



TÁBITA CRISTINA BELINI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA
CONTENDO ÍONS COBRE(II) PARA APLICAÇÃO AGROQUÍMICA.**

CAMPINAS

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TÁBITA CRISTINA BELINI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA
CONTENDO ÍONS COBRE(II) PARA APLICAÇÃO AGROQUÍMICA**

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO APARECIDO SIGOLI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ITALO ODONE MAZALI

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

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
TÁBITA CRISTINA BELINI, E ORIENTADA PELO PROF. DR. FERNANDO APARECIDO SIGOLI.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2012

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

B412s Belini, Tábita Cristina (1985-).
Síntese e caracterização de nanopartículas de sílica contendo íons cobre (II) para aplicação agroquímica / Tábita Cristina Belini. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Fernando Aparecido Sígoli.
Coorientador: Italo Odone Mazali

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Sílica. 2. Nanopartículas. 3. Cobre (II) 4. Aplicação agroquímica. I. Sígoli, Fernando Aparecido. II. Mazali, Italo Odone. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Synthesis and characterization of silica nanoparticles containing copper (II) ions to agrochemical application

Palavras-chave em inglês:

Sílica
Nanopartídes
Copper (II)
Agrochemical application

Área de concentração: Química Inorgânica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Inorgânica

Banca examinadora:
Fernando Aparecido Sígoli [Orientador]
Pedro Paulo Corbi
Walter Ruggieri Waldman

Data de defesa: 18/10/2012

Programa de pós-graduação: Química

*“Many of life’s failures are people who
did not realize how close they were
to success when they gave up”.*
(Thomas Edison)

AGRADECIMENTOS

- *Agradeço, em especial, aos meus orientadores Prof. Dr. Fernando Aparecido Sigoli e Prof. Dr. Italo Odone Mazali, que acreditaram em mim e me confiaram a difícil tarefa de conciliar o curso de mestrado e a carreira corporativa;*
- *À Iharabras S/A Indústrias Químicas e, em especial, ao Edson Mamoru Narita e ao Moacir de Mancilha, pelo investimento em minha formação e oportunidade de prosseguir com meus estudos;*
- *À Universidade Estadual de Campinas/Unicamp, em específico ao Instituto de Química e Laboratório de Materiais Funcionais (LMF), pela infraestrutura e todo auxílio prestado;*
- *À equipe do Laboratório de Tecnologia, da Iharabras S/A Indústrias Químicas, e à equipe do Laboratório de Materiais Funcionais (LMF), do Instituto de Química da Unicamp, por todo auxílio, incentivo e coleguismo;*
- *Ao pesquisador Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, da Divisão de Fitoquímica do CPQBA/Unicamp - Betel, bem como aos estagiários Katyri e Sidney, por disponibilizar o equipamento de spray dryer em todos os momentos que tive necessidade e me auxiliarem no seu manuseio;*
- *Ao Prof. Dr. Marcos Aurélio Cebim da Unesp/Araraquara e à Fabiana Corbi, do LMF, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura;*
- *À minha família e amigos, em especial aos meus pais Alberto Severino Bellini e Udeilda Aparecida da Silva Belini, por torcerem pelo meu sucesso, sempre.*

MUITO OBRIGADA!

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Tábita Cristina Belini

Data de Nascimento: 16/08/1985

Naturalidade: Campinas – SP

Filiação: Alberto Severino Bellini e Udeilda Aparecida da Silva Belini

Email: tabita.belini@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas

Instituto de Química – Unicamp

Ingresso: 03/2005 Conclusão: 12/2009

Mestrado em Química Inorgânica

Instituto de Química – Unicamp

Ingresso: 07/2010 Conclusão: 10/2012

PROJETOS DESENVOLVIDOS

Iniciação Científica – Química Inorgânica

Período: 03/2007 a 12/2008

Orientador: Prof. Dr. Fernando Aparecido Sigoli

Título do projeto: “Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ítrio dopadas com íons európio(III)”.

Bolsista PIBIC: 08/2007 a 01/2008

Bolsista Fapesp: 02/2008 a 10/2008

Mestrado – Química Inorgânica

Período: 07/2010 a 10/2012

Orientador: Prof. Dr. Fernando Aparecido Sigoli

Título do projeto: “Síntese e caracterização de nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) para aplicação agroquímica”.

CONGRESSOS E SIMPÓSIOS

- International Conference on Food and Agriculture Applications of Nanotechnologies – NANOAGRI 2010.
Junho/2010 – São Pedro-SP.
- Simpósio sobre Manejo da Resistência a Produtos Fitossanitários: Sustentabilidade dos Sistemas de Produção.
Dezembro/2010 – Piracicaba-SP.
- III Simpósio Internacional sobre Glyphosate – Uso sustentável.
Mai/2011 – Botucatu-SP.
- Agrochemical Formulation – USA.
Setembro/2011 – Raleigh - North Caroline (USA).

PATENTE PROTOCOLADA

F. A. Sigoli, I. O. Mazali, T. C. Belini. **Método de obtenção de nanoproductos a base de sílica** – PI1105171-0. Universidade estadual de Campinas e Iharabras S/A Indústrias Químicas, **2011**.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- *Rhodia Poliamida & Especialidades Ltda.*
Período: 02/2009 a 10/2009
Cargo: estagiária
Atribuições: Desenvolvimento de formulações agroquímicas, desenvolvimento de sistemas solventes, manutenção do laboratório segundo as práticas de 5'S.
- *Iharabras S/A Indústrias Químicas*
Período: 10/2009 a 12/2009
Cargo: estagiária

Atribuições: Desenvolvimento de formulações agroquímicas e manutenção do laboratório segundo as práticas de 5´S.

Período: 01/2010 a 04/2011

Cargo: Analista de Tecnologia

Atribuições: Desenvolvimento de formulações agroquímicas, novas matérias-primas/fornecedores, transferência de tecnologia para produção, participação em feiras, congressos e eventos em geral, e manutenção do laboratório segundo as práticas de 5´S.

Período: 04/2011 a atual

Cargo: Pesquisadora de Tecnologia

Atribuições: Desenvolvimento de formulações agroquímicas, novas matérias-primas/fornecedores, novas tecnologias de formulação, transferência de tecnologia para produção, participação em feiras, congressos e eventos em geral, gerenciamento de projetos e manutenção do laboratório segundo as práticas de 5´S.

CURSOS

INGLÊS nível avançado – Certificação TOIEC (2010).

MASP – Método Avançado de Solução de Problemas (Seis Sigma Yellow Belt)

Carga horária: 3 horas

PDL – Programa de Desenvolvimento de Líderes

Carga horária: 64 horas

Dale Carnegie – Treinamento de Relações Humanas e Comunicação Eficaz

Carga horária: 48 horas

RESUMO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO ÍONS COBRE(II) PARA APLICAÇÃO AGROQUÍMICA

Nanopartículas de sílica foram obtidas, via método sol-gel, a partir de silicato de sódio em pH alcalino. A reação de precipitação foi conduzida por 24 h, mediante aquecimento sob refluxo, obtendo-se assim um sol de sílica 1 % m/v, podendo ser concentrado a 3 % m/v mediante destilação. Amostras em fase sólida foram preparadas removendo-se a água da suspensão com o auxílio de um *spray dryer*. As partículas presentes nos sóis apresentam morfologia esferoidal, diâmetro médio de 15 nm e potencial zeta de -28 mV. Já as amostras secas em *spray dryer* foram caracterizadas como não-cristalinas, o potencial zeta variou para -33,5 mV sendo observado a possibilidade de aglomeração de partículas. A distribuição de tamanho de partículas mostrou-se bimodal, com a primeira população centrada em aproximadamente 15 nm e a segunda, em 100 nm.

O processo de adsorção dos íons cobre(II) foi conduzido a partir da suspensão de nanopartículas de sílica 1 % m/v. Adicionou-se cloreto de cobre(II) à suspensão de modo a se obter as concentrações de 1 e 5 mol % de íons cobre(II) em relação à sílica. Esta suspensão final foi processada em *spray dryer*, obtendo-se amostras em fase sólida. Estas são não-cristalinas, apresentam morfologia esferoidal, potencial zeta de -43 mV para as amostras contendo 1 mol % de íons cobre(II), e -33,7 mV, para 5 mol % de íons cobre(II).

A ação biológica das nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) teve foi testada com relação as bactérias *Xanthomonas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum* e nos fungos *Alternaria solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*, mostrando eficácia no controle destes quatro patógenos.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILICA NANOPARTICLES CONTAINING COPPER(II) IONS TO AGROCHEMICAL APPLICATION.

Silica nanoparticles were obtained by sol-gel method from sodium silicate in alkaline medium. The precipitation reaction was conducted by heating the solution under reflux for 24 h, obtaining a silica sol 1 % w/v, that may be concentrated to 3 % w/v by distillation. Dried samples were obtained removing water in a spray-dryer equipment. The obtained nanoparticles are spheroidal, with an average size of 15 nm and zeta potential of -28 mV. The dried samples were characterized as non-crystalline, the zeta potential of re-dispersed have changed to -33,5 mV and its possible to observe some agglomerated particles after drying. The size distribution is bimodal, being the first population around 15 nm and the second one around 100 nm.

The adsorption of copper(II) ions was conducted from 1 % w/v the silica sol. Copper(II) chloride was added silica nanoparticles suspension in order to achieve the concentrations of 1 and 5 mol % of copper(II) ions by silica mol. This final suspension was dried in spray-dryer to obtain solid samples. The latter are non-crystalline, spheroidal, with a zeta potential around -43 mV (samples with copper(II) 1 mol %) and -33,7 mV (samples with copper(II) 5 mol %).

The biological activities of the silica nanoparticles containing copper(II) ions were tested against the bacterias, *Xanthomonas axonopodis* and *Ralstonia solanacearum* and the fungus, *Alternaria solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* showing efficacy against these four targets.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. SÍLICA.....	1
1.2. MÉTODO SOL-GEL	3
1.2.1. Métodos de preparação de sílica.....	7
1.3. AGRONEGÓCIO E DEFENSIVOS AGRÍCOLAS.....	10
1.4. COMPOSTOS CÚPRICOS – ATIVIDADE BACTERICIDA/FUNGICIDA..	14
1.4.1. Área da saúde/ Patógenos humanos.....	14
1.4.2. Agricultura.....	17
2. OBJETIVO	20
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
3.1. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA.....	20
3.1.1. Síntese das nanopartículas de sílica	20
3.1.2. Gravimetria	21
3.1.3. Avaliação de pH.....	22
3.2. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO ÍONS COBRE(II).....	22
3.2.1. Estudos de gelificação em função do pH.....	22
3.2.2. Adsorção dos íons metálicos na superfície da sílica	23
3.3. PROCESSAMENTO SPRAY-DRYER.....	24
3.3.1. Condições.....	24
3.3.2. Processamento das amostras	24
3.4. CARACTERIZAÇÕES	25

3.4.1.	Difratometria de Raios X (XRD).....	25
3.4.2.	Fluorescência de Raios X (XRF)	25
3.4.3.	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR)	25
3.4.4.	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) – Raio hidrodinâmico das partículas.....	25
3.4.5.	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) – Potencial Zeta	26
3.4.6.	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM-FEG)	26
3.4.7.	Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios X (SEM-EDS)	26
3.5.	ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	27
3.5.1.	Bactérias.....	27
3.5.2.	Fungos.....	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
4.1.	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA.....	30
4.1.1.	Gravimetria	32
4.1.2.	Avaliação de pH.....	33
4.1.3.	Difratometria de Raios X (XRD).....	33
4.1.4.	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR)	34
4.1.5.	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) – Raio hidrodinâmico das partículas.....	35
4.1.6.	Espalhamento de Luz Dinâmico – Potencial Zeta	39
4.1.7.	Microscopia Eletrônica de Varredura (FEG-SEM)	40
4.2.	OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO ÍONS COBRE(II).....	43
4.2.1.	Estudos de gelificação em função do pH.....	43
4.2.2.	Adsorção dos íons metálicos na superfície da sílica.....	44
4.2.3.	Fluorescência de Raios X (XRF)	45

4.2.4.	Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios X (SEM-EDS)	46
4.2.5.	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR)	46
4.2.6.	Espalhamento de Luz Dinâmico – Potencial Zeta	48
4.2.7.	Difratometria de Raios X (XRD).....	49
4.2.8.	Microscopia Eletrônica de Varredura (FEG-SEM)	52
4.3.	ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	52
4.3.1.	Bactérias.....	52
4.3.2.	Fungos.....	59
5.	CONCLUSÃO	64
6.	PERSPECTIVAS DE TRABALHO	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de dispersões coloidais.	3
Tabela 2. Relação entre os volumes de solução de silicato de sódio, água e solução de ácido cítrico utilizados na síntese das nanopartículas de sílica.	21
Tabela 3. Relação de massa de sal de cobre(II) com volume de solução de nanopartículas de sílica.	23
Tabela 4. Amostras de sílica nanoparticulada obtidas através de processamento em <i>spray-dryer</i>	24
Tabela 5. Relação entre a massa de amostra, volume de água e concentração de íons cobre(II) utilizada no preparo dos meios de cultura para o ensaio de atividade biológica com bactérias.	27
Tabela 6. Relação entre a massa de amostra, volume de água e concentração de íons cobre(II) utilizada no preparo dos meios de cultura para o ensaio de atividade biológica com fungos.	29
Tabela 7. Dados experimentais referentes à análise gravimétrica.	32
Tabela 8. Valores de pH de soluções de sílica a 0,1 % m/v.	33
Tabela 9. Atribuições das bandas dos espectros vibracionais na região do infravermelho.	35
Tabela 10. Raio hidrodinâmico das nanopartículas de sílica presentes na suspensão coloidal – diâmetro médio e moda das distribuições apresentadas na Figura 4.	36
Tabela 11. Raio hidrodinâmico das amostras processadas em <i>spray-dryer</i> e redispersas em água a 0,1 % m/v – diâmetro médio e moda das distribuições apresentadas na Figura 5.	37
Tabela 12. Moda das distribuições de potencial zeta apresentadas na Figura 6.	40
Tabela 13. Estudo de gelificação do sol de sílica obtido via refluxo.	44
Tabela 14. Quantificação de íons cobre(II) nas amostras de nanopartículas de sílica, processadas em <i>spray-dryer</i> nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.	46

Tabela 15. Porcentagem, em massa, dos elementos químicos caracterizados por EDS, desconsiderando contaminantes e subprodutos.....	46
Tabela 16. Atribuições das bandas dos espectros vibracionais na região de infravermelho.....	47
Tabela 17. Valor médio do potencial zeta das suspensões preparadas com as amostras de sílica contendo íons cobre(II).....	49
Tabela 18. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para a bactéria <i>Ralstonia solanacearum</i>	56
Tabela 19. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para a bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i>	57
Tabela 20. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para o fungo <i>Alternaria solani</i>	60
Tabela 21. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para o fungo <i>Colletotricum gloeosporioides</i>	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da superfície da sílica gel. (1) grupo silanol livre, (2) grupos silanóis geminais, (3) ponte de siloxano e (4) ligações de hidrogênio.....	2
Figura 2. Difratogramas das suspensões coloidais de sílica a 1% e 3% m/v após secagem em <i>spray-dryer</i> nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.	34
Figura 3. Espectros vibracionais na região do infravermelho das suspensões coloidais de sílica a 1% e 3% m/v após secagem em <i>spray-dryer</i> nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.	34
Figura 4. Distribuição do raio hidrodinâmico das partículas presentes na suspensão coloidal de sílica: (a) 1 % m/v e (b) 3 % m/v, sendo que a condição (a.1) e (b.1) referem-se às análises por intensidade e (a.2) e (b.2), volume.	36
Figura 5. Distribuição do raio hidrodinâmico das partículas de sílica: (a) 1 % m/v e (b) 3 % m/v processadas em <i>spray-dryer</i> e redispersas em água, sendo que a condição (a.1) e (b.1) referem-se às análises por intensidade e (a.2) e (b.2), volume.....	38
Figura 6. Gráficos de distribuição do potencial zeta referentes às suspensões de (a) sílica 3 % m/v e (b) sílica a partir das amostras secas em <i>spray-dryer</i>	40
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura das suspensões coloidais de sílica: (a) 1 % m/v e (b) 3 % m/v.....	41
Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura das suspensões em água das amostras (a) SiO ₂ 1150, (b) SiO ₂ 1150, (c) SiO ₂ 1200, (d) SiO ₂ 3150, (e) SiO ₂ 1180 e (f) SiO ₂ 1200.....	42
Figura 9. Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras de nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) a 1 e 5 mol%, após secagem em <i>spray-dryer</i> nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.....	47
Figura 10. Distribuição de potencial zeta referentes às suspensões preparadas com as amostras de sílica contendo íons cobre(II).	49
Figura 11. Amostras de sílica contendo íons cobre(II): (a) 1 mol% e (b) 5 mol% secas por <i>spray-dryer</i> em diferentes temperaturas. JCPDS citrato de sódio: 16-1170 e JCPDS cloreto de sódio: 5-628.	50

Figura 12. Difratoograma comparativo entre as suspensões de nanopartículas de sílica processadas em <i>spray-dryer</i> com diferentes valores de pH.	51
Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura de suspensões em água das amostras (a) SiO ₂ 1Cu1150, (b) SiO ₂ 1Cu1180, (c) SiO ₂ 1Cu1200, (d) SiO ₂ 1Cu5150, (e) SiO ₂ 1Cu5180 e (f) SiO ₂ 1Cu5200. Os detalhes nas imagens (c) e (e) apresentam partículas contidas nessas amostras em escala micrométrica.	53
Figura 14. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra <i>Ralstonia solanacearum</i> nas concentrações de: (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 1 ppm de íons Cu(II), (c) 5 ppm de íons Cu(II), (d) 10 ppm de íons Cu(II). Os detalhes em casa imagem apresentam um <i>zoom</i> do halo de inibição formado.	54
Figura 15. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra <i>Ralstonia solanacearum</i> nas concentrações de: (a) 25 ppm de íons Cu(II), (b) 50 ppm de íons Cu(II), (c) 100 ppm de íons Cu(II) e (d) padrão comercial – 1050 ppm de íons cobre(II). Os detalhes em casa imagem apresentam um <i>zoom</i> do halo de inibição formado.	55
Figura 16. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> nas concentrações de: (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 1 ppm de íons Cu(II), (c) 5 ppm de íons Cu(II), (d) 10 ppm de íons Cu(II). Os detalhes em casa imagem apresentam um <i>zoom</i> do halo de inibição formado.	58
Figura 17. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> nas concentrações de: (a) 25 ppm de íons Cu(II), (b) 50 ppm de íons Cu(II), (c) 100 ppm de íons Cu(II) e (d) Padrão comercial – 1050 ppm de íons Cu(II). Os detalhes em casa imagem apresentam um <i>zoom</i> do halo de inibição formado.	59
Figura 18. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra <i>Alternaria solani</i> . (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 25 ppm de íons Cu(II), (c) 50 ppm de íons Cu(II), (d) 100 ppm de íons Cu(II) e (e) Padrão comercial – 490 ppm de íons Cu(II).	61

Figura 19. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra *Colletotricum gloeosporioides*. (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 25 ppm de íons Cu(II), (c) 50 ppm de íons Cu(II), (d) 100 ppm de íons Cu(II) e (e) Padrão comercial – 490 ppm de íons Cu(II)..... 63

1. INTRODUÇÃO

1.1. SÍLICA

O silício é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, perdendo apenas para o oxigênio. Está presente em vários tecidos, animais e vegetais, sendo essencial para alguns organismos. Este elemento pode apresentar-se nas formas de óxidos cristalinos (quartzo, cristobalita, tridimita, coesita) e não-cristalinos (sílica vítrea, opala e sílica gel). Em ambiente natural, apresenta-se na forma de óxido (SiO_2) ou combinado com outros elementos – por exemplo, sódio, potássio, magnésio – formando os silicatos ^{1,2}.

Frondel et al.³ afirmam em seu trabalho que a sílica não-cristalina é, na verdade, constituída por regiões, de ordem atômica, nos quais apresentam-se cristais bastante pequenos que, quando analisados cuidadosamente por difratometria de raios X, pode-se observar picos referentes à estrutura cristobalita do SiO_2 ; todavia, em análises regulares de difratometria de raios X, observa-se apenas um halo largo de difração caracterizando-a como “não-cristalina” ou “amorfa”.

A sílica não-cristalina pode ser dividida em três grupos¹:

- 1) Sílica vítrea;
- 2) Sílica M, sendo produzida a partir da irradiação de nêutrons em alta velocidade em sílica amorfa ou cristalina. Essa forma é termicamente instável, sendo convertida a quartzo a 930 °C em 16 horas;
- 3) Sílica “microamorfa”, como sóis, géis, pós e vidros porosos. Englobam-se partículas menores do que 1 μm ou com área superficial superior a 3 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$.

A classe de sílica “microamorfa”, constituída por partículas com diâmetro inferior a 100 nm, é àquela mais facilmente sintetizada em laboratório, principalmente via método sol-gel. As partículas são formadas a partir do enovelamento das cadeias do polímero inorgânico ácido polissilícico, cujas unidades repetitivas (grupos SiO_4 tetraédricos) se distribuem tridimensionalmente,

ligando-se por pontes de siloxano (ligações Si-O-Si). Desse modo, observa-se em sua superfície grupos SiO_2 e grupos Si-OH, sejam livres ou geminais – Figura 1 ⁴.

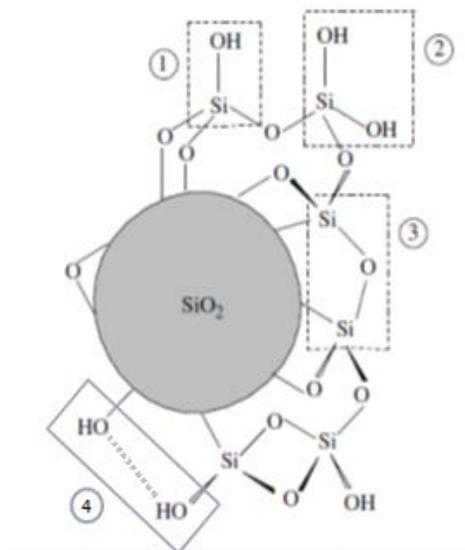


Figura 1. Esquema da superfície da sílica gel. (1) grupo silanol livre, (2) grupos silanóis geminais, (3) ponte de siloxano e (4) ligações de hidrogênio.

A reatividade química é determinada, principalmente, pelos grupos silanóis presentes na superfície da sílica. A primeira constante de dissociação (pK_a) do ácido silícico (H_4SiO_4) é 9,6 ^{2,5}. Já o valor de pK_a dos grupos silanóis (enésima dissociação) presentes na sílica é de, aproximadamente, 7,1 ⁶. Como para ácidos polipróticos, a sílica apresenta diversas constantes de dissociação, sendo que tal grandeza varia em função da ionização das hidroxilas. A dissociação de tais grupos pode ser controlada através do pH do meio em que as partículas encontram-se suspensas. Em pH 2,0 (ponto isoelétrico, i.e., valor de pH no qual as partículas apresentam carga superficial zero), o pK_a da sílica é 6,5. Quando se dissocia cerca de 50 % dos grupos silanóis, o pK_a aumenta para 9,2, aproximando-se do valor referente ao ácido silícico ¹. Portanto, em seu ponto de carga zero (pH 2), a sílica apresenta caráter mais ácido do que o ácido silícico, sendo este diminuído em função da dissociação dos grupos silanóis, que é conseguido elevando-se o pH do meio de suspensão das partículas.

As hidroxilas presentes na superfície da sílica são passíveis de serem quimicamente modificadas, resultando na funcionalização da superfície da sílica.

Tais reações possibilitam a obtenção de matrizes de sílica mais seletivas e versáteis, uma vez que incorporam as características dos agentes modificadores ⁷. Portanto, uma matriz de sílica pode ser utilizada para ancorar outras substâncias – como íons metálicos ou moléculas orgânicas – seja por adsorção direta à sua superfície, seja pela funcionalização dos grupos silanóis e interação química com os terminais modificados.

1.2. MÉTODO SOL-GEL

Um coloide é definido como uma suspensão na qual a fase dispersa é suficientemente pequena (aproximadamente, de 1 a 1000 nm), de modo que a atuação de forças gravitacionais pode ser desconsiderada. As interações predominantes são as forças de van der Waals e interações eletrostáticas, provocadas pela carga superficial das partículas ⁸.

Um adjetivo que bem descreve um sistema coloidal é “microheterogêneo”, uma vez que um colóide é composto por duas fases: uma fase dispersa e um meio dispersante; todavia, quando observado a olho nu, mostra-se como uma única fase ⁹. Tanto a fase dispersa, quanto o meio dispersante, podem ser sólidos, líquidos ou gasosos. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de dispersões coloidais.

Tabela 1. Exemplos de dispersões coloidais.⁹

Fase dispersa	Meio dispersante	Nome da dispersão	Exemplos
Líquido	Gás	Aerosol líquido	Sprays líquidos
Sólido	Gás	Aerosol sólido	Poeira
Gás	Líquido	Espuma	Espumas em geral
Líquido	Líquido	Emulsão	Maionese, cremes cosméticos
Sólido	Líquido	Sol	Pasta de dente
Gás	Sólido	Espuma sólida	Espumas utilizadas em estofados
Líquido	Sólido	Emulsão sólida	Opala, pérola
Sólido	Sólido	Suspensão sólida	Pigmentos plásticos

Uma dispersão coloidal é classificada como um sistema termodinamicamente instável, sendo que sua estabilidade relativa deve-se à sua alta energia superficial.

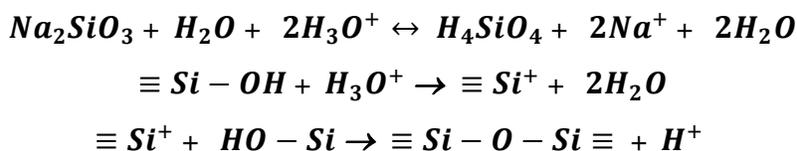
As partículas suspensas tendem a se encontrar, devido ao movimento Browniano, e, dependendo da interação entre essas partículas, as mesmas podem se agregar e precipitar, desestabilizando o sistema coloidal, sendo esta uma ação irreversível.

As interações de van der Waals regem os fenômenos de agregação das partículas. Portanto, precisa-se contrabalancear essa força para promover a estabilidade do coloide, o que é conseguido através de interações eletrostáticas repulsivas e/ou efeito estérico. A teoria da dupla camada elétrica é capaz de explicar essa estabilidade relativa dos sistemas coloidais, uma vez que prevê a ordenação de íons e contra-íons ao redor da superfície das partículas, em função de sua densidade de carga superficial. Assim, quando as mesmas se aproximam, há a prevalência de fenômenos de repulsão devido à densidade de carga gerada por essa dupla camada elétrica. Outro modo de estabilizar um sistema coloidal é através da adição de moléculas que se ordenem ao redor das partículas e provoquem efeito estérico, impedindo a aproximação das mesmas. Um exemplo clássico é a adição de surfactantes, o que possibilita a formação de emulsões ⁹.

Sendo o sol (suspensão de partículas sólidas em um meio líquido) um sistema coloidal, as considerações descritas anteriormente são válidas, portanto sua estabilidade é atingida mediante o balanço entre as forças de van der Waals e interações eletrostáticas.

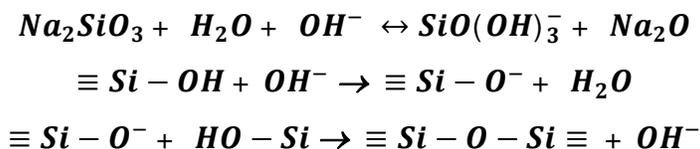
No método sol-gel, os precursores para a síntese de um sol podem ser compostos inorgânicos, como sais, ou um composto metalorgânico, como alcóxidos⁸. No caso da sílica, silicato de sódio (sal de silício) ou tetraetilortosilicato – TEOS (alcóxido) são comumente utilizados para a preparação de sóis. Ambos precursores são polimerizados, por meio de reações de hidrólise e de condensação, originando o sol de sílica. Para os silicatos, Iler¹ descreve a preparação do sol sendo regida pelo pH do meio de reação, podendo ser dividida em três condições: abaixo de pH 2, entre pH 2 e 7, e acima de pH 7.

Em todas as condições, a reação inicia-se com a hidrólise do silicato; todavia, em pH inferior a 2, o mecanismo de polimerização envolve a formação de um íon intermediário ($\equiv\text{Si}^+$), como é demonstrado pela Equação 1. Nesse caso, a taxa de polimerização é proporcional à concentração de prótons.



Equação 1. Mecanismo de polimerização do silicato em pH abaixo de 2⁸.

Já em valores de pH entre 2 e 7, a taxa de polimerização é proporcional à concentração de íons OH⁻, sendo que o mecanismo de reação envolve a formação de um íon ($\equiv Si-O^-$) – vide Equação 2. Nessa condição reacional, os grupos silanóis mais ácidos são aqueles presentes na espécie condensada (o pKa de tais grupos é inferior ao pKa das espécies não condensadas, como apresentado no item 1.1), portanto a condensação ocorre preferencialmente envolvendo as espécies condensadas, ao invés de ocorrer entre as espécies neutras. Isso quer dizer que, uma vez formado um dímero, a probabilidade de uma espécie neutra se ligar a esse dímero, formando um trímero, é maior do que a probabilidade de duas espécies neutras reagirem formando um novo dímero.



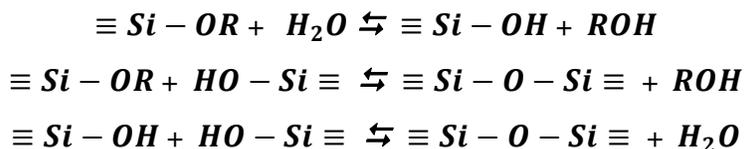
Equação 2. Mecanismo de polimerização do silicato em pH entre 2 e 7⁸.

Nessa condição também se observa o crescimento das partículas através de fenômenos de agregação e de coalescência, sendo que, quanto mais próximo do ponto isoelétrico da sílica (pH 2), mais notáveis serão os fenômenos de agregação, já que não há repulsão eletrostática entre as partículas ou esta é praticamente nula^{1,8}. Assim sendo, formadas as partículas, em valores de pH inferiores a 7, observa-se a formação de uma rede tridimensional denominada gel. Essa estrutura é formada através de reações de reticulação da cadeia polimérica, sendo que quanto maior a taxa das reações de reticulação, mais consistente será o gel formado.

Por fim, em pH acima de 7, o mecanismo de reação é semelhante ao apresentado pela Equação 2. Contudo, como nessa condição o pH do meio encontra-se distante do ponto isoelétrico, espera-se que o crescimento das partículas seja majoritariamente conduzido por fenômenos de coalescência, uma vez que a repulsão eletrostática entre as partículas de sílica é considerável; todavia, isso só é observado em ausência de sais. Quando há, por exemplo, NaCl presente no meio de reação, os íons e contra íons, gerados pela dissociação desse sal em água, se ordenam ao redor da superfície da partícula de sílica, minimizando os efeitos de coalescência e favorecendo a formação do gel, através da reticulação das cadeias poliméricas – como ocorre em valores de pH inferiores a 7^{1,8}.

A presença de sal no meio dispersante eleva a taxa das reações de reticulação entre as cadeias do ácido polissilícico, diminuindo o tempo de gelificação. Ou seja, na presença de sal, o sol de sílica gelifica mais rapidamente do que na ausência do mesmo¹.

Com relação aos alcóxidos, pode-se descrever o método sol-gel com três reações (Equação 3).



Equação 3. Mecanismo de polimerização a partir de um alcóxido de silício.

Numa primeira etapa, ocorrem reações de hidrólise, onde um grupo alcóxido (OR) é substituído por uma hidroxila (OH). Em sequência ocorrem reações de condensação, onde um grupo silanol reage com um alcóxido, ou com outro grupo silanol, formando um grupo siloxano e tendo como subproduto uma molécula de um álcool equivalente ou água⁸.

Apesar de sua alta pureza, os alcóxidos apresentam algumas desvantagens, como baixa disponibilidade no mercado, custo mais elevado, quando comparado aos sais inorgânicos, e requerem maiores cuidados no manuseio, uma vez que

sofrem hidrólise facilmente. Deste modo, sínteses de sol de sílica a partir de silicato são industrialmente mais viáveis, apesar de requererem controle mais rígido de alguns parâmetros, como pH.

Portanto, o método sol-gel consiste na obtenção de materiais sólidos a partir de precursores líquidos através de reações de hidrólise e de condensação. Esse método apresenta inúmeras vantagens, como pureza e homogeneidade das matérias primas, não requer temperatura elevada para preparação, o que implica em menor gasto energético, menos perda por evaporação, menor poluição do ar; além de possibilitar o preparo de filmes e produtos de vidro através da formação do gel. Porém, em alguns casos, requer reagentes de alto custo, longos tempos de reação, produz materiais com residual de compostos orgânicos e/ou poros e oferece alguns perigos à saúde do manipulador, principalmente quando requer uso de solventes orgânicos ⁸.

1.2.1. Métodos de preparação de sílica

A precipitação de sílica via método sol-gel é largamente apresentada na literatura, sendo que os principais métodos são através da acidificação de uma solução de um sal inorgânico de silício, como silicato de sódio, e precipitação através de um alcóxido, como tetraetilortosilicato (TEOS) ¹.

O método mais comum para síntese de sílica coloidal é denominado método de Stöber e faz uso de TEOS como fonte de silício. O método foi desenvolvido por Werner Stöber em 1968¹⁰ e consiste em hidrolisar/condensar o tetraetilortosilicato em uma solução alcoólica em presença de hidróxido de amônio. Consegue-se controlar o tamanho das partículas sintetizadas variando-se as concentrações de TEOS e do álcool, bem como a natureza do álcool. Trata-se de um método bastante divulgado e vários trabalhos ainda são desenvolvidos com base no mesmo, pois obtém-se partículas estáveis com uma estreita distribuição de tamanho ^{11,12}.

O método de Stöber tem sido utilizado não somente para obtenção de nanopartículas de sílica, como também pode ser adaptado para obtenção de

sistemas como nanopartículas híbridas¹³, revestimentos em sistema *core/shell*¹⁴, sistemas estruturados (como sílica mesoporosa)^{15,16} e xerogéis¹⁷.

Todavia, os parâmetros de síntese de nanopartículas a partir de TEOS, tais como volume, formato de reator, temperatura, tempo de reação, agitação e atmosfera devem ser controlados dentro de uma estreita janela de variações para a obtenção de nanopartículas com tamanho e forma controlados. Dessa forma, a produção em larga escala de nanopartículas de sílica por reações de hidrólise e de condensação do TEOS requer o controle rígido de tais parâmetros, dificultando sua obtenção em escala industrial, principalmente para indústrias de *commodities*. Cabe mencionar também o número pequeno de fornecedores em quantidades industriais a nível mundial deste precursor, sendo zero ou ínfimo no Brasil, dependendo da importação desse insumo. Além das dificuldades encontradas no âmbito de produção, o TEOS é um reagente instável frente à umidade. Quando exposto a água (seja fonte direta ou umidade), pode sofrer hidrólise, liberando etanol e, portanto, requer alguns cuidados com relação ao manuseio e armazenagem.

Em contra partida, o silicato de sódio é uma fonte de silício que apresenta menor custo, grande disponibilidade no mercado e menor periculosidade para manuseio, além de que o método sol-gel para síntese de nanopartículas de sílica a partir de silicato de sódio é mais fácil de ser transposto para escala industrial quando comparado ao método que emprega TEOS. Todavia, os produtos obtidos a partir da síntese via silicato de sódio não possuem a mesma pureza daqueles obtidos via síntese a partir de alcóxido. Isso se deve ao fato de que o método sol-gel via alcóxido gera, como subproduto, alcoóis voláteis, que são desprendidos do meio de reação; em contrapartida, a síntese envolvendo o silicato de sódio gera, como subproduto, óxido de sódio, que reage *in situ* formando sais, desestabilizando o sol de sílica.

Assim, tendo em vista todas as dificuldades industriais para a obtenção de nanopartículas de sílica a partir de alcóxidos e conhecendo-se a grande disponibilidade do silicato de sódio no mercado brasileiro, o presente trabalho

propõe um método viável para a obtenção de uma suspensão estável de nanopartículas de sílica, utilizando silicato de sódio.

Encontram-se na literatura diversos trabalhos publicados sobre síntese de nanopartículas de sílica a partir de silicato de sódio. Por exemplo, Grace¹⁸ e Nissan Co.¹⁹ e patentearam métodos de obtenção de nanopartículas de sílica a partir de ácido silícico, produzindo o silicato de sódio *in situ*, através da adição de hidróxido de sódio ao meio. Incorporaram uma coluna de troca iônica ao processo para estabilizar a suspensão final, eliminando o cloreto de sódio do meio de reação. Todavia, independente do precursor utilizado na síntese de partículas de sílica, as aplicações das mesmas são bastante semelhantes: agente secante, agente abrasivo, suporte para catalisador, material adsorvente, aditivos para formulações cosméticas, farmacêuticas e agroquímicas, sistemas carreadores, dentre outras inúmeras aplicações^{15, 20, 21, 22}.

As características atribuídas à propriedade adsorvente da sílica devem-se a sua interessante superfície e área superficial, que possibilita a adsorção de diversos materiais, como moléculas orgânicas ou íons metálicos²³. Contudo, nem sempre a adsorção é eficiente diretamente nos grupos silanóis, sendo necessário funcionalizar as partículas de sílica com grupos orgânicos. Diversos métodos já foram publicados com relação à funcionalização de partículas de sílica, porém esse procedimento deve ser conduzido visando a melhor condição para adsorção do material de interesse, i.e., deve ser conduzido de acordo com o material a ser adsorvido à sílica.

Há um forte interesse pela capacidade da sílica em adsorver íons metálicos, podendo ser utilizada em processos de purificação de águas, por exemplo. Gushikem, et al. apresentam diversos estudos de adsorção de íons metálicos em sílica porosa funcionalizada como, por exemplo, a modificação da superfície de sílica gel com grupo imidazolipropil^{24,25}, íons piridínio^{26,27} e 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octano²⁸ para adsorção de Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Co²⁺ e Cd²⁺, bem como o uso de benzimidazol²⁹ e 2-amino-1,3,4-tiadiazol³⁰ em sílica para adsorver íons Cu²⁺. Porém, processos de funcionalização requerem o uso de solventes orgânicos livres de água, atmosfera inerte, reatores específicos, dentre

outros fatores que dificultam sua transposição para escala industrial. Portanto, se houver a possibilidade de adsorver o composto de interesse diretamente sobre a superfície da sílica – sem prévia funcionalização – o processo torna-se economicamente mais atrativo.

Os íons Cu(II), assim como os íons Ag(I), dentre outros, apresentam propriedades bactericidas/fungicidas, já reconhecidas em diversos estudos. Portanto, a possibilidade de adsorver tais íons à superfície de nanopartículas de sílica viabiliza o desenvolvimento de um novo composto bactericida/fungicida, podendo ser aplicado em diversas áreas, como médica, farmacêutica e agroquímica.

1.3. AGRONEGÓCIO E DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

O conceito de agronegócio (ou *agribusiness*) foi proposto pela primeira vez em 1957, por Davis e Goldberg e, por definição, abrange toda relação comercial e industrial envolvendo a cadeia produtiva agrícola e pecuária; portanto, enquadram-se nesse contexto, desde o agricultor (seja ele pequeno, médio ou grande produtor), indústrias fabricantes de insumos, como sementes, fertilizantes, defensivos agrícolas e equipamentos; revendas, bem como logística, venda e beneficiamento dos produtos agropecuários até o consumidor final ^{31,32}.

No ano de 2011, segundo resultados divulgados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o PIB (produto interno bruto) brasileiro apresentou um crescimento de 2,7 % em relação a 2010, totalizando R\$ 4,143 trilhões, o que levou o país a ocupar a 6ª posição no *ranking* mundial, ultrapassando o Reino Unido. O agronegócio, especificamente, apresentou um crescimento de 3,9 % em relação a 2010, contribuindo, portanto, de forma mais expressiva do que as demais atividades (serviço, 2,7 % e indústria, 1,6 %) no crescimento do PIB total brasileiro. Vale ressaltar também que, em 2011, o agronegócio não causou déficit à balança comercial brasileira – as exportações (*commodities* e produtos agro-industriais) superaram as importações ³³.

E as expectativas permanecem otimistas com relação a este ramo de atividade. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) divulgou,

em Junho de 2011, um estudo que apresenta as projeções do agronegócio no Brasil para os anos de 2020/2021, relacionando-os aos anos de 2010/2011. Segundo o estudo, o crescimento da produção agrícola no Brasil deve continuar acontecendo com base na produtividade – os resultados revelam maior acréscimo da produção agropecuária que os acréscimos das demais áreas ³³.

Por exemplo, as projeções indicam que, em 10 anos, a produção de grãos (arroz, feijão, soja, milho e trigo) deve aumentar em 23,0 %, enquanto a área deverá expandir-se em somente 9,5 %. Este estudo mostra um exemplo típico de crescimento com base na produtividade.

Todavia, o Brasil ainda enfrenta situações oriundas da imposição de barreiras sanitárias e fitossanitárias que precisam ser superadas. Além disso, está sob ameaça constante do avanço e severidade de pragas e doenças de plantas e animais já existentes no país e daquelas que podem ser introduzidas a qualquer momento, se medidas preventivas competentes e eficazes não forem delineadas e implementadas pelo poder público e pelo setor produtivo.

Para que o agronegócio cresça, conforme prospecção, mediante tantas adversidades, a agricultura brasileira terá que evoluir em termos tecnológicos e em associações. O “agricultor do futuro” terá que ser capaz de gerenciar as inovações tecnológicas oferecidas pela indústria, bem como fortalecer o seu negócio mediante contratos com cooperativas e sindicatos, de modo a não trabalhar de forma isolada. As indústrias de insumos, por sua vez, deverão suprir os produtores com os recursos necessários, sejam eles relacionados à agricultura de precisão (como maquinário, GPS e softwares), sistemas de irrigação e drenagem, mecanização, transgenia, biotecnologia, nanotecnologia, dentre outros ³².

Um ramo de atividade que desempenha um papel muito importante neste quadro é a indústria de defensivos agrícolas, sendo responsável pelo desenvolvimento, produção e fornecimento de produtos fitossanitários, também denominados defensivos agrícolas, agroquímicos, agrotóxicos, pesticidas, praguicidas ou biocidas.

Segundo a Lei Federal nº 7.802 de 11/07/1989, regulamentada através do decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, o termo agrotóxico é definido como: “Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da fauna e da flora, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”. Em suma, tratam-se de produtos químicos utilizados no controle de pragas, doenças e ervas daninhas no campo, em geral, excluindo-se os fertilizantes e medicamentos administrados a animais para estimular seu crescimento ou modificar seu ciclo reprodutivo ³⁴.

Segundo sua finalidade, os agroquímicos são divididos nas seguintes classes de uso ³⁵:

- Acaricidas: destinados ao controle de ácaros;
- Fungicidas: destinados, principalmente, a eliminar fungos tanto nas culturas quanto nas sementes;
- Herbicidas: destinados a eliminar ou impedir o crescimento de ervas daninhas. São, normalmente, utilizados para substituir a capina manual;
- Inseticidas: destinados a eliminar insetos;
- Raticidas: destinados a eliminar ratos, marmotas, toupeiras, esquilos e camundongos.

Apesar de serem taxados como venenos, os agroquímicos exercem um importante papel no agronegócio, pois a sua utilização – de forma regulamentada e consciente – possibilita o aumento de produtividade sem demandar por maiores áreas agricultáveis, o que será essencial nos próximos anos, como já abordado.

Uma formulação agroquímica é composta, basicamente, por um ingrediente ativo (uma molécula ou íon metálico que apresenta a ação fungicida, inseticida ou

herbicida) e ingredientes inertes (solventes, surfactantes, dentre outros componentes que auxiliam na veiculação do ingrediente ativo). Portanto, quem de fato apresenta a ação dentro de uma formulação agroquímica são os ingredientes ativos. Uma vez que o desenvolvimento de novas moléculas leva, em média, 25 anos, é importante dar sobrevida a moléculas antigas, principalmente mediante os casos de resistência que vêm sendo observados ³⁶.

A evolução dos ingredientes ativos demonstra o quanto a indústria de agroquímicos evoluiu nos últimos anos. O uso de substâncias químicas na agricultura é conhecido desde a antiguidade e surgiu, basicamente, para combate de insetos. Encontram-se registros de utilização de arsênio e enxofre para o controle de insetos em escritos romanos e gregos, nos primórdios da agricultura. Destacam-se o uso de arsênico branco na Idade Média e, a partir do século XVI, o emprego de substâncias orgânicas, como a nicotina e o piretro (extraído do crisântemo) na Europa e nos Estados Unidos ³⁵.

Já no início do século XX, produtos à base de cobre, chumbo, mercúrio e cádmio, dentre outros, foram desenvolvidos comercialmente para tais fins e empregados contra uma variedade de doenças ³⁶.

Os compostos organossintéticos tiveram seu apogeu após a Segunda Guerra Mundial, marco para a indústria química em termos de avanços no campo da síntese. Destaca-se, nesse período, a descoberta do inseticida organoclorado diclorodifeniltricloreto (DDT) e do organofosforado *Sharadam*. Desde então, intensificou-se as pesquisas acerca de novas moléculas, todavia com maior atenção às questões toxicológicas, o que levou ao banimento de um grande número de moléculas antigas ³⁵.

O custo do desenvolvimento de um novo ingrediente ativo é um assunto cercado de muita controvérsia, porém estima-se um valor entre US\$ 100 e 250 milhões; o que justifica os esforços para dar sobrevida a moléculas antigas ³⁵.

1.4. COMPOSTOS CÚPRICOS – ATIVIDADE BACTERICIDA/FUNGICIDA

1.4.1. Área da saúde/ Patógenos humanos

O crescimento/proliferação e morte de microrganismos são influenciadas por diversos fatores, tanto ambientais (como temperatura, pH, níveis de oxigênio e radiação de luz), quanto agentes físico/químicos (como o uso de agentes sanitizantes e radiação UV). Diversos compostos apresentam ação antimicrobiana, destacando-se os alcoóis, fenóis, compostos halogenados, sais quartenários de amônio e íons metálicos, por exemplo. Estes últimos, especificamente, têm sido utilizados há anos, incluindo Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Cd^{2+} , Pd^{2+} ³⁷.

Foram os gregos antigos (400 a.C.) quem descobriram as propriedades antimicrobianas do cobre. Eles prescreviam esse metal para o tratamento de doenças pulmonares e para a purificação de água. Desde então, diversas culturas adotaram o uso desse elemento como agente sanitizante. Por exemplo, os hindus costumavam guardar a água sagrada do Ganges em utensílios de cobre devido a sua propriedade bacteriostática, enquanto que os chineses utilizavam agulhas de cobre em suas práticas de acupuntura e os egípcios faziam uso desse metal para esterilizar água e feridas ^{38,39}. A partir do século XVIII o uso do cobre se disseminou em clínicas ocidentais para tratamentos de desordem mental e doenças pulmonares. Para a manutenção de água potável era comum se adicionar algum objeto de cobre ao líquido, como uma moeda, e essa prática foi adotada tanto pelas caravanas que cruzaram os Estados Unidos na ocupação do oeste, quanto pelos japoneses, durante a Segunda Guerra Mundial. Tratando-se de tecnologias mais avançadas, a NASA desenhou um esterilizador de água a base de cobre e prata para equipar a Apollo 13 ³⁸.

O cobre mostrou-se, ao longo da história, como um excelente agente antimicrobiano, uma vez que apresenta certa abundância, baixo custo e baixa toxicidade ao homem, quando comparado a outros metais, como a prata e o mercúrio ³⁹. O efeito bacteriostático do cobre foi reportado pela primeira vez, em moldes científicos, pelo Dr. Phyllis J. Kuhn em 1983, quem avaliou o efeito de ligas metálicas no crescimento de bactérias ³⁸. Através de um estudo *in vitro*, ele

observou que, em presença de cobre metálico ou ligas metálicas contendo cobre, o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas* era inibido ³⁸. A partir dos dados reportados, desencadeou-se uma série de estudos avaliando a possibilidade de se usar maçanetas de porta, torneiras, dentre outros objetos, contendo cobre em sua composição, em hospitais, clínicas e outros, de modo a minimizar as infecções por contaminação ⁴⁰.

Solioz et al.⁴¹ avaliaram a ação antimicrobiana do cobre metálico em 39 microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus, obtendo resultado positivo para mais de 90 % das espécies. Outros resultados foram reportados ^{42,43}, sendo que o mecanismo de ação mais aceito envolve o dano da parede celular da bactéria, quando exposta à superfície metálica. Contudo, quem de fato apresenta atividade biológica são os íons cobre(II) – processos metabólicos oxidam o cobre metálico da superfície a seu estado iônico, sendo atribuída a esta espécie a ação bactericida ⁴⁴.

Outra vertente que começou a ser intensamente estudada é a combinação de compostos contendo cobre(II) aliados à nanotecnologia. Uma vez que atribuí-se o efeito bactericida aos íons, e não ao elemento metálico, passou-se a avaliar a atividade biológica de nanopartículas carregadas com íons cobre(II) em diversos patógenos. Tang et al.⁴⁵ apresentaram estudos comparativos do efeito bactericida de nanopartículas de TiO₂, nanopartículas de TiO₂ dopadas com cobre e nanopartículas de CuO em *Mycobacterium smegmatis* e *Shewanella oneidensis* e constatou que a dopagem das nanopartículas de titânio intensificam a ação bactericida do cobre. Fenômeno semelhante foi observado por Chen et al.⁴⁶, que reportaram um efeito sinérgico no composto Cu/TiO₂/CS (sendo CS nanopartículas de quitosana). Estes autores propõem que as nanopartículas de quitosana, quando combinadas ao cobre e óxido de titânio, apresentam uma melhor ação bactericida do que os compostos isolados. Seus estudos foram conduzidos com *E. coli* e *S. aureus* e, através de estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão (TEM), os autores verificaram que a parede celular das bactérias é danificada na presença desse composto triplo e atribuem tal efeito à

carga superficial negativa da parede bacteriana – as nanopartículas liberam, quando em solução, íons cobre(II), que se ligam à parede bacteriana, rompendo-as.

Anteriormente, já havia sido publicado um estudo comparando o potencial zeta de nanopartículas de quitosana com nanopartículas de quitosana carregadas com íons cobre(II), bem como o efeito biológico de ambas em *E. coli*⁴⁷. Os autores concluíram que a adição de íons cobre(II) à nanopartículas de quitosana desloca o potencial zeta de tais partículas para valores mais positivos e, portanto, interagem melhor com a parede bacteriana – negativamente carregada – provocando a sua lise ou inibindo o transporte de nutrientes para dentro das células (o mecanismo ainda não foi bem elucidado), conseqüentemente causando a morte das bactérias.

Outros compostos tiveram sua ação bactericida testada, como nanopartículas de cobre embebidas em uma matriz de sílica⁴⁸, nanoestruturas porosas de cobre/carbono⁴⁹ e complexos de cobre com quartenários de amônio⁵⁰, por exemplo, sendo que todos apresentaram melhor ação bactericida/bacteriostática quando combinado a íons cobre(II); assim como nanopartículas de óxido de cobre(II) também apresentam atividade biológica, todavia são menos eficazes do que compostos nos quais os íons cobre(II) se encontram mais biodisponíveis, uma vez que a ação de nanopartículas de óxidos depende da lenta liberação de tais íons para exercerem a função desejada^{51,52}.

Independente do composto avaliado, o mecanismo de ação dos íons cobre(II) como agente antimicrobiano ainda não está bastante claro. Muitos autores^{41,46,47} atribuem tal ação à simples capacidade do cobre(II) em lisar a parede bacteriana, conduzindo-a a morte. Contudo, estudos mais completos estão sendo realizados e os primeiros indícios de que o cobre interfere no metabolismo bacteriano já foram publicados. Esses autores^{42,44,51,53} propõem que, enquanto o cobre é necessário no transporte de elétrons no processo de respiração e atua como cofator em diversas enzimas, o íon Cu^{2+} é tóxico, devido sua capacidade de gerar radicais hidroxila frente a peróxidos, após sofrer redução a Cu^+ (processo este conduzido por enzimas como NADH reductase-2). Assim sendo, os íons

cobre(II) interrompem diversos processos metabólicos dentro da célula, conduzindo-a a morte.

1.4.2. Agricultura

Como já mencionado, fungicidas cúpricos passaram a ser comercializados no início do século XX, porém já no século XIX utilizava-se nas lavouras a denominada “calda bordalesa” – uma mistura de sulfato de cobre(II) e óxido de cálcio na proporção de 1:1 em massa ³⁵. Portanto, a ação bactericida/fungicida do cobre(II) é reconhecida há anos, não somente na área da saúde, como também no setor agrícola. Contudo, poucos estudos são publicados avaliando-se a ação fungicida/bactericida desses novos compostos de cobre nos patógenos relacionados à agricultura, sendo que um dos motivos atribuídos a essa observação é o baixo valor agregado dos defensivos agrícolas, principalmente àqueles a base de cobre.

Atualmente, existem registrados diversos fungicidas cúpricos, destacando-se o óxido, oxiclreto e hidróxido de cobre ⁵⁴. Todavia, tratam-se de formulações antigas, de baixa tecnologia, que exigem uma alta dose de aplicação para que apresentem resultado no controle de doenças. Outro fator que se destaca, nesse contexto, são os casos de resistência. O uso indiscriminado de defensivos agrícolas provoca uma seleção natural na lavoura, seja entre as pragas, patógeno ou ervas daninha. Portanto, dar sobrevida às moléculas antigas é de fundamental importância, principalmente quando se considera o custo e tempo envolvidos no desenvolvimento de novas moléculas, bem como as dificuldades associadas a essa pesquisa. Assim, associando ingredientes ativos antigos a novas tecnologias, como a nanotecnologia, há a possibilidade de obter-se uma melhor eficácia, quando comparado aos produtos tradicionais.

Fungicidas cúpricos apresentam ação protetora e, como tal, são capazes de inibir inespecificamente diversos processos enzimáticos, podendo atuar em qualquer parte da célula onde haja atividade metabólica. Estudos mostram que fungicidas metálicos, como os cúpricos, envolvem reações com os grupos

sulfidrílicos, além de atuar também nas enzimas sacarase, catalase, arginase, asparaginase, beta-glucosidade, dentre outras, inibindo-as ⁵⁵.

Devido à inespecificidade dos fungicidas protetores, observam-se sintomas de fitotoxicidade nas plantas, caso os mesmos sejam absorvidos pela superfície vegetal. Portanto, utilizam-se compostos com baixa solubilidade, como hidróxido, oxicloreto ou óxido de cobre, sendo que a atividade antifúngica e antibacteriana é conseguida mediante intemperismos (chuva, orvalho), secreções vegetal ou do próprio fungo, que solubilizam uma pequena quantidade do composto, liberando os íons cobre(II). Em contrapartida, esses fungicidas apresentam atuação mais lenta, já que é necessário o acúmulo de íons cobre(II) até que se consiga atingir a dose fungitóxica, sendo que esta varia de acordo com cada patógeno ⁵⁵.

Inúmeros patógenos aflingem as mais variadas culturas, sendo que alguns representam maior valor econômico, uma vez que as doenças provocadas por tais patógenos comprometem a produtividade. Por exemplo, a bactéria *Ralstonia solanacearum*, habitante natural do solo, é responsável pela doença vascular murcha bacteriana, acometendo mais de 50 famílias botânicas, incluindo o tomateiro, bananeira, batata doce, fumo, mamoeiro, pimenta e pimentão, dentre outras. Ocorre em todas as regiões do Brasil, causando maiores problemas principalmente nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, onde predominam temperaturas e umidades elevadas ^{56,57}.

O patógeno sobrevive também em várias espécies de plantas daninhas sem expressar nenhum sintoma da doença. Considerada de difícil controle, pela sua ampla gama de hospedeiras e variabilidade do patógeno, é a doença bacteriana mais estudada em todo o mundo ⁵⁷.

Já a bactéria *Xanthomonas axonopodis* é responsável por diversas doenças, incluindo o cancro cítrico, em citros; o crestamento bacteriano, no feijoeiro; e a mancha angular, no algodoeiro; dentre outras. Trata-se de uma doença que ocorre de forma generalizada em todas as regiões, uma vez que o patógeno é bastante resistente à dissecação, calor, baixa umidade e radiação solar, podendo sobreviver por vários anos em sementes, folhas e caules infectados ⁵⁷.

Todas as doenças mencionadas são murchas bacterianas – doenças vasculares que comprometem o transporte de água e nutrientes absorvidos pelas raízes. Tais patógenos colonizam o xilema (vaso condutor) das plantas, apresentando como sintomas a murcha das folhas mais velhas da planta e, com o avanço da doença, o tecido do caule e do ponteiro se tornam flácidos, seguindo-se a seca das folhas, caule, ramos e, finalmente, a morte da planta⁵⁵.

O gênero *Alternaria* pertence a uma família de fungos responsáveis pela requeima (ou crestamento), uma doença que causa a necrose repentina de órgãos aéreos, como folhas, flores e brotações. A necrose se inicia pelos bordos, podendo progredir por toda extensão dos órgãos atacados, causando a morte da região afetada. A doença não causa a morte da planta, num estágio inicial, todavia leva a perda de produtividade. A *Alternaria solani*, especificamente, causa a pinta preta (ou mancha de alternaria) no tomate, berinjela e jiló^{55,57}.

Outro exemplo é o *Colletotricum gloeosporioides*, patógeno causador da antracnose, doença que afeta principalmente culturas frutíferas, mas também pode infectar folhas, flores e ramos, porém sem ocasionar a perda da planta. Sintomas em folhas são caracterizados por manchas necróticas de coloração escura, com bordos definidos e formato irregular, ocupando as margens das folhas ou os espaços entre as nervuras. As flores podem ser facilmente afetadas pelo patógeno, ocorrendo seca ou abscisão das mesmas ou, então, serem infectadas através do botão floral, o que afetará o desenvolvimento do fruto, causando queda prematura e/ou podridão. Mas são os sintomas nos frutos os mais críticos, iniciando-se por pequenas pontuações de coloração marrom a preta, com formato circular. Estas tendem a evoluir atingindo parte do fruto ou necrosando-o completamente, o que ocasiona perda de produtividade. Essa doença é crítica nas plantações de acerola, cacau, café, caju, caqui, citros, goiaba, maçã, mamão, dentre outras culturas⁵⁷.

Assim sendo, o presente trabalho propõe um método para a preparação de uma suspensão estável de nanopartículas de sílica a partir de matérias primas de baixo custo e baixa periculosidade, cujas partículas apresentem uma estreita distribuição de tamanho e sejam redispersáveis em água após secagem. Uma possível aplicação para tais nanopartículas é como sistemas carreadores de íons metálicos ou moléculas orgânicas, podendo ser utilizadas em sistemas catalíticos, agroquímicos, fármacos, cosméticos, dentre outros.

Mais especificamente, propõe-se o desenvolvimento de um novo composto fungicida/bactericida, a base de cobre(II), visando uma melhor eficiência em relação aos fungicidas cúpricos disponíveis no mercado, sem causar fitotoxicidade às plantas.

2. OBJETIVO

O presente trabalho propõe um método para a síntese de nanopartículas de sílica, a partir de silicato de sódio, ajustando-se o pH de precipitação com uma solução de um ácido fraco, e estudo de adsorção de íons cobre(II) à superfície dessas nanopartículas sem prévia funcionalização das mesmas.

Testou-se a atividade biológica do sistema “nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II)” em fungos e bactérias, uma vez que há registro de que tal metal apresenta atividade bactericida e fungicida.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA

3.1.1. Síntese das nanopartículas de sílica

3.1.1.1. Reagentes

- Silicato de sódio alcalino 30 % m/v – Diatom
- Ácido cítrico 99,5 % – Sigma-Aldrich

3.1.1.2. Método

Preparou-se duas soluções, sendo uma de silicato de sódio a 1 % m/v e a outra, ácido cítrico a 1,0 mol L⁻¹. Ajustou-se o pH da primeira solução para 10,5 com a solução de ácido cítrico, sendo que o pH inicial da solução de silicato a 1 % m/v é aproximadamente 12. Vide Tabela 2.

Tabela 2. Relação entre os volumes de solução de silicato de sódio, água e solução de ácido cítrico utilizados na síntese das nanopartículas de sílica.

Concentração de silicato de sódio / % m/v	Volume de água / mL	Volume de silicato de sódio / mL	Volume de ácido cítrico 1,0 mol L ⁻¹ / mL	pH inicial	pH final
1	750	25	6	12,0	10,5

Submeteu-se tal solução a refluxo com agitação magnética por 24 h, com temperatura aproximada de 90 °C, num sistema que consiste em um balão de duas bocas, um condensador em espiral e um termômetro acoplado a uma rolha. O aquecimento foi realizado com o auxílio de uma manta de aquecimento com agitação magnética. Após a reação, concentrou-se a suspensão por destilação, utilizando-se um rota-evaporador acoplado a um sistema de vácuo. Removeu-se água do sistema por destilação até atingir-se a concentração de 3 % m/v – três vezes superior à inicial. Para isso, definiu-se o volume de água que era necessário retirar da suspensão 1 % m/v, de modo a se atingir a concentração de 3 % m/v, e controlou-se o processo de destilação através do volume de água condensada no rota-evaporador.

Para se obter as amostras em fase sólida, processou-se as soluções em *spray-dryer*, conforme item 3.3. Todos os reagentes foram utilizados sem prévio tratamento/purificação.

3.1.2. Gravimetria

Com o objetivo de avaliar a massa contida nas suspensões de nanopartículas de sílica, tanto na amostra cuja concentração nominal é 1 % m/v, quanto naquela concentrada a 3 % m/v, realizou-se análise gravimétrica. Numa cápsula de quartzo tarada, pesou-se uma massa específica da suspensão final de nanopartículas de sílica. Primeiro evaporou-se parte dessa suspensão numa

chapa de aquecimento em temperatura branda, depois tais barquinhas foram submetidas a aquecimento em forno do tipo mufla (EDG 3000) por 3 h a 900 °C. Finalizado o processo, aguardou-se o resfriamento das barquinhas para, então, pesar-se a massa resultante do tratamento.

3.1.3. Avaliação de pH

A suspensão de nanopartículas de sílica, tanto na concentração original (1 % m/v), quanto a 3 % m/v, apresenta um pH em torno de 11. Para avaliar se, quando redispersas em água, as amostras sólidas retomam essa faixa de pH, adicionou-se cerca de 0,01 g de amostra (processada em *spray-dryer*, segundo item 3.3) em 10 mL de água destilada, resultando numa concentração de 0,1% m/v de sólido suspenso. Mediu-se o pH dessa suspensão com o auxílio de um pHmetro Analyser pH 300M, calibrado com soluções tampão Synth 7,00±0,05 e 10,00±0,05 (25 °C).

3.2. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO ÍONS COBRE(II)

3.2.1. Estudos de gelificação em função do pH

Como um dos objetivos do trabalho é a adsorção dos íons cobre(II) na superfície das nanopartículas de sílica sem qualquer processo de funcionalização, buscou-se na literatura o melhor valor de pH para adsorção de tais íons. E, também, avaliou-se o tempo de gelificação da suspensão de nanopartículas de sílica mediante diversos valores de pH. Assim, com base nessas duas informações, determinou-se a melhor condição para prosseguir com o experimento.

O estudo de gelificação foi realizado ajustando-se o pH da suspensão de sílica 1 % m/v, com solução de ácido cítrico 99,5% (Sigma-Aldrich) 1,0 mol L⁻¹, nos valores de pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Para cada ponto, avaliou-se o tempo de gelificação da solução, mediante agitação magnética. Os valores de pH foram ajustados com o auxílio de um pHmetro (Analyser pH 300M) calibrado com tampões (Synth) 7,00±0,05 e 10,00±0,05 (25 °C).

O estudo não foi conduzido com a suspensão de nanopartículas de sílica a 3 % m/v pois, nessa concentração, a suspensão gelifica prontamente à adição do ácido.

3.2.2. Adsorção dos íons metálicos na superfície da sílica

3.2.2.1. Reagentes

- Suspensão de nanopartículas de sílica a 1 % m/v – Preparada segundo item 3.1.1.
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A. – Sigma Aldrich
- Ácido cítrico 99,5 % – Sigma Aldrich

3.2.2.2. Método

Primeiro, preparou-se uma solução de ácido cítrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e, com esta, ajustou-se o pH da suspensão de nanopartículas de sílica para aproximadamente 8. Então se adicionou uma determinada quantidade de cloreto de cobre(II) dihidratado à suspensão de sílica, de modo a se obter uma concentração final de 1, 5 e 10 mol% (em relação à massa de sílica). Vide Tabela 3.

Tabela 3. Relação de massa de sal de cobre(II) com volume de solução de nanopartículas de sílica.

Concentração de íons cobre(II) / mol%	Volume de suspensão de nanopartículas de sílica 1% m/v / mL	Volume de ácido cítrico 1 mol L^{-1} / mL	Massa de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / g
1	1000	30	0,43
5	1000	30	2,13
10	1000	30	4,26

Novamente, para obtenção das amostras em fase sólida, processou-se em *spray-dryer* de acordo com item 3.3, sendo que o sal de cobre foi adicionado à solução de sílica pouco antes dessa etapa. Todos os reagentes foram utilizados sem prévio tratamento/purificação.

3.3. PROCESSAMENTO SPRAY-DRYER

3.3.1. Condições

- Temperaturas: 150, 180 e 200 °C
- Bomba: 15%
- Aspiração: 85%
- *Nozzle cleaner*: 5 / und. arb.
- Bico: 1,5 mm

3.3.2. Processamento das amostras

A secagem das amostras foi realizada utilizando-se um mini *spray-dryer* Büchi modelo B-290, alocado no CPQBA/Unicamp, Betel – SP, divisão de fitoquímica, sob orientação do pesquisador Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Processou-se as duas soluções de sílica (concentrações de 1 e 3% m/v), contendo, ou não, íons cobre(II), nas três temperaturas mencionadas, obtendo-se as amostras apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Amostras de sílica nanoparticulada obtidas através de processamento em *spray-dryer*.

Nomenclatura*	Temperatura / °C	Concentração da suspensão de nanopartículas de sílica / % m/v	Concentração de íons Cu(II) / mol%
SiO ₂ 1150	150	1	-
SiO ₂ 3150	150	3	-
SiO ₂ 1180	180	1	-
SiO ₂ 3180	180	3	-
SiO ₂ 1200	200	1	-
SiO ₂ 3200	200	3	-
SiO ₂ 1Cu1150	150	1	1
SiO ₂ 1Cu5150	150	1	5
SiO ₂ 1Cu1180	180	1	1
SiO ₂ 1Cu5180	180	1	5
SiO ₂ 1Cu1200	200	1	1
SiO ₂ 1Cu5200	200	1	5

* As amostras dopadas com cobre a 10 mol% não puderam ser caracterizadas, conforme discutido no item 4.2.1.

3.4. CARACTERIZAÇÕES

3.4.1. Difratometria de Raios X (XRD)

Os difratogramas de raios X das amostras na forma de pó foram obtidos em um difratômetro Shimadzu XRD-7000, operando em modo de varredura com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), voltagem 40 kV, corrente 30 mA, velocidade de varredura de 2° min^{-1} em 2θ . A calibração do ângulo de varredura (2θ) foi feita usando-se silício policristalino.

3.4.2. Fluorescência de Raios X (XRF)

A quantificação de cobre(II) nas amostras foi realizada pela técnica de fluorescência de raios X por leitura de comprimento de onda utilizando um equipamento Shimadzu XRF-1800 com tubo de ródio. A calibração do equipamento foi realizada com padrões de óxido de cobre(II) em sílica gel.

3.4.3. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR)

Foi utilizado um espectrofotômetro com transformada de Fourier (FT-IR) Bomem FTLA2000, na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Utilizaram-se pastilhas preparadas a partir da dispersão dos sólidos em KBr, na proporção de 1:100 m/m.

3.4.4. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) – Raio hidrodinâmico das partículas

Utilizou-se um equipamento Malvern ZetaSizer Nano-ZS para estimar os diâmetros das partícula sintetizadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico. Realizou-se as medidas com um laser de comprimento de onda de 630 nm a um ângulo fixo de 173° . As amostras foram preparadas suspendendo 0,1% m/v de sólidos em água e submetendo a suspensão a ultrassom por 30 min. Ao transferir a suspensão para cubeta, filtrou-as com membrana de teflon® (PTFE) de $0,20 \mu\text{m}$.

3.4.5. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) – Potencial Zeta

Utilizou-se um equipamento Malvern ZetaSizer Nano-ZS para efetuar as medidas de potencial zeta das partículas de sílica sintetizadas e processadas. As amostras foram preparadas suspendendo 0,1% m/v de sólidos em água e submetendo a suspensão a ultrassom por 30 min.

3.4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM-FEG)

As micrografias foram obtidas em três microscópios distintos (em virtude da disponibilidade destes equipamentos), sendo que as amostras foram preparadas seguindo o mesmo procedimento: amostras sólidas foram redispersas em água destilada em condição bastante diluída e as amostras líquidas (suspensões coloidais) foram diluídas em água destilada. As suspensões finais foram gotejadas sobre fragmentos de silício, previamente limpos com água, detergente neutro e acetona.

- 1) *Field Emission Scanning Electron Microscope* Supra™ 55VP com aceleração de 5 kV e detector de elétrons secundários.
- 2) *Field Emission Scanning Electron Microscope* JEOL JSM 7500F com aceleração de 8 kV com detector de elétrons secundários, disponível no INCT do Instituto de Química de Araraquara (Unesp).
- 3) *Field Emission Scanning Electron Microscope* JSM 6330F com aceleração de 5 kV com detector de elétrons secundários, disponível no laboratório de Luz Síncrotron – LNLS de Campinas.

3.4.7. Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios X (SEM-EDS)

As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (SEM) JEOL JSM-6360 LV com aceleração de 20 kV, com detector de elétrons retroespalhados (*backscattered*), e um analisador de raios X acoplado, modelo Noram System Six, para realização das medidas de EDS. As amostras, presas ao porta-amostra empregando-se fita de carbono, foram recobertas com carbono, pela técnica de *sputtering*, utilizando o equipamento Bal-Tec MED 020.

3.5. ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.5.1. Bactérias

3.5.1.1. Materiais

- Meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar)
- Amostra SiO₂1Cu5150
- Suspensões de bactérias *Xanthomonas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum*

3.5.1.2. Método

Empregou-se o método de teste de difusão em disco. Primeiramente preparou-se suspensões da amostra SiO₂1Cu5150 de modo a se atingir as concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 ppm de íons cobre(II) – vide Tabela 5. Assumiu-se a concentração de 3,99 % m/m de íons cobre(II) para a amostra SiO₂Cu5150, conforme resultado da análise de fluorescência de raios X. Também realizou-se a análise de um produto comercial, a base de hidróxido de cobre(II), para avaliar se o sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II), desenvolvido neste trabalho, apresenta atividade biológica equivalente, inferior ou superior aos produtos já disponíveis no mercado. No caso desse último produto, optou-se por testar a dose máxima recomendada em bula para bactérias.

Tabela 5. Relação entre a massa de amostra, volume de água e concentração de íons cobre(II) utilizada no preparo dos meios de cultura para o ensaio de atividade biológica com bactérias.

Amostra	Concentração de íons cobre(II) / ppm	Massa de amostra utilizada / g	Volume de água / mL
Testemunha (Branco)	0	0,0	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	1	0,0025	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	5	0,0125	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	10	0,0251	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	25	0,0627	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	50	0,1253	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	100	0,2506	100,0
Padrão comercial	1050	0,3000	100,0

Em uma placa de petri contendo o meio de cultura, espalhou-se uma alíquota da suspensão de bactéria com o auxílio de uma alça de *Drigalski*. No centro da

placa de petri, colocou-se um disco de papel filtro previamente imergido nas suspensões contendo as diversas concentrações das amostras a serem avaliadas. O ensaio foi conduzido em triplicata.

As placas de petri foram mantidas a 25 °C, em uma estufa de germinação com fotoperíodo (Eletrolab modelo 222/4), pelo período aproximado de uma semana, sendo que o ensaio deu-se por encerrado no momento em que a placa determinada como “testemunha” teve toda sua área coberta pela respectiva bactéria.

A ação bactericida do composto é verificada pela formação de um halo na região ocupada pelo disco de papel filtro, onde não houve o crescimento bacteriano, sendo este denominado “halo de inibição”. Para todas as concentrações avaliadas, realizou-se duas medidas, diametralmente opostas, do halo de inibição, quando este se fez presente. Com os resultados obtidos pode-se montar uma curva dose/resposta para ambas bactérias, contendo oito pontos cada curva (7 concentrações distintas mais o branco, aqui denominado “testemunha”). Os valores dos halos de inibição foram submetidos a uma análise estatística (método de Turkey – 5% probabilidade), sendo possível avaliar se os mesmos são estatisticamente distintos, ou não.

3.5.2. Fungos

3.5.2.1. Materiais

- Meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar)
- Amostra SiO₂1Cu5150
- Inóculo dos fungos *Alternaria solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*

3.5.2.2. Método

A metodologia adotada foi o teste de difusão em disco para fungos. O meio de cultura foi preparado e, antes de ser vertido na placa de petri, adicionou-se o composto a ser testado na concentração desejada. Neste ensaio trabalhou-se apenas com as concentrações de 25, 50 e 100 ppm de íons cobre(II) – vide

Tabela 6 (novamente utilizou-se a concentração de 3,99 % m/m de íons cobre(II) na amostra, conforme resultado da análise de fluorescência de raios X).

Assim como para o ensaio em bactérias, avaliou-se o desempenho de um produto comercial, a base de hidróxido de cobre(II), nos dois patógenos em questão, de modo a verificar se o composto de nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) apresenta atividade biológica superior, semelhante ou inferior aos produtos disponíveis no mercado. Novamente, fez-se uso da dose máxima recomendada em bula para tais patógenos.

Tabela 6. Relação entre a massa de amostra, volume de água e concentração de íons cobre(II) utilizada no preparo dos meios de cultura para o ensaio de atividade biológica com fungos.

Amostra	Concentração de íons cobre(II) no meio de cultura / ppm	Massa de amostra dispersa no meio de cultura / g	Volume de meio de cultura / mL
Testemunha	0	0,0	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	25	0,0627	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	50	0,1253	100,0
SiO ₂ 1Cu5150	100	0,2506	100,0
Padrão comercial	490	0,1400	100,0

Portanto, suspendeu-se a respectiva massa de amostra no determinado volume de meio de cultura, de modo a se obter a concentração desejada de íons cobre(II). Essa suspensão foi vertida nas placas de petri e, no centro da mesma, colocou-se um inóculo, com cerca de 1 cm de diâmetro, do fungo a ser testado. As placas de petri foram, então, armazenadas em estufa de germinação com fotoperíodo (Eletrolab modelo 222/4) a 25 °C. O ensaio deu-se por encerrado no momento em que o fungo ocupou toda a área superficial da placa de petri denominada como testemunha. As análises foram realizadas em triplicata.

A ação fungicida do composto é verificada através da inibição do crescimento do fungo, quando comparado àquele da testemunha. Assim, mede-se o diâmetro da área ocupada pelo fungo e subtrai-se tal valor do diâmetro da placa de petri (área total), obtendo-se assim a área não ocupada pelo fungo. Realizou-se as medidas em duplicata, procurando-se obter valores diametralmente opostos. Obteve-se uma curva dose/resposta com 4 pontos para cada fungo avaliado (3 concentrações de íons cobre(II) mais a testemunha). Os diâmetros obtidos foram

submetidos a uma análise estatística (método de Turkey – 5% probabilidade), sendo possível avaliar se os mesmos são estatisticamente distintos, ou não.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA

O método apresentado baseou-se em diversas referências, dentre elas patentes e publicações científicas e, ainda assim, se mostra único, uma vez que faz uso de silicato de sódio e um ácido orgânico fraco como fonte precursora das nanopartículas de sílica. Portanto, o método foi protocolado no INPI sob o título “*Processo de obtenção de nanoproductos a base de sílica*”⁵⁸.

As primeiras sínteses foram conduzidas a temperatura ambiente. Preparou-se uma solução de silicato de sódio a 1 % m/v e seguiu-se com a adição da solução de ácido, a temperatura ambiente e mediante agitação magnética. Foram testados vários ácidos, orgânicos e inorgânicos, em diversas concentrações, buscando a melhor alternativa para o controle da cinética de reação, de modo a se obter uma suspensão estável de nanopartículas de sílica. Mediante esse estudo, concluiu-se que quanto maior a força do ácido e maior a concentração da solução desse ácido, mais rápido é o processo de gelificação do sol de sílica; portanto a melhor alternativa é a utilização de uma solução de um ácido orgânico fraco e optou-se pelo ácido cítrico, uma vez que se trata de uma matéria prima de baixo custo, fácil manipulação e baixa periculosidade. É mais viável utilizar o ácido cítrico, quando em escala industrial, do que os ácidos comuns, como clorídrico, sulfúrico, nítrico ou acético. Assim sendo, estabeleceu-se a solução 1,0 mol L⁻¹ de ácido cítrico para ajuste de pH, de modo a se obter uma suspensão de nanopartículas de sílica estável.

Em sequência, otimizou-se a concentração da solução de silicato de sódio, fonte de silício para a síntese das nanopartículas de sílica. Primeiramente, fixou-se a concentração de 1 % m/v para essa solução, de modo a se definir o ácido mais adequado a essa síntese. Concluída essa etapa, buscou-se concentrar a solução de silicato de sódio e para tal, testou-se uma faixa de valores, variando de 1,5 %

m/v até 10 % m/v. O estudo mostrou que em qualquer concentração de silicato de sódio, acima de 1 % m/v, o processo de gelificação é rápido e de difícil controle. Portanto, optou-se por manter a concentração de 1 % m/v para a solução de silicato de sódio. Contudo, mesmo nessa concentração, a suspensão final de nanopartículas de sílica não é consideravelmente estável, permanecendo como sol somente por 6 horas – após esse período, desencadeia-se o processo de gelificação.

Neste contexto, resolveu-se avaliar o efeito da temperatura na estabilidade da suspensão de nanopartículas de sílica. Preparou-se a solução de silicato de sódio a 1 % m/v, adicionou-se a solução do ácido anteriormente definido (solução de ácido cítrico 1,0 mol L⁻¹) até que o pH dessa solução atingisse o valor 10,5. Então submeteu-se essa solução final, com pH ajustado, a refluxo por 24 h. Observou-se que, nessas condições, era possível obter-se uma suspensão de nanopartículas de sílica bastante estável, podendo ser armazenadas por meses sem que houvesse alteração significativa no diâmetro médio das partículas. Aparentemente, o aquecimento/refluxo permite a formação de partículas individuais de sílica, estabilizando a suspensão final. Tendo em vista esses resultados, tentou-se – novamente – concentrar a solução de silicato de sódio, agora submetendo o sistema a refluxo. Todavia, ainda assim, não obteve-se sucesso, sendo necessário manter a concentração de 1 % m/v.

Uma vez esgotadas as alternativas para se concentrar a suspensão de nanopartículas de sílica durante a síntese, avaliou-se a possibilidade de concentrá-la posteriormente, por processo de destilação. Submeteu-se a suspensão final de nanopartículas à remoção de água via destilação a vácuo, controlando-se o volume de água retirado do sistema. Conseguiu-se obter uma suspensão estável de nanopartículas de sílica a 3 % m/v (estabilidade esta, semelhante a da suspensão a 1% m/v), sendo que qualquer concentração superior a 3 % m/v apresentou menor estabilidade.

Sendo assim, seguiu-se com as caracterizações de ambas suspensões (a 1 % e 3 % m/v) e ambas foram processadas em *spray-dryer* (conforme descrito no item 3.3) para obtenção de amostras em fase sólida.

4.1.1. Gravimetria

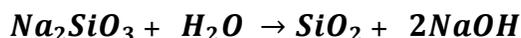
Com o intuito de estimar a massa de sílica presente em suspensão, realizou-se análises gravimétricas das suspensões de nanopartículas de sílica em ambas concentrações – 1 % e 3 % m/v. Os dados referentes a essa análise encontram-se na Tabela 7.

Como se pode observar, os valores obtidos estão acima do esperado, contudo deve-se considerar que não há somente sílica presente na suspensão. Os contra-íons sódio não são eliminados nesse processo de decomposição, o que provoca um acréscimo de massa, já que os cálculos teóricos foram realizados em função do elemento silício. Com relação ao citrato, assume-se que toda sua massa tenha sido decomposta a CO₂ e H₂O devido ao tratamento térmico a 900 °C – essa temperatura é suficiente para decompor toda matéria orgânica presente.

Tabela 7. Dados experimentais referentes à análise gravimétrica.

Concentração teórica / % m/v	Massa inicial de suspensão / g	Massa final de suspensão seca / g	Concentração real / % m/v
1,0	2,0039	0,0298	1,5
3,0	1,7426	0,0718	4,1

Considerando a estequiometria da reação geral de conversão de silicato de sódio em sílica (Equação 4), esperava-se obter cerca de 1,1 % m/v de resíduo para o primeiro caso e 3,4 % m/v, para o segundo caso, devido a massa de hidróxido de sódio produzida junto à massa de sílica.



Equação 4. Equação geral que representa a conversão do silicato de sódio em sílica.

Todavia, o valor experimental ainda mostrou-se superior ao estimado. Uma explicação para essa observação está atrelada à presença de contaminantes no silicato de sódio utilizado – matéria prima industrial. Como não se possui um certificado de análise para este reagente, torna-se difícil averiguar a veracidade dessa hipótese.

4.1.2. Avaliação de pH

Realizou-se essa análise para avaliar o pH da suspensão de nanopartículas de sílica produzida após redispersar o sólido, obtido via secagem em *spray-dryer*, em água. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de pH de soluções de sílica a 0,1 % m/v.

	pH		pH
SiO₂1150	10,5	SiO₂3150	10,4
SiO₂1180	10,3	SiO₂3180	10,3
SiO₂1200	10,4	SiO₂3200	10,4

Nota-se que, como esperado, o tratamento térmico para obtenção de nanopartículas de sílica em fase sólida não elimina os íons sódio. Isso é comprovado pelo fato de que, quando redispersa em água, as amostras sólidas geram uma suspensão com pH alcalino, o que caracteriza a presença dos íons sódio. Esse cátion metálico, quando em meio aquoso, produz hidróxido de sódio que, por sua vez, se dissocia tornando o meio alcalino.

4.1.3. Difractometria de Raios X (XRD)

Com o objetivo de avaliar a cristalinidade do material sintetizado, as amostras de sílica foram analisadas por difratometria de raios X. Como esperado, as amostras são não-cristalinas, apresentando o halo de difração típico desta substância (Figura 2).

De acordo com a literatura¹, sóis, géis, pós e vidros porosos com partículas menores que 1 μm e com área superficial superior a 3 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ são não-cristalinos. Uma vez que as amostras abordadas por este projeto foram sintetizadas via método sol-gel, o evento observado experimentalmente condiz com a literatura.

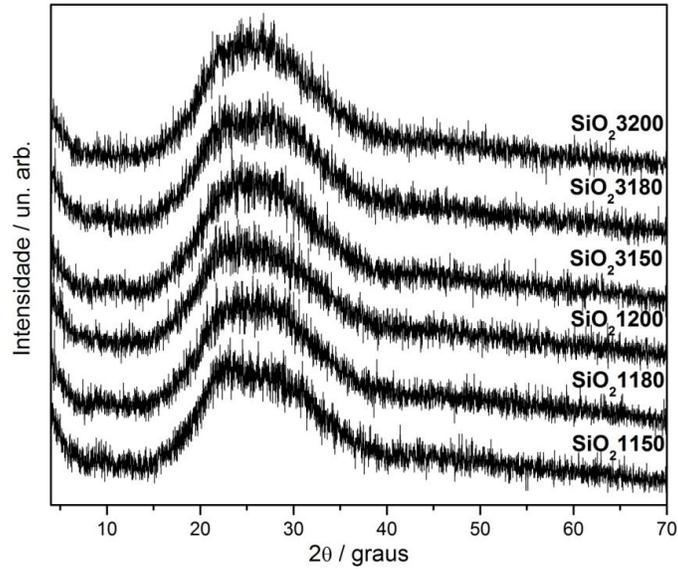


Figura 2. Difratogramas das suspensões coloidais de sílica a 1% e 3% m/v após secagem em *spray-dryer* nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.

4.1.4. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR)

As amostras em fase sólida foram analisadas por espectroscopia no infravermelho e os espectros estão dispostos na Figura 3, enquanto que as atribuições das bandas estão indicadas na Tabela 9.

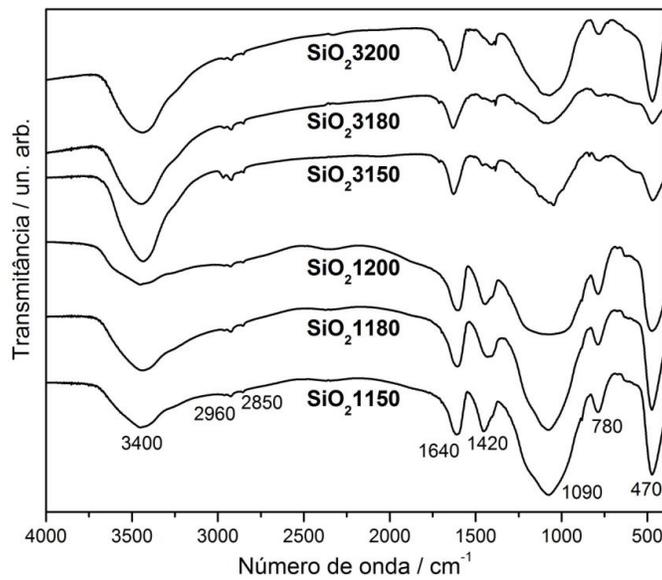


Figura 3. Espectros vibracionais na região do infravermelho das suspensões coloidais de sílica a 1% e 3% m/v após secagem em *spray-dryer* nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.

Tabela 9. Atribuições das bandas dos espectros vibracionais na região do infravermelho.

Número de onda / cm^{-1}	Atribuição
3400	ν_s (O-H) ⁵⁹
2960 e 2850	ν_s (C-H), carbono alifático ⁵⁹
1640	δ (H-O-H) ⁵⁹
1420	ν_s (CO ₂) ⁵⁹
1090	ν_{ass} (Si-O-Si) ²¹ , ν_s (Si-O) ⁶⁰
780	ν_s (Si-O-Si) ⁶¹
470	δ (Si-O-Si) ²¹

Pelos espectros no infravermelho é possível caracterizar a formação da sílica através da reação de hidrólise do silicato de sódio. Os estiramentos simétricos e assimétricos das ligações Si-O-Si podem ser claramente visualizadas, bem como a banda característica de sua deformação, conforme disposto na Tabela 9. Na região de 2960 e 2850 cm^{-1} observam-se bandas fracas, características de estiramento C-H, proveniente do ácido cítrico. Em 1420 cm^{-1} pode-se observar uma banda levemente desdobrada, característica de estiramento simétrico de COO⁻ de ácidos carboxílicos.

4.1.5. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) – Raio hidrodinâmico das partículas

A técnica de espalhamento de luz dinâmico determina o raio hidrodinâmico das partículas suspensas em um meio líquido relacionando-o ao movimento Browniano das mesmas. Aplicando a equação de Einstein-Stokes, obtêm-se uma boa estimativa do raio/diâmetro das partículas através dessa técnica.

Assim sendo, estimou-se o tamanho das nanopartículas de sílica sintetizadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico. Tanto a suspensão coloidal, quanto as amostras processadas em *spray-dryer*, redispersas em água a uma concentração de 0,1 % m/v, foram analisadas e os resultados obtidos estão dispostos nas Figura 4 e Figura 5, respectivamente.

Com relação à suspensão coloidal, estudou-se a estabilidade das nanopartículas em função do tempo. Armazenou-se uma alíquota da suspensão, após reação em refluxo, em condições ambiente e seguiu-se com sua análise mês a mês, até completar 90 dias. Como se pode observar pelos gráficos da Figura 4, não houve alteração significativa no seu raio hidrodinâmico, o que permite concluir

que o diâmetro das partículas não foi alterado significativamente, portanto trata-se de uma suspensão coloidal estável.

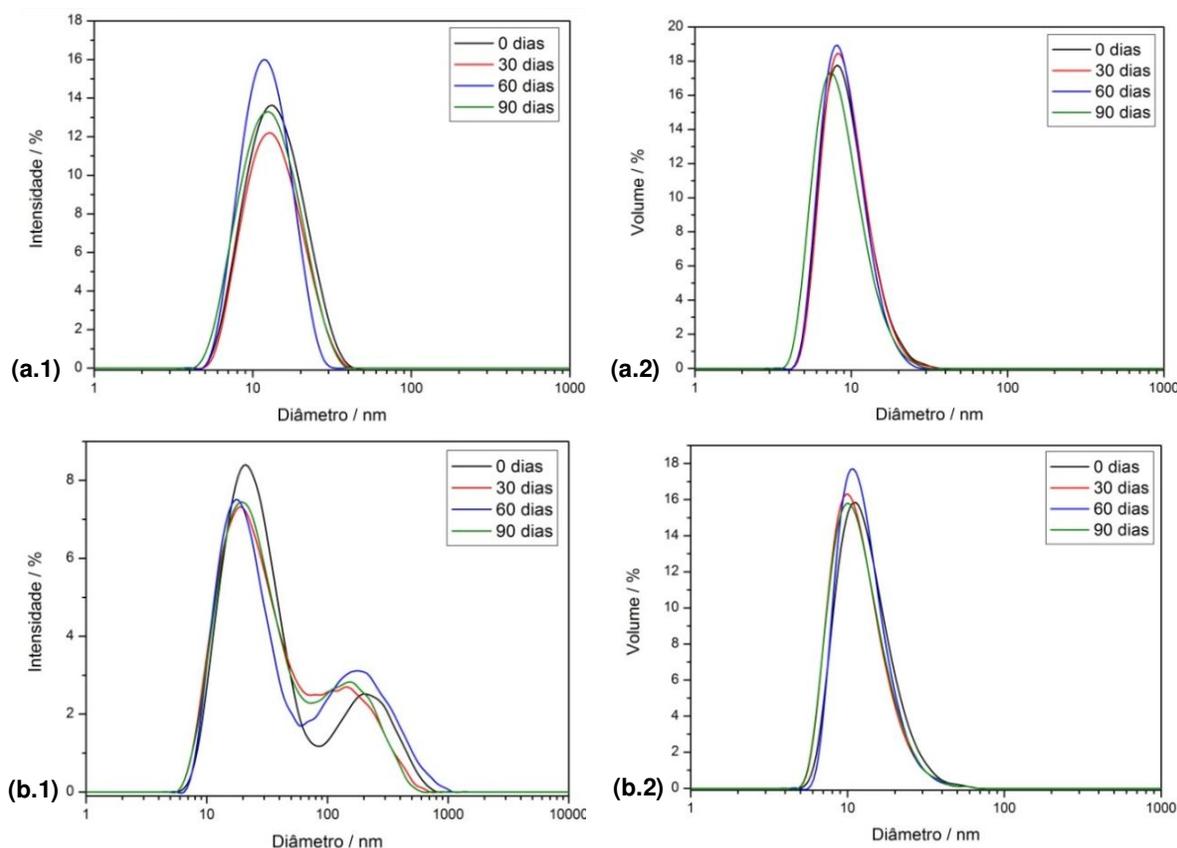


Figura 4. Distribuição do raio hidrodinâmico das partículas presentes na suspensão coloidal de sílica: (a) 1 % m/v e (b) 3 % m/v, sendo que a condição (a.1) e (b.1) referem-se às análises por intensidade e (a.2) e (b.2), volume.

Tabela 10. Raio hidrodinâmico das nanopartículas de sílica presentes na suspensão coloidal – diâmetro médio e moda das distribuições apresentadas na Figura 4.

Suspensão de nanopartículas de sílica	Tempo de armazenagem	Diâmetro médio / nm	Moda / nm	
			Intensidade*	Volume
1 % m/v	0 dias	15,0	13,2	8,1
	30 dias	14,3	12,8	362,9
	60 dias	11,8	11,7	8,0
	90 dias	12,0	12,3	7,5
3 % m/v	0 dias	24,4	21,0	212,8
	30 dias	24,2	19,0	142,9
	60 dias	24,6	18,1	177,3
	90 dias	27,0	19,3	152,8

*As amostras que apresentam dois valores possuem distribuição bimodal, portanto foi indicada a moda das duas famílias.

Tanto na Figura 4 quanto na Tabela 10 apresenta-se uma estimativa do diâmetro das partículas em função de intensidade e de um segundo parâmetro, o volume. O equipamento utilizado possibilita uma avaliação mais detalhada da amostra, oferecendo algoritmos capazes “excluir” a população de partículas menos significativas, gerando essa análise por volume. Portanto, o resultado desta análise expressa a população de partículas mais significativa na suspensão analisada o que, neste caso, é composta pelas partículas de menor raio hidrodinâmico.

Tabela 11. Raio hidrodinâmico das amostras processadas em *spray-dryer* e redispersas em água a 0,1 % m/v – diâmetro médio e moda das distribuições apresentadas na Figura 5.

Suspensão de nanopartículas de sílica	Temperatura de tratamento no <i>spray-dryer</i> / °C	Diâmetro médio / nm	Moda / nm		
			Intensidade*	Volume	
1 % m/v	150	16,6	15,4	234,0	8,2
	180	22,1	10,9	91,1	7,3
	200	25,3	10,8	85,3	8,1
3 % m/v	150	35,4	15,8	86,4	9,4
	180	54,8	20,4	144,8	8,2
	200	29,6	14,6	67,9	9,4

**As amostras que apresentam dois valores possuem distribuição bimodal, portanto foi indicada a moda das duas famílias.*

Apenas a suspensão coloidal de sílica a 3 % m/v apresenta distribuição bimodal, a suspensão a 1 % m/v apresenta uma única família de partículas em ambas condições (análise por intensidade e por volume) - Figura 4. Em contrapartida, quando a suspensão coloidal é submetida ao processo de secagem por *spray-dryer* e prepara-se uma suspensão com essas partículas secas, observa-se distribuição bimodal para todas as amostras quando analisadas por intensidade (Figura 5 a.1 e b.1). Todavia, ainda assim, a população com menor raio hidrodinâmico prevalece, conforme pode-se observar pelos resultados das análises por volume (Figura 5 a.2 e b.2). Portanto, a secagem da solução induz processos de aglomeração, todavia a maioria das partículas são passíveis de serem redispersas, retomando o raio hidrodinâmico original.

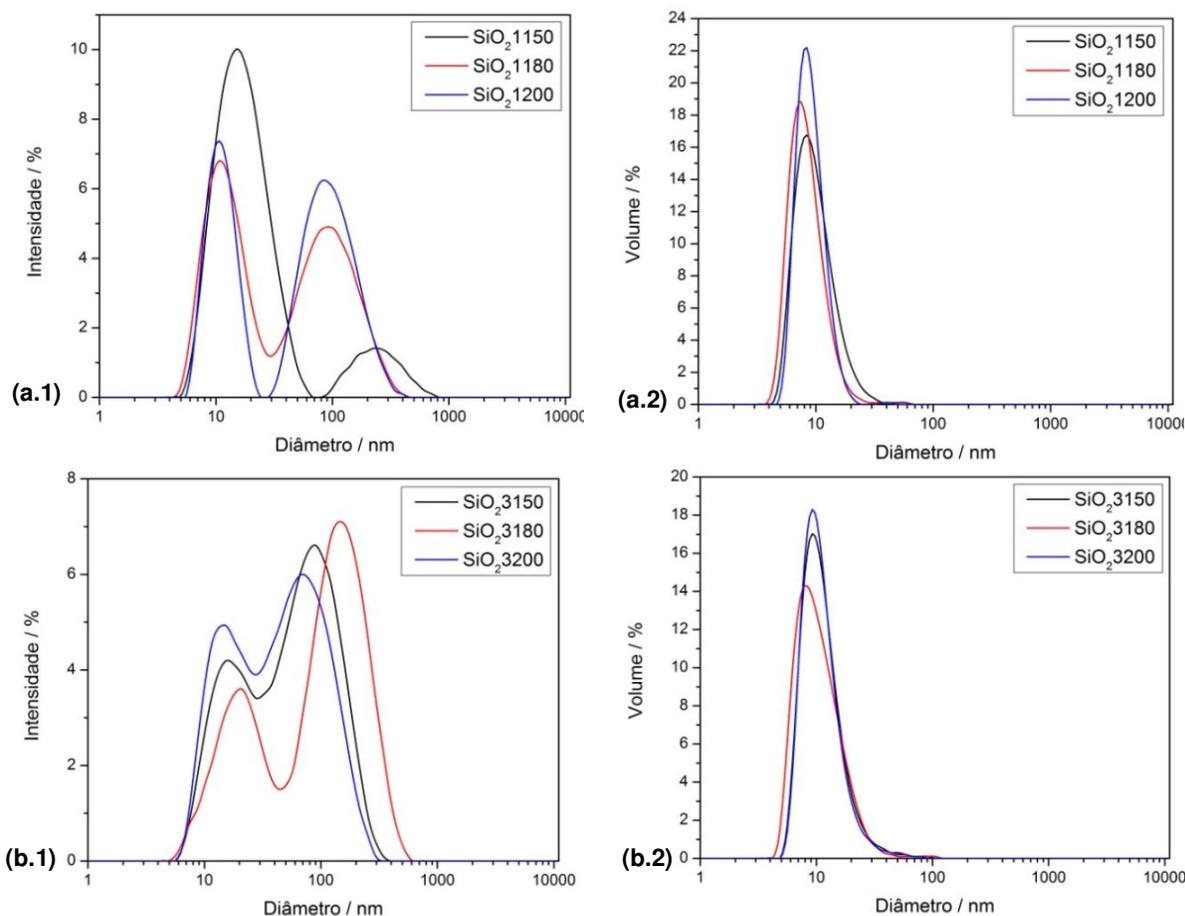


Figura 5. Distribuição do raio hidrodinâmico das partículas de sílica: (a) 1 % m/v e (b) 3 % m/v processadas em *spray-dryer* e redispersas em água, sendo que a condição (a.1) e (b.1) referem-se às análises por intensidade e (a.2) e (b.2), volume.

É válido ressaltar que o diâmetro médio das partículas, após processamento em *spray dryer*, segue uma tendência de aumentar conforme aumenta-se a temperatura do tratamento térmico. Essa tendência é observada para todas as amostras, com exceção à última – SiO₂3200. Portanto, não é possível afirmar que o aumento de temperatura, durante a secagem das amostras, induz a formação de partículas com maior raio hidrodinâmico.

Outra observação pertinente é com relação às concentrações das amostras de sílica *versus* a intensidade das populações de partículas. Nota-se que nas suspensões preparadas com as amostras SiO₂1150, SiO₂1180 e SiO₂1200 a população de partículas com menor raio hidrodinâmico é mais intensa do que àquelas com maior raio hidrodinâmico, sendo esta observação mais evidente para a amostra SiO₂1150. O oposto ocorre com as suspensões das amostras

SiO₂3150, SiO₂3180 e SiO₂3200, onde a intensidade de espalhamento das populações de partícula com maior raio hidrodinâmico supera àquelas com valor inferior. Todavia, quando se avalia as amostras em função do volume, observa-se que as nanopartículas ainda são predominantes na suspensão, o que indica uma boa redispersão das amostras.

4.1.6. Espalhamento de Luz Dinâmico – Potencial Zeta

O potencial zeta de uma suspensão é dado em função do potencial elétrico presente na superfície das partículas, sendo este induzido pela presença de íons e contra-íons que se aloca ao redor das partículas presentes na suspensão. Uma vez que a carga líquida presente na superfície de uma partícula orienta, por indução, os demais íons presentes no meio, forma-se uma dupla camada elétrica ao redor de cada partícula, sendo que esta pode ser dividida em duas partes: uma região mais interna, denominada camada de Stern, onde os íons interagem fortemente com a superfície da partícula; e uma região mais externa, denominada camada difusa, onde os íons interagem de uma forma menos intensa. Há um limite, dentro da camada difusa, onde a interação entre os contra-íons e a superfície da partícula é forte o suficiente a ponto de formar um único sistema – qualquer íon além desse limite não é carregado junto à partícula quando a mesma se move. Esse limite é conhecido como superfície de cisalhamento hidrodinâmico e o potencial que existe nesta região é denominado potencial zeta.

A Figura 6 apresenta os gráficos de potencial zeta tanto para as suspensões coloidais de sílica, na concentração de 3 % m/v (uma vez que a 1 % m/v não atinge a sensibilidade para análise no equipamento em questão), quanto para as suspensões preparadas a partir das amostras secas por *spray-dryer*. A moda das distribuições apresentadas na Figura 6 encontra-se disposta na Tabela 12, permitindo uma melhor análise de tais valores.

Tabela 12. Moda das distribuições de potencial zeta apresentadas na Figura 6.

Amostras	Potencial Zeta / mV	Amostras	Potencial Zeta / mV
Suspensão 1 % m/v	-	Suspensão 3 % m/v	-28,3
SiO ₂ 1150	-33,4	SiO ₂ 3150	-30,9
SiO ₂ 1180	-35,1	SiO ₂ 3180	-30,9
SiO ₂ 1200	-37,2	SiO ₂ 3200	-34,3

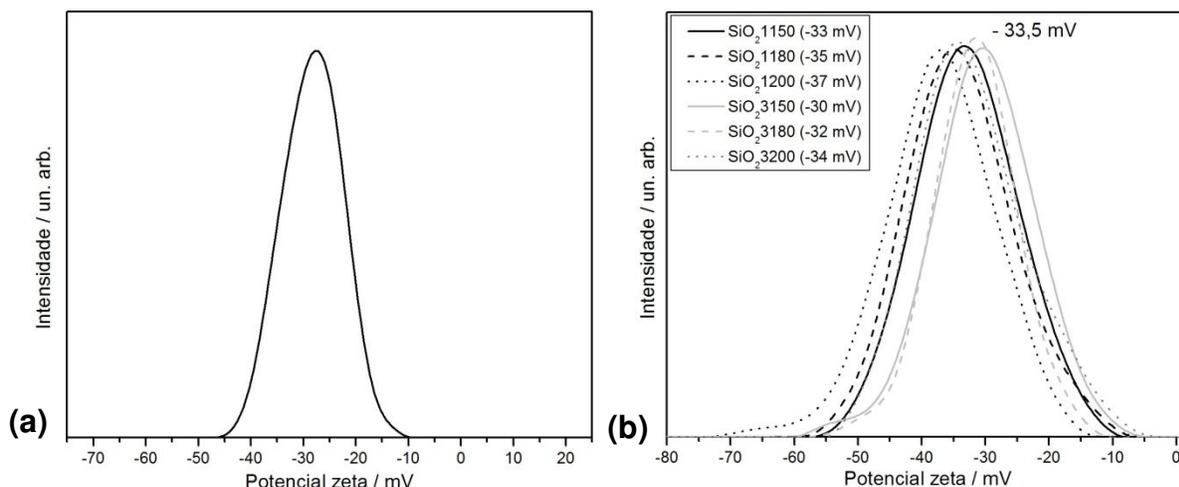


Figura 6. Gráficos de distribuição do potencial zeta referentes às suspensões de (a) sílica 3 % m/v e (b) sílica a partir das amostras secas em *spray-dryer*.

Nota-se que as nanopartículas de sílica apresentam um potencial zeta negativo, sendo este pouco alterado após a secagem das amostras por *spray-dryer* e resuspensão das mesmas em água. Outro ponto a destacar é a estabilidade da suspensão coloidal. A literatura⁶² apresenta estudos de suspensões coloidais de sílica estáveis, sem prévia funcionalização, cujo potencial zeta, em pH 10, é de -40 mV. As suspensões aqui preparadas apresentam potencial zeta próximo a -35 mV, bastante próximo ao já reportado, e se mostram estáveis por longos períodos.

4.1.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (FEG-SEM)

Realizou-se análise de microscopia eletrônica de varredura com o intuito de avaliar a morfologia das partículas sintetizadas. Na Figura 7 são mostradas as imagens referentes às suspensões coloidais de sílica, nas concentrações de 1 % e 3 % m/v. Já na Figura 8 encontram-se as microscopias referentes às amostras de sílica processadas em *spray-dryer* nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.

As nanopartículas de sílica, presentes na suspensão coloidal, mostram morfologia esferoidal, com diâmetro próximo ao previsto pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS). Depois de secas em *spray-dryer*, percebe-se que as partículas se aglomeraram.

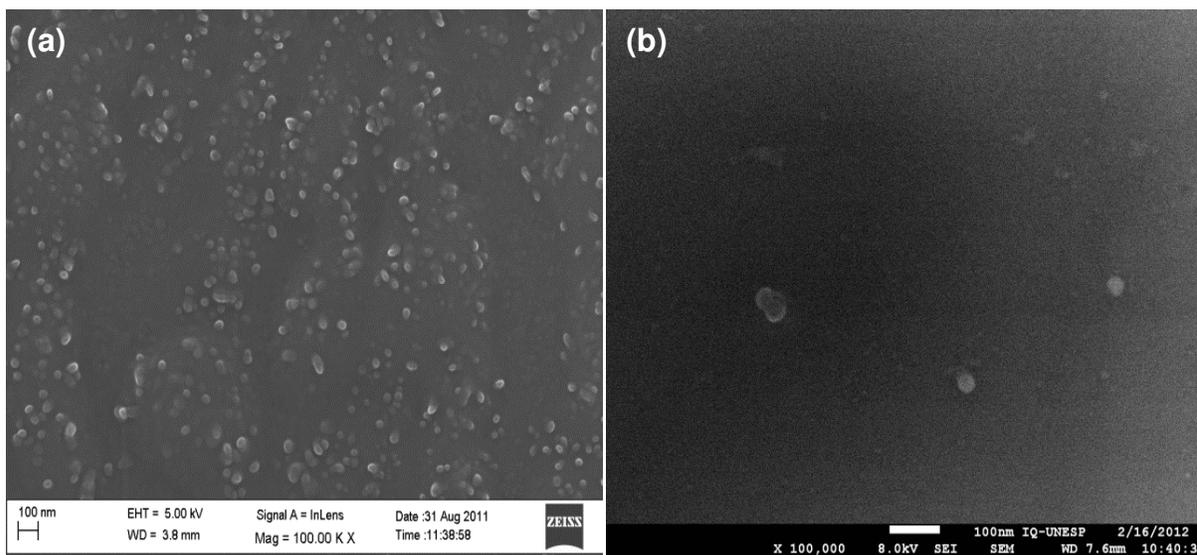


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura das suspensões coloidais de sílica: (a) 1 % m/v e (b) 3 % m/v.

Portanto, concluí-se que foi possível sintetizar as nanopartículas de sílica via método sol-gel. A suspensão final mostrou-se estável. As nanopartículas de sílica preparadas através do método aqui descrito apresentam um diâmetro médio de 10 nm, morfologia esferoidal, são não-cristalinas e, após processo de secagem – em diversas temperaturas – sofrem processos de aglomeração, o que provoca um aumento no diâmetro médio das partículas.

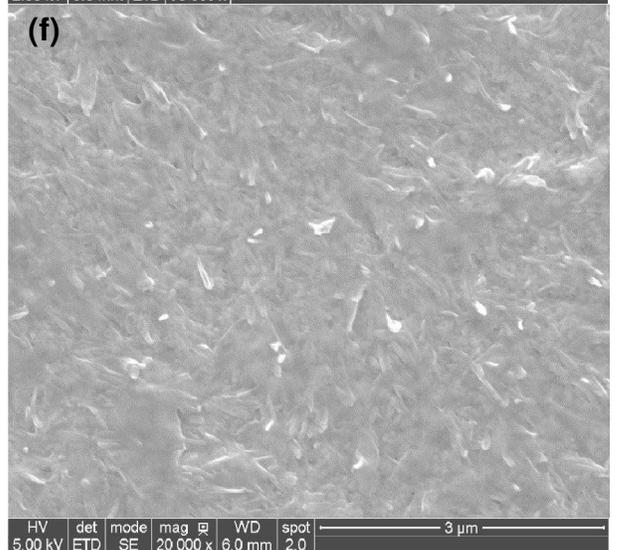
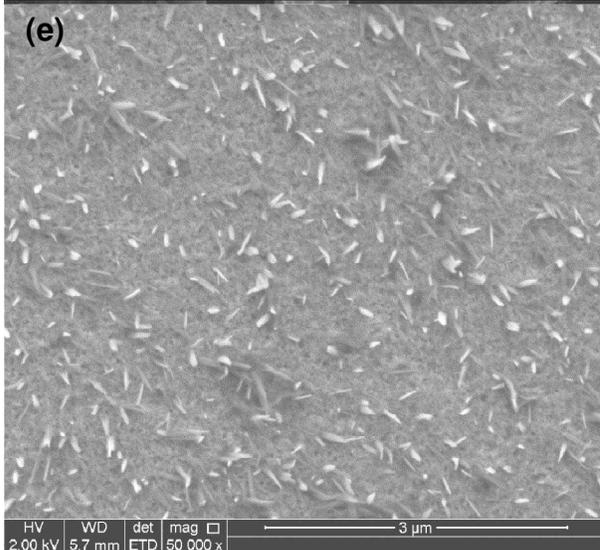
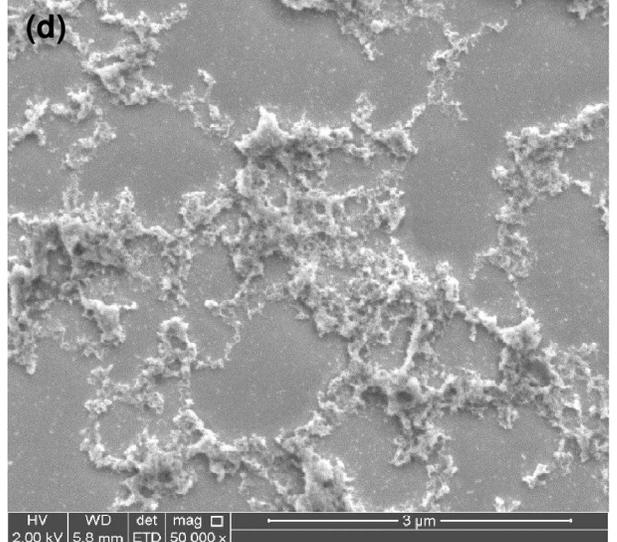
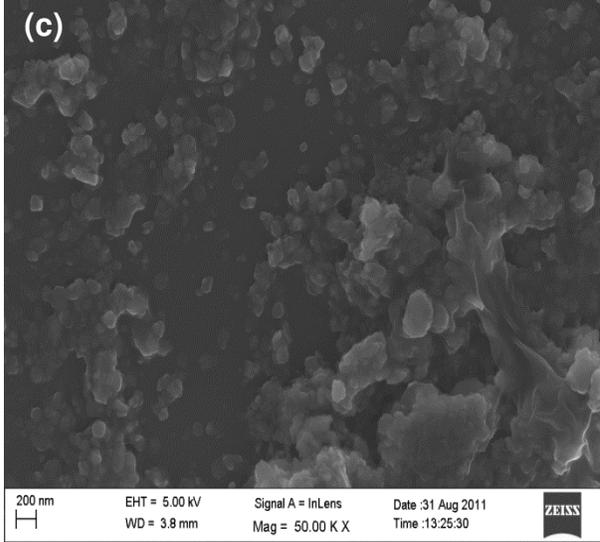
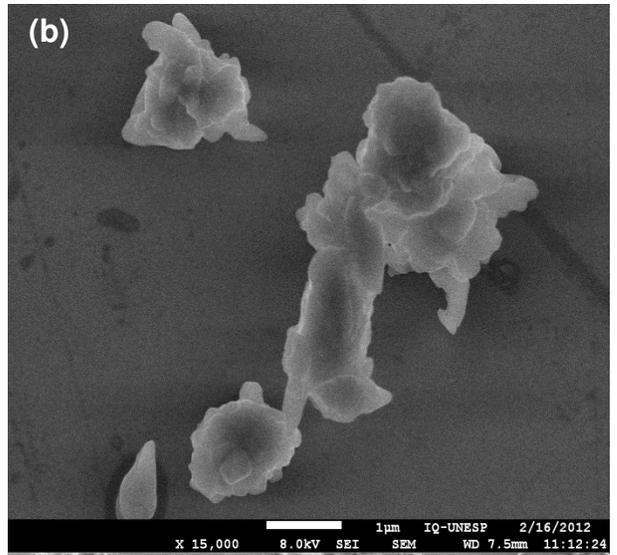
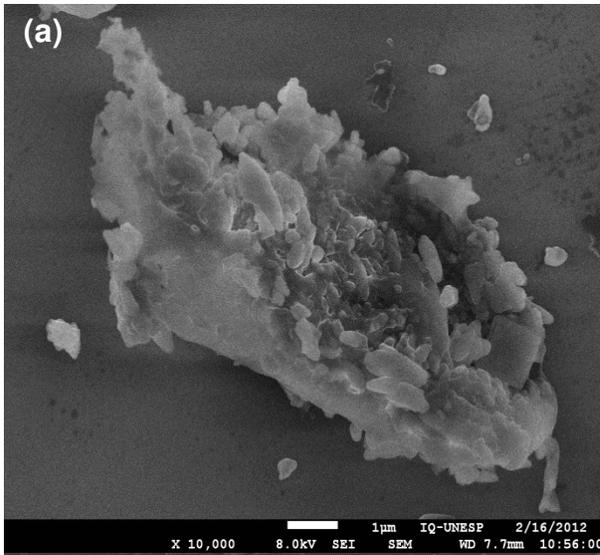


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura das suspensões em água das amostras (a) SiO₂1150, (b) SiO₂1150, (c) SiO₂1200, (d) SiO₂3150, (e) SiO₂1180 e (f) SiO₂1200.

4.2. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA CONTENDO ÍONS COBRE(II)

Como segunda parte do projeto, estudou-se a adsorção de íons cobre(II) na superfície das nanopartículas de sílica previamente sintetizadas. É sabido que compostos de cobre apresentam atividade fungicida/bactericida, portanto buscou-se desenvolver uma matriz de sílica para adsorver tais íons e averiguar a atividade biológica deste sistema final (nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) adsorvidos).

Segundo a literatura¹, íons cobre(II) são adsorvidos à superfície de partículas de sílica a partir de pH 4,0, sendo máxima a adsorção em pH acima de 8,0. Todavia, íons cobre(II) precipitam na forma de hidróxido a partir de pH 9,0. Assim sendo, a adsorção desses íons na superfície das partículas de sílica não pode ser conduzida em pH 9,0 ou acima, pois nesse caso os íons precipitarão aos invés de se adsorverem à superfície das partículas.

A suspensão coloidal de sílica preparada na primeira parte do projeto apresenta comportamento de sistema sol-gel, portanto as partículas de sílica se “polimerizam” a partir de um determinado valor de pH, intensificando-se conforme aproxima-se de pH 7,0, o que causa a gelificação do sistema. Deste modo, buscou-se encontrar um ponto ótimo para a adsorção dos íons cobre(II) nas nanopartículas de sílica, uma condição em que ocorra a adsorção dos íons cobre(II) sem que haja a precipitação dos mesmos na forma de hidróxido e em um valor de pH em que as reações de condensações – que reticulam as cadeias de ácido polissilícico – sejam lentas.

4.2.1. Estudos de gelificação em função do pH

De modo a se determinar a condição ótima para adsorção dos íons cobre(II) na superfície das nanopartículas de sílica, avaliou-se o tempo de gelificação da suspensão de sílica coloidal em diversos valores de pH. Os resultados encontram-se na Tabela 13. Como a suspensão coloidal se encontrava inicialmente em pH 10,6, ajustou-se o pH com ácido cítrico 1 mol L⁻¹ até os valores indicados na Tabela 13.

Este estudo foi conduzido apenas com a suspensão coloidal a 1% m/v, pois, num teste prévio, notou-se que a suspensão a 3% m/v gelifica imediatamente após a adição do cloreto de cobre(II), quando em pH 8,0. Esse processo intenso de polimerização comprometeria o processamento das amostras em *spray-dryer*, podendo entupir o bico do equipamento. Assim, focou-se na suspensão coloidal a 1% m/v para adsorver os íons cobre(II).

Como esperado, observa-se que próximo a pH 7,0, o processo de gelificação ocorre mais rapidamente, portanto ter-se-á que manter a solução num pH ácido ou básico, para minimizar as reações de condensação entre as partículas de sílica. Com base nos dados já apresentados, optou-se por ajustar o pH da suspensão de nanopartículas de sílica em 8,0 para, então, adicionar o sal de cobre e seguir com as caracterizações. A partir desse ponto, seguiu-se com o procedimento conforme descrito no item 3.2.2.

Tabela 13. Estudo de gelificação do sol de sílica obtido via refluxo.

Valores de pH teóricos	Valores de pH ajustados	Tempo de gelificação
4,5	4,52	Não gelificou em 5 h
5,0	5,07	Não gelificou em 6 h
5,5	5,54	6 h
6,0	5,90	4 h
6,5	6,35	2 h
7,0	6,79	2 h
7,5	7,57	7 h
8,0	7,85	Não gelificou em 6 h

4.2.2. Adsorção dos íons metálicos na superfície da sílica

O intuito do presente trabalho é desenvolver um composto fungicida/bactericida a base de cobre, que apresente atividade biológica e seja economicamente viável para produção em escala industrial; além de ser produzido a partir de um processo sustentável, que não demande uso de solventes orgânicos e/ou outras substâncias que apresentem periculosidade ao manipulador. Portanto, optou-se por tentar adsorver os íons cobre(II) na superfície das nanopartículas de sílica tal qual, sem prévia funcionalização dos grupos silanóis, por exemplo.

A adição dos íons cobre(II) ao sistema foi realizada a partir da dissociação de um sal de cobre solúvel em meio aquoso. Trabalhou-se com o cloreto de cobre(II) nas concentrações de 1, 5 e 10 mol% em relação à sílica (SiO_2), todavia essa última concentração (10 mol%) inviabilizou o processamento no *spray-dryer*, uma vez que essa quantidade superior de íons cobre em solução acelerou o processo de gelificação.

Portanto, preparou-se as nanopartículas de sílica conforme exposto anteriormente; então ajustou-se o pH da suspensão final para 8,0, com auxílio de uma solução de ácido cítrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e, por fim, adicionou-se a massa correspondente de cloreto de cobre(II), de modo a se obter as amostras indicadas na Tabela 4. A suspensão coloidal de sílica, após a adição do sal de cobre(II), gelifica em pouco mais de 1 h; assim sendo, há tempo suficiente para processar essas amostras em *spray-dryer*, todavia não é possível armazená-las na forma líquida, devido sua baixa estabilidade.

4.2.3. Fluorescência de Raios X (XRF)

As amostras contendo os íons cobre(II) foram preparadas de modo a se obter as concentrações de 1 e 5 mol% de íons cobre(II) em relação à quantidade (em mols) de sílica em suspensão, sendo que estes foram estimados pela concentração da suspensão coloidal – 1% m/v de SiO_2 .

A Tabela 14 apresenta os valores de cobre(II) – estimado e experimental – para cada amostra e pode-se observar que não houve perda significativa do metal durante o processo de secagem em *spray-dryer* nas diversas temperaturas. Os desvios observados entre os valores podem ser atribuído à pureza do material e/ou erros experimentais durante a preparação das amostras.

Sendo a fluorescência de raios X uma técnica quantitativa, utilizou-se a concentração de cobre(II) indicada por essa análise para preparar-se as suspensões utilizadas nos ensaios de atividade biológica (item 3.5).

Tabela 14. Quantificação de íons cobre(II) nas amostras de nanopartículas de sílica, processadas em *spray-dryer* nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.

	Cu(II) % m/ m – Valor calculado	Cu(II) % m/ m – Valor experimental
SiO₂1Cu1150	1,06	0,99
SiO₂1Cu1180	1,06	1,02
SiO₂1Cu1200	1,06	1,05
SiO₂1Cu5150	5,28	3,99
SiO₂1Cu5180	5,28	4,27
SiO₂1Cu5200	5,28	4,31

4.2.4. Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios X (SEM-EDS)

Com o objetivo de verificar a distribuição dos íons cobre(II) sobre a superfície das nanopartículas de sílica, realizou-se análises de EDS em todas as amostras contendo cobre(II). Os valores obtidos para cada amostra, em porcentagem de massa, estão dispostos na Tabela 15.

Tabela 15. Porcentagem, em massa, dos elementos químicos caracterizados por EDS, desconsiderando contaminantes e subprodutos.

	% m/m					
	SiO₂1Cu1150	SiO₂1Cu1180	SiO₂1Cu1200	SiO₂1Cu5150	SiO₂1Cu5180	SiO₂1Cu5200
<i>O</i>	47,52	48,90	50,49	45,73	51,81	49,05
<i>Na</i>	17,21	15,46	14,31	14,59	12,63	12,87
<i>Si</i>	32,77	33,17	32,98	29,15	26,44	27,76
<i>Cl</i>	1,46	1,51	1,21	6,08	4,96	5,44
<i>Cu</i>	1,04	0,96	1,01	4,46	4,16	4,88
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Os teores de cobre(II) caracterizados por essa técnica foram muito próximos àqueles quantificados pela fluorescência de raios X. Pela análise de SEM-EDS também pode-se averiguar a homogeneidade dos íons metálicos sobre a superfície das nanopartículas de sílica e concluiu-se que os íons cobre(II) encontram-se uniformemente distribuído pela amostra.

4.2.5. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR)

A Figura 9 apresenta o espectro na região no infravermelho das amostras de sílica contendo íons cobre(II). Comparando-a com a Figura 3, nota-se que as bandas na região de 1400 e 1090 cm⁻¹ se desdobraram. Pode-se observar também bandas na região de 975 e 605 cm⁻¹. A Tabela 16 mostra as atribuições das bandas presentes no espectro da Figura 9.

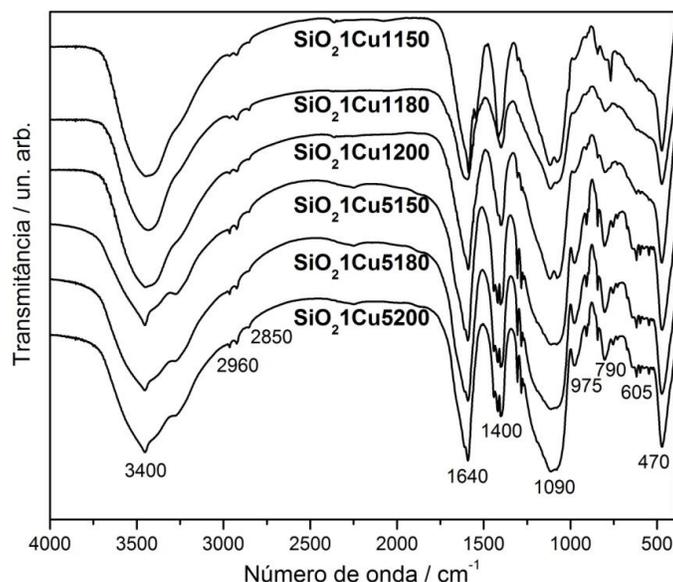


Figura 9. Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras de nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) a 1 e 5 mol%, após secagem em *spray-dryer* nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C.

Tabela 16. Atribuições das bandas dos espectros vibracionais na região de infravermelho.

Número de onda / cm ⁻¹	Atribuição
3400	ν_s (O-H) ⁵⁹
2960	ν_{ass} (H-C-H), carbono alifático ⁵⁹
2850	ν_s (C-H), carbono alifático ⁵⁹
1640	δ (H-O-H) ⁵⁹
1400	ν_s (CO ₂) ⁵⁹
1090	ν_{ass} (Si-O-Si) ⁶¹
975	ν_s (Si-O) ⁶⁰
790	ν_s (Si-O-Si) ⁶¹
605	ν_s anéis polissiloxanos ⁶³
470	δ (Si-O-Si) ^{1,61}

Os desdobramentos observados nas bandas em 1400 e 1090 cm⁻¹ podem ser atribuídos ao fato de que, na presença de íons cobre(II) na superfície das nanopartículas, menos grupos silanóis encontram-se disponíveis para interagir via ligação de hidrogênio – interação intermolecular responsável pelo alargamento de bandas nos espectros vibracionais na região de infravermelho. A banda em 1090 cm⁻¹ é atribuída a estiramentos assimétricos Si-O-Si, enquanto que a banda em 1400 cm⁻¹ é característica de estiramento simétrico de carboxilas (COO⁻).

Já a banda observada em 605 cm⁻¹ é atribuída a estiramento de anéis polissiloxanos. Através de uma análise cautelosa da Figura 3 nota-se que essa banda também estava presente em tais espectros, porém com menor intensidade.

Portanto, concluí-se que, assim como para as bandas em 1400 e 1090 cm^{-1} , a inserção de íons cobre(II) no sistema minimizou as interações por ligação de hidrogênio, possibilitando uma melhor caracterização dessa banda.

A literatura⁶⁰ apresenta que estiramentos de ligações Si-O^- podem se apresentar em quatro regiões distintas, em função da quantidade de oxigênios terminais:

- Quatro oxigênios terminais (SiO_4^{4-}): $\sim 850 \text{ cm}^{-1}$
- Três oxigênios terminais ($\text{Si}_2\text{O}_7^{6-}$): $\sim 900 \text{ cm}^{-1}$
- Dois oxigênios terminais ($\text{Si}_3\text{O}_9^{6-}$): 950 – 1000 cm^{-1}
- Um oxigênio terminal (Si-O^-): 1050 – 1100 cm^{-1}

Comparando-se o espectro da Figura 3 (sílica sem íon metálico) com o da Figura 9 (sílica contendo íon metálico), nota-se que a adição dos íons cobre(II) ao sistema permitiu uma melhor resolução de muitas bandas, incluindo bandas nas regiões de oxigênios terminais. Com base nessas observações, pode-se inferir que, de fato, a presença do íon cobre(II) no sistema reduz as interações do tipo ligações de hidrogênio, resolvendo as bandas características de estiramento simétrico Si-O . Uma vez que existem oxigênios terminais “livres” e adicionou-se um cátion de carga 2+ à suspensão, espera-se que esse íon interaja com a superfície da sílica (através dos oxigênios terminais desprotonados), adsorvendo-se a ela.

4.2.6. Espalhamento de Luz Dinâmico – Potencial Zeta

As amostras contendo íons cobre(II) não puderam ter seu diâmetro estimado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Devido à presença do íon cobre(II), a amostra adquire uma coloração azul/esverdeada, bem como a suspensão gerada pela dispersão destes sólidos em água; uma vez que o equipamento utiliza um laser vermelho (630 nm) para realizar as medidas, ocorre a absorção da radiação, comprometendo os resultados das análises. Todavia, as análises de potencial zeta não foram prejudicadas.

A Figura 10 apresenta as curvas de distribuição do potencial zeta das amostras de sílica contendo íons cobre(II) após secagem em *spray-dryer*, nas temperaturas de 150, 180 e 200 °C; enquanto que a Tabela 17 dispõe os valores médios de cada uma das curvas.

Tabela 17. Valor médio do potencial zeta das suspensões preparadas com as amostras de sílica contendo íons cobre(II).

	Potencial Zeta / mV		Potencial Zeta / mV
SiO₂1Cu1150	-41,5	SiO₂1Cu5150	-36,3
SiO₂1Cu1180	-45,2	SiO₂1Cu5180	-33,5
SiO₂1Cu1200	-42,4	SiO₂1Cu5200	-32,1

Observa-se que a adição dos cátions metálicos ao sistema desloca o valor do potencial zeta para valores mais negativos quando comparado ao potencial zeta das amostras de nanopartículas de sílica sem íons cobre(II).

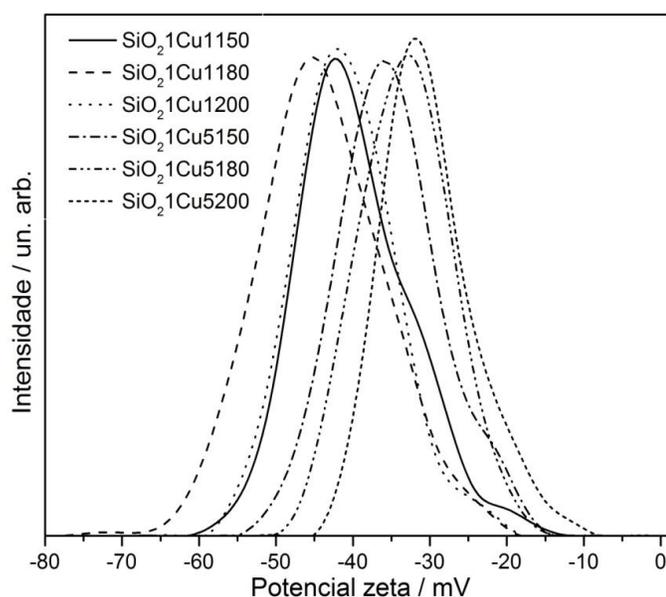


Figura 10. Distribuição de potencial zeta referentes às suspensões preparadas com as amostras de sílica contendo íons cobre(II).

4.2.7. Difratometria de Raios X (XRD)

Os difratogramas apresentados na Figura 2 mostraram que a matriz de sílica é não-cristalina. Na Figura 11 estão dispostos os difratogramas das amostras contendo íons cobre(II) nas concentrações de 1 e 5 mol% em comparação aos

difratogramas padrões de citrato de sódio e cloreto de sódio. Por análise comparativa, concluí-se que o composto formado na matriz de sílica é uma mistura dessas substâncias.

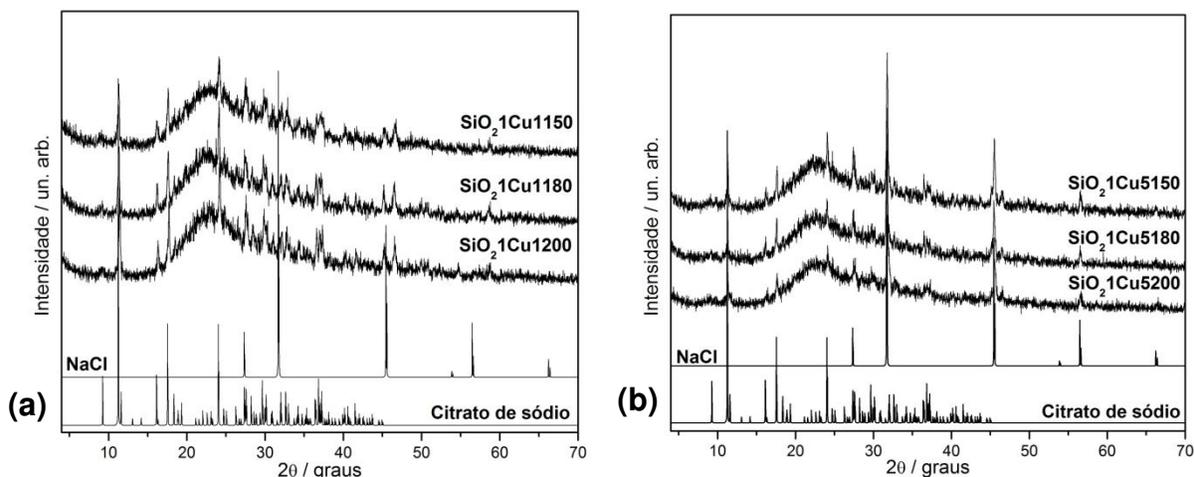


Figura 11. Amostras de sílica contendo íons cobre(II): (a) 1 mol% e (b) 5 mol% secas por *spray-dryer* em diferentes temperaturas. JCPDS citrato de sódio: 16-1170 e JCPDS cloreto de sódio: 5-628.

O aparecimento dos picos referentes ao cloreto de sódio somente nos difratogramas das amostras contendo os íons cobre(II) pode ser justificado pelo fato de que, antes da adição do sal de cobre (cloreto de cobre(II)), não haviam ânions cloreto disponíveis no meio, portanto não havia a possibilidade de se formar cloreto de sódio. Todavia, seguindo esse raciocínio, os picos referentes ao citrato de sódio deveriam ter aparecido nos difratogramas das amostras de sílica sem íons cobre(II), uma vez que naquelas amostras já era possível se formar esse sal a partir da reação do ácido cítrico com o cátion sódio, advindo do silicato de sódio. Porém, isso não foi observado.

Uma hipótese para explicar esse evento se baseia na concentração de ácido cítrico adicionado às amostras. No caso das nanopartículas de sílica sem íons cobre(II), o volume de ácido adicionado ao sistema é baixo. Já nas amostras de nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) a concentração de ácido cítrico é superior, visto que se faz necessário ajustar o pH da suspensão de sílica coloidal antes da adição do sal de cobre. Sabendo-se que a técnica de difratometria de

raios X apresenta certo limite de detecção e que, abaixo de tal concentração o equipamento não é capaz de detectar o composto, acreditou-se que essa era a razão pela qual os picos referentes ao citrato de sódio não se fazem presentes nos difratogramas da Figura 2.

Na tentativa de se confirmar esta hipótese, processou-se no *spray-dryer* uma amostra da suspensão coloidal de sílica com pH ajustado em 8,0, utilizando-se a mesma solução de ácido cítrico 1,0 mol L⁻¹. O difratograma obtido encontra-se exposto na Figura 12.

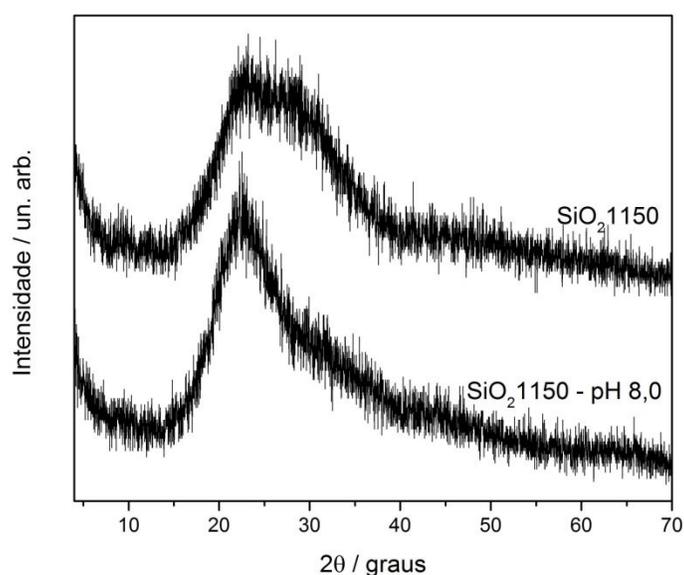


Figura 12. Difratograma comparativo entre as suspensões de nanopartículas de sílica processadas em *spray-dryer* com diferentes valores de pH.

Ao contrário do suposto, a concentração superior de ácido cítrico na suspensão de nanopartículas de sílica não induz a aparição dos picos referentes ao citrato de sódio no difratograma. Portanto, de alguma forma, tais picos também estão relacionados à adição de cobre no meio.

Neste contexto, pode-se supor que quando os íons cobre(II) não estão presentes no sistema, os íons citrato se coordenam à superfície das nanopartículas de sílica, juntamente com os íons sódio. Contudo, após adição dos íons cobre(II) à suspensão coloidal, ocorre um rearranjo na composição da superfície das partículas de sílica, sendo que os cátions Cu²⁺ interagem

preferencialmente à superfície das nanopartículas e, portanto, observa-se a formação de citrato de sódio e cloreto de sódio junto às nanopartículas de sílica, após processo de secagem em *spray-dryer*.

4.2.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (FEG-SEM)

A análise das imagens obtidas através de FEG-SEM indica que a inserção dos íons cobre(II) no sistema favorece a formação de partículas esferoidais, mesmo após o processo de secagem por *spray-dryer*. Analisando a Figura 13 observa-se, em geral, um crescimento considerável no tamanho das partículas, mas ainda assim se encontram presentes partículas na escala nanométrica (amostras SiO₂1Cu1200 e SiO₂1Cu5180). Portanto, pode-se concluir que a secagem em *spray-dryer* – para as amostras contendo íons cobre(II) – induz processos de aglomeração e coalescência, todavia algumas nanopartículas são passíveis de serem redispersas em água, retomando a escala original.

4.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1. Bactérias

O ensaio foi conduzido com as bactérias *Xanthomas axonopodis* e *Ralstonia solanacearum*, sendo que estes dois patógenos foram selecionados devido à importância das doenças causadas por eles no campo.

Assim, avaliou-se a atividade bactericida do sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra esse patógeno, em comparação a um produto comercial padrão. Nas Figura 15 e Figura 15 encontram-se expostas as imagens do ensaio de atividade biológica, enquanto que na Tabela 18 está apresentada a análise estatística do halo de inibição, causado pela presença da determinada concentração de íons cobre(II).

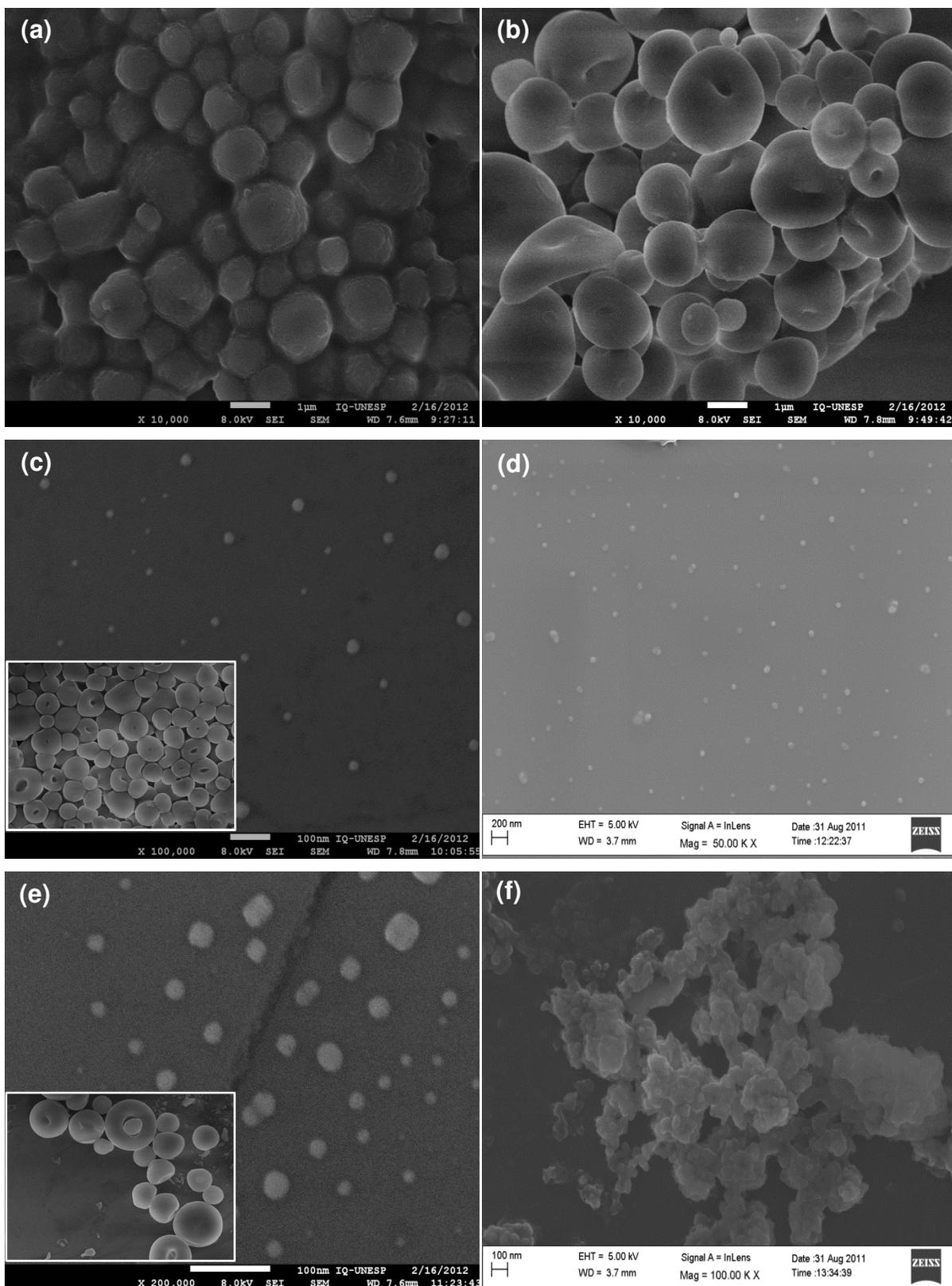


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura de suspensões em água das amostras (a) $\text{SiO}_2\text{Cu1150}$, (b) $\text{SiO}_2\text{Cu1180}$, (c) $\text{SiO}_2\text{Cu1200}$, (d) $\text{SiO}_2\text{Cu5150}$, (e) $\text{SiO}_2\text{Cu5180}$ e (f) $\text{SiO}_2\text{Cu5200}$. Os detalhes nas imagens (c) e (e) apresentam partículas contidas nessas amostras em escala micrométrica.

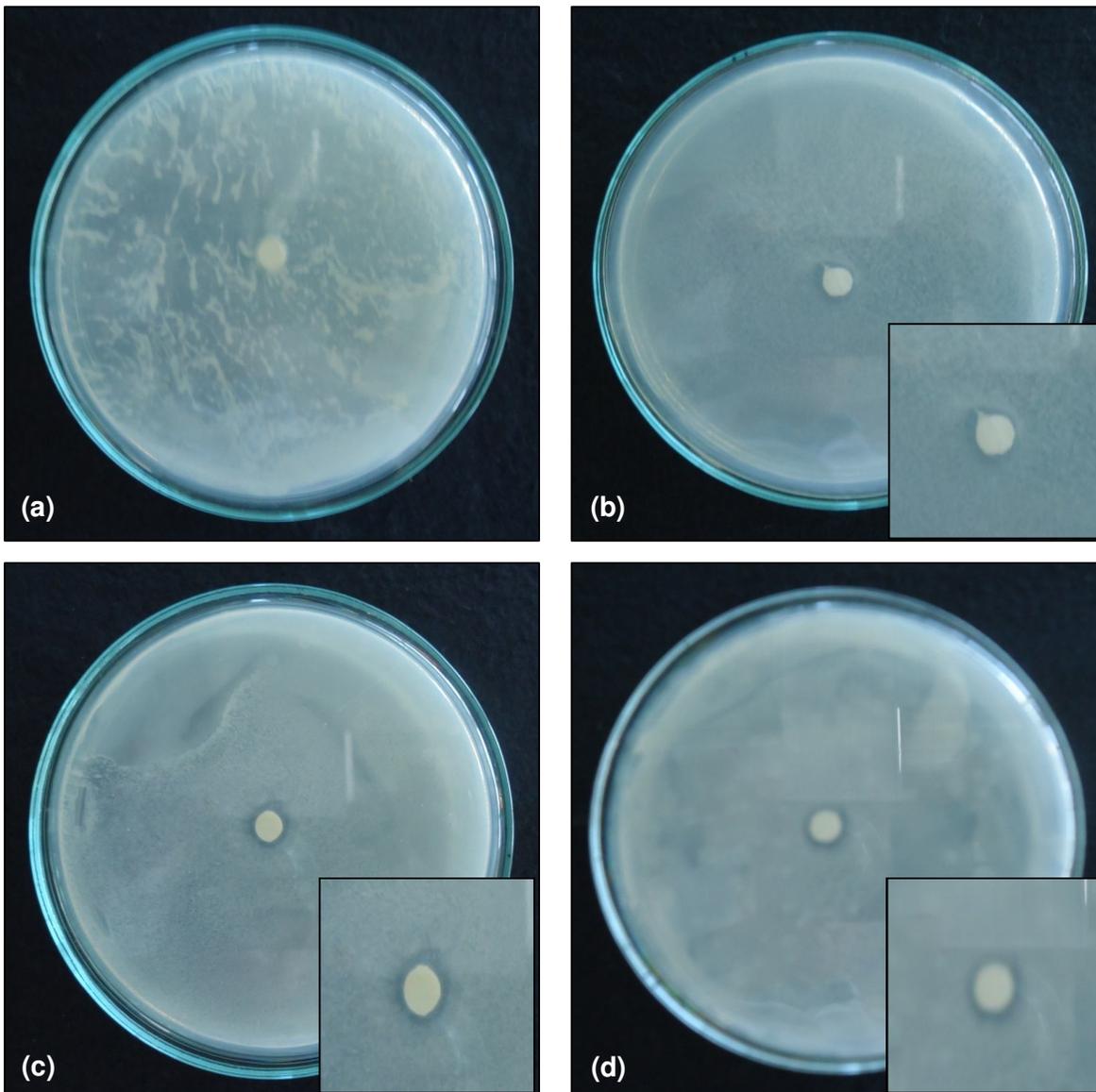


Figura 14. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra *Ralstonia solanacearum* nas concentrações de: (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 1 ppm de íons Cu(II), (c) 5 ppm de íons Cu(II), (d) 10 ppm de íons Cu(II). Os detalhes em casa imagem apresentam um *zoom* do halo de inibição formado.

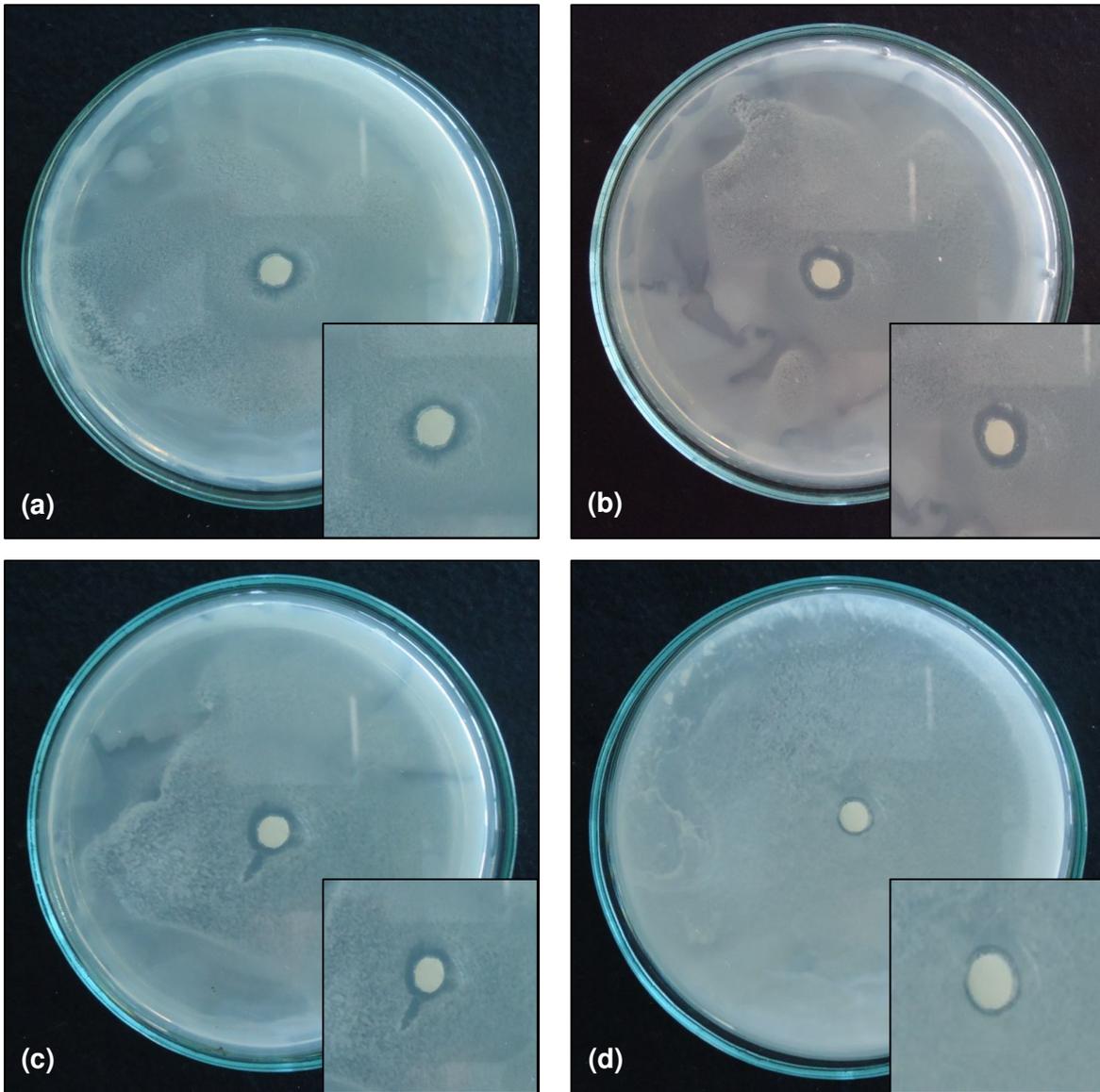


Figura 15. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra *Ralstonia solanacearum* nas concentrações de: (a) 25 ppm de íons Cu(II), (b) 50 ppm de íons Cu(II), (c) 100 ppm de íons Cu(II) e (d) padrão comercial – 1050 ppm de íons cobre(II). Os detalhes em casa imagem apresentam um *zoom* do halo de inibição formado.

Pode-se inferir que um determinado composto apresenta ação bactericida quando um halo de inibição é observado em torno do papel filtro (quando empregado o método de difusão em disco) e, quanto maior esse halo de inibição, mais eficaz é o controle bacteriológico. Assim, os fatores que podem influenciar nessa avaliação são o patógeno em si, o composto a ser avaliado e a sua concentração. Por tal razão, escolhe-se um “patógeno chave” (que apresente uma

certa relevância, seja comercial ou epidemiológica) e avalia-se diversas concentrações do composto, construindo-se uma curva dose-resposta.

Tabela 18. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para a bactéria *Ralstonia solanacearum*.

Amostra	Concentração de íons Cu(II) / ppm	Diâmetro do halo de inibição / cm (°)
Testemunha	0	0 a
SiO ₂ 1Cu5150	1	0,70 b
SiO ₂ 1Cu5150	5	0,92 bc
SiO ₂ 1Cu5150	10	0,93 bc
SiO ₂ 1Cu5150	25	0,92 bc
SiO ₂ 1Cu5150	50	1,13 c
SiO ₂ 1Cu5150	100	1,03 c
Padrão comercial	1050	0,83 b

Assim, com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que o sistema “nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II)” apresenta ação bactericida contra a *Ralstonia solanacearum*, sendo a concentração de 50 ppm de íons cobre(II) a mais eficiente, uma vez que o halo de inibição provocado por essa concentração mostrou-se estatisticamente diferente dos demais.

Com relação ao padrão comercial, um produto a base de hidróxido de cobre(II), o composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) apresentou ação semelhante a este com uma dose de 25 ppm de íons cobre(II), enquanto que no ensaio com o padrão comercial utilizou-se 1050 ppm de íons cobre(II). Portanto, conclui-se que o sistema desenvolvido neste projeto apresenta melhor eficácia do que os produtos regulares a base de hidróxido de cobre(II).

Também avaliou-se a ação bactericida do sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra a *Xanthomonas axonopodis* e, assim como para a *Ralstonia solanacearum*, construiu-se uma curva dose-resposta em função da concentração de íons cobre(II). Nas Figura 16 e Figura 17 encontram-se expostas as imagens do ensaio de atividade biológica, enquanto que na Tabela 19 está

* Valores de diâmetro de halo de inibição que apresentam as mesmas letras devem ser considerados estatisticamente iguais

apresentada a análise estatística do halo de inibição, causado pela presença da determinada concentração de íons cobre(II).

Tabela 19. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para a bactéria *Xanthomonas axonopodis*.

Amostra	Concentração de íons Cu(II) / ppm	Diâmetro do halo de inibição / cm (*)
Testemunha	0	0 a
SiO ₂ 1Cu5150	1	0,63 b
SiO ₂ 1Cu5150	5	0,78 bc
SiO ₂ 1Cu5150	10	0,73 b
SiO ₂ 1Cu5150	25	0,85 c
SiO ₂ 1Cu5150	50	0,68 b
SiO ₂ 1Cu5150	100	0,77 bc
Padrão comercial	1050	0,82 c

A análise estatística, apresentada na Tabela 19, nos leva a concluir que o sistema “nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II)” apresenta ação bactericida na concentração de 25 ppm de íons cobre(II). Todavia nota-se que em concentrações superiores – 50 e 100 ppm de íons cobre(II) – o halo de inibição não difere-se estatisticamente dos demais.

Portanto, apesar do composto a base de cobre(II) aqui testado apresentar atividade biológica contra *Xanthomonas axonopodis*, uma vez que se observou uma certa inibição em concentrações superiores de íons cobre(II), faz-se necessário avaliar a sua ação em concentrações ainda maiores, buscando por resultados mais fidedignos.

Já o padrão comercial (1050 ppm de íons cobre(II)) apresentou atividade biológica semelhante ao sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) na concentração de 100 ppm de íons cobre(II), o que indica uma eficácia superior aos produtos regulares a base de hidróxido de cobre(II) disponíveis no mercado.

* Valores de diâmetro de halo de inibição que apresentam as mesmas letras devem ser considerados estatisticamente iguais.

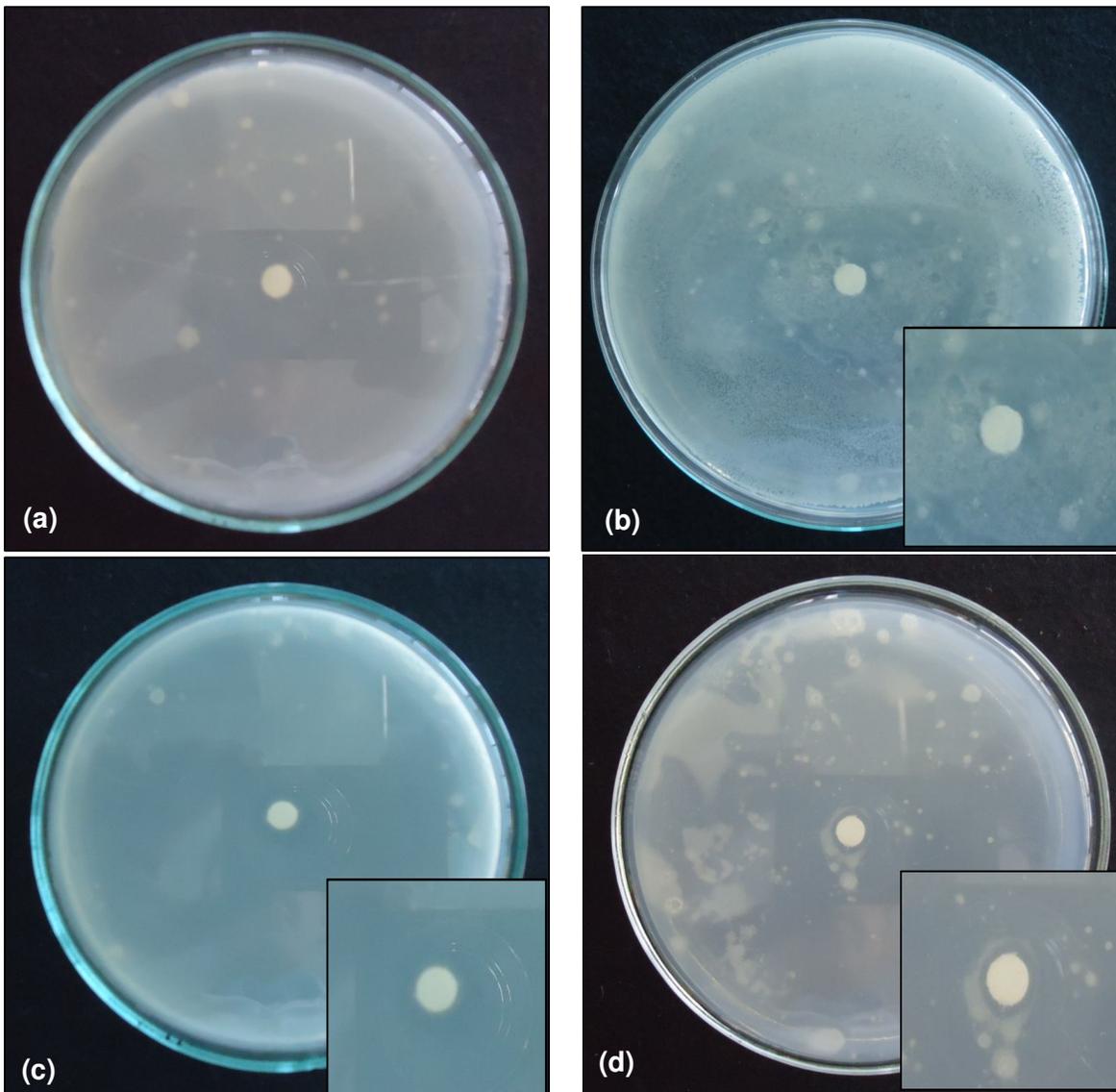


Figura 16. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra *Xanthomonas axonopodis* nas concentrações de: (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 1 ppm de íons Cu(II), (c) 5 ppm de íons Cu(II), (d) 10 ppm de íons Cu(II). Os detalhes em cada imagem apresentam um *zoom* do halo de inibição formado.

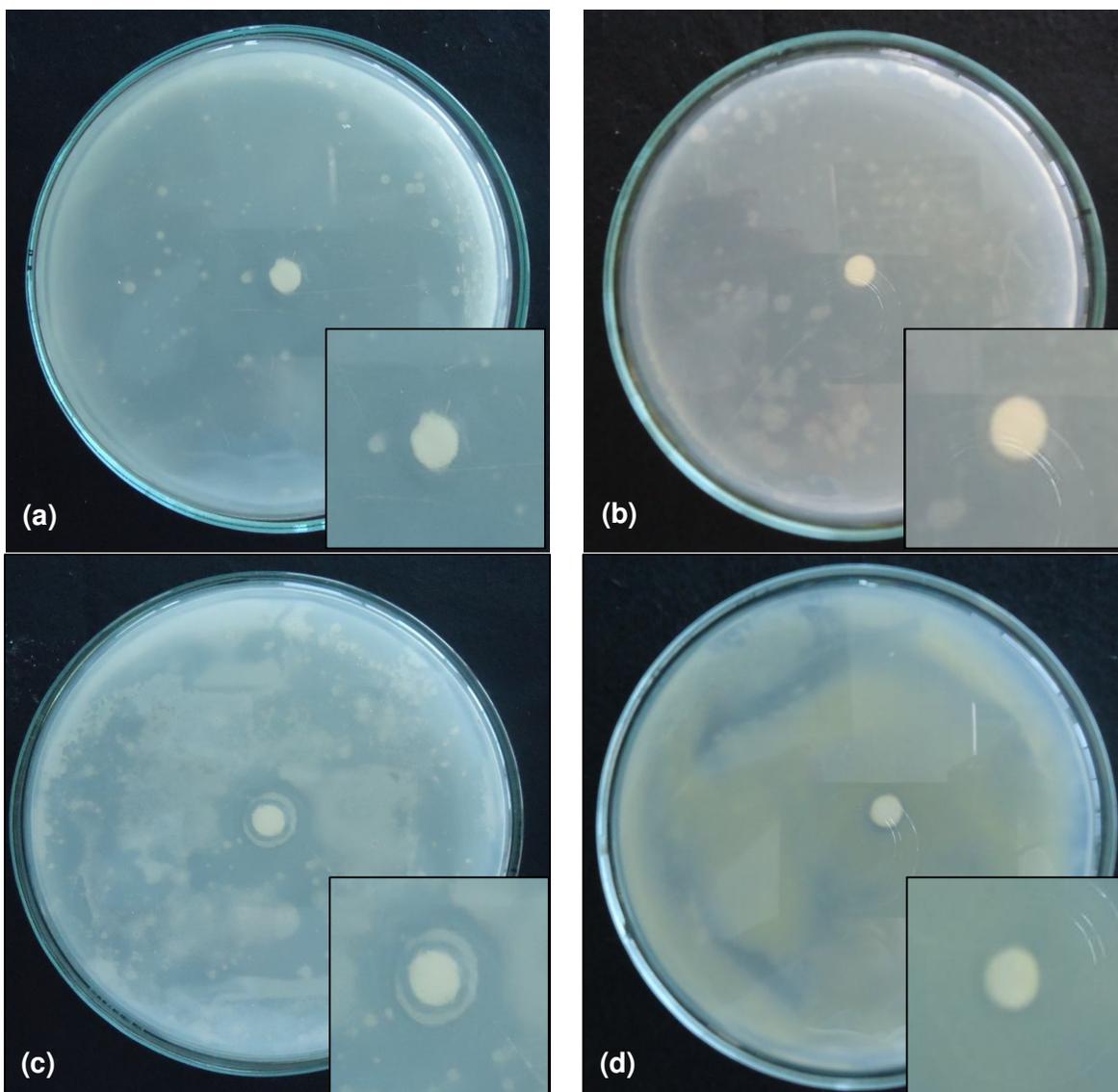


Figura 17. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra *Xanthomonas axonopodis* nas concentrações de: (a) 25 ppm de íons Cu(II), (b) 50 ppm de íons Cu(II), (c) 100 ppm de íons Cu(II) e (d) Padrão comercial – 1050 ppm de íons Cu(II). Os detalhes em cada imagem apresentam um *zoom* do halo de inibição formado.

4.3.2. Fungos

O ensaio de atividade biológica para fungos foi conduzido com os patógenos *Alternaria solani* e *Colletotricum gloeosporioides*, sendo que estes dois patógenos foram selecionados devido à importância de suas doenças no campo.

A atividade fungicida do sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) foi avaliada através da construção de uma curva dose-resposta, empregando-se o teste de difusão em disco para fungos. Na Figura 18 encontram-

se expostas as imagens do ensaio de atividade biológica, enquanto que na Tabela 20 está apresentada a análise estatística do crescimento do fungo.

Tabela 20. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para o fungo *Alternaria solani*.

Amostra	Concentração de íons Cu(II) / ppm	Diâmetro da área ocupada pelo fungo / cm (*)
Testemunha	0	9,50 a
SiO ₂ 1Cu5150	25	9,12 a
SiO ₂ 1Cu5150	50	7,78 b
SiO ₂ 1Cu5150	100	6,18 c
Padrão comercial	490	4,90 d

Como explicado no item 3.5.2.2, optou-se por construir a curva dose-resposta para fungos apenas com as concentrações de 25, 50 e 100 ppm, uma vez que doses inferiores a estas não apresentaram ação contra bactérias. No caso de fungos, pode-se inferir que um determinado composto apresenta ação fungicida quando há a inibição do crescimento do fungo e, quanto menor for o espaço da placa de petri ocupado pelo fungo, mais eficaz é o controle.

* Valores de diâmetro da área ocupada pelo fungo que apresentem as mesmas letras devem ser considerados estatisticamente iguais.

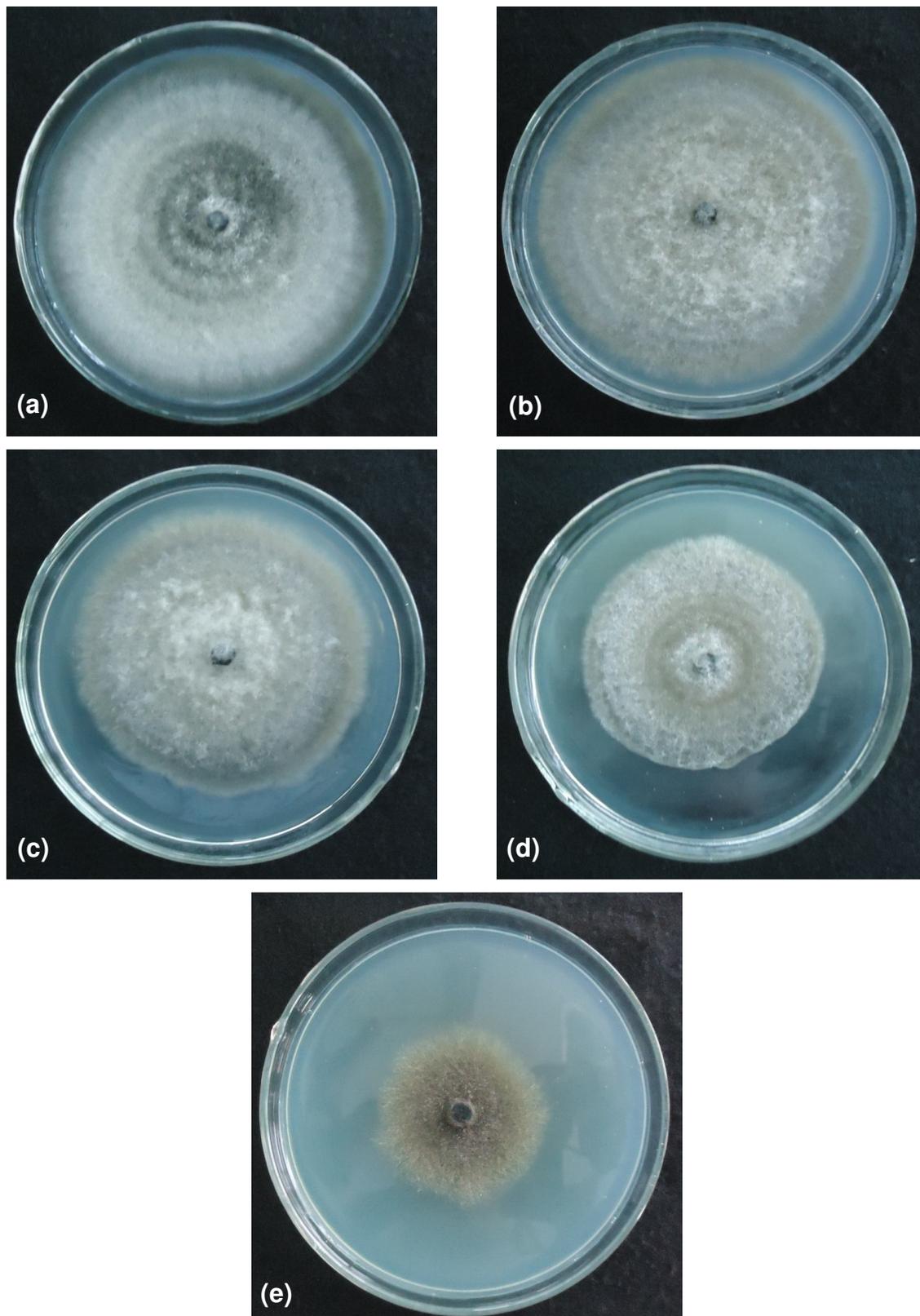


Figura 18. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra *Alternaria solani*. (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 25 ppm de íons Cu(II), (c) 50 ppm de íons Cu(II), (d) 100 ppm de íons Cu(II) e (e) Padrão comercial – 490 ppm de íons Cu(II).

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o sistema “nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II)” apresenta ação fungicida contra a *Alternaria solani* a partir da concentração de 50 ppm de íons cobre(II), porém observa-se uma melhor resposta em função do aumento de concentração de íons cobre(II). Portanto, um aumento de dose provavelmente oferecerá um melhor controle do patógeno em questão.

O resultado obtido para o padrão comercial corrobora com essa hipótese, uma vez que a concentração de 490 ppm de íons cobre(II) deste composto proporcionou um melhor controle do que as doses testadas para o sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II).

Assim como para a *Alternaria solani*, avaliou-se a atividade fungicida do sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) em *Colletotricum gloeosporioides* construindo uma curva dose-resposta. Na Figura 19 encontram-se expostas as imagens do ensaio de atividade biológica, enquanto que na Tabela 21 está apresentada a análise estatística do crescimento do fungo.

Tabela 21. Análise estatística dos halos de inibição em função da concentração de íons cobre(II) para o fungo *Colletotricum gloeosporioides*.

Amostra	Concentração de íons Cu(II) / ppm	Diâmetro da área ocupada pelo fungo / cm (*)
Testemunha	0	9,50 a
SiO ₂ 1Cu5150	25	9,00 a
SiO ₂ 1Cu5150	50	8,32 ab
SiO ₂ 1Cu5150	100	7,50 b
Padrão comercial	490	8,87 a

* Valores de diâmetro de halo de inibição que apresentam as mesmas letras devem ser considerados estatisticamente iguais.

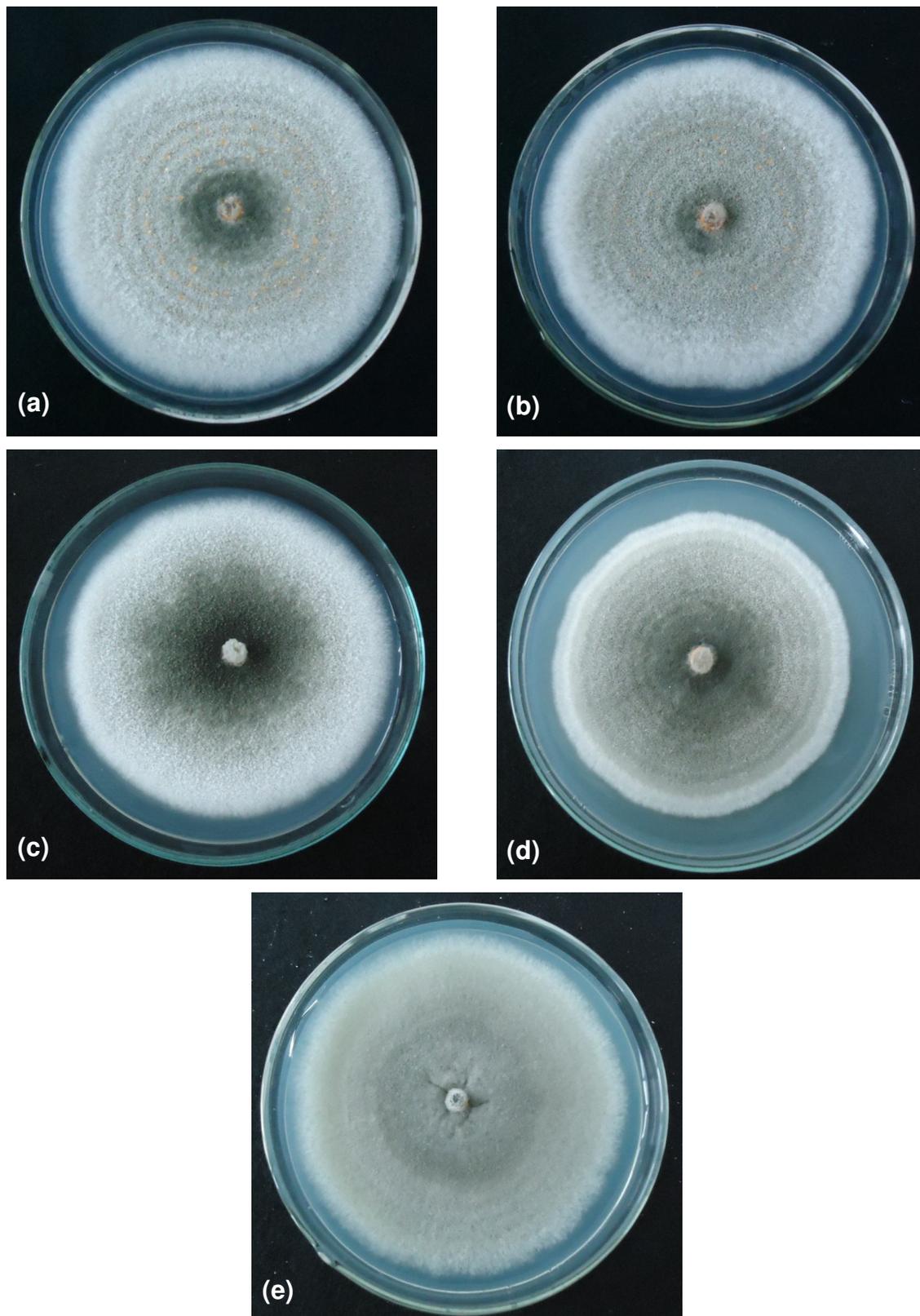


Figura 19. Ensaio de eficácia do composto nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) contra *Colletotricum gloeosporioides*. (a) 0 ppm de íons Cu(II) (testemunha), (b) 25 ppm de íons Cu(II), (c) 50 ppm de íons Cu(II), (d) 100 ppm de íons Cu(II) e (e) Padrão comercial – 490 ppm de íons Cu(II).

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o sistema “nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II)” apresenta ação fungicida contra o *Colletotricum gloeosporioides* a partir da concentração de 100 ppm de íons cobre(II), porém observa-se uma melhora no controle proporcional ao aumento de concentração de íons cobre(II). Portanto, um aumento de dose provavelmente será mais eficaz no controle do patógeno.

Todavia, para este patógeno, o sistema nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) apresentou melhor eficácia do que o padrão comercial, uma vez que apresentou controle semelhante na concentração de 50 ppm de íons cobre(II), comparado aos 490 ppm de íons cobre(II) utilizados no ensaio com o padrão comercial.

5. CONCLUSÃO

A síntese de nanopartículas de sílica, a partir de silicato de sódio, utilizando um ácido fraco para ajuste de pH de precipitação, foi conduzida com sucesso e obteve-se nanopartícula de sílica esferoidais, com uma estreita distribuição de tamanho. Trata-se de um material não-cristalino que pode ser utilizado como matriz para adsorção de outros compostos, como, por exemplo, íons metálicos. A suspensão coloidal resultante é bastante estável, podendo ser armazenada por longos períodos. O método proposto neste trabalho apresenta a vantagem de utilizar reagentes de baixo custo, baixa periculosidade, além de ser facilmente transposto para escala industrial.

A adsorção dos íons cobre(II) foi conduzida com sucesso nas nanopartículas de sílica – sem prévia funcionalização – contidas na suspensão a 1% m/v, sendo caracterizadas por técnicas de espalhamento de luz/potencial zeta (DLS), difratometria de raios X (DRX) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR).

O sistema final – nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II) – teve sua atividade bactericida/fungicida avaliada nos patógenos *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis*, *Alternaria solani* e *Colletotricum gloeosporioides*. Para a bactéria *Ralstonia solanacearum*, observou-se ação bactericida mais eficiente a

uma concentração de 50 ppm de íons cobre(II), o que implica numa concentração de $1,25 \text{ g L}^{-1}$ da amostra $\text{SiO}_2\text{1Cu5150}$. Já para a *Xanthomonas axonopodis*, observou-se um certo controle na concentração de 50 ppm de íons cobre(II) – $1,25 \text{ g L}^{-1}$ da amostra $\text{SiO}_2\text{1Cu5150}$, mas em doses superiores o controle foi menos significativo. Portanto tais ensaios deveriam ser repetidos, buscando por resultados mais fidedignos, antes que qualquer conclusão seja feita com relação a esse patógeno.

Com relação aos fungos, observou-se ação fungicida para a *Alternaria solani* a 50 ppm de íons cobre(II), o que implica numa concentração de $1,25 \text{ g L}^{-1}$ da amostra $\text{SiO}_2\text{1Cu5150}$ e, para o *Colletotricum gloeosporioides*, a atividade fungicida foi evidenciada na concentração de 100 ppm de íons cobre(II) – $2,51 \text{ g L}^{-1}$ da amostra $\text{SiO}_2\text{1Cu5150}$.

Assim sendo, é possível concluir que a adsorção de íons cobre(II) a superfície de nanopartículas de sílica possibilitou o desenvolvimento de um composto bactericida/fungicida, oferecendo uma alternativa aos compostos cúpricos já existentes no mercado.

6. PERSPECTIVAS DE TRABALHO

Propõe-se, como continuidade do projeto, o estudo de área superficial e porosidade das nanopartículas de sílica e se a adição dos íons cobre(II) ao sistema irá influenciar nesses parâmetros.

Estudos paralelos podem ser conduzidos buscando-se concentrar a quantidade de íons cobre(II) adicionada ao sistema, bem como buscar outros meios para se concentrar a suspensão de nanopartículas de sílica, sem desestabilizá-la.

Repreparar a amostra $\text{SiO}_2\text{3200}$ e repetir a análise de DLS, buscando averiguar se há uma tendência com relação ao aumento do raio hidrodinâmico das partículas em função do aumento de temperatura de processamento no spray dryer. Somente essa amostra apresentou um desvio com relação a essa

tendência, portanto pode ter ocorrido algum desvio experimental durante o preparo da amostra.

Também se faz necessário repetir alguns ensaios de atividade biológica, principalmente os ensaios conduzidos com fungos. Os testes aqui apresentados demonstraram que o composto “nanopartículas de sílica contendo íons cobre(II)” apresenta ação fungicida, todavia precisa-se testar concentrações superiores de íons cobre(II) para verificar se há um aumento de resposta proporcional ao aumento de concentração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. R. K. Iler. “**The Chemistry of Silica**”. New York: John Wiley & Sons, 1979.
2. R. F. Farias, C. Airoidi. “**Síntese e Reatividade de Sílica Lamelar**”. Química Nova, vol. 23, 2000, pp. 88-93.
3. C. Frondel. “**The System of Mineralogy of DANA**”. New York: John Wiley & Sons, 1962. APUD R. K. Iler. “**The Chemistry of Silica**”. New York: John Wiley & Sons, 1979.
4. A. O. Moura. “**Síntese e Aplicação de Magadiíta na Liberação Controlada de Herbicidas**”. Dissertação de Mestrado em Química – Instituto de Química. Universidade de Brasília – UNB, 2008.
5. M. S. Camargo, G. H. Korndörfer, H. S. Pereira. “**Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicados**”. Bragantia, vol. 66, 2007, pp. 637-647.
6. M. L. Hair, W. Herlt. “**Acidity of surface hydroxyl groups**”. *Journal of Physical Chemistry*, vol. 74, 1970, pp. 91-94.
7. J. D. Torres. “**Nanosílica Modificada com Ácido Carboxílico para Liberação Controlada de Herbicidas**”. Dissertação de Mestrado em Química – Instituto de Química. Universidade de Brasília – UNB, 2007.
8. C. J. Brinker, G. W. Sherer. “**Sol-Gel Science**”. New York: Academic Press, 1990.
9. D. J. Shaw. “**Introduction to Colloid & Surface Chemistry**”. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992.
10. W. Stöber, A. Fink. “**Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range**”. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 26, 1968, pp. 62-69.
11. I. A. M. Ibrahim, A. A. F. Zikry, M. A. Sharaf. “**Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica**”. *Journal of American Science*, vol. 11, 2010, pp. 985-989.
12. S. K. Park, K. D. Kim, H. T. Kim. “**Preparation of silica nanoparticles: determination of the optimal synthesis conditions for small and uniform particles**”. *Colloids and Surface: A*, vol. 197, 2002, pp. 7-17.

-
13. M. Alesker, A. Heller, J. P. Lellouche, et al. "**Hybrid silica nanoparticles traceable by fluorescence and FT-IR spectroscopy: preparation, characterization and preliminary biological studies**". *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, 2011, pp. 10883-10893.
14. L. Cong, M. Takeda, N. Ohuchi, et al. "**Uniform silica coated fluorescent nanoparticles: synthetic method, improved light stability and application to visualize lymph network tracer**". *Plos One*, vol. 5, 2010, pp. 1-6.
15. X. Wang, X. Miao, Z. Li, W. Deng. "**Fabrication of mesoporous silica hollow spheres using triblock copolymer PEG-PPG-PEG as template**". *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 356, 2010, pp. 898-905.
16. C. M. Maroneze, H. A. Magosso, Y. Gushikem, et al. "**Surface functionalization of SBA-15 and a nonordered mesoporous silica with 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane derivative: Study of CuCl_2 adsorption from ethanol solution**". *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 356, 2011, pp. 248-256.
17. L. T. Arenas, C. W. Simm, Y. Gushikem, T. M. H. Costa, E. V. Benvenutti, et al. "**Synthesis of Silica Xerogels with High Surface Area using Acetic Acid as Catalyst**". *Journal of Brazilian Chemical Society*, vol. 18, 2007, pp. 886-890.
18. F. Todarello. "**Process to obtain a high-concentration colloidal silica suspension and product thus obtained**" - EP 0996588 B1. Grace GmbH & Co, 2000.
19. Y. Watanabe, M. Ando, I. Yogo. "**Method of preparing high-purity aqueous silica sol**" - EP 0557740 B1. Nissan Chemical Industries Ltd, 1993.
20. R. H. M. Godoi, L. Fernandes, M. Jafelicci Jr., R. C. Marques, L. C. Varanda, M. R. Davolos. "**Investigation of the systems silica and silica containing chromium in alcohol medium**". *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 47, 1999, pp. 141-145.
21. R. H. M. Godoi, M. Jafelicci Jr., M. R. Davolos, L. Fernandes, M. A. U. Martines, J. Portillo. "**Chromium-containing silica materials**". *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 273, 2000, pp. 36-40.
22. S. Santra. "**Silica-based antibacterial and antifungal nanoformulation**" - WO 2010/068275. University of Central Florida Research Foundation, 2010.
23. S. K. Parida, S. Dash, S. Patel, B. K. Mishra. "**Absorption of organic molecules on silica surface**". *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 121, 2006, pp. 77-110.
24. Y. Gushikem, J. C. Moreira. "**Adsorption of MX_2 ($M = \text{Mn, Ni, Cu, Zn, and Cd}$; $X = \text{Cl, Br, and I}$) and FeCl_3 by modified silica surface with imidazolylpropyl group**". *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 107, 1985, pp. 70-74.
25. A. Tancredo, J. C. Moreira, Y. Gushikem, O. R. Nascimento. "**Electron paramagnetic resonance study of CuCl_2 adsorbed on silica-gel surface modified with 3(1-imidazolyl)propyl groups**". *Colloids and Surfaces*, vol. 19, 1986, pp. 41-45.
26. M. S. Yamamoto, Y. Gushikem. "**Adsorption of metal ions from aqueous and ethanol solutions by silica gel functionalized with pyridinium ions**". *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 129, 1989, pp. 162-165.

-
27. M. S. Yamamoto, Y. Gushikem. "**Adsorption of Co(II) and Cu(II) on silica gel surface modified with pyridinium ion from acetone and ethanol solutions**". *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 134, 1990, pp. 275-278.
28. W. C. Moreira, Y. Gushikem, O. R. Nascimento. "**Adsorption and structure of MCl_2 ($M = Co^{2+}$, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+}) complex species on a chemically modified silica gel surface with 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)Octane**". *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 150, 1992, pp. 115-120.
29. N. L. Dias Filho, Y. Gushikem. "**ESR study of $CuCl_2$ adsorbed on a chemically modified silica gel surface with benzimidazole molecule**". *Journal of Molecular Structure*, vol. 335, 1995, pp. 175-180.
30. N. L. Dias Filho, Y. Gushikem, D. W. Franco, M. S. Schultz, L. C. G. Vasconcelos. "**Study of copper complexes adsorbed on a silica gel surface chemically modified with 2-amino-1,3,4-thiadiazole**". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 141, 1998, pp. 181-187.
31. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/texto.php?p=oquee>. Acessado em 07 de Março de 2012.
32. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2007/artigo.2007-01-24.7477201343>. Acessado em 07 de Março de 2012.
33. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2093&id_pagina=1. Acessado em 07 de Março de 2012.
34. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm. Acessado em 22 de Julho de 2012.
35. L. O. M. Velasco, L. X. L. Capanema. "**O setor agroquímico**". Rio de Janeiro: BNDS setorial, 2006.
36. A. Knowles. "**New developments in crop protection product formulation**". United Kingdom: Agrow Reports, 2005.
37. V. E. Copcia, C. Luchian, S. Dunca, N. Bilba, C. M. Hristodor. "**Antibacterial activity of silver-modified natural clinoptilolite**". *Journal of Material Science*, vol. 46, 2011, pp. 7121-7128.
38. G. Borkow, J. Gabbay. "**Copper as biocidal tool**". *Current Medicinal Chemistry*, vol. 12, 2005, pp. 2163-2175.
39. J. Elguindi, X. Hao, Y. Lin, C. "**Rensing, et al. Advantages and challenges of increased antimicrobial copper use and copper mining**". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 91, 2011, pp. 237-249.
40. P. Airey, J. Verran. "**Potencial use of copper as hygienic surface; problems associated with cumulative soiling and cleaning**". *Journal of Hospital Infection*, vol. 67, 2007, pp. 271-277.
41. G. Grass, C. Rensing, M. Solioz. "**Metallic copper as an antimicrobial surface**". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, 2011, pp. 1541-1547.
42. C. E. Santo, E. W. Lam, G. Grass, et al. "**Bacterial killing by dry metallic copper surface**". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, 2011, pp. 794-802.

-
43. C. E. Santo, P. V. Morais, G. Grass. "**Isolation and Characterization of bacteria resistant to metallic copper surface**". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, 2010, pp. 1341-1348.
44. M. Ibrahim, F. Wang, A. Wareth, G. Xie. "**Copper as an antibacterial agent for human pathogenic multidrug resistant *Burkholderia cepacia* complex bacteria**". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 112, 2011, pp. 570-576.
45. B. Wu, R. Huang, P. Biswas, Y. J. Tang. "**Bacterial responses to Cu-doped TiO₂ nanoparticles**". *Science of the Total Environment*, vol. 408, 2010, pp. 1755-1758.
46. S. Chen, Y. Guo, P. Zhang, J. Tang. "**Facile preparation and synergistic antibacterial effect of three-component Cu/TiO₂/CS nanoparticles**". *Journal of Materials Chemistry*, vol. 22, 2012, pp. 9092-9099.
47. W. Du, Y. Xu, Z. Xu, C. Fan. "**Preparation, characterization and antibacterial properties against *E. coli* K₈₈ of chitosan nanoparticles loaded copper ions**". *Nanotechnology*, vol. 19, 2008, 085707.
48. O. A. Yeshchenko, I. M. Dmitruk. "**Size-dependent melting of spherical copper nanoparticles embedded in silica matrix**". *Physical Review B*, vol. 75, 2007, 085434.
49. F. Gao, H. Pang, S. Xu, Q. Lu. "**Copper-based nanostructures: promising antibacterial agents and photocatalysts**". *Chemical Communication*, 2009, pp. 3571-3573.
50. J. J. Harrison, R. J. Turner, M. E. Olson, H. Ceri, et al. "**Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa***". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, 2008, pp. 2870-2881.
51. G. Ren, D. Hu, P. Reip, R. Allaker. "**Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications**". *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 33, 2009, pp. 587-590.
52. K. Y. Yoon, J. H. Byeon, J. H. Park, J. Hwang. "**Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles**". *Science of the Total Environment*, vol. 373, 2007, pp. 572-575.
53. C. Rensing, G. Grass. "***Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment**". *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 27, 2003, pp. 197-213.
54. "**Crop Protection Handbook**". New York: Meister Media Worldwilde, 2012.
55. L. Amorim, J. A. M. Rezende, A. Bergamin Filho. "**Manual de Fitopatologia – Volume I, Princípios e Conceitos**". São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2011.
56. Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimentaLonganaAmazoniaOccidental/doencas.htm>. Acessado em 19 de julho de 2012.
57. H. Kimati, L. Amorim, J. A. M. Rezende, et al. "**Manual de Fitopatologia – Volume II, Doenças das plantas cultivadas**". São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2011.
58. F. A. Sigoli, I. O. Mazali, T. C. Belini. "**Método de obtenção de nanoproductos a base de sílica**" – PI1105171-0. Universidade estadual de Campinas e Iharabras S/A Indústrias Químicas, 2011.

59. G. Socrates. ***"Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts"***. New York: J. Willey, 2001.

60. K. Nakamoto. ***"Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds – Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry"***. New York: J. Willey, 1997.

61. Y. Kawano, S. Denofre, Y. Gushikem. ***"Raman and infrared spectra of silica gel and niobium(V) oxide grafted on silica gel surface and their dependence on pretreatment temperatures"***. *Vibrational Spectroscopy*, vol. 7, 1994, pp. 293-302.

62. K. N. Pham, D. Fullstom, K. S. Crentsil. ***"Surface modification for stability of nano-sized silica colloids"***. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 315, 2007, pp. 123-127.

63. Y. Gushikem, S. Denofre, S. C. Castro, Y. Kawano. ***"Stability and surface acidity of niobium(V) oxide grafted on a silica gel surface"***. *Journal of Chemical Society Faraday Trans*, vol. 89, 1993, pp. 1057-1061.