ratios. In the multivariate study, it was evaluated the effect of water, TEOS, ethanol and ammonium hydroxide. Results obtained in the univariate study showed that all parameters affect the size and the morphology of the nanoparticles. In the multivariate study, it was found that the variables involved in the synthesis have such effects only under specific conditions. After identification and, consequently, better control of the parameters involved in the synthesis of nanoparticles, the development of fluorescent nanosensors was carried out. Two nanosensors were developed, synthesized with catalyst concentration ( $\text{NH}_3$ ) of  $0.18 \text{ mol L}^{-1}$  for the nanosensor 1, and  $0.70 \text{ mol L}^{-1}$  for the nanosensor 2. The nanosensor 2, developed in a synthesis of 2 h, did not present response to Cu(II) ions (fluorescence quenching), because nanoparticles did not present porosity, which prevented the access of Cu(II) ion to rhodamine B encapsulated. The nanosensor 1, developed in a synthesis of 7 h, showed response to Cu(II) ions. The luminescent reagent was added at different stages of the synthesis (2, 3, 4 and 5 hours), and the nanosensor obtained with addition of rhodamine B after 5 h of synthesis showed the best results. The nanosensor showed linear range from  $2.0$  to  $12.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , detection limit of  $0.40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , quantification limit of  $1.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , response time of 50 s and selectivity to Cu(II) ions which can be reused 3 times. The nanosensor was applied to the determination of Cu(II) in sugar cane spirit and the results obtained did not show significant differences from those obtained by atomic absorption spectrometry at a confidence level of 95 %.



# SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xxi
Lista de Tabelas.....	xxv
Lista de Abreviações.....	xxvii
<b>1. CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.2. MOTIVAÇÃO.....	4
1.3. OBJETIVOS.....	5
<b>2. CAPÍTULO 2 – SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA BASEADA NO PROCESSO DE STÖBER.....</b>	<b>7</b>
2.1. INTRODUÇÃO.....	9
2.1.1. Nanotecnologia e Nanomateriais.....	9
2.1.2. Processo Sol-Gel.....	11
2.1.2.1. Etapas do Processo Sol-Gel.....	11
2.1.2.1.1. Hidrólise e Condensação.....	12
2.1.2.1.2. Nucleação e Crescimento.....	14
2.1.2.1.3. Gelificação.....	16
2.1.2.1.4. Envelhecimento do Gel.....	17
2.1.2.1.5. Secagem.....	17
2.1.3. Sílica de Stöber.....	18
2.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
2.2.1. Reagentes Utilizados.....	19
2.2.2. Síntese de Nanopartículas de Sílica.....	19
2.2.3. Estudos dos Parâmetros Envolvidos na Síntese das Nanopartículas..	20
2.2.3.1. Avaliação da Concentração do Catalisador.....	20
2.2.3.2. Avaliação da Razão [H <sub>2</sub> O] / [TEOS] e [EtOH] / [TEOS].....	21
2.2.3.3. Avaliação do Efeito da Temperatura e Agitação.....	22
2.2.4. Otimização do Processo de Síntese das Nanopartículas de Sílica.....	22
2.2.4.1. Planejamento Fatorial 2 <sup>4</sup> .....	22

2.2.5.	Técnicas de Caracterização .....	23
2.2.5.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	23
2.2.5.2.	Espalhamento Dinâmico de Luz.....	23
2.2.5.3.	Determinação da Área Superficial e Volume de Poro .....	24
2.2.5.4.	Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR).....	24
2.2.5.5.	Ressonância Magnética do <sup>29</sup> Si .....	25
2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.3.1.	Caracterização.....	26
2.3.1.1.	Espectroscopia no Infravermelho Médio .....	26
2.3.1.2.	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>29</sup> Si.....	27
2.3.2.	Avaliação do Efeito dos Parâmetros Envolvidos na Síntese de Nanopartículas de Sílica .....	27
2.3.2.1.	Efeito da Temperatura.....	27
2.3.2.2.	Efeito do Catalisador .....	30
2.3.2.3.	Efeito da Agitação .....	31
2.3.2.4.	Efeito da Razão Molar Entre [EtOH] / [TEOS] e [H <sub>2</sub> O] / [TEOS].....	33
2.3.2.5.	Morfologia e Tamanho Médio de Partícula.....	34
2.3.2.6.	Análise dos Dados do Planejamento Experimental.....	39
<b>3.</b>	<b>CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DE NANOSSENSORES FLUORESCENTES REUTILIZÁVEIS.....</b>	<b>45</b>
3.1.	INTRODUÇÃO.....	47
3.1.1.	Sensores Químicos.....	47
3.1.1.1.	Sensores Químicos Ópticos.....	48
3.1.2.	Espectroscopia de Luminescência.....	49
3.1.2.1.	Rodamina B.....	50
3.1.3.	Nanossensores Fluorescentes.....	52
3.1.3.1.	Nanossensores Fluorescentes Reutilizáveis .....	53
3.1.3.2.	Química do Cobre .....	54
3.1.3.3.	Sensores Fluorescentes Para Determinação de Íons Cobre .....	55

3.2.	PARTE EXPERIMENTAL .....	56
3.2.1.	Reagentes Utilizados .....	56
3.2.2.	Desenvolvimento dos Nanossensores Fluorescentes .....	57
3.2.3.	Medidas de Fluorescência .....	58
3.2.3.1.	Avaliação dos Nanossensores .....	58
3.2.3.2.	Avaliação do Nanossensor 1 .....	59
3.2.4.	Estudo de Interferentes.....	60
3.2.5.	Regeneração do Sinal Analítico.....	60
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.3.1.	Nanossensores Fluorescentes.....	61
3.3.1.1.	Propriedades dos Nanossensores Desenvolvidos .....	61
3.3.1.2.	Avaliação dos Nanossensores Fluorescentes.....	62
3.3.2.	Análise dos Interferentes .....	68
3.3.3.	Desempenho Analítico do Nanossensor .....	69
3.3.4.	Reutilização do Nanossensor .....	70
3.3.5.	Aplicação do Nanossensor .....	71
4.	<b>CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
5.	<b>CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS .....</b>	<b>79</b>
6.	<b>CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>



## Lista de Figuras

Figura 2.1. Distribuição do número de artigos publicados por país no ano de 2012. . . 9	9
Figura 2.2. Principais processos e abordagens para a produção de nanomateriais. 10	10
Figura 2.3. Esquema geral do processo sol-gel e das diferentes vias possíveis ..... 12	12
Figura 2.4. Rotas de síntese envolvidas no processo sol-gel utilizando catálise ácida ou básica. .... 13	13
Figura 2.5. Diagrama de energia livre de nucleação para explicar a existência de um raio crítico (adaptado do livro “Crystallization”, J. Mullin) ..... 15	15
Figura 2.6. Representação esquemática da concentração do alcóxido metálico molecularmente dissolvido antes e depois da nucleação em função do tempo. (Adaptada do artigo de V.LaMer, onde se utilizou o TEOS como exemplo). .... 16	16
Figura 2.7. Esquema do sistema utilizado para síntese de nanopartículas de sílica. (A) Banho termostaticado, (B) Mangueira de conexão e (C) Reatores com camisas para termostaticar (150 mL de capacidade). .... 20	20
Figura 2.8. Espécies de silício presente na sílica. .... 25	25
Figura 2.9. Espectro no infravermelho médio das nanopartículas de sílica ..... 26	26
Figura 2.10. Espectros de RMN <sup>29</sup> Si das nanopartículas de sílica. .... 27	27
Figura 2.11. Influência da temperatura no tamanho de partícula determinados por DLS, onde é apresentado o tamanho médio e o desvio (n=2). .... 28	28
Figura 2.12. Efeito da temperatura no tamanho e energia livre de formação do núcleo crítico ( $T_1 < T_2$ ) . .... 29	29
Figura 2.13. Representação da formação e crescimento das nanopartículas sintetizadas em diferentes temperaturas. .... 29	29
Figura 2.14. (A) Meio reacional com 38% etanol e 56% água e (B) Meio reacional com 70% etanol e 22% água (%v/v) (n=2). .... 30	30
Figura 2.15. Influência da velocidade de agitação no tamanho médio de partícula a	

a partir de medidas de DLS (n=2). .....	31
Figura 2.16. Distribuição dos tamanhos de partícula em diferentes velocidades de agitação (300 a 1600 rpm), obtidos por DLS.....	32
Figura 2.17. Influência da Razão R= [H <sub>2</sub> O] / [TEOS] e (B) Razão R= [EtOH] / [TEOS] sobre o tamanho de partícula. ....	34
Figura 2.18. Micrografias das nanopartículas de sílica (pó) obtidas por microscopia eletrônica de varredura .....	35
Figura 2.19. Medidas de tamanho das NPs em suspensão obtidas por DLS. ....	37
Figura 2.20. Isoterma de adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> nas nanopartículas de sílica. (A) Isoterma das nanopartículas sem porosidade estrutural e (B) Isoterma das nanopartículas mesoporosas. ....	39
Figura 2.21. Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos de cada reagente envolvido na síntese de nanopartículas. ....	40
Figura 2.22. Diâmetro de partícula medido <i>versus</i> previstos. ....	42
Figura 2.23. Gráficos de superfície obtidos a partir do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> .....	44
Figura 3.1. Estrutura molecular da rodamina B (forma catiônica). ....	51
Figura 3.2. Espectro 3D de excitação (535 nm) e de emissão (573 nm) de uma solução a 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> de rodamina B em etanol. ....	51
Figura 3.3. Representação esquemática de um nanossensor fluorescente (adaptado de Bonnacchi et al. 2011).....	53
Figura 3.4. Desenvolvimento dos nanossensores através da imobilização da rodamina B na sílica de Stöber. (A) nanossensor 2 e (B) nanossensor 1. ....	58
Figura 3.5. Preparo das suspensões para avaliação dos nanossensores 1 e 2 através das medidas de fluorescência. (A) tem-se o pó das NPSRB – x, (B) suspensão de NPSRB – x em tampão fosfato e (C) adição na suspensão de íons Cu(II). ....	59
Figura 3.6. Espectros de emissão dos nanossensores fluorescentes em diferentes	

tempos de adição da rodamina B na síntese ( $\lambda_{\text{ex}}$ 535 nm, fendas de emissão 5 e excitação 20 nm).....	61
Figura 3.7. Espectros de emissão dos nanossensores 1 e 2. (A) nanossensor 1 com resposta a íons Cu(II), (B) nanossensor 2 sem resposta a íons Cu(II), [Cu(II)] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0 ([NPSRB] = 0,43 mg $\text{mL}^{-1}$ ). Comprimento de excitação em 535 nm, fendas de emissão e emissão 20 e 5 nm, respectivamente.....	63
Figura 3.8. Gráfico com as intensidades de emissão das nanopartículas em diferentes valores de pH e tempos de adição da rodamina B: (a) NPSRB - 2 na ausência e na presença de Cu(II), (b) NPSRB - 3 na ausência e na presença de Cu(II), (c) NPSRB - 4 na ausência de Cu(II) e na presença de Cu(II), (d) NPSRB - 5 na ausência de Cu(II) e na presença de Cu(II). (Comprimento de excitação em 535 nm, fendas de excitação e emissão 20 e 5 nm, respectivamente, [NPSRB] = 0,43 mg $\text{mL}^{-1}$ , [Cu(II)] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).....	64
Figura 3.9. Modo de ligação proposto entre a rodamina B e os íons Cu(II). .....	65
Figura 3.10. Resposta analítica dos nanossensores a íons Cu(II) para diferentes tempos de adição do reagente luminescente (Rodamina B) em pH 7,0 .....	66
Figura 3.11. Representação da estratégia de encapsulamento da rodamina B nas nanopartículas de sílica durante o processo de síntese (síntese com duração de 7 h) (Adaptada do artigo de Dawei Zhang, onde se utilizou complexo de rutênio como material imobilizado). .....	67
Figura 3.12. Interferência de íons metálicos na detecção de íons Cu(II) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , [metais] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (A) pH 4,0 e (B) pH 7,0. ....	68
Figura 3.13. Espectro de fluorescência e curva analítica do NPSRB - 5 (A) 1ª utilização e (B) reutilização por uma vez. (A1) e (B1) curvas analíticas desenvolvidas a partir do nanossensor novo e do nanossensor reutilizado, respetivamente.....	70
Figura 3.14. Curva analítica construída com nanossensor novo e reutilizado para determinação de Cu(II) em cachaça e suas respectivas equações da reta. ....	72



## Lista de Tabelas

Tabela 2-1. Concentração dos reagentes utilizados no estudo do efeito do catalisador na síntese de nanopartículas de sílica. O TEOS foi utilizado em todas as sínteses com concentração constante (0,32 mol L <sup>-1</sup> ). .....	21
Tabela 2-2. Planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> da síntese de nanopartículas de sílica. ....	23
Tabela 2-3. Valores de tamanho médio e área superficial das nanopartículas de sílica. ....	38
Tabela 2-4. Valores preditos pelo modelo e resíduos de cada combinação experimental.....	41
Tabela 2-5. Análise da variância (ANOVA) .....	42
Tabela 3-1. Determinação de íons cobre em amostras de cachaça utilizando as NPSRB - 5.....	72



## **Lista de Abreviações**

**ISO:** Organização Internacional para Padronização

**NPs:** Nanopartículas de Sílica

**TEOS:** Tetraetilortosilano

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**DLS:** Espalhamento Dinâmico de Luz

**FTIR:** Infravermelho por Transformada de Fourier

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**ANOVA:** Análise de variância

**DDSN:** Nanopartículas de Sílica Dopadas com Corante

**GF:** Forno de Grafite

**AAS:** Espectrometria de Absorção Atômica

**ICP:** Plasma Indutivamente Acoplado

**OES:** Espectrometria de Emissão Óptica

**NPSRB:** Nanopartículas de Sílica com Rodamina B



# **CAPÍTULO 1 – Introdução**



## 1.1. Introdução Geral

O estudo de nanomateriais teve início no século XIX, quando Faraday estudou a cor de partículas coloidais de ouro, no qual foi possível observar a relação entre as propriedades ópticas e o tamanho de partícula [1]. Nos últimos anos, o progresso de métodos químicos e físicos e o desenvolvimento de instrumentação adequada para estudo e manipulação da matéria em nanoescala, com flexibilidade e precisão nunca antes alcançadas, contribuíram para o avanço na produção de nanomateriais [2]. Estes estudos foram impulsionados pela habilidade de controlar as propriedades dos materiais através do tamanho das partículas, tornando-os significativamente diferentes quando comparados ao seu material de origem [3].

A ISO (*International Organization for Standardization*) 229/TC JGW1 desenvolvida em junho de 2005 teve como objetivo a padronização dos termos e definições utilizados na área da nanotecnologia. Segundo a ISO 229, nanoescala é a faixa de tamanho a partir de 1 nm até 100 nm. Assim, nanomaterial é um material com qualquer dimensão em nanoescala ou com estrutura interna ou estrutura de superfície em nanoescala. Já nano-objeto pode ser um material com uma, duas ou três dimensões externas na escala nanométrica [4].

Em virtude de partículas em nanoescala apresentarem uma alta razão superfície/volume, novas propriedades eletrônicas, ópticas, fotoquímicas, magnéticas, eletroquímicas e catalíticas podem ser obtidas dependendo do material utilizado [5–8]. Essas novas propriedades abrem uma gama de possibilidades para a fabricação de novos materiais que apresentam novas aplicações, diferentes do material de origem. Neste contexto, a síntese da sílica de Stöber baseada no processo sol-gel merece destaque por ser um método que permite a preparação de materiais híbridos orgânico-inorgânicos [9]. Através do processo sol-gel vem sendo possível sintetizar nanopartículas de sílica fluorescentes (nanossensores fluorescentes). As nanopartículas de sílica (NPs) atuam como suporte sólido para imobilização de diferentes reagentes luminescentes. Esse tipo de nanossensor pode estabelecer uma nova alternativa para a detecção de íons metálicos com aplicação biológica, toxicológica e ambiental.

## 1.2. Motivação

Atualmente, o estudo das NPs, tem apresentado uma elevada importância e, conseqüentemente, um aumento no número de publicações científicas. O aumento no número de publicações está diretamente ligado ao surgimento de novas aplicações desse material em diferentes áreas, tais como cromatografia [10], cerâmicas [11], catálise [12], pigmentos [13], semicondutores [14], e sensores fluorescentes [15]. Em função das inúmeras aplicações das NPs, propriedades cada vez mais específicas do material passaram a ser requeridas. Assim, como o tamanho, a morfologia e a estrutura das partículas produzidas, são propriedades influenciadas tanto pelo método de síntese empregado, como também pelos parâmetros envolvidos nesta síntese de nanopartículas. Deste modo, a síntese de nanopartículas passou a ser foco de estudo e vem sendo cada vez mais explorada.

Uma das aplicações das NPs tem sido o desenvolvimento de nanossensores fluorescentes para determinação de íons metálicos. Estudos recentes demonstraram que o desempenho do nanossensor possui relação direta com o tamanho, uniformidade e volume dos poros das partículas produzidas [16,17], reforçando a importância do controle dos parâmetros na síntese. A literatura também descreve, embora que timidamente, trabalhos direcionados ao desenvolvimento de nanossensores fluorescentes reutilizáveis para detecção de íons metálicos [18,19]; porém não apresentaram resultados satisfatórios, o que evidencia que a reutilização desses materiais ainda se encontra em fase de consolidação.

Apesar de vários trabalhos reportarem o estudo dos parâmetros envolvidos na síntese de NPs, a literatura tem apresentado resultados controversos em relação aos efeitos causados pelos parâmetros (concentração dos reagentes, grau de agitação, temperatura e catalisador) envolvidos na síntese [15,20–24]. Apesar de usar métodos experimentais semelhantes, alguns artigos ([15,20–24]) apresentaram resultados distintos sobre os efeitos da água, do tetraetilortosilano (TEOS), da temperatura e da amônia no tamanho médio das nanopartículas. Isso ocorre porque os parâmetros envolvidos não são devidamente controlados e os efeitos causados entre as interações entre as variáveis são negligenciados, o que produz resultados

irreprodutíveis e conflitantes. Uma das grandes dificuldades encontradas tem sido no controle da concentração do catalisador no meio. Isso porque, a maioria dos artigos referente ao estudo dos parâmetros envolvidos na síntese de Stöber descrevem o uso de amônia concentrada (volátil) como catalisador, o que pode promover uma série de erros. Por exemplo, uma variação na concentração da amônia provoca uma variação na quantidade de água e/ou de etanol envolvido na reação [25,26], não sendo possível identificar a influência da água, do etanol ou da amônia na variação do tamanho médio de partícula. Devido aos resultados contraditórios, é possível identificar a necessidade de se ter uma técnica otimizada para a produção confiável de nanopartículas esféricas de sílica e, conseqüentemente, utilizá-las no desenvolvimento de nanossensores fluorescentes reutilizáveis de forma controlada e reprodutível.

### **1.3. Objetivos**

Neste trabalho, o objetivo foi desenvolver nanossensores ópticos reutilizáveis empregando rodamina B imobilizada em nanopartículas de sílica, obtidas pelo método de Stöber, para a detecção de íons Cu(II) em meio aquoso empregando a técnica de espectroscopia de fluorescência. Teve ainda por objetivo investigar os efeitos causados pelos parâmetros envolvidos (temperatura, concentração dos reagentes e do catalisador, agitação magnética e razão molar entre os reagentes) na síntese da sílica de Stöber inicialmente de forma individual. Após um estudo individual, utilizou-se o planejamento experimental <sup>24</sup> com os reagentes envolvidos na síntese, permitindo uma análise multivariada do sistema, tornando possível uma maior compreensão sobre os parâmetros e conseqüentemente um maior controle sobre a síntese.



## **CAPÍTULO 2 – Síntese de Nanopartículas de Sílica Baseada no Processo de Stöber**



## 2.1. Introdução

### 2.1.1. Nanotecnologia e Nanomateriais

O número de publicações sobre o tema “nanomateriais” tem aumentado a uma taxa exponencial desde o início de 1990, atingindo cerca de 52.000 publicações no ano de 2012, como indicado por uma pesquisa na base de dados ISI Web of Knowledge (2005). O grande número de publicações sobre nanomateriais podem ser explicado pelo fato de que a nanociência e a nanotecnologia abrangem ampla gama de áreas, incluindo a química, a física, a engenharia de materiais, a biologia, a medicina e a eletrônica. Na Figura 2.1 é possível observar a porcentagem de publicações em 2012 na área de nanomateriais por alguns países.

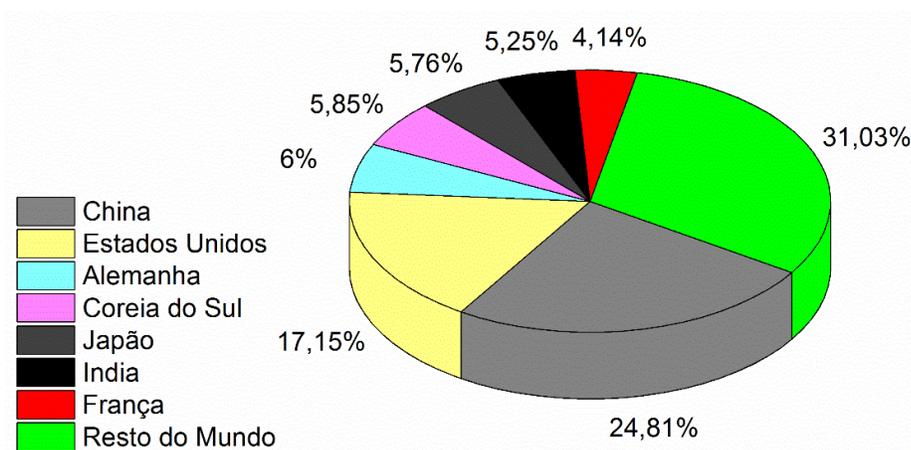


Figura 2.1. Distribuição do número de artigos publicados por país no ano de 2012.

A definição amplamente aceita de nanotecnologia é dada como a manipulação de átomos ou moléculas em escala nanométrica de 1-100 nm [27]. Em geral, a nanotecnologia pode ser entendida como a tecnologia que projeta, fabrica e aplica nanoestruturas. O estudo fundamental entre as propriedades físicas e fenômenos relacionados à dimensão em nanoescala é também chamado de nanociência.

Os materiais nanoestruturados são aqueles com pelo menos uma dimensão em escala nanométrica, e incluem nanopartículas, nanobastões e nanofios, nanocamadas

e filmes finos [28].

Vários métodos têm sido propostos para o desenvolvimento de nanoestruturas, sendo classificados em duas abordagens principais: Botton-up e Top-down. No método botton-up os nanomateriais são produzidos a partir de unidades moleculares ou atômicas individuais em processos de auto-organização. No método top-down as estruturas em escala nanométrica são extraídas a partir de sólidos maiores, por exemplo, por processos mecânicos, tais como moagem de alta energia ou por processos de litografia óptica [29,30]. Na Figura 2.2 estão descritos de forma sintetizada as principais abordagens para produção de nanomateriais.

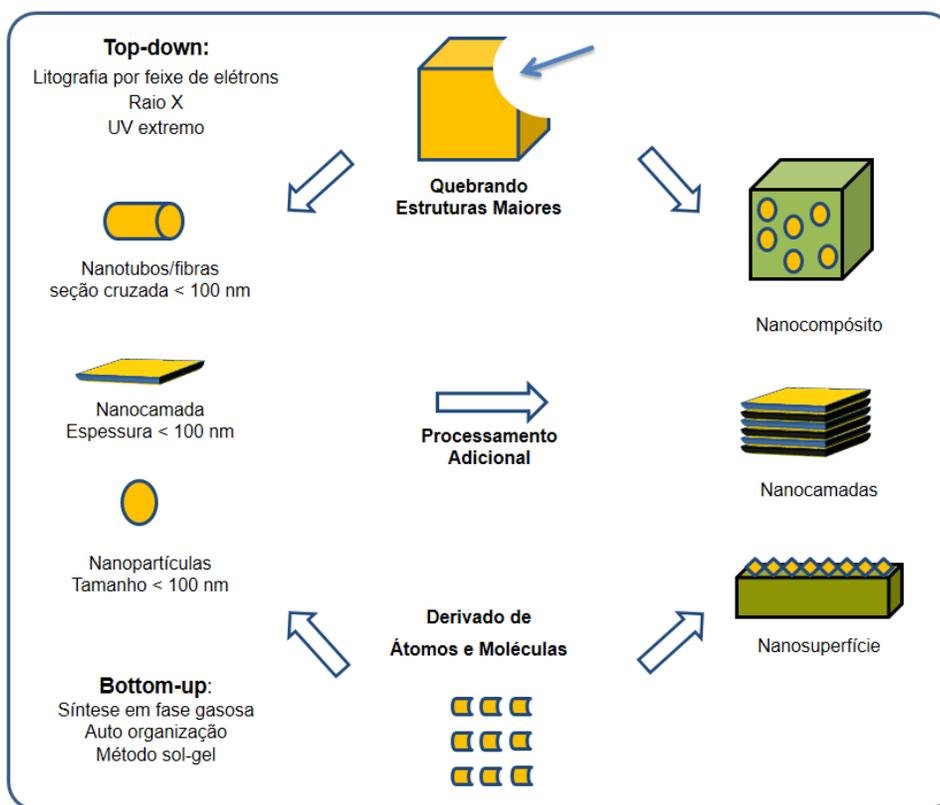


Figura 2.2. Principais processos e abordagens para a produção de nanomateriais.

Embora o tamanho seja um fator determinante para definir a propriedade final do nanomaterial, não é o único fator influenciável. A morfologia é um fator que rege outras propriedades; por exemplo, a porosidade e a rugosidade da superfície alteram a razão superfície-volume e, conseqüentemente, outras propriedades já mencionadas nesse

trabalho [31]. Os nanomateriais podem ser classificados através de sua morfologia, baseando-se na sua dimensionalidade ou aspecto. Atualmente são conhecidas 4 classes: 0D; 1D; 2D e 3D. As estruturas 0D (dimensão zero) englobam todas as nanopartículas amorfas ou semicristalinas com diâmetro acima de 1 nm. Nanoestruturas unidimensionais (1D) são anisotrópicas e muitas vezes possuem propriedades físicas exclusivas, tais como o transporte de elétrons balísticos e características ópticas específicas. São exemplos de partículas 1D os nanotubos e os nanofios. Estruturas 2D foram desenvolvidas por décadas na forma de filmes metálicos finos, que podem aumentar significativamente as propriedades de superfície de um determinado material. Por fim, as nanoestruturas 3D, que têm como exemplo matrizes nanoporosas e cristais, sendo esses materiais são formadas pela auto-organização de nanopartículas [32].

## **2.1.2. Processo Sol-Gel**

O termo sol-gel é usado para descrever uma série de processos de natureza físico-química que leva à formação de sólidos amorfos a partir de precursores inorgânicos, passando pelos estados de sol e de gel [33]. O sol é uma suspensão coloidal de partículas sólidas em um líquido e o gel é uma estrutura rígida de partículas coloidais, porosa e interconectada que inclui uma fase líquida no seu interior [9]. O processo sol-gel possui diversas etapas e permite a manipulação de forma simples da textura, da estrutura, da configuração e das características químicas do material produzido. Esse processo, devido à sua extrema versatilidade, tem sido utilizado por décadas para produção de vidros, filmes, monólitos, placas, fibras, etc. [34]. Na Figura 2.3 são observados os diversos materiais obtidos pelo método sol-gel

### **2.1.2.1. Etapas do Processo Sol-Gel**

A síntese de materiais a partir do processo sol-gel envolve o uso de um alcóxido metálico, que através de hidrólise e condensação permite a obtenção de materiais com grande homogeneidade e pureza. O processo sol-gel pode ser dividido nas seguintes etapas: hidrólise e condensação, gelificação, envelhecimento do gel e secagem.

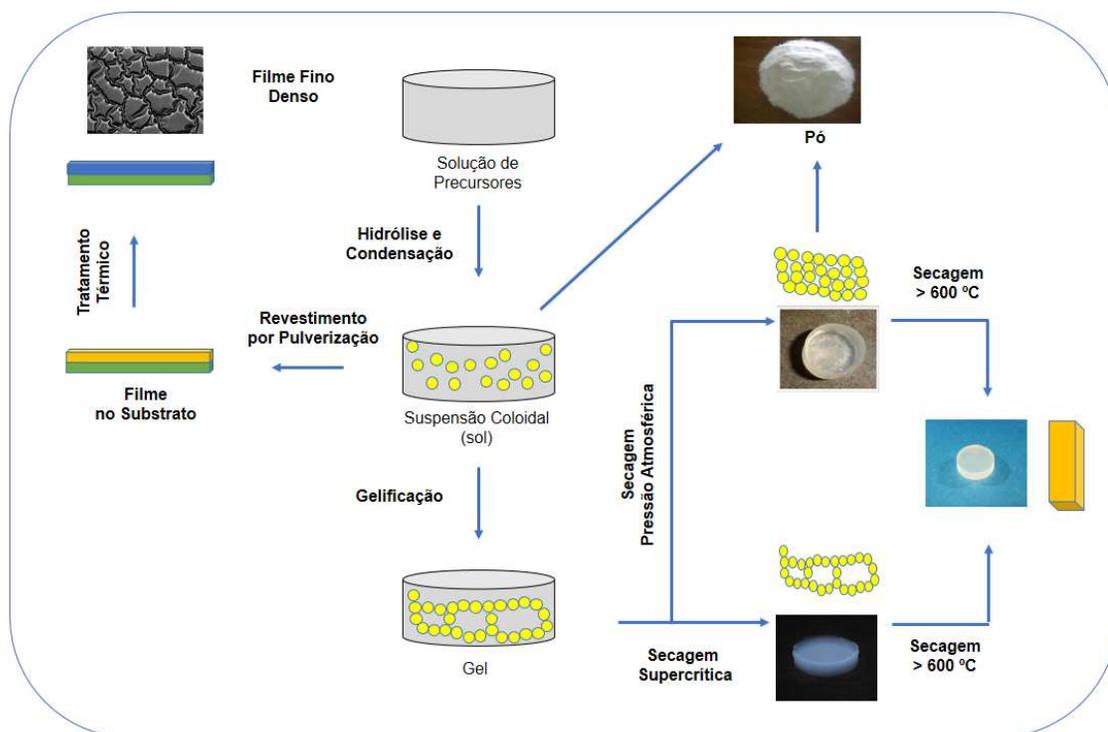


Figura 2.3. Esquema geral do processo sol-gel e das diferentes vias possíveis

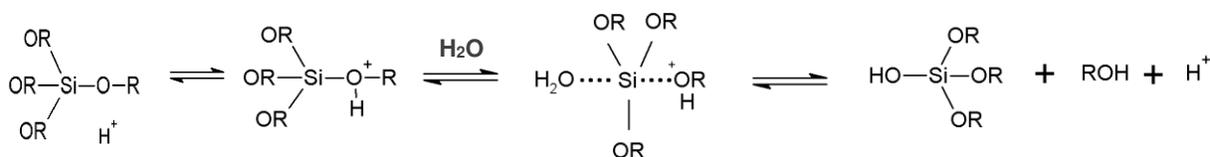
### 2.1.2.1.1. Hidrólise e Condensação

Os materiais produzidos através do processo sol-gel obtidos por via orgânica são sintetizados por hidrólise e condensação de precursores, os alcóxidos metálicos, utilizando ácido ou base como catalisadores e um solvente orgânico, geralmente etanol [35–37]. As reações de hidrólise e condensação dos alcóxidos metálicos ocorrem através da substituição nucleofílica bimolecular ( $SN_2$ ) no átomo metálico. A reação de hidrólise catalisada por ácido envolve a protonação do grupo alcóxido, seguida pelo ataque nucleofílico da água, para formação de um intermediário penta-coordenado. Sob condições básicas, ocorre o ataque nucleofílico sobre o átomo de silício pelo ânion hidróxido, formando um intermediário penta-coordenado carregado negativamente, seguido pela saída de um ânion alcóxido. Na Figura 2.4 é possível observar os mecanismos envolvidos na hidrólise e condensação do alcóxido de silício em meio ácido e em meio básico.

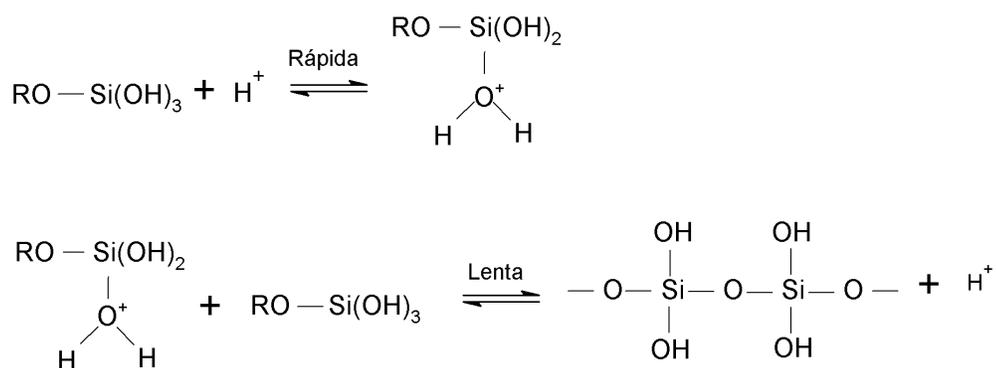
**ROTA DE SÍNTESE:**

**CATÁLISE ÁCIDA**

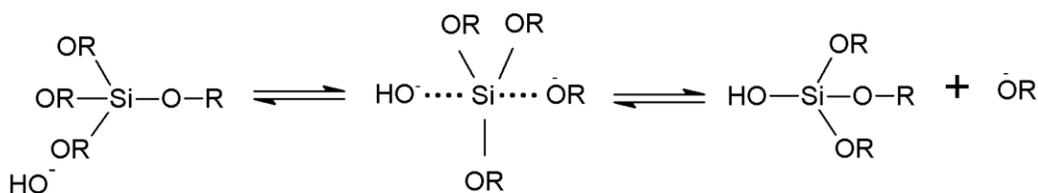
Hidrólise



Condensação



**CATÁLISE BÁSICA**



Condensação

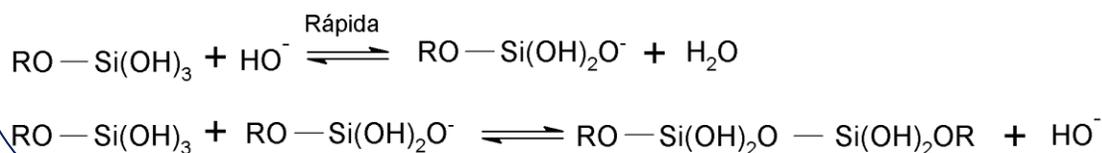


Figura 2.4. Rotas de síntese envolvidas no processo sol-gel utilizando catálise ácida ou básica.

### 2.1.2.1.2. Nucleação e Crescimento

A formação de uma nova fase concebida a partir de uma solução, tem suas dimensões determinadas por dois processos distintos: a nucleação, que consiste na formação de centros iniciais de cristalização, para posterior crescimento das partículas (consumo dos reagentes em solução pelos núcleos primários formados). Uma definição prática de nucleação é que é um processo pelo qual pequenos núcleos instáveis são transformados em nanopartículas dinamicamente metaestáveis, através da adição contínua de monômero livre em um sistema supersaturado. A teoria clássica da nucleação pressupõe que para os núcleos serem formados, os mesmos devem superar uma barreira de energia potencial, devido à área superficial, a fim de chegar a um tamanho de partícula metaestável. O máximo nesta barreira potencial corresponde ao raio crítico ( $r^*$ ), ou seja, o raio onde a partícula está em equilíbrio com a solução de monômero. Se a partícula formada tiver raio menor que o raio crítico, a partícula se redissolve e torna-se material precursor para crescimento de outras partículas já estáveis. Se o raio da partícula for maior que o raio crítico, a partícula continua a crescer enquanto houver monômero em solução. Através da equação de Gibbs - Thomson (1) é possível calcular a barreira energética necessária pra formação de um núcleo estável:

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v$$

Equação (1)

Desestabilização devido ao aumento na energia de superfície

Estabilização devido a formação dos Núcleos

Onde  $\Delta G_v$ , é a energia livre por unidade de volume ( $J/m^3$ ),  $r$  é o raio crítico e  $\gamma$  é a tensão superficial. A primeira parte representa a energia livre desfavorável associada à formação da superfície e a segunda parte desta equação representa a

energia livre de formação favorável a um volume definido de material. Na Figura 2.5 observa-se a relação entre energia livre e o raio crítico da partícula.

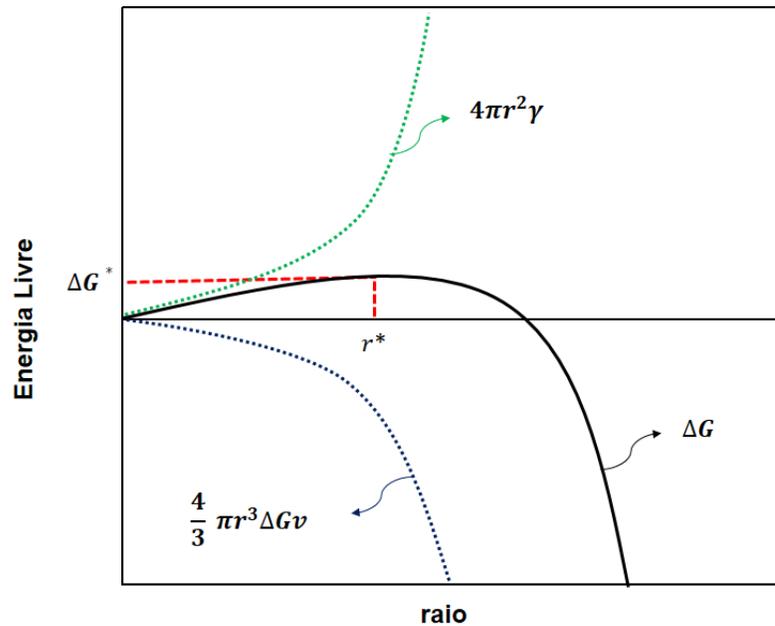


Figura 2.5. Diagrama de energia livre de nucleação para explicar a existência de um raio crítico (adaptado do livro “Crystallization”, J. Mullin)

O diagrama de LaMer [38] (Figura 2.6) pode ser usado para explicar qualitativamente a formação de partículas monodispersas a partir de uma solução supersaturada, reforçando a discussão quantitativa do processo de formação e crescimento de partícula [39]. O diagrama divide-se em três estágios: pré-nucleação, nucleação e crescimento. No estágio I (pré-nucleação), observa-se o aumento na concentração do soluto, no entanto, a nucleação não acontece mesmo acima da solubilidade de equilíbrio ( $C_s$ ). A nucleação ocorre apenas quando a concentração ( $C_{min}$ ) atinge um valor acima de  $C_s$  na qual  $\Delta G$  é satisfeita (estágio II). Assim que a nucleação inicial ocorre, a concentração de espécies para crescimento diminui. No estágio III, quando a concentração cai abaixo de  $C_{min}$ , núcleos param de se formar e o crescimento acontece até a concentração de espécies atingir  $C_s$ . Nesse caso, a concentração de espécies (supersaturação) aumenta abruptamente e cai rapidamente abaixo de  $C_{min}$  [40].

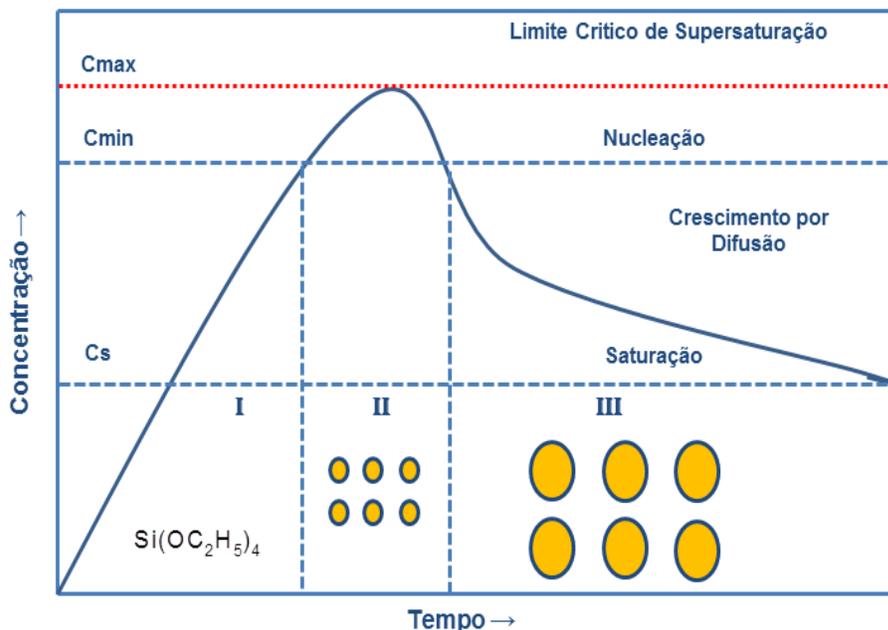


Figura 2.6. Representação esquemática da concentração do alcóxido metálico molecularmente dissolvido antes e depois da nucleação em função do tempo. (Adaptada do artigo de V.LaMer, onde se utilizou o TEOS como exemplo).

### 2.1.2.1.3. Gelificação

À medida que as reações de hidrólise e condensação evoluem, os monômeros reagem entre si de forma irreversível através dos seus grupos terminais, formando partículas e agregados de tamanho e complexidade crescente. A gelificação é um processo em que as partículas coloidais de sílica e espécies condensadas unem-se formando uma rede tridimensional [41]. A transição de sol para gel é irreversível e o meio reacional, contendo os reagentes, passa a um sistema de duas fases: o gel final é constituído por partículas amorfas de dimensões variáveis, com uma fase de líquido intersticial. O ponto ou tempo de gelificação,  $t_{\text{gel}}$ , corresponde ao momento da reação em que um número crítico de monômeros interligados é excedido e a massa total sólida se encontra interligada [42]. Esta estrutura pode mudar apreciavelmente com o tempo, dependendo da temperatura, solvente, condições de pH e a remoção do solvente (secagem).

#### **2.1.2.1.4. Envelhecimento do Gel**

Quando em um gel há líquido em seu poro, a sua estrutura e propriedades continuam a mudar muito depois do ponto de gelificação. Este processo é chamado de envelhecimento [43]. Nesta fase, ainda existem oligômeros livres para se difundirem e reagirem, e a rede sólida contém ainda a fase líquida contínua que permite um transporte rápido de moléculas no seu interior. Quatro processos podem ocorrer, isoladamente ou ao mesmo tempo, durante o envelhecimento, incluindo a policondensação, a sinerese, amadurecimento de Ostwald e a transformação de fase [44]. Embora existam diversos trabalhos na literatura sobre envelhecimento do gel, há relativamente pouco conhecimento dos mecanismos e cinética de envelhecimento. As reações de policondensação continuam a ocorrer dentro da rede de gel, enquanto silanóis vizinhos estão pertos o suficiente para reagir. Isso aumenta a conectividade da rede e sua dimensão fractal. A sinerese é a contração espontânea do gel, o que resulta na expulsão do líquido dos poros. O amadurecimento de Ostwald consiste num processo de maturação por redissolução e precipitação, conduzido por diferenças de solubilidade entre superfícies com diferentes raios de curvatura. Uma vez que as superfícies convexas são mais solúveis do que superfícies côncavas, se um gel é imerso em um líquido em que seja solúvel, o material dissolvido tenderá a precipitar em regiões de curvatura negativa. Isso significa que os espaços entre as partículas irão crescer e pequenos poros podem ser preenchidos, resultando numa diminuição do tamanho médio dos poros do gel e, conseqüentemente, numa diminuição da área superficial [33].

#### **2.1.2.1.5. Secagem**

A etapa de secagem é importante, pois também define o tipo de produto obtido através do processo sol-gel. Durante a secagem, o líquido é removido dos poros das partículas interligadas (rede). Quando um gel é seco, a sua estrutura pode ser alterada substancialmente. Durante a secagem térmica ou evaporação à temperatura ambiente, as forças capilares induzem tensões sobre o gel, que aumentam os números de

coordenação das partículas e induzem ao colapso da rede. A eliminação do solvente no gel à temperatura ambiente resulta na formação de um material vítreo chamado xerogel, ou alcogel se o líquido contido nos poros for majoritariamente álcool. O líquido contido nos poros pode ainda ser eliminado através de um processo de secagem supercrítica (processo para remover o líquido em uma maneira precisamente controlada). A extração supercrítica de solvente a partir de um gel não induz tensões capilares devido à falta de interfaces por vaporização do solvente. Nestas condições, obtém-se uma estrutura altamente porosa e de baixa densidade, sem que haja redução de volume nem colapso dos poros, designada por aerogel [45–48].

### **2.1.3. Sílica de Stöber**

A importância e vantagens das nanopartículas de sílica são observadas não somente no campo científico, mas também em várias áreas industriais, como por exemplo, catálise, pigmentos, área farmacêutica, sensores de umidade e isoladores térmicos [49]. Na maioria das aplicações das nanopartículas, a morfologia, o tamanho médio e a distribuição de tamanhos são considerados como as principais propriedades que devem ser controlados. As nanopartículas de sílica têm sido sintetizadas em tamanhos que variam de 5 nm até micrômetros de diâmetro. Existem várias técnicas de síntese que podem ser utilizadas para preparar nanopartículas sílica. Estas incluem emulsão água-óleo, pirólise por pulverização em chama, micela reversa e processo sol-gel [52–60].

Baseado no processo sol-gel, Stöber & Fink, em 1968, sintetizaram nanopartículas esféricas de dióxido de silício através da hidrólise e condensação do TEOS em etanol e água, utilizando amônia como catalisador [59]. O método de Stöber, além de versátil e rápido, permite obter partículas esféricas com tamanho uniforme, sendo possível obter partículas entre 5 a 2000 nm. O mecanismo envolvido na síntese de Stöber é semelhante a catalise básica descrita na Figura 2.4

A sílica de Stöber pode ser utilizada como suporte para a incorporação de moléculas de interesse, adquirindo as características da molécula imobilizada e

mantendo sua estrutura após as reações de imobilização [60]. A vantagem de se utilizar a sílica de Stöber está associada à fotoestabilidade, à estabilidade química, à biocompatibilidade, à fácil modificação e ao fato de a matriz de sílica ser inerte [7]. Diversos trabalhos são descritos na literatura envolvendo nanopartículas de sílica dopadas (processo de imobilização) com materiais luminescentes para construção de nanossensores ópticos [61–64]. Os métodos mais utilizados para imobilização do reagente luminescente nas nanopartículas são: (1) adsorção, (2) ligação covalente e (3) encapsulamento [65]. No terceiro capítulo dessa dissertação será possível observar o uso da sílica de Stöber dopado com rodamina B (encapsulamento) como nanossensor fluorescente reutilizável para a determinação de íons metálicos em meio aquoso.

## **2.2. Parte Experimental**

### **2.2.1. Reagentes Utilizados**

- Água desionizada ( $\geq 18 \text{ M}\Omega$ )
- Etanol absoluto (Merck)
- Solução de amônia ( $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  em etanol, Aldrich)
- Solução de hidróxido de amônio (28%  $\text{NH}_3$ , Synth)
- Tetraetilortosilano (TEOS) ( $\geq 99,0 \%$ , Aldrich)
- Solução aquosa padrão de hidróxido de amônio ( $2,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_3$ )

### **2.2.2. Síntese de Nanopartículas de Sílica**

A síntese das nanopartículas de sílica foi realizada baseando-se no método de Stöber. Inicialmente misturou-se a solução aquosa padrão de hidróxido de amônio com etanol absoluto e, durante 15 minutos, o sistema permaneceu com agitação constante. Após o período inicial de mistura, adicionou-se o tetraetilortosilano (TEOS,  $\geq 99,0 \%$ ), iniciando-se a reação de hidrólise, seguida de condensação durante 120 minutos a  $70^\circ\text{C}$ , sob agitação magnética de 350 rpm. Após a síntese, as partículas formadas

foram isoladas por centrifugação (14.000 rpm/60 min). Na sequência, o material foi lavado três vezes com etanol para eliminação do solvente e do catalisador do meio reacional. O material decantado foi seco em estufa durante 24 h a 60 °C. Na Figura 2.7 é possível visualizar a representação do sistema utilizado para síntese de nanopartículas de sílica. Foram utilizados reatores com camisas (150 mL), que permitiram a circulação de água a uma determinada temperatura.

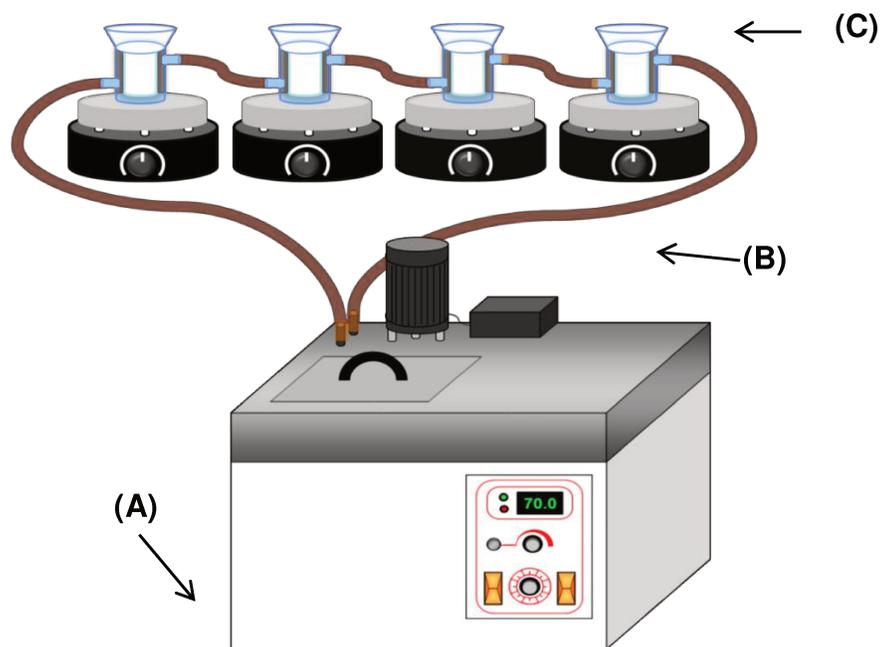


Figura 2.7. Esquema do sistema utilizado para síntese de nanopartículas de sílica. (A) Banho termostático, (B) Mangueira de conexão e (C) Reatores com camisas para termostatar (150 mL de capacidade).

## 2.2.3. Estudos dos Parâmetros Envolvidos na Síntese das Nanopartículas

### 2.2.3.1. Avaliação da Concentração do Catalisador

Para avaliação do efeito do catalisador ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) no tamanho médio das partículas, foram realizadas diversas sínteses em meio aquoso e em meio alcoólico, variando a concentração da solução aquosa de hidróxido de amônio e mantendo a concentração dos demais reagentes constante. Desse modo, foi possível avaliar a

influência do catalisador no tamanho médio e uniformidade das partículas formadas na síntese. As concentrações dos reagentes utilizados estão descritos na Tabela 2-1 abaixo:

Tabela 2-1. Concentração dos reagentes utilizados no estudo do efeito do catalisador na síntese de nanopartículas de sílica. O TEOS foi utilizado em todas as sínteses com concentração constante ( $0,32 \text{ mol L}^{-1}$ ).

<b>Amostra</b>	<b>Etanol (mol/L)</b>	<b>Amônia (mol/L)</b>	<b>Água (mol/L)</b>	<b>Etanol (%v/v)</b>
<b>NP – 1</b>	6,42	0,53	31,10	38
<b>NP – 2</b>	6,42	0,56	31,10	38
<b>NP – 3</b>	6,42	0,59	31,10	38
<b>NP – 4</b>	6,42	0,63	31,10	38
<b>NP – 5</b>	6,42	0,70	31,10	38
<b>NP – 6</b>	11,80	0,22	13,80	70
<b>NP – 7</b>	11,80	0,27	13,80	70
<b>NP – 8</b>	11,80	0,31	13,80	70
<b>NP – 9</b>	11,80	0,36	13,80	70
<b>NP – 10</b>	11,80	0,45	13,80	70

### 2.2.3.2. Avaliação da Razão $[\text{H}_2\text{O}] / [\text{TEOS}]$ e $[\text{EtOH}] / [\text{TEOS}]$

Após a avaliação do catalisador (item 2.2.3.1), um novo estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito causado pela variação da razão entre  $[\text{H}_2\text{O}] / [\text{TEOS}]$  (0,3 a 5,6) e  $[\text{EtOH}] / [\text{TEOS}]$  (5,5 a 15,5) na síntese de nanopartículas. As sínteses foram realizadas variando a concentração do etanol (6,42 a  $11,80 \text{ mol L}^{-1}$ ) e da água (13,80 a  $31,10 \text{ mol L}^{-1}$ ), mantendo-se constantes as concentrações de TEOS ( $0,32 \text{ mol L}^{-1}$ ) e da amônia ( $0,22 \text{ mol L}^{-1}$ ). Quando se avaliou a razão  $[\text{H}_2\text{O}] / [\text{TEOS}]$ , o catalisador utilizado foi a solução alcoólica de hidróxido de amônio padrão e para avaliar  $[\text{EtOH}] / [\text{TEOS}]$  utilizou-se uma solução aquosa de hidróxido de amônio padrão, sendo possível

controlar de forma rigorosa a concentração de todos os parâmetros envolvidos nesse estudo. A concentração de cada reagente citado é referente à concentração na mistura.

### **2.2.3.3. Avaliação do Efeito da Temperatura e Agitação**

Após essa etapa inicial, estudou-se a influência da temperatura e da agitação magnética no tamanho médio e na uniformidade das nanopartículas. Sínteses foram feitas variando-se a temperatura de 20 a 70 °C, e variando a agitação de 350 a 1600 rpm. A temperatura foi controlada através de um banho termostático e a agitação por meio de um foto tacômetro digital MDT-2244B. As sínteses realizadas para esse estudo utilizaram concentrações iguais àsquelas empregadas na síntese da NP – 5 descrita no item 2.2.2.

## **2.2.4. Otimização do Processo de Síntese das Nanopartículas de Sílica**

### **2.2.4.1. Planejamento Fatorial 2<sup>4</sup>**

Como o processo de síntese de nanopartículas pode ser influenciado por múltiplas variáveis, o planejamento fatorial é uma ferramenta estatística poderosa para a determinação dos efeitos de cada variável envolvida no processo e as suas interações. O principal foco do planejamento é extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo o mínimo de experimentos possíveis. Após esse processo de triagem das variáveis mais significativas, são executados experimentos que permitem o refinamento e um melhor conhecimento do sistema em estudo. O planejamento foi desenvolvido com objetivo de identificar qual dos reagentes e suas interações na síntese de nanopartículas apresenta uma maior contribuição no tamanho médio das partículas formadas, tornando possível uma otimização da síntese. Foram utilizados quatro fatores (quantidades de etanol, TEOS, água e amônia) e dois níveis (+1, -1), o que significa a realização de 16 experimentos em duplicata. A quantidade real de cada parâmetro é apresentada na Tabela 2-2.

Tabela 2-2. Planejamento fatorial  $2^4$  da síntese de nanopartículas de sílica.

Fatores	Nível Inferior (-1)	Nível Superior (+1)
Etanol (mmol)	240	440
TEOS (mmol)	12,0	13,0
Amônia (mmol)	4,00	11,0
Água (mmol)	500	1200

## 2.2.5. Técnicas de Caracterização

### 2.2.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica utilizada para caracterização da morfologia e do tamanho de partícula. O princípio do funcionamento do MEV consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 Kv [66]. A morfologia das partículas foi observada através de micrografias eletrônicas de varredura coletadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-360 - LV, operando a 20 kV com imagens de elétrons secundários. As amostras foram analisadas sobre um suporte para amostra de Cu-Zn, metalizado com uma camada de 10 nm de ouro (metalizador Bal-tec MED020 Coating system).

### 2.2.5.2. Espalhamento Dinâmico de Luz

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) baseia-se na determinação da intensidade de luz espalhada por partículas em suspensão em movimento Browniano [67]. As medidas das suspensões de nanopartículas em água e etanol foram realizadas em um Nanosizer da Malvern. Na primeira parte, a amostra sólida das nanopartículas foi dispersa em água (síntese em meio aquoso) ou etanol (síntese em meio alcoólico), e deixada no ultrassom durante 30 min. Após a sonicação, 2 mL da suspensão foram transferidos para uma cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico) e a medida foi feita

com detector em um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. A medida de espalhamento de luz permitiu obter o tamanho médio e a dispersão do tamanho das partículas em suspensão.

### **2.2.5.3. Determinação da Área Superficial e Volume de Poro**

A determinação da área superficial específica dos materiais em nanoescala é útil para compreender a interação desse material com outras espécies, uma vez que esses parâmetros estão relacionados com a acessibilidade aos poros e a superfície ativa. A área superficial específica ou área B.E.T, nos fornece informações a respeito da área superficial total, a qual pode ser determinante na quantidade de material imobilizado nas nanopartículas. Existem dois tipos diferentes de formação porosa. O primeiro tipo se constitui de espaços existentes entre as partículas primárias de um sólido (porosidade de agregados). Fazem parte ainda deste primeiro tipo de poros os espaços existentes entre as partículas. O segundo tipo de porosidade é formado quando uma parte do sólido é removida, seja por um processo de solubilização parcial deste sólido ou eliminação do solvente utilizado na síntese (porosidade estrutural). Neste trabalho, a área superficial foi determinada através da construção de uma isoterma de adsorção, utilizando o gás N<sub>2</sub> como adsorbato. As isotermas de adsorção/dessorção das nanopartículas de sílica foram obtidas após as amostras terem sido desgaseificadas a 180 °C sob vácuo. O volume dos poros foi calculado pela equação t-plot.

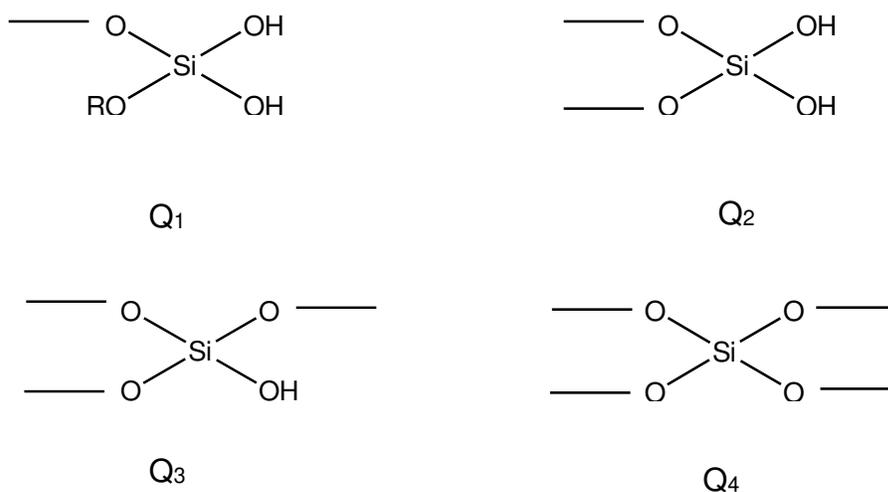
### **2.2.5.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia no infravermelho usando transformada de Fourier é uma técnica que analisa a interação da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação infravermelha é emitida em diferentes frequências e ao atingir a amostra uma parte da radiação é absorvida, enquanto outra parte é transmitida. Com a técnica de infravermelho é possível obter informações sobre as ligações presentes na amostra. Os espectros de absorção no infravermelho das nanopartículas de sílica sintetizadas no item 2.2.2 foram coletados utilizando um espectrômetro da marca MB100 Bomem com

resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , na faixa de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  e acumulação de 16 varreduras. Foram feitas pastilhas com KBr com concentração de  $2 \text{ \% (m/m)}$  para realização das medidas.

### 2.2.5.5. Ressonância Magnética do $^{29}\text{Si}$

A análise de RMN de  $^{29}\text{Si}$  fornece informações sobre o ambiente em torno dos átomos de silício que compõem a matriz inorgânica e a estrutura da sílica sem conter qualquer grupo orgânico imobilizado na superfície. As estruturas das espécies químicas com núcleo de silício nas nanopartículas de sílica podem ser representadas através da porcentagem de grupos  $Q_n$ , onde  $n$  pode variar de 1 a 4. Na Figura 2.8 é possível observar as estruturas correspondentes a  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$  e  $Q_4$ . Os espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  das amostras foram obtidos em um equipamento de  $400 \text{ MHz}$  Bruker Avance 400, operando em  $79,49 \text{ MHz}$ , rotação de  $10 \text{ KHz}$ , pulso simples de  $2 \mu\text{s}$  de duração e tempo de espera entre os pulsos de  $60 \text{ s}$ . Esse tempo entre os pulsos é necessário para garantir que todos os núcleos relaxassem antes que outro pulso de relaxação atingisse o material.



**R** -  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{Cl}_2$

Figura 2.8. Espécies de silício presente na sílica.

## 2.3. Resultados e Discussão

### 2.3.1. Caracterização

#### 2.3.1.1. Espectroscopia no Infravermelho Médio

Na Figura 2.9 observa-se o espectro de absorção na região do infravermelho médio das nanopartículas de sílica. Os espectros de infravermelho das nanopartículas de sílica apresentaram modos vibracionais em 473, 798 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes às vibrações  $\delta(\text{Si-O-Si})$ ,  $\nu_s(\text{Si-OH})$  e  $\nu_s(\text{Si-O-Si})$ , respectivamente. Vibrações originárias da absorção de moléculas de água na região de 3440  $\text{cm}^{-1}$  também foram observadas. Estas vibrações indicam a presença de grupos -OH livres na superfície da sílica [68].

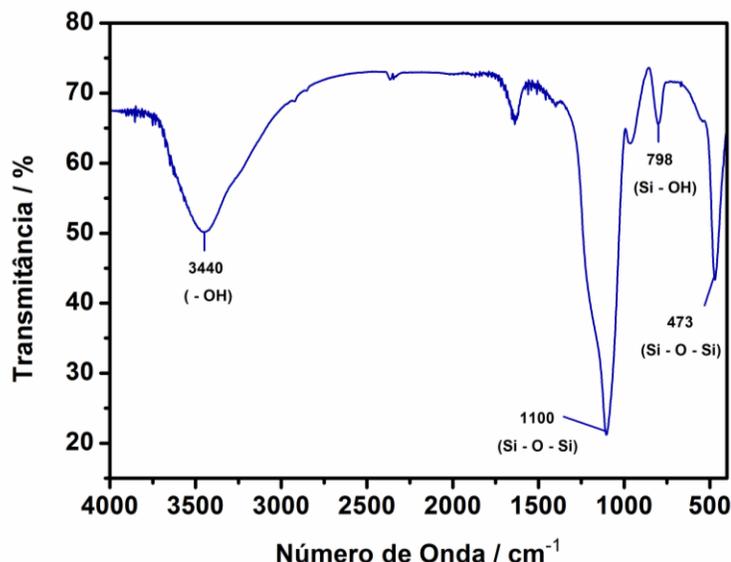


Figura 2.9. Espectro no infravermelho médio das nanopartículas de sílica

Através da espectroscopia no infravermelho médio foi possível comprovar que o método proposto e as condições experimentais utilizadas nesse trabalho, baseado na síntese de Stöber, mostrou-se eficiente para síntese de partículas de dióxido de silício, e que o número de lavagens proposto demonstrou ser suficiente para eliminação das demais espécies envolvidas na síntese e incorporadas ao produto final.

### 2.3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de $^{29}\text{Si}$

Os espectros de RMN das nanopartículas de sílica, ilustrados na Figura 2.10, mostraram a presença de sinais em -90, -100 e -110 ppm correspondente aos sítios  $Q_2$ ,  $Q_3$  e  $Q_4$ , respectivamente. Ou seja, as medidas de RMN mostram que as nanopartículas são compostas única e exclusivamente de grupos silanóis (Si-OH) e siloxanos (Si-O-Si). Também através do espectro de RMN é possível observar que as abundâncias das espécies aparecem na proporção 1:10:15, respectivamente a  $Q_2$ ,  $Q_3$  e  $Q_4$ . Essas proporções observadas através do RMN indicaram que o TEOS foi completamente hidrolisado, produzindo assim partículas compostas apenas por grupos siloxanos e grupos silanóis [68].

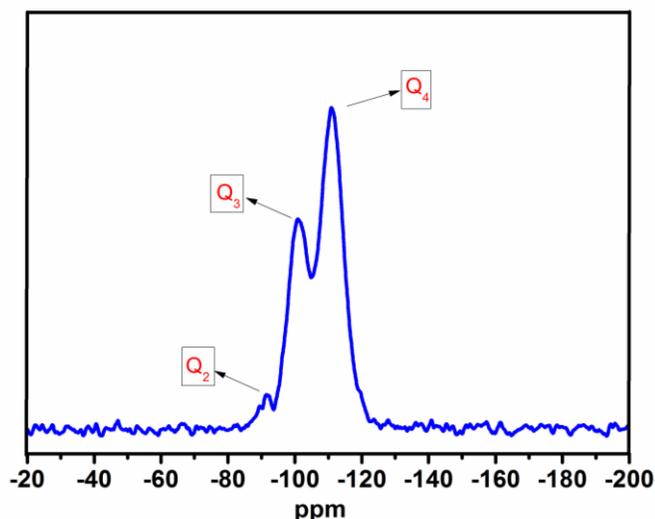


Figura 2.10. Espectros de RMN  $^{29}\text{Si}$  das nanopartículas de sílica.

## 2.3.2. Avaliação do Efeito dos Parâmetros Envolvidos na Síntese de Nanopartículas de Sílica

### 2.3.2.1. Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura no tamanho e na uniformidade das nanopartículas foi avaliado conforme descrito na seção 2.2.3.3 desta dissertação. A literatura atual indica que o efeito da temperatura no tamanho médio de partícula está relacionado com dois fatores: taxa de nucleação e tamanho crítico do núcleo. Através das medidas de DLS é

possível visualizar Na Figura 2.11 que o aumento na temperatura de reação resulta no decréscimo do tamanho de partícula.

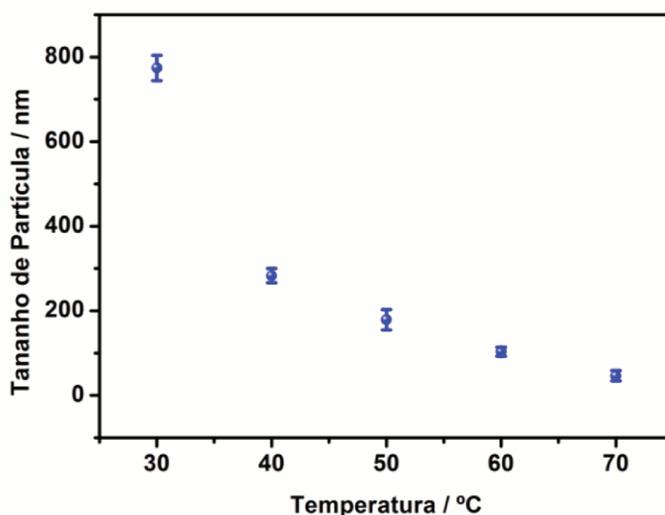


Figura 2.11. Influência da temperatura no tamanho de partícula determinados por DLS, onde é apresentado o tamanho médio e o desvio (n=2).

De acordo com a Equação 2 é possível observar que o aumento da temperatura provoca um aumento na taxa de nucleação comparado com a taxa de crescimento da partícula, conseqüentemente o tamanho médio das partículas do sistema diminui [24].

$$J = A \cdot \exp \left[ -\frac{16\pi\gamma^3 v^2}{3k^3 T^3 (\ln S)^2} \right] \quad \text{Equação (2)}$$

Onde  $J$  é a taxa de nucleação (núcleos por minuto),  $A$  é o fator pré-exponencial,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $\gamma$  é a tensão superficial,  $S$  é o grau de saturação,  $v$  o volume e  $T$  é a temperatura em Kelvin. Outro efeito da temperatura é sobre tamanho crítico da partícula. O tamanho crítico representa o tamanho mínimo no qual o núcleo se torna estável ( $r = r^*$ ). Núcleos com tamanho abaixo do tamanho crítico redissolvem-se tornando precursores para o crescimento de partículas estáveis [69]. Em temperaturas elevadas o tamanho crítico é maior, ou seja, partículas só se tornam estáveis em tamanhos maiores. Através da equação 3 e da Figura 2.12 pode-se observar a relação

do raio crítico e do  $\Delta G_v$  com a temperatura.

$$r^* = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} \quad \text{Equação (3)}$$

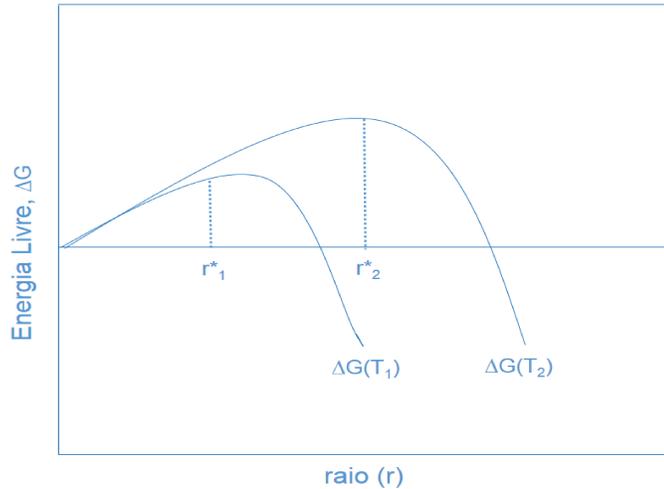


Figura 2.12. Efeito da temperatura no tamanho e energia livre de formação do núcleo crítico ( $T_1 < T_2$ ) [69].

O fato de o raio crítico ser maior em temperaturas elevadas indica que as partículas formadas inicialmente são maiores do que as sintetizadas em uma menor temperatura. Na Figura 2.13 é possível observar uma representação da formação e crescimento das nanopartículas sintetizadas em diferentes temperaturas.

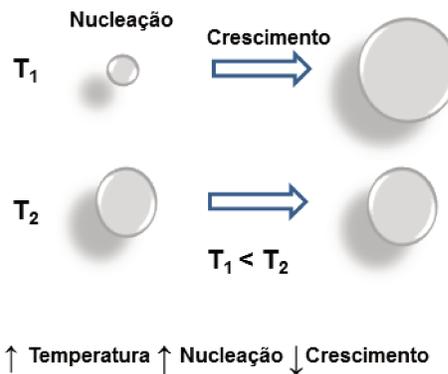


Figura 2.13. Representação da formação e crescimento das nanopartículas sintetizadas em diferentes temperaturas

Observando as consequências causadas pela variação da temperatura na síntese pode-se concluir que, em altas temperaturas as partículas iniciais formam-se com tamanho maior, contudo, por possuir uma taxa de nucleação elevada em relação à taxa de crescimento, as partículas são menores em relação às partículas sintetizadas em menor temperatura.

### 2.3.2.2. Efeito do Catalisador

A taxa de hidrólise e a condensação do TEOS em meio alcoólico ou aquoso é muito lenta. Para tornar o processo mais rápido é utilizado um catalisador ácido ou básico. Neste trabalho foi utilizado como catalisador uma solução aquosa padrão de hidróxido de amônio e a influência da sua concentração no tamanho das partículas foi avaliada como descrito na seção 2.2.3.1, onde a reação foi realizada a uma temperatura de 70 °C, variando-se a concentração de amônia, mantendo-se fixo os outros parâmetros. Observando-se a Figura 2.14, nota-se que o aumento na concentração do catalisador provoca um aumento no tamanho de partícula, sendo o meio reacional aquoso (Figura 2.14A) ou alcoólico (Figura 2.14B).

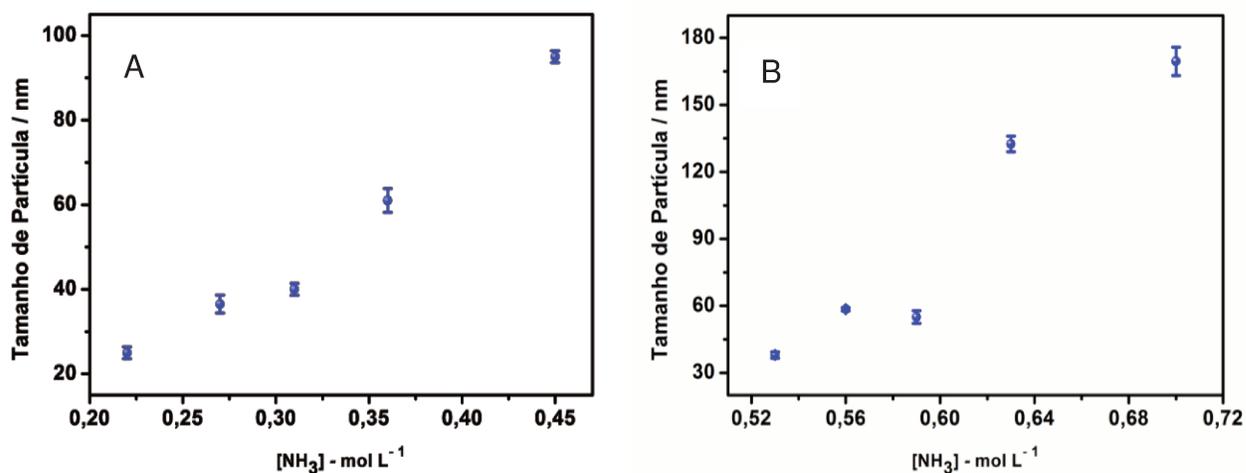


Figura 2.14. (A) Meio reacional com 38% etanol e 56% água e (B) Meio reacional com 70% etanol e 22% água (%v/v) (n=2).

Quando a concentração de amônia aumenta, as taxas de hidrólise e de condensação também aumentam. No entanto, uma vez que o sistema atinge a região

de supersaturação, a taxa de consumo do intermediário formado ( $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_{4-x}(\text{OH})_x$ ) através das reações de condensação é relativamente alta o que provavelmente reduz o período de nucleação [20,46]. Assim, o número total de núcleos formados será menor em número e o tamanho das partículas de sílica formadas será relativamente maior.

### 2.3.2.3. Efeito da Agitação

Estudos recentes demonstraram que problemas na reprodutibilidade da síntese de nanopartículas são causados principalmente pelo não controle da velocidade agitação [35]. Por esse motivo foi feito um estudo para avaliar o efeito da velocidade agitação no tamanho de partícula. Sínteses como descrito na seção 2.2.3.3 foram realizadas à temperatura de 70 °C, variando-se o grau de agitação e mantendo-se constantes os outros parâmetros. Na Figura 2.15, através das medidas de DLS é possível observar que um aumento na agitação magnética durante a síntese produz partículas com tamanho médio maior.

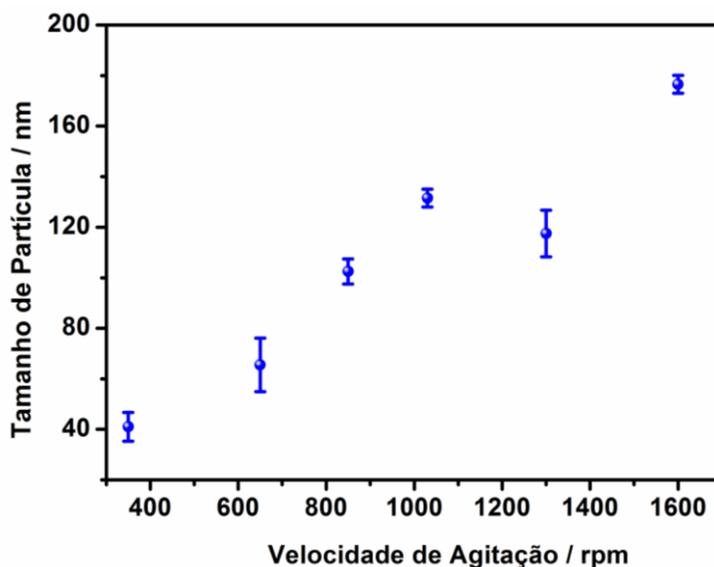


Figura 2.15. Influência da velocidade de agitação no tamanho médio de partícula a partir de medidas de DLS (n=2).

Isso ocorre, porque, em elevada agitação, aumenta-se o número de colisões mútuas entre as partículas, o que promove a coagulação das partículas, onde elevadas taxas de agitação podem ser suficiente para anular as forças de repulsão. Na Figura

2.16 é possível observar que o aumento na agitação do sistema promoveu uma maior distribuição no diâmetro de partícula, o que implica que as partículas sintetizadas em elevadas rotações não são monodispersas.

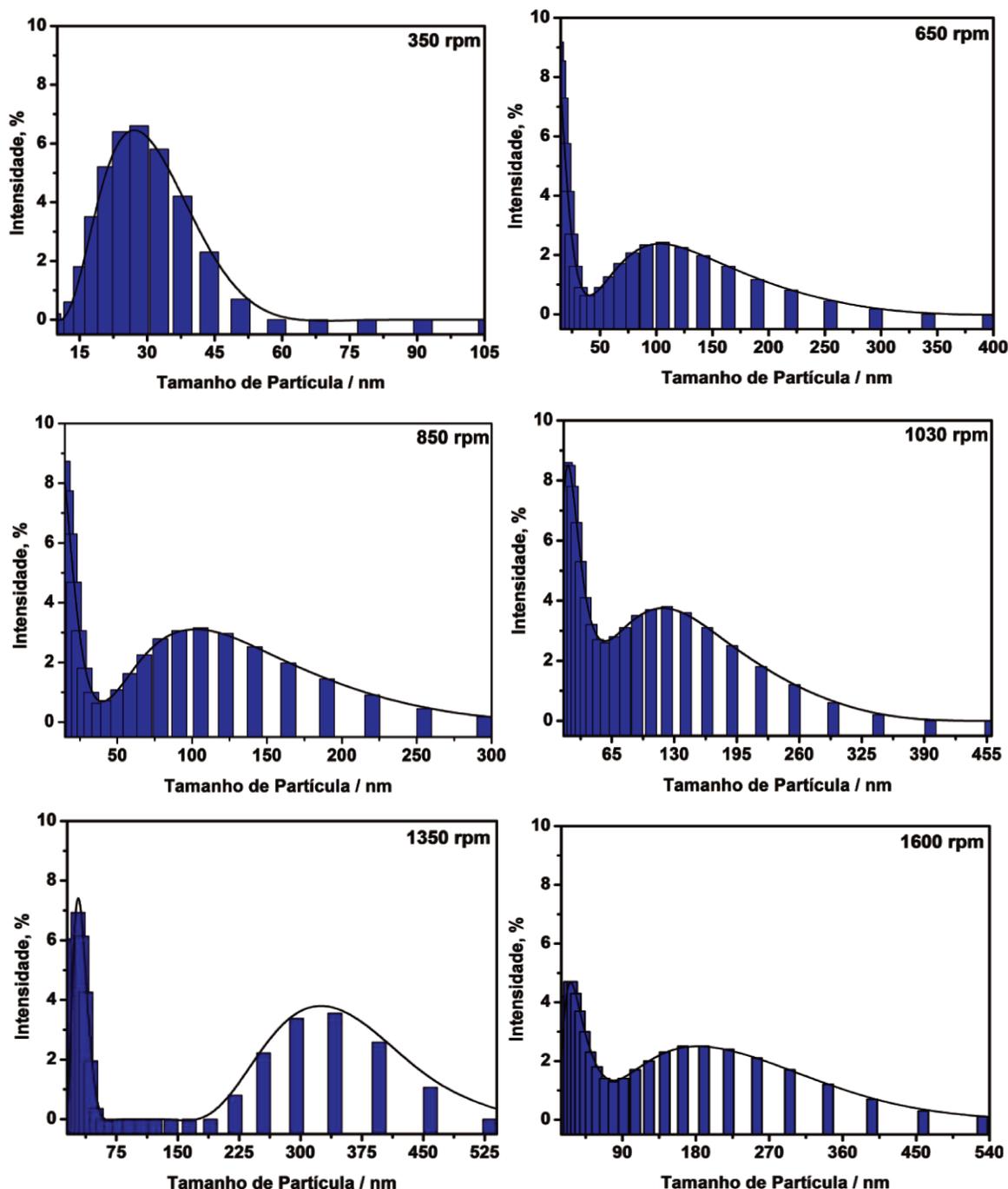


Figura 2.16. Distribuição dos tamanhos de partícula em diferentes velocidades de agitação (300 a 1600 rpm), obtidos por medidas de DLS.

#### 2.3.2.4. Efeito da Razão Molar Entre [EtOH] / [TEOS] e [H<sub>2</sub>O] / [TEOS]

Visando compreender a influência de todos os parâmetros envolvidos na síntese de nanopartículas, estudos foram realizados com objetivo de observar o efeito da variação da razão entre [EtOH] / [TEOS] e [H<sub>2</sub>O] / [TEOS], sobre o tamanho médio das partículas em meio alcalino. A adição de um solvente orgânico no processo sol-gel torna-se necessário devido aos reagentes utilizados (água e TEOS) serem imiscíveis. Na Figura 2.17A verifica-se a influência da razão [H<sub>2</sub>O] / [TEOS] no tamanho médio das nanopartículas. Este resultado segue uma tendência similar à concentração da amônia, isto é, o tamanho de partícula aumenta com o aumento da razão [H<sub>2</sub>O] / [TEOS]. Tal fenômeno ocorre porque o aumento do valor de R produz um aumento da taxa de hidrólise, fazendo com que a hidrólise dos monômeros seja mais completa antes que ocorra condensação significativa [70], resultando em tempos de gelificação baixos. É possível que exista um valor limite, porém não conhecido, para o qual o aumento da razão [H<sub>2</sub>O] / [TEOS] não provoque o aumento no tamanho médio de partícula, Isso porque as taxas de hidrólise e condensação são diretamente proporcionais à concentração dos reagentes, sendo limitadas pelo reagente em menor quantidade. Sínteses utilizando altas concentrações de água são limitadas pela quantidade de TEOS na mistura.

Na Figura 2.17B é possível observar que o aumento razão [EtOH] / [TEOS] provoca uma diminuição no tamanho médio de partícula. Tal fenômeno pode ser explicado de duas formas : a primeira é que o aumento do etanol diminui a tendência de aglomeração das partículas. A segunda é que um aumento no valor de R implica a diminuição da concentração de TEOS no sistema, conseqüentemente reduz as velocidades de hidrólise e condensação, o que resulta em um crescimento de partículas mais lento, produzindo um sistema com nanopartículas de tamanho médio menor.

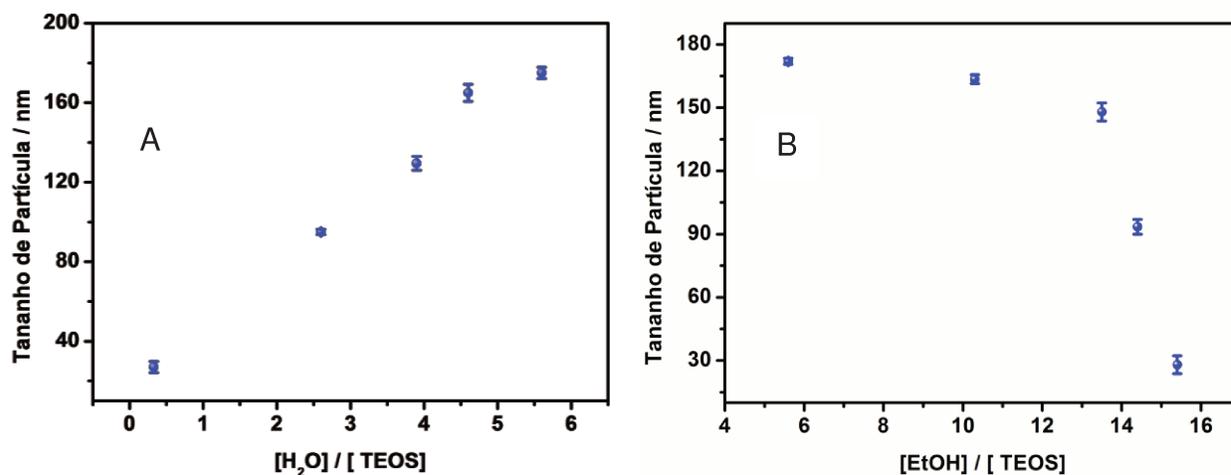
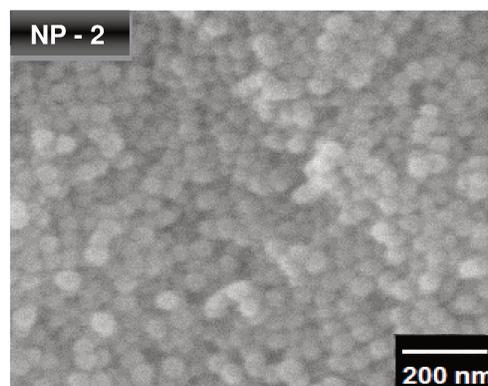
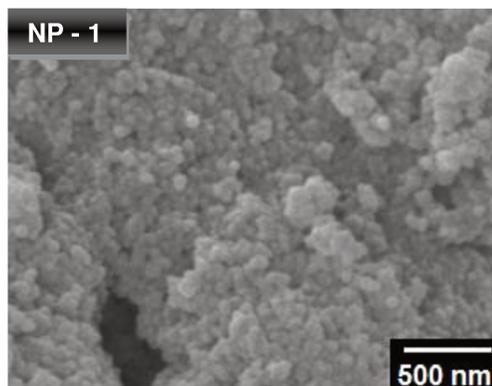


Figura 2.17. Influência da Razão R=  $[H_2O] / [TEOS]$  e (B) Razão R=  $[EtOH] / [TEOS]$  sobre o tamanho de partícula.

### 2.3.2.5. Morfologia e Tamanho Médio de Partícula

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e do espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi possível observar a morfologia, agregação e uniformidade das nanopartículas. As imagens de microscopia eletrônica de varredura e os gráficos de espalhamento de luz, das nanopartículas de sílica sintetizadas em meio aquoso (NP - 1 a NP - 5), e em meio alcoólico (NP - 6 a NP - 10), ilustradas nas Figura 2.18 e Figura 2.19, respectivamente, demonstraram que a concentração de amônia desempenha um papel importante na característica final das nanopartículas.



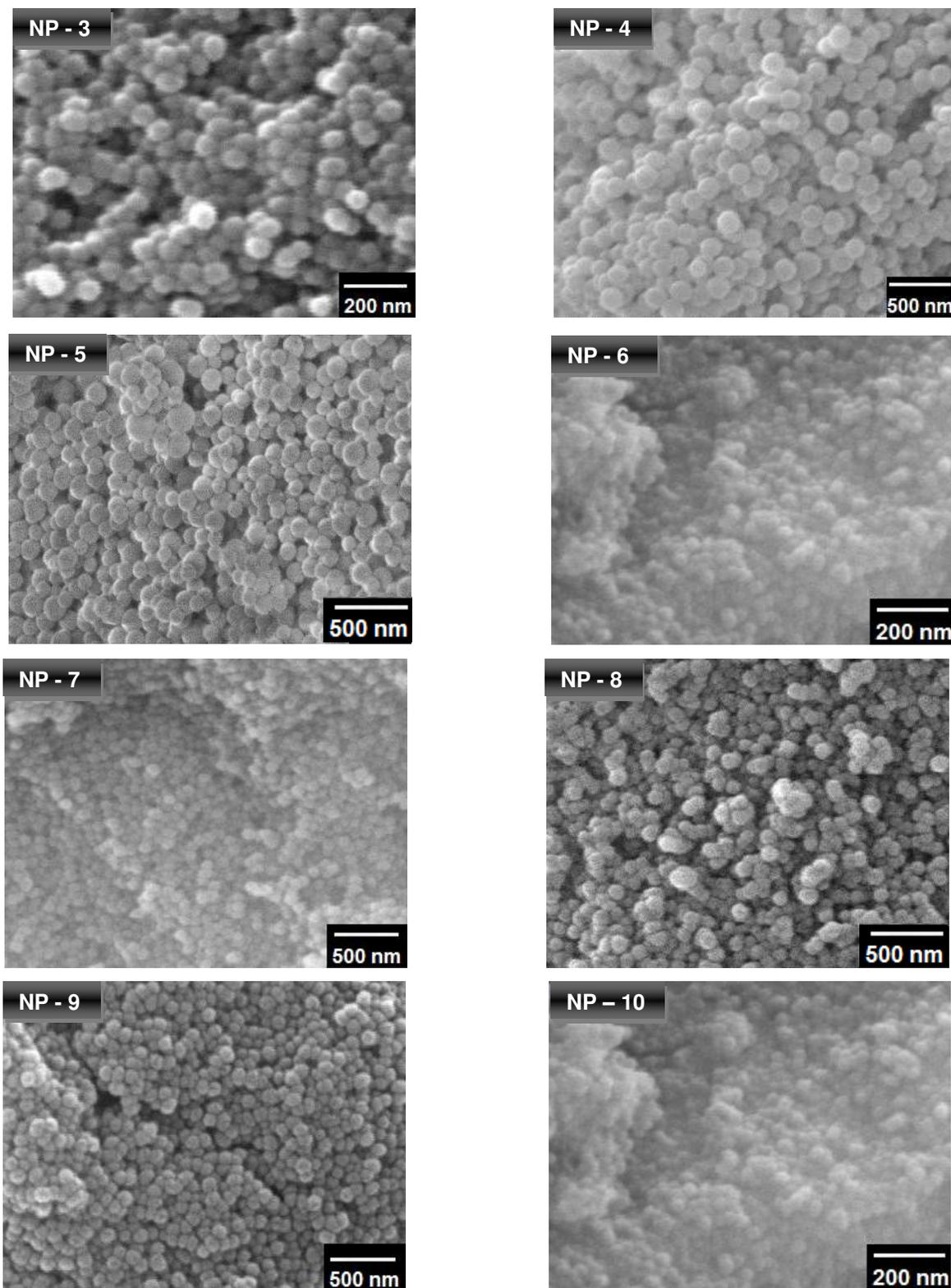
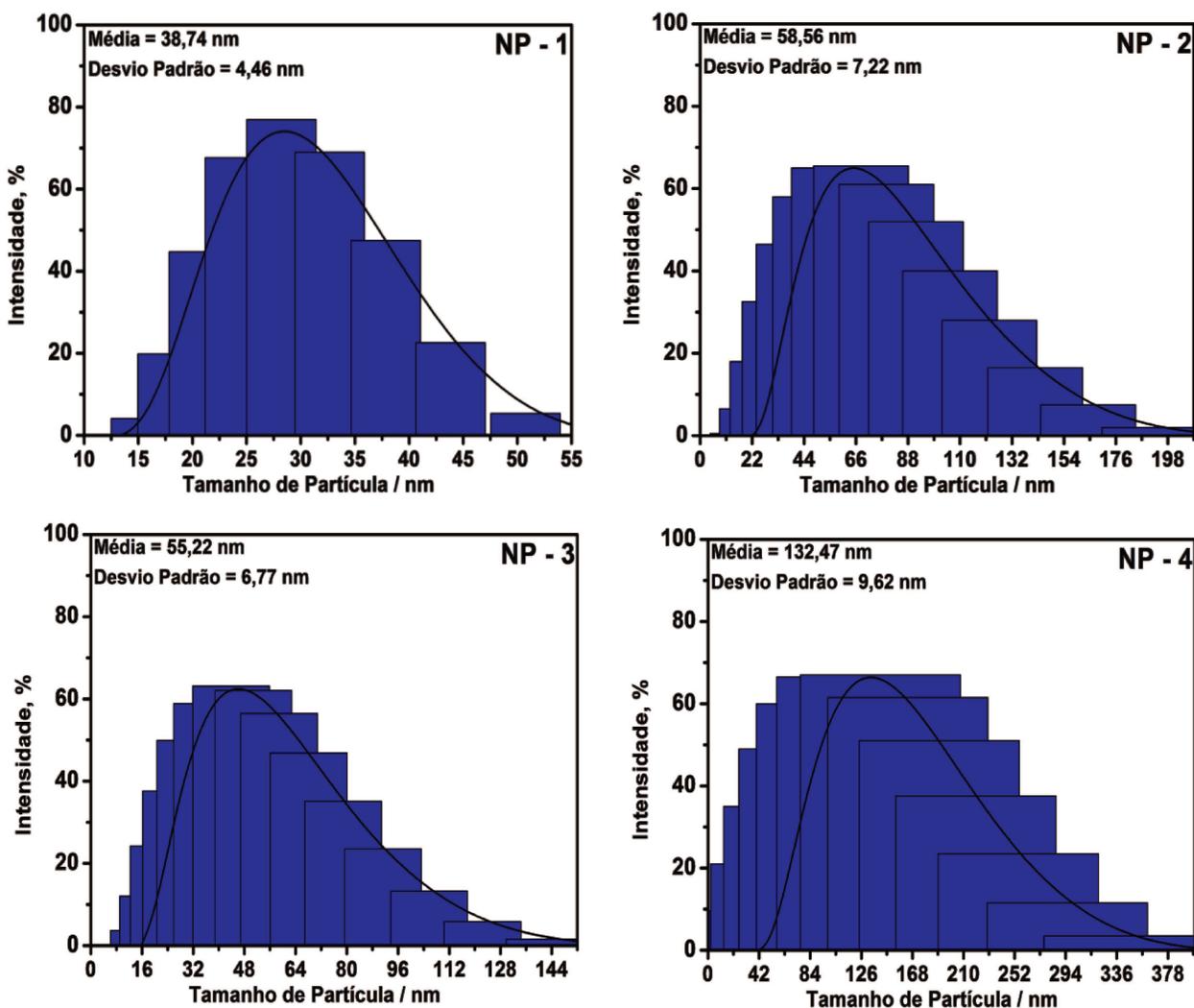


Figura 2.18. Micrografias das nanopartículas de sílica (pó) obtidas por microscopia eletrônica de varredura

Nas micrografias é possível observar a tendência geral das partículas menores em agregar mais do que as partículas maiores, resultando em um sistema com partículas com alto grau de deformação em relação às formas esféricas iniciais (suspensão em água). Em consequência disso, as imagens originadas da micrografia, sendo de difícil compreensão, tornando-se incerto a determinação do tamanho médio de partícula unicamente por MEV. Diferentemente das micrografias, as medidas de tamanho de partícula em suspensão por DLS (Figura 2.19) demonstraram que as condições experimentais de síntese utilizadas nessa dissertação foram capazes de produzir nanopartículas monodispersas na faixa de 24 a 173 nm.



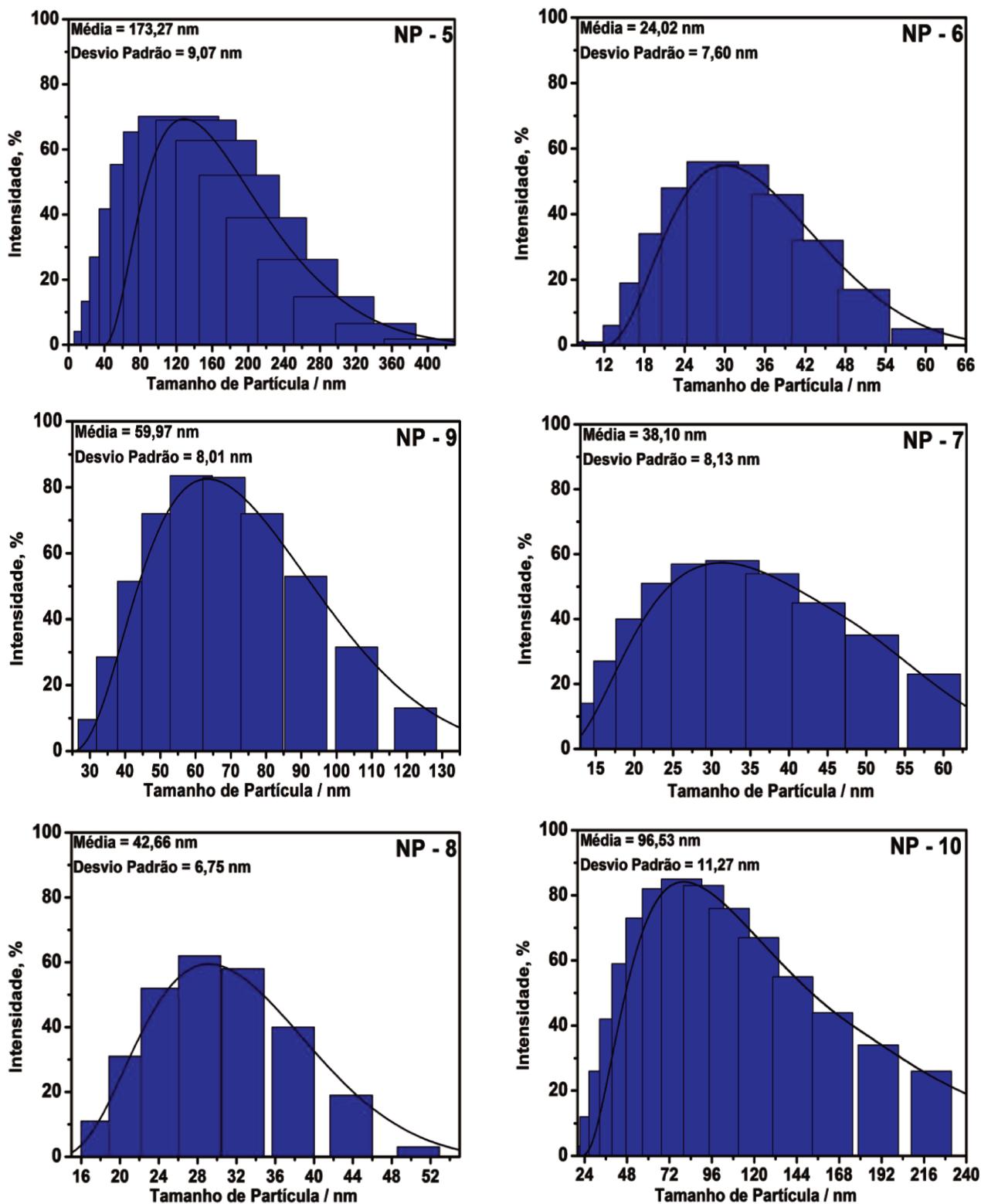


Figura 2.19. Medidas de tamanho das NPs em suspensão obtidas por DLS.

Na Tabela 2-3 encontram-se os valores de tamanho médio das nanopartículas e área superficial obtidos através do espalhamento dinâmico de luz e isoterma de adsorção, respectivamente. Os resultados apresentaram uma relação entre o tamanho de partícula e a área superficial, onde partículas menos tendem a possuir uma maior área superficial.

Tabela 2-3. Valores de tamanho médio e área superficial das nanopartículas de sílica.

<b>Amostra</b>	<b>Tamanho Médio (nm)</b>	<b>Área Superficial (m<sup>2</sup>/g)</b>
<b>NP – 1</b>	38	<b>137</b>
<b>NP – 2</b>	58	<b>166</b>
<b>NP – 3</b>	55	<b>154</b>
<b>NP – 4</b>	132	<b>83</b>
<b>NP – 5</b>	173	<b>50</b>
<b>NP – 6</b>	24	<b>424</b>
<b>NP – 7</b>	38	<b>268</b>
<b>NP – 8</b>	42	<b>149</b>
<b>NP – 9</b>	59	<b>182</b>
<b>NP – 10</b>	96	<b>119</b>

As propriedades de porosidade foram avaliadas através de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>. Através das isotermas (Figura 2.20) foi possível observar que partículas sintetizadas com altas concentrações de catalisador (0,53 a 0,70 mol/L) não apresenta porosidade estrutural, apresentando apenas porosidade de agregação (Figura 2.20A). O volume médio de poro e o diâmetro médio de poro para essas partículas foram 0,364cm<sup>3</sup>/g e 29,291 nm, respectivamente. Já as partículas sintetizadas com baixas concentrações de catalisador (0,22 a 0,45 mol/L) são porosas (Mesoporosa), apresentando volume médio de poro e diâmetro de poro 0,570 cm<sup>3</sup>/g e 4,673 nm

(Figura 2.20B). Embora as partículas produzidas com elevadas concentrações do catalisador não apresentem porosidade estrutural, observa-se que o diâmetro de poro dessas partículas é maior do que as partículas porosas (baixa concentração do catalisador). Isso ocorre porque as partículas esféricas ao aglomerarem deixam espaços vazios entre cada partícula esférica (porosidade de aglomeração), onde durante a isoterma de adsorção fica gás adsorvido.

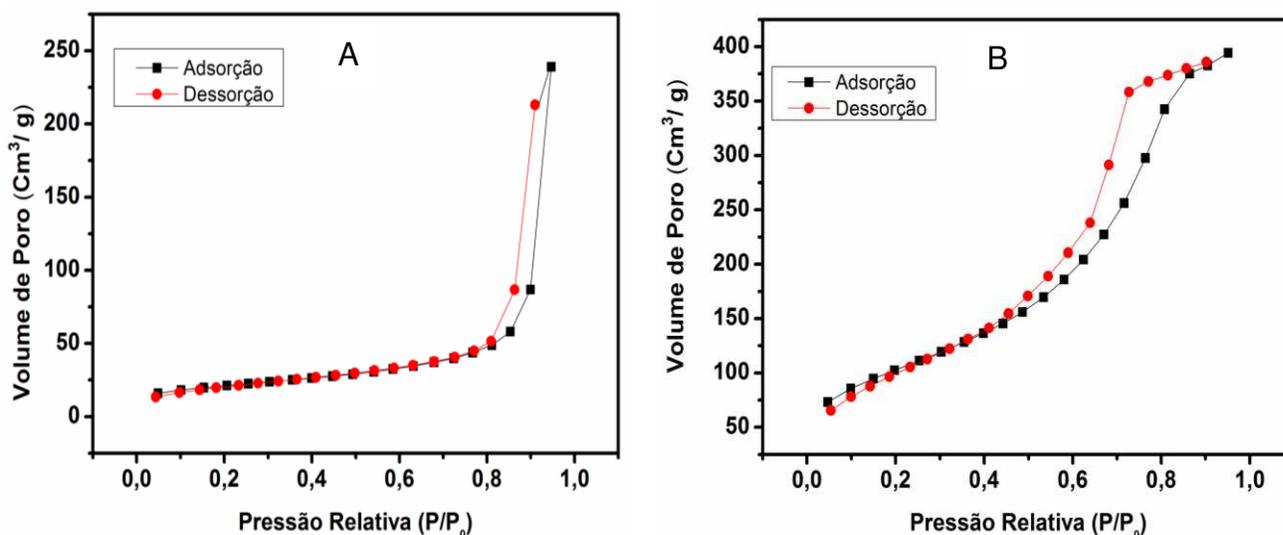


Figura 2.20. Isotherma de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> nas nanopartículas de sílica. (A) Isotherma das nanopartículas sem porosidade estrutural e (B) Isotherma das nanopartículas mesoporosas.

### 2.3.2.6. Análise dos Dados do Planejamento Experimental

A otimização da síntese de nanopartículas baseado no método de Stöber pode promover um melhor controle de tamanho e uniformidade das partículas. A Figura 2.21 mostra os valores padronizados para cada efeito. Os efeitos relacionados com a amônia, TEOS, água e etanol são chamados de efeitos primeira ordem. Os efeitos relacionados às interações entre as variáveis são chamados de efeitos de interação.

Através dos resultados obtidos pelo planejamento experimental foi possível observar que a amônia é a variável mais influente no tamanho médio final de partícula. Assim como já descrito nos itens 2.2.3.1 e 2.2.3.2, o gráfico de Pareto mostra que o

aumento das concentrações de água, amônia e TEOS provoca um aumento no tamanho médio das nanopartículas. A concentração de etanol apresentou apenas efeitos significativos de interação de segunda ordem. Através dos efeitos significativos para o etanol, observar-se que o aumento do etanol promove uma diminuição no tamanho médio de partícula, reforçando as informações obtidas no item 2.2.3.2.

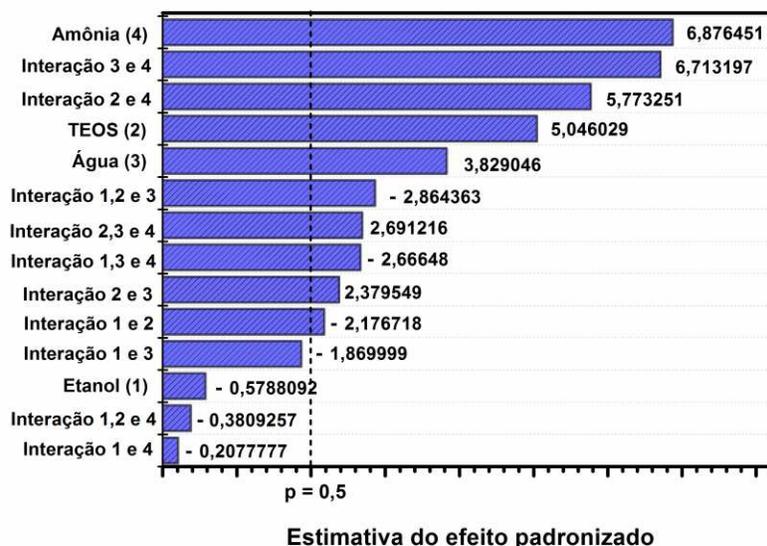


Figura 2.21. Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos de cada reagente envolvido na síntese de nanopartículas.

Na Equação 4 são apresentados apenas os coeficientes significativos do modelo obtido para o planejamento fatorial. As variáveis etanol, TEOS, água e amônia são representadas pelas variáveis codificadas  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ , e  $x_4$ , respectivamente.

$$Y = 23,39 + 6,37 x_2 + 4,84 x_3 + 8,69 x_4 - 2,75 x_1x_2 - 2,36 x_1x_3 + 3,01 x_2x_3 + 7,29 x_2x_4 + 8,48 x_3x_4 - 3,62 x_1x_2x_3 - 3,37 x_1x_3x_4 + 3,40 x_2x_3x_4 \quad \text{Equação (4)}$$

Através da Equação (4) foi possível calcular o tamanho de partícula para cada ponto do planejamento e, então, comparar os valores previstos com os valores obtidos experimentalmente, sendo possível avaliar o erro ou resíduo. Os valores de tamanho de partícula previstos e os seus respectivos resíduos, em termos absolutos e em porcentagens, são apresentados na Tabela 2-4. É possível observar que quanto menor o tamanho de partícula, maior o erro de previsão do modelo. Uma vez que todos os

valores previstos são possíveis de se alcançar experimentalmente, conclui-se que o modelo não apresenta nenhuma condição limitante.

Tabela 2-4. Valores preditos pelo modelo e resíduos de cada combinação experimental.

Ensaio	Fatores				Tamanho Médio de Partícula (nm)	Tamanho Previsto de Partícula (nm)	Resíduo	
	E1	E2	E3	E4			(nm)	(%)
1	-1	-1	-1	-1	17,15	20,75	3,60	21,0
2	1	-1	-1	-1	20,60	16,99	-3,61	-17,5
3	-1	1	-1	-1	23,50	17,95	-5,55	-23,6
4	1	1	-1	-1	12,10	17,67	5,57	46,0
5	-1	-1	1	-1	11,50	4,99	-6,51	-56,6
6	1	-1	1	-1	13,20	19,75	6,55	49,6
7	-1	1	1	-1	10,50	15,11	4,61	43,9
8	1	1	1	-1	9,00	4,39	-4,61	-51,2
9	-1	-1	-1	1	11,70	6,65	-5,05	-43,2
10	1	-1	-1	1	11,30	16,37	5,07	44,9
11	-1	1	-1	1	15,30	19,41	4,11	26,9
12	1	1	-1	1	36,75	32,61	-4,14	-11,3
13	-1	-1	1	1	19,60	24,69	5,09	26,0
14	1	-1	1	1	31,05	25,97	-5,08	-16,4
15	-1	1	1	1	83,60	77,57	-6,03	-7,2
16	1	1	1	1	47,35	53,37	6,02	12,7

Na Figura 2.22 é possível observar a relação dos valores previstos pelo modelo versus os valores medidos. É possível observar também que os resíduos se distribuem aleatoriamente. Os valores estimados apresentaram desvios positivos e negativos, sendo os maiores desvios negativos (~60 %) apresentados em partículas com tamanhos médio entre 9 e 12 nm. O erro experimental apresentado foi considerado

baixo (0,25%), mostrando que as condições experimentais permitiram a síntese de forma reprodutível,

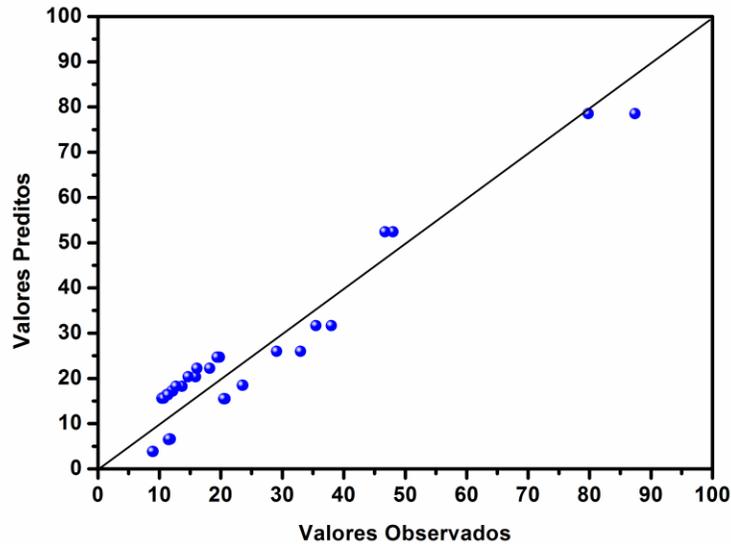


Figura 2.22. Diâmetro de partícula medido *versus* previsto.

A partir dos valores previstos pelo modelo e seus resíduos, calculou-se as somas quadráticas da regressão e dos resíduos, Esses resultados são apresentados na Tabela 2-5.

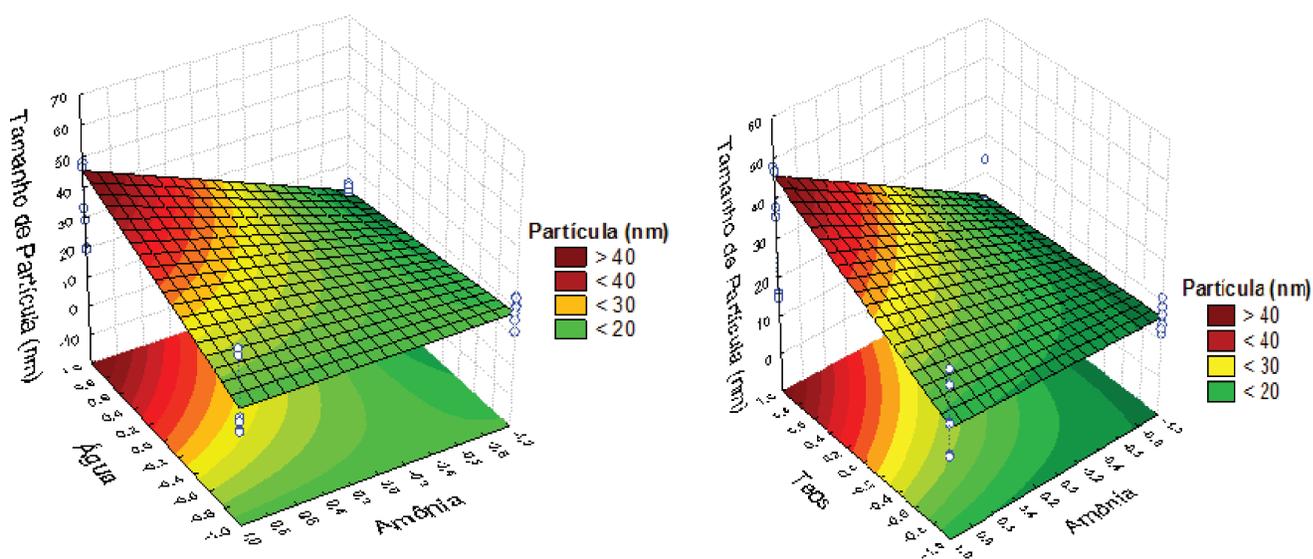
Tabela 2-5. Análise da variância (ANOVA)

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>
<b>Modelo</b>	10357,30	14	739,80
<b>Resíduo</b>	868,28	17	51,075
<b>Total</b>	11225,58	31	

Através da análise da variância, onde se dividiu a soma quadrática do modelo pela soma quadrática total, foi possível obter um  $R^2$  de 0,9226, o que significa que aproximadamente 92% da variância do sistema é explicada pelo modelo e os 8 % restantes são atribuídos aos resíduos. A avaliação do ajuste do modelo foi feita através

do teste F, no qual comparou-se o valor de F calculado ( $F_{cal}$ ) a partir da razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos como valor de F tabelado ( $F_{tab}$ ) para 14 e 17 graus de liberdade, a um nível de confiança de 95% confiança, é de 2,33, Uma vez que o valor de  $F_{cal}$  (14,48) é maior do que o valor  $F_{tab}$  tabelado, pode-se afirmar que a regressão é estatisticamente significativa,

Através do modelo obtido pelo planejamento experimental foi possível construir superfícies de resposta para as variáveis amônia, TEOS e água. Analisando-se as superfícies de resposta das Figura 2.23A e Figura 2.23B, observa-se que a influência das variáveis só ocorre em condições específicas. Isso ocorre porque não há uma variação estatisticamente significativa da resposta com a mudança no decorrer do nível. Por exemplo, nas Figura 2.23A e Figura 2.23B, a variação do TEOS não promove uma variação estatisticamente significativa da resposta quando se tem um nível inferior da amônia. No entanto, através da Figura 2.23C é possível verificar que a variação da quantidade de água promove uma variação significativa no tamanho médio de partícula independentemente do nível das outras variáveis.



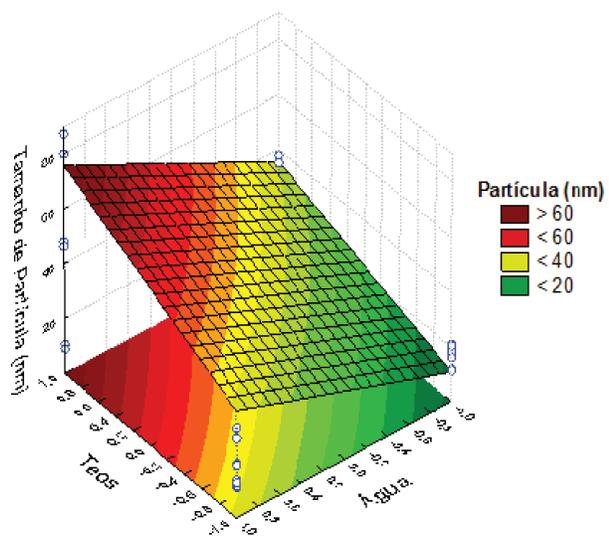


Figura 2.23. Gráficos de superfície obtidos a partir do planejamento fatorial  $2^4$ .

## **CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento de Nanossensores Fluorescentes Reutilizáveis**



## 3.1. Introdução

### 3.1.1. Sensores Químicos

Um sensor químico foi definido pela IUPAC (1991) como sendo um dispositivo que transforma a informação química, tanto relativa à concentração de um componente específico da amostra como de sua composição total, em um sinal analiticamente utilizável [71]. Essa definição é bastante geral, no entanto, existem outras definições na literatura. Por exemplo, Hulanicki (1989) definiu sensor como sendo um transdutor miniaturizado que responde seletiva e reversivelmente a compostos químicos ou íons, produzindo um sinal elétrico que depende da concentração [72]. Estes sistemas contêm duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor. O receptor é definido como unidade onde a informação química é transformada em uma forma de energia que pode ser medida pelo transdutor e o transdutor é definido como o dispositivo que transforma a energia, com a informação química da amostra, em um sinal analítico utilizável [72,73].

O receptor dos sensores químicos pode se basear em diferentes princípios, tais como: físicos, químicos e bioquímicos. Os receptores físicos são aqueles em que não ocorre reação química no reconhecimento molecular. Os receptores químicos são aqueles que o sinal analítico decorre de uma reação química e, por fim, os receptores bioquímicos que tem como fonte de sinal um processo bioquímico [72].

Os sensores químicos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de transdução [74], sendo atualmente conhecido 4 tipos principais:

- 1) Sensores ópticos baseiam-se na medida das propriedades ópticas do analito ou nas propriedades resultantes das interações do analito com o receptor (absorbância, reflectância, fluorescência, índice de refração e espalhamento de luz).
- 2) Sensores eletroquímicos baseiam-se na medida do potencial ou corrente elétrica gerada entre eletrodos diferentes na presença do analito (voltamétricos e potenciométricos e condutimétricos).

3) Sensores piezoelétricos envolvem a geração de corrente elétrica a partir de um cristal piezoelétrico em vibração (sensíveis a massa)

4) Sensores térmicos baseiam-se na medida de calor envolvido em uma reação química, na qual participa o analito de interesse.

Assim como vários outros dispositivos tecnológicos, sensores possuem parâmetros específicos que os caracterizam. As principais características que determinam a qualidade do sensor são sensibilidade, seletividade, tempo de resposta exatidão e precisão. Além desses parâmetros, um sensor químico possui como características importantes o baixo tempo de resposta e de recuperação, pequena dimensão, baixo consumo de energia e boa estabilidade térmica e química.

### **3.1.1.1. Sensores Químicos Ópticos**

Os primeiros sensores ópticos datam de 1930, quando Kautsky e Hirsch propuseram um método para o monitoramento contínuo de oxigênio em baixas concentrações, baseado na supressão de fluorescência da triploflavina e fluoresceína immobilizadas em sílica gel [75]. Os sensores ópticos baseiam-se na medida das propriedades ópticas do analito ou das propriedades decorrentes da interação deste com um receptor [76]. Esses sensores podem ser divididos de acordo com a propriedade óptica aplicada (absorbância, reflectância, fluorescência, índice de refração e espalhamento de luz). Diversos sensores ópticos têm sido desenvolvidos através da imobilização de um dado reagente com propriedades ópticas bem definidas, em uma matriz porosa fotoestável [48,77]. Os sensores ópticos possuem diversas vantagens com relação aos sensores com outros modos de transdução, essas vantagens são [78–80]:

- Não sofrem interferências elétricas ou magnéticas.
- Permite, através de fibras ópticas, a transmissão de sinais ópticos a longa distância.
- Determinações em tempo real.
- Determinações simultâneas de mais de uma espécie.

A forma na qual o sensor óptico interage com o analito vem sendo explorada por diversos pesquisadores, de modo que os mesmos podem interagir de forma reversível ou irreversível com o analito. Por exemplo, um reagente fluorescente imobilizado pode mudar de cor ao interagir com o analito e voltar para coloração inicial, através do deslocamento do equilíbrio entre o reagente imobilizado e o analito (reversível) e, assim, pode ser reutilizado. No entanto, se ocorrer uma reação irreversível entre o reagente imobilizado e o analito, o sensor, independentemente da cinética de reação, torna-se descartável. Os sensores irreversíveis, quando comparados aos reversíveis, podem ser extremamente sensíveis e permitem determinar um maior número de espécies. A literatura descreve, embora que timidamente, trabalhos direcionados ao desenvolvimento de sensores fluorescentes reutilizáveis para detecção de íons metálicos [18,19,81], porém não apresentaram resultados satisfatórios, o que evidencia que a reutilização desses materiais ainda se encontra em fase de consolidação.

### 3.1.2. Espectroscopia de Luminescência

Luminescência é o fenômeno de emissão de fótons nas regiões do ultravioleta, visível ou infravermelho a partir da relaxação de uma espécie excitada. Pode ser dividida em duas categorias: fluorescência ou fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. A fluorescência molecular é medida excitando-se a amostra no comprimento de onda de absorção, também conhecido como comprimento de onda de excitação, e medindo-se a emissão a um comprimento de onda maior, denominado comprimento de onda de fluorescência.

Qualquer processo que promova a diminuição da intensidade de fluorescência de um fluoróforo é chamado de supressão. Os dois tipos de supressão são a estática e a dinâmica (colisional) e ambos requerem contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. Na supressão estática o supressor e o fluoróforo, no estado fundamental, formam um complexo não fluorescente. Já na supressão dinâmica ocorrem colisões entre a espécie excitada e o supressor [82]. A razão entre a intensidade de fluorescência inicial do nanossensor ( $I_0$ ) e a intensidade após o efeito de supressão

(*I*) é diretamente proporcional à concentração do supressor. A supressão colisional da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer (equação 5):

Equação (5)

$$\frac{I_0}{I} = 1 + kt[Q] = 1 + K_D[Q]$$

Onde, *k* é a constante de supressão bimolecular, *t* é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor e [Q] é a concentração do supressor. A constante de supressão de Stern-Volmer (*K<sub>D</sub>*) é dada pelo produto *kt* [83]. Pela equação de Stern-Volmer é possível observar que a relação entre *I<sub>0</sub>/I* (efeito de supressão) é diretamente proporcional à concentração do supressor [Q]. Através dessa relação, pode-se construir curvas analíticas e, conseqüentemente quantificar espécies através do efeito de supressão de fluorescência [84].

### 3.1.2.1. Rodamina B

As rodaminas (B, 6G e 123) e seus derivados são corantes muito utilizados em microscopia de fluorescência e são candidatos a serem utilizados na construção de nanossensores fluorescente para determinação de íons metálicos, devido ao seu alto rendimento quântico de emissão. Para a rodamina B, esta propriedade tem o valor de 0,70 na forma zwitteriônica (RB<sup>±</sup>) e 0,53 na catiônica (RBH<sup>+</sup>), ambas em etanol (Figura 3.1) [85]. Além das duas formas iônicas a rodamina B pode formar dímeros (tipos H e J), sendo que o dímero H não apresenta fluorescência. Alguns fatores como temperatura, pH, formação de dímeros e a concentração afetam o rendimento quântico da rodamina B [86–89]. O rendimento quântico de uma solução concentrada de rodamina B em etanol, pode ser afetada pelo fenômeno de auto absorção. Nesse fenômeno, a intensidade de fluorescência diminui porque ao atravessar a solução, a radiação é absorvida por outras moléculas de rodamina B presentes em solução.

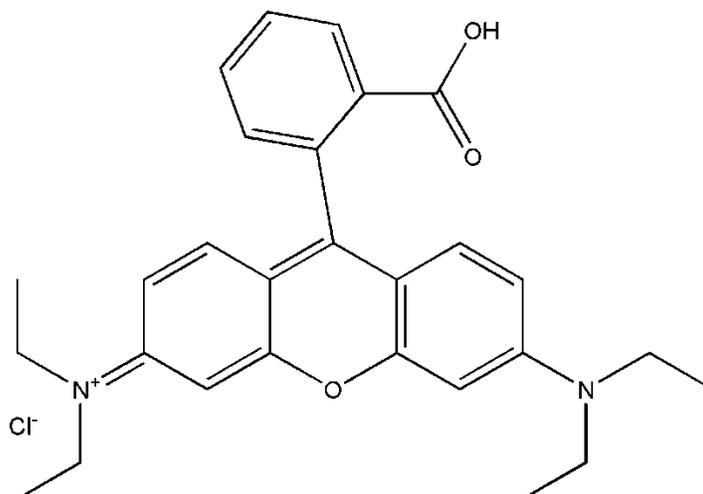


Figura 3.1. Estrutura molecular da rodamina B (forma catiônica).

A forma estrutural na qual a rodamina se encontra depende diretamente do pH, de modo que é possível a obtenção da forma zwitteriônica em soluções básicas e da forma catiônica em soluções ácidas, o que torna possível uma manipulação do corante para uma aplicação específica. A Figura 3.2 apresenta espectros 3D de emissão e excitação para uma solução a  $10^{-5}$  mol / L de rodamina B em etanol [90–92].

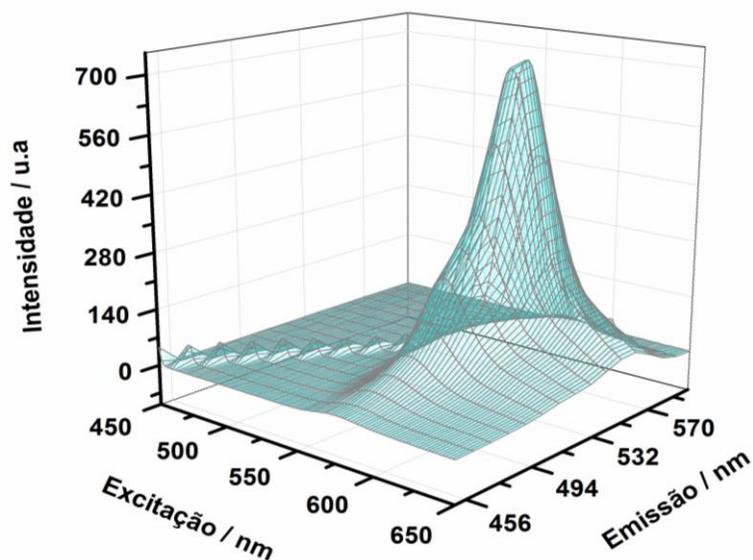


Figura 3.2. Espectro 3D de excitação (535 nm) e de emissão (573 nm) de uma solução a  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de rodamina B em etanol.

### 3.1.3. Nanossensores Fluorescentes

Nos últimos anos, a busca por métodos analíticos alternativos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. Em particular, a necessidade de métodos rápidos, versáteis, confiáveis, capazes de monitorar em tempo real espécies de interesse ambiental, industrial e biológico tem incrementado o desenvolvimento e o uso de sensores químicos, tanto eletroquímicos como ópticos, uma vez que agregam vários dos requisitos citados anteriormente [93].

As nanopartículas associadas à espectroscopia de fluorescência têm levado à produção de uma classe de sensores denominada de nanossensores fluorescentes [64,94–96]. Estes nanossensores têm sido aplicados em muitas áreas, tais como monitoramento ambiental, controle de processo, análise de alimentos e bebidas [97,98]. Nos últimos anos, estes sensores têm apresentado um rápido desenvolvimento nos campos da biologia e da medicina e muitas dessas aplicações são baseadas em suas propriedades magnéticas, ópticas e eletroquímicas [98].

Muitas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de nanossensores. Uma destas estratégias é conhecida como DDSN (do inglês, Dye-Doped Silica Nanoparticle) [99], a qual consiste na imobilização de reagentes luminescentes na matriz de sílica por encapsulamento [100]. O primeiro relato sobre a preparação de DDSNs foi publicado apenas em 1992 quando Van Blaaderen e Van Geest doparam uma nanoesfera de sílica com um derivado da fluoresceína por meio de ligações covalentes [101]. Desde então, moléculas orgânicas e inorgânicas têm sido imobilizadas em matrizes de sílica para formar nanopartículas com excelentes propriedades ópticas, como fotoestabilidade e elevada intensidade de fluorescência.

O sucesso da funcionalização depende fundamentalmente do tipo de suporte sólido empregado. Neste caso, a sílica desempenha excelente função, pois apresenta propriedades desejáveis como resistência mecânica, estabilidade térmica, elevada área superficial, inércia química, além de ser relativamente barata [102,103]. Pelas características anteriormente mencionadas, as nanopartículas de sílica se aproximam do suporte ideal para o desenvolvimento de nanossensores optoquímicos. Ainda, a sílica pode ser preparada pelo processo sol-gel de forma a ter

transparência para uma vasta gama do espectro UV-visível e porosidade controlada, permitindo que os reagentes imobilizados se mantenham firmemente retidos na matriz mas, contudo, expostos à interação com as moléculas ou íons de interesse da amostra que se possam difundir para o interior dos poros. A fácil manipulação das propriedades físico-químicas dos materiais sol-gel permite, por variação das condições reacionais, otimizar o desempenho (estabilidade, reversibilidade, tempo de resposta e seletividade) do nanossensor desenvolvido.

Um nanossensor fluorescente é constituído por duas unidades: um receptor que é responsável pelo reconhecimento do analito e um fluoróforo responsável pela geração do sinal analítico [104]. Em alguns casos o receptor e o fluoróforo são um só, ou seja, o mesmo componente que reconhece o analito promove o sinal analítico [105]. Um sensor químico fluorescente tem dois modos de ação. Um ocorre com o surgimento de uma emissão fluorescência na presença do analito (sensor químico modo off-on), e o outro ocorre devido à redução da fluorescência pela presença do analito (sensor químico modo on-off). Uma das vantagens de combinar as nanopartículas de sílica com a espectroscopia de fluorescência está na alta sensibilidade da técnica. Na Figura 3.3 é possível observar o esquema de um nanossensor químico fluorescente, onde o modo de ação off-on é observado.

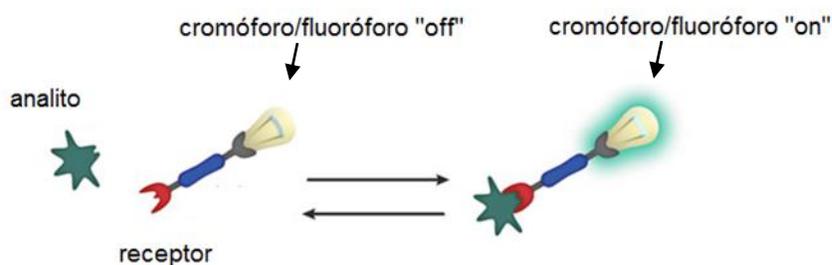


Figura 3.3. Representação esquemática de um nanossensor fluorescente (adaptado de Bonnacchi et al. 2011).

### 3.1.3.1. Nanossensores Fluorescentes Reutilizáveis

Os nanossensores fluorescentes têm sido utilizados para determinação de íons metálicos (por exemplo, Cu, Zn, Al) em meio aquoso [106–109]. No entanto, como já descrito nesse trabalho, o desenvolvimento dos nanossensores fluorescentes reutilizáveis está em fase de consolidação. Isso porque esses sensores

reutilizáveis desenvolvidos têm apresentado problemas, tais como perda de sensibilidade, perda de seletividade e aumento no tempo de resposta [110,111]. Outros problemas relacionados a esse tipo de nanossensor estão associados ao processo de regeneração do nanossensor, onde algumas etapas são complexas e demoradas [112,113]. De forma geral, a reutilização dos nanossensores depende de dois fatores fundamentais: um é a regeneração do sinal analítico e o outro é a recuperação das nanopartículas. Essas etapas dependem da lavagem, da centrifugação e da secagem, onde a lavagem tem por objetivo a regeneração do sinal analítico (remoção do analito) e a centrifugação, a recuperação do material. Em alguns trabalhos a regeneração do sinal analítico é realizada com sucesso, no entanto, a recuperação das nanopartículas não é possível, o que impossibilita a reutilização desse nanossensor para determinação do analito em outra amostra [92,114].

### **3.1.3.2. Química do Cobre**

O cobre é um elemento essencial aos organismos vivos, sua deficiência provoca algumas doenças como a anemia e a neutropenia [115]. Por outro lado, altas concentrações de cobre são extremamente tóxicas, o que contribui para o surgimento de algumas doenças como Alzheimer ou doença de Wilson. Como consequência dos problemas causados pelo cobre, nos últimos anos muitos trabalhos desenvolveram métodos para a determinação de Cu(II) em diversas matrizes [116–118]. Na literatura é possível encontrar a determinação de Cu(II) em diferentes amostras usando a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF-AAS), espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) [119], cromatografia de alta performance [120], potenciometria [117], voltametria [121] e LIBS (do inglês, Laser Induced Breakdown Spectroscopy) [83]. Neste trabalho está descrito o desenvolvimento de um método para determinação de Cu(II) usando fluorescência molecular.

### 3.1.3.3. Sensores Fluorescentes Para Determinação de Íons Cobre

O desenvolvimento de sensores químicos fluorescentes para determinação seletiva de íons metálicos, especialmente íons de metais de transição, tem atraído o interesses de químicos, biólogos e químicos ambientais nos últimos anos [122,123]. Isso porque os nanossensores fluorescentes apresentam diversas vantagens, como por exemplo, baixo custo, instrumentação simples e alta sensibilidade. Os sensores fluorescentes possuem uma unidade quelante, que é utilizada para o reconhecimento do analito. Ao reconhecer o analito, essa unidade produz um sinal de fluorescência diferente do quelante livre, ou seja, o quelante se comporta como receptor e fluoróforo dos sensores fluorescentes. A maiorias das publicações direcionadas ao desenvolvimento de sensores fluorescentes para determinação de íons Cu(II) em solução aquosa utilizam ou complexos luminescentes ou corantes comerciais como unidade quelante, encapsulado ou imobilizado na superfície de nanopartículas [62,77,107–109,114,124]. Recentemente Sung e Lo desenvolveram nanossensores fluorescentes através do encapsulamento de CdSe/ZnS em sílica mesoporosa [63]. O sensor apresentou limite de detecção e de quantificação no valor  $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, e uma faixa linear até  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . No entanto o nanossensor apresentou interferência a íons prata e não possui a característica de ser reutilizado. Zheng e colaboradores também demonstraram o uso destes nanossensores. Estes autores prepararam um nanossensor fluorescente para determinação de Cu(II) usando o reagente N-(quinoline-8-il)-2-(3-trietoxisililpropilamino)-acetamida depositado sobre a superfície de nanopartículas de sílica preparados por microemulsão reversa. Esse nanossensor exibiu limites de detecção e quantificação de  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, e não apresentou interferência de outros íons metálicos. Além disso apresentou uma faixa de resposta linear de 2 –  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  [106]. Analisando as recentes publicações, observa-se que os limites de detecção e quantificação vindo sendo otimizados, contudo a reutilização desses nanossensores ainda encontra-se em fase de consolidação.

## 3.2. Parte Experimental

### 3.2.1. Reagentes Utilizados

- Ácido acético (Synth)
- Acetato de sódio (Synth)
- Etanol Absoluto (Merck)
- Fosfato de sódio bibásico heptahidratado (Nuclear)
- Fosfato de sódio monobásico anidro (Synth)
- Solução de Amônia ( $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  em etanol, Aldrich)
- Solução de hidróxido de amônio (28%  $\text{NH}_3$ , Synth)
- Tetraetilortosilano (TEOS) ( $\geq 99,0 \%$ , Aldrich)
- Sais de Nitrato (Cobre, chumbo, cádmio, níquel e zinco) (TEC-LAB)
- Sais de Cloreto (Ferro e mercúrio) (TEC-LAB)

#### Solução de Rodamina B

Uma solução estoque de rodamina B foi preparada em etanol a uma concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, por diluição, foram preparadas soluções de  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em água.

#### Solução de Cátions Metálicos

As soluções de referência dos íons metálicos ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparadas em água deionizada. A partir destas soluções estoques prepararam-se soluções de diferentes concentrações em tampão fosfato ou acetato.

#### Soluções Tampão

Soluções estoque de tampão fosfato ( $5,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) e tampão acetato ( $6,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparadas em água deionizada. Diluições foram feitas para

preparação de soluções de diferentes valores de concentração e conseqüentemente diferentes valores de pH.

### 3.2.2. Desenvolvimento dos Nanossensores Fluorescentes

As nanopartículas de sílica dopadas com reagentes fluorescentes (nanossensor fluorescente) foram sintetizadas baseando-se no processo descrito no item 2.2.2., com algumas modificações. As concentrações utilizadas para o desenvolvimento do nanossensor foram: etanol (6,42 a 11,80 mol L<sup>-1</sup>), amônia (0,18 a 0,70 mol L<sup>-1</sup>) e água (13,80 a 31,10 mol L<sup>-1</sup>). A concentração de TEOS (0,32 mol L<sup>-1</sup>) foi mantida constante em todas as sínteses. Inicialmente misturou-se solução alcoólica de hidróxido de amônio padrão com água deionizada e manteve-se o sistema durante 15 minutos sobre agitação constante. Após o período inicial de mistura adicionou-se o tetraetilortosilano (TEOS, ≥ 99,0%) no qual deu início à reação de hidrólise, seguida de condensação. O sistema foi deixado sob agitação de 350 rpm durante 7 horas para síntese com concentrações de amônia entre 0,18 a 0,50 mol L<sup>-1</sup> (**nanossensor 1**) ou 2 horas de síntese para concentrações de amônia entre 0,53 a 0,70 mol L<sup>-1</sup> (**nanossensor 2**). Para imobilizar o reagente luminescente na sílica, 3 mL de uma solução do material luminescente (5,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados à síntese em diferentes tempos: 2, 3, 4 e 5 h para síntese de 7 horas e 30, 60, 90 e 120 minutos para síntese de 2 horas. Após a síntese, as partículas foram isoladas por centrifugação (15.000 rpm/120 min). Na seqüência, o material foi lavado três vezes com etanol para eliminação do solvente, do catalisador e do material luminescente que não ficou imobilizado na sílica do meio reacional. O material decantado foi seco em estufa durante 24 h a 60 °C. Na Figura 3.4 é possível observar as etapas e os produtos obtidos no desenvolvimento dos nanossensores fluorescentes.

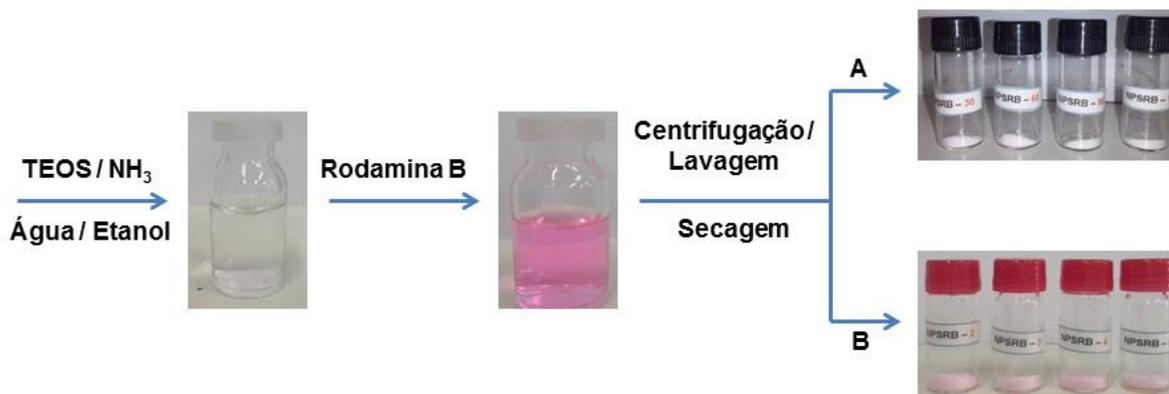


Figura 3.4. Desenvolvimento dos nanossensores através da imobilização da rodamina B na sílica de Stöber. (A) nanossensor 2 e (B) nanossensor 1.

O material desenvolvido foi denominado de **NPSRB – x**, onde NPSRB é a sigla que simplifica a expressão “nanopartículas de sílica dopadas com rodamina B”, e o x indica o tempo de adição do material luminescente durante a síntese. Quando x for 30, 60, 90 e 120 min representa o nanossensor 2 e quando x for 2, 3, 4 ou 5 h representa o nanossensor 1. Após a definição das concentrações dos reagentes utilizados, a concentração dos reagentes foi mantida constante para cada nanossensor desenvolvido, variando-se apenas o tempo de adição da rodamina B.

### 3.2.3. Medidas de Fluorescência

#### 3.2.3.1. Avaliação dos Nanossensores

Como descrito no item 3.2.2, dois tipos de nanossensores foram desenvolvidos. A avaliação desses nanossensores foi realizada usando um sistema composto por uma cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico) e um espectrofluorímetro Cary-Eclipse, VARIAN. Embora os nanossensores desenvolvidos nesse trabalho estejam no estado sólido, todas as medidas foram feitas em suspensão, através da ressuspensão das nanopartículas dopadas com rodamina B (Figura 3.5). Os espectros de fluorescência foram adquiridos excitando-se as NPSRB – x em um comprimento de onda de 535 nm e medindo a intensidade de radiação no comprimento de onda de fluorescência em 573 nm, com fendas de

excitação de 20 nm e emissão de 5 nm, e. Soluções-padrão das NPSRB – x com concentração  $0,43 \text{ mg mL}^{-1}$  foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,0) e logo após, registrou-se os espectros de emissão de cada solução. Para avaliar a resposta dos nanossensores a íons Cu(II) foram observadas a intensidade de emissão das NPSRB – x livre e na presença do Cu(II). Para execução dessas medidas, alíquotas de uma solução contendo íons Cu(II), com concentração de  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , foram adicionadas na suspensão de NPSRB – x com concentração  $0,43 \text{ mg mL}^{-1}$  em tampão fosfato (pH 7,0).

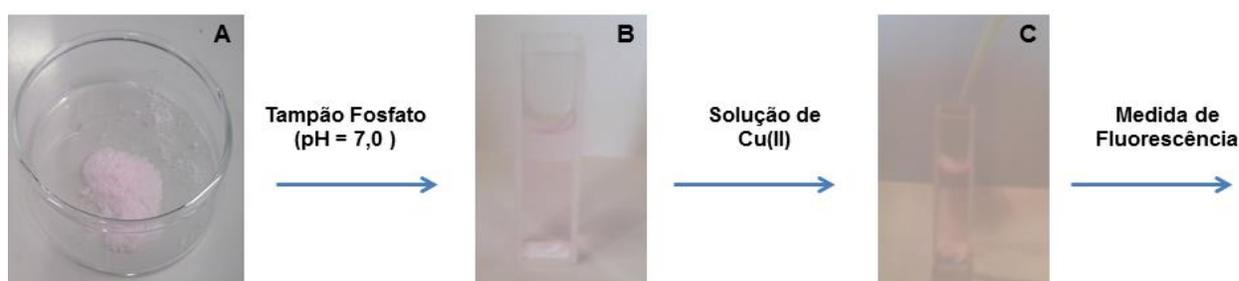


Figura 3.5. Preparo das suspensões para avaliação dos nanossensores 1 e 2 através das medidas de fluorescência. (A) tem-se o pó das NPSRB – x, (B) suspensão de NPSRB – x em tampão fosfato e (C) adição na suspensão de íons Cu(II).

### 3.2.3.2. Avaliação do Nanossensor 1

As medidas de fluorescência realizadas nesse item utilizaram a mesma instrumentação descrita no item 3.2.3.1. Soluções-padrão das NPSRB – x com concentração  $0,43 \text{ mg mL}^{-1}$  foram preparadas em tampão acetato (pH entre 3,0 – 5,0) e tampão fosfato (pH 6,0 – 9,0), e logo após registrou-se os espectros de emissão de cada solução. Para avaliar a resposta dos nanossensores a íons Cu(II) foram observadas a intensidade de emissão das NPSRB – x livre e na presença do Cu(II). Para execução dessas medidas, alíquotas de uma solução contendo íons Cu(II) com concentração de  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  foram adicionadas na suspensão de NPSRB – x com concentração  $0,43 \text{ mg mL}^{-1}$  em tampão fosfato e acetato. Para construção da curva analítica, espectros de fluorescência foram medidos antes e após adição de Cu(II) na mistura, Foram construídas curvas analíticas empregando-se a razão  $I_0/I$

em função da concentração de Cu(II) em diferentes valores de pH (3,0 e 9,0), onde  $I_0$  é a intensidade de fluorescência das NPSRB – x antes da adição do cobre, e  $I$  a intensidade de fluorescência após a adição de Cu(II). Além do pH de medida, o desempenho do nanossensor foi avaliado em função do tempo de adição da rodamina B durante a síntese. Para isso, medidas foram feitas em um pH fixo onde o nanossensor apresentou uma melhor sensibilidade. Para todas as determinações foram feitas correções com o fator de diluição. O fator de diluição é calculado dividindo o volume final na cubeta pelo seu volume inicial. Esse fator corrige a queda no sinal de fluorescência devido a diluição da suspensão contendo o NPSRB – 5.

#### **3.2.4. Estudo de Interferentes**

O estudo de interferentes foi realizado para avaliar a seletividade dos nanossensores na presença de outros íons metálicos. Para tal estudo foram testados os seguintes cátions: Zn(II), Hg(II), Pb(II), Ni(II), Cd(II) e Fe(III). As medidas foram feitas em solução tampão acetato pH 4,0 e 5,0 e solução tampão fosfato pH 7,0 e 8,0 fixando-se a concentração de Cu(II) e dos demais íons metálicos em 10 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Inicialmente foi feita a medida de fluorescência das NPSRB – x livre em suspensão. Logo na sequência foi realizada a medida de fluorescência na presença dos íons Cu(II). Por fim, adicionou-se a mesma suspensão outro íon metálico e realizou-se a medida de fluorescência.

#### **3.2.5. Regeneração do Sinal Analítico**

O material fluorescente utilizado nesse trabalho (rodamina B) ao complexar com cobre sofre o efeito de supressão de fluorescência. Para regenerar a intensidade de fluorescência é preciso utilizar uma espécie que seja capaz de remover o íon Cu(II) complexado. Geralmente, utilizam-se soluções de ácidos diluídos ou EDTA. Neste trabalho empregou-se HCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  como solução regeneradora e avaliou-se quantas vezes os nanossensores podem ser reutilizados. Primeiramente, prepararam-se suspensões das NPSRB - x com concentração 0,43

mg mL<sup>-1</sup> em solução de tampão fosfato e acetato e registraram-se os espectros de emissão de cada nanossensor antes e depois da adição dos íons Cu(II) no sistema. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl em cada sistema. Depois de 4h da adição do ácido, o sistema foi centrifugado (15.000 rpm/120 min), onde o sobrenadante foi eliminado (HCl + Cu(II)) e as NPSRB – x decantadas foram secas em estufa durante 24 h a 60 °C. Após a secagem da amostra, novas suspensões com a mesma concentração foram preparadas e novos espectros de emissão foram obtidos.

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1. Nanossensores Fluorescentes

##### 3.3.1.1. Propriedades dos Nanossensores Desenvolvidos

Como descrito no item 3.2.2, dois nanossensores foram desenvolvidos de forma semelhante, variando apenas o tempo em que a rodamina B foi adicionada à síntese. Através desse estudo foi possível identificar a relação entre o tempo de adição da rodamina B e a intensidade máxima de emissão. Na Figura 3.6 é possível observar os espectros obtidos para os nanossensores preparados pela adição da rodamina B em diferentes tempos de síntese.

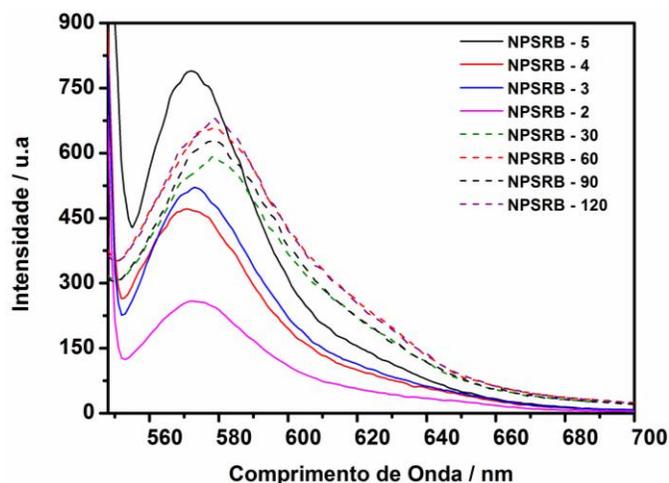


Figura 3.6. Espectros de emissão dos nanossensores fluorescentes em diferentes tempos de adição da rodamina B na síntese ( $\lambda_{ex}$  535 nm, fendas de emissão 5 e excitação 20 nm).

Observa-se que o nanossensor 1 (adição da rodamina B em 2, 3, 4 e 5h) apresentou bandas de emissão com intensidade máxima em 573 nm. Já o nanossensor 2 (adição da rodamina B em 30, 60, 90 e 120 min.) apresentou bandas com intensidade máxima em torno de 579 nm, o que mostra que houve uma variação no comprimento de onda de emissão máxima da rodamina B encapsulada nas nanopartículas de sílica em relação a rodamina B livre. Nota-se também que a intensidade máxima de emissão é obtida para o nanossensor 1. A explicação para tais observações pode ser baseada nos resultados obtidos no item 2.3.2.5, os quais indicam que as nanopartículas utilizadas para o desenvolvimento do nanossensor 1 apresentaram elevada porosidade estrutural (mesoporoso) e tamanho médio de partícula menor (60 nm), o que resulta em uma camada menor de sílica em volta da rodamina B encapsulada. Por outro lado, o nanossensor 2 (elevada concentração do catalisador) não apresentou porosidade estrutural e o tamanho médio de partícula foi maior (180 nm), o que resulta em uma camada de sílica maior em torno da rodamina B encapsulada. Baseado nesse mesmo fundamento teórico também é possível explicar o fato da intensidade máxima de emissão do nanossensor aumentar diretamente com aumento no tempo de adição da rodamina B durante a síntese.

### **3.3.1.2. Avaliação dos Nanossensores Fluorescentes**

Os nanossensores (1 e 2) desenvolvidos neste trabalho tiveram suas respostas a íons Cu(II) avaliadas conforme o item 3.2.4.1. Através da Figura 3.7A e Figura 3.7B foi possível observar que apenas o nanossensor 1 apresentou resposta aos íons Cu(II) no pH empregado. Isso porque não foi observado nenhuma variação significativa nas intensidades de emissão do nanossensor 2 (efeito de supressão) com e sem adição de Cu(II), como observado na Figura 3.7A.

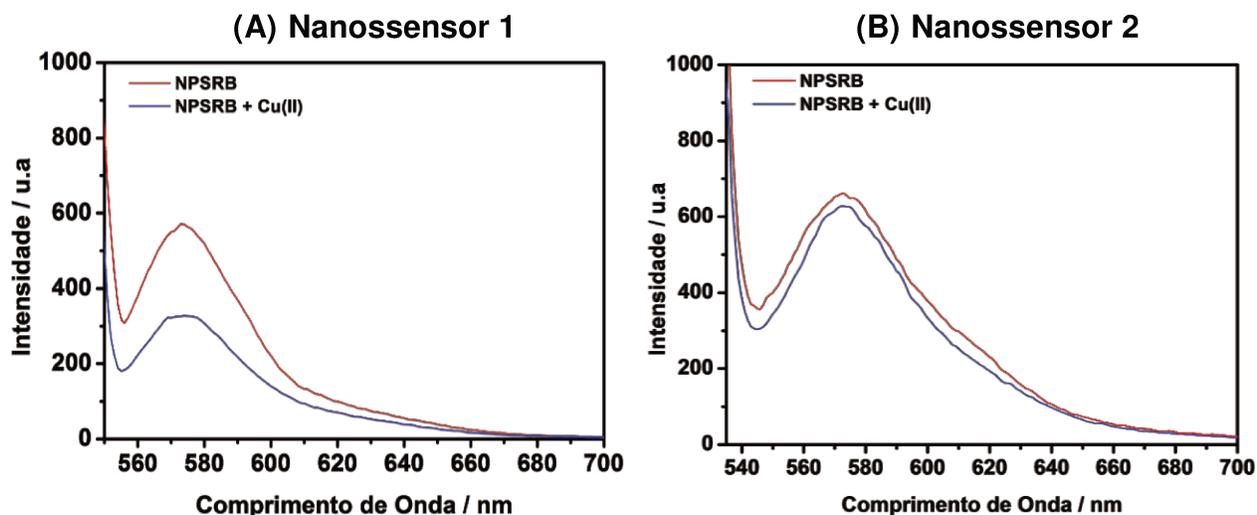


Figura 3.7. Espectros de emissão dos nanossensores 1 e 2. (A) nanossensor 1 com resposta a íons Cu(II), (B) nanossensor 2 sem resposta a íons Cu(II), [Cu(II)] = 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0 ([NPSRB] = 0,43  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Comprimento de excitação em 535 nm, fendas de emissão e emissão 20 e 5 nm, respectivamente.

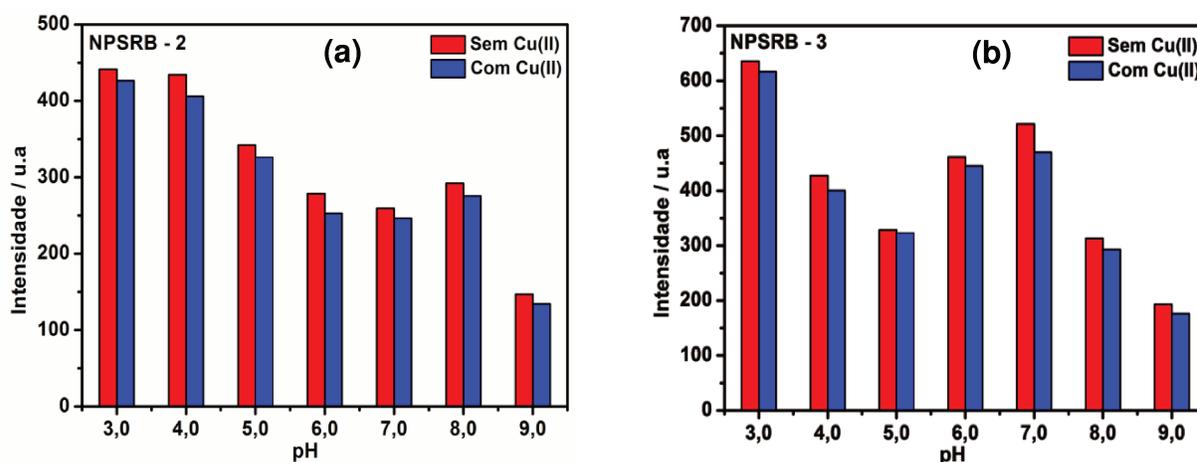
Explicações para os fenômenos observados podem estar na forma pela qual a rodamina B está encapsulada nas nanopartículas de sílica ou no grau de porosidade das nanopartículas desenvolvidas. Nos dois nanossensores desenvolvidos a rodamina B encontra-se encapsulada nas nanopartículas. Quanto maior o tempo de adição da rodamina B, mais próximo da superfície da partícula encontra-se o material luminescente, estando assim, mais acessível aos íons Cu(II).

No caso do nanossensor 2, a alta taxa de hidrólise e de condensação, devido ao uso de elevadas concentrações de catalisadores, produziram nanopartículas maiores, não porosas e com uma espessa camada de proteção da sílica, impedindo assim a interação metal-ligante. Por isso, nenhuma supressão de fluorescência foi observada, mesmo quando a rodamina B foi adicionada em diferentes tempos da síntese. Por outro lado, quando a síntese de nanopartículas é feita com baixas concentrações do catalisador (nanossensor 1), o material produzido é poroso, o que possibilita a difusão dos íons Cu(II) pelos poros das nanopartículas, possibilitando a complexação dos íons Cu(II) com a rodamina B.

Após estudos iniciais, foi possível identificar que apenas o nanossensor 1 com bandas de emissão de intensidade máxima em torno de 573 nm apresentou

resposta a íons Cu(II). Dessa forma, diversos nanossensores (nanossensor 1) foram desenvolvidos de acordo com item 3.2.2 e foram avaliados quanto à seletividade, à sensibilidade e ao tempo resposta. Avaliou-se a influência do pH e o tempo de adição da rodamina B durante a síntese de nanopartículas na intensidade de fluorescência e resposta dos nanossensores a íons Cu(II).

O estudo do pH foi realizado com a finalidade de avaliar o comportamento dos nanossensores em diferentes valores de pH. Para tal, foram considerados as variações de intensidade máxima de emissão sem e com a presença de íons Cu(II) para todos os nanossensores desenvolvidos (NPSRB – 2, NPSRB – 3, NPSRB – 4, NPSRB – 5). Através das medidas realizadas de acordo com o item 3.2.4.2, pode-se concluir que a sensibilidade dos nanossensores aumenta com o aumento do pH, tendo seu máximo em pH 7,0 para os nanossensores NPSRB – 3, NPSRB – 4 e NPSRB – 5. O nanossensor NPSRB – 2 não apresentou resposta em nenhum dos valores de pH e concentração de íons Cu(II) estudados. Isso ocorre, porque ao adicionarmos a rodamina B em 2 h de síntese, a rodamina tende a ficar imobilizada no núcleo das nanopartículas, de modo que a espessa camada de proteção da sílica impeça a interação metal- ligante. O NPSRB – 5 apenas não apresentou resposta a íons Cu(II) em pH 3,0 e 9,0 (Figura 3.8).



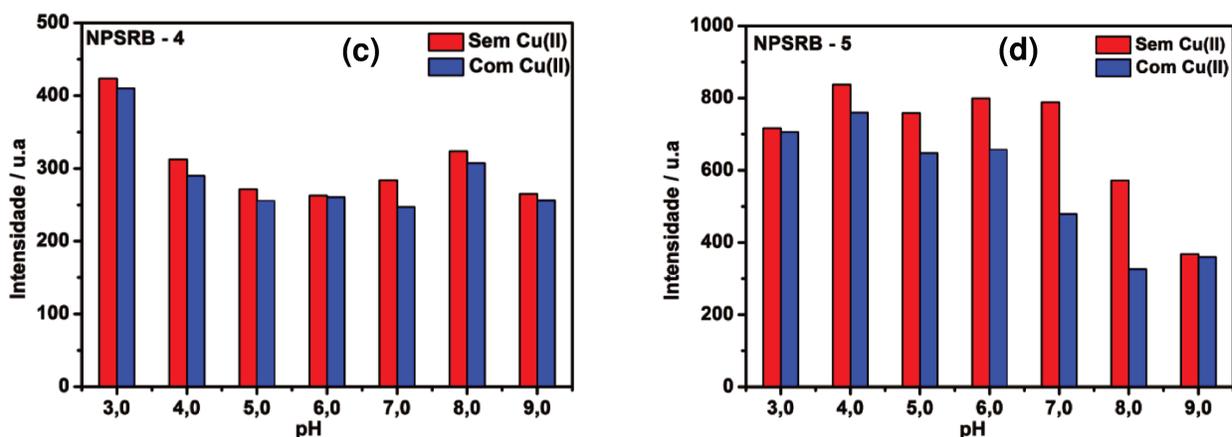


Figura 3.8. Gráfico com as intensidades de emissão das nanopartículas em diferentes valores de pH e tempos de adição da rodamina B: (a) NPSRB - 2 na ausência e na presença de Cu(II), (b) NPSRB - 3 na ausência e na presença de Cu(II), (c) NPSRB – 4 na ausência de Cu(II) e na presença de Cu(II), (d) NPSRB – 5 na ausência de Cu(II) e na presença de Cu(II). (Comprimento de excitação em 535 nm, fendas de excitação e emissão 20 e 5 nm, respectivamente. [NPSRB] = 0,43 mg mL<sup>-1</sup>, [Cu(II)] = 10 μmol L<sup>-1</sup>).

Uma das explicações para a baixa sensibilidade do NPSRB – 5 em pH 3,0 pode estar relacionada ao fato de que nesses valores de pH a rodamina B (pKa 4,51) encontra-se parcialmente protonada e o sítio ativo não está disponível para complexação com os íons Cu(II) (Figura 3.9). Já a baixa sensibilidade em pH 9,0 se dá devido a precipitação os íons Cu(II) em Cu(OH)<sub>2</sub> (Kps a 25 °C = 4,8 x 10<sup>-20</sup>), o que diminui a disponibilidade de íons Cu(II) para complexação com a rodamina B.

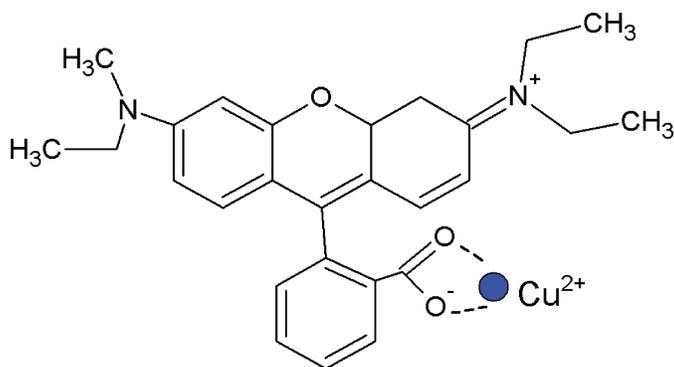


Figura 3.9. Modo de ligação proposto entre a rodamina B e os íons Cu(II).

Após a identificação do pH, onde a sensibilidade é maior, avaliou-se a resposta do nanossensor em função do tempo de adição da rodamina B. Pode-se concluir que a sensibilidade dos nanossensores é diretamente proporcional ao tempo de adição da rodamina B durante a síntese das nanopartículas, isto é, a resposta do nanossensor aumenta do NPSRB – 2 para o NPSRB – 5.

A sensibilidade do nanossensor foi avaliada através da construção de curvas analíticas de  $I_0/I$  em função da concentração de Cu(II). O intervalo de concentração de íons Cu(II) utilizado foi de  $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Na Figura 3.10, observa-se que houve um aumento na sensibilidade do nanossensor com o aumento do tempo de adição da rodamina B em um valor fixo de pH.

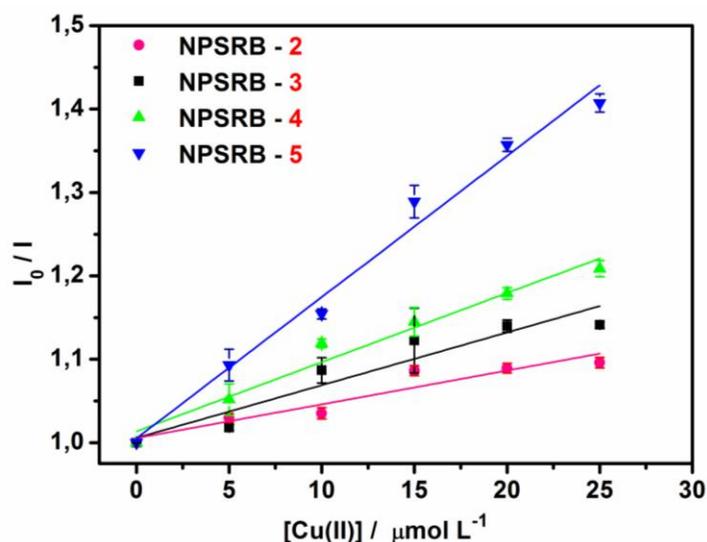


Figura 3.10. Resposta analítica dos nanossensores a íons Cu(II) para diferentes tempos de adição do reagente luminescente (Rodamina B) em pH 7,0

Como já descrito, o nanossensor NPSRB – 5 apresentou um melhor sinal analítico (maior razão  $I_0/I$ ). Isso pode ser explicado devido à espessura da camada de sílica ser fina e a rodamina B estar localizada mais próxima à superfície da partícula. No entanto, embora a rodamina B adicionada em cinco horas tenha apresentado o maior sinal analítico, ela é mais facilmente afetada pelo oxigênio (supressor) do ar e pelo solvente. Na Figura 3.11 observar-se uma ilustração das espécies de sílica em diferentes estágios da síntese de Stöber e a posição do reagente fluorescente encapsulado ao ser adicionado em diferentes tempos de

reação. É importante enfatizar que a ilustração é válida para representar os dois nanossensores desenvolvidos nesse trabalho, independentemente do tempo total de síntese (2 h ou 7 h). Isso porque a síntese com 2 h de duração possui uma concentração mais alta do catalisador, o que torna os processos de hidrólise, condensação e adsorção eletrostática mais rápidos.

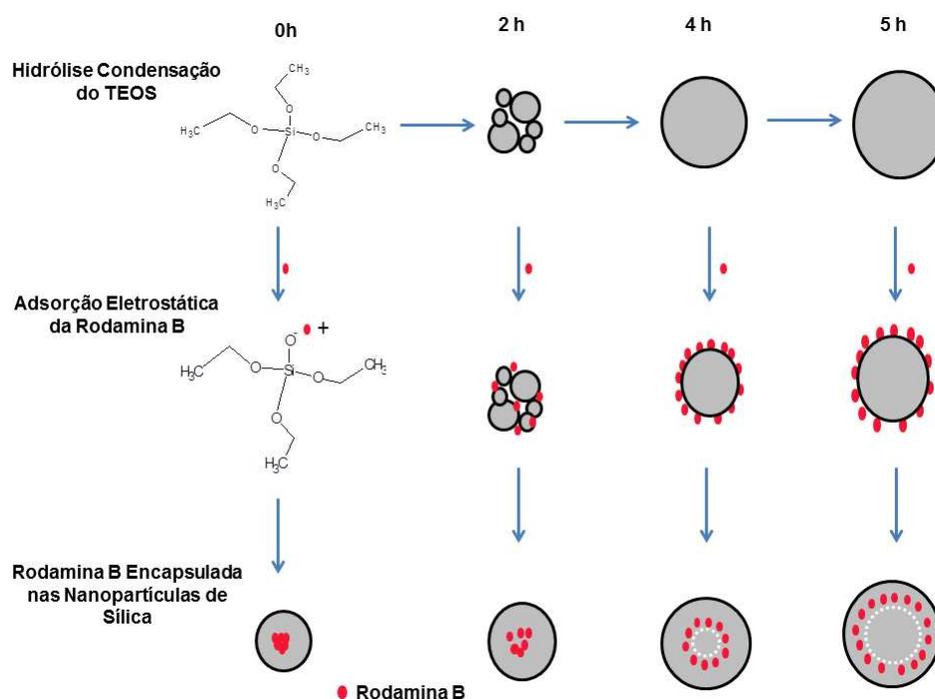


Figura 3.11. Representação da estratégia de encapsulamento da rodamina B nas nanopartículas de sílica durante o processo de síntese (síntese com duração de 7 h) (Adaptada do artigo de Dawei Zhang, onde se utilizou complexo de rutênio como material imobilizado).

Logo após a identificação do pH e do nanossensor que ofereceu a melhor resposta a íons Cu(II), avaliou-se o tempo de resposta do nanossensor NPSRB – 5. A análise foi realizada adicionando alíquotas de íons Cu(II) em suspensão aquosa de nanopartículas de sílica dopadas com rodamina B e observou-se o tempo necessário para que o decréscimo (supressão) na intensidade, causada pelos íons Cu(II), tornasse constante. O nanossensor desenvolvido neste trabalho apresentou tempo de resposta de aproximadamente 50 s para uma concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Cu(II).

### 3.3.2. Análise dos Interferentes

Na Figura 3.12, observam-se as intensidades de fluorescência NPSRB – 5 em função dos cátions analisados. Os resultados demonstraram que o nanossensor para íons Cu(II) foi seletivo, não apresentando interferência para nenhum dos íons investigados em pH 8,0 (Figura 3.12B), o que mostra desempenho melhor em relação a outros nanossensores descritos na literatura que sofreram interferência de Ni(II) e Zn(II) [125]. A seletividade obtida pelo nanossensor revela que a determinação de íons Cu(II) pode ser alcançada na presença do excesso de íons interferentes. A seletividade também foi testada invertendo a ordem de adição dos íons metálicos, ou seja, teste foram realizados adicionando inicialmente os íons interferentes e depois adicionando os íons Cu(II).

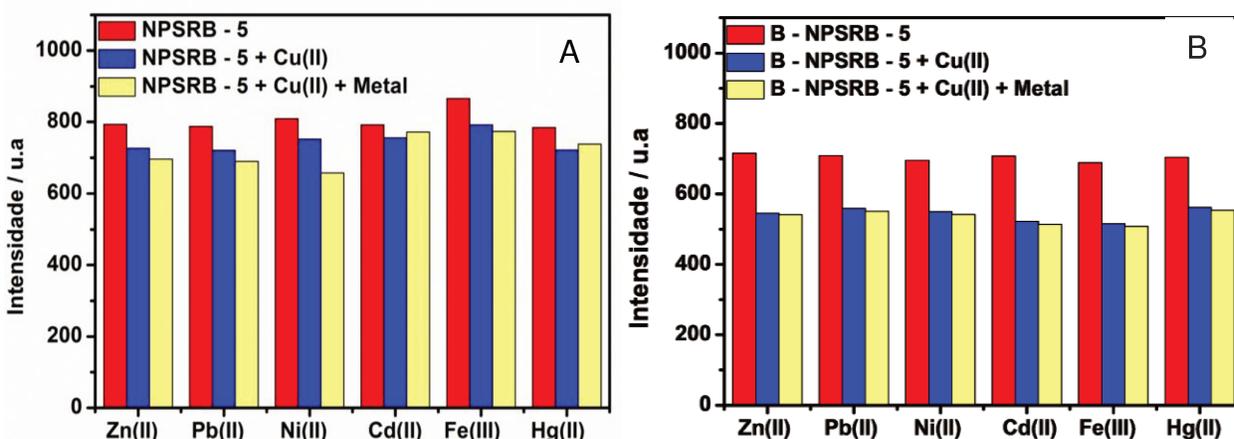


Figura 3.12. Interferência de íons metálicos na detecção de íons Cu(II)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , [metais] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (A) pH 4,0 e (B) pH 7,0.

Em pH 4,0 (Figura 3.12A) observou-se que os íons Ni(II) também promoveram o efeito de supressão de fluorescência, assim como os íons Cu(II). Em valores de pH 5,0 e 6,0 os nanossensores se mostraram seletivos aos íons Cu(II), apresentando uma melhor seletividade em pH 7,0. Acredita-se que a seletividade do nanossensor esteja associada a constante de formação do complexo e a esfera de hidratação dos íons metálicos. Ao avaliar a influência da esfera de hidratação foi necessário recorrer a alguns fundamentos teóricos da química, sendo possível afirmar que quanto menor o raio iônico do metal, menor a esfera de hidratação ( $\text{Pb(II)} > \text{Hg(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)} >$

Fe(III) > Cu(III) > Ni(II)). Como descrito no texto, a forma pela qual ocorre a complexão da rodamina B com o íon metálico se dá pela passagem do metal pelos poros das nanopartículas até o núcleo onde está a rodamina imobilizada, ou seja, um metal com esfera de hidratação relativamente grande não conseguirá ter acesso ao núcleo das nanopartículas. Outro parâmetro a ser avaliado é a constante de formação do complexo com a rodamina B, sendo que quanto maior a constante de formação, mais favorável será a formação desse complexo. No entanto, em estudos preliminares foi possível identificar que rodamina B em solução complexa apenas íons Cu(II), Ni(II) e Zn(II). Observando a seletividade em pH 8,0 podemos concluir que nessas condições, tanto o Ni(II) como o Cu(II) tiveram acesso a rodamina através dos poros, isso porque, o Zn(II) possui uma maior esfera de hidratação que o impossibilita de passar pelos poros das nanopartículas e chegar até a rodamina. No entanto, em pH 8,0 a constante de formação do complexo (Metal + Rodamina B) deve ser muito maior para os íons Cu(II) do que para os íons Ni(II), havendo assim, uma predominância na formação do complexo [Cu(II)-RDB]. A seletividade do nanossensor também foi testada com metais alcalinos terrosos. Os resultados mostraram que o nanossensor continua sendo seletivo a íons Cu(II) na presença de Ca(II) e Mg(II) em solução aquosa.

### 3.3.3. Desempenho Analítico do Nanossensor

O desempenho analítico do nanossensor NPSRB – 5 foi avaliado fazendo-se medidas em solução de tampão fosfato em pH 7,0, mantendo-se a concentração constante de 0,43 mg mL<sup>-1</sup>. As condições analíticas também foram mantidas constantes, sendo as fendas de emissão e excitação, de 20 e 5 nm, respectivamente e com  $\lambda_{ex}$ . 535 nm e  $\lambda_{em}$ . 573 nm. Os limites de detecção e quantificação encontrados para o nanossensor foi 0,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 1,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, considerando-se 20 medidas do branco. Os cálculos foram realizados com base nas seguintes equações:

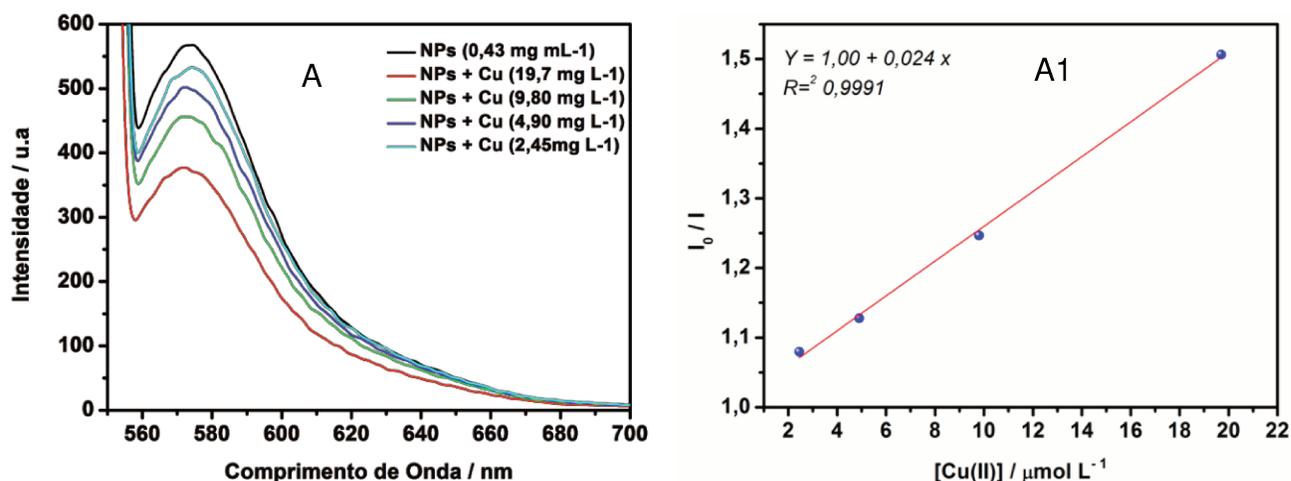
$$\text{L.D.} = 3 S_b / m$$

$$\text{L.Q.} = 10 S_b / m$$

Onde,  $S_b$  é o desvio padrão do branco e  $m$  é a inclinação da curva calibração. A resposta a íons Cu(II) apresentou faixa linear entre 2,0 – 12,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### 3.3.4. Reutilização do Nanossensor

O procedimento descrito no item 3.2.5 teve como objetivo avaliar o número de reutilização dos nanossensores. Na Figura 3.13 (A e B) é possível visualizar espectros de emissão decorrentes da detecção de íons Cu(II) em meio aquoso usando a NPSRB – 5. Observa-se que o comprimento de onda de emissão (573 nm) não variou entre o nanossensor inicial (Figura 3.13 A) e o reutilizável (Figura 3.13 B). Em relação à intensidade, nota-se que após a extração dos íons Cu(II), o sinal de fluorescência produzido pelo nanossensor foi regenerado completamente. Para avaliar a sensibilidade do nanossensor regenerado, foram construídas curvas analíticas (Figura 3.13 A1 e B1) com o nanossensor no primeiro e no segundo ciclo de uso, sendo a curva analítica construída com a razão entre as intensidades de emissão ( $I_0 / I$ ) e a concentração dos íons Cu(II). Esta avaliação permitiu comprovar que o nanossensor (NPSRB – 5) permaneceu sensível a íons Cu(II), mesmo após o segundo ciclo de uso, onde foi possível observar resultados satisfatórios, quando comparado com outros métodos ópticos para detecção de íons Cu(II) [83,106,109,126].



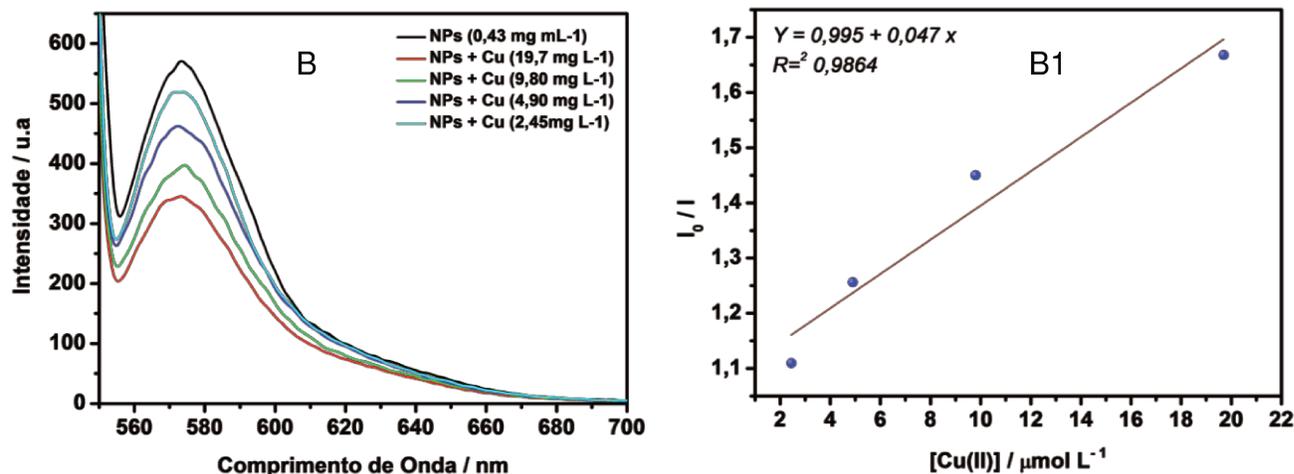


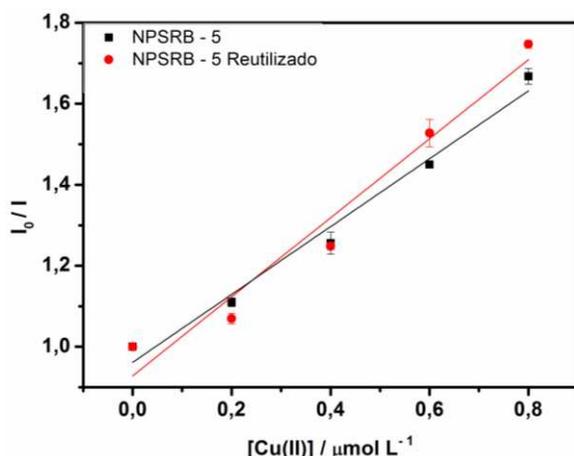
Figura 3.13. Espectro de fluorescência e curva analítica do NPSRB – 5 (A) 1<sup>o</sup> utilização e (B) reutilização por uma vez. (A1) e (B1) curvas analíticas desenvolvidas a partir do nanossensor novo e do nanossensor reutilizado, respectivamente.

[NPSRB -5] 0,43 mg mL<sup>-1</sup>, pH = 8,0.

Em relação a recuperação das NPSRB – 5 após a lavagem, foi possível recuperar aproximadamente 86,6 % (m/m) do material após cada lavagem. Como o nanossensor não apresentou lixiviação após a lavagem com ácido, a perda de 13,4 % (m/m) das NPSRB – 5, pode estar relacionada com as etapas envolvendo a transferência (da cubeta para tubo da centrífuga), a centrifugação ou secagem do material.

### 3.3.5. Aplicação do Nanossensor

Para demonstrar a viabilidade do nanossensor fluorescente desenvolvido, o mesmo foi aplicado para determinação de íons Cu(II) em cachaças artesanais e industriais. A determinação de íons Cu(II) foi realizada em duas etapas: na primeira etapa utilizou nanossensores (NPSRB – 5) novos. Já na segunda etapa foi utilizado nanossensores reutilizados, recuperados do material utilizado para primeira determinação de íons Cu(II). Para cada nanossensor foi construído uma curva de calibração entre as razões das intensidades de emissão ( $I_0 / I$ ) e a concentração dos íons Cu(II).



NPSRB – 5

$$Y = 0,9615 + 0,8377 x$$

$$r = 0,9959$$

NPSRB – 5 Reutilizado

$$Y = 0,9281 + 0,9795 x$$

$$r = 0,9801$$

Figura 3.14. Curva analítica construída com nanossensor novo e reutilizado para determinação de Cu(II) em cachaça e suas respectivas equações da reta.

No total, 7 amostras (marcas distintas) foram analisadas nesse trabalho. O método de referência utilizado para determinação de íons cobre foi o da absorção atômica em chama. O equipamento utilizado foi o espectrômetro de absorção atômica da Perkin Elmer, Analyst 400, usando chama ar (10,00 L / min.) / acetileno (2,50 L / min.) e comprimento de onda de 324,7 nm. Os resultados analíticos obtidos pelos nanossensores e pelo de referência estão descritos na Tabela 3-1.

Tabela 3-1. Determinação de íons cobre em amostras de cachaça utilizando as NPSRB - 5

<b>Amostras</b>	<b>Absorção Atômica (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>NPSRB – 5 (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Razão I<sub>0</sub> / I</b>	<b>NPSRB – 5 Reutilizável (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Razão I<sub>0</sub> / I</b>
<b>A</b>	3,25	3,08	1,22	3,14	1,24
<b>B</b>	1,95	2,37	1,16	2,61	1,18
<b>C</b>	4,47	3,80	1,28	4,87	1,40
<b>D</b>	0,98	1,41	1,08	,29	1,05
<b>E</b>	5,17	5,11	1,39	5,20	1,43
<b>F</b>	1,70	1,77	1,11	2,81	1,20
<b>G</b>	3,25	2,97	1,21	3,15	1,23

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 3-1, pode-se observar que os nanossensores novos e reutilizados foram aplicados com sucesso para análise de Cu(II) em cachaça, demonstrando que o nanossensor desenvolvido apresenta potencial para análise de amostras reais, confirmando sua capacidade de regeneração. Com objetivo de avaliar se os métodos utilizados (absorção atômica e nanossensor fluorescente) para determinação de íons Cu(II) em cachaça apresentaram resultados significativamente diferentes, a um grau de confiança 95 %, foi realizado um teste t pareado. Através do teste, onde observou que o t calculado ( $t_{cal} = 1,34$ ) é menor do que o t tabelado ( $t_{tab} = 1,76$ ), pode-se afirmar que não existe diferença significativa, a um grau de confiança 95 %, entre a determinação de íons Cu(II) utilizando absorção atômica e utilizando os nanossensores fluorescentes aqui desenvolvidos.



## **CAPÍTULO 4 – Conclusões**



Os resultados dos estudos direcionados a síntese de nanopartículas de sílica sugerem que a avaliação dos parâmetros envolvidos na síntese de forma univariada é válida apenas em condições específicas. Isso porque, através do planejamento experimental foi possível observar que os efeitos de interação entre as variáveis são estatisticamente significativos, não sendo possível observar o efeito apenas de uma variável isolada. O modelo obtido para o planejamento experimental apresentou um bom ajuste, explicando aproximadamente 92 % da variabilidade dos dados, o que originou os baixos valores de resíduos. Através das técnicas de caracterização foi possível observar que algumas sínteses geraram partículas não esféricas e sistemas polidispersos. Este fato reforça a necessidade de controlar as condições experimentais para obtenção de partículas com tamanho e uniformidade ideais. Por fim, conclui-se que um controle rígido e o entendimento dos efeitos causados pelos parâmetros são necessários para o desenvolvimento de uma síntese reprodutiva e com alto grau de uniformidade (monodisperso).

Avaliando o desempenho dos nanossensores fluorescentes desenvolvidos para detecção de íons Cu(II) em meio aquoso, observou-se resultados satisfatórios, uma vez que os nanossensores mostraram-se seletivos, sensíveis e com um tempo de resposta baixo. No entanto, o NPSRB – 5 apresentou o melhor desempenho dentre os outros nanossensores desenvolvidos, o que indica que o tempo de adição da rodamina B está relacionado diretamente com a detecção de íons Cu(II). Os estudos, indicam que apenas sínteses com baixas concentrações do catalisador produzem nanossensores com resposta a íons Cu(II). O estudo de interferentes revelou que a determinação de íons Cu(II) pode ser realizada na presença de outros íons. Através do estudo de reutilização do nanossensor pode-se concluir que o nanossensor produzido pode ser reutilizado, porém, necessita de uma otimização da quantidade de reutilizações. Isso porque o número de reutilização é limitado pela perda de massa no processo de lavagem e centrifugação da amostra. Na etapa final do trabalho, aplicou o NPSRB – 5 de forma satisfatória para determinação de íons Cu(II) em cachaça. Por fim é possível concluir que o método de síntese e a estratégia de imobilização mostraram-se eficiente para o desenvolvimento de nanossensores reutilizáveis.



## **CAPÍTULO 5 – Perspectivas**



Pretende-se em etapas futuras aprofundar-se no estudo sobre as mudanças das propriedades do material luminescente após a imobilização nas nanopartículas. Isso porque, o entendimento dessas mudanças possibilitará uma produção de nanossensores com propriedades ópticas bem definidas. Também pretende-se identificar novos métodos de recuperação das nanopartículas. Métodos utilizando um quelante para remoção do íon metálico pode ser futuramente testado. Em etapas futuras pode-se utilizar a análise por injeção em fluxo no intuito de automatizar e, conseqüentemente, analisar amostras de rotina em grande escala. Pode-se também avaliar a influência da carga e porosidade das nanopartículas de sílica na sensibilidade dos nanossensores. Uma vez que, o acesso ao material luminescente imobilizado na sílica ocorre pelos poros das nanopartículas. Outro estudo que pode ser realizado futuramente é o uso de materiais não luminescentes para detecção de íons metálicos na região do Uv-visível utilizando a mesma estratégia de imobilização do quelante.



## **CAPÍTULO 6 – Referências**



- [1] M. Faraday, The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light, *Philos. Trans. R. Soc. London.* 147 (1857) 145–181.
- [2] G. Couto, Nanopartículas de níquel: síntese, caracterização, propriedades e estudo de sua utilização como catalisadores na obtenção de nanotubos de carbono, Universidade Federal do Paraná., 2006.
- [3] M. Baibich, J. Broto, A. Fert, F. Nguyen, F. Petroff, Giant Magnetoresistance of (001)Fe(001) Cr Magnetic Superlattices, *Phys. Rev. Lett.* 61 (1988) 2472–2475.
- [4] ISO – International Organization for Standardization. ISO/TC 229: Nanotechnologies, ISO/TS 800 (2010).
- [5] Y. Wang, N. Herron, Chemical Effects on the Optical Properties of Semiconductor Particles, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 5005–5008.
- [6] M. Brust, C. Kiely, Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 202 (2002) 175–186.
- [7] L. Brus, Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 2555–2560.
- [8] A. Alivisatos, A. Harris, N. Levinos, M. Steigerwald, L. Brus, Electronic states of semiconductor clusters: Homogeneous and inhomogeneous broadening of the optical spectrum, *J. Chem. Phys.* 89 (1988) 4001– 4009.
- [9] R. Hiratsuka, C. Santilli, S. Pulcinelli, O processo sol-gel: uma visão físico-química, *Quim. Nova.* 18 (1995) 171–180.
- [10] N. Plumeré, B. Speiser, H. Mayer, D. Joosten, L. Wesemann, High-temperature chlorination-reduction sequence for the preparation of silicon hydride modified silica surfaces., *Chem. A Eur. J.* 15 (2009) 936–946.
- [11] M. Lee, F. Beyer, E. Furst, Synthesis of monodisperse fluorescent core-shell silica particles using a modified Stober method for imaging individual particles in dense colloidal suspensions, *J. Colloid Interface Sci.* 288 (2005) 114–123.
- [12] C. Chen, Y. Li, S. Liu, Fabrication of macroporous platinum using monodisperse silica nanoparticle template and its application in methanol catalytic oxidation, *J. Electroanal. Chem.* 632 (2009) 14–19.
- [13] H. Wang, Development of Silica-Based Nanopigments, Aachen, 2012.

- [14] M. Alejandro, T. Ung, Á. Blanco, P. Mulvaney, L. Liz-marzán, Silica-coated metals and semiconductors . Stabilization and nanostructuring, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 257–267.
- [15] H. Giesche, Synthesis of monodispersed silica powders I. Particle properties and reaction kinetics, *J. Eur. Ceram. Soc.* 14 (1994) 189–204.
- [16] Y. Tan, C. Li, Y. Wang, J. Tang, X. Ouyang, Fast-response and high sensitivity gas sensors based on SnO<sub>2</sub> hollow spheres, *Thin Solid Films.* 516 (2008) 7840–7843.
- [17] G. Ozaydin, J. Dubach, K. Gleason, H. Clark, Microworm optode sensors limit particle diffusion to enable in vivo measurements, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 2656–2661.
- [18] E. Delgado, N. Montoya, M. Galiana, T. Albelda, J. Frías, H. Jiménez, Preparation of Hg<sup>2+</sup> selective fluorescent chemosensors based on surface modified core–shell aluminosilicate nanoparticles, *New J. Chem.* 34 (2010) 567–570.
- [19] J. Malinge, C. Allain, L. Galmiche, F. Miomandre, P. Audebert, Preparation, Photophysical, Electrochemical, and Sensing Properties of Luminescent Tetrazine-Doped Silica Nanoparticles, *Chem. Mater.* 23 (2011) 4599–4605.
- [20] X. Wang, Z. Shen, T. Sang, X. Cheng, M. Li, L. Chen, Preparation of spherical silica particles by Stöber process with high concentration of tetraethylorthosilicate, *J. Colloid Interface Sci.* 341 (2010) 23–29.
- [21] C. Escobedo, D. Viguera, F. Beltrán, Preparation of Size Controlled Nanometric Spheres of Colloidal Silica for Synthetic Opal Manufacture, *Mater. Sci. Forum.* 509 (2006) 187–192.
- [22] J. Kim, L. Kim, C. Kim, Size Control of Silica Nanoparticles and Their Surface, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 215–222.
- [23] K. Rao, K. El-Hami, T. Kodaki, K. Matsushige, K. Makino, A novel method for synthesis of silica nanoparticles., *J. Colloid Interface Sci.* 289 (2005) 125–131.
- [24] S.K. Park, K. Do Kim, H.T. Kim, Preparation of silica nanoparticles: determination of the optimal synthesis conditions for small and uniform particles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 197 (2002) 7–17.
- [25] Y. Huang, J. Pemberton, Synthesis of uniform, spherical sub-100nm silica particles using a conceptual, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* (2010) 175–183.

- [26] K. Chou, C. Chen, The critical conditions for secondary nucleation of silica colloids in a batch Stober growth process, *Ceram. Int.* 34 (2008) 1623–1627.
- [27] C. Buzea, I. Pacheco, K. Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*. 2 (2007) 1–103.
- [28] P. Charles, J. Frank, *Introduction to Nanotechnology*, 1st ed., New York, 2003.
- [29] J. Kenneth, R. Ryan, *Nanoscale Materials in Chemistry*, 2nd ed., New York, 2009.
- [30] M.A. Martins, T. Trindade, Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico, *Quim. Nova*. 35 (2012) 1434–1446.
- [31] V. Stone, B. Nowack, A. Baun, N. Brink, F. Kammer, M. Dusinska, et al., Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 1745–1754.
- [32] R. Vajtai, Nanoparticle Dispersions, in: *Handb. Nanomater.*, Berlin, 2013: pp. 1–31.
- [33] L. Hench, J. West, The sol-gel process, *Chem. Rev.* 90 (1990) 33–72.
- [34] S. Bhaduri, C. Brinker, G. Scherer, *The physics and chemistry of sol-gel processing*, Academic Press, San Diego, 1990.
- [35] C. Brinker, *Sol–Gel Processing of Silica*, in: *Colloid. Silica Fundam. Appl.*, Princeton, 2006: pp. 616–632.
- [36] E. Nassar, L. Ávila, P. Pereira, E. Nassor, A. Cestari, K. Ciuffi, Fenilsilicato dopado com Eu (III) obtido pelo método sol-gel, *Quim. Nova*. 30 (2007) 1567–1572.
- [37] N. O’Farrell, A. Houlton, B. Horrocks, Silicon nanoparticles: applications in cell biology and medicine, *Int. J. Nanomedicine*. 1 (2006) 451–472.
- [38] R. Dinigar, V. LaMer, Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrols, *Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 4847 – 4854.
- [39] G. Viau, F. Fiévet, Nucleation and growth of bimetallic CoNi and FeNi monodisperse particles prepared in polyols, *Solid State Ionics*. 84 (1996) 259–270.
- [40] I. Markov, *Crystal Growth for Beginners: A textbook on the fundamentals of nucleation, crystal growth and epitaxy*, 2nd ed., 2004.

- [41] P. Flory, Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 3083–3090.
- [42] J. Livage, Sol-gel processes, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2 (1997) 132–138.
- [43] H. Hsiang, C. Lin, Effects of aging on the phase transformation and sintering properties of TiO<sub>2</sub> gels, *Mater. Sci. Eng. A.* 380 (2004) 67–72.
- [44] G. Scherer, Aging and drying of gels, *J. Non. Cryst. Solids.* 100 (1988) 77–92.
- [45] H. Ju, X. Zhang, J. Wang, Biosensors Based on Sol–Gel Nanoparticle Matrices, in: *NanoBiosensing Princ. Dev. Appl. (Biological Med. Physics, Biomed. Eng., New York, 2011: pp. 305–332.*
- [46] I. Ibrahim, A. Zikry, M. Sharaf, Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica, *J Am. Sci.* 6 (2010) 985–989.
- [47] I.A. Rahman, V. Padavettan, Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites — A Review, *J. Nanomater.* 12 (2012) 1–15.
- [48] A. Mujahid, P. Lieberzeit, F. Dickert, Chemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Sol-Gel Materials, *Materials (Basel).* 3 (2010) 2196–2217.
- [49] H. Giesche, Synthesis of monodispersed silica powders II. Controlled growth reaction and continuous production process, *J. Eur. Ceram. Soc.* 14 (1994) 205–214.
- [50] N. Venkatathri, J. Yoo, Synthesis and Characterization of Silica Nanosphere from Octadecyltrimethoxy Silane, *Bull. Korean Chem. Soc.* 29 (2008) 29–30.
- [51] S. Park, Y. Kim, S. Park, Size-dependent shape evolution of silica nanoparticles into hollow structures, *Langmuir.* 24 (2008) 12134–12137.
- [52] K. Hartlen, A. Athanasopoulos, V. Kitaev, Facile preparation of highly monodisperse small silica spheres (15 to >200 nm) suitable for colloidal templating and formation of ordered arrays, *Langmuir.* 24 (2008) 1714–1720.
- [53] J. Lim, S. Ha, J. Lee, Precise Size control of Silica Nanoparticles via Alkoxy Exchange Equilibrium of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) in the Mixed Alcohol Solution, *Bull. Korean Chem. Soc.* 33 (2012) 1067–1070.
- [54] K. Bredereck, F. Effenberger, M. Tretter, Preparation and characterization of silica aquasols, *J. Colloid Interface Sci.* 360 (2011) 408–414.

- [55] S. Fouilloux, J. Daillant, A. Thill, Single step synthesis of 5–30nm monodisperse silica nanoparticles: Important experimental parameters and modeling, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 393 (2012) 122–127.
- [56] M. Darbandi, R. Thomann, T. Nann, D. Freiburg, R. July, V. Re, Single Quantum Dots in Silica Spheres by Microemulsion Synthesis, *J. Chem. Mater.* 17 (2013) 5720–5725.
- [57] D. Grojo, L. Boarino, N. Leo, R. Rocci, G. Panzarasa, P. Delaporte, et al., Size scaling of mesoporous silica membranes produced by nanosphere mediated laser ablation., *Nanotechnology.* 23 (2012) 1–9.
- [58] H. Misran, M. Yarmo, S. Ramesh, Synthesis and characterization of silica nanospheres using nonsurfactant template, *Ceram. Int.* 39 (2013) 931–940.
- [59] W. Stober, A. Fink, E. Bohn, Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range, *J Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62–69.
- [60] V. Lucia, Sílicas modificadas com centros básicos de nitrogênio, enxofre e oxigênio como adsorventes para cátions metálicos, Universidade Federal da Paraíba, 2007.
- [61] K. Viswanathan, Utilizing a tripeptide conjugated fluorescent hybrid nanoparticles as a fluorescence sensor for the determination of copper ions, *Sensors Actuators A Phys.* 175 (2012) 15–18.
- [62] L. Wang, B. Li, L. Zhang, L. Zhang, H. Zhao, Fabrication and characterization of a fluorescent sensor based on Rh 6G-functionlized silica nanoparticles for nitrite ion detection, *Sensors Actuators B Chem.* 171-172 (2012) 946–953.
- [63] W. Sung, L. Lo, Highly sensitive and selective sensor based on silica-coated CdSe/ZnS nanoparticles for Cu<sup>2+</sup> ion detection, *Sensors Actuators B Chem.* 165 (2012) 119–125.
- [64] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, Luminescent chemosensors based on silica nanoparticles, *Top. Curr. Chem.* 300(2011) 93–138.
- [65] E. Bayer, M. Spraul, M. Hofmann, C. Dowle, L. Tseng, T. Keller, Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing, *Trends Anal. Chem.* 16(1997) 200–211.
- [66] S. Amelinckx, D. Dyck, J. Landuyt, G. Tendeloo, *Electron Microscopy: Principles and Fundamentals*, 1st ed., Weinheim, 1997.

- [67] J. Bruce, P. Robert, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology and Physics*, 2000.
- [68] R. Silverstein, F. Webster, D. Kiemle, *The Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed., 2005.
- [69] J. Mullin, *Crystallization*, 4th ed., United States, 2001.
- [70] C. Brinker, G. Scherer, *The physics and chemistry of sol-gel processing*, San Diego, 1990.
- [71] A. Hulanicki, S. Glab, F. Wingma, IUPAC Discussion Paper, Commission V.I., 1989.
- [72] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Chemical sensors: definitions and classification, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247–1250.
- [73] D. Thévenot, K. Toth, R. Durst, G. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121–131.
- [74] B. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*, 2002.
- [75] H. Kautsky, A. Hirsch, Wechselwirkung zwischen angeregten Farbstoff-Molekülen und Sauerstoff, *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* 64 (1931) 2677–2683.
- [76] P. Cristina, *Sensores ópticos de matriz sol-gel com interesse na análise farmacêutica e clínica*, Universidade do Porto, 2005.
- [77] S. Rastogi, P. Pal, E. Aston, T. Bitterwolf, L. Branen, 8-Aminoquinoline Functionalized Silica Nanoparticles: a Fluorescent Nanosensor for Detection of Divalent Zinc in Aqueous and in Yeast Cell Suspension., *Appl. Mater. Interfaces.* 3 (2011) 1731–1739.
- [78] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Boston, 2006.
- [79] G. Orellana, Fluorescence Based Sensors, in: *Opt. Chem. Sensors*, Dordrecht, 2006: pp. 99–116.
- [80] J. Askim, M. Mahmoudi, K. Suslick, Optical sensor arrays for chemical sensing: the optoelectronic nose, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 8649–8682.
- [81] W. Wang, Y. Zhang, Q. Yang, M. Sun, X. Fei, Y. Song, Fluorescent and colorimetric magnetic microspheres as nanosensors for Hg<sup>2+</sup> in aqueous

solution prepared by a sol-gel grafting reaction and host-guest interaction, *Nanoscale*. 5 (2013) 4958–4965.

- [82] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2002.
- [83] K. Santos, *LIBS e nanopartículas fluorescentes: novas estratégias para determinação de íons cu (II) em águas*, 2012.
- [84] B. Valeur, *Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*, Weinheim, 2001.
- [85] L. Arbeloa, R. Ojeda, Fluorescence self-quenching of the molecular forms of Rhodamine B in aqueous and ethanolic solutions, *J. Lumin.* 44 (1989) 105–112.
- [86] J. Bowen, F. Wokes, *Fluorescence of Solutions*, 1953.
- [87] L. Arbeloa, Solvent effect on photophysics of the molecular forms of rhodamine B, *Chem. Phys. Lett.* 128 (1986) 474–479.
- [88] P. Sadkowski, G. Fleming, Photophysics of the acid and base forms of rhodamine B, *Chem. Phys. Lett.* 57 (1978) 526–529.
- [89] M. Snare, F. Treloar, K. Ghiggino, P. Thistlethwaite, The photophysics of rhodamine B, *J. Photochem.* 18 (1982) 335–346.
- [90] F. Arbeloa, R. Chaudhuri, Aggregation of rhodamine 3B adsorbed in Wyoming Montmorillonite aqueous suspensions., *J. Colloid Interface Sci.* 246 (2002) 281–267.
- [91] L. Arbeloa, B. Prieto, Adsorption of Rhodamine 3B Dye on Saponite Colloidal Particles in Aqueous Suspensions, *Langmuir*. 18 (2002) 2658–2664.
- [92] M. Chai, D. Zhang, M. Wang, H. Hong, Y. Ye, Y. Zhao, Four Rhodamine B-based fluorescent chemosensor for Fe<sup>3+</sup> in aqueous solution, *Sensors Actuators B Chem.* 174 (2012) 231–236.
- [93] K. Lima, I. Raimundo Jr., A. Silva, M. Pimentel, Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio, *Quim. Nova*. 32 (2009) 1635–1643.
- [94] L. Prodi, Luminescent chemosensors: from molecules to nanoparticles, *New J. Chem.* 29 (2005) 20–31.
- [95] A. Burns, P. Sengupta, T. Zedayko, B. Baird, U. Wiesner, Core/Shell fluorescent silica nanoparticles for chemical sensing: towards single-particle laboratories., *Small*. 2 (2006) 723–736.

- [96] D. Zhang, Z. Wu, J. Xu, J. Liang, J. Li, W. Yang, Tuning the emission properties of Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> doped silica nanoparticles by changing the addition time of the dye during the Stöber process, *Langmuir*. 26 (2010) 6657–6662.
- [97] R. Lucena, B. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Potential of nanoparticles in sample preparation, *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 620–637.
- [98] J. Liu, X. Yang, X. He, K. Wang, Q. Wang, Q. Guo, Fluorescent nanoparticles for chemical and biological sensing, *Sci. China Chem.* 54 (2011) 1157–1176.
- [99] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, Luminescent chemosensors based on silica nanoparticles, *Top. Curr. Chem.* 300 (2011) 93–138.
- [100] A. Dios, M. Díaz, Multifunctional nanoparticles: analytical prospects, *Anal. Chim. Acta*. 666 (2010) 1–22.
- [101] A. Blaaderen, J. Geest, A. Vrij, Monodisperse colloidal silica spheres from tetraalkoxysilanes: Particle formation and growth mechanism, *J. Colloid Interface Sci.* 154 (1992) 481–501.
- [102] R. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*, 896.
- [103] P. Jal, S. Patel, B. Mishra, Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions, *Talanta*. 62 (2004) 1005–1028.
- [104] S. Bonacchi, *Luminescence Applied in Sensor Science*, 2011.
- [105] T. Ogoshi, A. Harada, *Chemical Sensors Based on Cyclodextrin Derivatives*, *Sensors*. 8 (2008) 4961–4982.
- [106] J. Zheng, C. Xiao, Q. Fei, M. Li, B. Wang, G. Feng, A highly sensitive and selective fluorescent Cu<sup>2+</sup> sensor synthesized with silica nanoparticles, *Nanotechnology*. 21 (2010) 1–5.
- [107] Y. Zhao, Y. Sun, X. Lv, Y. Liu, M. Chen, W. Guo, Rhodamine-based chemosensor for Hg<sup>2+</sup> in aqueous solution with a broad pH range and its application in live cell imaging, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 4143–4147.
- [108] Z. Song, C. Xiao, Y. Dai, Q. Fei, Y. Huan, G. Feng, Fluorescence quenching amplification in silica nanosensors for Au<sup>3+</sup>, *Nanotechnology*. 23 (2012) 1–8.
- [109] E. Brasola, F. Mancin, E. Rampazzo, P. Tecilla, U. Tonellato, A fluorescence nanosensor for Cu<sup>2+</sup> on silica particles, *Chem. Commun.* 2 (2003) 3026–3027.

- [110] C. He, W. Zhu, Y. Xu, Y. Zhong, J. Zhou, X. Qian, Ratiometric and reusable fluorescent nanoparticles for  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  detection in aqueous solution and living cells, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 10755–10764.
- [111] M. Shahid, P. Srivastava, S. Razi, R. Ali, A. Misra, Detection of  $\text{Zn}^{2+}$  ion on a reusable fluorescent mesoporous silica beads in aqueous medium, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 77 (2012) 241–248.
- [112] Y. Zhang, L. Gao, L. Wen, L. Heng, Y. Song, Highly sensitive, selective and reusable mercury(II) ion sensor based on a ssDNA-functionalized photonic crystal film, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 11943–11949.
- [113] C. Fu, J. Wu, C. Xie, Y. Zhong, H. Liu, Rhodamine-based fluorescent probe immobilized on mesoporous silica microspheres with perpendicularly aligned mesopore channels for selective detection of trace mercury(II) in water, *Anal. Methods.* 5 (2013) 2615–2622.
- [114] F. Yan, D. Cao, N. Yang, M. Wang, L. Dai, C. Li, A rhodamine based fluorescent probe for  $\text{Hg}^{2+}$  and its application to cellular imaging., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 106 (2013) 19–24.
- [115] J. Lazarchick, Update on anemia and neutropenia in copper deficiency, *Curr. Opin. Hematol.* 19 (2012) 58–60.
- [116] X. Hu, J. Wang, X. Zhu, D. Dong, X. Zhang, S. Wu, A copper(II) rhodamine complex with a tripodal ligand as a highly selective fluorescence imaging agent for nitric oxide, *Chem. Commun.* 47 (2011) 11507–11509.
- [117] I. K uchler, F. Silva, M todo potenciom trico para determina o de cobre em cacha a, *Q. 22* (1999) 339–341.
- [118] C.- Lu, W. Liu, N. Zhao, L. Liu, D. Chen, Y. Zhang, Measurement and analysis of copper in soil using laser-induced breakdown spectroscopy, *Spectrosc. Spectr. Anal.* 30 (2010) 3132–3135.
- [119] E. Hashem, M. Seleim, A. El-Zohry, Environmental method for spectrophotometric determination of copper(II), *Green Chem. Lett. Rev.* 4 (2011) 241–248.
- [120] E.N. Gai o, R.S. Honorato, S.R.B. Santos, M.C.U. Ara jo, An automated flow-injection titrator for spectrophotometric determinations of total acidity in wines, using a single standard solution and gradient calibration, *Analyst.* 124 (1999) 1727–1730.

- [121] W. Seifert, A. Bosma, A. Brouwer, H. Hendriks, P. Roholl, R. Van Leeuwen, Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats., *Hepatology*. 19 (1994) 193–201.
- [122] J. Wu, W. Liu, J. Ge, H. Zhang, P. Wang, New sensing mechanisms for design of fluorescent chemosensors emerging in recent years., *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 3483–3495.
- [123] C. Lohani, J. Kim, S. Chung, J. Yoon, K. Lee, Colorimetric and fluorescent sensing of pyrophosphate in 100% aqueous solution by a system comprised of rhodamine B compound and Al<sup>3+</sup> complex., *Analyst*. 135 (2010) 2079–2084.
- [124] J. Bordini, I. Calandrelli, G. Silva, K. Ferreira, D. Leitão, E. Espreafico, A rhodamine-B-based turn-on fluorescent sensor for biological iron(III), *Inorg. Chem. Commun.* 35 (2013) 255–259.
- [125] E. Rampazzo, E. Brasola, S. Marcuz, F. Mancin, P. Tecilla, U. Tonellato, Surface modification of silica nanoparticles: a new strategy for the realization of self-organized fluorescence chemosensors, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 2687–2696.
- [126] A. Sikdar, S. Roy, K. Haldar, S. Sarkar, S. Panja, Rhodamine-based Cu<sup>2+</sup>-selective fluorosensor: synthesis, mechanism, and application in living cells, *J. Fluoresc.* 23 (2013) 495–501.