



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

KLECIA MORAIS DOS SANTOS

**LIBS E NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES: NOVAS
ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE ÍONS Cu(II) EM ÁGUAS**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

ORIENTADOR: PROF. DR. IVO MILTON RAIMUNDO JÚNIOR

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR KLECIA MORAIS DOS SANTOS, E ORIENTADA PELO PROF.DR. IVO MILTON RAIMUNDO JÚNIOR**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Sa59L Santos, Klecia Morais dos (1979-).
LIBS e nanopartículas fluorescentes: novas
estratégias para determinação de íons Cu(II) em águas /
Klecia Morais dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Ivo Milton Raimundo Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. LIBS. 2. Nanopartículas fluorescentes. 3. Polímero
de impressão molecular. 4. Cobre. I. Raimundo Júnior,
Ivo Milton. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: LIBS and fluorescent nanoparticles: new strategies for the determination of Cu(II) ions in water

Palavras-chave em inglês:

LIBS
Fluorescent nanoparticles
Molecularly imprinted polymer
Copper

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ivo Milton Raimundo Júnior [Orientador]
Maria das Graças Andrade Korn
Ana Paula Silveira Paim
Solange Cadore
Carla Beatriz Grespan Bottoli

Data de defesa: 18/04/2012

Programa de pós-graduação: Química

*Sempre chega a hora em que descobrimos que sabíamos muito
mais do que antes julgávamos.*

José Saramago.

*À minha querida mãe Ivanira (minha fortaleza)
dedico o resultado de anos de trabalho, uma conquista.
Muito obrigada mamí!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado nas horas difíceis e me permitir a concretização de mais uma etapa importante na minha vida.

Ao Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Jr. pela orientação, paciência, confiança e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. María Cruz Moreno-Bondi e ao Prof. Dr. Guillermo Orellana pela orientação, dedicação e grandiosa ajuda com os experimentos realizados no doutorado sanduíche na Espanha. *Muchas gracias, MariCruz!*

A todos do GSOLFA que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

Aos professores Jarbas Rohwedder e Celio Pasquini pelo apoio, ajuda e momentos divertidos no laboratório.

À Profa. Dra. Maria das Graças Korn pela orientação durante o estágio PROCAD realizado na UFBA.

À minha querida amiga Profa. Fátima por ter me incentivado e ter me oferecido a oportunidade de conhecer o IQ-UNICAMP.

À André Santos pela síntese dos reagentes luminescentes utilizados nesta tese.

À técnica Fabiana pela pesagem das amostras.

À minha grande amiga Juliana Cortez pelo apoio e carinho ao longo desses quase cinco anos de amizade. Muito obrigada Ju por estar ao meu lado nos momentos difíceis da minha vida e por compartilhar comigo as angústias e alegrias de um doutorado.

À Lívia pelos momentos “maravilhosos” no laboratório e pela divertida companhia nas jornadas árduas de trabalho. Muito obrigada Livildes!

À Silvia pela amizade, apoio, ajuda e pelos bons momentos que passamos juntas em Madrid.

À Laiane pela bela amizade que temos construído dia após dia e pela força, apoio e carinho. Muito obrigada “pequeninha”.

À Paula pela amizade singela e pelo carinho que tem me dedicado nos últimos meses.

Ao meu *design* e amigo Benedito pela amizade e pela construção das moléculas e da estrutura do “meu MIP lindo”. Obrigada Benezinho!

À minha amiga Juliana Santiago pelo desenho esquemático da síntese das nanopartículas. Obrigada Ju.

À Dani Pessoa e Dani Xavier pela maravilhosa companhia, força e amizade. Obrigada meninas!

À Lília e Eva pela amizade e companheirismo durante 4 anos e meio de doutorado. Obrigada meninas.

À minha grande amiga espanhola Sonia por fazer os dias em Madrid serem mais leves e divertidos. *Muchísimas gracias Sonia, por la amistad!*

Um agradecimento especial a Andréia Cavalcante pelos nossos 13 anos de amizade que começaram desde a graduação. “Muito obrigada amiguinha”.

Ao meu amigo Rogério por sempre ter me apoiado nos momentos difíceis.

À agência de fomento à pesquisa CAPES (PROCAD e MEC/DGU Espanha) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao INCTAA, Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas, pelo apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

Formação Acadêmica

- 2007 – 2012 **Doutorado em Ciências**
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
LIBS e Nanopartículas Fluorescentes: novas estratégias para
determinação de íons Cu(II) em águas
- 2004 – 2006 **Mestrado em Química Analítica**
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
- 1999 – 2004 **Graduação em Química Bacharelado**
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Formação Complementar

- 2009 – 2010 Universidade Complutense de Madrid - UCM
Estágio de Doutorado em Química Analítica (10/2009 – 09/2010)
- 2008 – 2008 Universidade Federal da Bahia – UFBA
Estágio de Doutorado em Química Analítica (02/2008 – 04/2008)

Atividades acadêmicas

Programa de estágio docente (2008)
Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Santos, K. M.; Moura, M.F.V.; Azevedo, F.G.; Lima, K.M.G.; Raimundo Jr., I.M.; Pasquini, C. “Classification of Brazilian coffee using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration”. *Analytical Letters* **2012**, 45, 774-781.

Santos, K.M.; Gondim, J.A.M.; Dantas, A.S.; Medeiros, R.L.S.; Moura, M.F.V. “Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2005**, 25, 825-827.

Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais:

Santos, K.M.; Santos, A.R.; Raimundo Jr. I.M.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M.C. “Luminescent sílica nanoparticles for selective detection of Cu(II) ions. XI Europt(r)ode, 2012, Barcelona.

Santos, K.M.; Santos, A.R.; Lima, K.M.G.; Raimundo Jr. I.M.; Moreno-Bondi, M.C.; Orellana, G. “Long-lived luminescent indicator dyes for heavy metals determination”. X Europt(r)ode, 2010, Praga.

Santos, K. M.; Raimundo Jr., I. M.; Cortez, J. ; Morte, E.S.B ; Korn, M. G.A. “Avaliação do uso de membranas extratoras para a determinação de metais em águas por LIBS”. 32^a Reunião Anual da SBQ, 2009, Fortaleza.

Santos, K.M.; Saldanha, T.C.B.; Hansil, F.A.; Pasquini, C.; Simões, S.S.; Lima, K.M.G. “Classification of Brazilian mate tea using wavelet transform and successive projection algorithm for variable selection”. 11th Conferência de Quimiometria em Química Analítica, 2008, Montpellier – França.

Santos, K.M.; Moura, M.F.V.; Lima, K.M.G.; Raimundo Jr. I.M.; Pasquini, C. “Classification of Brazilian coffee using near infrared spectroscopy”. 13th Conferência Internacional em Espectroscopia Conference on Near Infrared Spectroscopy, 2007, Vasa.

Cursos:

Infravermelho aplicado a análise de alimentos - UFBA (2008)

Microfabricação – UFPB (2008)

RESUMO

LIBS E NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES: NOVAS ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE ÍONS Cu(II) EM ÁGUAS

Neste trabalho diferentes fases sensoras foram desenvolvidas para implementar novas estratégias para a determinação de íons cobre em águas naturais, empregando Espectroscopia Óptica de Emissão em Plasma Induzido por Laser (LIBS) e Espectroscopia de Luminescência. Nas determinações por LIBS, membranas de PVC plastificadas foram empregadas para extração e pré-concentração de íons cobre em meio aquoso, fornecendo curvas analíticas na faixa de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ – 100mg L^{-1} ($R^2 > 0,90$). Esses estudos mostraram que a técnica LIBS é capaz de detectar íons cobre em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, indicando que membranas extratoras podem ser aplicadas como uma eficiente estratégia de pré-concentração. Dessa forma, LIBS pode ser considerada como uma potencial e viável ferramenta para determinação de íons Cu(II) em águas. Determinações baseadas em Espectroscopia de Luminescência foram realizadas usando o bis(1,10-fenantrolina)1-(4-hidroxi 3-(1H-imidazol [4,5-f][1,10] rutênio(II) bis hexafluorofosfato ([Ru(phen)₂HAIP](PF₆)₂), que foi imobilizado em membranas de metacrilato, de PVC e iônicas, sol-gel e nanopartículas (NP) de sílica. O reagente luminescente apresenta alta seletividade para íons Cu (II) em solução, enquanto somente as nanopartículas mostraram sensibilidade adequada para esse íon. As nanopartículas de sílica foram sintetizadas através do método Stöber, sendo que o reagente luminescente foi adicionado em diferentes estágios da síntese (0, 3, 6 e 8 horas), a qual foi realizada em um total de 10 horas. A microscopia de transição eletrônica (TEM) mostrou nanopartículas com diâmetros em torno de 10-20 nm. As nanopartículas sintetizadas pela adição do reagente após 8h de síntese apresentaram uma faixa linear entre $2,0$ – $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, um limite de detecção de $0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$, um limite de quantificação de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um tempo de resposta ($t_{90\%}$) < 30 s. A nanopartícula apresentou alta seletividade para íons cobre, não mostrando interferência dos íons Zn(II), Cd(II), Ni(II), Hg(II), Pb(II) e Fe(III). As nanopartículas foram aplicadas para determinação de íons Cu (II) em amostras de água mineral e de torneira que foram enriquecidas com $5,0$ e $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito. Recuperações na faixa de $88,1$ – $109,6\%$ foram obtidas, indicando a potencialidade das NPs fluorescentes para determinação de Cu(II) em águas. Além disso, os íons Cu (II) podem ser liberados na NP depois de tratamento ácido, sendo regenerado para um novo conjunto de medidas, tornando o reagente reutilizável, fato que está de acordo com os princípios da Química Verde.

ABSTRACT

LIBS AND FLUORESCENT NANOPARTICLES: NEW STRATEGIES FOR THE DETERMINATION OF Cu(II) IONS IN WATER

In this work, different sensing phases were developed to implement new strategies for determination of copper ions in natural waters, employing Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) and Luminescence Spectroscopy. In the determinations by LIBS, plasticized PVC membranes were employed for extraction and pre-concentration of copper ions in aqueous medium, providing analytical curves in the range from $10 \mu\text{g L}^{-1}$ to 100mg L^{-1} ($R > 0.90$). These studies have shown that LIBS is able to detect copper ions in concentrations as low as $\mu\text{g L}^{-1}$, indicating that extraction membranes can be applied as an efficient strategy of pre-concentration. In this way, LIBS can be considered as a potential and feasible tool for Cu(II) determination in waters. Determinations based on luminescence spectroscopy were performed by using the bis(1,10-phenanthroline)1-(4-hydroxy 3-(1H-imidazo [4,5-f][1,10] ruthenium(II) bis(hexafluorophosphate) reagent ($[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$), which was immobilized in methacrylate, PVC and ionic membranes, sol-gel silica and silica nanoparticles (NP). The luminescent reagent presented high selectivity to Cu(II) ions in solution, while only the silica nanoparticles showed adequate sensitivity to this ion. The nanoparticles were synthesized by the Stöber method, being the luminescent reagent added at different stages of the synthesis (0, 3, 6 and 8 hours), which was performed in a total interval of 10 hours. The transmission electron microscopy (TEM) showed nanoparticles with diameters around 10-20 nm. The nanoparticles synthesized by adding the reagent after 8 hours provided a linear response range from 2.0 to $8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, a detection limit of $0.30 \mu\text{mol L}^{-1}$, a quantification limit of $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ and response time ($t_{90\%}$) < 30 s. The nanoparticle presented high selectivity for copper ions, showing no interference of Zn(II), Cd(II), Ni(II), Hg(II), Pb(II) and Fe(III) ions. The nanoparticles were applied to determination of Cu(II) ions in mineral and tap water samples, which were spiked with 5.0 and $7.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ of the analyte. Recovery within 88.1–109.6% were attained, indicating the capability of the fluorescent NPs for Cu(II) determination in waters. In addition, the Cu(II) ions can be released from the NP by acidic treatment, being regenerated for another set of measurements, making the reagent reusable, fact that is in agreement with the principles of Green Chemistry.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	xviii
Lista de Tabelas	xxvii
Lista de Figuras	xxix

PREFÁCIO.....	1
---------------	---

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO	5
1.1.1. A química do cobre	10

CAPÍTULO 2

Espectroscopia Óptica de Emissão em Plasma Induzido por Laser - LIBS

2.1. INTRODUÇÃO	15
2.1.1. Espectroscopia de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS)	15
2.1.2. LIBS para determinação de cobre em amostras líquidas	19
2.2. OBJETIVOS	21
2.2.1. Geral	21
2.2.2. Específico	21
2.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
2.3.1. Reagentes utilizados	22
2.3.2. Faixa de concentração	22
2.3.3. Fabricação da membrana polimérica	22
2.3.4. Tempo de extração dos íons metálicos	24
2.3.5. Aquisição dos espectros LIBS	24
2.3.6. Tratamento dos dados.....	26

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
2.4.1. Seleção das linhas de emissão	28
2.4.2. Avaliação do tempo de extração	30
2.4.3. Análise Quantitativa.....	31
2.4.3.1. Estabilidade da membrana e da resposta analítica.....	34
2.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	36

CAPÍTULO 3

Sensores Luminescentes

3.1. INTRODUÇÃO.....	39
3.1.1. Espectroscopia de Luminescência	39
3.1.2. Polímero de Impressão Molecular - MIP	41
3.1.2.1. Polímero de Íon Impresso - IIP	46
3.1.3. Nanopartículas de Sílica Luminescentes.....	48
3.1.3.1. Método Stöber	51
3.1.3.2. Nanopartículas de sílica com MIP	54
3.1.3.3. Nanopartículas de sílica para Cu(II)	55
3.2. OBJETIVOS	62
3.2.1. Geral.....	62
3.2.2. Específico	62
3.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	63
3.3.1. Reagentes luminescentes	63
3.3.2. Reagentes e soluções	63
3.3.3. Instrumentação analítica.....	67
3.3.4. Sistema de medida	68
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
3.4.1. AVALIAÇÃO DE REAGENTES LUMINESCENTES EM SOLUÇÃO	70
3.4.1.1. Caracterização dos reagentes em solução	70

3.4.1.2. Seletividade frente a íons metálicos	72
3.4.1.3. Estequiometria de complexação	74
3.4.1.4. Constante de estabilidade	75
3.4.2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO	75
3.4.2.1. Membranas de metacrilato	76
3.4.2.1.1. Preparação das membranas de metacrilato	76
3.4.2.1.2. Avaliação das membranas de metacrilato	78
3.4.2.2. Membranas de PVC	81
3.4.2.2.1. Preparação das membranas de PVC	81
3.4.2.2.2. Avaliação da concentração de complexo de Ru(II)-par iônico	84
3.4.2.2.3. Avaliação de plastificantes	86
3.4.2.3. Membranas iônicas	89
3.4.2.3.1. Preparação das membranas iônicas	89
3.4.2.3.2. Avaliação da concentração de ligante	90
3.4.2.3.3. Estudo da estequiometria metal-ligante	91
3.4.2.4. Sol-gel	93
3.4.2.4.1. Síntese do Sol-gel	93
3.4.2.4.2. Avaliação dos precursores poliméricos	96
3.4.2.4.3. Avaliação da estequiometria metal-ligante	98
3.4.2.4.4. Avaliação da estequiometria ligante-precursor	99
3.4.2.5. Nanopartículas de sílica luminescentes	100
3.4.2.5.1. Síntese das nanopartículas de sílica	100
3.4.2.5.2. Estratégia de imobilização do complexo de Ru(II) na sílica	104
3.4.2.5.3. Caracterização das partículas de sílica	105
3.4.2.5.4. Estudo de interferentes	107
3.4.2.5.5. Avaliação das nanopartículas de NIP e MIP	108
3.4.2.5.6. Estudo de pH	111
3.4.2.5.7. Regeneração do sinal analítico do MIP	114
3.4.2.5.8. Resposta do NIP e MIP para Cu(II)	116

3.4.2.5.9. Desempenho analítico das NPs	121
3.4.2.5.9.1. Limite de detecção e quantificação	122
3.4.2.5.9.2. Tempo de resposta ($t_{90\%}$).....	122
3.4.2.5.9.3. Repetibilidade e Reprodutibilidade	122
3.4.2.5.9.4. Reutilização das nanopartículas	124
3.4.2.5.9.5. Comparação com outros nanosensores	127
3.4.2.5.10. Aplicação analítica	129
3.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	133

CAPÍTULO 4

Referências Bibliográficas	137
---	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAEB:** 4-(2-aminoetilamino)-N-(2-(2-aminoetilamino) etil) butanamida
- AAS:** Espectrometria atômica com chama
- ABDV:** 2,2'-azobis(2,4-dimetil valeronitrila)
- ACN:** Acetonitrila
- AHPM:** 3-(acriloiloxi)-2 hidroxipropil metacrilato
- AIBN:** 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila
- AQ:** 1-hidroxi-4-(prop-2'-eniloxi)-9,10-antraquinona
- CTAB:** Brometo de cetil-trimetil amônio
- DMDMS:** Dimetildimetoxisilano
- DOS:** Bis(2-etilhexil) sebacato
- EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGDMA:** Etilenoglicol dimetacrilato
- EPA:** Agência de proteção ambiental
- EtOH:** Etanol
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- FMS:** Sílica mesoporosa funcionalizada
- FSNP-15:** Nanopartícula de sílica funcionalizada
- FSNT:** Nanotubo de sílica funcionalizado
- GFAAS:** Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
- GSOLFA:** Grupo de Sensores Optoquímicos e Laboratório de Fotoquímica Aplicada
- HEMA:** 2-hidroxietil metacrilato
- ICCD:** Detector de carga acoplada intensificada
- ICP-MS:** Espectrometria de emissão óptica com espectrômetro de massa

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

IIP: Polímero de íon impresso

LIBS: Espectroscopia Óptica de Emissão em Plasma Induzido por Laser

MAA: Ácido metacrílico

MAH: Metacriloilamidohistidina

MBAA: N,N'-Metileno bis(acrilamida)

MCP: Placa multicanal

MeOH: Metanol

MIP: Polímero de impressão molecular

MSN: Nanopartícula de sílica mesoporosa

MTES: Metiltriétoxisilano

NaTPB: Tetrafenilborato de sódio

NIP: Polímero não impresso

NIST: Instituto Nacional de Padrões

NPOE: 2-nitrofenil octil éter

PAR: 4-(2-piridilazo) Resorcinol

PEGDA: Poli(etilenoglicol) diacrilato

PEI: Polietilenoimina

PCV: Violeta de pirocatecol

PVC: Cloreto de polivinila

QIOEt: N-(quinolina-8-il)-2-(3-trietoxisilil-propilamina)-acetamida

RBH: Rodamina B hidrazida

RBITC: Isotiocianato de rodamina B

[Ru(phen)₂bpytym](PF₆)₂: bis(1,10-fenantrolina)-N,N'-(2,2'-bipiridina-4,4'-diil)bis(2-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)acetamida)

rutênio(II) bis hexafluorofosfato

[Ru(phen)₂HAIP](PF₆)₂: bis(1,10-fenantrolina)1-(4-hidroxi 3-(1H-imidazol [4,5-f][1,10] rutênio(II) bis hexafluorofosfato

[Ru(phen)₂HMIP](PF₆)₂: [bis(1,10-fenantrolina)(2-2`hidroxi-5`-metoxifenil) imidazol [4,5-f] rutênio(II) bis hexafluorofosfato

TBEP: Tri(2-butoxietil) fosfato

TBP: Tributil fosfato

TEOS: Tetraetil ortosilano

THF: Tetrahidrofurano

TMOS: Tetrametil ortosilano

TMPET: Trimetilpropano etoxilato triacrilato

VP: 4-vinilpiridina

γ-MPTMS: γ-Mercaptopropiltrimetoxisilano

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição da membrana de PVC imobilizada com o reagente violeta de pirocatecol	23
Tabela 2.2. Condições experimentais utilizadas no sistema LIBS.....	26
Tabela 3.1. Composições das membranas de metacrilato imobilizadas com o reagente $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$	77
Tabela 3.2. Composições das membranas de PVC imobilizadas com o reagente $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$	82
Tabela 3.3. Composições de sol-gel empregadas para síntese do NIP.....	93
Tabela 3.4. Composições de sol-gel empregadas para síntese do MIP	95
Tabela 3.5. Composições das soluções empregadas na síntese das nanopartículas.....	101
Tabela 3.6. Comprimentos de onda máximos obtidos para as nanopartículas..	109
Tabela 3.7. Desvios-padrão relativos das medidas das NPs em função da concentração de $\text{Cu}(\text{II})$	123
Tabela 3.8. Comparação das características analíticas de alguns nanosensores aplicados para determinação de íons $\text{Cu}(\text{II})$	128
Tabela 3.9. Determinação de íons cobre em amostras de água mineral e água de torneira.....	129
Tabela 3.10. Resultados de regressão linear obtidos para amostras de água...	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de um instrumento LIBS	16
Figura 2.2. Estrutura química do reagente violeta de pirocatecol.....	20
Figura 2.3. Sistema de medidas do LIBS: (a) laser, (b) espelho, (c) lente de focalização, (d) suporte para amostra, (e) sistema de coleta de radiação (lente acoplada à fibra óptica).....	25
Figura 2.4. Esquema de amostragem para aquisição dos espectros de emissão.	27
Figura 2.5. Espectros de emissão das membranas poliméricas complexadas com cobre (200 mg L^{-1}) em solução de acetato de sódio pH 6,0.....	29
Figura 2.6. Estudo do tempo de extração de íons cobre.....	30
Figura 2.7. Curvas analíticas para cobre com concentrações de: (a) $2\text{--}80 \text{ mg L}^{-1}$ e (b) $20\text{--}100 \mu\text{g L}^{-1}$ usando membranas extratoras.....	31
Figura 2.8. Curvas analíticas para cobre com concentrações de: (a) $0,1\text{--}0,8 \text{ mg L}^{-1}$, (b) $1,0\text{--}8,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (c) $10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$ usando membranas extratoras....	33
Figura 2.9. Curvas analíticas para cobre construídas a partir de membranas preparadas em diferentes dias	35
Figura 3.1. Representação esquemática do processo de impressão molecular...42	
Figura 3.2. Representação esquemática de um nanosensor fluorescente.	49
Figura 3.3. Reações envolvidas no processo sol-gel	52
Figura 3.4. Célula de fluxo usada para medidas com as membranas.....	68

Figura 3.5. Célula de fluxo utilizada para empacotamento do sol-gel.....	69
Figura 3.6. Estrutura química dos complexos de Rutênio (a) [Ru(phen) ₂ HAIP](PF ₆) ₂ , (b) [Ru(phen) ₂ HMIP](PF ₆) ₂ e (c) [Ru(phen) ₂ bpytym](PF ₆) ₂	70
Figura 3.7. (a) Espectros de absorção e (b) emissão dos reagentes luminescentes	71
Figura 3.8. Estudo de pH dos reagentes luminescentes na presença de diferentes íons metálicos: (a) [Ru(phen) ₂ HAIP](PF ₆) ₂ , (b) [Ru(phen) ₂ HMIP](PF ₆) ₂ e (c) [Ru(phen) ₂ bpytym](PF ₆) ₂	73
Figura 3.9. (a) Espectros de emissão do complexo de Ru(II) 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ na presença de cobre (0 – 3,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) e (b) variação da intensidade de fluorescência em função da relação [Cu(II)]/[Ru(phen) ₂ HAIP](PF ₆) ₂	74
Figura 3.10. Espectros de excitação e emissão obtidos para as membranas de metacrilato.....	79
Figura 3.11. Resposta das membranas de metacrilato na presença de íons Cu(II): (a) membrana C e (b) membrana E.....	80
Figura 3.12. Espectros de excitação e emissão obtidos das membranas de PVC.	84
Figura 3.13. Resultados obtidos para as membranas com diferentes plastificantes.....	87
Figura 3.14. Espectros de emissão obtidos para membranas iônicas em diferentes concentrações de indicador.....	91

Figura 3.15. Espectros de emissão obtidos para membranas iônicas com diferentes estequiometrias Metal-Ligante (a) Biodyne C, (b) S&S.	92
Figura 3.16. Resposta do sol-gel (NIP) em função de diferentes concentrações de Cu(II) em tampão fosfato.....	97
Figura 3.17. Resposta do sol-gel (MIP) em função de diferentes concentrações de Cu(II) em tampão fosfato.....	98
Figura 3.18. Esquema do sistema utilizado na síntese das nanopartículas de sílica pelo método Stöber	102
Figura 3.19. Fotografia das nanopartículas de sílica baseadas em NIP e MIP.	103
Figura 3.20. Representação da estratégia de imobilização do complexo de Ru(II) na sílica durante o processo de síntese.....	104
Figura 3.21. Imagens de TEM das nanopartículas de sílica para NIP-0 e NIP-8	106
Figura 3.22. Interferência de outros íons metálicos com cobre..	108
Figura 3.23. (a) Espectros de emissão das NPs em diferentes tempos de adição do complexo na reação (0, 3, 6 e 8h), (b) máximos de emissão obtidos para cada nanopartícula.....	109
Figura 3.24. Espectros de emissão das nanopartículas em diferentes valores de pH: (a) NIP-0 na ausência de Cu(II) e (b) NIP-0 na presença de Cu(II), (c) NIP-6 na ausência de Cu(II) e (d) NIP-6 na presença de Cu(II).	112
Figura 3.25. Resultados obtidos para (a) regeneração da intensidade de emissão dos MIPs e (b) $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão em função do tempo.	115

Figura 3.26. (a) Resposta do NIP em função da concentração de Cu(II). (b) Resposta do NIP-8 para Cu(II) em diferentes valores de pH.....	118
Figura 3.27. Resposta do MIP em função da concentração de Cu(II).....	120
Figura 3.28. Medidas de repetibilidade e reprodutibilidade para NIP-8 em diferentes concentrações de cobre.	123
Figura 3.29. Regeneração do sinal analítico do NIP-8 usando-se HCl 0,5 mol L ⁻¹ . ([Cu(II)] = 8,0 μmol L ⁻¹).....	125
Figura 3.30. Curvas analíticas para NIP-8 em função da concentração de Cu(II) com e sem reutilização da NP.....	126
Figura 3.31. Curvas analíticas obtidas para diferentes amostras de água	131

PREFÁCIO

Esta tese está dividida em quatro capítulos. O **capítulo 1** contém uma introdução geral que aborda alguns aspectos relevantes deste trabalho. O **capítulo 2** diz respeito a aplicação da técnica de Espectroscopia Óptica de Emissão em Plasma Induzido por Laser (LIBS) empregando-se membranas extratoras de íons metálicos em meio aquoso. Neste capítulo será descrita uma breve introdução sobre a técnica LIBS e sobre os íons cobre. Além disso, também será apresentada a parte experimental, discussão dos resultados, conclusões e perspectivas.

O **capítulo 3** é dedicado ao uso de sensores luminescentes sendo composto por quatro partes principais. Na primeira parte, será apresentada uma introdução envolvendo a fundamentação teórica sobre espectroscopia de luminescência, polímeros de impressão molecular e nanopartículas de sílica fluorescentes, cujo objetivo é apresentar informações básicas e relevantes ao leitor para facilitar a interpretação dos resultados obtidos. Na segunda parte, será mencionada a parte experimental e na terceira será abordada a avaliação das características espectroscópicas de novos reagentes luminescentes em meio aquoso, na ausência e na presença de distintos íons metálicos. A quarta e última parte trata do uso de diferentes técnicas de imobilização para desenvolvimento de fases sensoras. Nesta será abordada a discussão sobre os resultados obtidos para cada sensor desenvolvido, as conclusões finais e as perspectivas futuras. Por fim, no **capítulo 4** serão apresentadas as referências bibliográficas citadas no decorrer da tese.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

A determinação quantitativa de espécies metálicas em sistemas aquosos tem sido bastante explorada ao longo dos anos, especialmente no caso dos íons metálicos pesados, devido a sua toxicidade que afeta diretamente o meio ambiente e a saúde humana (*Moore & Ramamoorthy, 1984*).

A quantificação de íons metálicos é frequentemente realizada utilizando-se técnicas espectrométricas, tais como a espectrometria de absorção atômica (AAS e GFAAS,) e espectrometria de emissão atômica (ICP OES e ICP-MS) (*Pomazal et al., 1999; Moldovan et al., 2002; Saracoglu et al., 2003; Iyer & Ressler, 2004*). Estas análises necessitam de pré-tratamento e preparo da amostra, que demandam tempo e considerável quantidade de reagentes. Tendo em vista estas dificuldades, pesquisadores do mundo inteiro têm se dedicado a desenvolver métodos analíticos alternativos e confiáveis com boa relação custo-benefício. Assim sendo, o avanço da ciência tem levado ao surgimento de novas vertentes que passaram a ser alvo de pesquisas na atualidade.

Dentre estas vertentes, encontram-se os sensores químicos que tem sido uma das áreas mais estudadas nas últimas três décadas, consagrando-se como uma fascinante área de pesquisa, a qual vem mudando radicalmente a potencialidade das análises químicas.

De acordo com a definição da IUPAC, um sensor químico é um dispositivo que transforma a informação química em um sinal analiticamente utilizável. É um dispositivo que pode ser miniaturizado e pode responder seletiva e reversivelmente a compostos químicos ou a íons, produzindo um sinal elétrico que depende da concentração do analito (*Hulanicki et al., 1991*).

Os sensores químicos são constituídos basicamente por uma fase sensora, um transdutor e um processador de sinal. O princípio de funcionamento de um

sensor químico (óptico) baseia-se na interação de espécies químicas com a luz empregando-se técnicas de absorção, emissão e reflexão (*Hulanicki et al., 1991; Wolfbeis, 1991; Wang, 2011*). Assim, os sensores químicos são considerados versáteis, pois permitem a utilização de instrumentação analítica diversificada (UV-VIS, NIR, IR, etc) (*Wang, 2011*). Além disso, podem ser usados com fibras ópticas (permitindo monitoramento remoto) e com diferentes sistemas de imobilização da fase sensora, atuando como um dispositivo simples que pode fornecer informações químicas valiosas quando aplicado adequadamente (*Wolfbeis & Oehme, 1997*). Diante destas vantagens, grande parte dos sensores desenvolvidos vem sendo aplicada na determinação de íons metálicos, devido à sua simplicidade, baixo custo, reprodutibilidade e robustez.

Nos dias atuais, o *design* e eficiência destes sensores têm sido discutidos e explorados por químicos, físicos, biólogos e engenheiros que, juntos, colaboram para obter um sistema sensorial com aplicação desejável. O principal desafio do químico nesta multidisciplinaridade consiste em desenvolver uma interface entre o próprio dispositivo (sensor) e a matriz a ser analisada (parte que interage diretamente com o analito). Neste sentido, as características do material suporte e da metodologia de imobilização são critérios essenciais para a confecção de sensores com bom desempenho analítico. Como reflexo deste desafio, diversas fases sensoras imobilizadas com reagentes cromogênicos ou fluorogênicos, vêm sendo construídas e relatadas na literatura moderna. O uso de diferentes fases sensoras inclui suportes sólidos distintos, tais como membranas de PVC (*Raya et al., 2004; Mahajan & Sood, 2007*), membranas iônicas (*Guo et al., 2010*), membranas baseadas no método sol-gel (*Moreno, 1994; Díaz-García et al., 2006*), nanopartículas de sílica (*Jung et al., 2010; Kang et al., 2010*), entre outros.

Neste contexto, sensores preparados pelo método sol-gel merece destaque por ser um método que permite a preparação de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos (pós de vidros, filmes finos, etc.) (*Santilli et al., 1995*). A sílica é o material mais comumente empregado no processo sol-gel e sua versatilidade oferece a possibilidade de obter um sistema multifuncional sofisticado (*Brinker & Scherer, 1990*). Como fruto desta tecnologia, nanopartículas de sílica fluorescentes vêm sendo preparadas com êxito através do processo sol-gel. As nanopartículas de sílica atuam como suporte sólido e podem ser dopadas com diferentes tipos de reagentes luminescentes, tal como os complexos de rutênio (*Moreno-Bondi et al., 1998; Orellana et al., 1999; Glomm et al., 2005; Tfouni et al., 2010*). Essa classe de nanopartículas pode se estabelecer como uma nova alternativa para determinação de íons metálicos em amostras com aplicação biológica, toxicológica e ambiental (*Wiesner & Burns, 2006; Bonacchi et al., 2011; Prodi et al., 2011*).

Outro aspecto relevante na área dos sensores ópticos é o surgimento dos Polímeros de Impressão Molecular (MIP). Os MIPs são polímeros sintéticos para *design* de materiais de reconhecimento molecular (proteínas, aminoácidos, poluentes, etc), que origina uma memória macromolecular altamente seletiva ao analito de interesse. Os MIPs vêm sendo utilizados como elementos de reconhecimento na criação de sensores químicos (*Rao et al., 2007; Moreno-Bondi et al., 2008*). Desde então, muitos progressos têm sido alcançados utilizando-se este novo material, que atende a amostras de relevância ambiental, clínica, biotecnológica, etc.

Desse modo, os polímeros impressos representam uma importante ferramenta analítica empregada para viabilizar o uso de sensores ópticos, configurando-se em uma estratégia a ser explorada e avaliada, sendo este um dos objetivos deste trabalho.

Com relação ao sistema de detecção de íons metálicos com sensores químicos, a literatura tem apontado várias técnicas analíticas voltadas para este fim. A Espectroscopia de Luminescência é uma técnica clássica bem estabelecida e consolidada, bastante utilizada no ramo de sensores químicos. Muitas fases sensoras são compostas por reagentes luminescentes que sofrem supressão (*quenching*) de fluorescência na presença de íons metálicos pesados (*quencher*) (Valeur, 2002; Skoog et al., 2006). Neste caso, a espectroscopia de luminescência desempenhou um papel importante neste trabalho, já que parte desta tese é dedicada ao uso de sensores luminescentes, onde a performance analítica destes dispositivos depende primordialmente das suas propriedades espectroscópicas.

Outra técnica que pode ser aplicada para determinação de espécies metálicas é a Espectroscopia Óptica de Emissão em Plasma Induzido por Laser (LIBS) (Pasquini et al., 2007; Singh & Thankur, 2007). LIBS é considerada uma técnica pouco explorada, comparada às técnicas convencionais de análise. Todavia, vem conquistando seu espaço dentro da química analítica moderna em virtude de algumas características relevantes, como por exemplo, sua capacidade de determinar vários elementos químicos simultaneamente.

Por este motivo, LIBS foi adotado neste trabalho como um sistema de detecção alternativo e diferenciado frente aos sistemas convencionais. A finalidade, neste caso, foi dar ênfase à aplicação do LIBS (como uma nova instrumentação analítica) a fim de inserí-lo na área de sensores químicos. Para tanto, LIBS foi associado ao uso de membranas poliméricas para pré-concentração de íons metálicos tóxicos em meio aquoso.

Vale salientar que a abordagem de LIBS e os estudos aqui apresentados são de caráter preliminares, onde o foco desta pesquisa não está voltado para

uma discussão detalhada da técnica e, sim em apresentá-la e incluí-la na área de sensores no controle de poluentes ambientais.

Em suma, esta tese baseia-se em duas principais estratégias. A primeira se refere a busca de uma novo sistema para detecção de íons em sensores, onde LIBS representa uma importante ferramenta para quantificação destes íons. A segunda diz respeito a criação de diferentes estratégias de imobilização em sensores luminescentes, preparados com complexos de rutênio fluorescentes, em matrizes diversificadas.

Para avaliar as características analíticas dos sensores construídos, o íon Cu(II) foi escolhido como analito alvo (ou íon modelo). O desenvolvimento de novos dispositivos sensoriais e de procedimentos analíticos seletivos e sensíveis a íons cobre apresenta considerável interesse na atualidade. Sem dúvida, a química do cobre juntamente com sua facilidade de complexação com diferentes compostos químicos, propiciou sua utilização neste trabalho. Vale salientar que, em condições experimentais adequadas os sensores apresentados nesta tese podem ser aplicados para outros íons metálicos em meio aquoso.

Dentro deste contexto, a finalidade geral deste trabalho consiste em investigar diferentes tipos de fases sensoras (com e sem formação de MIP) para a construção de um sensor óptico dedicado à análise de íons metálicos em sistemas aquosos, empregando-se as técnicas de fluorescência e de LIBS. Um ponto relevante é que esta combinação permite contribuir com a química limpa tão difundida nos dias atuais.

1.1.1. A QUÍMICA DO COBRE

O cobre é um elemento traço essencial a saúde humana. É um micronutriente que exerce importante função nos processos biológicos que vão desde a formação óssea e respiração celular ao desenvolvimento do tecido conjuntivo. Em excesso, o cobre tem um efeito adverso na saúde humana causando anemia, desordens neurológicas e danos hepáticos (*Moore & Ramamoorthy, 1984*).

A contaminação de cobre e seu potencial efeito tóxico em seres humanos continuam sendo um desafio em todo o mundo devido ao seu uso na agricultura e na indústria. Por este motivo, o monitoramento da concentração de cobre em amostras ambientais é de suma importância. Para controlar estas concentrações, alguns órgãos competentes têm estabelecido normas para monitorar o teor máximo deste íon em amostras de águas.

De acordo com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357, de 17 de março de 2005) (*CONAMA, 2005*) que regulamenta e define o padrão de potabilidade de águas, o valor máximo permitido de íons cobre em águas doces brasileiras é de $9,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Em águas doces, o nível de cobre solúvel varia de $0,5$ a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Em áreas urbanas este valor pode ser $\geq 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Este íon é altamente tóxico para plantas aquáticas e peixes, com LC50 de $0,017$ a $1,0 \text{mg L}^{-1}$ (*Moore & Ramamoorthy, 1984*).

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos, estabelece o nível máximo de cobre permitido em água potável que corresponde a $1,3 \text{mg L}^{-1}$ ($\sim 20 \mu\text{mol L}^{-1}$).

O cobre pertence a terceira série dos metais de transição e sua subcamada *d*, parcialmente preenchida, é responsável pela grande variação de suas propriedades espectrais, magnéticas e capacidade de complexação. São

conhecidos complexos de cobre nos estados de oxidação 1+, 2+ e 3+, sendo o 2+ o mais comum entre eles (*Moore & Ramamoorthy, 1984*).

Em ambientes aquáticos, o cobre dissolvido pode se encontrar na forma de íons livres e/ou complexado com ligantes orgânicos e inorgânicos. Dessa forma, o cobre forma complexos com bases duras (carbonato, nitrato, sulfeto, cloreto, amônia e hidróxido), com ligantes neutros (bipiridina) e com ligantes contendo nitrogênio e enxofre em suas estruturas (azo-compostos derivados do reagente 8-aminoquinolina, violeta de pirocatecol) (*Moore & Ramamoorthy, 1984; Kumar & Kaur, 2011*). Normalmente, o cobre apresenta quatro sítios de coordenação, fornecendo uma geometria quadruplanar. Com relação a estequiometria de complexação, este íon pode se combinar em diferentes proporções metal-ligante (1:1, 1:2), onde esta proporção depende dos sítios de coordenação do ligante empregado.

O destino de cobre elementar em água é complexo e depende do pH do meio, do oxigênio dissolvido e da presença de agentes oxidantes e compostos quelantes. Em água pura, o íon Cu(II) é o estado de oxidação mais comum (*USEPA, 1995; Stumm & Morgan, 1996*).

Os compostos de coordenação deste metal têm sido bastante investigados (*Kumar & Kaur, 2011*), onde a composição, a estrutura do complexo de cobre e suas propriedades fotoquímicas são fundamentais para compreender os mecanismos de reação que ocorrem entre o íon metálico e o ligante livre (*Sýkora, 1997; Hu et al., 1998; Chavan et al., 2011; Fan et al., 2012; Li et al., 2012*).

Assim existe um grande número de procedimentos luminescentes (diretos e indiretos) para determinação de íons cobre, o qual envolve diferentes mecanismos de reação (*Pechishcheva & Shunyaev, 2008; Iyer & Ressler, 2004*). Estes procedimentos são baseados na habilidade que este íon tem de

suprimir a fluorescência de reagentes orgânicos na formação de complexos. Deve-se considerar que estes compostos devem conter grupos quelantes com alta afinidade para íons cobre.

A interação do íon Cu(II) com um luminóforo pode ocorrer através de três métodos: (1) o íon cobre suprime a fluorescência do luminóforo, (2) o íon cobre provoca o aumento da intensidade de fluorescência do luminóforo e (3) uso de fluorescência intrínseca de íons cobre, neste caso, o tipo de luminescência é característico da transição eletrônica do complexo de cobre ($d^* \rightarrow d$).

Sem dúvida, o cobre é um dos elementos químicos mais investigados nos últimos tempos. Sua apreciável reatividade contribui para que este íon seja amplamente explorado.

CAPÍTULO 2
ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO
ÓPTICA EM PLASMA INDUZIDO
POR LASER - LIBS

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓPTICA EM PLASMA INDUZIDO POR LASER (LIBS)

A literatura tem apontado diversas técnicas analíticas empregadas na determinação de íons metálicos. Neste âmbito, a Espectroscopia Óptica de Emissão em Plasma Induzido por Laser, conhecida pela sigla **LIBS** (do inglês, *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*), tem se destacado por sua simplicidade instrumental e possibilidade de realizar “análise direta” (*Pasquini et al., 2007; Singh & Thankur, 2007*).

No sistema LIBS um pulso de laser de alta potência é focalizado sobre uma pequena superfície da amostra, provocando o aquecimento e a ruptura do material. O material ablado se expande e produz um plasma de elevada temperatura, o qual desencadeia os processos de atomização, excitação e emissão das espécies (átomos, íons e moléculas) presentes na amostra (*Cortez, 2007*). Logo, o princípio do LIBS baseia-se na análise espectral da radiação proveniente do plasma gerado, onde a emissão característica do plasma fornece uma impressão digital dos constituintes da amostra. Essa emissão da radiação, a partir das espécies excitadas, possibilita a realização de análises qualitativas e quantitativas.

Com relação à instrumentação analítica, o sistema LIBS é constituído basicamente por um laser, um sistema de coleta e condução de radiação, monocromador ou policromador, detector e computador, como pode ser visualizado na Figura 2.1.

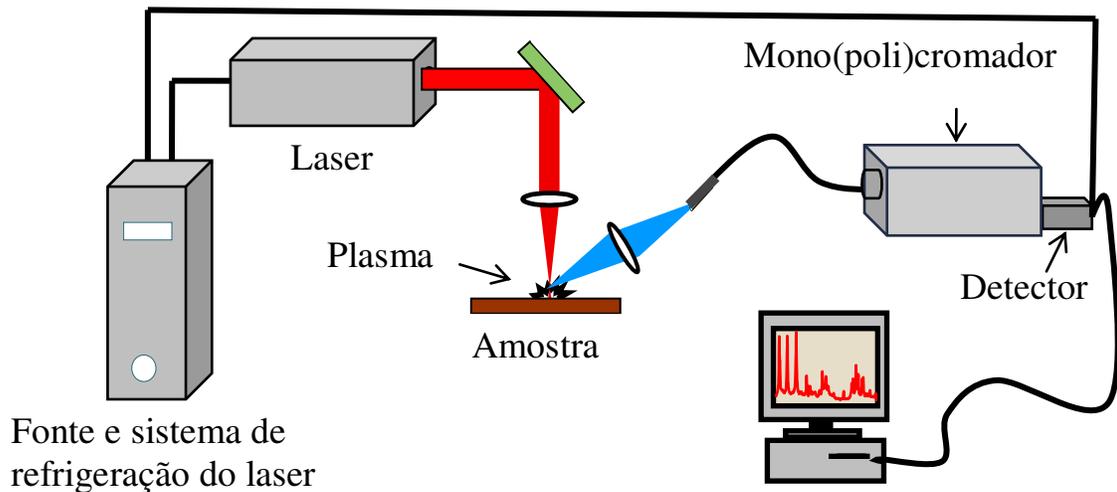


Figura 2.1. Esquema de um instrumento LIBS.

O laser é o responsável pela vaporização, atomização e excitação dos constituintes da amostra. Fibras ópticas e/ou lentes coletam a radiação proveniente do plasma e a conduzem para a fenda do mono(poli)cromador.

O mono(poli)cromador, por sua vez, separa a radiação em diferentes comprimentos de onda. Essa informação é lida por um detector e convertida em um espectro de emissão unidimensional, acessado por um computador.

Maiores informações sobre o princípio de funcionamento da técnica e detalhes da instrumentação analítica do sistema LIBS podem ser encontradas na literatura (*Cremers & Radziemski, 2006; Cortez, 2007; Pasquini et al., 2007; Singh & Thankur, 2007*).

LIBS é uma técnica multielementar que exige pouco ou nenhum tratamento da amostra, proporcionando economia de tempo e evitando erros advindos do processo de tratamento da amostra. É uma técnica praticamente não-destrutiva, visto que somente cerca de nanogramas a microgramas de amostra são consumidos em cada ponto amostrado e dependendo do laser

empregado é impossível visualizar (a olho nu) a região atingida pelo laser. Instrumentos portáteis que utilizam fibras ópticas podem ser empregados para análises *online* e *in situ*, o que é bastante atrativo para aplicações industriais e ambientais (Bousquet et al., 2008; Laserna et al., 2009; Laserna & Fortes, 2010; Dyar et al., 2012). Todas essas vantagens associadas à sua simplicidade fazem com que LIBS seja uma das técnicas mais versáteis já desenvolvidas e por isso tenha um campo de atuação muito amplo.

Os limites de detecção da técnica são altos comparados aos valores alcançados por técnicas analíticas já consolidadas (por exemplo, ICP OES), situando-se comumente na faixa de “mg L⁻¹” (Cremers & Radziemski, 2006; Singh & Thankur, 2007).

As medidas por LIBS também sofrem com a falta de reprodutibilidade, a qual é provocada tanto pela formação do plasma que envolve processos complexos quanto pela característica da medida “pontual” da técnica (a região amostrada é definida pelo foco do laser). Isso faz com que a medida se torne mais susceptível a falta de homogeneidade da amostra do que outras técnicas analíticas. Embora essa característica seja extremamente vantajosa para a microanálise e para obras de valor cultural (artefatos arqueológicos e obras de arte) (De Giacomo et al., 2008; Erdem et al., 2008; Fortes et al., 2008), ela dificulta a análise quantitativa. A solução é aumentar o número de pontos amostrados por amostra a fim de melhorar a representatividade e diminuir os desvios das medidas e, ainda pode-se amostrar várias vezes o mesmo ponto da amostra (Singh & Thankur, 2007).

LIBS não tem nenhuma restrição com relação ao tipo de amostra analisada, podendo essa estar no estado sólido, gasoso e líquido. Porém, na análise de amostras líquidas a técnica apresenta algumas dificuldades. Parte da energia do laser é empregada para vaporizar o solvente da solução, diminuindo a

energia empregada nos processos de formação do plasma e excitação das espécies, o que repercute na diminuição da sensibilidade da medida. Além disso, a parte óptica do sistema tem que ser adaptada para que não seja danificada pelo solvente que se projeta na direção do pulso de laser. Em virtude destas e também de outras dificuldades inerentes ao processo de formação do plasma em líquidos, poucos trabalhos dedicam-se a amostras líquidas quando comparados ao volume total de trabalhos na literatura.

Uma estratégia que tem sido proposta na literatura para contornar os problemas existentes nas medidas de amostras líquidas por LIBS é o uso de substratos sólidos. O(s) analito(s), presente(s) na amostra líquida é (são) transferido(s) para o substrato, eliminando os problemas das medidas nos líquidos por LIBS, já que o analito está presente no substrato sólido. Os substratos que têm sido empregados são papel, grafite, madeira, membranas de troca iônica e placas metálicas (*Wal et al., 1999; Chen et al., 2008; Chinni et al., 2010; Sarkar et al., 2010*).

As membranas poliméricas são capazes de extrair os íons metálicos da solução de interesse e podem servir também como substrato para medidas em líquidos, empregando-se a técnica LIBS. Além da membrana servir como substrato para a amostra líquida, ela tem a vantagem de proporcionar a pré-concentração do analito, que é muito vantajosa para a técnica porque possibilita uma diminuição dos limites de detecção, podendo alcançar limites no nível de “ $\mu\text{g L}^{-1}$ ”. A fim de avaliar o potencial do uso de sensores poliméricos na técnica de LIBS, escolheu-se o cobre como analito.

2.1.2. LIBS para determinação de cobre em amostras líquidas

Poucos são os trabalhos que relatam a determinação de cobre em amostras líquidas empregando LIBS. Fichet *et al.* (2001) quantificaram cobre, e mais outros onze metais, em água e em óleo, obtendo limites de detecção de 7 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cobre, respectivamente. As medidas LIBS foram feitas com o laser inclinado a um ângulo de 15° com relação à superfície da amostra para minimizar projeção da mesma.

Outros quatro trabalhos empregam substratos sólidos para a quantificação de cobre. Goode e Schmidt (2002) determinaram simultaneamente dez metais, incluindo cobre, usando uma membrana de troca iônica através da qual era possível também pré-concentrar os íons metálicos. Dois métodos de preparação das amostras foram investigados: ativo e passivo. No método passivo, a membrana é colocada diretamente em contato com a solução de interesse e os íons da solução entram em equilíbrio com os sítios ativos da membrana concentrando o analito. A filtração é utilizada como método ativo e permite uma pré-concentração maior aumentando o volume da solução. O melhor limite de detecção obtido para o cobre foi de $0,0042 \mu\text{g mL}^{-1}$ empregando o método ativo.

Chen *et al.* (2008) utilizaram placas de madeira que foram imersas nas soluções contendo os metais de interesse, por alguns minutos. O limite de detecção obtido para o cobre com esse procedimento foi de $0,029 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já o substrato escolhido por Wal e colaboradores (1999) foi a placa de grafite amorfo empregada em microscopia eletrônica. Cerca de 1 mL da solução de interesse era depositada sobre a placa e evaporada com aquecimento brando. O cobre e mais quatorze metais foram quantificados, e o seu limite de quantificação foi de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já Lu *et al.* (2010) usaram placas de alumínio para fazer a

pré-concentração eletroquímica do cobre, obtendo o limite de detecção de $0,034 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A membrana polimérica empregada nesse trabalho é baseada na imobilização de reagentes orgânicos e nessa aplicação específica o reagente escolhido foi o violeta de pirocatecol, o qual foi imobilizado em uma matriz de PVC (Steinber *et al.*, 2003).

O violeta de pirocatecol é um reagente fotométrico que tem sido bastante explorado devido a sua capacidade de formar complexos com uma variedade de íons metálicos (Cheng *et al.*, 1982), sendo utilizado para pré-concentração de distintos íons metálicos, Cu(II), Mn(II), Cd(II), Pb(II), Ni(II), Co(II) (Narin *et al.*, 2000 e 2004; Buke *et al.*, 2009). A Figura 2.2 mostra a estrutura química deste reagente.

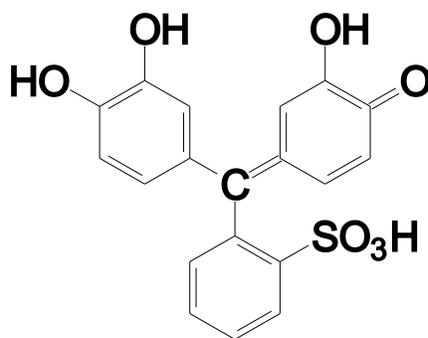


Figura 2.2. Estrutura química do reagente violeta de pirocatecol.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. GERAL:

Avaliar o potencial de membranas poliméricas extratoras para determinação de íons Cu(II) em sistemas aquosos usando-se a técnica LIBS, visando contornar os problemas encontrados nas medidas de líquidos.

2.2.2. ESPECÍFICO:

- Empregar membranas extratoras de PVC plastificado e empregá-las como substrato sólido para extração e pré-concentração de íons Cu(II) em águas.
- Diminuir os limites de detecção característicos da técnica LIBS para alcançar o nível de $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.3. PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1. REAGENTES UTILIZADOS

- Cloreto de polivinila, PVC de alto peso molecular (Fluka)
- Violeta de pirocatecol, VP (Merck)
- Brometo de cetil-trimetil amônio, CTAB (Sigma)
- Bis(2-etilhexil) sebacato, DOS (Sigma)
- Tetrahidrofurano destilado, THF (Synth)
- Nitrato de cobre pentahidratado (Merck)
- Acetato de sódio (Synth)

2.3.2. FAIXA DE CONCENTRAÇÃO

As análises foram realizadas utilizando-se soluções de referência de cobre ($20 \mu\text{g L}^{-1}$ – 200mg L^{-1}) preparadas em solução de acetato de sódio ($0,02 \text{mol L}^{-1}$) pH 6,0. As soluções foram obtidas a partir da diluição da solução de referência de 1000mg L^{-1} de íon cobre.

2.3.3. FABRICAÇÃO DA MEMBRANA POLIMÉRICA

As membranas poliméricas foram preparadas de acordo com a composição mostrada na Tabela 2.1 (*Steinber et al., 2003*). Os reagentes foram dissolvidos em 1,5 mL de THF destilado e submetidos a agitação em ultrassom durante 30 minutos.

Tabela 2.1. Composição da membrana de PVC imobilizada com o reagente violeta de pirocatecol.

Componentes	Massa / mg	% m/m
PVC	40,0	31,34
VP ^a	4,0	3,13
CTAB ^b	4,0	3,13
DOS ^c	79,63	62,40

^a Complexante

^b Íon lipofílico

^c Plastificante

Para a confecção das membranas foi empregada a técnica *dip coating*. Essa técnica consiste em mergulhar o suporte sólido (fita de poliéster) na mistura desejada sob velocidade controlada e conhecida, com a finalidade de obter filmes homogêneos e uniformes.

O instrumento utilizado para fabricação das membranas foi um *Dip Coater* (Construmaq) pertencente ao Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES) do Instituto de Química da UNICAMP.

A espessura das membranas foi controlada mantendo-se constante a velocidade de puxamento em 10 cm min^{-1} , com 2 camadas sobrepostas da mistura. As membranas foram armazenadas em dessecador por 24 h até evaporação do solvente.

Em cada fita de poliéster foram preparados dois filmes, que correspondem ao lado direito e inverso da fita (lado 1 e lado 2). Membranas foram obtidas com as seguintes dimensões: 1,0 cm de largura, 2,5 cm de comprimento com aproximadamente $3,0 \mu\text{m}$ de espessura.

2.3.4. TEMPO DE EXTRAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS

A extração dos íons metálicos foi feita por imersão das membranas em 8 mL de solução tamponada de cobre (40 mg L^{-1}). Foram investigados diferentes intervalos de tempo de extração: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos.

2.3.5. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS LIBS

Para realização das medidas empregou-se o instrumento LIBS *lab-made* mostrado na Figura 2.3, constituído por um laser Nd:YAG (1064 nm), um policromador *echelle* e um detector ICCD (detector de carga acoplada intensificada). O sensor era posicionado no suporte de alumínio mostrado na letra (d) da Figura 2.3, sustentando um pedaço de papel.

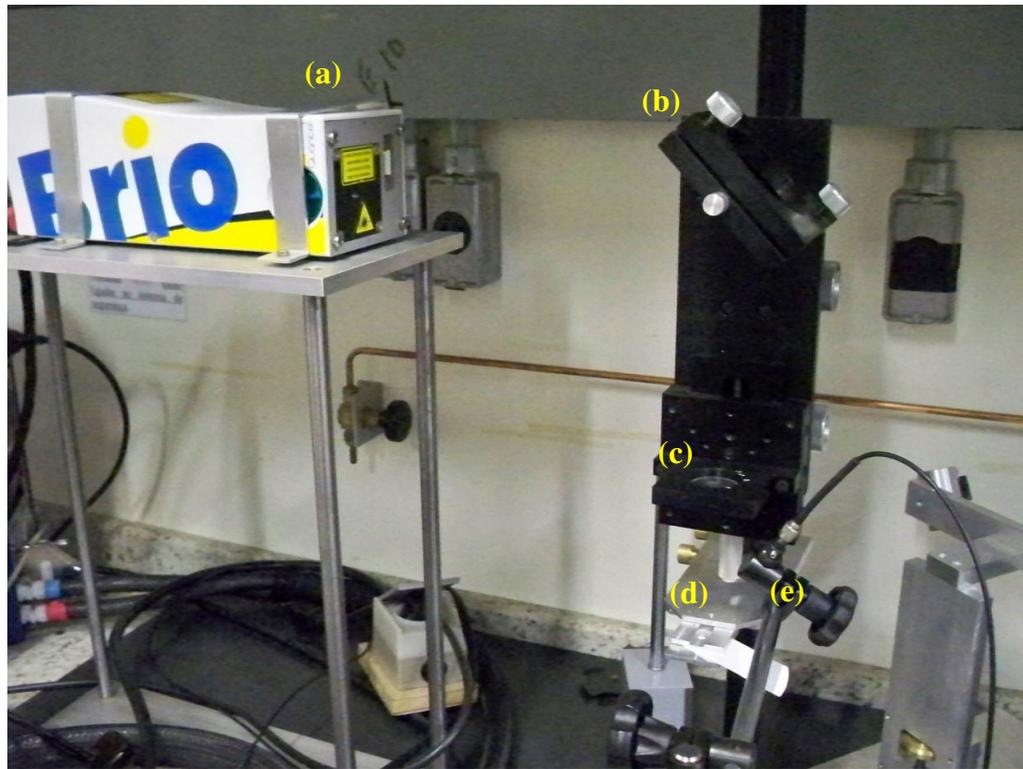


Figura 2.3. Sistema de medidas do LIBS: (a) laser, (b) espelho, (c) lente de focalização, (d) suporte de alumínio para amostra, (e) sistema de coleta de radiação (lente acoplada à fibra óptica).

Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros do instrumento LIBS estão especificados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Condições experimentais utilizadas no sistema LIBS.

Parâmetros	Valores
Energia do laser	110 mJ/pulso
Duração do pulso do laser	5 ns
Tempo de atraso ^a	1 μ s
Tempo de integração ^b	1 μ s
Ganho MCP ^c	100
Faixa espectral	200-850 nm

^a Intervalo de tempo entre o disparo do laser e o início da leitura da radiação emitida pelo plasma.

^b Tempo em que a radiação é amostrada pelo detector.

^c Ganho: valor relacionado a voltagem aplicada na placa do multicanal (MCP), componente do intensificador do ICCD responsável pela intensificação do sinal.

2.3.6. TRATAMENTO DOS DADOS

O tratamento dos dados foi feito usando-se análise univariada para medidas quantitativas. O pacote computacional utilizado foi o *Origin 8.0*. A Figura 2.4 mostra a forma de aquisição dos espectros e o tratamento dos mesmos.

Cada membrana possuía dois lados iguais, sendo que cada lado foi considerado uma réplica do mesmo nível de concentração. Foram adquiridos 10 espectros em pontos diferentes da membrana que foram acumulados no programa de aquisição de dados (a acumulação funciona como uma soma espectral), gerando um único espectro de emissão para cada lado da membrana. As médias das raias de emissão de interesse foram obtidas a partir desses dois espectros que juntos somam vinte locações amostradas.

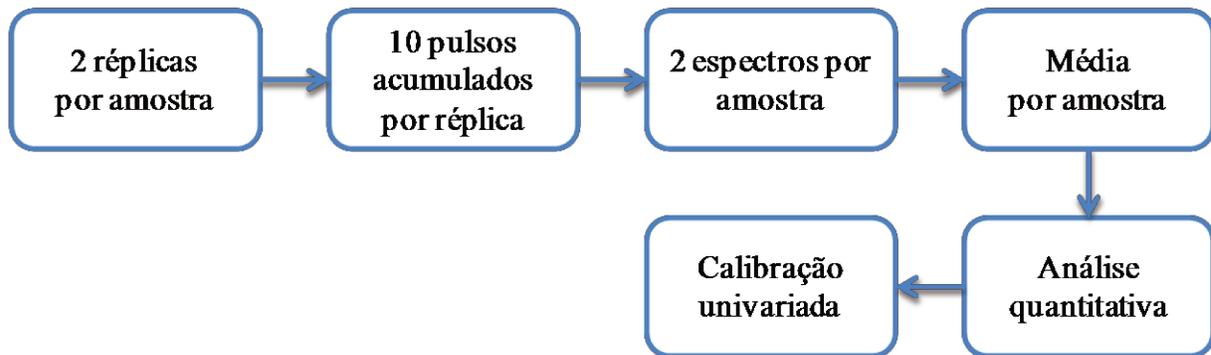


Figura 2.4. Esquema de amostragem para aquisição dos espectros de emissão.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. SELEÇÃO DAS LINHAS DE EMISSÃO

Para verificar se o sensor estava respondendo ao metal e para selecionar as raias de emissão do cobre, foram confeccionadas duas membranas para a leitura no LIBS. As membranas foram imersas nas soluções durante 20 minutos. A primeira foi imersa em uma solução contendo somente cobre na concentração de 200 mg L^{-1} e a segunda que foi considerada como branco, foi imersa em solução de acetato (na ausência do íon metálico).

Os espectros de emissão das membranas contendo cobre foram comparados com os espectros obtidos para o branco. A Figura 2.5 apresenta os espectros obtidos para as duas membranas.

As raias de emissão escolhidas para o cobre são representadas em detalhe no canto direito da Figura 2.5. Foram escolhidas as raias mais intensas presentes ao longo do espectro e que não coincidiram com raias de emissão presentes no branco, ou seja, com raias de emissão dos elementos constituintes do sensor.

As raias escolhidas para o cobre foram 324,75 e 327,39 nm, ambas raias de emissão atômicas. Para averiguação das raias de emissão foi consultada a base de dados do NIST (*NIST*). A diferença apresentada na posição da raia de emissão do espectro obtido com o valor indicado pela base do NIST está de acordo com a resolução do policromador do tipo *echelle*.

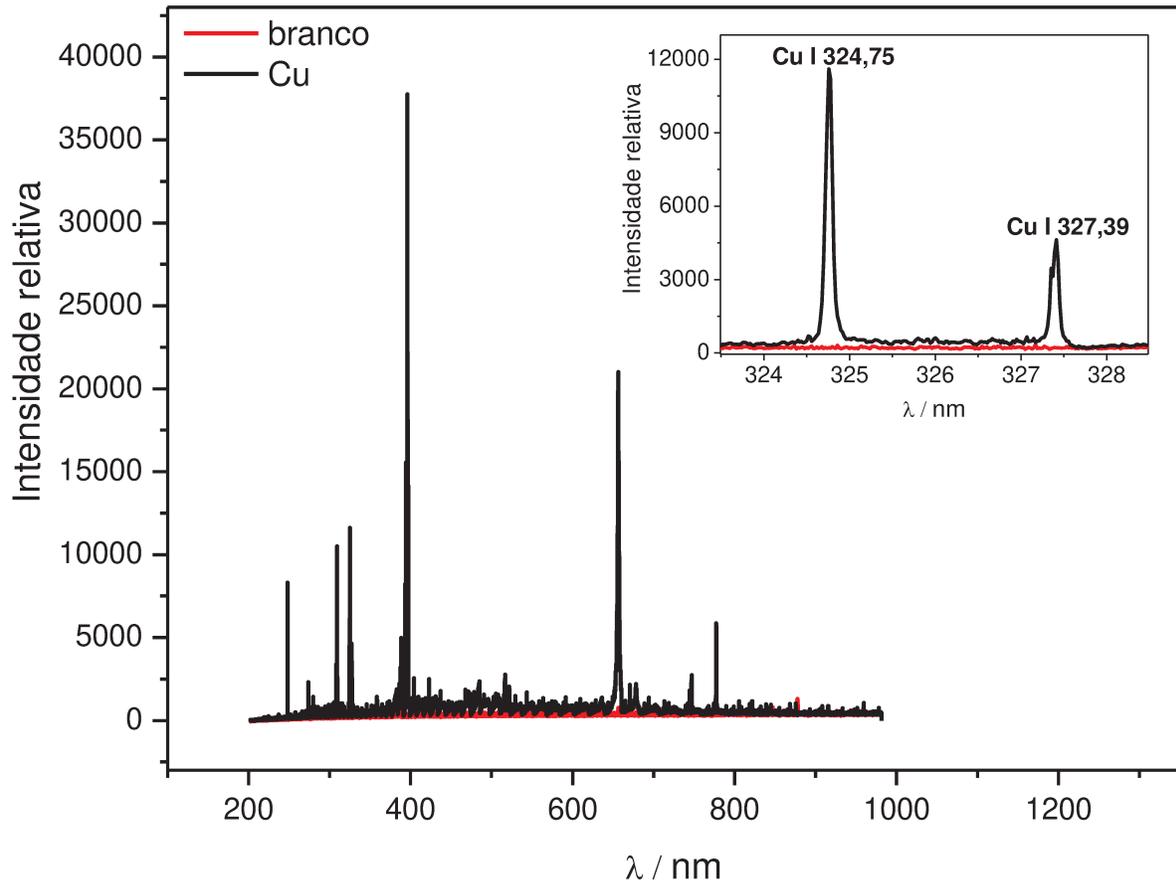


Figura 2.5. Espectros de emissão das membranas poliméricas complexadas com cobre (200 mg L^{-1}) em solução de acetato de sódio pH 6,0.

2.4.2. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO

Para avaliar o efeito do tempo de extração, as membranas foram imersas em uma solução tamponada de cobre (40 mg L^{-1}) em pH 6,0, sendo avaliados os seguintes intervalos: 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos. A Figura 2.6 mostra a resposta analítica da membrana em função do tempo de reação.

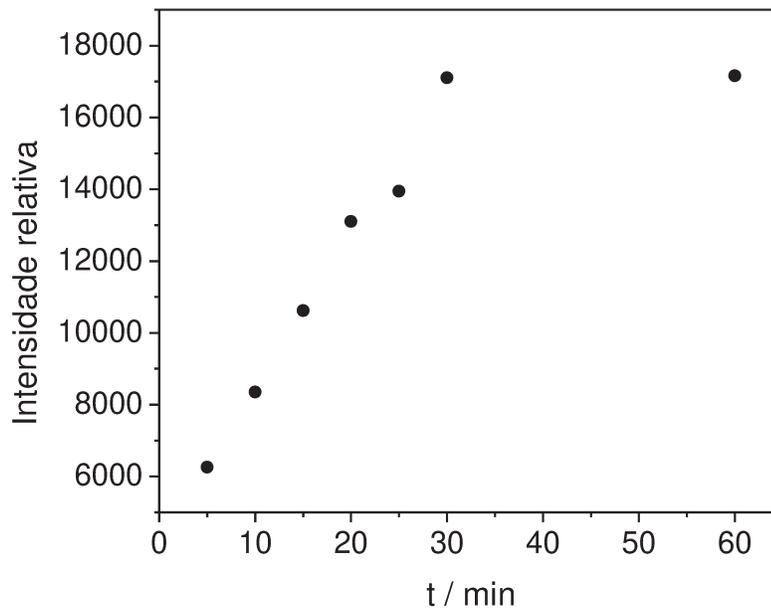


Figura 2.6. Estudo do tempo de extração de íons cobre ($\lambda_{em.}$ 324,75 nm, uma réplica).

Os resultados obtidos mostram que ocorre um aumento gradativo do sinal analítico a medida que se eleva o tempo de extração do metal, onde o processo de saturação da membrana ocorre a partir de 30 min de reação. Para obter uma extração mais rápida, o tempo escolhido foi 20 minutos.

2.4.3. ANÁLISE QUANTITATIVA

Para dar continuidade às investigações, a análise quantitativa foi realizada usando-se o íon cobre. Para tanto, curvas analíticas foram construídas em duas faixas de concentração distintas: 2–80 mg L⁻¹; 20–100 µg L⁻¹. Os tempos de extração escolhidos foram de 20 e 50 min, para as curvas nos níveis de concentração de mg L⁻¹ e µg L⁻¹, respectivamente. O tempo de 50 min foi usado para garantir a extração de íons em menores concentrações. A Figura 2.7 apresenta as curvas analíticas obtidas para as diferentes faixas de concentração.

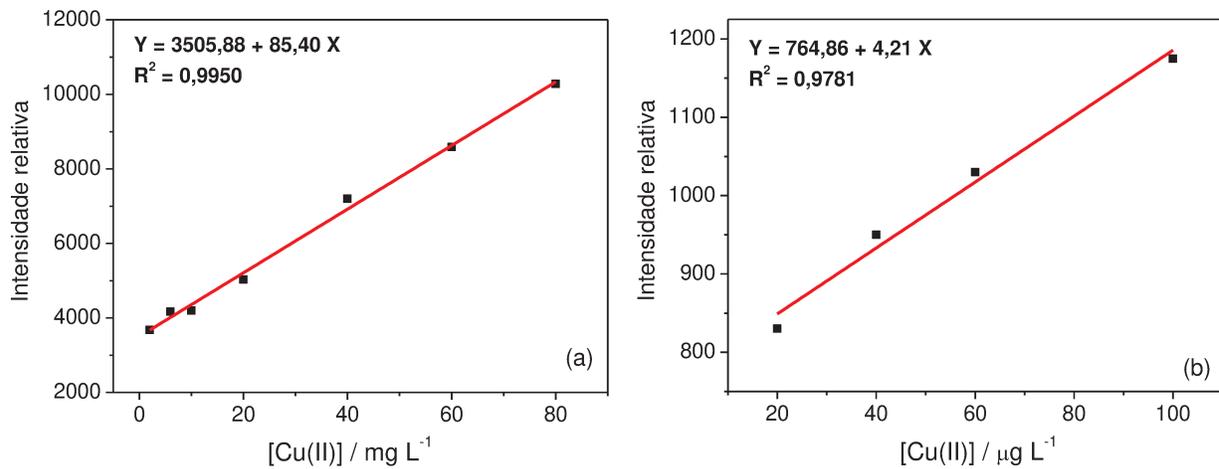


Figura 2.7. Curvas analíticas para cobre em concentrações de: (a) 2–80 mg L⁻¹ e (b) 20–100 µg L⁻¹ usando membranas extratoras (λ_{em} . 324,75 nm, uma réplica).

De acordo com as curvas analíticas, observa-se que foi possível determinar o teor de cobre na faixa de concentração estudada com linearidade adequada, onde o coeficiente de determinação obtido foi superior a 0,97.

Além disso, a curva da Figura 2.7.b apresenta uma excelente resposta analítica para cobre em nível de $\mu\text{g L}^{-1}$, demonstrando a habilidade das membranas extratoras para pré-concentração de íons metálicos em baixas concentrações que dificilmente seriam quantificadas por LIBS com facilidade, visto que os limites de detecção empregando LIBS com pulso único e medida direta para quantificar metais em solução, são da ordem de mg L^{-1} (Berman & Wolf, 1998; Pearman et al., 2003). Quando se empregam substratos sólidos esses valores diminuem consideravelmente, alcançando em alguns trabalhos a faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$. O menor limite de detecção com o emprego de suporte sólido foi obtido por Goode e Schmidt (2002) que encontraram o valor de $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para o cobre.

Fazendo-se uma estimativa do limite de detecção usando-se a curva da Figura 2.7.b encontra-se o valor de $0,26 \mu\text{g L}^{-1}$, que é bem inferior ao menor valor encontrado na literatura de $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Isto sugere que o uso da membrana extratora pode melhorar os limites de detecção do LIBS.

Outras faixas de concentração foram analisadas. Neste caso, três novas curvas foram elaboradas nos seguintes intervalos de concentração: 0,1–0,8; 1,0–8,0 e 10–100 mg L^{-1} , conforme Figura 2.8.

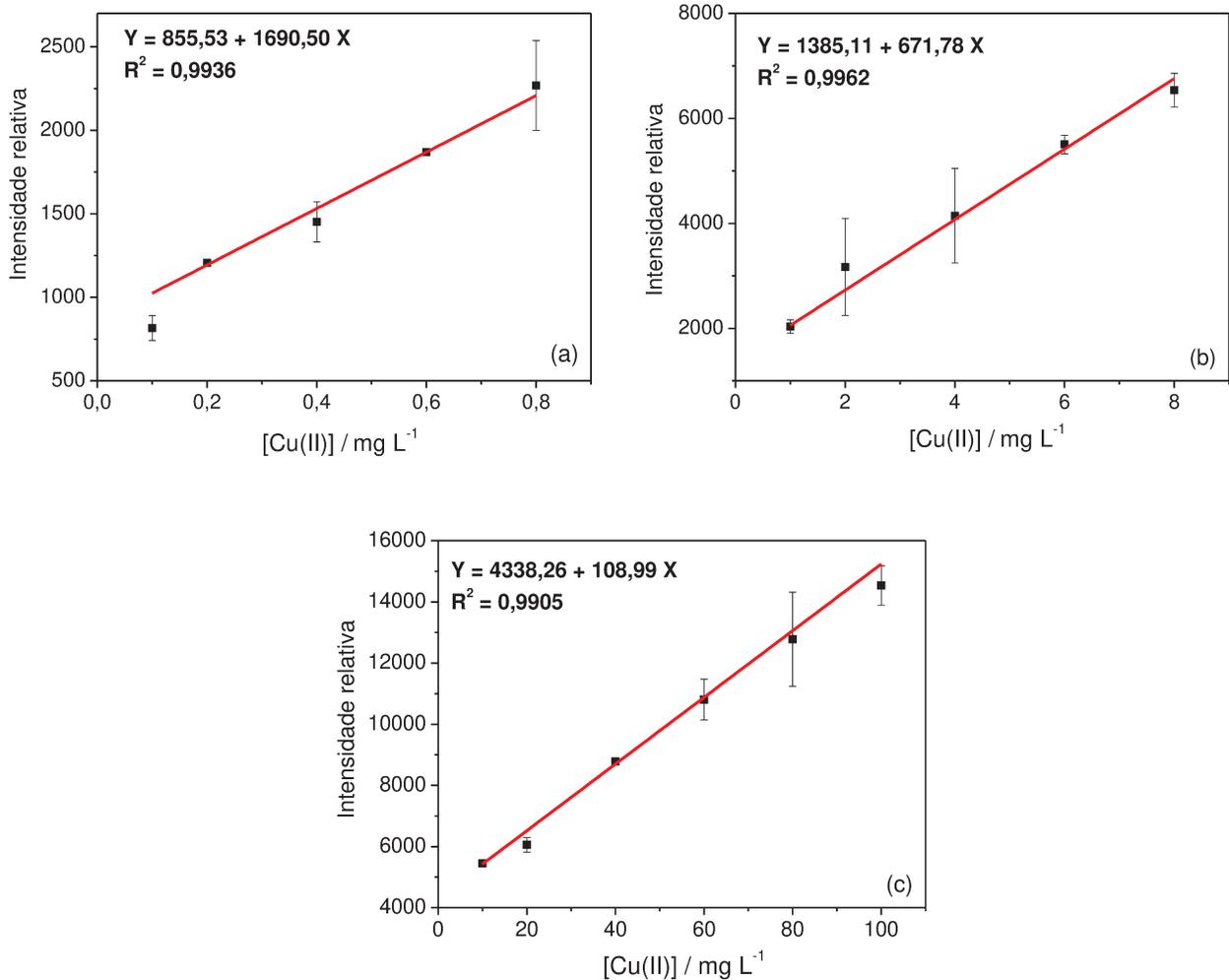


Figura 2.8. Curvas analíticas para cobre em concentrações de: (a) 0,1–0,8 mg L⁻¹, (b) 1,0–8,0 mg L⁻¹ e (c) 10–100 mg L⁻¹ usando membranas extradoras ($\lambda_{em.}$ 324,75 nm, média de duas réplicas).

Os resultados indicam que há uma linearidade satisfatória entre os pontos da curva analítica, que apresentam um desvio-padrão variando de 0,03 a 12 % para duplicatas. Apenas dois pontos da curva apresentam desvios elevados que correspondem a 21,79 e 29,13 % (Figura 2.8.b).

2.4.3.1. Estabilidade da membrana e da resposta analítica

Para avaliar a estabilidade da membrana e da curva analítica foram preparadas membranas em diferentes dias (partindo-se do mesmo coquetel), a fim de reproduzir as curvas analíticas de cobre. As membranas foram fabricadas em seis dias distintos: 1, 2, 3, 4, 8 e 30 dias.

A Figura 2.9 apresenta as curvas analíticas construídas para as membranas preparadas em diferentes dias, no intervalo de 10–80 mg L⁻¹ de cobre. Observa-se que as curvas analíticas também apresentaram linearidade adequada com bons coeficientes de determinação ($R^2 > 0,90$). Neste caso, pode-se dizer que as membranas extratoras e a resposta do sinal analítico foram bastante reprodutíveis.

A análise dos gráficos sugere que membranas mais sensíveis podem ser obtidas após o terceiro dia de preparo. Isto pode ser evidenciado pelo aumento da inclinação da curva obtida com a membrana preparada no quarto dia, a qual é cerca de 2,5 vezes maior que o valor encontrado para o 3º dia, sugerindo que a sensibilidade da membrana aumenta a partir do 4º dia de fabricação do coquetel. Tal estabilidade indica que a membrana possui vida útil apreciável, o que é uma importante vantagem para construção de uma fase sensora.

As curvas preparadas nos dois primeiros dias apresentaram desvios-padrão bastante elevados, comparado às curvas construídas a partir de três dias. Este fato pode estar associado à variações na intensidade de emissão do LIBS.

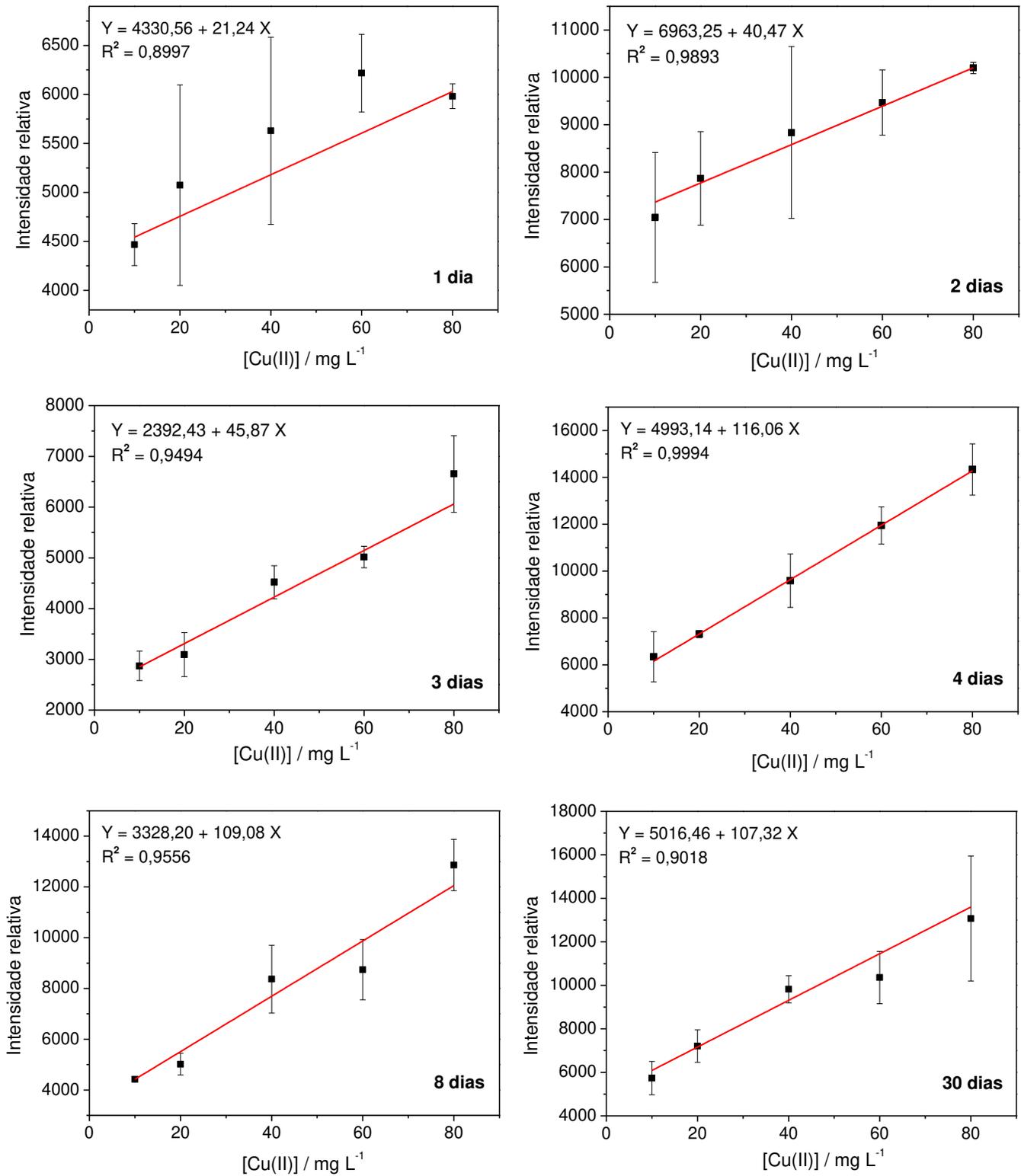


Figura 2.9. Curvas analíticas para cobre construídas a partir de membranas preparadas em diferentes dias.

2.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os testes preliminares indicaram que a técnica LIBS pode ser empregada em análise qualitativa e quantitativa de íons metálicos em meio aquoso, uma vez que apresentou respostas satisfatórias considerando-se suas limitações.

O uso de membranas extratoras na análise LIBS mostrou ser viável, com a grande vantagem de a amostra ser aplicada diretamente sobre a fase sensora, sem qualquer tratamento prévio. Além do mais, as membranas extratoras, como sistema de pré-concentração de íons, apresentaram resultados bastante significativos comparados aos suportes sólidos comumente empregados, com habilidade para quantificar íons metálicos em nível de $\mu\text{g L}^{-1}$.

Vale salientar que as medidas aqui apresentadas se encontram em estágio inicial de pesquisa. Entretanto, é possível afirmar que o LIBS apresenta grande potencial para análise de íons em amostras líquidas.

As perspectivas deste trabalho se resumem em aprimorar as medidas LIBS para determinação de íons cobre visando atingir os limites de quantificação compatíveis com os valores máximos permitidos pelas legislações vigentes. Por fim, aplicar a técnica LIBS para determinação de outras espécies metálicas em amostras líquidas. Neste caso, um arranjo de sensores poderia ser desenvolvido para determinação de vários íons simultaneamente.

CAPÍTULO 3

SENSORES LUMINESCENTES

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. 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 e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. O modo de excitação é a absorção de fótons, que promovem a espécie a um estado eletrônico excitado. A emissão de fótons acompanhada de relaxação é chamada fotoluminescência (fluorescência ou fosforescência), que é um dos possíveis efeitos físicos resultantes da interação da luz com a matéria (*Valeur, 2002*).

Uma vez que uma molécula é excitada pela absorção de fótons, ela pode retornar ao estado fundamental com emissão de fluorescência; entretanto, outros caminhos para a relaxação também são possíveis (conversão interna, cruzamento intersistemas, transferência de carga intermolecular e mudança conformacional), os quais são explicados pelo diagrama de Jablonski (*Valeur, 2002; Skoog et al., 2006*). 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.

A supressão de fluorescência se refere a qualquer processo que diminua a intensidade de emissão de fluorescência de um fluoróforo. Os dois tipos mais conhecidos de supressão são a estática e a dinâmica (colisional) e ambos requerem contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. Na supressão colisional, o supressor deve difundir-se ao fluoróforo durante o tempo de vida do

estado excitado e, após este contato, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem a emissão de fóton. Geralmente, a supressão ocorre sem mudanças permanentes nas moléculas, isto é, sem reações fotoquímicas. Na supressão estática, um complexo é formado entre o fluoróforo e o supressor, e este complexo não é fluorescente (*Lakowicz, 1999; Valeur, 2002*).

A supressão colisional da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + kq \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

Onde, F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor e F na presença do supressor; kq é a constante de supressão bimolecular; τ_0 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_D) é dada pelo produto $kq \tau_0$.

Pela equação de Stern-Volmer a correlação linear entre F_0/F e $[Q]$ produz dados de supressão, já que a concentração do supressor afeta diretamente a supressão de fluorescência.

3.1.2. POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR – MIP

O Polímero de Impressão Molecular, conhecido como **MIP**, é um material que vem revolucionando a química analítica moderna (*Kryscio & Peppas, 2012*).

Os MIPs são materiais sintéticos capazes de reconhecer seletivamente o analito para o qual foi preparado. Foram propostos nos últimos anos como candidatos para substituir as biomoléculas como elementos de reconhecimento no desenvolvimento de sensores (*Rao et al., 2007; Moreno-Bondi et al., 2008*).

O processo de síntese de um MIP baseia-se na formação de um complexo entre o analito (*template*) e o monômero funcional. Na presença de um excesso de agente reticulante, uma rede polimérica tridimensional é formada. Após o processo de polimerização, o *template* é removido com solvente de extração adequado, deixando o sítio de reconhecimento específico complementar em forma e tamanho à molécula molde (*Concheiro et al., 2011; Vasopollo et al., 2011*). A Figura 3.1 mostra um esquema do processo de impressão molecular.

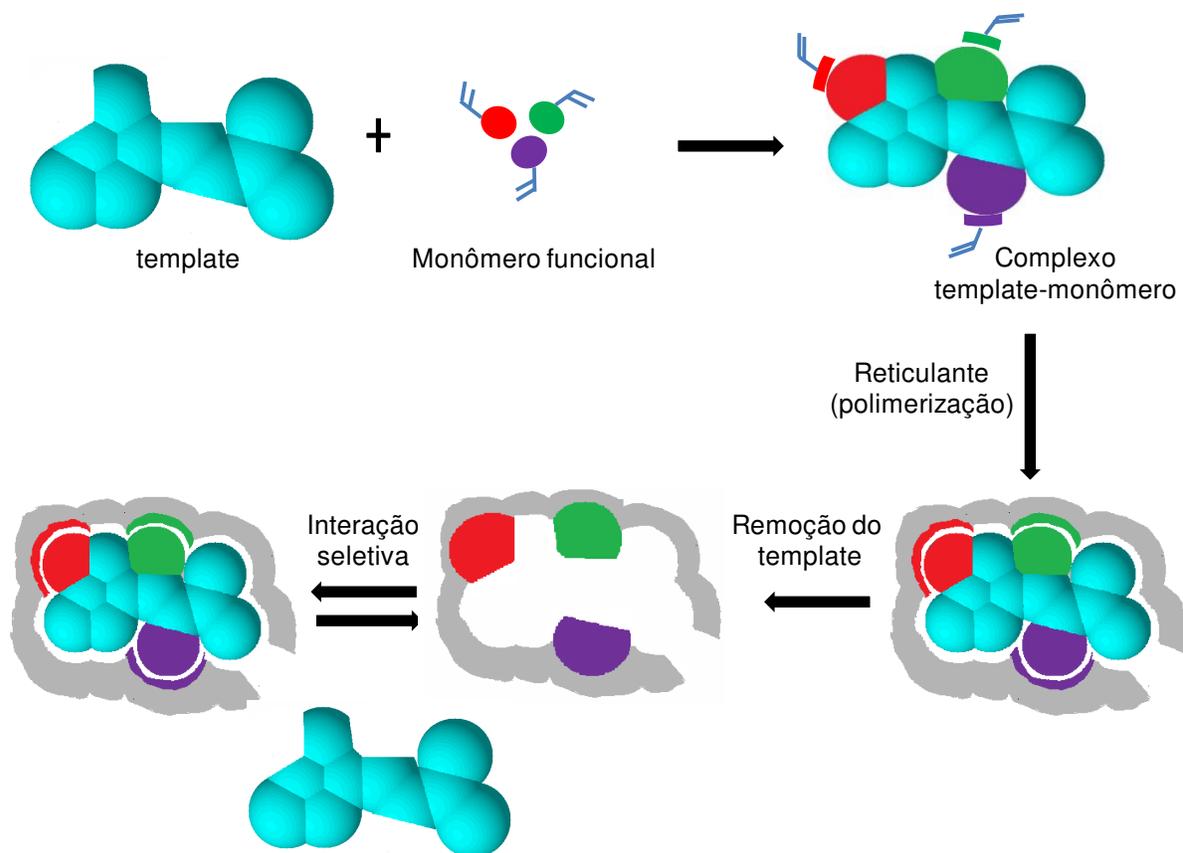


Figura 3.1. Representação esquemática do processo de síntese do polímero de impressão molecular (autor: Benedito Filho).

O sucesso do reconhecimento molecular do MIP depende fundamentalmente do seu processo de síntese. A combinação e a escolha adequadas dos componentes da mistura reacional (analito, monômero funcional, solvente, agente reticulante e iniciador polimérico) são de extrema importância na síntese dos polímeros impressos (*Moreno-Bondi et al., 2008; Advincula, 2011*). Deste modo, a otimização destas variáveis, com base em relações estequiométricas apropriadas, é um parâmetro essencial para fabricação de MIPs funcionais eficientes (*Advincula, 2011; Vasopollo et al., 2011*).

No processo de impressão molecular cada componente desempenha uma função específica:

- **Analito:**

O analito, também chamado de *template* ou molécula molde, deve apresentar grupos funcionais capazes de reagir com o monômero para formar um complexo estável.

- **Monômero funcional:**

O monômero funcional determina o tipo de ligação nos sítios impressos do polímero e sua escolha depende da estrutura do analito. A formação de um complexo estável entre o *template* e o monômero é fundamental na síntese do MIP e para o sucesso do reconhecimento molecular, pois os sítios de ligação do polímero impresso dependem das interações envolvidas no processo de polimerização. Interações como ligações de hidrogênio, força de Van der Waals e interações eletrostáticas determinam o arranjo espacial dos monômeros ao redor do *template*. Geralmente são usados ácidos carboxílicos, ácidos sulfônicos e bases heteroaromáticas como monômeros funcionais (*Vasopollo et al., 2011*).

- **Agente reticulante:**

O reticulante (ou agente de ligação cruzada) é o reagente responsável pela polimerização dos monômeros funcionais. Desempenha as seguintes funções: controla a morfologia da matriz polimérica, estabiliza o sítio de ligação impresso e fornece estabilidade mecânica à matriz. Um dos reagentes mais utilizados

como reticulante é o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) (*Vasopollo et al., 2011*).

- **Solvente:**

A principal função do solvente é solubilizar adequadamente os componentes da síntese, sem afetar a interação *template*-monômero. A natureza e o tipo de solvente influenciam as características morfológicas do MIP (área superficial e porosidade). A porosidade é responsável pela difusão do analito no sítio ativo da molécula, possibilitando a reutilização do MIP, uma vez que determina a eficiência na remoção do *template*. Dessa forma, o solvente pode afetar de maneira significativa a seletividade, especificidade e habilidade de reconhecimento molecular. Os solventes, normalmente empregados nas sínteses são tolueno, clorofórmio, acetonitrila, etc (*Vasopollo et al., 2011*).

- **Iniciador polimérico:**

O iniciador polimérico (ou iniciador radicalar) é o reagente que provoca a polimerização do agente reticulante. Ao sofrer decomposição térmica ou fotolítica, o iniciador produz radicais livres que reagem com as moléculas do reticulante, dando início ao processo de polimerização em cadeia. Os iniciadores mais comumente usados são: 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) e 2,2'-azo-bis-(2,4-dimetil valeronitrila) (ABDV) (*Vasopollo et al., 2011*).

Resumidamente, o polímero impresso deve apresentar três características básicas (*Murray et al., 1997*):

1. A cavidade da geometria e o arranjo do grupo de ligação devem ser preservados após a retirada do molde.
2. As cavidades devem apresentar flexibilidade suficiente para permitir rápida absorção e liberação do molde, havendo um compromisso com a quantidade de reticulante empregada, uma vez que este diminui a flexibilidade da molécula.
3. Os materiais poliméricos devem ser química e mecanicamente estáveis, permitindo, assim, sua regeneração e reutilização.

No que diz respeito as suas vantagens, o uso de MIP apresenta as seguintes qualidades: fabricação em grande escala de forma simples, barata e reprodutível em diversas formas (bloco, partículas, membranas, etc) a partir de monômeros acrílicos ou vinílicos; estabilidade química e mecânica, podendo trabalhar em condições extremas de pH, temperatura e na presença de solventes orgânicos, sem perder sua estrutura ou afinidade pelo analito (*Moreno-Bondi et al., 2008; Lasáková & Jandera, 2009; Martín-Esteban & Turiel, 2010; Vasopollo et al., 2011*).

Devido a estas características, a técnica de impressão molecular tem sido aplicada com êxito na preparação de materiais poliméricos de elevada especificidade que atende a amostras de relevância ambiental, clínica, biotecnológica, entre outros (*Caro et al., 2006; Grassi, 2008; Vasopollo et al., 2011; Kryscio & Peppas, 2012*).

3.1.2.1. Polímero de Íon Impresso – IIP

A partir do MIP surgiu uma subclasse de polímeros impressos, chamada Polímero de Íon Impresso (**IIP**) (*Rao et al., 2006*). Os IIPs são similares aos MIPs, a única diferença é que o polímero impresso reconhece um íon, em vez de uma molécula. O processo de polimerização do IIP também é idêntico ao do MIP e obedece aos mesmos princípios e características da síntese.

Na confecção de um polímero de íon impresso, um agente complexante interage com um cátion específico para formar o complexo metal-ligante. A molécula molde é devidamente polimerizada, formando uma cavidade com um arranjo dimensional que coincide com a carga, o tamanho, o número e a geometria de coordenação do cátion alvo. Uma vez imobilizado, o cátion pode ser removido do polímero por lavagem com ácido mineral, onde as cavidades ou sítios ativos são complementares em forma e tamanho ao cátion (*Rao et al., 2006*).

Para construir um sensor iônico baseado em IIP é necessário encontrar uma molécula com um sítio sensível que possa ser reconhecido quimicamente e acoplado a um sinal de transdução apropriado, tal como os sistemas de transdução eletroquímicos e espectroscópicos (*Rao et al., 2006*). Muitas vezes essa combinação não é uma tarefa fácil de ser realizada, daí a dificuldade de fabricar sensores baseados em IIP.

Nos últimos anos, os polímeros de íons impressos têm encontrado importantes aplicações em extração em fase sólida, sensores (eletrodos e optrodos) e membranas (*Martín-Esteban & Turiel, 2010; Li et al., 2011*). Artigos recentemente publicados relatam a síntese de materiais IIP para separação e determinação de diferentes íons metálicos (*Buhani et al., 2010; Singh & Mishra,*

2010; Zhang *et al.*, 2011; Godlewska-zyłkiewicz *et al.*, 2012; Shakerian *et al.*, 2012).

Apesar da grande disponibilidade dos trocadores de íons, os polímeros de íons impressos têm ganhado seu espaço na detecção de espécies iônicas e tem aberto caminho para o desenvolvimento da ciência e da tecnologia. Devido aos impactos ambientais e biológicos causados pelo íon cobre, o desenvolvimento de novos métodos para separação seletiva, purificação e determinação de Cu(II) é de grande interesse. Com isso, algumas referências têm sido dedicadas especificamente para detecção de Cu(II) baseado em IIP.

Say *et al.* (2003) prepararam um IIP-Cu(II) altamente seletivo para adsorção e remoção de cobre em meio aquoso. A polimerização foi feita dissolvendo-se em etanol, o complexo Cu(II)-MAH, EGDMA e AIBN. O IIP formado, EGDMA-MAH/Cu(II), foi preparado em *microbeads* (150-200 μm) e utilizado para extração em fase sólida. O IIP-SPE foi aplicado em amostras de água de mar, obtendo-se recuperações de 95-97,2%. Além disso, o sensor mostrou-se bastante seletivo e reversível.

Outro trabalho relevante foi proposto por Singh & Mishra (2009). Estes pesquisadores sintetizaram um Cu(II)-IIP através da copolimerização do ácido salicílico e formaldeído na presença do complexo Cu(II)-PAR. O íon Cu(II) impresso foi completamente removido do IIP usando-se EDTA 0,05 mol L⁻¹. A capacidade máxima de adsorção de Cu(II) foi de 310 $\mu\text{g g}^{-1}$ em pH 6,0 e o limite de detecção encontrado foi de 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. O IIP foi reutilizado sete vezes consecutivas. Os testes foram realizados pré-concentrando Cu(II) em amostras de água de mar, água de torneira e água destilada. As recuperações obtidas variaram de 98-99%. Neste trabalho demonstrou-se, claramente, que os IIPs são muito mais eficientes que os polímeros não impressos.

Além de cobre, polímeros de íons impressos também foram empregados para determinação de outras espécies metálicas, como Pb(II) (*Murray et al., 1997*), Al(III) (*Díaz-García et al., 2002*), Zn(II) (*Araki et al., 2005*), entre outros.

Neste sentido, pode-se dizer que a aplicação dos IIPs está focada na extração em fase sólida, empregada principalmente para pré-concentração de íons metálicos em sistemas aquosos.

O IIP é um material que representa uma importante ferramenta analítica que pode ser empregada para viabilizar o uso de sensores ópticos. Sua utilização na área de sensores é considerada recente. Assim, este trabalho tem como finalidade explorar essa técnica no ramo de sensores como uma alternativa viável que possa abrir caminho para o desenvolvimento desta área.

3.1.3. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA LUMINESCENTES

A nanotecnologia é uma ciência que explora as características e propriedades únicas de materiais em nível de nanoescala (1-100 nm) (*Lucena et al., 2011; Wang, 2011*). Nesse contexto, as nanopartículas de sílica são um dos principais temas de interesse, atuando como um dos materiais mais promissores na atualidade (*Díaz-García & Dios, 2010; Goesmann & Feldmann, 2010*).

As nanopartículas de sílica associada à espectroscopia de fluorescência têm levado à produção de uma classe de sensores denominada “nanosensores fluorescentes” (*Prodi, 2005; Wang et al., 2006; Wiesner et al., 2006; Liang et al., 2010; Prodi et al., 2011*). Estes nanosensores têm sido aplicados em muitas áreas, tais como monitoramento ambiental, controle de processo, análise de alimentos e bebidas (*Lucena et al., 2011; Silva, et al., 2011; Wang, 2011*). Nos últimos anos, estes sensores têm apresentado um rápido desenvolvimento nos campos da biologia e da medicina (*Huang et al., 2011; Chatterjee et al., 2012*) e

muitas dessas aplicações são baseadas em suas propriedades magnéticas, ópticas e eletroquímicas.

Um nanosensor fluorescente clássico é constituído por duas unidades principais: um “receptor” responsável pelo reconhecimento molecular do analito e um “cromóforo/fluoróforo” responsável pelo sinal analítico do reconhecimento molecular, que fornece o meio de detecção (Bonnacchi *et al.*, 2011). A Figura 3.2 mostra o esquema de nanosensor fluorescente.

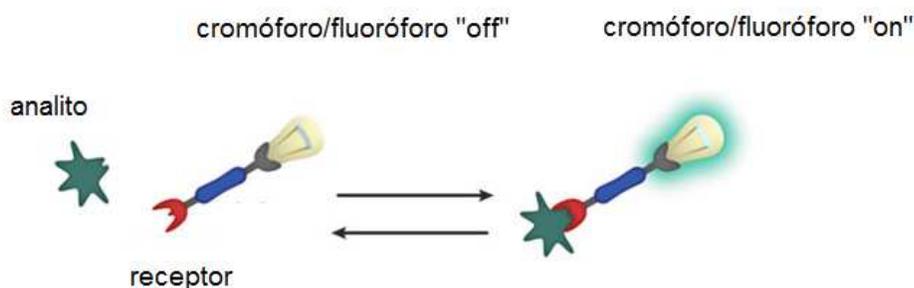


Figura 3.2. Representação esquemática de um nanosensor fluorescente (adaptado de (Bonnacchi *et al.*, 2011)).

A união entre o receptor e o cromóforo/fluoróforo associado à escolha de um suporte sólido adequado, tal como a sílica, oferece a possibilidade de se obter sistemas multifuncionais sofisticados.

Muitas estratégias interessantes têm sido empregadas para preparação de nanopartículas esféricas, utilizando-se novas rotas de síntese e novos métodos de preparação (Díaz-García & Dios, 2010; Liang *et al.*, 2010). Uma destas estratégias consiste na imobilização de reagentes luminescentes na matriz de sílica por encapsulamento. Esta categoria de nanopartícula é conhecida como **DDSN** (do inglês, *Dye-Doped Silica Nanoparticle*) (Díaz-García & Dios, 2010; Liang *et al.*, 2010; Bonacchi *et al.*, 2011).

O controle da preparação de sílica coloidal foi proposto pela primeira vez por Kolbe, em 1956, sendo aprimorado mais tarde por Stöber, em 1968 (*Stöber & Fink, 1968*). Entretanto, o primeiro relato sobre a preparação de DDSNs foi publicado apenas em 1992 quando Van Blaaderen *et al.* (*Blaaderen & Vrij, 1992*) doparam uma nanoesfera de sílica com um derivado da fluoresceína através de ligação covalente. 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.

Os DDSNs vêm sendo funcionalizados quimicamente para possibilitar a produção de nanosensores altamente seletivos e sensíveis ao analito de interesse (*Doussineau et al., 2009; Milieto et al., 2010; Chen et al., 2012*). 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 (*Iller, 1979; Jal et al., 2004; Jin et al., 2009*). A superfície hidrofílica da sílica fornece boa solubilidade em água e sua baixa toxicidade favorece a aplicação biológica dos DDSNs. Além disso, a superfície da sílica possui elevada concentração de grupos silanóis que podem reagir com uma grande quantidade de compostos, propiciando a formação de camadas de grupos funcionais que interagem com o reagente a ser dopado (*Jal et al., 2004; Jung et al., 2012*). Dessa forma, é possível funcionalizar a superfície e/ou o interior da matriz de sílica, mantendo suas propriedades ópticas originais.

O rápido desenvolvimento dos DDSNs ocorreu nos últimos dez anos. Dada sua importância, o *design* destes sensores tem sido amplamente discutido pela comunidade científica, conseqüentemente, numerosas revisões sobre este

assunto têm sido disponibilizados na literatura (*Prodi, 2005; Wang et al., 2006; Liang et al., 2010; Bonacchi et al., 2011; Prodi et al., 2011*).

3.1.3.1. METODO STÖBER

Nanopartículas de sílica são comumente preparadas pelo método Stöber (*Stöber & Fink, 1968*). Derivado do processo sol-gel, o método Stöber consiste em sintetizar dióxido de silício através da hidrólise e condensação do tetraetil ortosilano (TEOS) em etanol e água, utilizando-se amônia como catalisador.

Na reação de hidrólise, os grupos alcoóxidos (-OR) são substituídos por grupos hidroxilas (-OH) e nas reações de condensação são produzidos siloxanos (Si-O-Si), subprodutos alcoólicos (ROH) e água. Na hidrólise via catálise básica, as hidroxilas ou os ânions de alquilsilicatos atacam diretamente o silício e formam uma rede polimérica que leva a formação das partículas de sílica (*Iller, 1979*). A Figura 3.3 mostra as principais reações envolvidas no processo sol-gel e o esquema da rede de sílica formada.

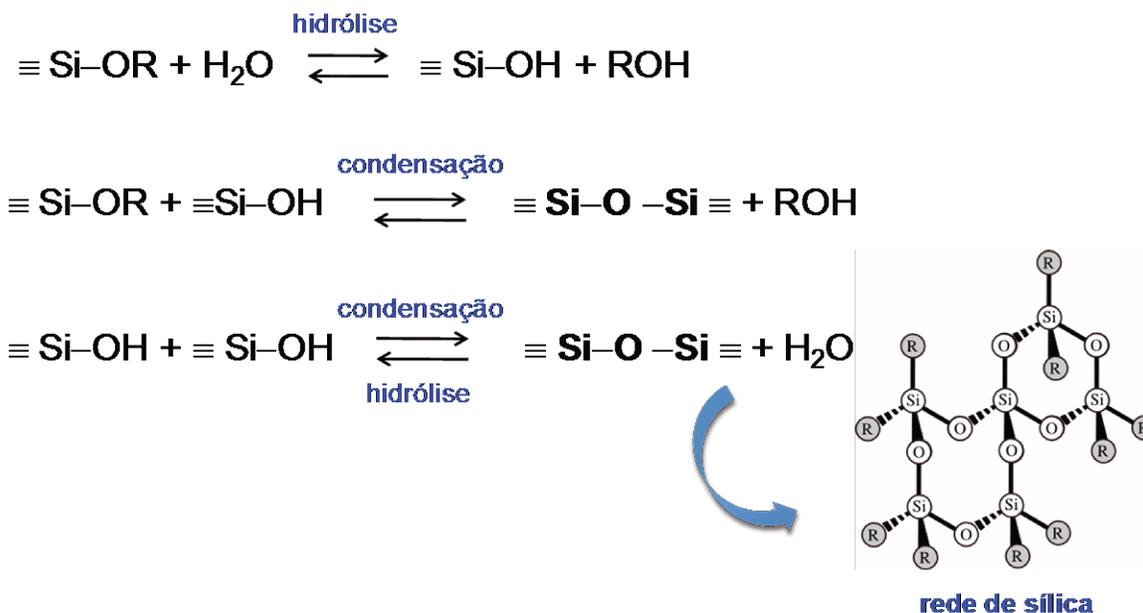


Figura 3.3. Reações envolvidas no processo sol-gel (adaptado de *Costa, 2004*).

Na síntese de Stöber a interação entre as moléculas do reagente luminescente e a matriz de sílica pode ocorrer por meio de ligação covalente e/ou interação eletrostática. A ligação covalente fornece ligações mais estáveis. Neste método, as moléculas podem ser funcionalizadas pela ligação de grupos funcionais alcóxidos (*Liang et al., 2010*). A interação eletrostática é uma força relativamente fraca comparada à ligação covalente, porém é forte o suficiente para manter as moléculas do reagente dentro da matriz de sílica. Moléculas carregadas positivamente podem interagir facilmente com a carga negativa da sílica através de interações eletrostáticas. Assim, complexos de metais de transição e compostos orgânicos como íons de amônio quaternário podem ser aplicados com sucesso neste tipo de síntese (*Liang et al., 2010*).

O método Stöber é simples, rápido e muito versátil que permite obter partículas esféricas coloidais com tamanho uniforme, variando de 0,05 a 2 μm de

diâmetro (Stöber & Fink, 1968). Desde a publicação deste trabalho pioneiro, a preparação de partículas de Stöber tem sido usada como um método-modelo em uma série de experimentos e algumas variantes desse procedimento experimental foram surgindo e sendo modificadas ao longo dos anos (Blaaderen & Vrij, 1992; Jankiewicz et al., 2012).

Neste contexto, o mecanismo de formação e o crescimento das partículas de sílica têm sido investigados (Chou & Chen, 2008; Masalov et al., 2011). O controle rigoroso das variáveis da síntese é considerado crítico, principalmente no que diz respeito ao controle do tamanho das partículas. Assim, a discussão sobre os efeitos do pH do meio, tipo de solvente, temperatura, tempo de reação e concentração dos analitos vem sendo bastante explorada na literatura atual (Kim et al., 2002; Rahman et al., 2007 e 2008; Wang et al., 2010).

A maioria dos trabalhos publicados se dedicam aos estudos de otimização das condições de síntese, neste caso, planejamentos fatoriais têm sido desenvolvidos para tentar otimizar as condições de análise (Chung et al. 2006; Gun'ko et al., 2009). Isto indica que a rota de síntese das partículas de Stöber ainda se encontra em fase de consolidação.

De modo geral, o método Stober tem se consagrado como uma excelente forma de preparar partículas de sílica, exercendo um papel fundamental na síntese coloidal de diversas estruturas de partículas, possibilitando avanços em diversas áreas tecnológicas, incluindo os sensores. Um dos grandes desafios deste método é melhorar a uniformidade das nanopartículas de sílica e a eficiência da imobilização de moléculas orgânicas dentro da matriz de interesse. Com base nisso, neste trabalho será abordada a preparação de nanopartículas de sílica luminescentes dopadas com um complexo de rutênio utilizando-se o método Stöber.

Diante do exposto pode-se dizer que a síntese de nanopartículas de sílica é um processo bastante criterioso. De modo geral, sua preparação depende de alguns requisitos básicos:

- (a) Selecionar um reagente luminescente com elevada seletividade e sensibilidade ao analito de interesse;
- (b) Escolher um suporte sólido adequado para imobilização deste reagente;
- (c) Escolher um método de síntese e *design* adequados para fabricação das nanopartículas, considerando a possibilidade de funcionalização;
- (d) Otimizar as condições de síntese para controlar o tamanho da partícula e do poro.

3.1.3.2. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA COM MIP

Os polímeros impressos vêm se difundindo em várias áreas de análises. Recentemente esta tecnologia tem sido associada ao uso de nanopartículas de sílica (*Poma et al., 2010*). Logo, um significativo avanço na preparação de nanopartículas esféricas com elevada capacidade de reconhecimento molecular vem se difundindo na ciência (*Yoshimatsu et al., 2007*).

As “nanopartículas de MIP” estão sendo usadas para substituir enzimas e anticorpos, sendo também aplicadas em eletroforese capilar e em sensores, ampliando suas aplicações principalmente na biologia e na medicina (*Shea et al., 2008; Yang & Chen, 2011*).

O uso de polímeros impressos com nanopartículas de sílica é considerado recente. Um trabalho que pode ser mencionado neste caso, é o artigo de *Shamsipur et al.* (2010). Estes autores prepararam um IIP baseado em nanopartículas usando-se o reagente 1-hidroxi-4-(prop-2'-eniloxi)-9,10-antraquinona (AQ) para reconhecimento seletivo de íons cobre em meio aquoso.

A síntese foi feita pelo método de polimerização por precipitação, obtendo-se partículas com diâmetro de 60-100 nm. O íon cobre foi removido da matriz polimérica utilizando-se ácido nítrico e a quantificação do íon metálico foi feita utilizando-se ICP OES. O nanosensor desenvolvido apresentou limite de detecção de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$.

A respeito deste tema pode-se dizer que as investigações em MIP estão sendo focadas, basicamente, no estudo das condições de síntese para avaliar como a composição afeta as propriedades do polímero impresso (*Kryscio & Peppas, 2012*). Atualmente, essa composição tem sido avaliada com base em bibliotecas combinatórias de diferentes monômeros funcionais e de diferentes *templates*, onde modelos teóricos (computacionais) são desenvolvidos com a finalidade de facilitar o procedimento de preparação destes polímeros (*Saloni et al., 2011; Rostamizadeh et al., 2012*).

O que deve ser levado em conta é que não há evidência na literatura de um método otimizado para síntese de nanopartículas de MIP, visto uma vez que estes materiais são considerados recentes em pesquisas científicas.

3.1.3.3. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA PARA Cu(II)

Nanopartículas (NPs) de sílica têm sido empregadas para determinação de Cu(II). Assim como as NPs baseadas em MIPs, o uso de nanopartículas de sílica para detecção de espécies metálicas ainda é pouca explorada.

Zheng *et al.* (2010) prepararam um nanosensor fluorescente para determinação de Cu(II) usando-se o reagente *N*-(quinoline-8-il)-2-(3-trietoxisilil-propilamino)-acetamida (QIOEt) depositado sobre a superfície de nanopartículas de sílica empregando o método da microemulsão reversa. A síntese foi feita a

partir da mistura contendo Triton-X-100, hexano, ciclohexano, água, TEOS e amônia em solução aquosa. O nanosensor apresentou faixa dinâmica linear entre $2,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e limite de detecção de $3,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Segundo estes autores, este sensor pode ser aplicado em medidas intracelulares.

Outros pesquisadores que também demonstraram o uso destes nanosensores foi Kang *et al.* (2010). Estes autores sintetizaram nanopartículas de sílica funcionalizada com fluoresceína através do processo sol-gel para detecção de íons cobre em solução aquosa e em células vivas. O sensor apresentou excelente reversibilidade, usando-se solução de EDTA para extração do íon Cu(II), e o limite de detecção encontrado foi de 0,50 µmol L⁻¹.

Poucos são os sistemas de sensores conhecidos para determinação de Cu(II) em células vivas. Não existem precedentes para uso de nanopartículas com este tipo de material. Esse é um exemplo raro de um sensor cromogênico para íons metálicos usando-se nanomateriais inorgânicos funcionais. Assim, os experimentos realizados neste trabalho mostram a potencialidade deste nanosensor para análise de toxicidade de cobre intracelular.

A microscopia de fluorescência oferece um método único para visualizar detalhes morfológicos em tecidos com resolução subcelular e os nanosensores permitem a detecção não destrutiva de íons em tempo real com alta sensibilidade. A combinação da microscopia de fluorescência com nanosensores fluorescentes seletivos a Cu(II) tem sido uma excelente alternativa para monitorar concentrações de cobre intracelular. Por este motivo, grande parte dos trabalhos científicos têm se dedicado a este tipo de pesquisa.

Recentemente, Lu *et al.* (2011) prepararam uma nanosonda fluorescente para detecção de Cu(II). O sensor foi desenvolvido utilizando-se dois reagentes luminescentes a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de Rodamina B (RBITC). A preparação do sensor foi realizada em três etapas: (a)

síntese da NP dopada com FITC preparada a partir de TEOS, etanol e amônia, codificada como FITC-NP; (b) funcionalização do polietileneimina (PEI) na superfície da FITC-NP, representada como PEI/FITC-NP; e (c) incorporação do RBITC em PEI/FITC-NP. A nanosonda apresentou linearidade na faixa de 10 a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 10 nmol L^{-1} . Para avaliar a aplicabilidade do sensor, o íon Cu(II) foi determinado em águas residuais, industriais e de lago. Os valores de recuperação obtidos para as três amostras foram superiores a 95%. A citotoxicidade das NPs também foi avaliada através de ensaios de proliferação celular. Para tanto, as células foram incubadas em amostras contendo diferentes concentrações de NPs (0-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados indicaram que a toxicidade das NPs foi relativamente baixa para as concentrações testadas, indicando que a nanosonda pode ser aplicada também para monitoramento deste íon em células vivas.

Este artigo mostra a versatilidade das nanopartículas de sílica e sua capacidade de ser facilmente funcionalizada. Além disso, outra característica importante apontada foi a combinação de dois reagentes fluorescentes (FITC e RBITC), que demonstra a habilidade do sensor apresentar um sistema de dupla emissão. Desta forma, este é um dos trabalhos mais relevantes, na atualidade, no que se refere a aplicação de nanosensores de sílica para detecção de Cu(II).

Li *et al.* (2011) sintetizaram nanopartículas de sílica mesoporosas (MSN) modificadas com rodamina B hidrazida (RBH) para construção de uma nanosonda (MSN-RHB) sensível a íons cobre em células vivas. A nanosonda desenvolvida possui habilidade para discriminar Cu(II) de Hg(II), baseando-se em diferentes mecanismos de reação para o reconhecimento de cada íon. A molécula de RBH imobilizada apresenta dois sítios reativos capazes de quelar os dois íons simultaneamente. O processo de reconhecimento envolve uma série de reações consecutivas, dentre elas: reações redox, hidrólise, envolvendo a

liberação da rodamina B da NP da MSN. Os estudos demonstraram a utilidade do MSN-RBH no monitoramento de Cu(II) dentro de células vivas. Esta estratégia pode ser expandida para outros nanomateriais funcionais.

Além destas aplicações, alguns trabalhos apontam o uso de nanopartículas de sílica para sistemas de pré-concentração de espécies metálicas em amostras biológicas e ambientais. A modificação da superfície da sílica, usando-se grupos funcionais com elevada atividade química, pode gerar um material com elevada capacidade de adsorver íons metálicos.

Zhang *et al.* (2009) avaliaram a capacidade de adsorção da sílica gel (SG) e do SiO₂ funcionalizados com o reagente 4-(2-aminoetilamino)-N-(2-(2-aminoetil amino) etil) butanamida (AAEB) para extração em fase sólida. Os materiais funcionalizados, SG-AAEB e SiO₂-AAEB, foram utilizados para pré-concentração Cu(II), Fe(III) e Pb(II) em amostras naturais, em nível de traço, usando-se ICP OES. Os autores demonstraram que SiO₂-AAEB apresentou melhor capacidade de adsorção em relação ao SG-AAEB. Essa diferença se deve a elevada área superficial apresentada pelo óxido de silício.

Outro segmento que vem sendo explorado nesta área é o uso de nanotubos de carbono, uma vez que estes materiais têm sido considerados suportes sólidos promissores. Como exemplo disto, recentemente, Jung *et al.* (2008) utilizaram três diferentes morfologias de nanomateriais de sílica fluorescentes para comparar suas capacidades de adsorção. Os seguintes materiais foram estudados: nanotubos de sílica funcionalizada (FSNP), sílica mesoporosa funcionalizada (FMS) e nanopartículas de sílica funcionalizada (FSNP-15). A síntese foi feita com base no método sol-gel e cada material foi imobilizado com fenantrolina como receptor fluorescente. A detecção de Cu(II) foi realizada por fluorescência em água/acetoneitrila (pH 7,0). Os resultados indicaram que a capacidade de adsorção para Cu(II) foi 75, 52 e 36% para FSNT, FMS e FSNP-15,

respectivamente. Isto se deve a grande área superficial do FSNT que favorece o processo de difusão do íon cobre. O limite de detecção alcançado para FSNT foi $3,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Apesar do nanotubo de carbono exibir um resultado satisfatório sua aplicação em sistemas vivos deve ser reavaliada, uma vez que não há maiores informações sobre a toxicidade deste material.

Outra propriedade explorada é a aplicação de nanopartículas magnéticas. Essas nanopartículas representam uma das mais interessantes perspectivas na atual nanotecnologia analítica, visto que podem ser facilmente separadas da matriz usando-se um simples campo magnético (*Jang & Lim, 2010*).

As NPs magnéticas têm sido usadas para separação de drogas, isolamento de células, imobilização de enzimas e purificação de proteínas (*Díaz-García & Dios, 2010*). O uso de nanopartículas magnéticas está voltado basicamente para aplicações biológicas, entretanto alguns trabalhos retratam a detecção de espécies iônicas para fins ambientais (*Jung et al., 2010; Karatapanis et al., 2011*).

Jung et al. (2010) descreveram a preparação de nanopartículas magnéticas de Ni@SiO₂ funcionalizadas com nitrobenzofurano pelo método sol-gel. O sensor foi desenvolvido para separar e detectar Cu(II) em água potável e em sangue humano. A avaliação do sensor para água potável foi feita usando-se uma coluna contendo a nanopartícula. A água potável enriquecida com cobre (10 mg L⁻¹) foi eluída através da coluna. O íon foi determinado usando-se cromatografia de íons e ICP-MS. Foi possível remover mais de 95% do cobre adicionado na água potável. Os testes também foram realizados em sangue humano contendo a mesma concentração de Cu(II). O cobre foi removido do sangue utilizando-se um ímã pequeno e as medidas de ICP-MS indicaram que

96% do íon metálico foi removido da amostra. Dessa forma, as NPs podem ser usadas para remoção rápida e efetiva de Cu(II) *in vivo*.

Semelhantemente, Hu & Huang (2008) relataram a síntese de um novo adsorvente baseado em nanopartículas magnéticas de sílica (SCMNP) modificadas com mercaptopropiltrimetoxisilane (γ -MPTMS) para extração em fase sólida de quantidades traço de Cd(II), Cu(II), Hg(II) e Pb(II) de amostras biológicas e ambientais. Os íons podem ser facilmente separados em meio aquoso, aplicando-se um campo magnético externo. Os limites de detecção encontrados variaram de 24 a 107 pg L⁻¹, onde o desvio-padrão relativo das medidas variou entre 3,7 e 9,6%.

Além de cobre, nanopartículas de sílica baseadas no método sol-gel também têm sido utilizadas para determinação de outros íons metálicos, tal como Ca(II) (Hun & Zhang, 2007), Pb(II) (Arduini *et al.*, 2007) e Zn(II) (Teolato *et al.*, 2007).

A combinação de nanopartículas de sílica com espectroscopia de fluorescência, para fins analíticos, tem sido discutida (Wang, 2011). Apesar de todo progresso alcançado nesta área, pode-se dizer que estes nanosensores ainda se encontram em estágio inicial de pesquisa, logo, um significativo empenho é necessário para o desenvolvimento e aplicação destes materiais. Isto significa que esse segmento da nanociência é ainda quase inexplorado, configurando-se em um novo horizonte a ser explorado dentro da química analítica.

A imobilização de receptores fluorogênicos em suportes sólidos adequados é uma estratégia relevante para aplicação ambiental, onde sensores ópticos podem ser utilizados para detecção de íons metálicos tóxicos.

A criação de metodologias analíticas e de dispositivos para determinação de espécies em solução é realmente necessário, neste sentido, as NPs de sílica baseadas em polímeros impressos podem ser aplicados com êxito.

Os MIPs (*Pinheiro, 2010*) são empregados exclusivamente para o reconhecimento molecular de espécies biológicas e para pré-concentração de espécies catiônicas. Já os estudos envolvendo as NPs de sílica dedicam-se, geralmente, à investigação do tipo de funcionalização, das propriedades de emissão das nanopartículas e especialmente na otimização das condições de síntese para obter partículas com tamanho desejável. Por esta razão, observa-se que poucos trabalhos enfocam a “aplicação analítica” destes nanosensores, comparados ao volume total de artigos na literatura. Dentro deste contexto, a finalidade deste trabalho consiste em combinar duas importantes vertentes na área de sensores ópticos: “Polímeros de Impressão Molecular” e “Nanopartículas de Sílica”.

Muito métodos novos para aprimorar a performance do sensores químicos ainda são extremamente desafiadores. Nosso objetivo, então, foi sintetizar nanopartículas de sílica usando como estratégia a adição do reagente luminescente em diferentes tempos da reação. A estratégia mostra uma nova forma de imobilização do reagente na matriz de sílica visando obter um nanosensor apto para determinação de íons metálicos tóxicos em meio aquoso.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. GERAL:

Desenvolver sensores ópticos empregando-se reagentes luminescentes imobilizados em diferentes suportes sólidos para determinação de íons Cu(II) em águas usando-se a técnica de espectroscopia de fluorescência.

3.2.2. ESPECÍFICO:

- Avaliar as características espectroscópicas de complexos de rutênio frente a diferentes íons metálicos, visando selecionar um reagente luminescente seletivo a íons cobre.
- Desenvolver fases sensoras empregando diferentes técnicas de imobilização e diferentes tipos de suportes sólidos. Para tal, os sensores foram preparados na forma de membranas (metacrilato, PVC e iônicas) e na forma de partículas (sol-gel e nanopartículas de sílica).
- Preparar fases sensoras a partir de polímeros de impressão molecular e polímeros não impressos.
- Caracterizar e aplicar analiticamente os sensores desenvolvidos.

3.3. PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1. REAGENTES LUMINESCENTES

Neste trabalho foram empregados três novos reagentes luminescentes sintetizados pelo doutorando André Santos, no Grupo de Sensores Optoquímicos e Laboratório de Fotoquímica Aplicada (GSOLFA) da Universidade Complutense de Madrid (UCM).

- **[Ru(phen)₂HAIP](PF₆)₂**: bis(1,10-fenantrolina)-1-(4-hidroxi-3-(1H-imidazol [4,5-f][1,10] rutênio(II) bis hexafluorofosfato.
- **[Ru(phen)₂HMIP](PF₆)₂**: [bis(1,10-fenantrolina)-(2,2'-hidroxi-5'-metoxifenil)imidazol [4,5-f] rutênio(II) bis hexafluorofosfato.
- **[Ru(phen)₂bpytym](PF₆)₂**: bis(1,10-fenantrolina)-N,N'-(2,2'-bipiridina-4,4'-diil)bis(2-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)acetamida) rutênio(II) bis hexafluorofosfato.

3.3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Sais de íons metálicos pesados

- Nitrato de cádmio tetrahidratado (Riedel-de-Haen)
- Nitrato de cobre trihidratado (Aldrich)

- Cloreto de mercúrio (Sigma)
- Acetato de zinco (Panreac)
- Sulfato de níquel hexahidratado (Aldrich)

Reagentes para preparação de membranas de metacrilato

- Trietilamina, (Fluka)
- 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato, (Aldrich)
- Metacrilamida, MAM (Fluka)
- Ácido metacrílico, MAA (Fluka)
- 2-hidroxietil metacrilato, HEMA (Aldrich)
- N,N'-Metileno bis(acrilamida), MBAA (Fluka)
- Poli(etilenoglicol) diacrilato, PEGDA (Aldrich)
- 3-(acrilóiloxi)-2 hidroxipropil metacrilato, AHPM (Aldrich)
- Trimetilopropano etoxilato triacrilato, TMPET (Aldrich)
- 2,2'-azobis(2,4-dimetil valeronitrila), ABDV (Aldrich)
- Dimetilsulfóxido, DMSO

Reagentes para preparação de membranas de PVC

- Cloreto de polivinila, PVC (Fluka)
- Tributíil fosfato, TBP (Aldrich)
- Tetrafenilborato de sódio, NaTPB (Fluka)
- Bis(2-etilhexil) sebacato, DOS (Fluka)
- 2-nitrofenil octil éter, NPOE (Fluka)
- Tri(2-butoxi)etil fosfato, TBEP (Aldrich)

Membranas iônicas

- Biodyne C (nylon 6,6)
- Schleicher & Schuell (S&S)
- Nafion (tiras).

Reagentes para preparação de sol-gel

- Tetrametil ortosilano (TMOS) (Fluka)
- Tetraetil ortosilano (TEOS) (Fluka)
- Metiltrietoxisilano (MTES) (Fluka)
- Dimetildimetoxisilano (DMDMS) (Fluka)

Reagentes para preparação de nanopartículas de sílica

- Tetraetil ortosilano (TEOS) (Fluka)
- Hidróxido de amônio (Synth)

Solventes

- Acetona (Qemical)
- Acetonitrila (Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (Aldrich)
- Etanol absoluto (Merck)

- Metanol (SDS)
- Tetrahidrofurano (Synth)
- Tolueno (SDS)

Reagentes diversos

- Ácido clorídrico (Recaptur)
- Ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA (Merck)
- Ácido fosfórico (Fluka)
- Fosfato de sódio dodeca-hidratado (Pan React, Aldrich)
- Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado (Aldrich);
- Hidróxido de amônio (Synth)
- Hidróxido de potássio (Synth)
- Trifosfato de sódio (Synth)

Soluções de Reagentes Luminescentes

As soluções dos complexos de rutênio foram preparadas em metanol a uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, por diluição, foram preparadas soluções de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em água com 1% de metanol.

Soluções de Cátions Metálicos

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

Soluções Tampão

Soluções de referência de tampão fosfato ($5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em água deionizada. Diluições apropriadas foram feitas para preparação de soluções de diferentes concentrações.

3.3.3. INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA

Para aquisição dos espectros de absorção utilizou-se um Espectrofotômetro Varian Cary-3 Bio UV-VIS.

Para registro dos espectros de emissão e excitação empregaram-se os seguintes equipamentos: Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50, Espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS50B, Espectrofluorímetro Fluoromax 4 Horiba Jobin Yvon e um espectrofluorímetro Cary-Eclipse, VARIAN.

3.3.4. SISTEMA DE MEDIDA

As medidas de fluorescência foram realizadas usando-se um sistema equipado com uma célula de fluxo (contendo a fase sensora), bomba peristáltica (vazão de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$), fibra óptica, espectrofluorímetro e computador para aquisição dos dados. Duas células de fluxo foram empregadas neste caso: célula de Teflon e cubeta de fluxo.

- **Células de Teflon**

A Figura 3.4 mostra a célula de Teflon que comporta duas membranas simultaneamente (Lima, 2009). A membrana foi acomodada em um orifício específico da célula e sobre ela acoplou-se a fibra óptica. A célula possui uma entrada e uma saída de fluxo para passagem das soluções que são bombeadas através da célula até atingir a fase sensora. Esta célula foi utilizada para realização das medidas com as membranas de metacrilato, PVC e iônicas.

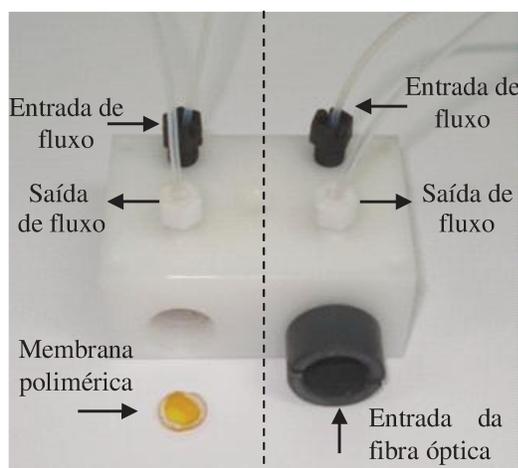


Figura 3.4. Célula de fluxo usada para medidas com as membranas.

- **Cubeta de Fluxo**

As medidas que empregaram o sol-gel foram feitas usando-se uma cubeta de fluxo Hellma 176.052 conforme Figura 3.5 (Pinheiro, 2010). Para empacotar a fase sensora na célula inicialmente foi colocada uma malha de nylon na extremidade da saída de fluxo. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, uma suspensão do sol-gel em metanol foi colocada na entrada da célula, a qual foi aspirada com uma bomba peristáltica, sendo retida pela malha. Empacotada a fase sensora, iniciaram-se as análises de fluorescência.

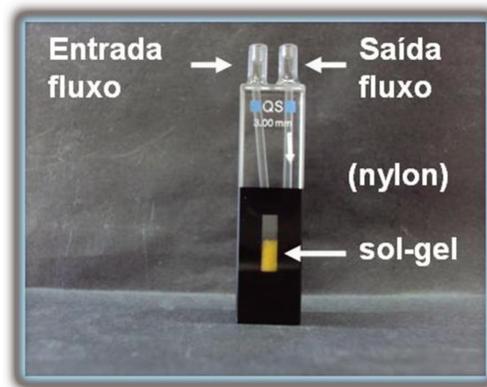


Figura 3.5. Célula de fluxo utilizada para empacotamento do sol-gel.

- **Cubeta de Quartzo**

As medidas de fluorescência foram feitas usando-se um sistema simples composto apenas por uma cubeta de quartzo (1 cm caminho óptico).

Soluções-padrão de cada nanopartícula foram preparadas em etanol (suspensão) e a partir desta solução, diluições apropriadas foram feitas em tampão fosfato.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. AVALIAÇÃO DE REAGENTES LUMINESCENTES EM SOLUÇÃO

3.4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DOS REAGENTES EM SOLUÇÃO

Nesta etapa foram investigados três diferentes complexos de rutênio: $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$, $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HMIP}](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpytym}](\text{PF}_6)_2$, cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura abaixo. Estes complexos de rutênio diferenciam-se apenas pela presença de grupos funcionais distintos, os quais estão destacados na Figura 3.6.

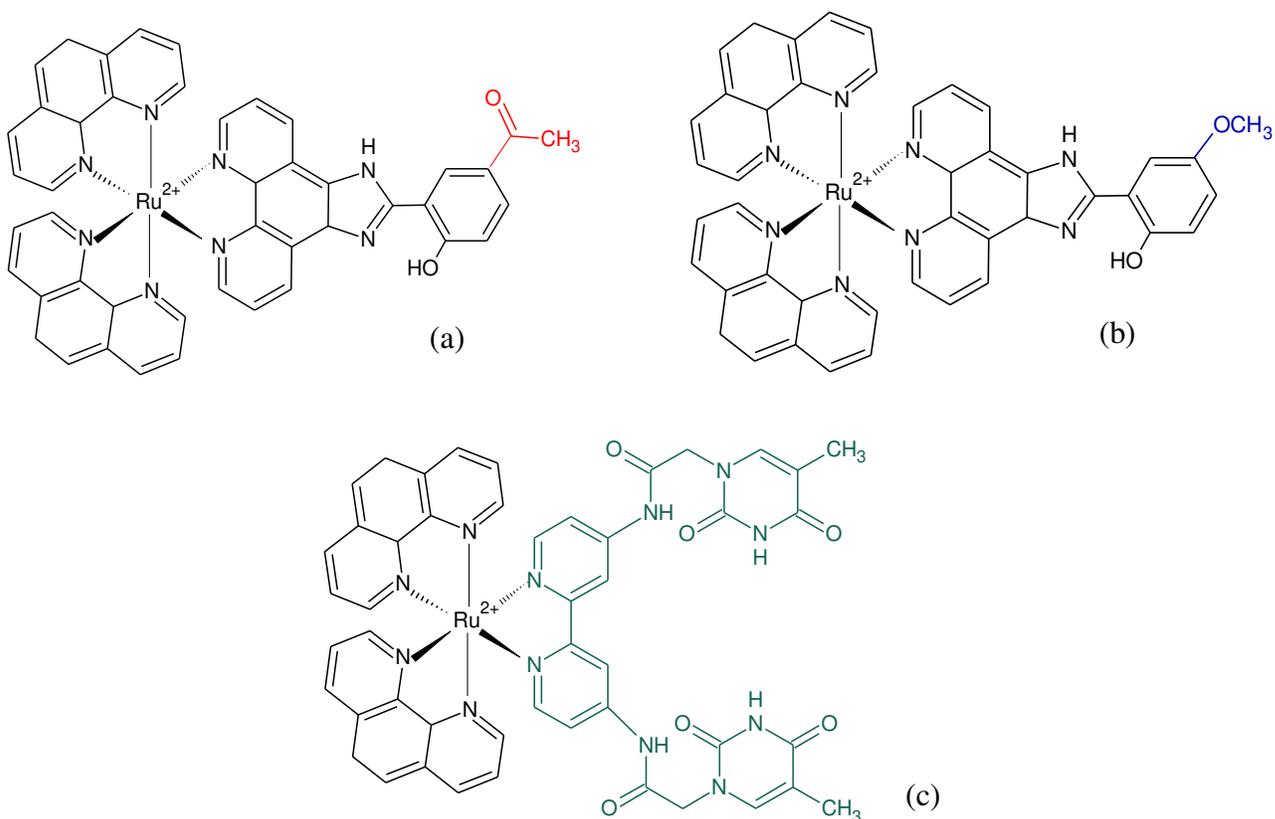


Figura 3.6. Estrutura química dos complexos de Rutênio (a) $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$, (b) $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HMIP}](\text{PF}_6)_2$ e (c) $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpytym}](\text{PF}_6)_2$.

Os reagentes luminescentes foram caracterizados em meio aquoso para obtenção de espectros de absorção e emissão. Nesse estudo, utilizou-se soluções de complexos de rutênio $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ preparadas em tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com 1% de metanol. A Figura 3.7 mostra os espectros de absorção e emissão obtidos para cada reagente.

Os três complexos apresentaram bandas de absorção em 456 nm. Para os espectros de emissão foram obtidas bandas de máxima intensidade em 588, 598 e 614 nm para $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$, $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HMIP}](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpytym}](\text{PF}_6)_2$, respectivamente.

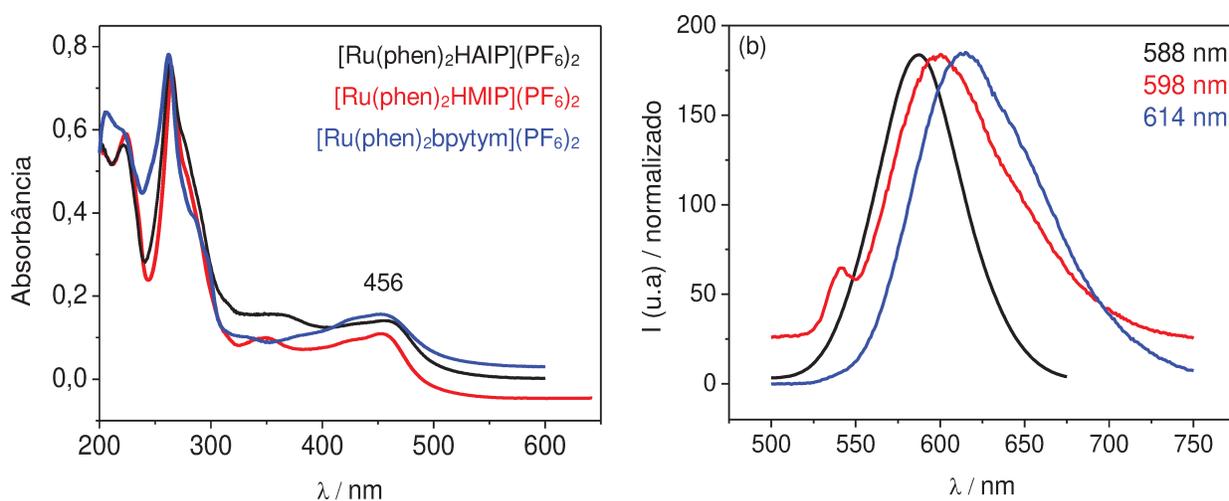


Figura 3.7. (a) Espectros de absorção e (b) emissão dos reagentes luminescentes (tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0).

3.4.1.2. SELETIVIDADE FRENTE A ÍONS METÁLICOS

Para avaliar a seletividade dos complexos de rutênio frente a íons metálicos, cada reagente foi analisado em diferentes valores de pH (2-11) na ausência e na presença de cinco diferentes íons metálicos: Cu(II), Zn(II), Ni(II), Hg(II) e Cd(II). Espectros de absorção e emissão foram registrados utilizando-se concentrações fixas de $1,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5}$; e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de reagente, íon metálico e tampão fosfato, respectivamente.

Os resultados obtidos indicaram que dentre os três reagentes estudados em solução apenas o [Ru(phen)₂HAIP](PF₆)₂ apresentou potencialidade para ser aplicado na construção de sensores químicos, apresentando seletividade para íons cobre a partir de pH 7,0 (Figura 3.8). Os demais reagentes não apresentaram diferenças significativas dos espectros de emissão na presença de diferentes íons metálicos e, portanto, não mostraram seletividade para nenhum dos íons metálicos investigados.

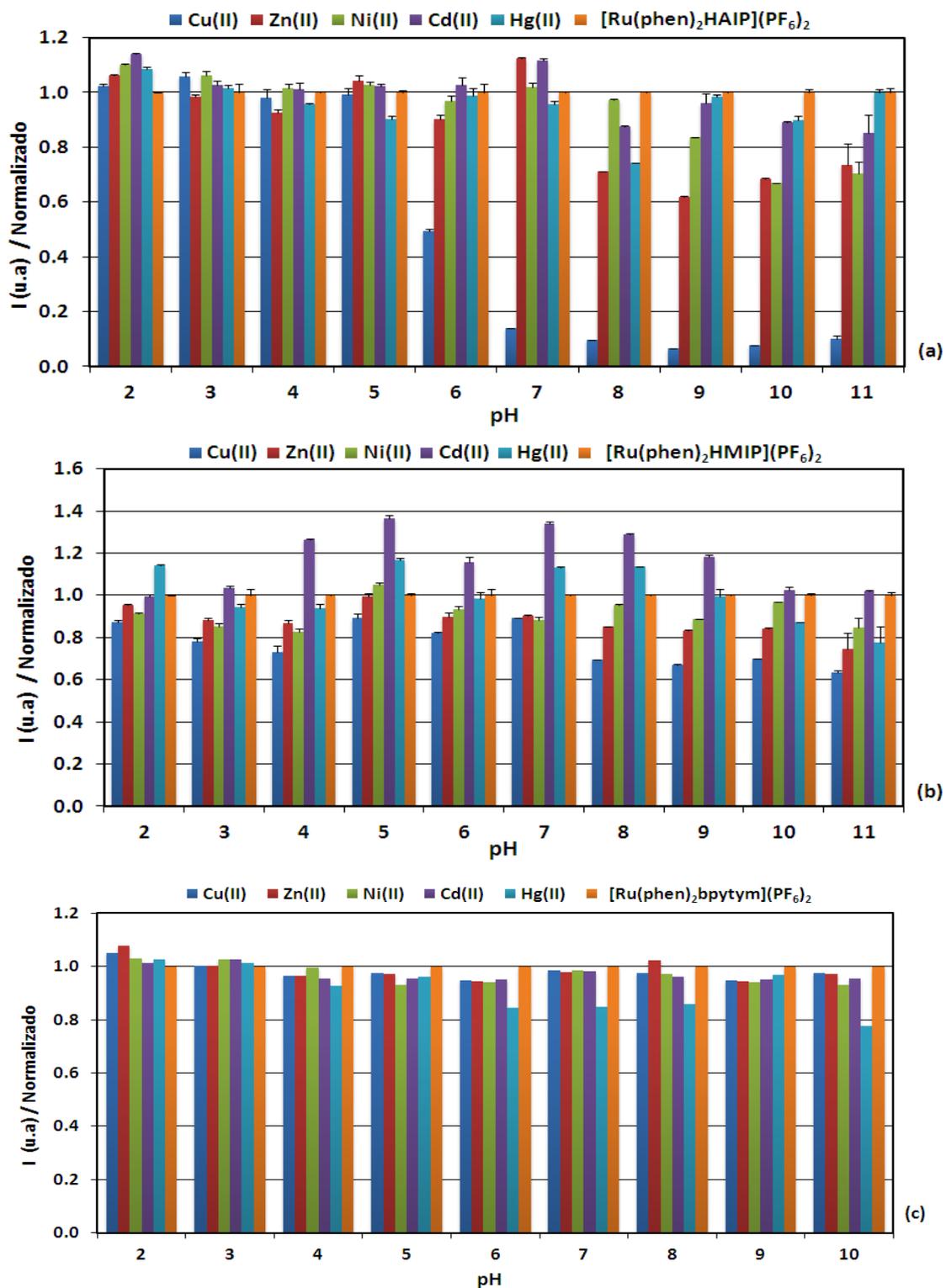


Figura 3.8. Estudo de pH dos reagentes luminescentes na presença de diferentes íons metálicos: (a) [Ru(phen)₂HAIP](PF₆)₂, (b) [Ru(phen)₂HMIP](PF₆)₂ e (c) [Ru(phen)₂bpytym](PF₆)₂. ([reagente] = 1,0 x 10⁻⁵; [metal] = 5,0 x 10⁻⁵ e [tampão fosfato] = 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹).

3.4.1.3. ESTEQUIOMETRIA DE COMPLEXAÇÃO

Para calcular a estequiometria de complexação entre o ligante e o íon cobre, utilizou-se o método da razão molar, que consiste em variar a concentração do metal ou do ligante e manter fixa a concentração do outro componente. Neste trabalho manteve-se a concentração do ligante fixa ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e a de metal variável (0 a $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), variando-se a concentração de metal de 0 a $3,0$ vezes a concentração de ligante, como mostra a Figura 3.9.a. A intensidade de emissão do ligante foi monitorada em função da razão molar íon metálico/ligante durante a titulação de íons cobre com o ligante em meio etanólico. Desse modo, uma curva de intensidade de emissão versus C_M/C_L foi construída e a estequiometria foi determinada através da intersecção das curvas. Observa-se na Figura 3.9.b que a intersecção da curva ocorre aproximadamente em $0,5$, indicando a formação de um complexo $\text{Cu(II):[Ru(phen)}_2\text{HAIP]}(\text{PF}_6)_2$ com estequiometria $1:2$, representada por M_1L_2 .

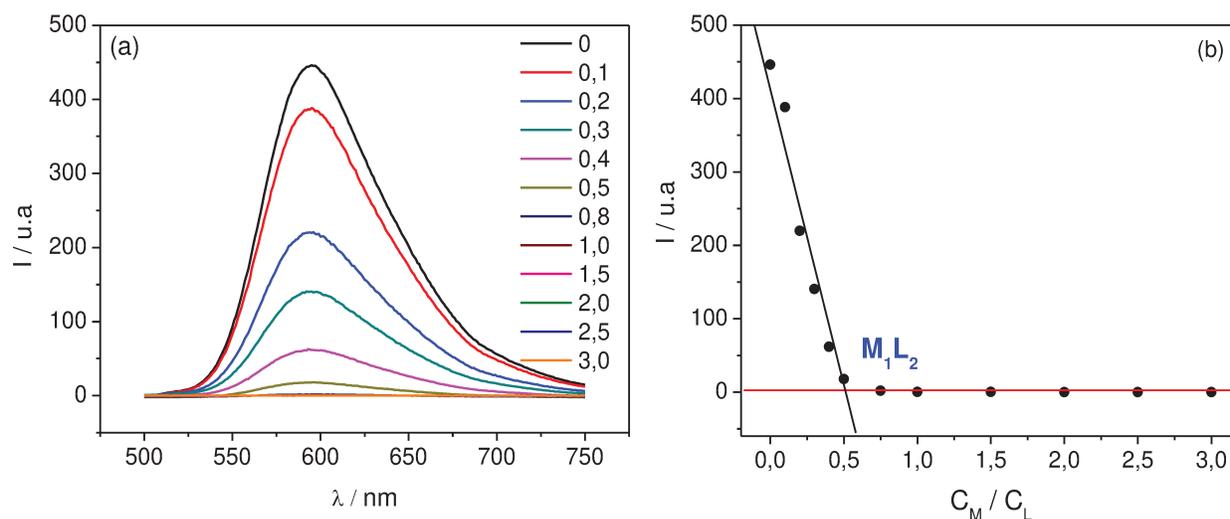


Figura 3.9. (a) Espectros de emissão do complexo de Ru(II) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de cobre ($0 - 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e (b) variação da intensidade de fluorescência em função da relação $[\text{Cu(II)}]/[\text{[Ru(phen)}_2\text{HAIP]}(\text{PF}_6)_2]$ ($\lambda_{\text{ex.}} 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} 593$, fendas de excitação e emissão: 10 nm).

3.4.1.4. CONSTANTE DE ESTABILIDADE

As constantes de estabilidade do complexo de rutênio em solução foram calculadas utilizando-se os mesmos espectros de emissão obtidos na seção anterior. Para tanto, empregou-se o Hyperquad 2006 (*Protonic software*, www.hiperquad.co.uk) que é uma ferramenta computacional usada para simular curvas de titulação de espécies em equilíbrio. Estimou-se que K_1 e K_2 possuem valores na ordem de 10^6 e 10^{11} , respectivamente.

3.4.2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos cinco tipos de sensores aplicando-se diferentes técnicas de imobilização. Todas as fases sensoras descritas a seguir foram preparadas com o reagente luminescente $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$.

Dessa forma, esta seção será dividida em cinco subitens: membranas de metacrilato, membranas de PVC, membranas iônicas, método sol-gel e nanopartículas de sílica.

As técnicas de imobilização empregadas consistem na preparação de polímeros impressos e não impressos, na preparação de fases sensoras, seguido da caracterização analítica e aplicação do sensor desenvolvido.

Neste estudo serão avaliados diversos parâmetros, tais como: efeito do tipo de monômero, solvente, agente reticulante, quantidade e tipo de iniciador e concentração ideal do analito para a obtenção do polímero e otimização das condições de polimerização. Além disso, polímeros não impressos correspondentes para sua avaliação como controle de reconhecimento seletivo também serão analisados.

3.4.2.1. MEMBRANAS DE METACRILATO

3.4.2.1.1. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE METACRILATO

- **Limpeza e ativação dos vidros**

Para limpeza, os vidros (1 cm de diâmetro) foram postos em uma mistura de 75 mL de água e KOH sólido e agitados durante 1 hora. Em seguida, foram lavados com água e submetidos a uma mistura contendo 50 mL de água, 15 mL de HCl concentrado (agitação por 20 minutos). Posteriormente, foram lavados com água novamente e colocados em contato com outra mistura de 75 mL de água, 15 mL de H₂O₂ 30% (v/v) e 15 mL de HCl concentrado (agitação por 20 minutos). Por fim, foram lavados uma vez com acetona e duas vezes com tolueno. Após ativação, os vidros foram silanizados usando-se uma mistura de 75 mL de tolueno, 300 µL de trietilamina e 3 mL de 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato e agitados durante 17 horas. Após agitação, os vidros foram lavados duas vezes com tolueno e secados com nitrogênio.

- **Composição das membranas de metacrilato**

Os primeiros sensores desenvolvidos foram as membranas de metacrilato. Seis formulações distintas foram preparadas, variando-se os tipos de monômeros e reticulantes como especificado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composições das membranas de metacrilato imobilizadas com o reagente $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$.

Componentes	Membranas					
	A	B	C	D	E	F
MAM ^a (mg)	10	10	10	10	20	15
HEMA ^a (μL)	20	10	10	10	20	20
MAA ^a (μL)	-	10	-	-	20	20
MBAA ^b (mg)	-	18	7,5	-	35	50
PEGDA ^b (μL)	58	-	40	-	35	-
AHPM ^b (μL)	-	6,5	-	-	-	-
TMPET ^b (μL)	-	-	-	40	-	-
DMSO ^c (μL)	75	100	50	45	200	200
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$ (mg)	1,0	0,6	0,5	0,5	1,25	0,5
ABDV ^d (mg)	1,5	2,0	2,0	2,0	3,0	2,5

^a Monômero funcional^b Reticulante^c Solvente^d Iniciador polimérico

Para preparação das misturas, quantidades apropriadas de monômeros, reticulantes, complexo de rutênio e iniciador polimérico foram dissolvidas em DMSO e submetidas a agitação em ultrassom até completa dissolução. Todas as membranas foram feitas por deposição manual adicionando-se 3 μL de cada mistura em lâminas de vidros (1 cm de diâmetro) previamente limpas e ativadas. Fitas de poliéster (*Mylar*) foram postas sobre cada membrana para uniformizar a espessura do filme formado. Para iniciar o processo de polimerização, foram

submetidas à temperatura de 60°C em estufa durante 24h. Um total de quatro membranas foram fabricadas para cada composição.

3.4.2.1.2. AVALIAÇÃO DAS MEMBRANAS DE METACRILATO

Dentre as seis membranas de metacrilato desenvolvidas, apenas duas apresentaram-se homogêneas (membranas **C** e **E**). As demais composições apresentaram rachaduras e bolhas na superfície do filme formado e por este motivo foram descartadas dos estudos. Observou-se que a principal dificuldade encontrada na preparação desta fase sensora foi a etapa de polimerização. Para tentar solucionar este problema membranas foram fabricadas à temperatura ambiente, mas a fase sensora manteve-se líquida e não apresentou qualquer sinal de polimerização. Como alternativa optou-se por realizar a polimerização em uma atmosfera de DMSO em estufa (60°C) para evitar possíveis rachaduras, todavia o problema não foi solucionado. Provavelmente, o próprio reagente pode ter inibido a polimerização, provocada por um desequilíbrio de cargas entre o complexo e os demais componentes da mistura. Em virtude dos problemas encontrados, apenas as membranas **C** e **E** foram utilizadas para realização das medidas de fluorescência.

Os espectros de excitação e emissão das membranas foram medidos em solução de tampão fosfato $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0). Ambas as membranas apresentaram máxima absorção em 459 nm, enquanto que a intensidade máxima de emissão foi obtida em 604 e 608 nm para as membranas **C** e **E**, respectivamente. Estes valores estão coerentes com os valores encontrados para as medidas em solução que correspondem a 456 e 588 nm para absorção e emissão, respectivamente. A Figura 3.10 ilustra os espectros obtidos.

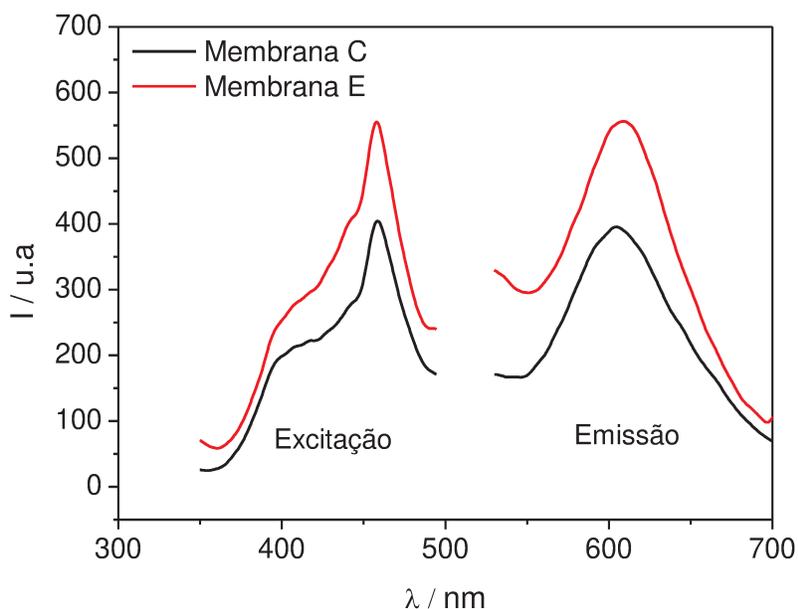


Figura 3.10. Espectros de excitação e emissão obtidos para as membranas de metacrilato. ($\lambda_{\text{ex.}}$ 459 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 608 nm, fendas de excitação e emissão 15 e 20 nm).

Para avaliar a resposta das membranas foram realizadas medidas de fluorescência na presença de íons cobre ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de tampão fosfato $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (5-9). A Figura 3.11 mostra os espectros de emissão das membranas obtidos na ausência e na presença de cobre.

Primeiramente, espectros de emissão foram registrados na ausência do metal em pH 5,0; em seguida, a mesma medida foi feita com a membrana na presença de íons Cu(II). O mesmo procedimento foi feito para os demais valores de pH.

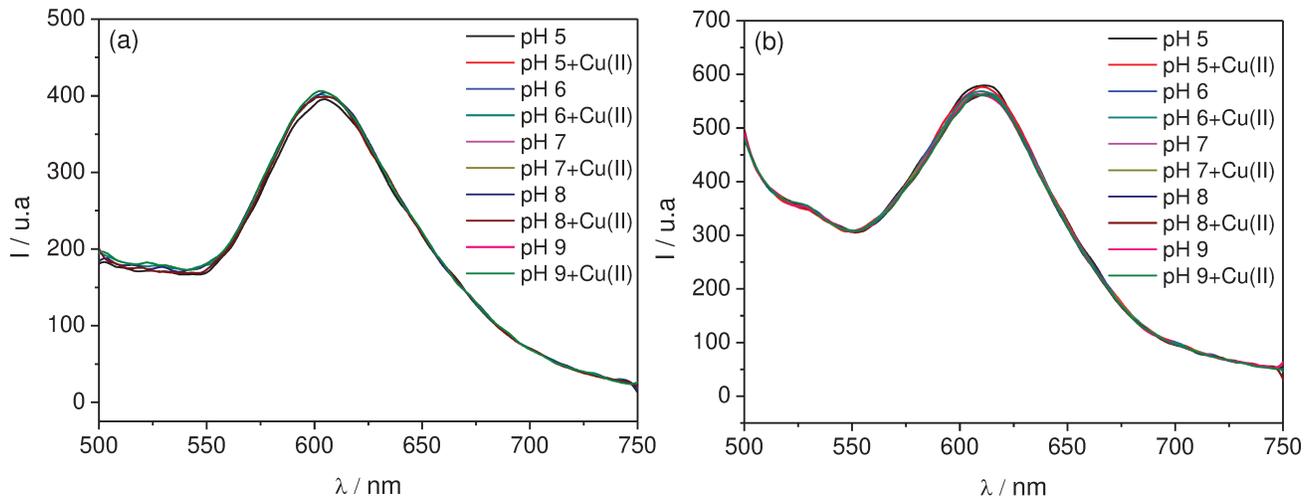


Figura 3.11. Resposta das membranas de metacrilato na presença de íons Cu(II) em solução de tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de pH 5,0 – 9,0: (a) membrana C e (b) membrana E. ($\lambda_{\text{ex.}}$ 459 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 608 e 604 nm, fendas de excitação e emissão 15 e 20 nm).

Observa-se que não há diferenças significativas entre os espectros de emissão na ausência e na presença de íons cobre, uma vez que não ocorreu supressão de fluorescência. Dessa forma, os resultados obtidos indicaram que as membranas de metacrilato não foram capazes de detectar íons cobre no intervalo de pH estudado. Além disso, após efetuar as primeiras medidas, a membrana foi armazenada em solução tampão fosfato ($5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) e verificou-se que o filme formado se despreendeu completamente do vidro, ocorrendo perda total da fase sensora. Provavelmente, a passagem de fluxos contínuos através das membranas propiciou a perda da fase sensora, indicando que a polimerização não foi eficaz. Por esta razão, o estudo com as membranas de metacrilato foi encerrado e resolveu-se investigar outras técnicas de imobilização.

3.4.2.2. MEMBRANAS DE PVC

3.4.2.2.1. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DE PVC

O segundo tipo de imobilização empregado foi a membrana de PVC plastificada. A resposta analítica deste tipo de sensor não depende apenas do gradiente de concentração de íons Cu(II) através da membrana, depende também das propriedades da matriz polimérica e de seus constituintes. O teor de PVC utilizado é importante, pois influencia na espessura do filme formado. A natureza do plastificante, por sua vez, é responsável pela mobilidade dos cátions através da membrana (*Mashhadizadeh et al., 2002; Jain et al., 2005*). Além disso, a estabilidade e a vida útil do sensor também dependem do tipo de plastificante empregado. Os aditivos lipofílicos atuam como trocadores iônicos afetando a permeabilidade dos íons na membrana (*Zhang et al., 2006*). Com base nisto, a fim de otimizar a composição da membrana de PVC, sensores de diferentes composições foram desenvolvidos e investigados neste trabalho.

Foram preparados sete coquetéis com diferentes formulações, variando-se a concentração de complexo de rutênio e os tipos de plastificantes. Além disso, o íon lipofílico NaTPB foi empregado para formação de par iônico com o complexo de rutênio. Quantidades apropriadas de complexo, íon lipofílico e plastificantes foram dissolvidas em uma mistura contendo 26 mg de PVC, 1 mL de THF destilado e 0,15 mL de acetonitrila, conforme especificado na Tabela 3.2. Essas formulações foram baseadas no trabalho proposto por Capitán-Vallvey *et al.* (2004).

Tabela 3.2. Composições das membranas de PVC imobilizadas com o reagente [Ru(phen)₂HAIP](PF₆)₂.

Componentes	Membranas						
	A	B	C	D	E	F	G
PVC (mg)	26	26	26	26	26	26	26
[Ru(phen) ₂ HAIP](PF ₆) ₂ (mg)	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5
NaTPB ^a (mg)	-	-	0,29	0,58	-	-	-
TBP ^b (μL)	64	64	65	65	-	-	-
DOS ^b (μL)	-	-	-	-	68	-	-
NPOE ^b (μL)	-	-	-	-	-	60	-
TBEP ^b (μL)	-	-	-	-	-	-	62
THF ^c (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
ACN ^c (mL)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

^a íon lipofílico^b plastificantes^c solvente

Para a preparação das membranas empregaram-se três técnicas distintas: deposição manual, *spin coating* e *knife coating*.

- **Deposição manual**

A deposição manual consiste em gotejar manualmente uma alíquota do coquetel em um suporte sólido adequado. Foram adicionados 15 μL de coquetel em fitas de poliéster (*Mylar*) com dimensões de 1,5 cm x 1,5 cm. Os filmes foram cobertos com um béquer até evaporação do solvente (2 horas), em seguida

foram cortados em círculos de 1 cm de diâmetro e utilizados para iniciar as medidas de fluorescência.

- *Spin Coating*

A técnica de *spin coating* consiste em formar filmes finos sob rotação da membrana a velocidade controlada e conhecida. Neste estudo a espessura do filme foi medida investigando-se os seguintes parâmetros: volume de coquetel adicionado (15 e 50 μL), velocidades de agitação (600, 720 e 1200 rpm) e tempo de rotação (30 e 60 segundos).

- *knife coating*

Na técnica de *knife coating*, a formação do filme é feita espalhando-se a mistura manualmente sobre um bloco de metal acoplado em um sistema à vácuo, usando-se uma espécie de lâmina (faca). Os parâmetros avaliados neste caso foram: volume de coquetel adicionado (50, 80 e 100 μL) e espessura do filme (25 e 500 μm). Em ambas as técnicas, *Mylar* também foi usado como suporte do filme.

Avaliando-se as membranas preparadas pelas três técnicas citadas acima, verificou-se que os filmes mais homogêneos foram obtidos por deposição manual. Por esta razão, todas as membranas de PVC desenvolvidas nesta etapa do trabalho foram feitas aplicando-se esta técnica.

3.4.2.2.2. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO DE Ru(II)-PAR IÔNICO

Inicialmente, realizou-se um estudo da concentração de complexo de Ru(II) usando-se duas massas distintas: 0,5 e 1,0 mg que correspondem às membranas **A** e **B** da Tabela 3.2 Em seguida, este mesmo estudo foi feito usando-se o tetrafenilborato de sódio (íon lipofílico) para formar um par iônico com o complexo de Ru(II) (membranas **C** e **D**). O íon lipofílico foi usado para investigar o efeito do trocador iônico na resposta da fase sensora.

A Figura 3.12 mostra os espectros de excitação e emissão para as quatro primeiras membranas medidas em solução de tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. As membranas apresentaram máximos de absorção e emissão em 459 nm e 610 nm, respectivamente.

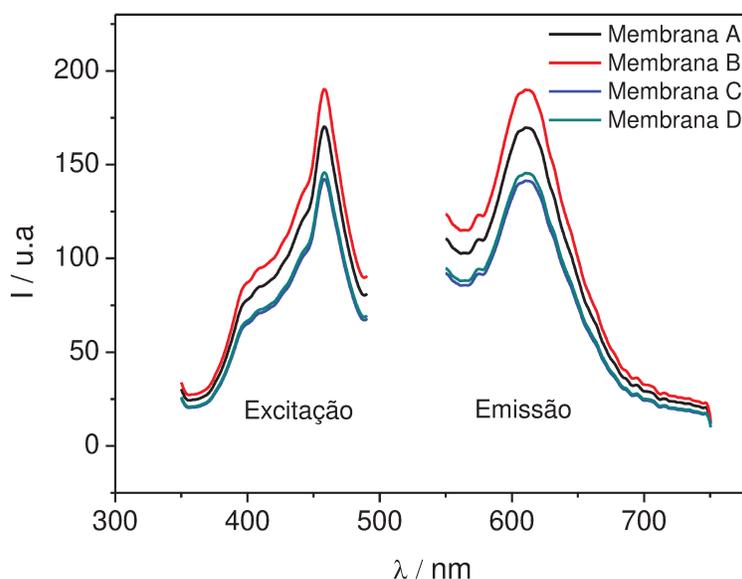


Figura 3.12. Espectros de excitação e emissão obtidos das membranas de PVC em solução de tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. ($\lambda_{\text{ex.}}$ 459 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 610 nm, fendas de excitação e emissão 15 e 20 nm).

Antes de iniciar as medidas de fluorescência, cada membrana foi equilibrada em solução de tampão fosfato ($5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) por 24h. Para verificar se ocorreu lixiviação do reagente, espectros de emissão de cada sobrenadante foram medidos e observou-se que todas as membranas sofreram lixiviação. Com base nestas medidas, verificou-se que dentre as quatro composições analisadas, as membranas contendo 1,0 mg de complexo apresentaram uma perda de reagente mais elevada. Por isso, utilizou-se 0,50 mg de complexo como sendo a massa adequada para fabricação das membranas de PVC.

Observou-se também que a perda de reagente é menos intensa quando se emprega a formação de par iônico, indicando que o uso do íon lipofílico favorece a imobilização do complexo na matriz polimérica, aumentando a estabilidade da membrana em meio aquoso. Por outro lado, o próprio íon lipofílico provoca um *quenching*, reduzindo o sinal de fluorescência. Isto pode ser constatado, comparando-se a diminuição na intensidade de emissão das membranas **B** e **D**.

Comparativamente, pode-se dizer que a membrana A (composta por 0,50 mg de reagente na ausência de par iônico) foi a composição mais apropriada em termos de estabilidade da membrana em meio aquoso.

Apesar dos problemas de lixiviação, realizou-se um estudo cinético para avaliar a resposta das membranas na presença de Cu(II) em função tempo. A concentração de íon metálico utilizada foi $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

Os resultados mostraram que não houve supressão de fluorescência nos espectros de emissão medidos na presença e na ausência do metal. Assim sendo, concluiu-se que nenhuma das membranas foi capaz de detectar íons cobre nas condições experimentais investigadas. Portanto, novas composições foram

desenvolvidas na tentativa de encontrar uma membrana sensível ao cobre. Neste caso decidiu-se variar os tipos de plastificantes, como será visto na seqüência.

3.4.2.2.3. AVALIAÇÃO DE PLASTIFICANTES

Uma segunda avaliação foi estabelecida variando-se os tipos de plastificantes. Além de TBP, outros três plastificantes foram investigados: DOS, NPOE e TBEP representados pelas membranas **E**, **F** e **G**, respectivamente. Espectros de excitação e emissão foram obtidos para cada membrana imersa em solução de tampão fosfato. Os espectros adquiridos foram similares aos espectros da Figura 3.12. As três membranas apresentaram máximos de absorção e emissão em 459 e 610 nm, respectivamente.

Para avaliar a resposta dos sensores **E**, **F** e **G**, o sinal de fluorescência foi monitorado em três etapas distintas: **(1)** em atmosfera de ar; **(2)** em meio aquoso, na ausência de cobre e **(3)** em meio aquoso, na presença de cobre.

Na etapa **(2)** cada membrana foi imersa, separadamente, em 2 mL de solução tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e mantida sob agitação durante 2 h. Em seguida, os espectros de emissão de cada sobrenadante foram medidos. Na terceira etapa as membranas resultantes da etapa **(2)** foram medidas na presença de Cu(II) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (tamponada com pH 7,0). A Figura 3.13 mostra os dados obtidos em cada etapa.

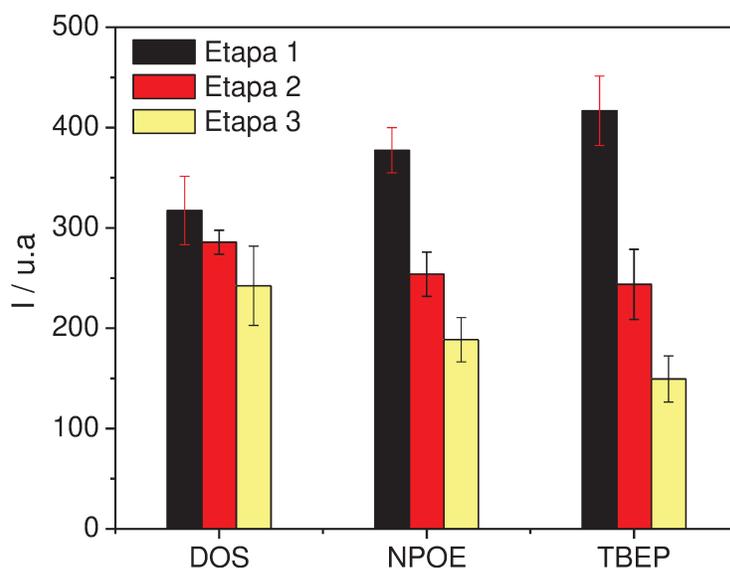


Figura 3.13. Resultados obtidos para as membranas com diferentes plastificantes: Etapa (1) atmosfera de ar; Etapa (2) meio aquoso, na ausência de cobre e Etapa (3) meio aquoso, na presença de $\text{Cu(II)} 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (tamponada com pH 7,0). ($\lambda_{\text{ex.}}$ 459 nm; $\lambda_{\text{em.}}$ 610 nm; fendas de excitação e emissão: 10 e 15 nm; média de duas réplicas).

Analisando-se a etapa (1), pode-se verificar que os plastificantes apresentaram a seguinte ordem crescente de fluorescência: $\text{DOS} < \text{NPOE} < \text{TBEP}$. Quando as membranas foram equilibradas em tampão fosfato (etapa 2), observou-se que ocorreu uma diminuição nas suas intensidades de fluorescência, sugerindo que houve perda de reagente durante os ensaios. Por esta razão, o sobrenadante da etapa (2) foi medido para verificar a porcentagem de lixiviação de cada membrana. Os valores encontrados foram 4,4; 7,8 e 42,2 % para DOS, NPOE e TBEP, respectivamente. Estes dados demonstram que ocorreu uma perda de reagente significativa durante as três etapas realizadas.

Devido aos problemas de lixiviação, não se pode afirmar que na etapa (3) o íon Cu(II) suprimiu a fluorescência do reagente imobilizado, uma vez que a queda do sinal analítico pode ter sido proveniente da perda do complexo para o meio aquoso.

Apesar disso, outros experimentos foram feitos para tentar obter uma resposta para Cu(II). Neste caso, utilizou-se apenas as membranas contendo DOS e NPOE. O TBEP foi descartado das medidas por causa de seu elevado percentual de lixiviação.

Para dar continuidade as análises, uma nova estratégia foi elaborada. Membranas contendo DOS e NPOE foram equilibradas durante 24h em uma solução de Cu(II) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, (Mahajan & Sood, 2007). Esse experimento foi feito para aumentar o tempo de difusão e a permeabilidade dos íons cobre na membrana polimérica, e assim facilitar a detecção do metal. Após 24 h as membranas foram medidas, todavia, nenhuma resposta ao metal foi observada.

Baseando-se nestas informações, pode dizer que o uso de diferentes plastificantes e o emprego de um íon lipofílico não contribuíram para a obtenção de melhores respostas analíticas. Constatou-se que as membranas de PVC não modificaram as propriedades da fase sensora estudada e, portanto, foram descartadas de futuras avaliações.

3.4.2.3. MEMBRANAS IÔNICAS

3.4.2.3.1. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS IÔNICAS

Outra técnica empregada foi o uso de membranas iônicas. Nessa técnica o complexo de rutênio foi imobilizado, fisicamente, em três diferentes membranas comerciais: *Biodyne C* (nylon 6,6); *Schleicher & Schuell* (S&S) ambos com tamanho de poro de 0,45 μm ; e Nafion (tiras).

- **Polímeros Não Impressos – NIP**

As primeiras membranas iônicas foram desenvolvidas sem a formação de polímeros impressos. Para imobilização do reagente, as membranas foram cortadas em círculos (1,0 cm de diâmetro) e cada uma delas foi submersa em 1 mL de solução do ligante em duas concentrações distintas: $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do complexo de Ru(II). Posteriormente, as fases sensoras foram agitadas durante 24 h para adsorver o reagente na membrana.

- **Polímeros de Impressão Molecular – MIP**

O procedimento experimental executado para o MIP foi semelhante ao procedimento realizado para preparação do NIP, exceto pela presença do Cu(II). Para formação da molécula-alvo, duas relações estequiométricas Metal-Ligante foram consideradas: M₁L₁ e M₁L₂. Para a relação M₁L₁, foram misturados 1 mL de solução de ligante $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e 30,2 μL de solução de Cu(II)

$3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. No caso de M_1L_2 , misturou-se a mesma proporção de ligante e $15,1 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de Cu(II) $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.2.3.2. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE

Duas diferentes concentrações de ligante ($1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram usadas para avaliar o processo de imobilização do reagente nas membranas iônicas, como pode ser visto na Figura 3.14. Os espectros de emissão obtidos para as membranas forneceram máximo de emissão entre 600 e 605 nm. Para absorção obteve-se comprimento de onda máximo em 460 nm.

Analisando-se a Figura 3.14, observa-se que as membranas imersas em soluções mais concentradas favoreceram o aumento da intensidade de emissão, onde Biodyne C apresentou o melhor sinal analítico, seguido de S&S. O Nafion apresentou intensidade próxima de zero, neste caso, concentrações mais baixas deveriam ser investigadas para tentar eliminar efeitos de espalhamento de luz e obter um melhor sinal de fluorescência. Resolveu-se não mais utilizar o Nafion e medidas subsequentes foram feitas com as outras membranas usando-se a concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para imobilização do reagente.

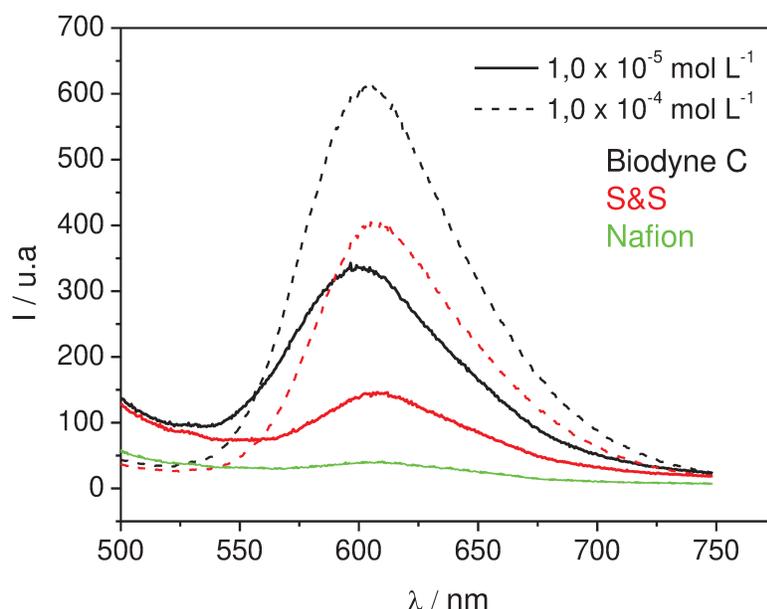


Figura 3.14. Espectros de emissão obtidos para membranas iônicas em diferentes concentrações de indicador. (λ_{ex} , 460 nm, fendas de excitação e emissão: 10 nm).

As membranas de Biodyne C e S&S foram postas em uma solução de Cu(II) $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e novos espectros foram adquiridos. Neste caso, não foi observada sensibilidade ao metal. Para avaliar o efeito de difusão do cobre na fase sensora, um estudo cinético também foi realizado e verificou-se que a resposta não se modifica em função do tempo, comprovando a baixa sensibilidade do sensor.

3.4.2.3.3. ESTUDO DA ESTEQUIOMETRIA METAL-LIGANTE

Os próximos testes foram executados variando-se a estequiometria Metal-Ligante. A Figura 3.15 ilustra os resultados obtidos para todas as membranas iônicas com e sem MIP.

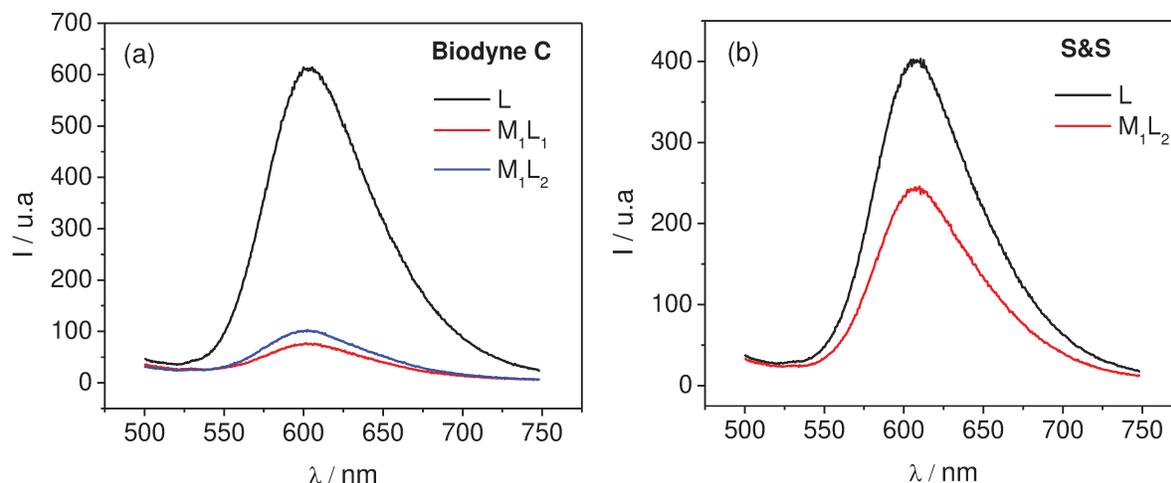


Figura 3.15. Espectros de emissão obtidos para membranas iônicas com diferentes estequiometrias Metal-Ligante (M_1L_1 , M_1L_2) (a) Biodyne C, (b) S&S. (λ_{ex} . 460 nm, fendas de excitação e emissão: 10 nm).

Membranas preparadas na presença de cobre favorecem o processo de supressão de fluorescência independente da relação estequiométrica entre metal e indicador, como pode ser visualizado na Figura 3.15, onde se observa o *quenching* para as relações 1:1 e 1:2. Considerando-se a relação M_1L_2 , nota-se que Biodyne C suprime 3 vezes mais fluorescência que S&S, por isso essa membrana foi escolhida para dar continuidade as análises.

Um estudo de pH (2-10) também foi realizado usando-se a membrana Biodyne C para verificar o comportamento do ligante imobilizado, entretanto, nenhuma modificação dos espectros de emissão foi verificada. Diferentes fluxos de solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram passados através da membrana e verificou-se que com esta concentração de ácido não foi possível extrair o cobre da fase sensora. Foi necessário 4h para retirada do metal, demonstrando que a fase sensora é praticamente irreversível e por isso não pode ser empregada para construção de um sensor.

3.4.2.4. SOL-GEL

3.4.2.4.1. SÍNTESE DO SOL-GEL

Para otimizar a composição do sol-gel, nove diferentes materiais foram sintetizados e divididos em duas classes principais: **NIP** e **MIP**, os quais foram baseados e adaptados no procedimento experimental proposto por Moreno (Moreno, 1994).

- **Polímeros Não Impressos – NIP**

Os polímeros não impressos foram preparados utilizando-se apenas o complexo de rutênio e quatro diferentes precursores poliméricos. As quantidades empregadas de cada componente estão descritas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Composições de sol-gel empregadas para síntese do NIP.

Componentes (mL)	Sol-gel			
	A	B	C	D
TMOS ^a	5	-		6
MTES ^a	-	2,5	4 mL de sol-gel A	-
DMDMS ^a	-	-	+	2,5
MeOH	6	3	4 mL de sol-gel B	3
Solução (a)	0,8	0,48		1,2
H ₂ O	2,4	1,2		1,2

^aPrecursor

Primeiramente foi preparada uma solução (a) contendo 5,87 mg de complexo, 250 μL de NH_3 $1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e 9 mL de metanol. O sol-gel **A** foi preparado misturando-se 5 mL de TMOS, 6 mL de metanol e 2,4 mL de água, seguido de agitação durante 5 minutos. A esta mistura foram acrescentados 0,8 mL da solução (a). A mistura resultante foi coberta com filme plástico e mantida em repouso à temperatura ambiente até iniciar o processo de formação de gel (~ 5 dias). Após a formação do gel, o filme foi perfurado para facilitar a evaporação do solvente e acelerar a formação de um vidro (sólido amarelo). O sólido formado foi mantido em estufa (à 45°C) até obtenção de massa constante (~ 3 a 5 dias), o qual foi triturado, peneirado (100-150 μm) e armazenado em local seco. Os materiais **B**, **C** e **D** foram sintetizados de forma semelhante.

- **Polímeros de Impressão Molecular – MIP**

Os polímeros impressos foram sintetizados usando-se o complexo na presença de Cu(II) junto com os precursores poliméricos. Neste caso, foram consideradas duas relações estequiométricas Metal-Ligante (1:1 e 1:2) e três diferentes percentuais de Ligante:Precursor (0,001; 0,01 e 0,1%), onde a % corresponde ao (n° de mol do ligante / n° de mol do precursor) x 100. A Tabela 3.4 mostra as formulações para cada sol-gel.

Tabela 3.4. Composições de sol-gel empregadas para síntese do MIP.

Componentes	Sol-gel				
	M ₁ L ₁	M ₁ L ₂			
	E ^a	F ^a	G ^b	H ^c	I ^a
TMOS (mL)	5	2,5	1,9	0,38	-
TEOS (mL)	-	-	-	-	2,4
MeOH (mL)	6	3	2,3	0,46	3
Solução (a) (mL)	0,8	0,4	2,4	4,8	0,4
Cu(NO ₃) ₂ (μL)	88	22	132	264	22
H ₂ O (mL)	2,2	1,18	1,27	1,10	1,28

Ligante:Precursor = ^a 0,001; ^b 0,01; ^c 0,1%

O sol-gel **E** foi desenvolvido a partir de duas soluções **(1)** e **(2)**. A solução **(1)** foi preparada misturando-se 0,8 mL da solução **(a)**, 88 μL de solução de Cu(NO₃)₂ 4,9 x 10⁻³ mol L⁻¹ em MeOH e 112 μL de água deionizada. Essa mistura foi feita para formação do complexo metal-ligante em meio aquoso. A solução **(2)** foi feita adicionando-se 5 mL de TMOS, 6 mL de metanol e 2,2 mL de água deionizada. Cada mistura foi agitada separadamente durante 5 minutos. O sol-gel resultante foi obtido misturando-se **(1)** e **(2)**. Para obtenção do sólido, realizou-se o mesmo procedimento experimental anterior. As demais composições foram preparadas de maneira similar. Antes de iniciar as medidas de fluorescência, o íon cobre foi extraído de cada sol-gel usando-se solução de HCl 0,1 mol L⁻¹.

3.4.2.4.2. AVALIAÇÃO DOS PRECURSORES POLIMÉRICOS

Primeiramente avaliou-se o desempenho de três diferentes precursores poliméricos: TMOS, MTES e DMDMS. Para tal, foram preparadas fases sensoras contendo um ou mais tipos de precursores (sol-gel **A**, **B**, **C** e **D**). Observou-se que nenhum dos materiais sintetizados perdeu o ligante por lixiviação, indicando que houve uma eficiente interação entre o ligante e a rede de silicato formada, ou seja, a imobilização foi bastante eficaz.

Com a finalidade de avaliar a funcionalidade das fases sensoras, um estudo cinético foi feito para monitorar a intensidade de fluorescência em função do tempo. A execução das medidas foi feita usando-se duas concentrações de Cu(II), $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹. Os resultados foram discutidos considerando-se a razão da intensidade de emissão do ligante livre (I_0) e do ligante na presença de cobre (I), como pode ser visto na Figura 3.16. O sol-gel **B** não foi incluído nos resultados porque apresentou baixa intensidade de fluorescência na ausência do supressor (íons Cu(II)).

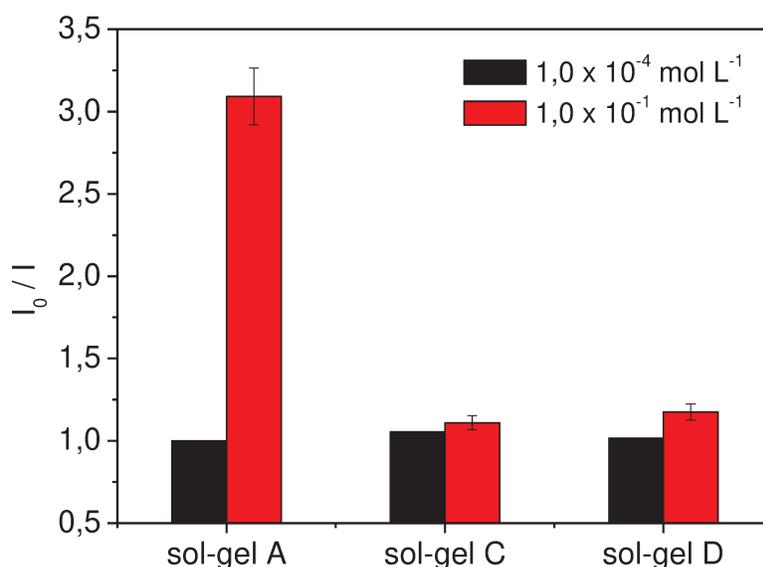


Figura 3.16. Resposta do sol-gel (NIP) em função de diferentes concentrações de Cu(II) em tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0; média de duas réplicas. (λ_{ex} , 460 nm, λ_{em} , 590 nm, fendas de excitação e emissão: 3 nm).

Analisando-se a Figura 3.16, nota-se que as matrizes sol-gel não conseguem detectar íons cobre em baixas concentrações ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Apenas o sol-gel A, composto somente por TMOS, mostrou-se sensível ao íon cobre na concentração de $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. As matrizes também foram analisadas em outros valores de pH (8-10), todavia nenhuma resposta ao metal foi observada. Dessa maneira, pode-se dizer que a mistura de diferentes precursores não forneceu melhores respostas, indicando que a modificação no grau de reticulação não facilitou a complexação do íon metálico.

Para finalizar esta etapa, concluiu-se que TMOS é o precursor mais adequado para dar continuidade às demais investigações. Deste ponto em diante, serão abordados os materiais baseados em MIP.

3.4.2.4.3. AVALIAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA METAL-LIGANTE

Novas fases sensoras foram sintetizadas baseando-se no sol-gel **A**. Polímeros de impressão molecular foram desenvolvidos a partir desta composição. As análises foram feitas considerando-se duas estequiometrias Metal-Ligante: M_1L_1 e M_1L_2 , representadas pelas matrizes **E** e **F**, respectivamente. Além disso, outro precursor foi avaliado: TEOS (sol-gel **I**).

Para avaliar a sensibilidade desses novos materiais, outro estudo cinético foi desenvolvido para três concentrações de Cu(II): $1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$ e $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, conforme Figura 3.17.

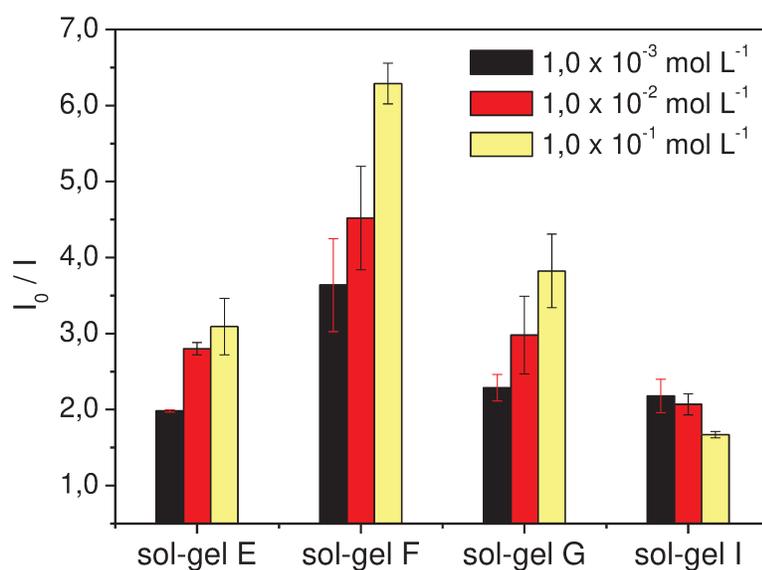


Figura 3.17. Resposta do sol-gel (MIP) em função de diferentes concentrações de Cu(II) em tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0; média de duas réplicas. (λ_{ex} , 460 nm, λ_{em} , 590 nm, fendas de excitação e emissão: 3 nm).

Observa-se que todas as matrizes apresentaram respostas significativas para as três concentrações analisadas. A melhor resposta foi obtida para o sol-gel **F**, sugerindo que a estequiometria M_1L_2 fornece uma melhora na resposta analítica comparada a M_1L_1 . Com relação ao sol-gel **I**, ocorreu um comportamento atípico, o sinal decresceu com o aumento da concentração do íon metálico. Desse modo, o TEOS não é um precursor adequado para o estudo em questão e foi excluído das avaliações. Nesta etapa o sol-gel **F** foi escolhido como a fase sensora mais adequada.

A composição **H** não foi analisada porque apresentou intensidade de fluorescência próxima de zero. Provavelmente, isto ocorreu devido a elevada quantidade de ligante que pode ter provocado auto-absorção. Por esta razão, esta fase sensora foi descartada.

3.4.2.4.4. AVALIAÇÃO DA ESTEQUIOMETRIA LIGANTE-PRECURSOR

A última avaliação foi feita considerando-se a estequiometria entre ligante e precursor polimérico. Levando-se em conta que o sol-gel **F** possui uma porcentagem de ligante/precursor de 0,001%, duas novas fases sensoras foram preparadas contendo 0,01 e 0,1 %, que correspondem aos materiais **G** e **H**, respectivamente.

A Figura 3.17 ilustra os resultados obtidos para estas matrizes. A composição mais apropriada continuou sendo o sol-gel **F**, apesar do sol-gel **G** também ter apresentado uma resposta satisfatória.

Após cada medida, tentou-se extrair o metal do sol-gel usando-se soluções de ácido clorídrico e EDTA. No entanto, em nenhum dos casos observou-se a regeneração da intensidade de emissão I_0 (sol-gel na ausência de cobre), comprovando a não regeneração da fase sensora.

Levando-se em consideração o processo de otimização da matriz sol-gel, é possível afirmar que a composição mais adequada foi desenvolvida a base de MIP, sendo constituída pelo precursor TMOS, com uma relação Metal:Ligante (1:2) e Ligante:TMOS (0,001%). Essa composição corresponde ao sol-gel F.

Até o presente momento, verificou-se que o sol-gel foi o único material que forneceu resposta à íons Cu(II) em meio aquoso. Esse material também apresentou uma importante vantagem: “ausência de lixiviação”. Apesar disto, não se pode afirmar que este material é adequado para construção de fases sensoras sensíveis a íons cobre, visto que mostrou-se insensível a concentrações inferiores a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Além do mais, essa fase sensora apresenta desvantagens do ponto de vista de sensores ópticos, uma vez que não é reversível, nem mesmo regenerável.

3.4.2.5. NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA LUMINESCENTES

3.4.2.5.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA

A síntese das nanopartículas de sílica foi feita empregando-se o método Stöber (*Stöber & Fink, 1968*). Para sintetizá-las, criou-se uma nova estratégia de imobilização, onde o reagente luminescente foi adicionado na síntese em diferentes estágios de reação. Esta estratégia foi adotada com a finalidade de imobilizar o reagente em distintas camadas da nanopartícula de sílica. Assim, uma série de nanopartículas de sílica dopadas com complexo de Ru(II) foi preparada pela adição do complexo em quatro diferentes tempos da reação: 0, 3, 6 e 8 h (*Yang et al., 2010*).

Oito diferentes nanopartículas de sílica foram desenvolvidas a partir de polímeros impressos e não impressos, como será visto mais adiante.

A composição para a síntese foi feita baseando-se no procedimento experimental otimizado por Chung *et al.* (2006).

- **Polímeros Não Impressos - NIP**

Para síntese dos NIPs foram preparadas quatro soluções, cada uma contendo a composição apresentada na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Composições das soluções empregadas na síntese das nanopartículas.

Componentes	Volume / mL	Concentração / mol L ⁻¹
TEOS	0,17	0,05
NH ₃	0,60	0,57
Água deionizada	0,15	0,60
Etanol	14,0	–

Para imobilizar o reagente na sílica, 3 mL de solução etanólica de complexo de Ru(II) ($1,42 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foi adicionada em cada solução em diferentes tempos de reação: 0, 3, 6 e 8 h.

As misturas foram aquecidas, simultaneamente, a 60°C durante 10 h sob agitação magnética a 400 rpm. Um sistema montado em série e equipado com um banho termostatizado foi utilizado no procedimento de síntese, como pode ser visualizado na Figura 3.18.

Após a síntese, as partículas foram isoladas por centrifugação (4000 rpm / 25 min) para possibilitar a retirada do solvente do meio reacional. Em seguida, foram lavadas três vezes com 15 mL de etanol para remover a quantidade de

complexo que não reagiu. Por fim, as nanopartículas foram secadas em estufa a 60°C por 1 h e armazenadas em frascos de vidro. Uma massa de 30 – 60 mg de nanopartícula foi obtida em cada síntese.

Após o processo de síntese, obtiveram-se quatro nanopartículas, denominadas por **NIP-0**, **NIP-3**, **NIP-6** e **NIP-8**, onde 0, 3, 6 e 8 correspondem ao tempo (h) de adição do reagente na reação.

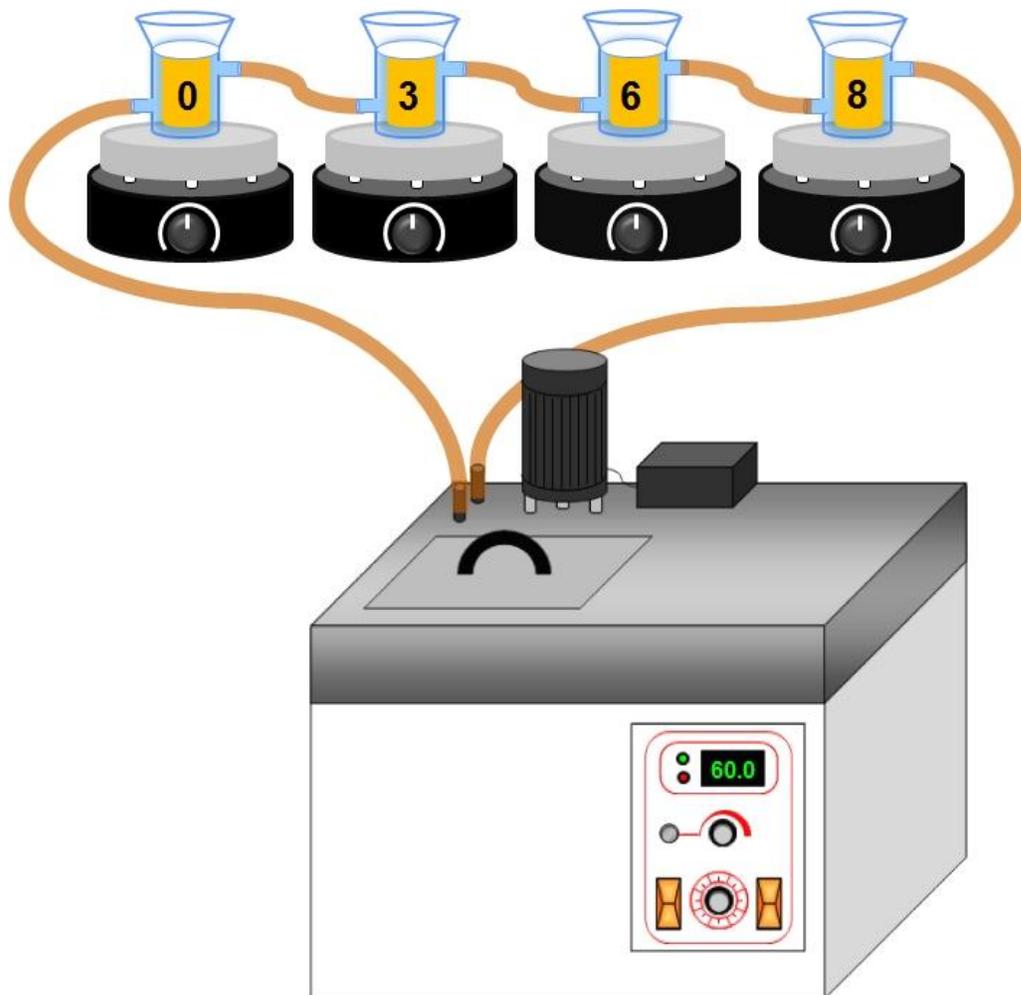


Figura 3.18. Esquema do sistema utilizado na síntese das nanopartículas de sílica pelo método Stöber (*autora: Juliana Santiago*).

- **Polímeros de Impressão Molecular – MIP**

Os MIPs foram preparados empregando-se o mesmo procedimento experimental das nanopartículas de NIP, exceto pela presença do *template*.

O procedimento de síntese das nanopartículas de MIP foi feito em duas etapas. Primeiro foram preparadas quatro soluções idênticas aos NIPs. Posteriormente, preparou-se uma solução contendo complexo de Ru(II) ($509 \mu\text{L}$; $8,31 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e Cu(II) ($650 \mu\text{L}$; $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) para formar o complexo metal-ligante na proporção M_1L_2 . Um pequeno excesso de cobre foi adicionado para garantir que todo ligante presente no meio fosse complexado pelos íons cobre.

Após o processo de síntese, obtiveram-se quatro novas nanopartículas de MIP, denominadas por **MIP-0**, **MIP-3**, **MIP-6** e **MIP-8**.

As nanopartículas obtidas para os polímeros impressos e não impressos estão ilustradas na Figura 3.19.

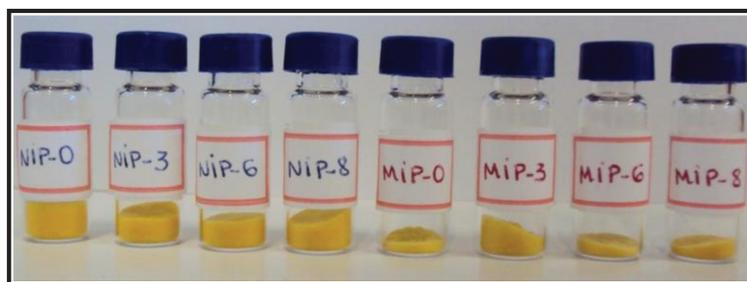


Figura 3.19. Fotografia das nanopartículas de sílica baseadas em NIP e MIP.

3.4.2.5.2. ESTRATÉGIA DE IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO DE Ru(II) NA SÍLICA

A Figura 3.20 mostra o esquema proposto para preparação das nanopartículas de sílica pelo método Stöber. Neste esquema é possível ter uma idéia de como ocorre a imobilização do complexo de Ru(II) nas partículas de sílica, adicionando-se o reagente luminescente em diferentes estágios de síntese.

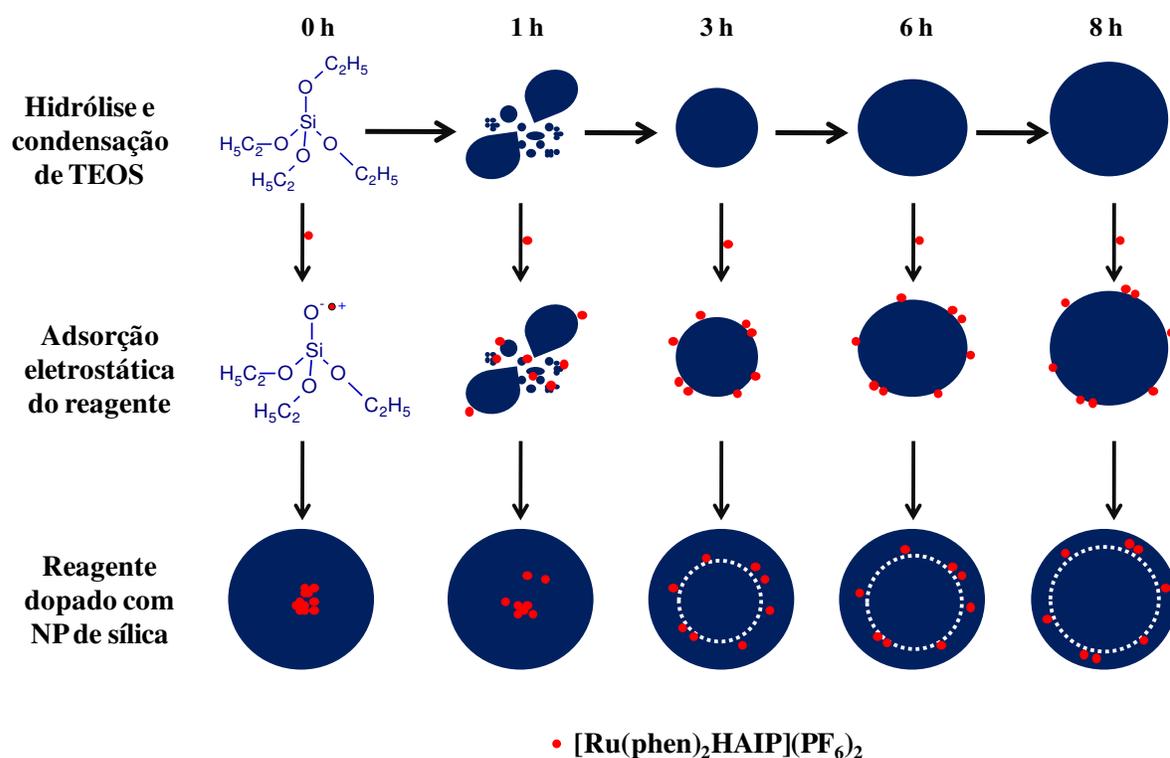


Figura 3.20. Representação da estratégia de imobilização do complexo de Ru(II) na sílica durante o processo de síntese (adaptado de *Yang et al., 2010*).

A síntese se processa basicamente em três etapas: (1) hidrólise e condensação do TEOS, (2) adsorção eletrostática do complexo de Ru(II) na sílica e (3) incorporação do complexo de Ru(II) no interior da sílica formada.

Nas etapas (1) e (2) ocorre a interação eletrostática da carga positiva do complexo de Ru(II) com a carga negativa do Si-O⁻ proveniente da hidrólise e condensação do TEOS. Na etapa (3) ocorre o crescimento da nanopartícula e a incorporação do reagente em diferentes camadas da sílica formada. A terceira etapa é fundamental para compreender a estratégia de imobilização do reagente. Maiores detalhes serão discutidos mais adiante.

3.4.2.5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA

A caracterização das nanopartículas de sílica foi realizada empregando-se a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com a finalidade de verificar o tamanho das partículas formadas. A Figura 3.21 ilustra a imagem de TEM para as nanopartículas analisadas.

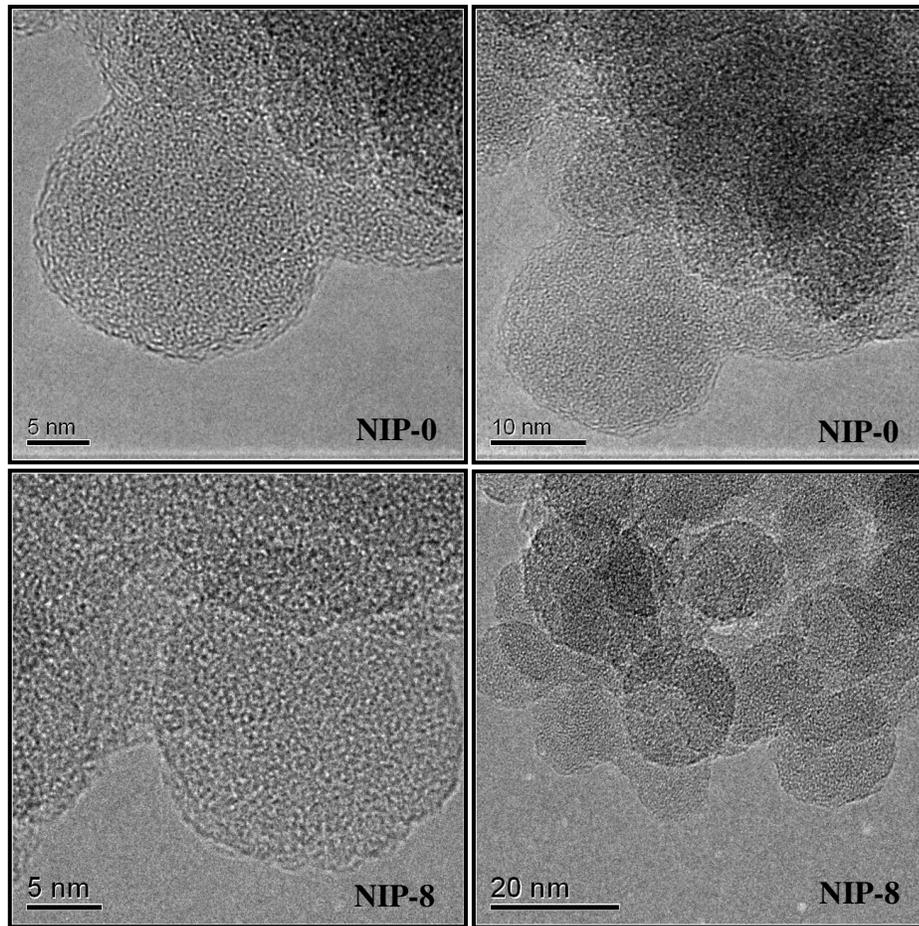


Figura 3.21. Imagens de TEM das nanopartículas de sílica para NIP-0 e NIP-8.

As imagens de TEM para NIP-0 e NIP-8 informam que as partículas apresentaram diâmetro em torno de 10-20 nm e morfologia esférica similar.

O tamanho das partículas preparadas a 0h e 8h de síntese praticamente não varia à medida que se avança o tempo de reação, devido ao crescimento uniforme da camada de sílica (*Yang et al., 2010*).

Além da análise de microscopia realizou-se também um mapeamento para verificar o posicionamento do complexo de rutênio na camada da sílica. Esta análise foi feita para comprovar a validade da estratégia de imobilização adotada. Os resultados obtidos indicaram que é possível identificar o rutênio na sílica. Entretanto, devido ao elevado grau de aglomeração e ao pequeno tamanho das partículas não foi possível obter uma imagem com resolução adequada capaz de mapear rutênio no centro e na superfície da sílica.

3.4.2.5.4. ESTUDO DE INTERFERENTES

O estudo de interferentes foi realizado para avaliar a seletividade do NIP-8 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 de tampão fosfato pH 8,0 fixando-se a concentração de Cu(II) e dos demais íons metálicos em $1,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente.

A Figura 3.22 mostra a intensidade de fluorescência da NP em função dos cátions analisados. Os resultados demonstraram que o nanosensor para Cu(II) foi altamente seletivo e não apresentou interferência para nenhum dos íons investigados nesta proporção, o que constitui uma importante vantagem visto que alguns nanosensores desenvolvidos sofrem interferência de Ni(II) (*Brasola et al., 2003; Ramazzo et al., 2005*) e Zn(II) (*Zheng et al., 2010*).

A seletividade obtida revela de fato que a determinação de íons Cu(II) pode ser realizada na presença do excesso de íons interferentes.

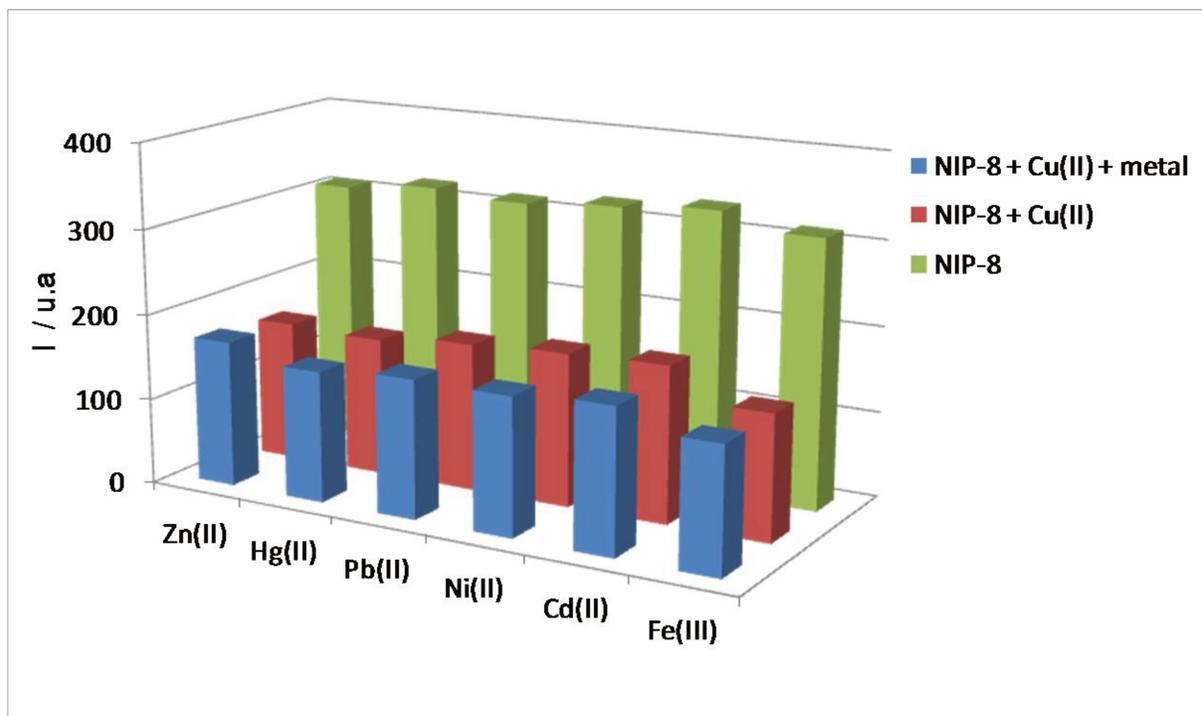


Figura 3.22. Interferência de outros íons metálicos com cobre ($[\text{Cu(II)}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{metais}] = 5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampão fosfato}] = 43,5 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 8,0).

3.4.2.5.5. AVALIAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE NIP E MIP

Para avaliar o comportamento das nanopartículas à base de NIP e MIP, espectros de fluorescência foram adquiridos em tampão fosfato pH 7,0 ($5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência de íons cobre. A Figura 3.23 mostra os espectros obtidos para as NPs preparadas pela adição do complexo em diferentes tempos de reação.

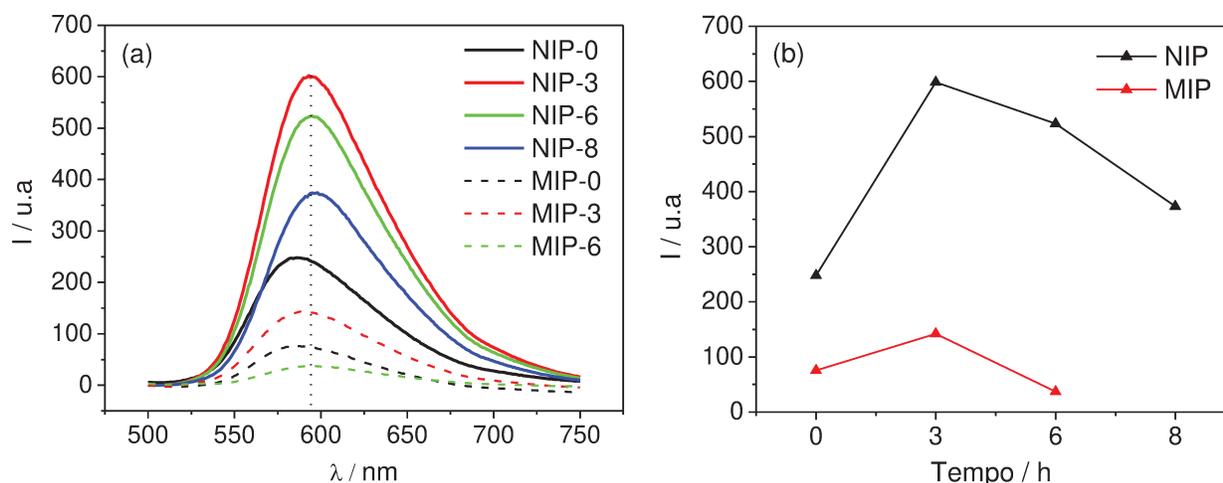


Figura 3.23. (a) Espectros de emissão das NPs em diferentes tempos de adição do complexo na reação (0, 3, 6 e 8h), (b) máximos de emissão obtidos para cada nanopartícula. (λ_{ex} , 450 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm; $[\text{NP}] = 0,33 \text{ mg mL}^{-1}$).

Observa-se que as nanopartículas apresentaram bandas de emissão com intensidade máxima em torno de 590 nm. Os comprimentos de onda de absorção e emissão encontrados estão indicados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Comprimentos de onda máximos obtidos para as nanopartículas.

Nanopartículas	$\lambda_{\text{em.}} / \text{nm}$
NIP-0	586
NIP-3	594
NIP-6	595
NIP-8	596
MIP-0	586
MIP-3	590
MIP-6	594

λ_{ex} , 450 nm para todas as NPs

Como pode ser visto na Tabela 3.6, o comprimento de onda muda rapidamente de NIP-0 para NIP-3 e se mantém praticamente constante após 3h de síntese. Um comportamento similar é verificado para os MIPs. Esse deslocamento das bandas de emissão indica que o tempo de adição do reagente na síntese afeta as propriedades de emissão das nanopartículas até 3h de reação. Essa hipótese também pode ser confirmada pela variação na intensidade de emissão do complexo imobilizado.

A variação na intensidade e nas bandas de emissão das nanopartículas pode ser explicada a partir das informações contidas nas Figuras 3.20 e 3.23. Analisando-se os polímeros não impressos, verifica-se que a máxima intensidade de emissão foi atingida quando o reagente foi adicionado em 3h de síntese, onde NIP-3 é cerca de 2,5 vezes maior que NIP-0.

A Figura 3.23.b mostra claramente o comportamento de cada nanopartícula em função das suas intensidades de fluorescência. Nota-se que o sinal analítico aumenta de NIP-0 para NIP-3 e decresce de NIP-3 para NIP-8, passando por NIP-6. Estes resultados condizem com o estudo proposto por Yang *et al.* (2010). Essa variação na intensidade de fluorescência é causada por dois efeitos principais: “agregação das moléculas de rutênio nas partículas de sílica” e a “espessura da camada de proteção da sílica”. Ou seja, quando o reagente é adicionado até 3 h de reação, as moléculas de rutênio interagem rapidamente com as partículas primárias e os oligômeros do meio reacional. Essa rápida interação aumenta a agregação das moléculas de Ru(II) nas partículas formadas e conseqüentemente, intensifica-se o sinal de fluorescência. Por este motivo, ocorre um aumento contínuo da intensidade de emissão até 3h de reação.

Quando o reagente é adicionado após 3h de síntese, os oligômeros e partículas primárias já foram praticamente consumidos e, neste caso, predominam as partículas secundárias que são mais uniformes. Neste estágio, as

moléculas de Ru(II) são absorvidas na superfície das partículas secundárias e a camada de proteção da sílica cresce na superfície das partículas pela deposição dos monômeros remanescentes. A intensidade de emissão diminui gradativamente porque a espessura da camada de sílica torna-se mais fina a medida que se aumenta o tempo de reação e, neste caso, as moléculas de rutênio estão mais próximas da superfície da partícula, sendo mais facilmente afetada pelo oxigênio do ar e pelo solvente do meio. Provavelmente, a intensidade de fluorescência decai porque o oxigênio atua como um efetivo supressor da fluorescência (*Juris et al., 1988; Yang et al., 2010*).

O mesmo comportamento é observado para os MIPs, a intensidade de emissão aumenta de MIP-0 para MIP-3 e diminui de MIP-3 para MIP-6. Verifica-se também que os sinais analíticos de todos os MIP são inferiores aos valores obtidos para os NIP. No caso do MIP-0 a emissão é cerca de 3,3 vezes menor que NIP-0 e esse efeito é ainda mais pronunciado no tempo de 6h (MIP-6) quando a intensidade de emissão se aproxima de zero. Essa queda de sinal ocorre porque o cobre atua como supressor da fluorescência da molécula de rutênio, indicando que polímeros de impressão molecular foram realmente produzidos.

3.4.2.5.6. ESTUDO DE pH

Este estudo foi elaborado com a finalidade de avaliar o perfil das nanopartículas em diferentes valores de pH (2-11). Para tal, foram consideradas as variações de intensidade de emissão e os comprimentos de onda máximos obtidos. Em solução, o complexo de rutênio apresenta excelente seletividade ao cobre em pH 7,0 (seção 3.4.1.2). Uma vez imobilizado na sílica, o ligante pode ter sofrido alterações nas suas propriedades de emissão, por isso um novo estudo de pH foi requerido. Para exemplificá-lo, duas nanopartículas foram escolhidas

para realização das medidas, NIP-0 e NIP-6. A Figura 3.24 mostra a resposta obtida para as NPs com e sem adição de íons cobre.

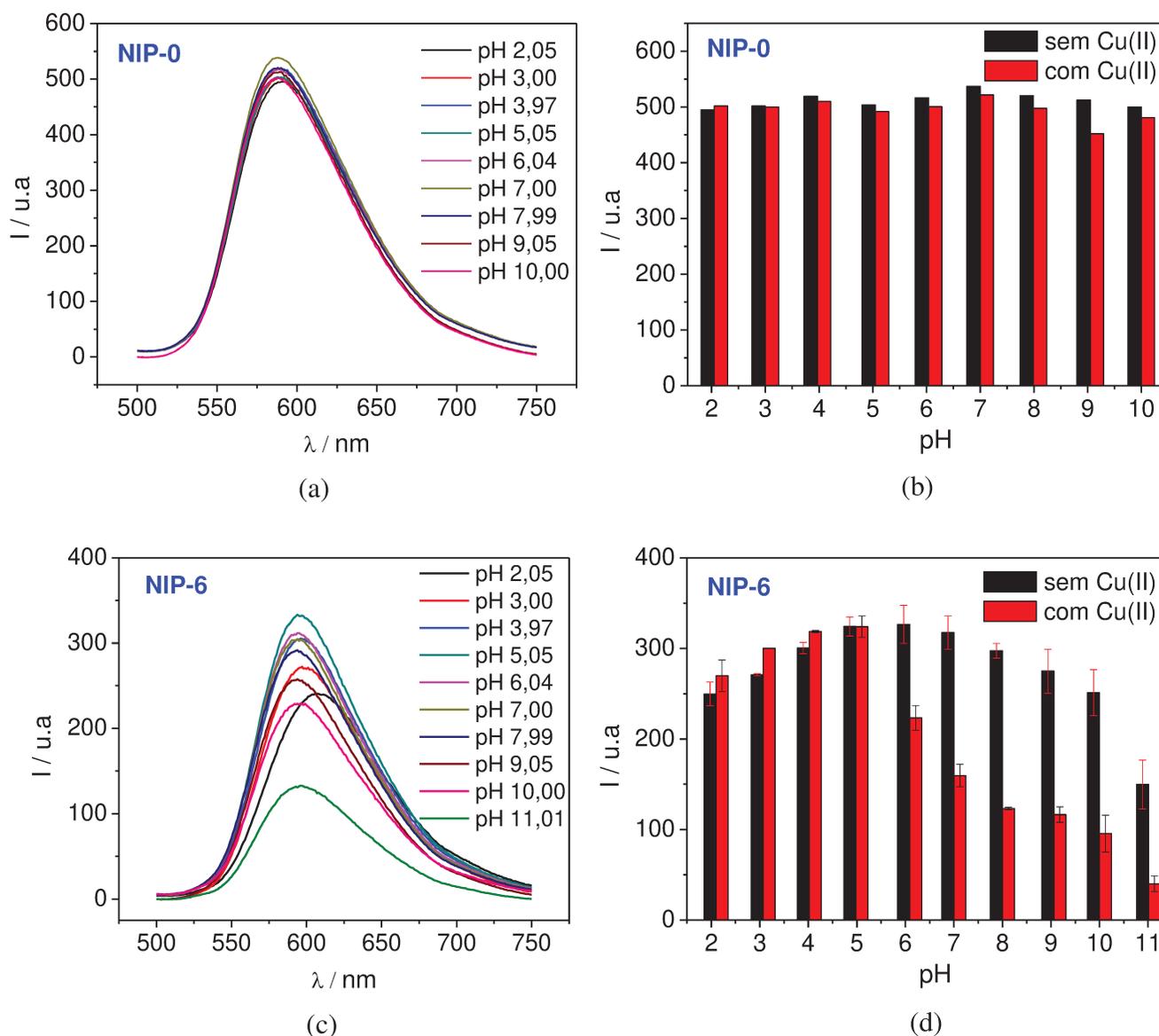


Figura 3.24. Espectros de emissão das nanopartículas em diferentes valores de pH: (a) NIP-0 na ausência de Cu(II) e (b) NIP-0 na presença de Cu(II), (c) NIP-6 na ausência de Cu(II) e (d) NIP-6 na presença de Cu(II). (λ_{ex} . 450 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm, $[NP] = 0,33 \text{ mg mL}^{-1}$, $[\text{tampão fosfato}] = 5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{Cu(II)}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Média de duas réplicas.

Na Figura 3.24 verifica-se que NIP-0 não foi capaz de detectar cobre na faixa de pH analisada. Essa falta de sensibilidade pode ser justificada pela não supressão de fluorescência, visto que o comprimento de onda máximo manteve-se praticamente constante (~ 590 nm) em todos os valores de pH. Além disso, nenhuma variação significativa nas intensidades de emissão da NP com e sem adição de Cu(II) foi observada, como mostra a Figura 3.24.b. Isto significa que o complexo não foi afetado pela acidez ou basicidade do meio, sugerindo que os sítios ativos da molécula de rutênio não estão disponíveis para complexação do Cu(II), uma vez que não foram protonados ou desprotonados.

Esta teoria condiz com o esquema proposto na Figura 3.20, onde o complexo de Ru(II) está totalmente incorporado no centro da partícula, de maneira que a espessa camada de proteção da sílica impede a interação metal-ligante. Por isso, nenhuma supressão de fluorescência foi observada.

Por outro lado, quando o reagente é adicionado no tempo de 6 h de reação (NIP-6), as moléculas tendem a se imobilizar na superfície da partícula, em vez de localizar-se no centro. Neste caso, a camada de proteção da sílica é menos espessa e não impede a interação metal-ligante, facilitando a complexação do íon metálico. Esse efeito também pode ser evidenciado pelo deslocamento das bandas de emissão de NIP-6, que variaram de 595 a 608 nm. Com a variação do pH a resposta ao cobre pode ser facilmente visualizada na Figura 3.24.d, onde NIP-6 consegue detectar Cu(II) a partir de pH 6,0 quando ocorre a primeira supressão de fluorescência.

Para finalizar esta discussão, conclui-se que a estratégia adotada faz com que o reagente não perca suas propriedades luminescentes quando imobilizado na sílica. Estes resultados confirmam a hipótese de que a sensibilidade das NPs depende do posicionamento das moléculas do ligante na partícula de sílica. Com

base nisso, pode-se afirmar que o desempenho das nanopartículas depende do pH e do tempo de adição do complexo nos diferentes estágios da síntese.

3.4.2.5.7. REGENERAÇÃO DO SINAL ANALÍTICO DO MIP

Na síntese dos MIPs, as nanopartículas foram preparadas com o cobre já complexado pela molécula do ligante. A formação do complexo metal-ligante provoca a supressão de fluorescência do reagente. Para regenerar a intensidade de fluorescência é preciso utilizar uma espécie que seja capaz de remover o íon Cu(II) do MIP. Geralmente, utilizam-se soluções de ácidos diluídos ou EDTA. Antes de iniciar as medidas de fluorescência foi necessário, primeiramente, extrair o íon metálico das partículas para regenerar o sinal analítico. Neste trabalho empregou-se HCl 0,5 mol L⁻¹ como solução regeneradora. Com base nisso, um breve estudo cinético foi desenvolvido com a finalidade de avaliar a recuperação do sinal analítico em função do tempo e analisar qual MIP apresentou uma resposta mais rápida e efetiva.

Primeiramente, misturou-se 0,50 mL de NP 2,5 mg mL⁻¹, 2 mL de solução de tampão fosfato 5,0 x 10⁻² mol L⁻¹ (pH 7,0) e registrou-se os espectros de emissão de cada nanopartícula. Em seguida, adicionou-se 1 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ em cada mistura e novos espectros de emissão foram obtidos em três tempos distintos: 1 min, 30 min e 48 h.

A Figura 3.25 mostra a intensidade do sinal analítico dos polímeros impressos em função do tempo e seus comprimentos de onda máximos. As linhas pontilhadas da Figura 3.25.a indicam as intensidades de emissão máximas obtidas para cada NIP. Estas intensidades foram usadas como valor de referência a fim de compará-las com o sinal máximo obtido para cada MIP após a extração dos íons cobre.

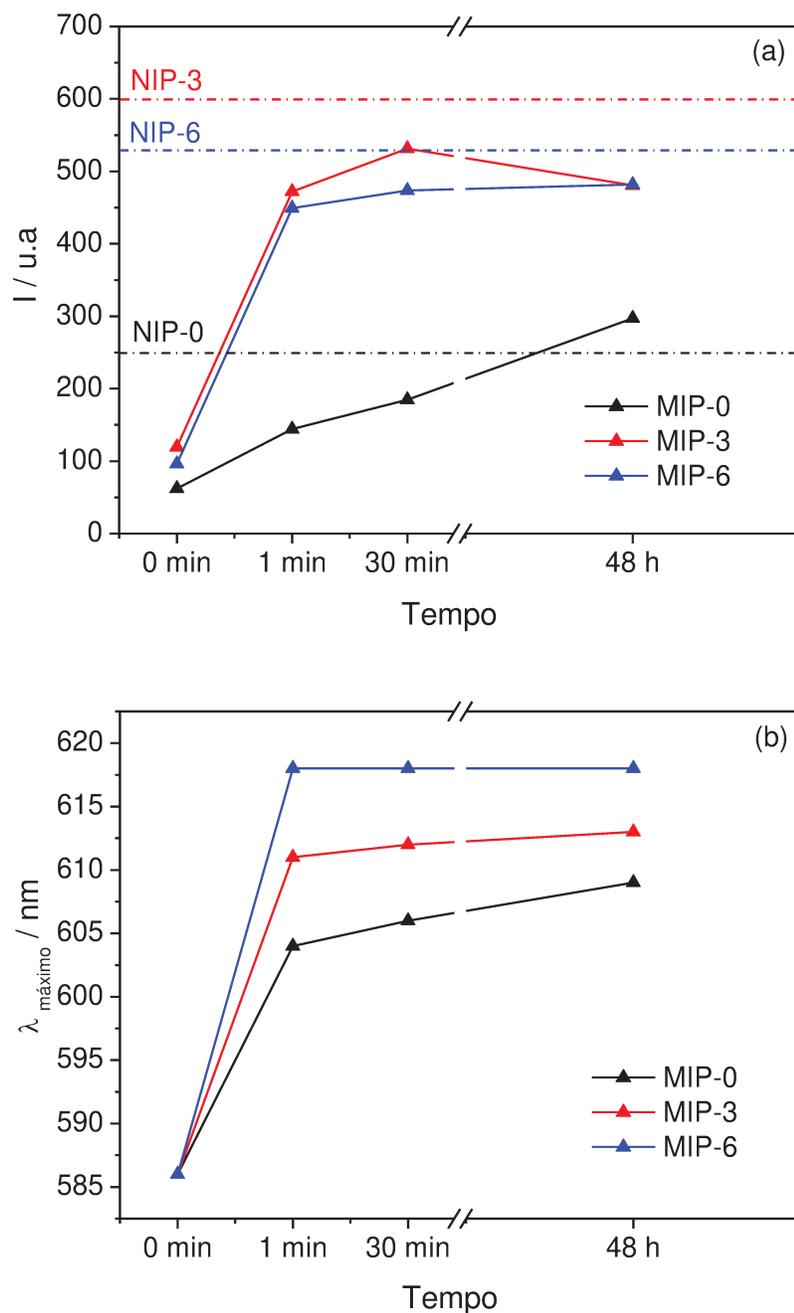


Figura 3.25. Resultados obtidos para (a) regeneração da intensidade de emissão dos MIPs, onde as linhas pontilhadas indicam as intensidades de emissão máxima obtidas para cada NIP usados como valores de referência; (b) $\lambda_{máx.}$ de emissão em função do tempo. ($\lambda_{ex.}$ 450 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm).

Observa-se que a regeneração do sinal analítico é bastante significativa no tempo de 1 min, enquanto que em 30 min e 48 h o sinal aumenta lentamente. Isto indica que a extração do íon metálico é bastante rápida e eficaz.

Comparando-se MIP e NIP, verificou-se que após extração dos íons cobre houve um ganho de sinal de aproximadamente 60, 80 e 90 % para MIP-0, MIP-3 e MIP-6, respectivamente, no tempo de 1 min. Isto quer dizer que a recuperação do sinal é diretamente proporcional ao tempo de adição do reagente na reação. Por esta razão, a retirada de Cu(II) é mais eficiente para MIP-6 que para MIP-0. Isto também pode ser confirmado através do deslocamento das bandas de emissão das nanopartículas, que ocorre devido à presença do ligante livre, como mostra a Figura 3.25.b. O comprimento de onda máximo varia de 586 nm para 618 nm. Para todos MIPs, nos primeiros segundos de reação ocorre um brusco deslocamento das bandas de emissão, que se mantém praticamente constante após um minuto de reação, sugerindo que praticamente todo cobre foi extraído.

A remoção do *template* é uma etapa fundamental na obtenção de um MIP devido à fragilidade mecânica dos sítios de reconhecimento molecular. Assim sendo, pode-se afirmar que nanopartículas de MIP foram preparadas com sucesso, uma vez que a remoção do íon foi feita sem grandes dificuldades.

3.4.2.5.8. RESPOSTA DO NIP E MIP PARA Cu(II)

O estudo de pH na seção 3.4.2.5.6 apresentou uma breve resposta para detecção de íons cobre a uma concentração constante de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, usando-se apenas NIP-0 e NIP-6 como exemplo.

Nesta etapa do trabalho um estudo mais detalhado será apresentado para cada nanopartícula, incluindo NIP e MIP, em diferentes concentrações de íons cobre. Os resultados foram avaliados considerando-se a razão das intensidades de emissão do complexo livre e do complexo na presença de cobre (II), como será visto mais adiante.

- **Polímeros Não Impressos – NIP**

Para execução dessas medidas, alíquotas de uma solução aquosa de Cu(II) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas em uma mistura de 0,30 mL de NP $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e 2 mL solução de tampão fosfato $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Para a construção da curva analítica, foram feitas medidas fluorescência antes e após a adição de íons cobre na mistura contendo as nanopartículas.

A Figura 3.26.a mostra a resposta das nanopartículas em função da concentração de Cu(II) no intervalo de $4,3 \times 10^{-6}$ a $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A correção da diluição foi feita para cada concentração.

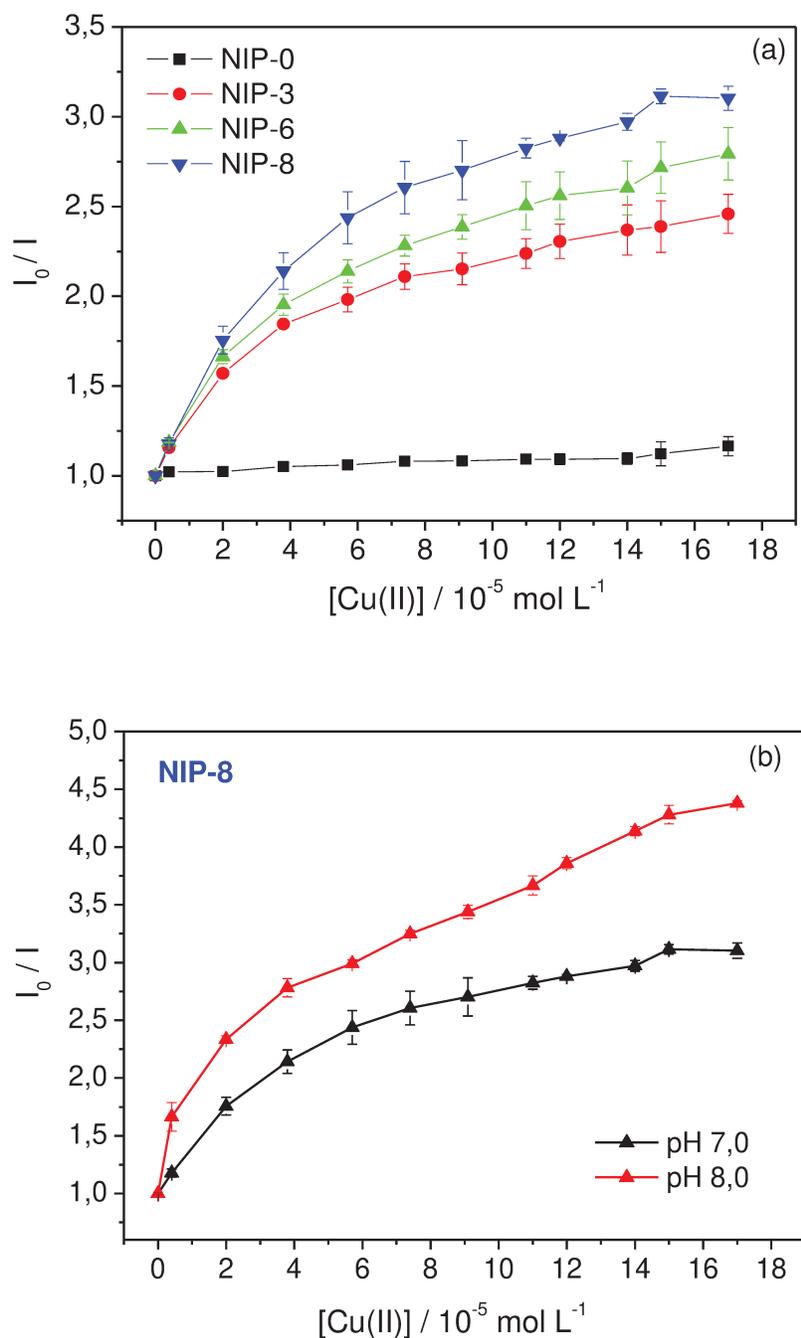


Figura 3.26. (a) Resposta do NIP em função da concentração de Cu(II). (b) Resposta do NIP-8 para Cu(II) em diferentes valores de pH. ($\lambda_{\text{ex.}}$ 450 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 595 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm, $[NP] = 0,33 \text{ mg mL}^{-1}$, $[\text{tampão fosfato}] = 43,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Média de três réplicas.

Na Figura 3.26 a razão da intensidade de emissão (I_0/I) mostra que a sensibilidade das nanopartículas para íons cobre é diretamente proporcional ao tempo de adição do complexo na reação, isto é, aumenta de NIP-3 para NIP-8. Nenhuma resposta foi observada para NIP-0 e a detecção de Cu(II) somente foi constatada quando se utilizou nanopartículas preparadas a partir de 3h de reação.

Esse gráfico demonstra claramente a teoria proposta pela estratégia de imobilização adotada, onde as moléculas do complexo de rutênio se aproximam cada vez mais da superfície da partícula a medida que se aumenta o tempo de reação.

Uma avaliação mais criteriosa pode ser feita, por exemplo, com base no I_0/I obtido para a concentração de $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu(II). Neste ponto encontraram-se os seguintes valores: 1,16; 2,45; 2,81 e 3,10 para NIP-0, NIP-3, NIP-6 e NIP-8, respectivamente. Esta proporcionalidade entre os valores encontrados explica a eficiência da estratégia proposta e demonstra que a posição da molécula na sílica é realmente responsável pelo aumento da resposta analítica.

Os estudos preliminares indicaram que NIP-8 foi a fase sensora que forneceu a melhor sensibilidade ao cobre. Uma nova medida com NIP-8 foi feita em tampão fosfato pH 8,0 para tentar melhorar a resposta analítica. A Figura 3.26.b mostra a curva obtida para esta nanopartícula em pH 7,0 e 8,0. Os resultados indicaram que a sensibilidade de NIP-8 em pH 8,0 é maior que em pH 7,0.

- **Polímeros de Impressão Molecular – MIP**

Antes de iniciar as medidas foi necessário extrair o íon cobre do MIP formado. O procedimento adotado foi similar ao utilizado para regeneração do

sinal analítico (seção 3.4.2.5.7). Basicamente, o experimento obedeceu a seguinte ordem:

- Extração do íon metálico com ácido clorídrico;
- Centrifugação para separação de Cu(II) e recuperação das partículas;
- Aquisição dos espectros de emissão (I_0) após a extração (sinal de referência);
- Adição de íons Cu(II) em diferentes concentrações;
- Aquisição dos espectros de emissão (I) na presença de cobre.

A resposta dos MIPs para diferentes concentrações de cobre são mostradas na Figura 3.27.

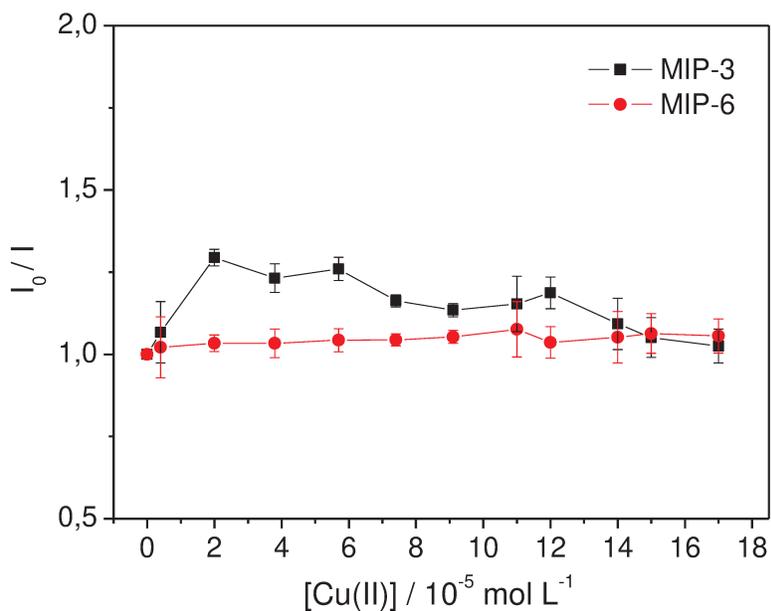


Figura 3.27. Resposta do MIP em função da concentração de Cu(II). (λ_{ex} . 450 nm, λ_{em} . 595 nm, fendas de emissão e excitação: 10 nm, [NP] = 0,33 mg mL⁻¹, [tampão fosfato] = 43,5 mmol L⁻¹). Média de duas réplicas.

Os resultados obtidos no gráfico acima mostram que os MIPs não apresentaram uma resposta satisfatória para Cu(II), exceto MIP-3 que mostrou uma pequena sensibilidade. MIP-0 não foi medido porque provavelmente não apresentaria resposta ao metal por causa da sua posição na sílica.

Apesar desses resultados não terem sido satisfatórios, não se pode afirmar que o polímero impresso não apresenta sensibilidade ao cobre, já que não foi possível medi-lo adequadamente. Após a etapa de centrifugação houve perda das nanopartículas, de maneira que não foi possível manter o sinal de referência inicial para compará-lo com o sinal na presença de Cu(II).

Em decorrência disto, optou-se pelo uso dos polímeros não impressos para dar continuidade as investigações. Apesar de não ter sido possível medir o MIP, outros estudos devem ser realizados para avaliar sua real sensibilidade e compará-lo com os polímeros não impressos.

Uma vez estabelecida a sensibilidade dos polímeros não impressos ao íon cobre, o próximo passo consistiu na avaliação do desempenho analítico do nanosensor desenvolvido.

3.4.2.5.9. DESEMPENHO ANALÍTICO DAS NPs

O desempenho analítico das nanopartículas foi avaliado fazendo-se todas as medidas em solução de tampão fosfato 43,5 mmol L⁻¹ em pH 8,0, mantendo a concentração constante de 0,33 mg mL⁻¹ de **NIP-8**. As condições analíticas também foram mantidas constantes: λ_{ex} . 450 nm, λ_{em} . 595 nm e fendas de emissão e excitação de 10 nm.

3.4.2.5.9.1. Limite de Detecção e Quantificação

Os Limites de Detecção e Quantificação encontrados para o nanosensor foram respectivamente $0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cobre, considerando-se 20 medidas do branco. Os cálculos foram realizados com base nas seguintes equações:

$$\text{L.D.} = 3 S_b / m \qquad \text{L.Q.} = 10 S_b / m$$

Onde, S_b é o desvio padrão do branco e m é a inclinação da curva analítica.

3.4.2.5.9.2. Tempo de Resposta ($t_{90\%}$)

Para obter o tempo de resposta, registraram-se os espectros de fluorescência antes e após adição do íon cobre na solução contendo a NP. O tempo de resposta estimado para uma concentração de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II) foi inferior a 30 segundos, demonstrando que o nanosensor apresenta uma rápida resposta ao analito.

3.4.2.5.9.3. Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade instrumentais, curvas analíticas foram construídas para NIP-8 em diferentes concentrações de Cu(II).

Para realizar as medidas de repetibilidade três curvas analíticas foram construídas no mesmo dia, usando-se a mesma solução de referência de NIP-8. Para as medidas de reprodutibilidade, as curvas foram feitas em três dias distintos, utilizando-se três novas soluções de referência de NIP-8 todas com a mesma concentração de NP. A Figura 3.28 apresenta as curvas analíticas obtidas

para NIP-8 em diferentes concentrações de íons cobre e a Tabela 3.7 mostra os desvios-padrão relativos obtidos para cada ponto da curva.

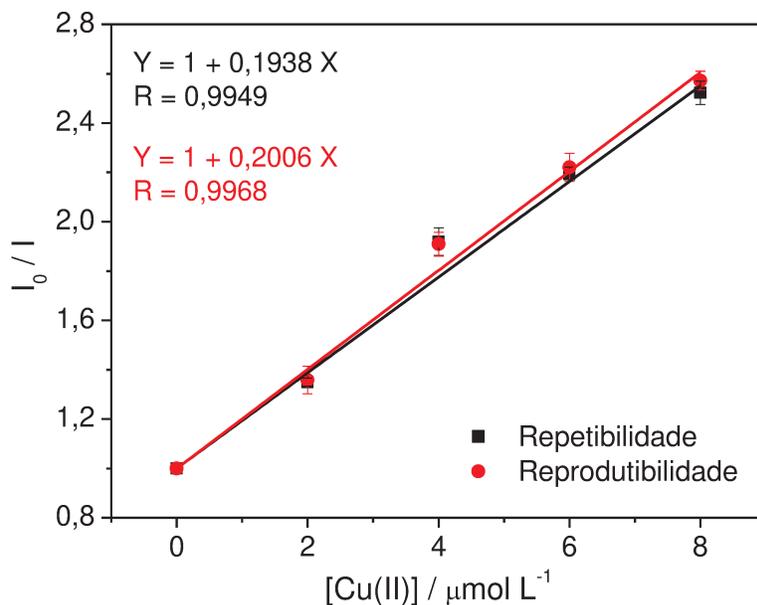


Figura 3.28. Medidas de repetibilidade e reprodutibilidade para NIP-8 em diferentes concentrações de cobre (média de três réplicas).

Tabela 3.7. Desvios-padrão relativos das medidas das NPs em função da concentração de Cu(II).

[Cu(II)] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	% Desvio padrão relativo	
	Repetibilidade	Reprodutibilidade
2	1,2	4,1
4	2,9	2,5
6	1,3	2,6
8	1,9	1,4

De acordo com equação de regressão linear, observa-se que uma boa correlação linear foi obtida ($R = 0,99$). A resposta de fluorescência do NIP-8 para Cu(II) apresentou faixa dinâmica linear entre 2,0–8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O desvio-padrão relativo das medidas variou de 1,2 a 4,1 %. Estes resultados mostram que o sensor desenvolvido apresenta boa repetibilidade e reprodutibilidade para análise de íons Cu(II) em meio aquoso.

3.4.2.9.4. Reutilização das nanopartículas

Uma vantagem das NPs é que podem ser recuperadas ao final de todo o processo de análise para posterior reutilização. Essa reutilização depende de dois fatores fundamentais: regeneração do sinal analítico e recuperação das NPs.

- **Regeneração do Sinal Analítico**

Para verificar a regeneração das NPs empregou-se o mesmo procedimento aplicado para os MIPs (seção 3.4.2.5.7). Após a realização das medidas de fluorescência, o sinal analítico do nanosensor foi regenerado com ácido clorídrico e sua reversibilidade foi constatada com base no deslocamento das bandas de emissão da nanopartícula que variou de 595 a 615 nm, como mostra a Figura 3.29. Observa-se que a intensidade de fluorescência é totalmente recuperada e que a variação do máximo de emissão confirma a regeneração da fase sensora.

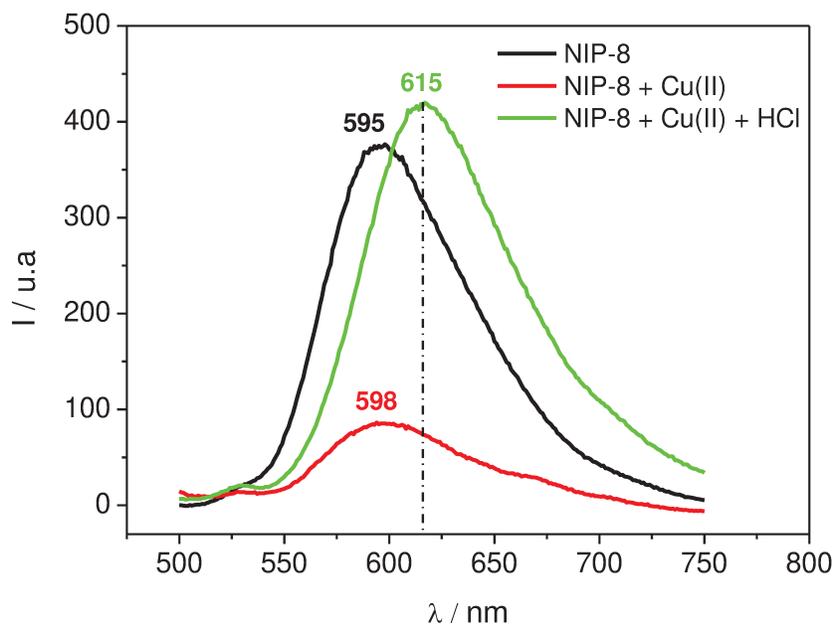


Figura 3.29. Regeneração do sinal analítico do NIP-8 usando-se HCl 0,5 mol L⁻¹ ([Cu(II)] = 8,0 μmol L⁻¹).

- **Recuperação das nanopartículas**

As NPs medidas na presença de Cu(II) foram coletadas e regeneradas com ácido clorídrico e centrifugadas. As partículas remanescentes foram secadas em estufa a 60 °C por 1 h e armazenadas em frascos de vidro para serem usadas novamente.

Para reutilização, preparou-se uma nova solução de referência com a NP reutilizada e a partir desta, uma curva analítica em função da concentração de Cu(II) foi construída. A Figura 3.30 mostra a resposta obtida para a nanopartícula não reutilizada e reutilizada. As medidas foram feitas sob as mesmas condições de medidas mencionadas na seção 3.4.2.5.9.

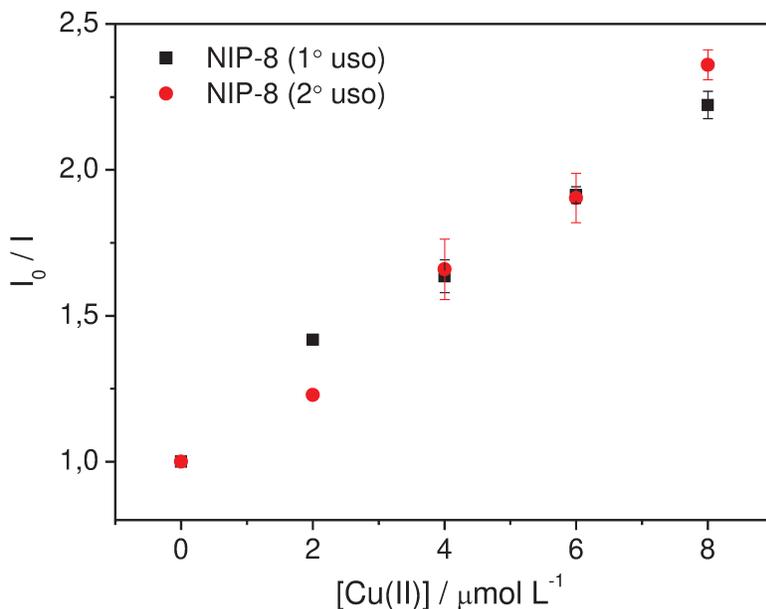


Figura 3.30. Curvas analíticas para NIP-8 em função da concentração de Cu(II) com e sem reutilização da NP. (média de três réplicas)

A concordância entre os dados da curva mostra que as nanopartículas podem ser reutilizadas com êxito no final do processo de análise, o que constitui uma importante vantagem para a construção de um sensor químico.

Vale salientar que os estudos apresentados são preliminares e por este motivo, maiores detalhes sobre a vida útil das NPs não podem ser discutidos. Um processo de otimização deve ser realizado para saber quantas medidas podem ser feitas usando-se as mesmas partículas sem que estas percam sua afinidade de ligação com o íon metálico.

3.4.2.5.9.5. Comparação com outros nanosensores

A Tabela 3.8 mostra as características analíticas de algumas nanopartículas empregadas para determinação de íons cobre. Comparando-se a performance analítica dos nanosensores encontrados na literatura, observa-se que o método proposto neste trabalho apresenta boa linearidade e sensibilidade, e baixo limite de detecção, indicando que NIP-8 apresentou resultados satisfatórios, sendo portanto, um nanosensor bastante competitivo comparados às nanopartículas encontradas na literatura.

Tabela 3.8. Comparação das características analíticas de alguns nanosensores aplicados para determinação de íons Cu(II).

Reagente	Método	Faixa linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	L.D. $\mu\text{mol L}^{-1}$	Interferentes	Aplicação	Ref.
Dansilamida	Sol-gel	–	0,03	Ni(II)	–	Ramazzo <i>et al.</i> , 2005
FSNT	Sol-gel	–	0,03	–	–	Jung <i>et al.</i> , 2008
NBF	Sol-gel	–	–	–	Água potável e sangue humano	Jung <i>et al.</i> , 2010
RB	Sol-gel	0,2–8,0	0,50	–	–	Kang <i>et al.</i> , 2010
RHB	Sol-gel	1,0–10	2,0	–	Células vivas	Li <i>et al.</i> , 2011
QIOEt	Microemulsão reversa	2,0–20	0,38	Zn(II)	–	Zheng <i>et al.</i> , 2010
RBITC/FITC	Microemulsão reversa	0,1–0,8	0,01	–	Água residual e água de lago	Lu <i>et al.</i> , 2011
Complexo de Ru(II)	Sol-gel	2,0–8,0	0,30	–	Água mineral e água de torneira	Este trabalho

FSNT: nanotubo de sílica funcionalizada

NBF: nitrobenzofurano

RB: rodamina B

RHB: rodamina B hidrazida

QIOEt: N-(quinolina-8-il)-2-(3-trietoxisilil-propilamina)-acetamida

RBITC/FITC: isotiocianato de rodamina B/isotiocianato de fluoresceína

3.4.2.5.10. APLICAÇÃO ANALÍTICA

Para demonstrar a viabilidade do sensor, o método desenvolvido foi aplicado para a análise de amostras de água mineral e água de torneira. Testes de recuperação foram feitos através do método da adição de padrão para sete amostras de água mineral e duas de água de torneira. As amostras foram enriquecidas com Cu(II) em dois níveis de concentração: 5,0 e 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados analíticos estão apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Determinação de íons cobre em amostras de água mineral e água de torneira.

Amostras	Cu(II) adicionado			
	5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$		7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	Encontrado	% Recuperado	Encontrado	% Recuperado
A	4,79	95,8	6,80	97,1
B	5,48	109,6	7,02	100,3
C	5,03	100,6	6,90	98,6
D	4,46	89,2	6,88	98,3
E	5,06	101,2	6,30	90,0
F	5,02	100,4	6,17	88,1
G	5,12	102,4	6,85	97,9
H	4,60	92,0	6,22	88,9
I	4,86	97,2	6,53	93,3

Água mineral

Água de torneira

Uma curva analítica foi construída para cada amostra e a concentração para o cálculo de recuperação foi obtida a partir de suas respectivas equações da reta. Recuperações de 88,1 a 109,6 % foram obtidas indicando que as nanopartículas podem ser empregadas para determinação de Cu(II) em águas. As nanopartículas foram aplicadas com sucesso para análise de água enriquecidas com Cu(II), demonstrando que o sensor desenvolvido apresenta potencial para análise de amostras reais.

- **Avaliação de efeito de matriz**

Para avaliar o efeito de matriz para diferentes amostras de água, foram preparadas curvas analíticas para quatro amostras diferentes: água deionizada, água mineral, água de torneira e solução de tampão fosfato.

As curvas foram construídas com os resultados obtidos em triplicata e a faixa de concentração investigada foi de 2–8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu(II). A Figura 3.31 mostra as curvas analíticas obtidas para as amostras de água e a Tabela 3.10 apresenta suas respectivas equações de regressão linear.

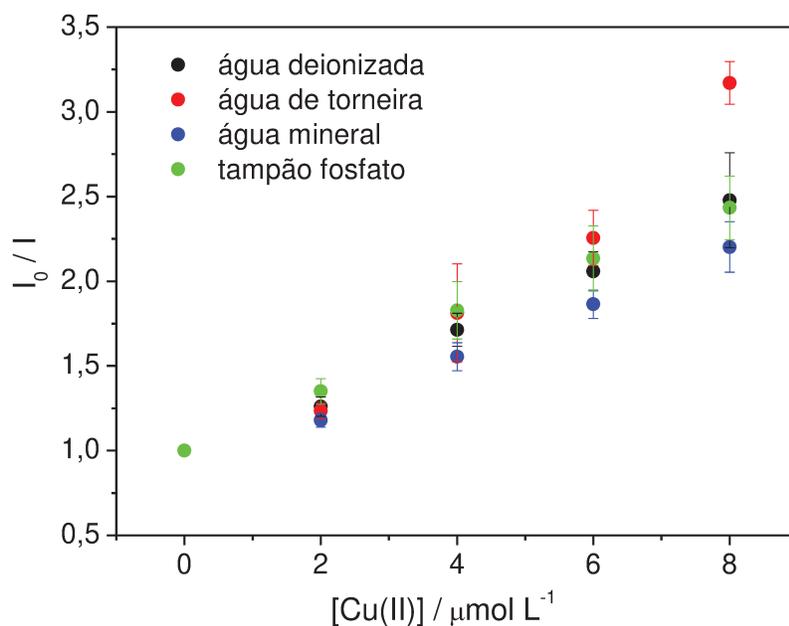


Figura 3.31. Curvas analíticas obtidas para diferentes amostras de água.

Tabela 3.10. Resultados de regressão linear obtidos para amostras de água.

Amostras	Equação da reta	Coef. de correlação linear
Água deionizada	$Y = 0,9510 + 0,1877 X$	0,9952
Água de torneira	$Y = 0,6936 + 0,3961 X$	0,9289
Água mineral	$Y = 0,9554 + 0,1683 X$	0,9910
Tampão fosfato	$Y = 1,0190 + 0,1825 X$	0,9898

Para analisar o efeito de matriz entre as amostras, foram aplicados cálculos da ANOVA para verificar se há diferença significativa entre os valores da inclinação da reta obtidos para cada amostra.

Os resultados obtidos aplicando-se o teste F no nível de 95% de confiança indicaram que não há diferenças significativas entre as inclinações das curvas analíticas, já que o $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ ($1,14 < 4,07$). Em decorrência disto, pode-se dizer que não há efeito de matriz para as diferentes amostras de água.

Essa informação é bastante relevante, indicando que se for aplicado um tratamento matemático adequado é possível obter uma equação modelo que possa ser utilizada para calcular a concentração de vários tipos de amostras de água, sem a necessidade de construir uma curva analítica para cada uma separadamente. Neste caso, teríamos um processo otimizado para realização da adição de padrão.

3.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram investigados cinco tipos de fases sensoras utilizando-se o reagente luminescente $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{HAIP}](\text{PF}_6)_2$ para determinação de cobre. As membranas de metacrilato, PVC e iônicas não forneceram resultados satisfatórios como fase sensora. Por outro lado, a técnica de imobilização via sol-gel apresentou resposta analítica a íons cobre e, além disso, não sofreu lixiviação da matriz. Todavia, indicou baixa sensibilidade e por isso não é adequada para aplicação de sensores ópticos.

Dentre as várias técnicas de imobilização avaliadas apenas as nanopartículas de sílica fluorescentes foram capazes de responder a íons cobre de maneira eficiente, com seletividade e sensibilidade adequadas. A síntese das nanopartículas ocorreu de maneira satisfatória, onde polímeros impressos e não impressos molecularmente foram preparados com êxito.

Nanopartículas de sílica fluorescentes foram sintetizadas, caracterizadas e aplicadas com sucesso na análise de íons $\text{Cu}(\text{II})$ em amostras de água mineral e água de torneira, demonstrando potencialidade para análise ambiental, uma vez que oferecem a vantagem de reutilização.

A estratégia de imobilização adotada, com base na adição do reagente luminescente em diferentes tempos de reação, foi o fator fundamental para o desempenho analítico das nanopartículas, indicando que a sensibilidade para $\text{Cu}(\text{II})$ pode ser ajustada controlando-se as condições de síntese.

As nanopartículas de sílica fluorescentes frente ao sol-gel apresentam a vantagem de eliminar os problemas provenientes do empacotamento da cubeta (como bolhas de ar e diferentes granulometria) que podem provocar variações nas intensidades de fluorescência do reagente imobilizado e fornecer resultados não reproduzíveis. Dessa forma, as nanopartículas atuam como um sistema de

medida mais simples e eficiente que o sol-gel, sendo este um dos pontos relevantes desta tese.

As perspectivas deste trabalho sugerem que as nanopartículas de sílica fluorescentes podem ser utilizadas para determinação de outras espécies metálicas de interesse ambiental. Além disso, outra perspectiva que se vislumbra consiste em desenvolver um sistema microfluídico para avaliação e controle das variáveis envolvidas nas medidas das nanopartículas.

CAPÍTULO 4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVINCULA, R.C. *Korean J. Chem. Eng.* **2011**, *28*, 1313-1321.

ARAKI, K.; Maruyama, T.; Kamiya, N.; Goto, M. *J. Chromatogr. B* **2005**, *818*, 141-145.

ARDUINI, M.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Langmuir* **2007**, *23*, 8632-8636.

BERMAN, L.M.; Wolf, P.J. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 438-443.

BLAADEREN, A.V.; Vrij, A. *Langmuir* **1992**, *8*, 2921-2931.

BONACCHI, S.; Genovese, D.; Juris, R.; Montalti, M.; Prodi, L.; Rampazzo, E.; Sgarzi, M.; Zaccheroni, N. *Top. Curr. Chem.* **2011**, *300*, 93-138.

BOUSQUET, B.; Travaillé, G.; Ismaël, A.; Canioni, L.; Pierrès K.M.-L.; Brasseur, E.; Roy, S.; Hecho, I.L.; Tellier, S.; Potin-Gautier, M.; Boriachon, T.; Wazen, P.; Diard, A.; Belbèze, S. *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, *63*, 1085-1090.

BRASOLA, E.; Mancin, F.; Ramazzo, E.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Chem. Commun.* **2003**, *24*, 3026-3027.

BRINKER, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-gel science: The physics and Chemistry of sol-gel processing* **1990**, Academic Press, Boston.

BUHANI; Narsito; Narsito; Nuryono; Kunarti, E.S. *Desalination* **2010**, *251*, 83-89.

BUKE, B.; Divrikli, U.; Soylak, M.; Elci, L. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *163*, 1298-1302.

CAPITÁN-VALLVEY, L.F.; Raya, C.C.; López, E.L.; Ramos, M.D.F. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *524*, 365-372.

CARO, E.; Marcé, R.M.; Borrull, F.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C. *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 143-154.

CHATTERJEE, A.; Priyama, A.; Ghosh, D.; Mondal, S.; Bhattacharya, S.C. Saha, A. *J. Lumin.* **2012**, *132*, 545-549.

CHAVAN, S.S.; Gaikwad, G.A.; Sawant, V.A.; Lahiri, G.K. *Polyhedron* **2011**, *30*, 1871-1875.

CHEN, Z.; Li, H.; Liu, M.; Li, R. *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, *63*, 64-68.

CHEN, Z.-Z.; Cai, L.; Dong, X.-M.; Tang, H.-W.; Pang, D.-W. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *37*, 75-81.

CHENG, K.L.; Ueno, K.; Imamura, T. *Handbook of Organic Analytical Reagents* **1982**, CRC Press, Boca Raton.

CHINNI, R.; Cremers, D. A.; Multari, R. *Appl. Optics* **2010**, *49*, C143-152.

CHOU, K.-S.; Chen, C.-C. *Ceram. Int.* **2008**, *34*, 1623-1627.

CHUNG, T.W.; Wang, H.C.; Wu, C.Y.; Chung, C.C.; Lai, M.H. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 8043-8048.

CONAMA http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf.
(acessado em 02/2012).

CONCHEIRO, A.; Lorenzo, R.A.; Carro, A.M.; Alvarez-Lorenzo, C. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 4327-4347.

CORTEZ, J. *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2007**.

COSTA, C. A. R. *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, **2004**.

CREMERS, D.A.; Radziemski, L.J., *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, **2006**, Wiley & Sons, New York.

DE GIACOMO, A.; Dell'Aglio, M.; De Pascale, O.; Gaudioso, R.; Santagata, A.; Teghil, R. *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, *63*, 585-590.

DÍAZ-GARCÍA, M.E.; Al-Kindy, S.; Badía, R. *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 1763-1774.

DÍAZ-GARCÍA, M.E.; Dios, A.S. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *666*, 1-22.

DÍAZ-GARCÍA, M.E.; Guardia, L.; Badía, R. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1822-1829.

DOUSSINEAU, T.; Trupp, S.; Mohr, G.J. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *339*, 266-270.

DYAR, M.D.; Carmosino, M.L.; Tucker, J.M.; Brown, E.A.; Clegg, S.M.; Wiens, R.C.; Barefield, J.E.; Delaney, J.S.; Ashley, G.M.; Driese, S.G. *Chem. Geo.* **2012**, 294-295, 135-151.

ERDEM, A.; Çilingiroglu, A.; Giakoumaki, A.; Castanys, M.; Kartsonaki, E.; Fotakis, C.; Anglos, D. *J. Archaeol. Sci.* **2008**, 35, 2486-2494.

FAN, J.; Zhu, H.; Lu, J.; Hu, M.; Cao, J.; Wang, J.; Li, H.; Liu, X.; Peng, X. *Talanta* **2012**, 93, 55-61.

FICHET, P.; Mauchien, P.; Wagner, J.; Moulin, C. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 429, 269-278.

FORTES, F.J.; Cabalín, L.M.; Laserna, J.J. *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, 63, 1191-1197.

GLOMM, W.R.; Volden, S.; Sjöblom, J.; Lindgren, M. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 5512-5520.

GODLEWSKA-ZYŁKIEWICZ, B.; Zambrzycka, E.; Lesniewska, B.; Wilczewska, A.Z. *Talanta* **2012**, 89, 352-359.

GOESMANN, H.; Feldmann, C. *Angew Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1362-1395.

GOODE, S.R.; Schmidt, N.E. *Appl. Spectrosc.* **2002**, 56, 370-374.

GRASSI, V. *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2008**.

GUN'KO, Y.K.; Davies, G.L.; Barry, A. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, 468, 239-244.

GUO, M.; Fang, J.; Xu, H.; Li, W.; Lu, X.; Lan, C.; Li, K. *J. Membr. Sci.* **2010**, *362*, 97-104.

HU, B.; Huang, C. *Spectrochim. Acta Part B* **2008**, *63*, 437-444.

HU, Z.; Cao, Q.-E.; Wang, K.; Xu, Q. *Talanta* **1998**, *47*, 921-927.

HUANG, H.-C.; Barua, S.; Sharma, G.; Deys, S.K.; Rege, K. *J. Controlled Release* **2011**, *155*, 344-357.

HULANICKI, A.; Glab, S.; Ingman, F. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247-1250.

HUN, X.; Zhang, Z. *Microchim. Acta* **2007**, *159*, 255-261.

ILLER, R.K. *The chemistry of silica* **1979**, Willey, New York.

IYER, C.S.P. Ressalan, S. *Rev. Anal. Chem.* **2004**, *23*, 159-190.

JAIN, A.K.; Gupta, V.K.; Singh, L.P.; Raisonni, J.R. *Talanta* **2005**, *66*, 1355-1361.

JAL, P.K.; Patel, S.; Mishra, B.K. *Talanta* **2004**, *62*, 1005-1028.

JANG, J.H.; Lim, H.B. *Microchem. J.* **2010**, *94*, 148-158.

JANKIEWICZ, B.J.; Jamiola, D.; Choma, J.; Jaroniec, M. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *170*, 28-47.

JIN, Y.; Li, A.; Hazelton, S.G.; Liang, S.; John, C.L.; Selid, P.D.; Pierce, D.T.; Zhao, J.X. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2998-3014.

JUNG, C.Y.; Kim, J.S.; Kim, H.Y.; Ha, J.M.; Kim, Y.H.; Koo, S.M. *J. Colloid. Interface Sci.* **2012**, *367*, 67-73.

JUNG, J.H.; Lee, S.J.; Bae, D.R.; Han, W.S.; Lee, S.S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, *10*, 1559-1564.

JUNG, J.H.; Minsung, P.; Seo, S.; Lee, S.J. *Analyst* **2010**, *135*, 2802-2805.

JURIS, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; Zelewsky, V. *Coord. Chem. Rev.* **1988**, *84*, 85-277.

KANG, D.; Seo, S.; Lee, H.Y.; Park, M.; Lim, J.M.; Yoon, J.; Jung, J.H. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *6*, 843-847.

KARATAPANIS, A.E.; Fiamegos, Y.; Stalikas, C.D. *Talanta* **2011**, *84*, 834-839.

KIM, W.S.; Kim, K.S.; Kim, J.K. *Ceram. Int.* **2002**, *28*, 187-194.

KRYSCIO, D.R.; Peppas, N.A. *Acta Biomaterialia* **2012**, *8*, 461-473.

KUMAR, S.; Kaur, N. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9233-9264.

LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* **1999**, New York, NY.

LASÁKOVÁ, M.; Jandera, P. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 799-812.

LASERNA, J.J.; Cuñat, J.; Fortes, F.J. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *633*, 38-42.

LASERNA, J.J.; Fortes, F.J. *Spectrochim. Acta Part B* **2010**, *65*, 975-990.

LI, F.; Liu, J.; Li, C. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7175-7181.

LI, X.-L.; Ai, Y.-B.; Yang, B.; Chen, J.; Tan, M.; Xin, X.-L.; Shi, Y.-H. *Polyhedron* **2012**, *35*, 47-54.

LIANG, S.; Jonh, C.L.; Xu, S.; Chen, J.; Jin, Y.; Yuan, Q.; Tan, W.; Zhao, J.X. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II: Molecular Constructions, Polymers and Nanoparticles* **2010**, Springer, Berlin.

LIMA, K.M.G. *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2009**.

LU, L.; Zong, C.; Ai, K.; Zhang, G.; Li, H. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3126-3132.

LU, Y.; Li, Y.; Wu, J.; Zhong, S.; Zheng, R. *Appl. Opt.* **2010**, *49*, C75-79.

LUCENA, R.; Simonet, B.M.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 620-637.

MAHAJAN, R.K.; Sood, P. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2007**, *2*, 832-847.

MARTÍN-ESTEBAN, A.; Turiel, E. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *668*, 87-99.

MASALOV, V.M.; Sukhinina, N.S.; Kudrenko, E.A.; Emelchenko, G.A. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 1-9.

MASHHADIZADEH, M.H.; Mostafavi, A.; Razavi, R.; Shamsipur, M. *Sens. Actuators B* **2002**, 86, 222-228.

MILLETO, I.; Gilardino, A.; Zamburlin, P.; Dalmazzo, S.; Lovisolo, D.; Caputo, G.; Viscardi, G.; Martra, G. *Dyes Pigm.* **2010**, 84, 121-127.

MOLDOVAN, Z.; Neagu, E.; Serb, J. *Chem. Soc.* **2002**, 67, 510-669.

MOORE, J.W.; Ramamoorthy, S. *Heavy Metals in Natural Waters* **1984**, Springer-Verlag New York Inc.

MORENO, J. M. B; *Tese de doutorado*, Universidad Complutense de Madrid, Espanha, **1994**.

MORENO-BONDI, M.C.; Navarro-Villoslada, F.; Benito-Peña, E.; Urraca, J.L. *Current Anal. Chem.* **2008**, 4, 316-340.

MORENO-BONDI, M.C.; Orellana, G.; Xavier, M.P.; Fresnadillo, D.G.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 5184-5189.

MURRAY, G. M.; Jenkins, A.; Bzhelyansky, A.; Uy, O. M. *Johns Hopkins Apl. Technical Digest* **1997**, 18, 464-472.

NARIN, I.; Soylak, M.; Elçi, L.; Dogan, M. *Talanta* **2000**, 52, 1041-1046.

NARIN, I.; Tuzen, M.; Soylak, M. *Talanta* **2004**, 63, 411-418.

NIST Atomic Spectra Database Lines Form.http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html (acessado em 02/2012).

ORELLANA, G.; Fresnadillo, D.G.; Marazuela, M.D.; Moreno-Bondi, M.C.; *Langmuir* **1999**, *15*, 6451-6459.

PASQUINI, C; Cortez, J.; Silva, L.M.C. e Gonzaga, F.B. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 463-512.

PEARMAN, W.; Scaffidi, J.; Angel, M.; *Appl. Optics* **2003**, *30*, 6085-6093.

PECHISHCHEVA, N.V.; Shunyaev, Y. *J. Anal. Chem.* **2008**, *63*, 412-423.

PINHEIRO, S.C.L. *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2010**.

POMA, A.; Turner, A.P.F.; Piletsky, S.A. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 629-637.

POMAZAL, K.; Prohaska, C.; Steffan, I.; Reich, G.; Huber, J.F.K. *Analyst* **1999**, *124*, 657-663.

PRODI, L. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 20-31.

PRODI, L.; Bonacchi, S.; Genovese, D.; Juris, R.; Montalti, M.; Rampazzo, E.; Zaccheroni, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4056-4066.

RAHMAN, I.A.; Vejayakumaran, P.; Sipaut, C.S.; Ismail, J.; Bakar, M.A.; Adnan, R.; Chee, C.K. *Colloids Surf. A* **2007**, *294*, 102-110.

RAHMAN, I.A.; Vejayakumaran, P.; Sipaut, C.S.; Ismail, J.; Chee, C.K. *Ceram. Int.* **2008**, *34*, 2059-2066.

RAMAZZO, E.; Brasola, E.; Marcuz, S.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2687-2696.

RAO, T. P.; Prasad, K.; Kala, R.; Gladis, J.M. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2007**, *37*, 191-210.

RAO, T.P.; Kala, R.; Daniel, S. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *578*, 105-116.

RAYA, C.C.; Ramos, M.D.F.; Vallvey, L.F.C. López, E.L. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *524*, 365-372.

ROSTAMIZADEH, K.; Vahedpour, M.; Bozorgi, S. *Int. J. Pharm.* **2012**, *424*, 67-75.

SALONI, J.; Lipkowski, P.; Dasary, S.S.R.; Anjaneyulu, Y.; Yu, H.; Hill Jr., G. *Polymer* **2011**, *52*, 1206-1216.

SANTILLI, C. V.; Hiratkuka, R. S.; Pulcinelli, S. H. *Quím. Nova* **1995**, *18*, 171-180.

SARACOGLU, S.; Soylak, M.; Elci, L. *Acta Chim. Slov.* **2003**, *50*, 807-814.

SARKAR, A.; Aggarwal, S.K.; Sasibhusan, K.; Alamelu, D.; *Microchim. Acta* **2010**, *168*, 65-69.

SAY, R.; Birlik, E.; Ersoz, A.; Yilmaz, F.; Gedibey, T.; Denizli, A. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *480*, 251-258.

SHAKERIAN, F.; Dadfarnia, S.; Mohammad, A.; Shabani, H. *Food Chem.* **2012**, *134*, 488-493.

SHAMSIPUR, M.; Besharati-Seidani, A.; Fasihi, J.; Sharghi, H. *Talanta* **2010**, *83*, 674-681.

SHEA, K.J.; Hoshino, Y.; Kodama, T.; Okahata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15242-15243.

SILVA, B.F.; Pérez, S.; Gardinalli, P.; Singhal, R.K. Mozeto, A.A.; Barceló, D. *Trend. Anal. Chem.* **2011**, *30*, 528-540.

SINGH, D.K.; Mishra, S. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256*, 7632-7637.

SINGH, D.K.; Mishra, S. *Chromatographia* **2009**, *70*, 1539-1545.

SINGH, J.P.; Thankur, S.N. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, **2007**, Elsevier, Oxford UK.

SKOOG, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. *Principles of Instrumental Analysis* **2006**, Thomson.

STEINBER, I.M.; Lobnik, A.; Wolfbeis, O.S. *Sens. Actuators B* **2003**, *90*, 230-235.

STÖBER, W.; Fink, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62-69.

STUMM, W.; Morgan, J.J. *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters* **1996**, Wiley Interscience, New York, NY.

SÝKORA, J. *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *159*, 95-108.

TEOLATO, P.; Rampazzo, E.; Arduini, M.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2238-2245.

TFOUNI, E.; Doro, F.G.; Gomes, A.J.; Silva, R.S.; Metzker, G.; Benini, P.G.Z.; Franco, D.W. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 355-371.

USEPA (1994) Methods for determination of metals in environmental samples. Supplement I. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development (EPA-600/R-94-111).

VALEUR, B.; *Molecular Fluorescence – Principles and Applications* **2002**, Wiley VCH, Weinheim.

VASAPOLLO, G.; Sole, R.D.; Mergola, L.; Lazzoi, M.R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, Giuseppe. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5908-5945.

WAL, R.L.V.; Ticich, T.M.; West, J.R.; Householder, P.A., *Appl. Spectrosc.* **1999**, *53*, 1226-1236.

WANG, L.; Wang, K.; Santra, S.; Zhao, X.; Hilliard, L.R.; Smith, J.E.; Wu, Y.; Tan, W. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 647-654.

WANG, W. *Advances in chemical sensors* **2011**, In tech, Croácia.

WANG, Z.S.; Wang, X.D.; Shen, Z.X.; Sang, T.; Cheng, X.B.; Li, M.F.; Chen, L.Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *341*, 23-29.

WIESNER, U.; Burns, A.; Ow, H. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1028-1042.

WOLFBEIS, O.S. *Fibre Optic Chemical Sensors and Biosensors* **1991**, CRC Press: Boca Raton.

WOLFBEIS, O.S.; Oehme, I. *Mikrochim. Acta* **1997**, *126*, 177-192.

YANG, L.; Chen, Z. *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 687-697.

YANG, W.; Zhang, D.; Wu, Z.; Xu, J.; Liang, J.; Li, J. *Langmuir* **2010**, *26*, 6657-6662.

YOSHIMATSU, K.; Reimhult, K.; Krozer, A.; Mosbacha, K.; Sode, K.; Ye, L. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 112-121.

ZHANG, L.; Zhai, Y.; Chang, X.; He, Q.; Huang, X.; Hu, Z. *Microchim. Acta* **2009**, *165*, 319-327.

ZHANG, M.; Zhang, Z.; Liu, Y.; Yang, X.; Luo, L.; Chen, J.; Yao, S. *Chem. Eng. J.* **2011**, *178*, 443-450.

ZHANG, X.-B.; Peng, J.; He, C.-L.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *567*, 189-195.

ZHENG, J.; Huan, Y.; Xiao, C.; Feil, Q.; Li, M.; Wang, B.; Feng, G.; Yu, H.; Song, Z. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 1-5.