



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LARISSA FERNANDA FERREIRA

**Sensor impedimétrico e *machine learning* para
o monitoramento *in-situ* de nanopartículas de sílica**

**CAMPINAS
2023**

LARISSA FERNANDA FERREIRA

**Sensor impedimétrico e *machine learning* para
o monitoramento *in-situ* de nanopartículas de sílica**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Renato Sousa Lima

O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Larissa Fernanda Ferreira e orientada pelo Prof. Dr. Renato Sousa Lima.

**CAMPINAS
2023**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

F413s Ferreira, Larissa Fernanda, 1993-
Sensor impedimétrico e *machine learning* para o monitoramento *in-situ* de nanopartículas de sílica / Larissa Fernanda Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Renato Sousa Lima.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanomateriais. 2. Espectroscopia de impedância eletroquímica. 3. Sensor. 4. Aprendizado de máquina. I. Lima, Renato Sousa, 1984-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Impedimetric sensor and machine learning for *in-situ* monitoring of silica nanoparticles

Palavras-chave em inglês:

Nanomaterials

Electrochemical impedance spectroscopy

Sensor

Machine learning

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Renato Sousa Lima [Orientador]

William Reis de Araujo

José Alberto Fracassi da Silva

Daniel Souza Corrêa

Paulo Augusto Raymundo Pereira

Data de defesa: 19-07-2023

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5896-6903>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9646234807069994>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Sousa Lima (Orientador)

Prof. Dr. William Reis de Araujo (IQ/Unicamp)

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ/Unicamp)

Dr. Daniel Souza Corrêa (Embrapa – Instrumentação)

Dr. Paulo Augusto Raymundo Pereira (USP- *Campus* São Carlos)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **Larissa Fernanda Ferreira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de julho de 2023.

DEDICATÓRIA

Ao meu amado esposo, por toda ajuda, cuidado e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a todos que me ajudaram a chegar até aqui, direta ou indiretamente, sendo eles, meu esposo, família, amigos e professores.

Ao meu esposo André Nicoletti por todo apoio em vários quesitos, dedicação, ajuda, amor e compreensão durante todos esses anos.

Ao meu orientador Dr. Renato Sousa Lima pelas orientações, discussões e ajuda. Além da oportunidade em desenvolver esse projeto.

Ao Angelo Gobbi por ter fornecido suporte/ajuda e disponibilizado toda a estrutura do laboratório de microfabricação e microfluídica (MF) para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os companheiros do MF pela ajuda e suporte durante o decorrer do doutorado, sendo eles: Caroline, Ítalo, Júlia Poker, Júlia Adorno, Lucas, Juliana, Flávio Makoto, Luis Carlos, Maria Helena, Rui, Anielli, Vitória, Ricardo, Alexandre, Gabriela, James, Daniel, Gabriel, Karl e Waldemir.

Aos colegas do LNNano/LNLS, em especial ao Fabrício Delite, Natalia Moreno, Elcio Liberato, João da Silva, Joel Alencar, Simone Betim, Mateus Cardoso, Cleyton Biffe e Carlos Costa pelas conversas, paciência. Assim como por todo suporte na operação de equipamentos, instruções, interpretação e ajuda no tratamento de alguns dados presentes nesta tese. Ao CNPEM como um todo, pela infraestrutura.

À Júlia Poker por toda ajuda e companheirismo durante o meu último ano de doutorado, possibilitando a sua finalização em tempo hábil.

Às minhas amigas Caroline, Giulia, Andressa por todo o apoio em momentos difíceis e felizes. Vocês são muito especiais para mim.

Ao Dr. Agustin Picco por toda ajuda, compreensão, conversas sobre diversos assuntos, pretendo levá-lo comigo durante muitos anos.

Ao Flávio Makoto e Gabriel Schleder por terem feito os tratamentos de dados por *machine learning* presentes nesta tese. À Maria Helena por ter fabricado e solucionado problemas com os *chips* todas as vezes que precisei.

A todos os membros da minha banca de defesa de doutorado por se disponibilizarem a contribuir com discussões para a melhoria desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2018/24214-3) por todo o financiamento desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também ao Instituto de química da Unicamp pela oportunidade em cursar o doutorado em seu programa de pós-graduação. Assim como, aos funcionários do Instituto de química que sempre me auxiliaram com toda paciência sempre que precisei.

RESUMO

Um dos principais desafios para as técnicas de caracterização convencionais é o monitoramento em tempo real e *in-situ* de nanomateriais (NMs) ao longo da sua síntese. Esse tipo de estudo auxilia (i) estudos fundamentais (como a formação da coroa de proteínas e cinética da síntese e da etapa de funcionalização), contribuindo, por exemplo, para o desenvolvimento de nanomedicamentos mais eficazes, e (ii) o controle de qualidade dos NMs, na academia ou na indústria. De fato, a falta de reprodutibilidade na síntese de NMs é uma barreira frente a aplicações em larga escala de nanotecnologias. Nesta tese de doutorado, baseada em um sensor milifluídico impedimétrico e tratamento de dados por *machine learning* (ML), é apresentada uma plataforma para monitorar em tempo real e de forma *in-situ* (i) a síntese e (ii) a funcionalização de nanopartículas de sílica (SiO₂NPs). Na primeira parte do trabalho, os eletrodos consistiram em padrões interdigitados (*interdigitated electrodes*, IDEs) de Cr/Au. Descritores simples obtidos pelo método SISSO (*sure independence screening and sparsifying operator*) superaram as interferências da adsorção das SiO₂NPs sobre os IDEs que ocorre ao decorrer da síntese (24 h), garantindo a multideterminação reprodutível e acurada do tamanho e concentração das nanopartículas a partir de uma única medida de impedância (Z) vs. frequência (para cada amostra). Na segunda parte do trabalho, a plataforma foi empregada para determinar de maneira reprodutível e acurada o nível de funcionalização das SiO₂NPs com ácido fólico (FO), um direcionador para interação com células tumorais. O (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) foi utilizado como intermediário de imobilização. A porcentagem de evolução da funcionalização (PEF_{N1s}) das SiO₂NPs-APTES com FO foi baseada nas quantidades relativas de N 1s obtidas por XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*) para até 6,0 h de modificação química covalente. Em ambas as aplicações, o SISSO proporcionou a determinação dos parâmetros de interesse com velocidade e simplicidade computacionais haja vista a simplicidade dos descritores que exibiram apenas 6 variáveis. Os erros quadráticos médios calculados foram ~2,0 nm (tamanho), $2,6 \times 10^{10}$ nanopartículas mL⁻¹ (concentração) e 1,5 % (PEF_{N1s}). Ademais, a robustez dos descritores mostrou-se elevada uma vez que eles permitiram determinações acuradas em amostras de teste ‘cegas’, referentes a monitoramentos independentes usando sensores diferentes. As acurácias médias globais foram 103,7 % ± 1,9 % (tamanho) e 95,1 % ± 1,5% (PEF_{N1s}). Em suma, nosso trabalho traz avanços no que tange ao desenvolvimento de sistemas em fluxo simples, englobando basicamente o frasco reacional e um sensor milifluídico impedimétrico, capaz de fornecer a análise em tempo real e *in-situ* de parâmetros da síntese (tamanho e concentração) e funcionalização (PEF_{N1s}) das SiO₂NPs a partir de um único espectro de Z. Essa plataforma poderá, certamente, ser expandida a demais NMs em função do seu princípio de detecção universal e representa uma estratégia promissora para auxiliar (i) estudos fundamentais na área de colóides e (ii) o controle de qualidade da sua síntese e funcionalização química.

ABSTRACT

One of the main challenges for conventional characterization techniques is the real-time and *in-situ* monitoring of nanomaterials (NMs) during their synthesis. This type of study assists in (i) fundamental research, such as understanding the formation of protein corona, synthesis kinetics, and functionalization steps, contributing, for example, to the development of more effective nanomedicines, and (ii) quality control of NMs, both in academia and industry. In fact, the lack of reproducibility in NM synthesis is a barrier to the large-scale application of nanotechnologies. In this doctoral thesis, based on a millifluidic impedimetric sensor and data processing through machine learning (ML), a platform is presented for real-time and *in-situ* monitoring of (i) the synthesis and (ii) functionalization of silica nanoparticles (SiO₂NPs). In the first part of the work, the electrodes consisted of Cr/Au thin films as interdigitated electrodes (IDEs). Simple descriptors obtained by the sure independence screening and sparsifying operator (SISSO) method overcame the interference of SiO₂NPs adsorption on the IDEs that occurs during the synthesis (24 h), ensuring reproducible and accurate determination of nanoparticle size and concentration from a single impedance (*Z*) vs. frequency measurement (for each sample). In the second part of the work, the platform was used to determine the level of functionalization of SiO₂NPs reproducibly and accurately with folic acid (FO), a targeting agent for interaction with tumor cells. (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) was used as an immobilization intermediate. The percentage of functionalization evolution (PEF_{N1s}) of SiO₂NPs-APTES with FO was based on the relative amounts of N 1s obtained by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) for up to 6.0 hours of covalent chemical modification. In both applications, SISSO provided the determination of the parameters of interest with computational speed and simplicity, given the simplicity of the descriptors, which exhibited only 6 variables. The calculated mean squared errors were ~2.0 nm (size), 2.6×10^{10} nanoparticles mL⁻¹ (concentration), and 1.5% (PEF_{N1s}). Moreover, the robustness of the descriptors was high as they allowed accurate determinations in "blind" test samples, corresponding to independent monitoring using different sensors. The overall average accuracies were $103.7\% \pm 1.9\%$ (size) and $95.1\% \pm 1.5\%$ (PEF_{N1s}). In summary, our work brings advances in the development of simple flow systems, essentially comprising the reaction vessel and a millifluidic impedimetric sensor, capable of providing real-time and *in-situ* analysis of synthesis parameters (size and concentration) and functionalization (PEF_{N1s}) of SiO₂NPs from a single *Z* spectrum. This platform can certainly be expanded to other NMs due to its universal detection principle and represents a promising strategy to assist (i) fundamental studies in the field of colloids and (ii) the quality control of their synthesis and chemical functionalization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas para a fabricação do chip de vidro/PDMS. (A) Molde do milicanal em PDMS com a peça de alumina, (B) demarcação para inserção das mangueiras de silicone (1,0 mm de d.i.) para a entrada e saída da síntese e (C) o substrato de PDMS com o canal milifluídico. (D) Chip final de vidro/PDMS com os eletrodos em Cr/Au. 34
- Figura 2.** Componentes do dispositivo *bubble trap* impresso em 3D. (A) Dispositivo impresso em 3D com entrada e saída, (B) membrana elástica semipermeável de PDMS e (C) suporte de aço inoxidável com parafusos para fixação. (D) Dispositivo final. As partes apresentadas nas chamadas anteriores (A, B e C) seguem discriminadas nesta foto. Figura adaptada da referência 30. 35
- Figura 3.** Componentes da plataforma para selagem reversível dos chips por pressão mecânica. (A) Eletrodo em vidro. (B) Substrato em PDMS com canal milifluídico. (C) Suporte acrílico com parafusos. (D) Plataforma final com o dispositivo selado. Os pinos metálicos em contato com os eletrodos foram soldados a um fio para conexão elétrica com o potenciostato. As partes apresentadas nas chamadas anteriores (A, B e C) estão discriminadas nesta foto. Figura adaptada da referência 30. 35
- Figura 4.** Esquema de formação das SiO₂NPs e sua funcionalização com o APTES. Considerações mais detalhadas sobre o mecanismo de síntese seguem apresentadas na seção 4.1. R: C₂H₅. 36
- Figura 5.** QRC com direcionamento a um vídeo mostrando a plataforma usada para o monitoramento in-situ das SiO₂NPs pelo sensor ao longo da síntese (parte I). 40
- Figura 6.** QRC com direcionamento para o vídeo do funcionamento do sistema 2 de monitoramento in-situ da funcionalização SiO₂NPs com FO pelo sensor (parte II). 41
- Figura 7.** Síntese das nanopartículas e plataforma de detecção. (A) Reagentes e plataforma analítica utilizados na síntese e monitoramento in-situ das SiO₂NPs, juntamente com uma imagem SEM dessas nanopartículas formadas após 24,0 h. (B) Representação esquemática do carregamento capacitivo da EDL e migração das SiO₂NPs carregadas negativamente cercadas por uma camada de solvatação (não mostrada) e nuvem iônica. (C) Imagem de estereoscopia do IDEs em vidro (1) e corte transversal do canal milifluídico (contendo corante vermelho). Figura adaptada da referência 30. 44
- Figura 8.** Curva mostrando as etapas do modelo ISG, a hidrólise do TEOS por meio do amônio (via I) e a condensação de monômeros recém-formados nas sementes geradas anteriormente (via II), bem como o perfil de condutividade ao longo da síntese sob a condição de amônio em

excesso. P_v significa o ponto de virada entre as vias I e II. Figura adaptada da referência 30.

.....45

Figura 9. Esquema com as reações de hidrólise e condensação para a síntese das SiO_2NPs ..46

Figura 10. Caracterização das SiO_2NPs de 110 nm. **(A)** Dados de D_H por DLS em função do tempo para síntese 1, S_1 e síntese 2, S_2 (1) junto com as imagens de SEM e distribuições de tamanho, respectivamente, das nanopartículas em etanol para S_1 após 2,0 h (2), 7,0 h (3), 11,0 h (4) e 24,0 h (5) de síntese. As vias I (VI) e II (VII) de acordo com a teoria ISG e as regiões R1-R4 (descritas no texto) são destacadas neste gráfico. As regiões foram definidas nos intervalos lineares dos dados. Cinética da síntese, **(B)** condutividade por DLS. **(C)** Taxa de crescimento nas 4 regiões (R1-R4). **(D)** Diminuição linear no incremento relativo do diâmetro total (IRDT) das SiO_2NPs ao longo da síntese. Figura adaptada da referência 30.....47

Figura 11. Caracterização da síntese das SiO_2NPs de 270 nm. **(A)** dados de D_H por DLS ao longo da síntese 1, (S_1) obtida no meio reacional (etanol) antes da purificação das SiO_2NPs (1), junto com as imagens de SEM (à esquerda) e distribuição de tamanho (à direita) das nanopartículas em etanol para S_1 depois de 2,0 (2) e 24,0 h de síntese (3). **(B)** Taxa de crescimento das 4 regiões como destacado em **(A)**, nomeado, R1, R2, R3 e R4. Figura adaptada da referência 30.50

Figura 12. Caracterização das SiO_2NPs de 110 nm. **(A)** Concentração das SiO_2NPs , C_{NP} , por DLS. Análise de BET. **(B)** Gráficos de quantidade adsorvida (QA) vs. pressão relativa obtido para S_1 . **(C)** O mesmo tipo de dado para S_2 . Sendo que em ambos os casos, P é a pressão e P_0 é a pressão inicial. Figura adaptada da referência 30.52

Figura 13. Monitoramento em tempo real das SiO_2NPs de 110 nm. **(A)** Gráficos de Bode ângulo de fase depois de 2,0 h de síntese. **(B)** Espectro de Z vs. frequência (Bode) em alguns períodos de síntese, como discriminado. A linha pontilhada separa as frequências correspondentes as regiões capacitivas e resistivas do sensor. **(C)** Mapa de cor de Z vs. frequência através da síntese. **(D)** Gráficos de Nyquist depois de 2,0 h (1) e 12,0 h (2) de síntese. Os elementos do circuito equivalente são: Q_{NPs} , C_{EDL} , R_{NPs} referentes a região capacitiva e a R_s para a região resistiva. **(E)** Gráficos de impedância vs. tempo em diferentes frequências como destacado em (1–3) demonstrando os estágios lineares de D_H vs. tempo (R1–R4). Figura adaptada da referência 30.54

Figura 14. Monitoramento em tempo real da síntese das SiO_2NPs de 270 nm. **(A, B e C)** Gráficos de Z vs. tempo em diferentes frequências demonstrando os estágios cinéticos da síntese. Figura adaptada da referência 30.....55

Figura 15. Determinação do tamanho das SiO₂NPs de 110 nm pelo sensor. **(A)** Curvas analíticas (1,3) e gráficos de paridade (2,4) tomando os dados de Z em 0,5 10⁰ (1,2) e 1,0 10³ Hz (3,4). Os conjuntos de treinamento e teste, juntamente com os ajustes de dados e casos ideais, são enfatizados nos gráficos. **(B)** Acurácias resultantes obtidas de Z em 0,5 10⁰ (1) e 1,0 10³ Hz (2). As identificações de cores dos conjuntos de treinamento e teste em **(A)** também são válidas em **(B)**. As amostras foram identificadas de acordo com o tempo de coleta (em h) ao longo da síntese. Figura adaptada da referência 30.56

Figura 16. Determinação do tamanho das SiO₂NPs de 270 nm pelo sensor. **(A)** Curvas analíticas (1,3) e gráficos de paridade (2,4) usando os dados de Z em 0,5 10⁰ (1,2) e 1,0 10³ Hz (3,4). **(B)** Acurácias obtidas considerando Z em 0,5 10⁰ Hz (1) e 1,0 10³ Hz (2). A inserção em (1) mostra uma imagem SEM dessas nanopartículas de sílica maiores. As identificações de cores dos conjuntos de treinamento e teste em **(A)** também são válidas em **(B)**. As amostras foram identificadas de acordo com o tempo de coleta (em h) ao longo da síntese. Figura adaptada da referência 30.57

Figura 17. Monitoramento inter-síntese das SiO₂NPs de 110 nm usando sensores distintos e investigação de adsorção. **(A)** Gráficos de paridade de três sínteses independentes (eletrodos 1, 2 e 3) aplicando a equação da curva analítica previamente obtida para Z em 0,5 10⁰ Hz (eletrodo 1). Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. **(B)** Imagens ópticas do dispositivo e vidro destacado para imagens SEM. **(C)** Nanopartículas adsorvidas em vidro e filme de Au durante a síntese. Imagens SEM, após 0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 24,0 h de síntese, conforme indicado. Para essas imagens, o PDMS foi separado manualmente do vidro para permitir a incidência do feixe SEM no Au. Figura adaptada da referência 30.58

Figura 18. Monitoramento inter-síntese das SiO₂NPs de 110 nm usando sensores distintos e investigação de adsorção. **(A)** Diâmetros por SEM (D_{SEM}) das SiO₂NPs adsorvidas no Au. **(B)** Ilustração do crescimento anisotrópico destas SiO₂NPs como hipotetizado. Figura adaptada da referência 30.59

Figura 19. Monitoramento inter-síntese das SiO₂NPs de 110 nm usando sensores distintos e investigação da adsorção. **(A,B)** Nanopartículas adsorvidas em dois sensores diferentes em regiões semelhantes dos IDEs de Au (veja as áreas destacadas em 1,4 por quadrados coloridos). Os painéis (1,2) e (4,5) são relacionados aos sensores após 24,0 h de síntese das NPs. Enquanto, os painéis (3,6) ilustram áreas após nova exposição ao branco do meio reacional a 900,0 (3) e 1.800,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ (6). Para essas imagens, as lâminas de vidro com os IDEs de Au foram

reversivelmente ligadas com os novos substratos PDMS por meio de pressão mecânica. Figura adaptada da referência 30.	59
Figura 20. Adsorção das SiO ₂ NPs em diferentes superfícies. (A) Imagens SEM no topo do canal milifluídico em PDMS, após 24,0 h de síntese das SiO ₂ NPs de 110 nm. (B) Imagens SEM das minas de grafite HB que atuaram como eletrodos, antes (1) e após (2) a síntese das SiO ₂ NPs de 110 nm. (C) Sensor microfluídico em PDMS com esses eletrodos embutidos. Figura adaptada da referência 30.	61
Figura 21. Análise de AFM-KPFM de uma área (2 μm x 2 μm) abrangendo as SiO ₂ NPs no Au. (A) Mapas 2D de topografia (1) e V _{CPD} (2). (B) Imagem 3D mesclando os dados, onde a escala de cor representa os valores de V _{CPD} . (C) Os perfis de altura (1) e V _{CPD} (2) ao longo de uma linha, está destacada em (1,2) como linhas tracejadas. Figura adaptada da referência 30.	62
Figura 22. Tratamento das features de Z através do SISO para quantificar D _H e C _{NP} através de uma validação cruzada randomizada de 5 vezes usando uma razão de 75/25 para os chamados conjuntos/grupos de treinamento/validação. Do total de amostras, os conjuntos de treinamento/teste foram divididos na proporção de 85/15. Figura adaptada da referência 30.	63
Figura 23. Monitoramento inter-síntese das SiO ₂ NPs de 110 nm e processamento de dados por ML. (A) Importância relativa (%) das features para determinação de D _H (1) e C _{NP} (2), respectivamente, como predito pelo SISO. As features utilizadas nas equações 2 e 3 do SISO estão destacadas em vermelho nos gráficos (1,2). (B) Gráficos de paridade (1,3) e acurácia dos conjuntos de teste (2,4) para os valores de D _H (1,2) e C _{NP} (3,4) para as três sínteses anteriores utilizando SISO. Figura adaptada da referência 30.	65
Figura 24. Monitoramento inter-síntese das SiO ₂ NPs de 110 nm e processamento de dados por ML. Acurácia dos valores de D _H em mais duas sínteses independentes (A) eletrodo 4 e (B) eletrodo 5, usando SISO. Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. Figura adaptada da referência 30.	66
Figura 25. Funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES com FO e plataforma de detecção. Reagentes e plataforma analítica utilizados e monitoramento da funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES com FO, juntamente com uma imagem SEM dessas SiO ₂ NPs-APTES funcionalizadas com FO após 12,0 h.	67
Figura 26. Análise de SEM das SiO ₂ NPs nativas e funcionalizadas com APTES sobre a região do IDEs. Imagens de SEM (1,2) e distribuição de tamanho (3) das (A) SiO ₂ NPs nativas de 108 nm e (B) SiO ₂ NPs-APTES.	69

Figura 27. Caracterização das SiO₂NPs nativas e funcionalizadas por XPS. **(A)** Gráfico de porcentagem relativa do N 1s por XPS. **(B)** Gráfico da porcentagem de evolução da funcionalização (PEF_{N1s}) das SiO₂NPs-APTES com FO. Espectros de XPS em alta resolução do elemento N 1s para as **(C)** SiO₂NPs-APTES-FO após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização. 72

Figura 28. Espectros de XPS em alta resolução do elemento C 1s para as **(A)** SiO₂NPs nativas de 108 nm, **(B)** SiO₂NPs-APTES e **(C)** SiO₂NPs-APTES-FO após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização. 73

Figura 29. Monitoramento em tempo real da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com o FO. **(A)** Gráficos de Bode ângulo de fase depois de 1,0 (1); 4,0 (2) e 6,0 (3) de funcionalização. **(B)** Espectro de Z vs. frequência (Bode) em alguns períodos de síntese, como discriminado. A linha pontilhada separa as frequências correspondentes a região capacitiva e resistiva do sensor. **(C)** Gráficos de Nyquist depois de 1,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3) e 8,0 h (4) de funcionalização. **(D)** Gráficos com os valores dos elementos do circuito equivalente C_{NPs-F} (1), R_{NPs-F} (2), Q_{EDL} (3) e N_{EDL} (4). 74

Figura 30. Monitoramento em tempo real da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com o FO. **(A)** Esquema representando o circuito equivalente. Os elementos do circuito equivalente são: C_{NPs-F}, R_{NPs-F}, Q_{EDL} (região capacitiva) e a R_s (região resistiva). **(B)** Gráficos de impedância vs. tempo em diferentes frequências (1–3). 75

Figura 31. Determinação da PEF_{N1s} da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO pelo sensor. **(A)** Curvas analíticas (1,3) e gráficos de paridade (2,4) tomando os dados de Z_n em 1,0 10¹ (1,2) e 1,0 10³ Hz (3,4). Os conjuntos de treinamento, juntamente com os ajustes de dados e casos ideais, são enfatizados nos gráficos. **(B)** Acurácias resultantes obtidas de Z_n em 1,0 10¹ (1) e 1,0 10³ Hz (2). As amostras foram identificadas de acordo com o tempo de coleta (em h) ao longo da funcionalização com FO. 76

Figura 32. Monitoramento da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO usando sensores distintos e investigação de adsorção. **(A)** Gráficos de paridade de quatro funcionalizações independentes (eletrodos 1, 2, 3 e 4) aplicando a equação da curva analítica previamente obtida para Z_n em 1,0 10¹ Hz (eletrodo 1). Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. **(B)** Imagens ópticas do dispositivo e vidro destacado para imagens SEM. **(C)** Nanopartículas adsorvidas sobre a região dos IDEs. Imagens SEM, após 12,0 h de funcionalização para dois dispositivos distintos (eletrodos 1 e 2), conforme indicado. 77

Figura 33. Monitoramento da funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES com FO e processamento de dados por ML. (A) Importância relativa (%) das features para determinação da PEF _{N1s} , como predito pelo SISO. As features utilizadas na equação 4 do SISO estão destacadas em cinza no gráfico. (B) Gráfico de paridade do conjunto de treinamento para os valores de PEF _{N1s} de uma funcionalização obtido utilizando o SISO.	79
Figura 34. Monitoramento da funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES com FO e processamento de dados por ML. (A) Acurácia dos valores de PEF _{N1s} para quatro funcionalização separadamente (eletrodos de 1 a 4) por SISO. Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. (B) Acurácia média dos valores de PEF _{N1s} das quatro funcionalizações por amostra usando SISO.	80
Figura A1. Estrutura química do ácido fólico empregado na segunda etapa de funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES.	96
Figura A2. Monitoramento em tempo real das SiO ₂ NPs de 110 nm. Gráficos de Bode ângulo de fase depois de (A) 12,0 e (B) 21,0 h de síntese. Gráfico de Nyquist depois de (C) 21,0 h de síntese.	98
Figura A3. Análise de SEM dos métodos de adsorção das SiO ₂ NPs-APTES sobre a região do IDEs. Imagens de SEM dos três tipos de preparo: (A) fluxo de 900,0 µL min ⁻¹ das NPs por meio da bomba peristáltica, (B) injeção da dispersão com uma seringa de 1,0 mL e (C) gota com as NPs, sem espalhar com uma microponteira.	99
Figura A4. Análise de SEM das SiO ₂ NPs-APTES-FO sobre substrato de silício. (A) Imagens de SEM (1,2) e (B) distribuição de tamanho.	99
Figura A5. Reação de equilíbrio da molécula de ácido fólico demonstrando a forma ácida e básica (R= C ₁₂ H ₁₃ O ₅ N ₂). Nesta imagem é representada a estrutura do ácido fólico que fica disponível no meio e que irá interagir com o receptor folato. ¹¹⁵	100
Figura A6. Espectros de XPS em alta resolução do elemento N 1s para as (A) SiO ₂ NPs nativas de 108 nm e (B) SiO ₂ NPs-APTES.	100
Figura A7. Espectros de XPS em alta resolução do elemento O 1s para as (A) SiO ₂ NPs nativas de 108 nm, (B) SiO ₂ NPs-APTES e (C) SiO ₂ NPs-APTES-FO após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização.	100
Figura A8. Espectros de XPS em alta resolução do elemento Si 2p para as (A) SiO ₂ NPs nativas de 108 nm, (B) SiO ₂ NPs-APTES e (C) SiO ₂ NPs-APTES-FO após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização.	101

Figura A9. Monitoramento em tempo real da lixiviação com DMSO/MES das SiO ₂ NPs-APTES. (A, B e C) Gráficos de Z vs. tempo em diferentes frequências demonstrando a estabilização do sinal de impedância após 2,5 horas.....	101
Figura A10. Monitoramento em tempo real da funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES com FO. Gráficos de Bode ângulo de fase após 8,0 h de funcionalização.....	101
Figura A11. QRC com direcionamento ao arquivo PDF do artigo referente à parte I do trabalho publicado no periódico <i>ACS Sensors</i> ³⁰ da editora <i>American Chemical Society</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetros médios das SiO ₂ NPs obtidos por DLS (D _H) e SEM (D _{SEM}). As SiO ₂ NPs se encontravam dispersas em meio etanólico (EtOH). Tabela adaptada da referência 30	48
Tabela 2. IRDT (nm e %) em cada região para as SiO ₂ NPs de 270 nm. Figura adaptada da referência 30	51
Tabela 3. Constantes para D _H e C _{NP} obtidas pelo SISO. Tabela adaptada da referência 30.	64
Tabela 4. Erro percentual médio absoluto (mean absolute percentual erros, MAPE) para D _H e C _{NP} usando os descritores SISO. Tabela adaptada da referência 30	66
Tabela 5. Porcentagem relativa dos elementos para as diferentes amostras analisadas por XPS	71
Tabela 6. Constantes para PEF _{N1s} obtidas pelo SISO	78
Tabela 7. Erro percentual médio absoluto (mean absolute percentual erros, MAPE) para PEF _{N1s} usando o descritor SISO	79
Tabela A1. Definição dos números subscritos das “features de Z” obtidas pelo sensor e avaliadas pelo SISO. Em vermelho estão destacadas as frequências presentes nas equações 2 e 3. Tabela adaptada da referência 30.....	98
Tabela A2. Definição dos números subscritos das “features de Z _n ” obtidas pelo sensor e avaliadas pelo SISO. Em vermelho estão destacadas as frequências presentes na equação 4.	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	<i>atomic force microscopy</i>
APTES	(3-aminopropil)trietoxisilano
BET	Brunauer-Emmett- Teller
C	concentração mássica em g L^{-1}
C_{DLS}	concentração das SiO_2NPs por DLS
C_{EDL}	capacitância da <i>electric double-layer</i>
C_{NP}	concentração das nanopartículas
$C_{\text{NPs-F}}$	capacitância das nanopartículas funcionalizadas
$C_1\text{-}C_6$	constantes das equações obtidas por SISSO
DMSO	dimetilsulfóxido
$d_{\text{sílica}}$	densidade da sílica
d.e.	diâmetro externo
D_{H}	diâmetro hidrodinâmico médio
d.i.	diâmetro interno
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DLVO	teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
D_{SEM}	diâmetro por SEM das SiO_2NPs
EDC	<i>1-(3-dimethylami-nopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride</i>
EDL	<i>electric double-layer</i>
EIE	espectroscopia de impedância elétrica
ENMs	engenharia de nanomateriais
FDA	<i>food and drug administration</i>
FDM	<i>fused deposition modeling</i>
FO	ácido fólico
FR	<i>folate receptor</i>
IRDT	incremento relativo do diâmetro total
ISG	<i>in situ seeded growth</i>
IDEs	<i>interdigitated electrodes</i>
kcps	<i>kilo counts per second</i>
K_{d}	afinidade de interação

KPFM	<i>Kelvin probe force microscopy</i>
MADLS	<i>multi-angle dynamic light scattering</i>
MAPE	<i>mean absolute percentual erros</i>
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer</i>
ML	<i>machine learning</i>
m_{NP}	<i>massa das SiO₂NPs</i>
N_{EDL}	<i>expoente de Q_{EDL}</i>
NHS	<i>N-hydroxysuccinimide</i>
NMs	<i>nanomateriais</i>
NNI	<i>national nanotechnology initiative</i>
NPs	<i>nanopartículas</i>
OCP	<i>open circuit potential</i>
PB	<i>phosphate buffered</i>
PDI	<i>polydispersity indexes</i>
PDMS	<i>polidimetilsiloxano</i>
PEF_{N1s}	<i>porcentagem de evolução da funcionalização do N 1s</i>
PLA	<i>polylactic acid</i>
PMMA	<i>poli(metacrilato de metila)</i>
pH	<i>potencial hidrogeniônico</i>
pI	<i>ponto isoelétrico</i>
P_V	<i>ponto de virada</i>
Q_{NPs}	<i>capacitância das NPs representado pelo <i>constant phase element</i></i>
Q_{EDL}	<i>capacitancia da EDL representado pelo <i>constant phase element</i></i>
QRC	<i>quick response code</i>
RMS	<i>root mean square</i>
RMSE	<i>root mean square error</i>
R_{NPs-F}	<i>resistência das nanopartículas funcionalizadas</i>
R_{NPs}	<i>resistência das nanopartículas</i>
R_s	<i>resistência da solução</i>
r_{SEM}	<i>raio das SiO₂NPs por SEM</i>
R1-R4	<i>regiões 1 a 4</i>
R^2	<i>coeficiente de determinação</i>
S ₁ - S ₂	<i>síntese 1 e 2 das SiO₂NPs</i>

SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SLA	<i>stereolithography</i>
SiO ₂ NPs	nanopartículas de sílica
SiO ₂ NPs-APTES	nanopartículas de sílica + APTES
SiO ₂ NPs-APTES-FO	nanopartículas de sílica + APTES + ácido fólico
SSA _{BET}	<i>specific surface área by BET</i>
SSA _{GEO}	<i>geometric specific surface área</i>
SISSO	<i>sure independence screening and sparsifying operator</i>
TEOS	tetraetilortosilicato
V _{CPD}	potencial de contato
V _{esfera}	volume esférico das SiO ₂ NPs
WE	<i>working electrode</i>
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>
Z	impedância
Z _{exp}	impedância experimento
Z _n	impedância normalizada
Z ₁ -Z ₁₈	<i>features</i> de entrada do SISSO
Z _{n 1} -Z _{n 14}	<i>features</i> de entrada do SISSO
Z _{ref}	impedância referência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. A consumerização da nanotecnologia	23
1.2. Nanopartículas de sílica	23
1.3. Caracterização de superfície e a relevância de análises em tempo real e <i>in-situ</i> ...	24
1.4. Controle de qualidade de nanomateriais.....	25
1.5. Funcionalização das nanopartículas de sílica	25
1.6. Nossa proposta	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	32
3.1. Materiais.....	32
3.2. Fabricação dos chips de vidro/PDMS	32
3.3. Fabricação do dispositivo <i>Bubble trap</i>	34
3.4. Selagem reversível dos <i>chips</i> por meio de pressão mecânica.....	35
3.5. Síntese em batelada das SiO ₂ NPs de 108, 110 e 270 nm.....	36
3.6. Funcionalização das SiO ₂ NPs de 108 nm sobre o eletrodo	36
3.7. Caracterização das SiO ₂ NPs sem e com funcionalização.....	37
3.8. Monitoramento <i>in-situ</i> das SiO ₂ NPs pelo sensor ao longo da síntese	40
3.9. Monitoramento <i>in-situ</i> da funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES com FO pelo sensor.....	41
3.10. <i>Machine learning</i>	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Síntese das SiO ₂ NPs e sensor capacitivo.....	43
4.2. Caracterização das SiO ₂ NPs.....	46
4.3. Monitoramento da síntese das SiO ₂ NPs em tempo real pelo sensor	53
4.4. Determinação do tamanho das SiO ₂ NPs e reprodutibilidade do sensor	56
4.5. Reprodutibilidade.....	58
4.6. Reprodutibilidade garantida por ML.....	63
4.7. Funcionalização das SiO ₂ NPs-APTES com FO e sensor capacitivo	67
4.8. Caracterização das SiO ₂ NPs funcionalizadas com APTES e FO.....	68

4.9.	Composição química da superfície das SiO₂NPs com e sem funcionalização por XPS	71
	
4.10.	Monitoramento da funcionalização das SiO₂NPs com ácido fólico pelo sensor.	73
4.11.	Determinação da porcentagem de evolução da funcionalização	76
4.12.	Reprodutibilidade	77
4.13.	Reprodutibilidade garantida por ML	78
5.	CONCLUSÕES	81
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. A consumerização da nanotecnologia

Nas últimas décadas, os avanços na área da nanotecnologia têm contribuído para o desenvolvimento da engenharia de vários nanomateriais (ENMs) com diferentes formas e tamanhos, por exemplo, nanofios, nanopartículas (NPs) metálicas e semicondutoras, nanotubos de carbono e grafeno.¹⁻⁵ Esses nanomateriais se expandiram em uma ampla variedade de aplicações devido às suas propriedades físico-químicas exclusivas, como a alta relação área de superfície/volume que leva a maiores reatividade e capacidade de direcionamento para um determinado alvo por meio de sua funcionalização.^{2,3,6-8} O Nanodatabase, um inventário europeu online de produtos comerciais baseados em nanomateriais,⁹ lista atualmente um total de 5.000 produtos, especialmente distribuídos nas categorias automotiva (11%), casa e jardim (17%) e saúde e *fitness* (62%). Um número tão expressivo mostra que a nanotecnologia atingiu a era da consumerização,¹⁰ em que os produtos são concebidos para indivíduos como consumidores finais. Os nanomateriais passaram dos laboratórios para a vida real e, atualmente, estão presentes em nossas casas, roupas e outros utensílios de uso diário. Devido ao grande desenvolvimento de novos nanomateriais, o *Precedence Research*, uma organização mundial de pesquisa e consultoria de mercado, está projetando que o mercado global de nanotecnologias até 2030 atingirá 288,7 bilhões de dólares.¹¹ Enquanto isso, o *Food and Drug Administration* (FDA) desde 2009, investiu de forma cumulativa cerca de 133,0 milhões de dólares em pesquisas pautadas em nanotecnologia.¹²

1.2. Nanopartículas de sílica

Em particular, as NPs inorgânicas são clinicamente relevantes, pois podem ser aplicadas em vacinas, regeneração de tecidos, *drug delivery*, imagens e implantes.^{2,13-15} As NPs de sílica (SiO₂NPs) se destacam por apresentarem porosidade e tamanho modulares, funcionalização versátil, síntese simples, de baixo custo e escalonável,¹⁶⁻¹⁸ alta estabilidade térmica, capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos¹⁵ e toxicidade reduzida.^{5,17,19-21} Essas nanopartículas ainda possuem um potencial significativo para melhorar a segurança e eficácia do tratamento, pois aumentam a estabilidade de cargas encapsuladas, promovem o transporte através de diferentes membranas biológicas e prolongam o tempo de circulação.^{22,23} Essas propriedades podem proporcionar respostas terapêuticas específicas do paciente, facilitando o desenvolvimento de medicamentos personalizáveis para a denominada medicina de precisão.^{24,25}

As SiO₂NPs também têm sido usadas para catálise, para remediação na agricultura, como aditivos químico nas indústrias de biotecnologia e alimentícia.²⁶ No campo teórico, as SiO₂NPs obtidas pela síntese de Stöber são consideradas um colóide modelo para diversas investigações fundamentais, como estudos sobre coroa de proteína,²¹ degradação biológica²⁷ e estabilidade coloidal frente a biointerações.²⁸ Isso ocorre por essas NPs serem esféricas, monodispersas e envolverem um mecanismo de síntese que pode ser explicado pelas etapas tradicionais de nucleação e crescimento.²⁹

1.3. Caracterização de superfície e a relevância de análises em tempo real e *in-situ*

Os métodos convencionais de caracterização usados para avaliar a morfologia, topografia e composição química de materiais em nanoescala incluem microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy*, SEM), espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering*, DLS), análise gravimétrica, espectroscopia de fotoelétrons por raios-X (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS), microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*, AFM), entre outros.^{28,30} Embora essas técnicas forneçam informações precisas sobre o tamanho, estrutura e química da superfície do nanomaterial, elas normalmente requerem instrumentação cara, análises demoradas, preparação laboriosa de amostras e técnicos qualificados para sua operação.^{31,32} Adicionalmente, essas técnicas enfrentam limitações para o monitoramento em tempo real e *in-situ* (ao longo da síntese) de nanomateriais.

Considerando as desvantagens associadas às técnicas tradicionais de caracterização, o desenvolvimento de plataformas de detecção simples e escalonáveis capazes de monitorar a síntese em tempo real e *in-situ* de NMs permanece uma tarefa desafiadora.^{31,32} Em particular, esse tipo de análise das propriedades físico-químicas (tamanho e concentração) das SiO₂NPs traz implicações relevantes para a área de ciência de materiais. Essas informações podem, por exemplo, ser empregadas em estudos sobre a cinética de síntese, a eficiência de funcionalização e fenômenos coloidais, como a formação da coroa de proteína e agregação das nanopartículas, contribuindo para a síntese de NPs estáveis em meios complexos (exemplo: fluidos corporais) e com capacidade de direcionamento, atributos cruciais no que tange à sua aplicação para a entrega *in-vivo* de fármacos.^{21,33} Plataformas capazes de fornecer o monitoramento em tempo real e *in-situ* das SiO₂NPs podem também levar a uma rápida triagem das suas propriedades finais objetivando um controle de qualidade otimizado na indústria e na academia, conforme discutido a seguir.^{1,34-36} Abordamos também a importância em realizar o monitoramento da modificação química das NPs.

1.4. Controle de qualidade de nanomateriais

A produção em larga escala de nanomateriais com uma baixa variabilidade lote a lote em termos de defeitos, tamanho, forma, quiralidade e estabilidade é ainda um desafio.^{1,34-}

³⁶ De fato, a falta de reprodutibilidade na síntese de diversos nanomateriais foi anos atrás reconhecida pela Iniciativa Nacional de Nanotecnologia dos EUA (*National Nanotechnology Initiative*, NNI) como um dos principais obstáculos contra o desenvolvimento comercial e aplicações mais amplas de nanotecnologias.^{1,31} Essa falta de reprodutibilidade nos lotes de nanomateriais altera o desempenho dos produtos de forma não sistemática, sendo, assim, um gargalo para o lançamento de nanotecnologias no mercado. O aumento de escala da síntese de NMs inorgânicos é difícil de ser obtido de maneira reprodutível em reatores de batelada industriais uma vez que as grandes dimensões envolvidas impactam sensivelmente a reação em termos de uniformidade de mistura e gradiente térmico. Desse modo, mesmo pequenas flutuações nas condições experimentais podem variar as etapas de nucleação e crescimento, prejudicando a reprodutibilidade do processo.^{37,38}

Há, assim, uma necessidade crítica pelo desenvolvimento de sensores que possam permitir o monitoramento *in-situ* e em tempo real de partículas em nanoescala ao longo da sua síntese, proporcionando uma triagem rápida e processos de tomada de decisão mais eficazes. O dimensionamento por paralelização de sistemas microfluídicos é uma alternativa poderosa para resolver os problemas de síntese em lote, pois permite transferências eficientes de calor e de massa, garantindo um aumento de escala mais previsível. Nesse caso, no entanto, um obstáculo é ainda assegurar um comportamento fluídico uniforme ao longo de todo o conjunto de reatores.³⁸

1.5. Funcionalização das nanopartículas de sílica

Com o passar dos anos, a nanomedicina tem se tornado um campo emergente da nanotecnologia, capaz de combinar o conhecimento das ciências farmacêuticas, biomédicas e de ciência de materiais na produção de nanofármacos.³⁹ O interesse em criar nanomedicamentos surgiu devido às propriedades físico-químicas únicas que um material possui quando em escala nanométrica. Essas dimensões nano proporcionam um aumento na área superficial das NPs, intensificando as suas interações químicas com as espécies disponíveis no meio. Segundo Bobo e colaboradores,³⁹ nanomedicamentos são drogas ou produtos biológicos que são administrados por via intravenosa ou oral e que contêm em sua composição nanopartículas (1–100 nm) que

levam a uma melhora no direcionamento do fármaco, gerando um aumento da sua eficiência clínica e uma diminuição da sua toxicidade. Assim, pesquisas têm sido feitas com o foco em entender como os conjugados de nanopartículas/medicamentos interagem com os fluidos corporais.^{3,39-41}

Diversos estudos têm apontado que as SiO₂NPs seriam uma alternativa promissora para ser utilizada como nanomedicamento devido à sua biocompatibilidade elevada, facilidade de excreção pela urina²⁷ e funcionalização versátil, permitindo a modificação da superfície com direcionadores voltados para diferentes tecidos.^{5,17,19-21,28,33} NPs funcionalizadas com grupos químicos específicos possibilitam o direcionamento *in-vivo* de fármacos ao alvo de interesse, reduzindo os efeitos colaterais causados pelo tratamento quimioterápico convencional.^{39,41,42} Tal direcionamento se dá através do ancoramento de biorreceptores sobre as NPs que interagem seletivamente com o sítio de interação do alvo de interesse. Por outro lado, quando as SiO₂NPs são adicionadas em meios biológicos (por exemplo, *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) ou com uma força iônica alta, ocorre a agregação do sistema.^{33,43} Além dessa baixa estabilidade coloidal, outro desafio está ligado ao direcionamento das SiO₂NPs. Normalmente, quando as NPs são administradas por via intravenosa, a sua primeira interação é com o sangue.^{44,45} Em consequência, as nanopartículas são revestidas por uma camada contendo diferentes proteínas, denominada “coroa de proteínas” (*protein corona*), a qual leva a uma alteração considerável nas características superficiais das NPs ocasionando, muitas vezes, um mascaramento da funcionalidade de interesse. Existem diversos fatores que mudam a composição da coroa de proteínas, sendo eles ligados à constituição do nanomaterial, suas propriedades físico-químicas e o ambiente fisiológico de interação, entre outros.^{44,45}

Embora testes clínicos tenham apontado o emprego potencial das SiO₂NPs como nanomedicamentos,^{46,47} elas ainda não alcançaram sucesso comercial o que se deve, certamente, aos desafios de estabilidade e direcionamento como discutidos anteriormente. O FDA, por exemplo, ainda não aprovou nenhuma formulação farmacêutica composta por SiO₂NPs.³⁹ O FDA conta com 51 nanofármacos aprovados para comercialização, os quais constituem-se de nanopartículas poliméricas ou lipídicas. Nesses casos, a sua interação com o alvo ocorre via direcionamento passivo, ou seja, os medicamentos se acumulam de modo não específica sobre os tecidos doentes, como tumores no caso do câncer.^{39,48} Assim, dadas as vantagens do direcionamento ativo, ou seja, uma maior eficiência clínica e menor toxicidade, pesquisas em estratégias de funcionalização química que visem a geração de SiO₂NPs estáveis em fluidos corporais e com uma alta capacidade de direcionamento são essenciais para avanços na

produção de nanomedicamentos aplicáveis na nossa vida cotidiana.³⁹ Nesse contexto, vale também destacar a relevância do desenvolvimento de plataformas analíticas que possibilitem e facilitem, por exemplo, o estudo cinético da funcionalização das SiO₂NPs com direcionadores. Esse estudo contribui para a compreensão dos fenômenos de química de superfície e permite a obtenção de NPs funcionalizadas reproduzíveis em um menor tempo.

Para funcionalização das SiO₂NPs com direcionadores, organossilanos como o (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) podem atuar como intermediários de imobilização. Uma das aplicações do APTES é o ancoramento do ácido fólico (FO) sobre SiO₂NPs para interações específicas com células tumorais.^{49,50} Essa espécie interage com receptores (*folate receptor*, FR) que são superexpressos na superfície de células cancerígenas de ovário, cérebro, mama, endométrio, próstata, rins, e pulmão.⁵¹ Assim, o FO vem sendo utilizado no desenvolvimento de biossensores e em diversas aplicações nanomédicas.⁵² Por exemplo, SiO₂NPs encapsulando fármacos como a doxorrubicina e modificadas superficialmente com FO (direcionador tumoral) podem ser usadas como nanomedicamentos, cuja ação terapêutica se dá através da liberação do fármaco.⁵³

1.6. Nossa proposta

Empregando um sensor milifluídico impedimétrico e método de tratamento de dados por ML, apresentamos nesta tese a primeira tentativa de monitorar em tempo real e de maneira *in-situ* a síntese de SiO₂NPs através de uma única medida. Mais especificamente, utilizando eletrodos de ouro (Au) polarizáveis para medidas de impedância (Z), alcançamos a determinação *in-situ* de múltiplos parâmetros (tamanho e concentração) das SiO₂NPs ao longo da sua síntese a partir de um único espectro de Z em função da frequência. Apesar do caráter universal (não seletivo) da técnica de espectroscopia de impedância elétrica (EIE), equações simples geradas por ML foram capazes de superar as interferências originadas da adsorção gradual das nanopartículas sobre os eletrodos, fornecendo a multideterminação reproduzível e acurada do tamanho e da concentração das SiO₂NPs. Em uma segunda parte deste trabalho, a nossa plataforma também permitiu a análise em tempo real e *in-situ* do nível de funcionalização de SiO₂NPs-APTES com ácido fólico, o qual pode ser usado para fins de diagnóstico e tratamento do câncer mediante o desenvolvimento de nanomedicamentos, como supracitado.^{49,50}

Os sensores multidimensionais ou línguas eletrônicas são promissores para análises que envolvem múltiplos interferentes ou espécies de interesse uma vez que eles podem garantir

o reconhecimento de amostras complexas sem o uso de receptores específicos. Tais dispositivos respondem a uma classe de compostos com sensibilidades distintas (sensibilidade cruzada), produzindo espectros de alta diversificação química que servem como padrões de resposta específicos para cada amostra (impressões digitais).⁵⁴ Tais respostas podem ser tratadas por métodos estatísticos não supervisionados e supervisionados visando classificações e/ou análises quantitativas (regressões).⁵⁵⁻⁵⁷ Enquanto as línguas eletrônicas impedimétricas são geralmente baseadas em sondas (eletrodos) diferentes, dispositivos baseados em apenas um tipo de sonda podem também ser capazes de fornecer padrões de resposta, o que se dá pela alta diversificação química dos espectros de Bode (Z vs. frequência).^{31,54,58-61} Portanto, além de possibilitar uma fabricação mais rápida e simples comparados com os sensores multi-sonda, os dispositivos com um único material de eletrodo podem fornecer análises discriminatórias a partir de uma única medida de Z , como temos observado em nosso grupo.^{30,31,59,61-63} O sensor empregado consistiu em um dispositivo milifluídico de vidro/polidimetilsiloxano (PDMS), compreendendo filmes finos de Cr/Au (sobre o vidro) como eletrodos idealmente polarizáveis (*interdigitated electrodes*, IDEs) para a realização de medidas não faradaicas de Z .

Para a determinação do tamanho e concentração das SiO₂NPs ao longo da síntese, a reprodutibilidade foi prejudicada devido à adsorção das nanopartículas sobre os eletrodos e as regiões de *gap* do vidro (entre os IDEs). Nesse sentido, um modelo de multi-regressão usando o método supervisionado *sure independence screening and sparsifying operator* (SISSO)⁶⁴ foi crucial para permitir essa multideterminação com reprodutibilidade e acurácia elevadas. Como vantagens, essa abordagem (i) opera através da obtenção de descritores (equações matemáticas) simples, com um baixo número de variáveis (em geral, de 6, em nosso caso), e (ii) requer um número de amostras baixo para o treinamento do algoritmo.^{30,60-62,65-67} Algumas das *features* primárias (dados de entrada, ou seja, os dados de Z vs. frequência em nosso caso) foram selecionadas para gerar os descritores de baixa dimensionalidade. Logo, na prática, como observado em métodos univariados os quais se baseiam em equações de regressão linear, o uso desses descritores do SISSO também resulta em um processo de tratamento de dados simples. Os dados obtidos com o monitoramento *in-situ* das SiO₂NPs ao longo da síntese foram publicados no periódico *ACS Sensors*³⁰ da editora *American Chemical Society*.

O SISSO foi também usado para determinação reprodutível e acurada do nível de funcionalização das SiO₂NPs com ácido fólico utilizando o APTES como um intermediário de imobilização. O FO possui uma alta afinidade de interação (K_d : $\sim 10^{-10}$ mol L⁻¹)^{49,51} com o FR. As SiO₂NPs foram modificadas quimicamente com FO via a formação de ligações amida por

meio da ativação de grupos carboxílicos usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida cloridrato (*1-(3-dimethylami-nopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride*, EDC) e N-hidroxisuccinimida (*N-hydroxysuccinimide*, NHS).⁴⁹⁻⁵² A porcentagem da evolução de funcionalização (PEF_{N1s}) do conjugado SiO₂NP-APTES com FO foi expressa pela quantidade relativa de N 1s, obtida por XPS para tempos de modificação de até 6,0 h. Os dados obtidos nessa segunda parte do projeto serão submetidos em breve também ao periódico *ACS Sensors*.

Importante destacar que para adquirir um equipamento como o DLS ou XPS o investimento seria acima de 500 mil dólares. Enquanto, no caso da nossa plataforma somando todos os equipamentos envolvidos (33 mil reais, incluso o potenciostato portátil Sensit BT), sensor vidro/PDMS (22,50 reais) e *bubble trap* (16,50 reais), o valor total seria de aproximadamente 28 mil reais, ou seja, ~1% do valor gasto para comprar um DLS. Nota-se que nossa plataforma tem um custo muito inferior aos equipamentos convencionais, sendo muito mais vantajosa a sua aquisição.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver uma plataforma alternativa para o monitoramento *in-situ* de nanomateriais pela técnica de EIE, o que inclui: i) o monitoramento do tamanho e da concentração das SiO₂NPs ao longo da sua síntese (24,0 h) a partir de uma única medida e (ii) o monitoramento da funcionalização de SiO₂NPs-APTES com FO (direcionador). A plataforma consiste em um sensor milifluídico contendo IDEs de Au e tratamento dos dados por ML.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos principais deste trabalho são, em resumo, a fabricação de um sensor milifluídico impedimétrico, caracterização das SiO₂NPs (sem e com funcionalização) e a aplicação deste dispositivo em estudos *in-situ* e em tempo real da síntese dessas NPs e da sua funcionalização com ácido fólico.

Abaixo é possível verificar de forma mais detalhada cada uma das etapas desenvolvidas para as partes i) e ii) do projeto.

Parte I

- Fabricar de forma reprodutível um sensor milifluídico impedimétrico com eletrodos idealmente polarizáveis.
- Avaliar o comportamento cinético e a reprodutibilidade da síntese das SiO₂NPs em termos de tamanho e concentração usando técnicas convencionais.
- Avaliar a eventual interferência do sensor nas propriedades finais das NPs.
- Investigar a área superficial e a estabilidade coloidal das NPs.
- Compreender o princípio de detecção, ou seja, extrair o circuito RC equivalente das medidas de Z e interpretar as resistências e capacitâncias ajustadas em termos de fenômenos interfaciais.
- Avaliar as respostas do sensor ao longo do monitoramento *in-situ* das NPs.
- Determinar o tamanho das SiO₂NPs ao longo da síntese usando o sensor através do método de curva analítica, ou seja, de ajustes de regressão linear.
- Examinar a reprodutibilidade do método usando o método univariada de regressão linear para o monitoramento do tamanho das NPs.

- Avaliar a passivação dos eletrodos pelas adsorções não específicas das SiO₂NPs ao longo da síntese usando as técnicas de SEM e AFM acoplado com KPFM (*atomic force-Kelvin probe force microscopy*).
- Realizar determinações acuradas e reprodutíveis do tamanho e concentração das NPs usando ML para tratamento dos dados do sensor.

Parte II

- Para a parte do projeto de monitoramento da funcionalização de SiO₂NPs-APTES com FO, a primeira etapa foi avaliar o tamanho, a homogeneidade, o formato, a carga superficial e a estabilidade coloidal de SiO₂NPs nativas (108 nm) e dos conjugados SiO₂NP-APTES e SiO₂NP-APTES-FO através do uso de técnicas convencionais.
- Avaliar o método de preparo dos eletrodos com as SiO₂NPs-APTES.
- Compreender o princípio de detecção.
- Avaliar as respostas do sensor ao longo do monitoramento *in-situ* do processo de funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO.
- Determinar a porcentagem de evolução da funcionalização, PEF_{N1s}, das SiO₂NPs-APTES com FO ao longo da síntese usando o sensor através do método de curva analítica (regressão linear).
- Examinar a reprodutibilidade do método através da utilização de regressão linear.
- Realizar determinação acurada e reprodutível dos valores de PEF_{N1s} usando ML para tratamento dos dados de Z_n.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Tetraetoxissilano (TEOS, 98%), hidróxido de amônio (NH₄OH 28–30% v/v em água, reagente ACS), fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES, 98%), N-hidroxissuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil)carbodiimide (EDC, líquido), dimetilsulfóxido (DMSO, 99,5%), ácido fólico (FO), ácido 4-morfolineetanossulfônico (MES) e cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O etanol (P.A.) foi obtido da Merck. O polidimetilsiloxano (PDMS) e o agente de cura do elastômero de silicone Sylgard 184 foram adquiridos da Dow Corning. A água usada em todos os procedimentos foi obtida de um sistema de purificação de água (Purelab ELGA) com resistividade igual a 18,2 MΩ cm⁻¹.

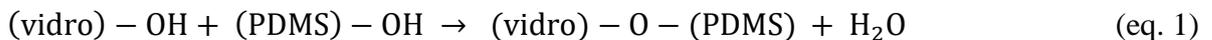
3.2. Fabricação dos chips de vidro/PDMS

Foram fabricados dispositivos de vidro/PDMS, nos quais os eletrodos foram fabricados sobre o vidro e os canais milifluídicos foram construídos em PDMS. O método de fabricação envolve os seguintes passos: (1) fotografação do fotorresiste para demarcação dos eletrodos, (2) deposição por *sputtering* (pulverização catódica) dos eletrodos (Cr/Au) em vidro, (3) confecção do milicanal em PDMS por moldagem de réplica e (4) selagem do dispositivo para a união dos substratos de vidro e PDMS.^{68–70} Esse método de fabricação é bastante difundido no nosso grupo de pesquisa, visto que já foi reportado em diversos artigos.^{71–73}

Primeiramente, as lâminas de vidro foram limpas com detergente e secas com nitrogênio (N₂). Depois, o resiste positivo S1811 foi depositado sobre a lâmina por rotação (*Spinning*- Headway Research Inc. EC101DT) a 3000 rpm por 25 s gerando um filme fino. Posteriormente, um pré-aquecimento foi feito a 115 °C por 3 min. A fotografação do fotorresiste foi realizada por meio da exposição a luz UV com o auxílio de fotoalinhadora (Karl Suss MJB 3 UV 200) por 20 s, composta por uma lâmpada UV com comprimento de onda de 200 nm em uma potência de 9,5 W, usando uma máscara metálica para a definição da geometria dos IDEs. Para a etapa de revelação, as lâminas de vidro foram mergulhadas em uma solução de revelador MIF 312 50% v/v em água (v/v) por aproximadamente 20 s. Após essa etapa, foi feita a lavagem em água deionizada e secagem com fluxo de N₂. Os resíduos foram removidos após exposição a plasma de O₂ (Plasma Technology, Power Supply Eni Power System ACG-3) por 2 min. Em seguida, filmes finos de Cr (200 Å) e Au (1100 Å) foram depositados por *sputtering* (Balzers BA510) para geração dos eletrodos. A camada de Cr tem por finalidade

promover uma maior adesão do Au ao vidro. Por fim, o *lift-off* foi realizado em acetona, gerando os padrões dos eletrodos de Cr/Au. Os IDEs apresentaram 30 pares de dígitos, cada um com 3,0 mm de comprimento e 40,0 μm de largura. Os dígitos foram também separados entre si por 40,0 μm .⁶⁸⁻⁷⁰ Uma imagem ampliada dos IDEs segue ilustrada no tópico **4.1**.

A fabricação do canal milifluídico foi realizada por moldagem de réplica. Para isso, monômeros de PDMS foram adicionados ao seu agente de cura numa razão 10:1 m/m. Após remoção das bolhas geradas em dessecadora acoplada a uma bomba de vácuo por 30 min, esse elastômero foi despejado no molde onde, ao centro do mesmo, uma peça de alumina foi fixada para formação do canal. O canal milifluídico teve 2,0 mm de largura, 1,3 mm de altura e 2,0 cm de comprimento. Ademais, mangueiras de silicone (1,0 mm de diâmetro interno, d.i.) foram alinhadas ao molde nas regiões de entrada e saída de fluxo com o auxílio de orifícios presentes em peças de acrílico. Essas mangueiras foram utilizadas para acesso aos reservatórios do *chip*, permitindo o fluxo dentro do milicanal após a sua selagem. A cura do PDMS foi realizada a 100 °C por 45 min sobre chapa térmica. Por apresentar baixa energia superficial, o PDMS foi facilmente desmoldado permitindo a reutilização do molde.⁶⁸⁻⁷⁰ Por fim, o substrato de PDMS foi selado contra a lâmina de vidro (incorporando os eletrodos), gerando o sensor eletroquímico milifluídico como mostra a **Figura 1**. Essa selagem foi obtida após a oxidação das superfícies do polímero e do vidro em plasma de O₂ por aproximadamente 20 s. Em seguida, as lâminas de vidro foram colocadas em contato com as peças de PDMS por alguns segundos sob pressão manual. Uma selagem irreversível foi então obtida graças a reações de condensação entre os grupos silanois ($-\text{O}_n\text{Si}(\text{OH})_{4-n}$) presentes tanto na superfície do PDMS (gerados pela oxidação em plasma) como na superfície do vidro. Esses grupos reagem entre si por condensação, formando ligações químicas covalentes (eq. 1).⁶⁸⁻⁷⁰



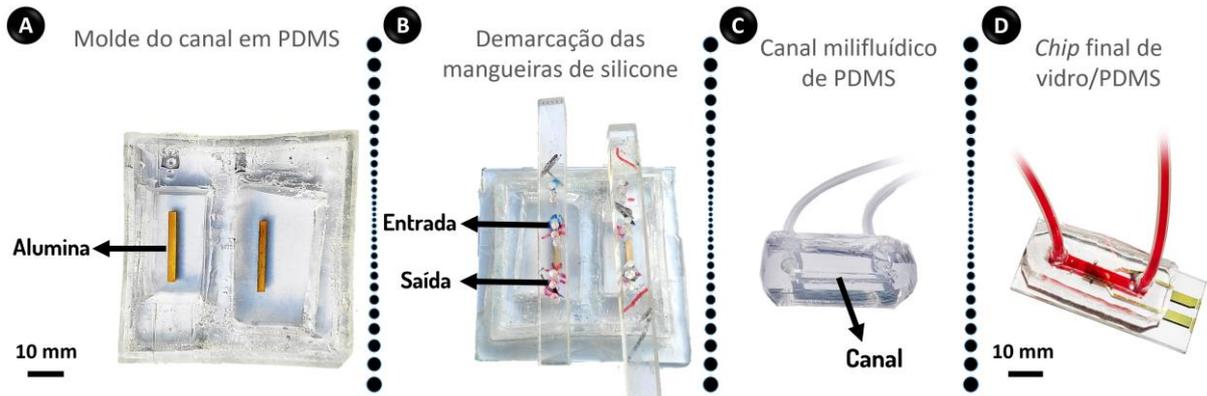


Figura 1. Etapas para a fabricação do *chip* de vidro/PDMS. (A) Molde do milicanal em PDMS com a peça de alumina, (B) demarcação para inserção das mangueiras de silicone (1,0 mm de d.i.) para a entrada e saída da síntese e (C) o substrato de PDMS com o canal milifluídico. (D) *Chip* final de vidro/PDMS com os eletrodos em Cr/Au.

Outro sensor microfluídico que foi aplicado para avaliar a adsorção das SiO_2NPs ao longo da síntese consistiu em um dispositivo contendo minas de lápis de grafite HB como eletrodos, que foram inseridas reversivelmente em um microchip em PDMS de peça única. De acordo com trabalhos anteriores do nosso grupo,^{59,60} o dispositivo em PDMS foi fabricado pelo método de polimerização, sem sala limpa e apenas pela remoção de *scaffold* (*polymerization and scaffold removal*, PSR). O canal da amostra apresentou diâmetro de 700,0 μm . As minas HB foram inseridas reversivelmente acima e abaixo do canal de amostra. Cinco pares de minas de grafite foram curto-circuitadas com peças de cobre para se obter uma associação de cinco capacitores polarizáveis em paralelo.

3.3. Fabricação do dispositivo *Bubble trap*

Um dispositivo foi fabricado para remover as bolhas geradas no sistema de fluxo ao longo da síntese⁷⁴ usando (i) impressora 3D de estereolitografia (*stereolithography*, SLA) (Formlabs Form 2) aplicada a uma resina à base de poli(metacrilato de metila) (PMMA; resina transparente, fotopolímero Formlabs) e (ii) uma membrana semipermeável de PDMS. Na **Figura 2**, podemos ver os componentes desse dispositivo, designado como de *bubble trap*. A peça impressa em 3D possui um reservatório interno que é preenchido com a dispersão das SiO_2NPs (dimensões: 20,0 mm de comprimento, 10,0 mm de largura e 10,0 mm de altura). Capilares de aço inoxidável (1,2 mm d.e.) foram usados para entrada e saída das dispersões. Uma resina epóxi (hobby Araldite, Tekbond Saint global) foi usada para colar os capilares na peça 3D. A membrana de PDMS, por fim, foi fixada na parte superior dessa peça com o auxílio de um suporte de aço inoxidável e parafusos (2,8 mm de diâmetro).³⁰

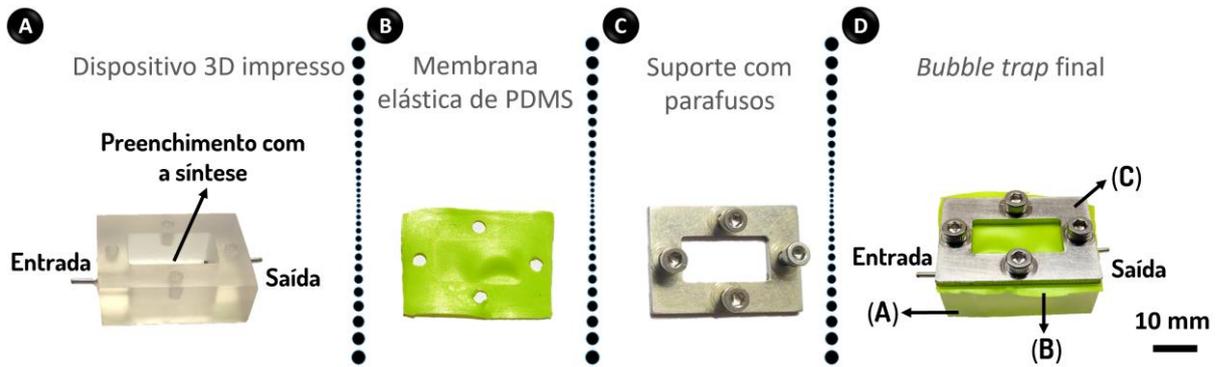


Figura 2. Componentes do dispositivo *bubble trap* impresso em 3D. (A) Dispositivo impresso em 3D com entrada e saída, (B) membrana elástica semipermeável de PDMS e (C) suporte de aço inoxidável com parafusos para fixação. (D) Dispositivo final. As partes apresentadas nas chamadas anteriores (A, B e C) seguem discriminadas nesta foto. Figura adaptada da referência 30.

3.4. Selagem reversível dos *chips* por meio de pressão mecânica

Fabricamos uma plataforma para selagem reversível dos *chips* por meio de pressão mecânica. Essa selagem foi usada para investigação da adsorção das NPs sobre os eletrodos e PDMS e para o monitoramento *in-situ* da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO já que a selagem irreversível feita com a aplicação de plasma de O₂ poderia modificar a molécula de APTES presente na superfície das NPs. Um sistema impresso em 3D com pinos de metal (aço inoxidável, 0,7 mm de diâmetro) foi usado para conectar os eletrodos ao potenciostato. A impressão 3D foi feita usando a técnica de modelagem de deposição fundida (*fused deposition modeling*, FDM; Sethi 3D AiPA3) com filamento de ácido polilático (*polylactic acid*, PLA) (Cor natural, UP3D, 1,75 mm de diâmetro). Este sistema foi colocado sobre uma peça plana de



Figura 3. Componentes da plataforma para selagem reversível dos chips por pressão mecânica. (A) Eletrodo em vidro. (B) Substrato em PDMS com canal milifluido. (C) Suporte acrílico com parafusos. (D) Plataforma final com o dispositivo selado. Os pinos metálicos em contato com os eletrodos foram soldados a um fio para conexão elétrica com o potenciostato. As partes apresentadas nas chamadas anteriores (A, B e C) estão discriminadas nesta foto. Figura adaptada da referência 30.

aço inoxidável conforme ilustrado na **Figura 3**. O canal milifluídico de PDMS foi fixado sobre o topo do vidro contendo os IDEs com o auxílio de um suporte de acrílico e dois parafusos (4,9 mm de diâmetro).³⁰

3.5. Síntese em batelada das SiO₂NPs de 108, 110 e 270 nm

A síntese das SiO₂NPs nativas seguiu protocolos já descritos na literatura.^{33,75} Inicialmente, o meio reacional foi composto de 120,0 mL de etanol na presença de 5,8 mL de NH₄OH 28–30% v/v em água para obter SiO₂NPs com diâmetro de aproximadamente 108 ou 110 nm. Para a síntese das NPs de 270 nm foi adicionado 10,0 mL de hidróxido de amônio, mantendo o volume para os demais reagentes utilizados. Duas alíquotas de 2,5 mL de TEOS foram adicionadas à mistura inicial após 0,5 e 3,0 h de agitação. A agitação foi mantida durante 24,0 h à temperatura ambiente (25 ± 3 °C). Em seguida, as SiO₂NPs obtidas foram purificadas por sucessivas etapas de centrifugação (Hettich-380R) a uma rotação de 11000 rpm por 15 min, sendo lavadas em etanol (uma vez) e água (três vezes). A sua ressuspensão após cada etapa de centrifugação foi feita por sonicação (Ecosonics Ultrasonic Q 3,0 L) durante 0,5 h. A suspensão aquosa das SiO₂NPs após a purificação foi armazenada entre 4 e 8 °C.

3.6. Funcionalização das SiO₂NPs de 108 nm sobre o eletrodo

SiO₂NPs nativas de 108 nm foram funcionalizadas com ácido fólico usando APTES como intermediário de imobilização (parte II).⁵³ Experimentalmente, 30,0 mL da suspensão obtida das SiO₂NPs nativas (sem purificação) foram transferidos a um outro frasco para o qual o volume de 3 μL de APTES foi adicionado lentamente. A reação, ilustrada na **Figura 4**, foi realizada sob agitação por 24,0 h. Posteriormente, as nanopartículas foram purificadas seguindo o protocolo das SiO₂NPs nativas (ver seção 3.5). A funcionalização de 10,0 mL das SiO₂NPs-APTES com ácido fólico (ver **Figura A1** no **Anexo 1**) foi realizada pela ativação dos seus grupos carboxila mediante a adição de 65,3 μL de EDC na presença de 13,1 mg de NHS (em

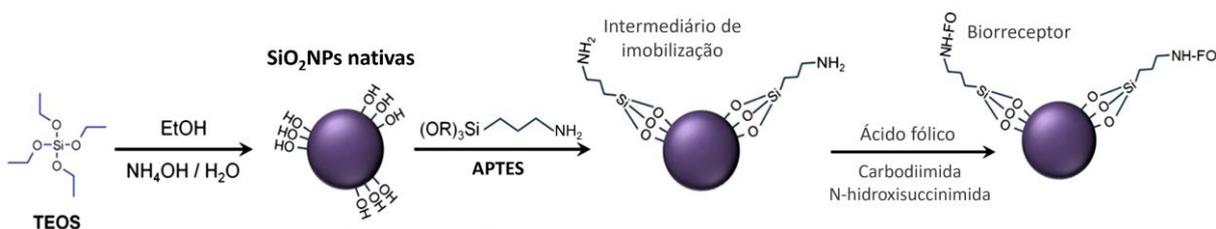


Figura 4. Esquema de formação das SiO₂NPs e sua funcionalização com o APTES. Considerações mais detalhadas sobre o mecanismo de síntese seguem apresentadas na seção 4.1. R: C₂H₅.

13,1 mL de tampão MES 15,0 mmol L⁻¹, pH = 6,0) e subsequente reação com o grupo amina do APTES.^{53,76} O ácido fólico (dissolvido em 2,0 mL de DMSO) foi adicionado na mesma proporção molar do APTES. O tamanho, homogeneidade, formato e carga superficial das SiO₂NPs-APTES e SiO₂NPs-APTES-FO foram estudados por DLS, SEM e potencial zeta. A técnica de XPS foi usada para avaliar a eficiência da funcionalização das NPs.³⁰

3.7. Caracterização das SiO₂NPs sem e com funcionalização

Espalhamento de luz dinâmico

O diâmetro hidrodinâmico (D_H) das SiO₂NPs de 110 e 270 nm, testadas na primeira parte do projeto (monitoramento das NPs ao longo da sua síntese), foram determinados usando o equipamento Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) equipado com laser na região do vermelho (632,8 nm) e baseado no modo de retroespalhamento (ângulo de detecção de 173°). As medidas foram feitas em triplicata no modo automático após 120 s para estabilização térmica. As curvas de correlação foram processadas através do método de cumulantes para determinação do D_H e do índice de polidispersão (*polydispersity indexes*, PDI).³¹ Alíquotas do meio foram coletadas a cada 30 min durante as primeiras 13,0 h e posteriormente a cada 1,0 h até o final da síntese (24,0 h) para testes de DLS visando determinações de D_H , da concentração das NPs (C_{NP}) e de PDI. Após purificação, as SiO₂NPs (em água) encontravam-se a uma concentração elevada, dificultando as medidas de DLS devido ao espalhamento da luz. Logo, as dispersões das SiO₂NPs foram diluídas a 1,0 mg mL⁻¹ em tampão fosfato (*phosphate buffer*, PB, 10,0 mmol L⁻¹ com pH 7,4) e em água para serem analisadas.^{33,77} O mesmo procedimento foi utilizado para as SiO₂NPs nativas de 108 nm e modificadas, quais sejam, SiO₂NPs-APTES e SiO₂NPs-APTES-FO. Todas essas amostras, porém, foram analisadas em água e KCl 10 mmol L⁻¹ (parte II).

A concentração das SiO₂NPs de 110 nm foi determinada usando o Zetasizer Ultra equipado com um laser He-Ne na região do vermelho ($\lambda = 632,8$ nm) e as análises foram realizadas no modo automático usando o espalhamento de luz dinâmico multi-ângulo (*multi-angle dynamic light scattering*, MADLS). A temperatura estabelecida foi de 25 °C e as amostras foram inseridas no equipamento usando cubeta descartável (DTS0012, Malvern Panalytical). O *software ZS Xplorer* foi empregado para otimizar as configurações do instrumento. O *software ZS Xplorer* faz os cálculos matemáticos para transformar a distribuição de tamanho das NPs (ponderada por intensidade) em uma distribuição absoluta de concentração

considerando a taxa de contagem derivada junto com a intensidade de dispersão (força do sinal), medida em quilocontagens por segundo (*kilo counts per second*, kcps). A concentração das NPs após a síntese obtida por DLS foi comparada com aquela obtida por gravimetria.³⁰

Potencial zeta

A carga superficial das NPs (110 e 270 nm) foi determinada por meio de medidas de potencial zeta (associado ao plano de cisalhamento na região da EDL) o que, indiretamente, indica a estabilidade coloidal da dispersão das SiO₂NPs. As amostras analisadas foram as mesmas citadas anteriormente para DLS (água e PB). Essas medidas, bem como análises de condutividade (Malvern Zetasizer Ultra) foram feitas em triplicata no modo automático com intervalo de 150 s entre cada medida.⁵³ A medida de carga superficial também foi realizada para as SiO₂NPs nativas de 108 nm, SiO₂NPs-APTES e SiO₂NPs-APTES-FO em dois meios (água e KCl 10 mmol L⁻¹) seguindo o mesmo procedimento descrito acima (parte II).

Microscopia eletrônica de varredura

Para investigar o tamanho e a morfologia das SiO₂NPs de 110 e 270 nm, imagens de SEM foram obtidas no microscópio Thermo/FEI Quanta 650 FEG. Todas as amostras foram previamente preparadas adicionando-se uma gota de aproximadamente 3,0 µL da suspensão das SiO₂NPs sobre um substrato de silício, previamente submetido a um processo de *glow discharge* em uma PELCO easiGlow. Após secagem das amostras à temperatura ambiente, imagens de elétrons secundários com resolução de 2024 × 1792 pixels foram obtidas com tensão de aceleração de 10,0 kV, tamanho de sonda (spot size) 3 e uma distância de trabalho de aproximadamente 10,0 mm. As imagens obtidas foram analisadas através do *software ImageJ*. Para análise de distribuição de tamanho, as nanopartículas foram contadas individualmente. Posteriormente, um ajuste gaussiano foi feito nas distribuições obtendo-se o diâmetro médio das nanopartículas.⁷⁵ As superfícies dos eletrodos foram também avaliadas por SEM. Para isso, o substrato de PDMS foi retirado manualmente da lâmina de vidro, que foi coberta com um filme fino de carbono (5,0 nm de espessura) por *sputtering* (Baltec SCD 050) para melhorar o contraste das imagens.³⁰

Na segunda parte do projeto, uma gota de 6,0 µL de suspensão foi adicionada sobre a superfície do eletrodo de vidro na região dos IDEs para análise das NPs nativas de 108 nm e funcionalizadas com APTES (C = 5,0 g L⁻¹, diluição feita em etanol). As imagens de SEM foram adquiridas após a completa secagem da gota com as NPs. Imagens foram também obtidas

das SiO₂NPs-APTES-FO sob substrato de Si, devido à sua baixa concentração ($C = 3,3 \text{ g L}^{-1}$), não foi necessário diluir.

Análise gravimétrica

A concentração mássica (C em g L^{-1}) das nanopartículas sem e com funcionalização (em g L^{-1}) nas suspensões purificadas foi determinada pesando o sólido remanescente após a evaporação da água de um determinado volume de suspensão a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2,0 h.⁷⁵ As medidas foram feitas em quintuplicatas ($n = 5$).

Isoterma de adsorção/dessorção de nitrogênio

A estrutura micro/mesoporosa de SiO₂NPs purificadas foi investigada através da técnica de adsorção/dessorção de nitrogênio. A isoterma foi obtida a $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ empregando o instrumento Tristar II 3020 (Micromeritics). A amostra foi seca em estufa a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24,0 h e então degaseificada durante a noite a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ sob vácuo antes das medidas.⁷⁵

Microscopia de força atômica

Os testes de microscopia de força atômica (AFM; ParkSystems NX10) foram feitos usando uma sonda de Pt/Ir revestida com Si. A ponta exibiu um raio final de aproximadamente 25,0 nm e operou em uma frequência de ressonância nominal de 75,0 kHz. Os experimentos de topografia e microscopia de força Kelvin, KPFM para a parte I do trabalho, foram conduzidos simultaneamente. Para os dados de potencial de superfície, um sinal de tensão ac de 3,0 V na frequência de 17,0 kHz foi aplicado ao *cantilever*. A varredura de KPFM foi obtida no modo de modulação de amplitude. A câmara do AFM foi purgada com nitrogênio para reduzir a umidade (aproximadamente 0,5%) de modo a evitar possíveis interferências nas medidas causadas por artefatos externos. Os dados foram analisados utilizando o *software Gwyddion*.³⁰

Espectroscopia de fotoelétrons por raios-X

O XPS foi utilizado para confirmar a funcionalização das NPs com APTES e FO (parte II do trabalho). Alíquotas de 2,0 mL das SiO₂NPs foram retiradas do erlenmeyer onde estava sendo feitas as funcionalizações em diferentes tempos, de 1,0 até 6,0 h. Em seguida, as NPs foram purificadas por centrifugação nas mesmas condições descritas na seção 3.5. Por fim, todas as amostras foram secas em estufa a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ e colocadas no porta amostras do XPS. As composições das amostras foram obtidas a partir do equipamento K-Alpha XPS (Thermo

Fischer Scientific) usando uma fonte de raio X de Al K α . A resolução espacial do espectro foi de 300 μm , com uma energia de passagem de 200,0 eV. Os espectros de alta resolução para os elementos C 1s, N 1s, O 1s e Si 2p foram adquiridos com resolução de 0,1 eV e energia de passagem de 50,0 eV.^{5,17,19–21,28,33} O *software CasaXPS* foi utilizado no tratamento de todos os dados adquiridos com o intuito de realizar a deconvolução dos picos e obter as energias de ligação referentes a cada uma das espécies presentes nas amostras analisadas. A calibração dos picos foi realizada utilizando o C 1s em 285,0 eV.

3.8. Monitoramento *in-situ* das SiO₂NPs pelo sensor ao longo da síntese

Análises de EIE foram conduzidas em um potenciostato da Metrohm Autolab AG PGSTAT128N. Aplicou-se um potencial ac com amplitude pico-a-pico de 50,0 mV (onda senoidal) e tempo de integração de 125,0 ms nas frequências de $\sim 0,2 \cdot 10^0$ a $1,0 \cdot 10^5$ Hz à temperatura ambiente (25 ± 3 °C). O circuito equivalente a partir dos gráficos de Nyquist foi obtido usando o *software NOVA*.⁵⁹

A síntese foi realizada pelo modo em batelada como supracitado (ver seção 3.5) e medidas em tempo real usando o sensor multidimensional foram realizadas a cada 0,5 h visando a análise *in-situ* das SiO₂NPs formadas. Para tanto, os reagentes, presentes em um balão de fundo chato e sob agitação constante com o auxílio de uma barra magnética, foram bombeados por uma bomba peristáltica (Ismatec Reglo ICC) a $900 \mu\text{L min}^{-1}$ em direção ao dispositivo milifluídico para a realização das medidas impedimétricas. O seu descarte foi direcionado ao mesmo balão de fundo chato com os reagentes fechando o circuito. A conexão dos itens da plataforma foi feita com uma mangueira de Tygon (R, 2375, *laboratory tubing*). Assim, foi possível realizar o monitoramento *in-situ* da síntese das SiO₂NPs sem alterar a estequiometria da reação.³⁰ Para assistir a um vídeo demonstrando o funcionamento desse sistema (parte I), basta *scanear* o QRC (*quick response code*) presente na **Figura 5**.



Figura 5. QRC com direcionamento a um vídeo mostrando a plataforma usada para o monitoramento *in-situ* das SiO₂NPs pelo sensor ao longo da síntese (parte I).

3.9. Monitoramento *in-situ* da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO pelo sensor

Primeiramente, o eletrodo foi preparado adicionando uma gota da suspensão das SiO₂NPs-APTES na região dos IDEs para formar uma cobertura uniforme de NPs sobre ele. A gota adicionada sobre o IDEs foi espalhada com uma microponteira plástica de 10 µL e secagem à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a etapa de lixiviação sob fluxo com o intuito de retirar as NPs não adsorvidas ou fracamente adsorvidas sobre os IDEs. Para tanto, foram utilizados os solventes (MES e DMSO) empregados na funcionalização com o ácido fólico. Presentes em erlenmeyer sob uma agitação constante por meio de uma barra magnética, esses solventes foram bombeados por uma bomba peristáltica (Ismatec Reglo ICC) a 900 µL min⁻¹ em direção ao dispositivo milifluídico que foi selado de forma reversível por meio de pressão mecânica, conforme descrito na seção 3.4. O seu descarte foi direcionado ao mesmo erlenmeyer fechando o circuito. Medidas de EIE foram feitas a cada 0,5 h (mesmos parâmetros do monitoramento anterior) nessa etapa de lixiviação para o acompanhamento de Z. A duração dessa etapa foi definida pelo tempo necessário para a estabilização dos valores de impedância.

Logo após a etapa de lixiviação, iniciamos a etapa de funcionalização das SiO₂NPs-APTES com solução de FO (reagentes já descritos na seção 3.6). As medidas de Z foram feitas a cada 0,5 h durante 12,0 h e as frequências aplicadas foram de 1,0 10⁰ a 1,0 10⁵ Hz. As demais condições de EIE foram mantidas. Para assistir a um vídeo demonstrando essa plataforma em funcionamento para parte II do trabalho, basta *scannear* o QRC presente na **Figura 6**. O circuito equivalente a partir dos gráficos de Nyquist foi mais uma vez obtido com o auxílio do *software NOVA*.



Figura 6. QRC com direcionamento para o vídeo do funcionamento do sistema 2 de monitoramento *in-situ* da funcionalização SiO₂NPs com FO pelo sensor (parte II).

3.10. *Machine learning*

Realizamos regressões *multi-output* usando o algoritmo SISSO para quantificar simultaneamente o tamanho e a concentração das SiO₂NPs. Para a tarefa de aprendizado, dividimos os dados de Z em conjuntos de treinamento e teste na proporção de 85/15. O conjunto de treinamento serviu para obtermos o descritor matemático otimizado por meio de uma validação cruzada aleatória de 5 vezes empregando uma razão de 75/25 para treinamento/validação. As acurácias referentes às determinações do tamanho e da concentração das SiO₂NPs foram investigadas assumindo os resultados por DLS, D_H e C_{NP} , respectivamente, como sendo valores verdadeiros.³⁰ Na segunda parte do trabalho, o SISSO foi usado para realização de regressão linear com o objetivo de calcular os valores de PEF_{N1s} que serão discutidos na sessão **4.13**. Onde um conjunto de dados foi usado para treinamento e validação cruzada aleatória por 5 vezes. As 4 amostras diferentes foram usadas para o teste cego, aplicando uma normalização nos dados de impedância, $Z_n = (Z_{ref} - Z_{exp})/Z_{ref}$, tomando os dados usados no treinamento como sendo Z_{ref} e Z_{exp} as novas medidas usadas nos testes cegos. As acurácias referentes às determinações dos valores de PEF_{N1s} foram calculadas assumindo os resultados por XPS como sendo valores verdadeiros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 1. Monitoramento das NPs ao longo da síntese

4.1. Síntese das SiO₂NPs e sensor capacitivo

O método de Stöber foi escolhido para síntese das SiO₂NPs por possibilitar uma purificação simples das NPs obtidas, exigindo apenas centrifugação e, logo, dispensando etapas trabalhosas como extração por solvente ou calcinação.^{43,78–80} A síntese foi conduzida durante 24,0 h; uma bomba peristáltica gerou o fluxo em um circuito fechado, no qual havia o sensor multidimensional. A conexão dos itens que compunham a plataforma foi feita com uma mangueira de Tygon. Além disso, o experimento também foi conduzido utilizando mangueiras de silicone convencional, mas com apenas algumas horas de bombeamento, o líquido não passava mais pela mangueira. Causando, assim, interferências nas medidas feitas pelo sensor. A formação/crescimento *in-situ* e em tempo real das SiO₂NPs foi monitorada por esse sensor. Toda a plataforma para síntese e monitoramento das SiO₂NPs, juntamente com uma imagem SEM das nanopartículas resultantes após 24,0 h, são mostradas na **Figura 7A**. Além do sensor e da bomba peristáltica, a plataforma analítica foi composta por um agitador magnético e o dispositivo de *bubble trap*. Esse último foi construído em impressora 3D (**Figura 2**) e teve como objetivo remover as bolhas geradas no sistema de fluxo. Isso ocorre geralmente em experimentos prolongados devido à permeabilidade parcial dos componentes a gases, como o substrato do sensor, o PDMS, e as mangueiras de fluxo.⁷⁴ Quando um fluido contendo bolhas de gás atinge o dispositivo, as bolhas sobem à superfície, causando um leve aumento na pressão interna. Como a saída do líquido no dispositivo fica na parte inferior, apenas o líquido, sem bolhas, é deslocado para o sensor milifluídico. O gás resultante das bolhas permanece no topo e é eliminado através da membrana PDMS. Essa plataforma em funcionamento pode ser vista em vídeo conforme descrito anteriormente (**Figura 5**).

No geral, os valores de Z dependem não apenas do arranjo dos íons (potencial externo) e dipolos de água (potencial de superfície) e da concentração superficial de excesso na dupla camada elétrica (*electric double-layer*, EDL),^{81,82} mas também das propriedades eletrônicas do eletrodo (função de trabalho e potencial interno) e da concentração/arranjo de nanomateriais carregados, como as SiO₂NPs. Dada a ocorrência de grupos silanóis na superfície das SiO₂NPs, tais nanopartículas carregam uma carga líquida negativa em dispersão e,^{29,83–85} portanto, são capazes de sofrer uma forte polarização, ou seja, seguir as oscilações do campo elétrico, principalmente em frequências inferiores a 10² Hz.⁵⁹ Sob essas condições, as SiO₂NPs migram em direção à EDL, conforme ilustrado na **Figura 7B**, perturbando também o potencial

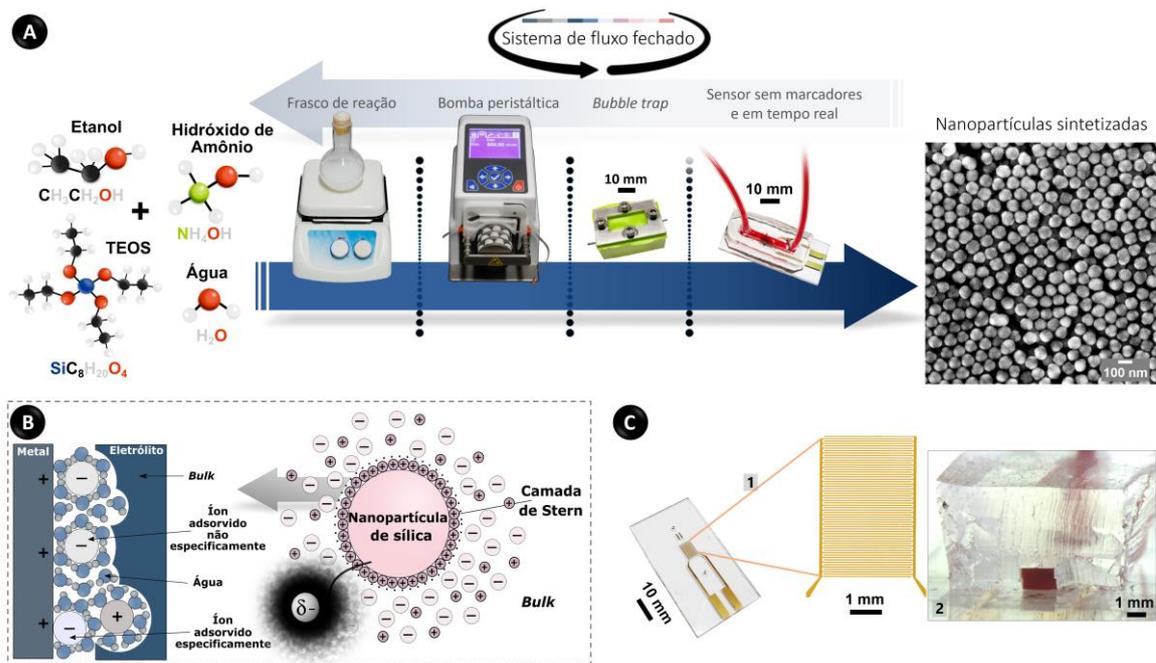


Figura 7. Síntese das nanopartículas e plataforma de detecção. (A) Reagentes e plataforma analítica utilizados na síntese e monitoramento *in-situ* das SiO₂NPs, juntamente com uma imagem SEM dessas nanopartículas formadas após 24,0 h. (B) Representação esquemática do carregamento capacitivo da EDL e migração das SiO₂NPs carregadas negativamente cercadas por uma camada de solvatação (não mostrada) e nuvem iônica. (C) Imagem de estereoscopia do IDEs em vidro (1) e corte transversal do canal milifluídico (contendo corante vermelho). Figura adaptada da referência 30.

externo e, logo, o potencial elétrico total, ou seja, o potencial interno.⁸² Maiores considerações sobre o princípio de detecção, associadas aos fenômenos capacitivos e resistivos que governam Z em função da frequência, ao circuito RC equivalente e à definição dos seus componentes, serão abordadas na seção 4.3.

Outros fenômenos além da formação de nuvens iônicas e das interações de retardamento de migração (efeitos eletroforético e assimétrico) ocorrem em torno das SiO₂NPs quando em dispersões. Sua interface pode sofrer biotransformações como dissolução, formação da coroa de proteína, agregação e troca de ligantes.^{86,87} Apesar da eventual ocorrência de uma série de fenômenos coloidais, o sensor foi capaz de determinar a concentração e o tamanho das SiO₂NPs a partir de um único espectro de Bode (Z vs. frequência) utilizando equações simples ajustadas por ML. A **Figura 7C** mostra imagens do sensor milifluídico, incluindo uma visão ampliada dos IDEs. Canais milifluídicos foram usados pelo fato das SiO₂NPs sedimentarem e causarem a obstrução de canais microfluídicos durante a síntese.

O comportamento cinético observado para o crescimento das SiO₂NPs pode ser explicado pelo modelo ISG (*in situ seeded growth*), conforme ilustrado na **Figura 8**.⁸⁸ De acordo com esse modelo, existem duas vias subsequentes que impulsionam o crescimento das SiO₂NPs obtidas pelo método de Stöber. A via I é ditada pela hidrólise do TEOS para formação dos monômeros de silanol, implicando na nucleação inicial e, em seguida, no crescimento das sementes por meio de reações de condensação formando aglomerados de siloxano ramificados, que são de suma relevância para desencadear a nucleação e o crescimento das NPs. As reações de condensação para formação das sementes de siloxano podem ocorrer entre os monômeros de silanol ou entre esses monômeros e grupos TEOS etoxila (-Si-OEt) não hidrolisados, ocorrendo a substituição de -Si-OEt por grupos silanol (-Si-OH). As reações citadas anteriormente são mostradas na **Figura 9**.⁸⁸

A via II, por sua vez, é impulsionada por reações de condensação envolvendo os monômeros de silanol recém-formados e as sementes geradas na via I. Essa etapa é responsável pelo aumento do tamanho das SiO₂NPs durante a maior parte do período de síntese. No processo de Stöber, a via I acontece imediatamente após a adição de TEOS na solução de amônia, enquanto a via II se inicia a partir de um momento caracterizado pela condutividade máxima do meio reacional. Essa última deriva da concentração máxima de monômeros de silanol e seus oligômeros. Ao longo da via II, uma redução sensível na condutividade é observada devido à condensação rápida que ocorre nas sementes como ilustra a **Figura 8**. Paralelamente, a taxa de

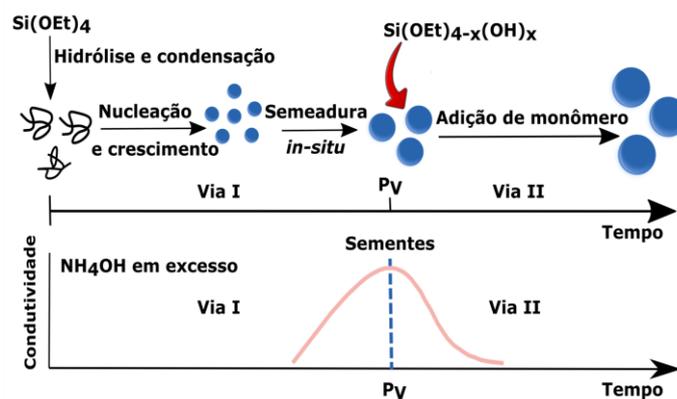


Figura 8. Curva mostrando as etapas do modelo ISG, a hidrólise do TEOS por meio do amônio (via I) e a condensação de monômeros recém-formados nas sementes geradas anteriormente (via II), bem como o perfil de condutividade ao longo da síntese sob a condição de amônio em excesso. Pv significa o ponto de virada entre as vias I e II. Figura adaptada da referência 30.

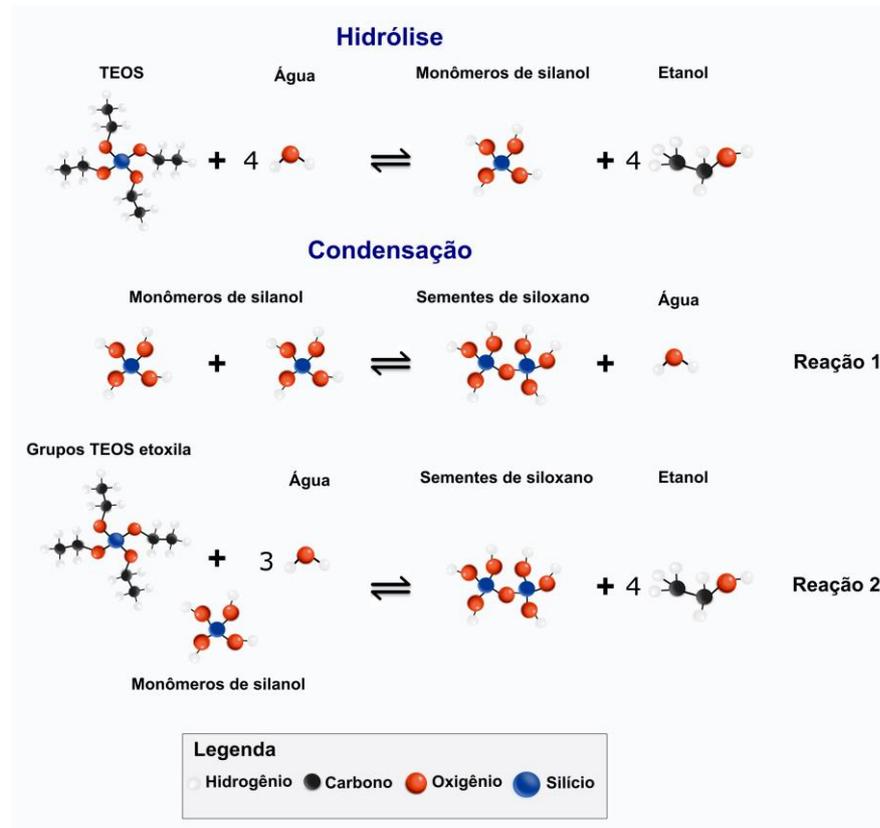


Figura 9. Esquema com as reações de hidrólise e condensação para a síntese das SiO₂NPs.

aumento do tamanho das SiO₂NPs é gradualmente reduzida e um tamanho uniforme é obtido em função do número constante de partículas sendo formadas.⁸⁸

4.2. Caracterização das SiO₂NPs

Tamanho e homogeneidade

A primeira técnica usada para investigar o tamanho, homogeneidade e eventual agregação das SiO₂NPs formadas foi o DLS por meio da determinação de seus D_H médios e PDI. Além disso, sem os dados obtidos por DLS não seria possível determinar o tamanho e concentração das NPs através dos valores de impedância. Essas análises foram realizadas em alíquotas coletadas ao longo da síntese que durou 24 h e em duas dispersões contendo as NPs finais purificadas e, a seguir, diluídas em água e PB. A água é o solvente mais comumente utilizado para armazenar as SiO₂NPs devido à alta estabilidade coloidal dessas dispersões, enquanto o PB é amplamente utilizado em ensaios biológicos.^{33,77}

A **Figura 10A** mostra dados de D_H em função do tempo obtidos no meio de reação (etanol) antes de purificar as SiO_2NPs . A síntese e as análises foram feitas em dois dias sucessivos, o que nos permitiu coletar os dados de 1,0 a 13,0 h (síntese 1, S_1) e de 14,0 a 24,0 h (síntese 2, S_2). Deve-se também destacar que as NPs obtidas após 24,0 h da S_1 também foram coletadas para análise. O D_H variou de $42,0 \pm 4,6$ (S_1) a $109,2 \pm 0,7$ nm (S_1 e S_2) ao longo da síntese. O valor após 1,0 h exibiu um desvio padrão (*standard deviation*, SD) de 4,6 nm que é resultado da etapa de nucleação rápida que ocorre nos momentos iniciais de síntese. Por outro lado, como esperado, os demais valores de D_H apresentaram baixa variação com SD de 0,2 a 1,7 nm. Comparados com o diâmetro calculado em etanol ($109,2 \pm 0,7$ nm), os valores de D_H em PB ($113,2 \pm 1,2$ nm) e, principalmente, em água ($118,6 \pm 1,7$ nm) foram maiores devido à forte solvatação mediada por ligações de hidrogênio das SiO_2NPs com as moléculas de água.⁸⁹

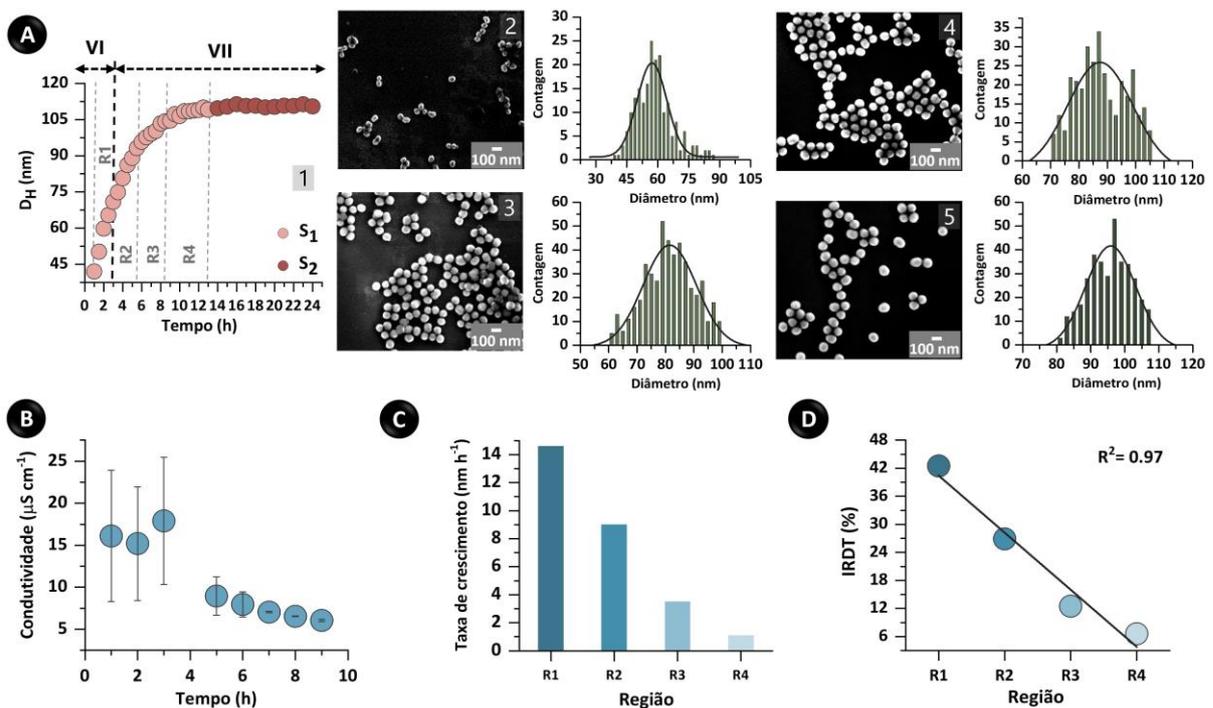


Figura 10. Caracterização das SiO_2NPs de 110 nm. **(A)** Dados de D_H por DLS em função do tempo para síntese 1, S_1 e síntese 2, S_2 (1) junto com as imagens de SEM e distribuições de tamanho, respectivamente, das nanopartículas em etanol para S_1 após 2,0 h (2), 7,0 h (3), 11,0 h (4) e 24,0 h (5) de síntese. As vias I (VI) e II (VII) de acordo com a teoria ISG e as regiões R1-R4 (descritas no texto) são destacadas neste gráfico. As regiões foram definidas nos intervalos lineares dos dados. Cinética da síntese, **(B)** condutividade por DLS. **(C)** Taxa de crescimento nas 4 regiões (R1-R4). **(D)** Diminuição linear no incremento relativo do diâmetro total (IRDT) das SiO_2NPs ao longo da síntese. Figura adaptada da referência 30.

De acordo com as imagens de SEM das SiO₂NPs após 2,0; 7,0; 11,0 e 24,0 h de síntese, presentes na **Figura 10A**, as nanopartículas apresentaram distribuições de tamanho uniforme e formato quase esférico. As diferenças de diâmetros por DLS e SEM (para S₁ em etanol, antes da purificação) foram de 2,6 e 18,8 nm para as amostras após 2,0 e 24,0 h de síntese, respectivamente. Todos os diâmetros estão discriminados na **Tabela 1**.

Como esperado, os tamanhos por SEM foram inferiores aos valores registrados por DLS devido aos princípios de medição dessas técnicas. O sinal de DLS é baseado na intensidade de espalhamento do material suspenso em solução (dispersão), refletindo assim o diâmetro hidrodinâmico com influência proeminente da camada de solvatação primária. Por outro lado, SEM depende de distribuições gaussianas para medir o tamanho de materiais secos em um substrato.^{20,90,91}

Em geral, o comportamento cinético da síntese das SiO₂NPs concordou com o modelo ISG para sínteses com amônia em excesso, considerando o comportamento cinético observado por DLS e o perfil de condutividade.⁸⁸ Apesar dos erros obtidos, as medidas de condutividade podem ser consideradas robustas estatisticamente, como abordado na seção 3.7. Demonstrando a confiabilidade dos dados apresentados. De acordo com as medidas de condutividade, conforme mostrado na **Figura 10B**, o P_V entre as vias I e II foi em 3,0 h (ver **Figura 10A**). Visto que ocorre uma diminuição da condutividade após 3,0 h. Isso indica um aumento das reações de condensação para formação dos monômeros que são adicionados sobre a superfície das sementes de siloxano. Espera-se que esse fenômeno aumente a concentração de grupos -Si-OH nas superfícies das SiO₂NP após 3,0 h (via II), provavelmente sendo uma razão para o aumento das diferenças de tamanho da NP por DLS e SEM sobre a síntese, conforme descrito acima (2,6 e 18,8 nm após 2,0 e 24,0 h, respectivamente). NPs enriquecidas com silanol levam a uma solvatação de nanopartículas mais pronunciada, aumentando o D_H por

Tabela 1. Diâmetros médios das SiO₂NPs obtidos por DLS (D_H) e SEM (D_{SEM}). As SiO₂NPs se encontravam dispersas em meio etanólico (EtOH). Tabela adaptada da referência 30

Tempo de síntese	D _H (nm)	D _{SEM} (nm)
2 h (EtOH)	59,8 ± 0,8	57,2 ± 7,2
7 h (EtOH)	99,2 ± 0,2	81,5 ± 9,4
11 h (EtOH)	108,5 ± 1,4	87,5 ± 11,5
24 h (EtOH)	114,7 ± 0,8	95,9 ± 7,4

DLS. Além disso, uma agregação das NPs também pode ter contribuído para causar o alargamento observado. No entanto, a presença de agregados no etanol não deve perturbar os sinais de Z do sensor, pois os valores de PDI indicaram a formação das SiO₂NPs homogêneas em toda a via II. Além disso, essas nanopartículas apresentaram alto potencial zeta, sugerindo apenas um nível sutil de agregação, conforme descrito posteriormente, juntamente com os valores de PDI e potencial zeta das SiO₂NPs de 110 nm.

Além disso, dividimos a síntese em regiões que apresentaram relações lineares D_H vs. tempo visando calcular as distintas taxas de crescimento das SiO₂NPs, como pode ser visto nas **Figuras 10C,D**. Regressões lineares foram utilizadas para ajustar os dados, possibilitando a obtenção de coeficientes angulares que serviram para calcular a taxa de crescimento em nm h⁻¹. A maior taxa de crescimento (14,6 nm h⁻¹) foi obtida entre 1,0 e 3,0 h (região 1, R1), com aumento de 28,9 nm no D_H (intervalo entre os diâmetros após 3,0 e 1,0 h) que responde por 42,5% de incremento no diâmetro total ao longo de toda a síntese. Este aumento foi igual a 18,3 (26,9%) e 8,5 nm (12,5% da alteração total em D_H) de 3,5 a 5,5 h (R2) e 6,0 a 8,5 h (R3), respectivamente. A taxa de crescimento diminuiu linearmente ($R^2 = 0,98$) sobre as regiões anteriores, enquanto uma taxa de crescimento extremamente baixa (1,1 nm h⁻¹) foi alcançada entre 9,0 e 13,0 h (R4) com um aumento no D_H de apenas 4,5 nm (6,6% da variação total). Após 13,0 h, o D_H permaneceu praticamente constante.

O PDI das SiO₂NPs após 1,0 h de síntese foi de $0,2 \pm 0,05$. Essa polidispersidade está relacionada à nucleação rápida, conforme mencionado anteriormente.⁹² Em contrapartida, as SiO₂NPs obtidas após 1,5 h permaneceram homogêneas ao longo das sínteses (considerando S₁ e S₂) com um PDI geral de $0,02 \pm 0,01$. Os valores de PDI das SiO₂NPs finais purificadas foram calculados como $0,04 \pm 0,02$ (em H₂O) e $0,05 \pm 0,01$ (em PB). Todos esses valores referem-se às médias globais das duas sínteses.

Com relação as SiO₂NPs de 270 nm, os dados de D_H sobre a síntese foram coletados de 1,0 a 12,0 h (S₁ até a estabilização do tamanho) e após 24,0 h, conforme mostrado nas **Figuras 11A,B**. O perfil cinético também concordou com o modelo ISG. O D_H variou de 117,9 a 275,4 nm. Os diâmetros médios finais foram $271,3 \pm 0,4$ nm, $258,9 \pm 3,2$ nm e $260,9 \pm 2,5$ nm em etanol, água e PB, respectivamente. Esses dados são provavelmente devido a uma agregação mais pronunciada em etanol e sua quebra subsequente no meio aquoso que se espera que ocorra devido à forte solvatação causada por ligação de hidrogênio nesses meios.⁸⁹ Esse fenômeno de quebra da agregação é especialmente observado na etapa de sonicação.^{93,94} Pelas mesmas razões descritas anteriormente para as SiO₂NPs de 110 nm, os dados de Z do nosso

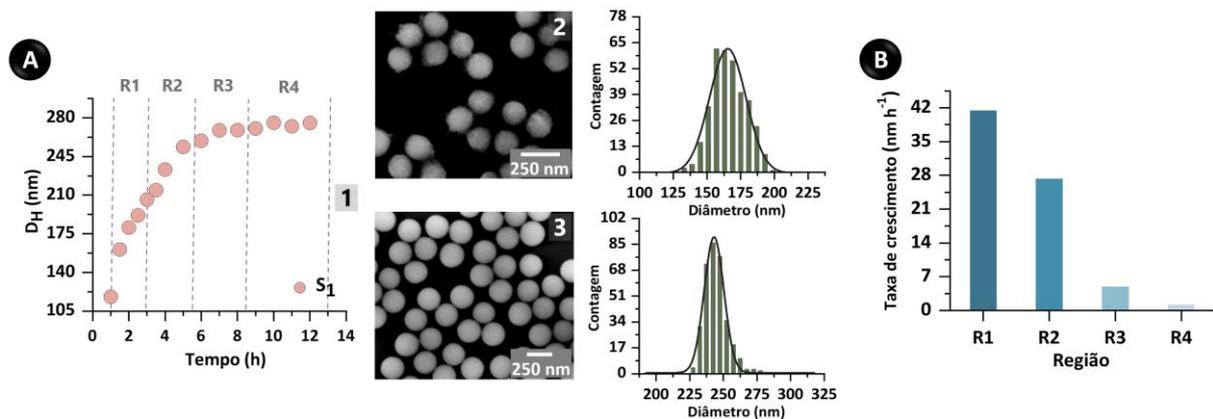


Figura 11. Caracterização da síntese das SiO₂NPs de 270 nm. (A) dados de D_H por DLS ao longo da síntese 1, (S₁) obtida no meio reacional (etanol) antes da purificação das SiO₂NPs (1), junto com as imagens de SEM (à esquerda) e distribuição de tamanho (à direita) das nanopartículas em etanol para S₁ depois de 2,0 (2) e 24,0 h de síntese (3). (B) Taxa de crescimento das 4 regiões como destacado em (A), nomeado, R1, R2, R3 e R4. Figura adaptada da referência 30.

sensor provavelmente não foram afetados por essa agregação das nanopartículas de 270 nm em etanol. Seus valores de PDI após 1,0 e 24,0 h de síntese foram $0,04 \pm 0,03$ e $0,01 \pm 0,01$, respectivamente. As SiO₂NPs exibiram forma esférica e distribuição uniforme. Os diâmetros por SEM em etanol (S₁, antes da purificação) foram $165,4 \pm 0,6$ nm e $243,1 \pm 0,2$ nm após 2,0 e 24,0 h, respectivamente.

O valor de PDI para SiO₂NPs de 270 nm após 1,0 h síntese foi de $0,04 \pm 0,03$. Assim, essas SiO₂NPs permaneceram homogêneas durante toda a síntese. Os valores de PDI das SiO₂NPs finais purificados foram calculados como $0,03 \pm 0,02$ (em água) e $0,03 \pm 0,008$ (em tampão fosfato, PB). O mesmo comportamento cinético observado para as SiO₂NPs de 110 nm foi obtido ao analisar as SiO₂NPs de 270 nm (ver **Figuras 11A,B**). Assim, a divisão da síntese nas quatro regiões (1 a 4) foi realizada novamente para o cálculo da taxa de crescimento (nm h⁻¹). Os incrementos relativos no diâmetro total (IRDT) são apresentados na **Tabela 2**. Além disso, o comportamento cinético concordou com o modelo ISG.

Tabela 2. IRDT (nm e %) em cada região para as SiO₂NPs de 270 nm. Figura adaptada da referência 30

Região	IRDT (nm)	IRDT (%)
R1	83,1	52,9
R2	43,1	27,5
R3	9,7	6,2
R4	5,0	3,2

Concentração e área superficial

Além dos valores de D_H e PDI, o equipamento de DLS foi capaz de determinar a concentração das SiO₂NPs formadas durante a síntese, conforme mostrado na **Figura 12A**. Como citado anteriormente (seção 3.7), as análises foram realizadas no modo automático usando o modo MADLS do equipamento. A medida de MADLS envolve a luz espalhada da amostra em três posições angulares diferentes: dispersão traseira (173°), dispersão lateral (90°) e dispersão frontal (13°). Essas medições em vários ângulos destinam-se a melhorar os resultados da distribuição do tamanho das partículas. De acordo com Austin e colaboradores,⁹⁵ a determinação da concentração de nanopartículas via MADLS baseia-se na medida da distribuição de tamanhos e da intensidade de espalhamento médio em relação ao tempo. Essas análises por DLS dependem das propriedades ópticas do dispersante e do material.

As concentrações das SiO₂NPs, C_{NP} , obtidas por DLS apresentaram uma variação não sistemática ao longo da via I (conforme definido pelo modelo ISG,⁸⁸ em R1, entre 1,0 e 3,0 h). Esse resultado, pode ter ocorrido pela rápida etapa de nucleação. Essas concentrações variaram linearmente de 7,8 a 11,3 10¹¹ NPs mL⁻¹ a uma taxa de 9,5 10¹⁰ NPs mL⁻¹ ao longo das regiões R2 e R3 (3,5 a 8,0 h de síntese). Embora não haja aumento significativo, as concentrações observadas foram de 10,1 a 13,1 10¹¹ NPs mL⁻¹ na região IV (9,0 a 13,0 h). Em contrapartida, não foi verificado aumento significativo da C_{NP} após 9,0 h (R4), o que está de acordo com a baixa taxa de crescimento das NPs neste período de síntese.

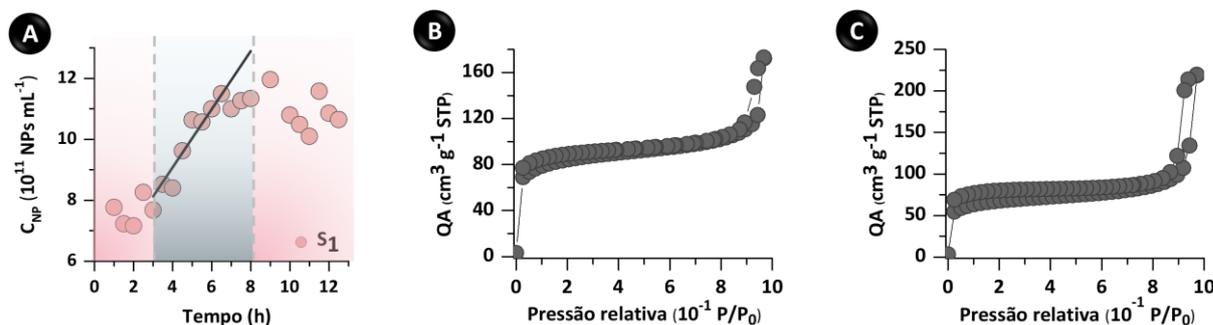


Figura 12. Caracterização das SiO₂NPs de 110 nm. (A) Concentração das SiO₂NPs, C_{NP} , por DLS. Análise de BET. (B) Gráficos de quantidade adsorvida (QA) vs. pressão relativa obtido para S₁. (C) O mesmo tipo de dado para S₂. Sendo que em ambos os casos, P é a pressão e P₀ é a pressão inicial. Figura adaptada da referência 30.

Determinamos ainda, a concentração em massa das SiO₂NPs para S₁ e S₂ por gravimetria. As dispersões foram aquecidas a 100 °C durante 2,0 h para permitir a evaporação da água adsorvida. Após essa etapa, foi possível calcular a concentração média das nanopartículas sólidas nas suspensões S₁ e S₂, que foi de $10,1 \pm 1,1$ g L⁻¹.⁷⁵ Vale ressaltar também que a concentração das nanopartículas obtida a partir dos dados de DLS após a síntese ($1,1 \cdot 10^{12}$ NPs mL⁻¹ \approx 0,9 g L⁻¹; cálculo presente no **Anexo 2**) concordou com a concentração das amostras obtidas por gravimetria (após correção da diluição selecionada para a realização dos ensaios de DLS). É importante ressaltar que esse resultado suporta o sucesso do cálculo feito usando os dados de C_{NP} obtido por DLS.

O método BET foi usado para obter as áreas de superficiais específicas (SSA_{BET}) das NPs, como mostrado nas **Figuras 12B,C**.^{96,97} As SSA_{BET} foram de 271,5 e 218,0 m² g⁻¹ para S₁ e S₂, respectivamente. Além disso, os valores de SSA geométrica (SSA_{GEO}) foram de 33,9 e 37,1 m² g⁻¹ para S₁ e S₂, respectivamente. Como $SSA_{GEO} < SSA_{BET}$, as NPs podem ser consideradas como micro/mesoporosas.^{75,97} De acordo com modelo proposto por Bogush e colaboradores,²⁶ a formação de SiO₂NPs microporosa é ocasionada pela agregação das partículas ou núcleos, formando-se gradativamente NPs maiores e porosas até que a cinética de síntese se estabilize.

Estabilidade coloidal

Também medimos o potencial zeta para avaliarmos a estabilidade coloidal das SiO₂NPs dispersas. Potenciais negativos foram registrados devido à presença de grupos silanóis nas superfícies das SiO₂NPs.^{29,83-85} Potenciais positivos são obtidos apenas em meios fortemente ácidos. O ponto isoelétrico (pI) das SiO₂NPs está localizado na faixa de pH de 2,0

a 3,0.^{98,99} Os potenciais zeta em água e PB foram, respectivamente, $-48,0 \pm 1,5$ e $-40,1 \pm 0,5$ mV, indicando que ambas as dispersões eram estáveis (potencial zeta em módulo maior que 30,0 mV)^{100,101} sem muita agregação devido a repulsões eletrostáticas entre as duplas camadas elétricas das SiO₂NPs, de acordo com a teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO).¹³

Valores negativos do potencial zeta também foram medidos para as SiO₂NPs de 270 nm. A mesma explicação para NPs menores é válida neste caso. Os potenciais zeta foram $-48,2 \pm 0,8$ (em água) e $-46,8 \pm 0,3$ mV (em PB), evidenciando que ambas as dispersões foram estáveis.

4.3. Monitoramento da síntese das SiO₂NPs em tempo real pelo sensor

A formação em tempo real das SiO₂NPs foi monitorada pelo sensor milifluídico a cada 30 min. O valor de potencial de circuito aberto (*open circuit potential*, OCP) foi igual a 54,3 mV no início e 93,6 mV ao final do monitoramento das SiO₂NPs (24,0 h). Os valores de ângulo de fase (Φ) podem ser usados para definição das regiões de frequência nas quais as respostas de Z são governadas pelos fenômenos capacitivos ($\Phi > 45^\circ$; acúmulo de carga na EDL devido à adsorção das SiO₂NPs) ou resistivos ($\Phi < 45^\circ$; transporte de carga através do *bulk*, dependendo do tamanho e da concentração das NPs).⁸² Como pode ser observado na **Figura 13A** (ver também **Anexo 3, Figura A2**), as respostas de impedância foram majoritariamente capacitivas e resistivas, respectivamente, em frequências abaixo e acima de $1,0 \cdot 10^2$ Hz.^{81,82,102} Assim, enquanto Z permanece constante na região resistiva, Z diminui com a frequência na região capacitiva conforme apresentado nos gráficos de Bode da **Figura 13B**. A predominância de diferentes fenômenos sobre a resposta de Z ao longo de um único gráfico de Bode evidencia a diversificação química do sensor mesmo usando um único tipo de eletrodo.¹⁰²

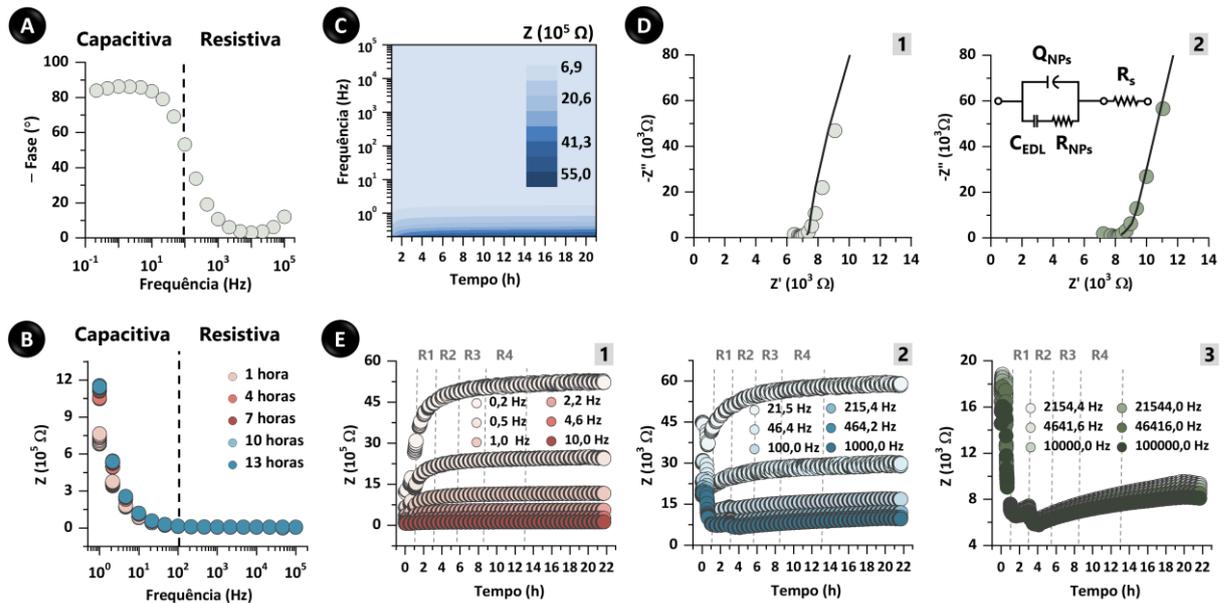


Figura 13. Monitoramento em tempo real das SiO_2NPs de 110 nm. **(A)** Gráficos de Bode ângulo de fase depois de 2,0 h de síntese. **(B)** Espectro de Z vs. frequência (Bode) em alguns períodos de síntese, como discriminado. A linha pontilhada separa as frequências correspondentes as regiões capacitivas e resistivas do sensor. **(C)** Mapa de cor de Z vs. frequência através da síntese. **(D)** Gráficos de Nyquist depois de 2,0 h (1) e 12,0 h (2) de síntese. Os elementos do circuito equivalente são: Q_{NPs} , C_{EDL} , R_{NPs} referentes a região capacitiva e a R_s para a região resistiva. **(E)** Gráficos de impedância vs. tempo em diferentes frequências como destacado em (1–3) demonstrando os estágios lineares de D_H vs. tempo (R1–R4). Figura adaptada da referência 30.

Os intervalos de confiança de Z ($\alpha = 0,05$ e $n = 9$) variaram entre $2,0 \cdot 10^0$ e $3,9 \cdot 10^4 \Omega$ e os valores de Z foram maiores nas menores frequências, como esperado, ao longo de toda a síntese como mostra a **Figura 13C**. É importante ressaltar que o valor de D_H ($127,3 \pm 2,3$ nm) e o PDI ($0,02 \pm 0,02$) das NPs após esta síntese (em etanol, sem purificação) obtidos por DLS concordaram com os valores relatados anteriormente, sem a presença do sensor. Esse resultado confirma que a síntese é reprodutível e que a presença do sensor não interferiu neste processo.

Os gráficos de Nyquist ($n = 9$) obtidos após 2,0 e 12,0 h de síntese são exibidos na **Figura 13D** (ver também **Anexo 3, Figura A2**). O circuito equivalente modelado foi consistente com aquele obtido para eletrodos passivados, no nosso caso, com a adsorção das NPs, consistindo na capacitância das NPs (Q_{NPs}) em paralelo com a sua resistência de carregamento (R_{NPs}) e com a capacitância da EDL (C_{EDL}), por sua vez em série com a resistência da solução (R_s). Como esperado, a capacitância das nanopartículas foi representada por um elemento de fase (Q_{NPs}) dada a heterogeneidade de superfície.¹⁰³ Os dados de R_s foram calculados como 3,2; 8,3 e 9,4 k Ω para 2,0; 12,0 e 21,0 h de síntese, respectivamente. Esse aumento em R_s ao decorrer da síntese pode ser atribuído ao aumento gradual no tamanho das

nanopartículas, o qual demonstra assim ter um efeito sobre Z maior do que o aumento da concentração das NPs (**Figura 12A**). Isso porque esse último levaria ao resultado oposto, ou seja, a redução gradual de R_s ao longo da síntese. Além disso, conforme esperado com o aumento de R_s ocorre uma diminuição da condutividade, conforme previsto pelo modelo ISG (**Figura 8**). Vale também destacar que os gráficos não mostraram semicírculos proeminentes, sinalizando valores de R_{NPs} baixos e, assim, (i) que o carregamento da interface é eficiente mesmo com a adsorção das SiO_2NPs sobre os IDEs e (ii) que as respostas de Z resistivas são governadas por R_s .^{102,104,105}

Para facilitar a visualização dos dados de Z ao longo da síntese, os gráficos de Z vs. tempo em diferentes frequências são exibidos na **Figura 13E**. Os dados de Z aumentaram ao longo da síntese em toda a faixa de frequências aplicadas, sendo esse mesmo comportamento verificado para as SiO_2NPs de 270 nm, como pode ser visto na **Figura 14**. Mais especificamente, esse aumento gradual pode ser atribuído, em particular, à redução de Q_{NPs} e C_{EDL} (região capacitiva; $<1,0 \cdot 10^2$ Hz) e ao aumento de R_s (região resistiva; $>1,0 \cdot 10^2$ Hz). Variações não sistemáticas ao longo da via I (até 3,0 h) foram observadas em todas as frequências. Como citado na seção 4.2 (**Figura 10**), nossa hipótese foi que o P_V entre as vias I e II acontece em 3,0 h de síntese. Justificando essas variações não sistemáticas de Z , visto que segundo a teoria ISG, usado como base teórica, até o P_V acontece um aumento das reações de condensação para formação dos monômeros que são adicionados sobre a superfície das sementes de siloxano.

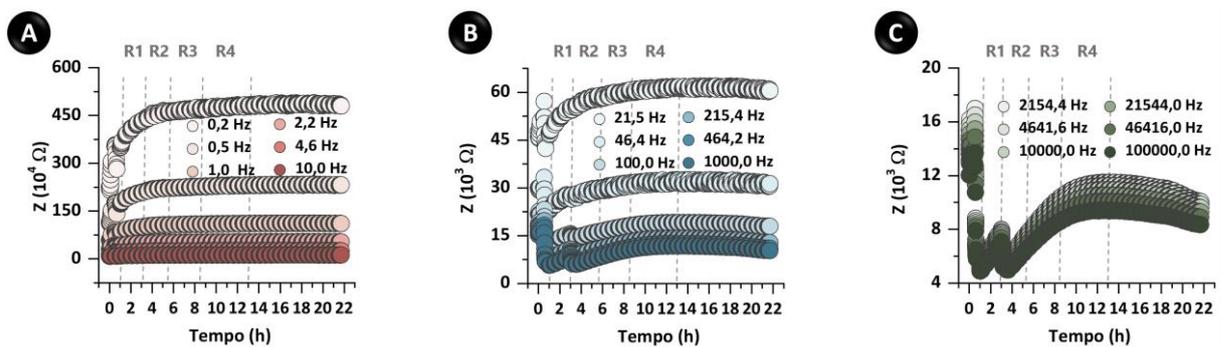


Figura 14. Monitoramento em tempo real da síntese das SiO_2NPs de 270 nm. (A, B e C) Gráficos de Z vs. tempo em diferentes frequências demonstrando os estágios cinéticos da síntese. Figura adaptada da referência 30.

4.4. Determinação do tamanho das SiO₂NPs e reprodutibilidade do sensor

A determinação do tamanho das SiO₂NPs de 110 nm empregando o sensor impedimétrico foi feito a partir de valores de Z em $0,5 \cdot 10^0$ e $1,0 \cdot 10^3$ Hz. Apenas os dados de Z após 4,0 h de síntese foram considerados, devido às variações não sistemáticas de Z antes de 3,0 h. As curvas analíticas resultantes e os gráficos de paridade (dados esperados por DLS vs. dados previstos pelo sensor) são mostrados na **Figura 15A**. É importante ressaltar que apenas 75% das amostras foram usadas para obter as curvas analíticas (conjunto de treinamento), cuja acurácia foi avaliada nos 25% restantes (conjunto de teste; amostras com D_H igual a 88,1; 106,3; 111,6; 111,9; 112,1 e 113,3 nm). Os valores de Z em ambas as frequências aumentaram linearmente com D_H ($R^2 \geq 0,79$), enquanto os intervalos de confiança gerais variaram de $5,2 \cdot 10^0$ a $9,4 \cdot 10^3 \Omega$ ($\alpha = 0,05$ e $n = 9$), sinalizando uma boa acurácia inter-síntese. Os gráficos de paridade mostraram $R^2 \geq 0,77$, com acurácias (das curvas analíticas) variando entre 96,6% e 106,2% para Z em $0,5 \cdot 10^0$ Hz e entre 95,7% e 110,6% para Z em $1,0 \cdot 10^3$ Hz, como ilustrado na **Figura 15B**.

A capacidade do sensor de monitorar o tamanho das nanopartículas em tempo real foi avaliada com sucesso ao longo da síntese das SiO₂NPs de 270 nm, conforme exibido nas

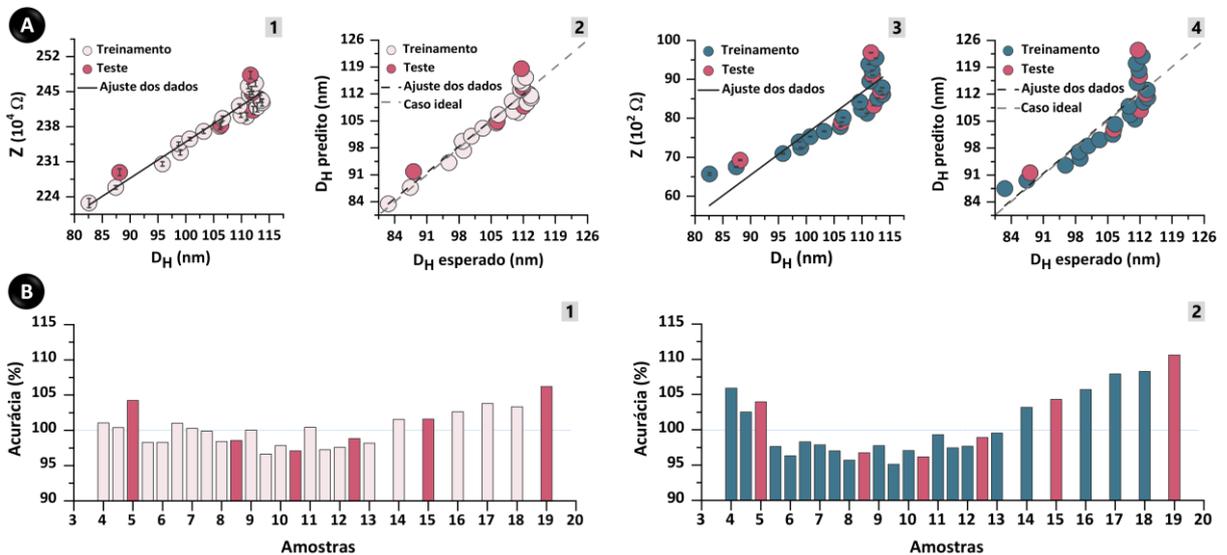


Figura 15. Determinação do tamanho das SiO₂NPs de 110 nm pelo sensor. **(A)** Curvas analíticas (1,3) e gráficos de paridade (2,4) tomando os dados de Z em $0,5 \cdot 10^0$ (1,2) e $1,0 \cdot 10^3$ Hz (3,4). Os conjuntos de treinamento e teste, juntamente com os ajustes de dados e casos ideais, são enfatizados nos gráficos. **(B)** Acurácias resultantes obtidas de Z em $0,5 \cdot 10^0$ (1) e $1,0 \cdot 10^3$ Hz (2). As identificações de cores dos conjuntos de treinamento e teste em **(A)** também são válidas em **(B)**. As amostras foram identificadas de acordo com o tempo de coleta (em h) ao longo da síntese. Figura adaptada da referência 30.

Figuras 16A,B. Apenas os dados após 4,0 h de síntese foram novamente analisados. O valor de Z aumentou linearmente junto com o D_H ($R^2 \geq 0,83$), apresentando intervalos de confiança de $6,4 \cdot 10^0$ a $7,2 \cdot 10^3 \Omega$ ($\alpha = 0,05$ e $n = 9$) considerando as frequências $0,5 \cdot 10^0$ e $1,0 \cdot 10^3$ Hz. Neste caso, as amostras com D_H de 259,2 e 270,4 nm serviram como conjunto de teste. Os gráficos de paridade apresentaram comportamento próximo ao caso ideal ($R^2 \geq 0,87$), enquanto as acurácias variaram de 97,1% a 102,1% ($0,5 \cdot 10^0$ Hz) e 96,4% a 101,8% ($1,0 \cdot 10^3$ Hz).

Embora os resultados anteriores sejam um indicador importante sobre a utilização desta plataforma para o fim proposto, o monitoramento intra-síntese (logo, também empregando um mesmo dispositivo) não é capaz de fornecer uma avaliação abrangente e robusta sobre o seu desempenho para análise em tempo real e *in-situ* das SiO_2NPs . Para tanto, faz-se necessário um estudo sobre a reprodutibilidade da plataforma. Portanto, procuramos avaliar esse parâmetro, por meio do monitoramento de sínteses independentes (inter-síntese) usando diferentes *chips* para cada caso, conforme discutido a seguir.

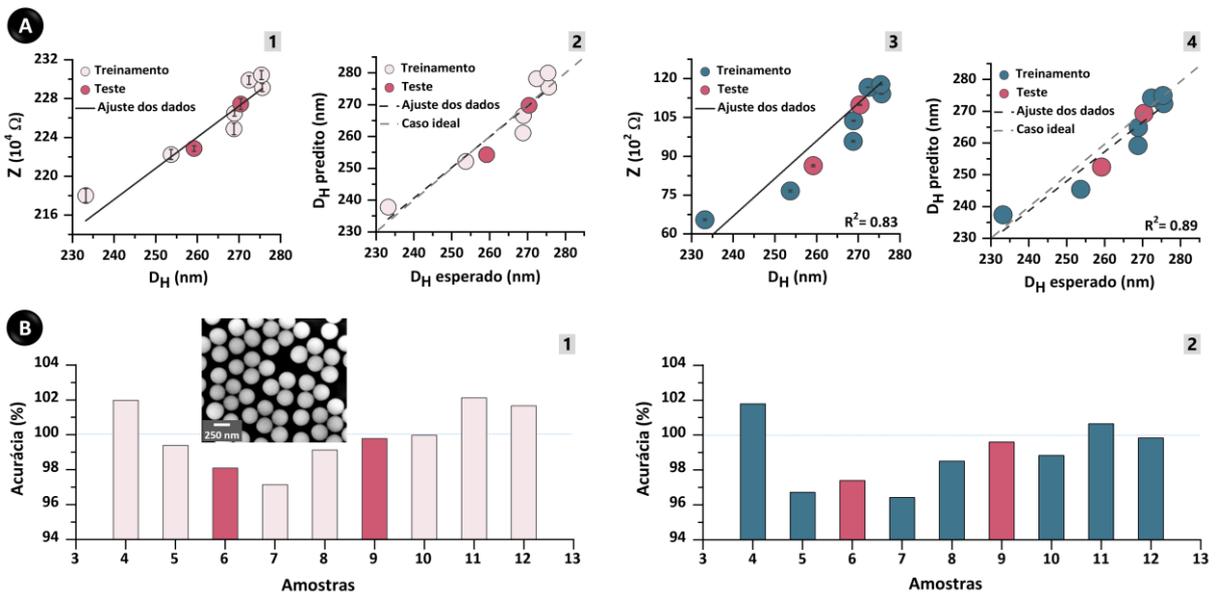


Figura 16. Determinação do tamanho das SiO_2NPs de 270 nm pelo sensor. **(A)** Curvas analíticas (1,3) e gráficos de paridade (2,4) usando os dados de Z em $0,5 \cdot 10^0$ (1,2) e $1,0 \cdot 10^3$ Hz (3,4). **(B)** Acurácias obtidas considerando Z em $0,5 \cdot 10^0$ Hz (1) e $1,0 \cdot 10^3$ Hz (2). A inserção em (1) mostra uma imagem SEM dessas nanopartículas de sílica maiores. As identificações de cores dos conjuntos de treinamento e teste em **(A)** também são válidas em **(B)**. As amostras foram identificadas de acordo com o tempo de coleta (em h) ao longo da síntese. Figura adaptada da referência 30.

4.5. Reprodutibilidade

Utilizando a equação de regressão linear da curva analítica obtida anteriormente para Z em $0,5 \cdot 10^0$ Hz, calculamos D_H a partir de outras duas sínteses das SiO_2NPs de 110 nm ($n = 9$). Sensores milifluídicos distintos foram usados em cada caso. Conforme mostrado na **Figura 17A**, os novos valores de D_H mostraram uma discrepância notável em relação aos dados verdadeiros (determinados por DLS), com acurácias de 102,5% a 132,8%. Essa baixa acurácia foi também observada em outras frequências. A adsorção das nanopartículas sobre os IDEs durante a síntese, como visualizado aqui através de imagens de SEM, é certamente a causa da baixa reprodutibilidade do sistema.

De acordo com as **Figuras 17C e 18A,B**, as SiO_2NPs adsorvem nos eletrodos com diâmetros maiores do que os valores anteriormente observados para as nanopartículas coletadas

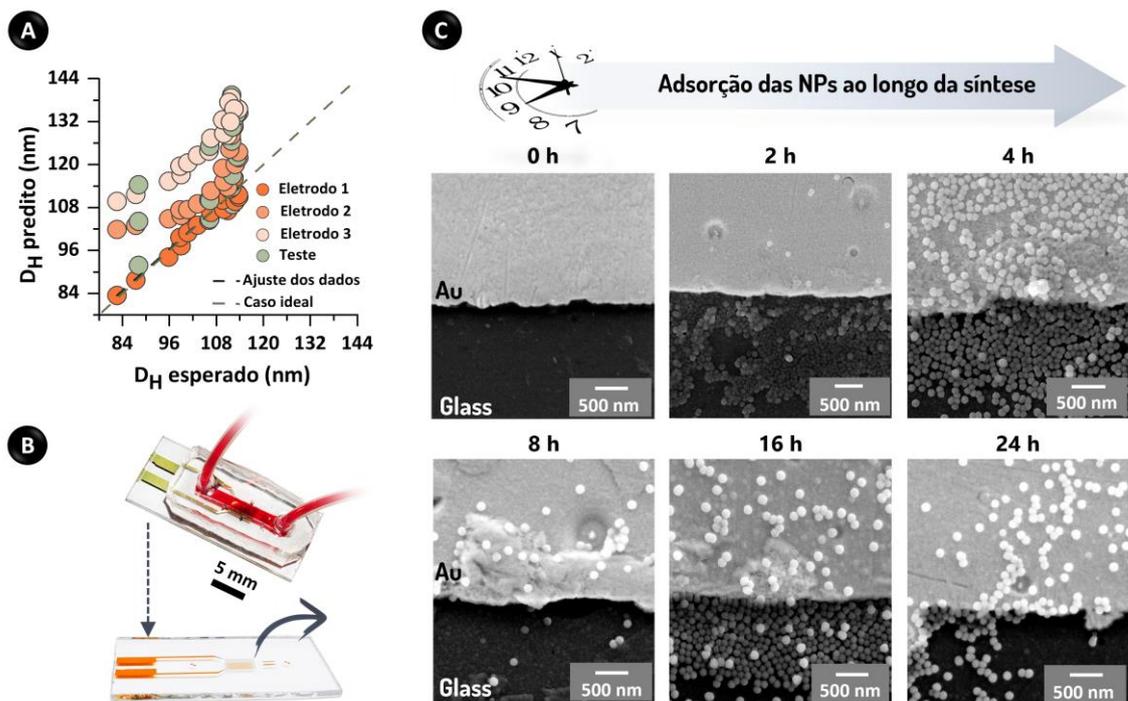


Figura 17. Monitoramento inter-síntese das SiO_2NPs de 110 nm usando sensores distintos e investigação de adsorção. **(A)** Gráficos de paridade de três sínteses independentes (eletrodos 1, 2 e 3) aplicando a equação da curva analítica previamente obtida para Z em $0,5 \cdot 10^0$ Hz (eletrodo 1). Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. **(B)** Imagens ópticas do dispositivo e vidro destacado para imagens SEM. **(C)** Nanopartículas adsorvidas em vidro e filme de Au durante a síntese. Imagens SEM, após 0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 24,0 h de síntese, conforme indicado. Para essas imagens, o PDMS foi separado manualmente do vidro para permitir a incidência do feixe SEM no Au. Figura adaptada da referência 30.

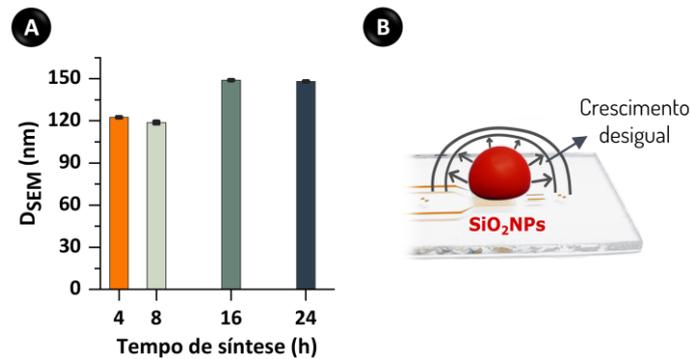


Figura 18. Monitoramento inter-síntese das SiO_2 NPs de 110 nm usando sensores distintos e investigação de adsorção. (A) Diâmetros por SEM (D_{SEM}) das SiO_2 NPs adsorvidas no Au. (B) Ilustração do crescimento anisotrópico destas SiO_2 NPs como hipotetizado. Figura adaptada da referência 30.

no meio reacional. Esse resultado pode também ser visualizado nas **Figuras 19A,B**. Supõe-se que isso ocorreu devido às diferenças nas taxas de crescimento originadas por fenômenos estéricos.

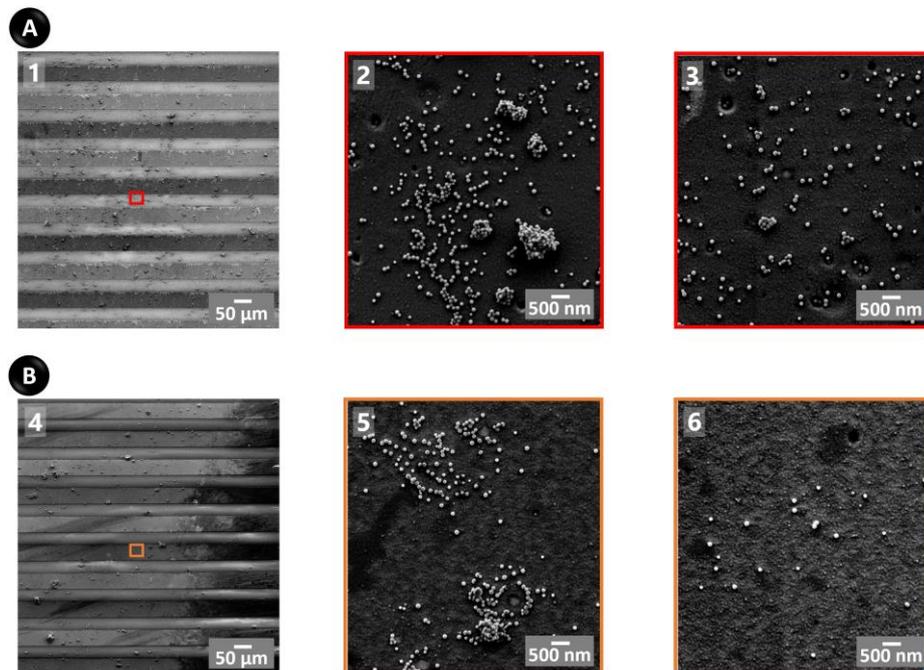


Figura 19. Monitoramento inter-síntese das SiO_2 NPs de 110 nm usando sensores distintos e investigação da adsorção. (A,B) Nanopartículas adsorvidas em dois sensores diferentes em regiões semelhantes dos IDEs de Au (veja as áreas destacadas em 1,4 por quadrados coloridos). Os painéis (1,2) e (4,5) são relacionados aos sensores após 24,0 h de síntese das NPs. Enquanto, os painéis (3,6) ilustram áreas após nova exposição ao branco do meio reacional a 900,0 (3) e 1.800,0 $\mu L \text{ min}^{-1}$ (6). Para essas imagens, as lâminas de vidro com os IDEs de Au foram reversivelmente ligadas com os novos substratos PDMS por meio de pressão mecânica. Figura adaptada da referência 30.

Enquanto as SiO₂NPs no meio reacional (*bulk*) sofrem crescimento isotrópico, as NPs adsorvidas não são totalmente expostas às reações de condensação dos monômeros de silanol, sendo submetidas a um crescimento anisotrópico com taxa aumentada nas áreas expostas. Como resultado, espera-se que as nanopartículas apresentem uma forma oval conforme foi observado por AFM (resultado discutido posteriormente).

O processo de adsorção e passivação das SiO₂NPs sobre o IDEs ocorreu devido a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares entre as NPs e o vidro do eletrodo (**Figura 19**). Esse comportamento sugere que a natureza hidrofílica do grupo silanol presente na superfície do vidro. Em contrapartida, as superfícies do PDMS (topo dos canais milifluídicos) foram apenas levemente passivadas pelas nanopartículas em comparação com o vidro, isso está relacionado a hidrofobicidade da cadeia polimérica do PDMS, conforme mostrado na **Figura 20A**.¹⁰⁶ Com relação aos eletrodos, espera-se que a adsorção das NPs durante a síntese ocorra também em outros tipos de eletrodos, pois esses materiais são eletricamente polarizados para as medidas de Z, favorecendo assim o processo de adsorção. Por exemplo, esse fenômeno pode ser usado para acelerar a imobilização de elementos de reconhecimento em eletrodos, como no trabalho reportado por Li e colaboradores,¹⁰⁷ onde aplicou-se um sinal ac para a construção de biossensores estruturados. Essa etapa pode ser curta e durar até 15 minutos neste cenário.¹⁰⁸ Embora o carbono tenha uma capacidade anti-passivante moderada,¹⁰⁹ as SiO₂NPs também passivaram eletrodos de grafite, conforme mostrado nas **Figuras 20B,C**.

Mais especificamente, a baixa reprodutibilidade do nosso sensor, provavelmente, pode ser atribuída à adsorção heterogênea e aleatória das NPs nos IDEs (ver **Figura 19**). De acordo com as imagens SEM realizadas em regiões semelhantes dos IDEs de dois *chips* (após 24,0 h de síntese de 110 nm das SiO₂NPs), as nanopartículas são adsorvidas em baixa concentração como entidades individuais e agregadas de maneira não reprodutiva. No entanto, vale ressaltar que esta adsorção não prejudicou as propriedades das SiO₂NPs coletadas após a síntese. Avaliando os dados de DLS na ausência e presença do sensor (D_H e PDI), eles eram semelhantes entre si como descrito anteriormente.

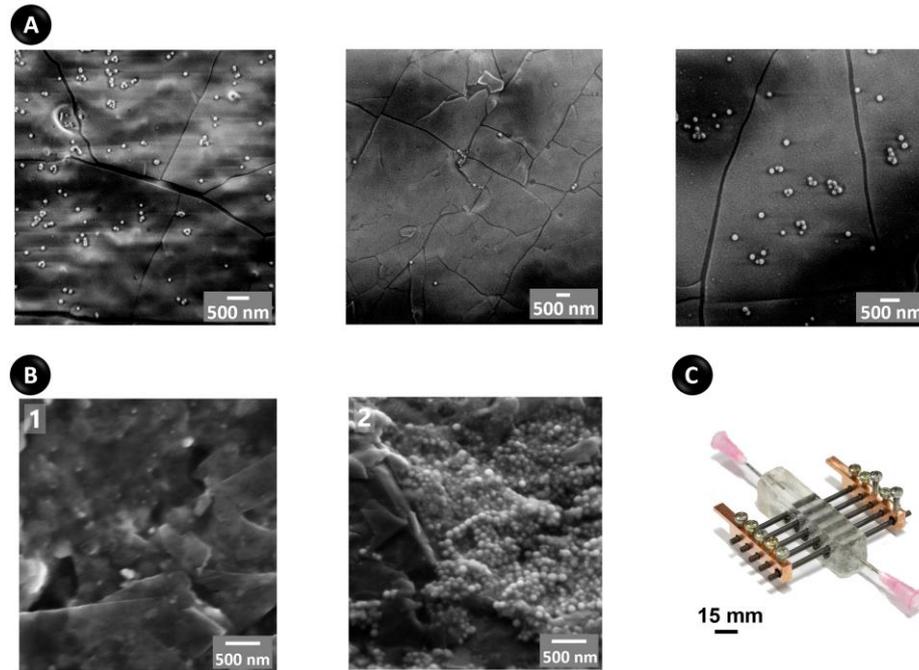


Figura 20. Adsorção das SiO₂NPs em diferentes superfícies. (A) Imagens SEM no topo do canal milifluídico em PDMS, após 24,0 h de síntese das SiO₂NPs de 110 nm. (B) Imagens SEM das minas de grafite HB que atuaram como eletrodos, antes (1) e após (2) a síntese das SiO₂NPs de 110 nm. (C) Sensor microfluídico em PDMS com esses eletrodos embutidos. Figura adaptada da referência 30.

Espera-se que a passivação dos eletrodos pelas SiO₂NPs altere os dados de detecção de Z durante a síntese por causa das variações locais resultantes no potencial eletrostático de superfície, pois o Au e SiO₂ possuem funções de trabalho distintas.⁸² Essas alterações foram confirmadas por medidas de AFM acoplado ao KPFM, as quais permitiram o monitoramento da topografia e das diferenças de potencial de contato (V_{CPD}) de uma área da superfície do Au (2,0 μm x 2,0 μm) recoberta com NPs, respectivamente, conforme mostrado na **Figura 21**. A raiz quadrada média (*root mean square*, RMS) encontrada foi de 35,3 e 8,2 nm para as superfícies das SiO₂NPs e Au, respectivamente. Os últimos dados estão de acordo com o RMS, esperado para superfícies lisas revestidas com filmes finos.¹¹⁰ Os valores de V_{CPD} foram de aproximadamente 13,6 (Au) e 49,9 mV (SiO₂NPs), mostrando que as NPs causam alterações no potencial de superfície como esperado. Essas variações explicam as perturbações nas respostas impedimétricas do sensor pela adsorção das SiO₂NPs. O perfil de V_{CPD} obtido ao longo de uma linha na área monitorada por AFM demonstra essas alterações, conforme mostrado nas **Figuras 21A,B**. É importante ressaltar também que os dados de AFM suportam nossa hipótese sobre a estrutura anisotrópica das NPs adsorvidas. A partir de um perfil de altura 2D,

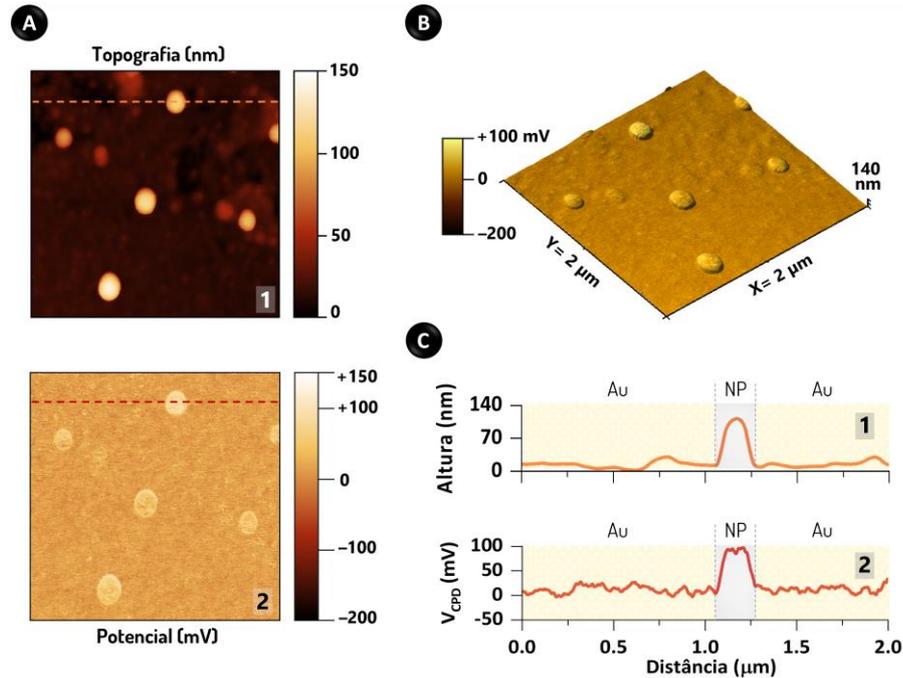


Figura 21. Análise de AFM-KPFM de uma área ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$) abrangendo as SiO_2NPs no Au. (A) Mapas 2D de topografia (1) e V_{CPD} (2). (B) Imagem 3D mesclando os dados, onde a escala de cor representa os valores de V_{CPD} . (C) Os perfis de altura (1) e V_{CPD} (2) ao longo de uma linha, está destacada em (1,2) como linhas tracejadas. Figura adaptada da referência 30.

uma nanopartícula exibiu 165,0 nm de diâmetro e somente 110,1 nm de altura, conforme pode ser visualizado na **Figura 21C**.

As adsorções das NPs no eletrodo, PDMS e vidro são provavelmente reversíveis. Apesar da ocorrência de grupos silanois no vidro e nas nanopartículas, adsorções covalentes irreversíveis mediadas por ligações de siloxano geralmente são alcançadas nesses casos e podem ser observadas somente após a oxidação das superfícies utilizando processos como ativação por plasma de O_2 através das reações de condensação.^{111,112} Para avaliar a lixiviação dessas NPs adsorvidas reversivelmente, um fluxo foi aplicado com etanol e amônia (mesma proporção usada para a síntese das NPs de 110 nm), aproximadamente nas mesmas duas regiões anteriores (usadas para mostrar a adsorção heterogênea). Então, novas imagens por SEM foram adquiridas após a exposição ao meio reacional (branco) com fluxos de 900,0 e 1.800,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ (ver **Figura 19**). A selagem reversível dos dispositivos por meio de pressão mecânica foi feita para a realização desses testes (ver **Figura 3**). Enquanto o último fluxo foi capaz de remover uma quantidade razoável das SiO_2NPs no Au, o valor utilizado em toda a síntese (900,0 L min^{-1}) resultou apenas em uma lixiviação parcial das nanopartículas, especialmente de seus agregados. Esta lixiviação parcial não deve afetar a detecção bem como o valor de Z ao longo

da síntese com base no perfil de resposta após 9,0 h (R4; ver **Figura 13D**) que permaneceu quase constante.

4.6. Reprodutibilidade garantida por ML

Diante da baixa reprodutibilidade do sistema obtida por métodos univariados de análise, partimos para o uso de métodos multivariados na tentativa de obter maior acurácia dos dados inter-síntese, que consistiu em processar todo espectro de impedância por meio do método SISSO. O algoritmo de ML SISSO determina novos descritores, através do uso de equações algébricas simples, que é capaz de realizar tarefas de regressão e classificação para predição de dados, como ilustrado na **Figura 22**.

Os novos descritores são utilizados para ajudar nas tomadas de decisões ou prever os resultados de interesse.¹¹³ Os métodos de ML podem ser separados entre não-supervisionados e supervisionados. No caso do método não-supervisionado ou descritivo, o intuito é de avaliar a variância dos dados a partir apenas dos dados de entrada (*input*, x_i), mas sem o fornecimento do respectivo dado de saída de interesse. Por exemplo, o PCA (*principal component analysis*) é um tipo de algoritmo que faz a redução da dimensionalidade por meio da análise de componentes principais, e através do reconhecimento de padrão permite realizar discriminação de diferentes amostras. Já no caso do método supervisionado ou preditivo, o foco principal é realizar a aprendizagem e identificação da função que conduz os dados de entrada (*input*, x_i) aos seus dados de saída (*output*, y_i) correspondentes. A diferença deste caso para o anterior é que os dados de entrada e saída são fornecidos (x_i , y_i) através de um conjunto de dados que será aplicado no treinamento (*training set*) do modelo sendo que $y_i = f(x_i)$. Para o algoritmo usado ser considerado como regressão, o *output* é formado por variáveis contínuas.

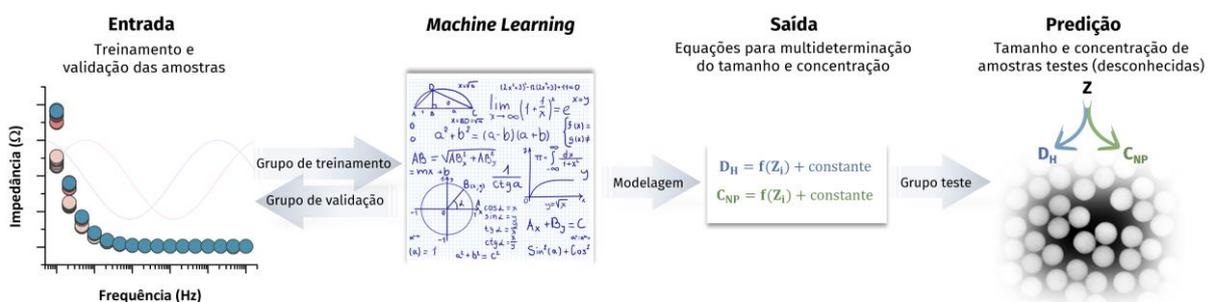


Figura 22. Tratamento das *features* de Z através do SISSO para quantificar D_H e C_{NP} através de uma validação cruzada randomizada de 5 vezes usando uma razão de 75/25 para os chamados conjuntos/grupos de treinamento/validação. Do total de amostras, os conjuntos de treinamento/teste foram divididos na proporção de 85/15. Figura adaptada da referência 30.

Caso as variáveis sejam categóricas, é considerado como classificação.¹¹³

No caso, deste trabalho foi aplicado o algoritmo SISSO que é um método de aprendizado supervisionado que pode realizar tarefas de regressão e classificação. Sendo assim, ele promove a combinação das *features* primárias (dados de entrada) a fim de encontrar um descritor eficiente (equação matemática) com baixa dimensionalidade que conseguisse expressar a problemática através de um modelo linear.^{64,114} Notoriamente, descritores simples ajustados pelo algoritmo SISSO foram capazes não apenas de garantir valores reprodutíveis de D_H após 4,0 h de síntese, mas também de fornecer a determinação simultânea de D_H e C_{NP} a partir de uma única medida, mantendo o compromisso entre acurácia e simplicidade/velocidade de cálculo. As equações usaram apenas 6 *features* de entrada (os gráficos de Bode possuíram um total de 18 *features* de Z vs. frequência) como segue:

$$D_H = c_1 * \left[\left(\frac{Z_7}{Z_{12}} \right) / (Z_{16} - Z_{18}) \right] + c_2 * [(Z_{12} + Z_{16}) - (Z_{13} + Z_{14})] + c_3 \quad (\text{eq. 2})$$

$$C_{NP} = c_4 * \left[\left(\frac{Z_6}{Z_2} \right) / (Z_{16} - Z_{18}) \right] + c_5 * \left[\left| \left(\frac{Z_{16}}{Z_{12}} \right) - \left(\frac{Z_{18}}{Z_{13}} \right) \right| \right] + c_6 \quad (\text{eq. 3})$$

Onde c_1 a c_6 são as constantes das equações 2 e 3, conforme pode ser observado na **Tabela 3**. Além disso, os subscritos significam diferentes frequências (ver **Tabela A1** no **Anexo 3**). As *features* selecionadas pelos descritores do SISSO para quantificar os valores de D_H e C_{NP} abrangem Z em toda a faixa de frequências aplicadas. Esses dados concordam com nossa hipótese anterior, em que as respostas de impedância foram majoritariamente capacitivas e resistivas, respectivamente, em frequências abaixo e acima de $1,0 \cdot 10^2$ Hz. As **Figuras 23A,B** demonstram as porcentagens de importância relativa das *features* de Z para a determinação de D_H e C_{NP} , respectivamente. Assim, os valores elevados de porcentagem representam as *features*

Tabela 3. Constantes para D_H e C_{NP} obtidas pelo SISSO. Tabela adaptada da referência 30.

Equações	Constantes	Valores
D_H	C_1	$-0,1319308986 \cdot 10^4$
	C_2	$0,4603685182 \cdot 10^{-1}$
	C_3	$0,1272404860 \cdot 10^3$
C_{NP}	C_4	$-0,2335630269 \cdot 10^{16}$
	C_5	$-0,5394275938 \cdot 10^{13}$
	C_6	$0,1528769910 \cdot 10^{13}$

que mais foram selecionadas dentre as milhares de tentativas que o método SISSO fez para a obtenção das equações. Posteriormente, o algoritmo seleciona os descritores que calcularam com acurácia os valores de tamanho e concentração das NPs. Ademais, cada número que acompanha o Z presente no eixo Y corresponde a uma frequência (ver **Figuras 23A,B** e **Tabela A1** no **Anexo 3**).

Nota-se que foram selecionadas diversas frequências pelo SISSO (ver **Tabela A1** no **Anexo 3**), correspondentes as respostas de impedância das regiões capacitiva ($<1,0 \cdot 10^2$ Hz) e resistiva ($>1,0 \cdot 10^2$ Hz). Ademais, as frequências $\geq 1,0 \cdot 10^2$ Hz foram as mais utilizadas nos cálculos de tamanho e concentração das NPs pelo SISSO. Estas frequências, a partir de $1,0 \cdot 10^2$ Hz, correspondem, como já discutido anteriormente, as respostas resistivas de Z que são governadas pela R_s .

Conforme demonstrado na **Figura 23B**, a aplicação das equações 2 e 3 resultou em gráficos de paridade de D_H/C_{NP} previsto vs. esperado com tendências lineares altas ($R^2 > 0,91$) e erros quadráticos médios baixos (*root mean square error*, RMSE), ou seja, 1,9 (grupo de treinamento) e 2,1 nm (conjunto de teste) para D_H e $2,3 \cdot 10^{10}$ (grupo de treinamento) e $2,9 \cdot 10^{10}$ NPs mL^{-1} (conjunto de teste) para C_{NP} . Os erros percentuais absolutos médios resultantes estão descritos na **Tabela 4**. Considerando os resultados de DLS para as três sínteses anteriores como

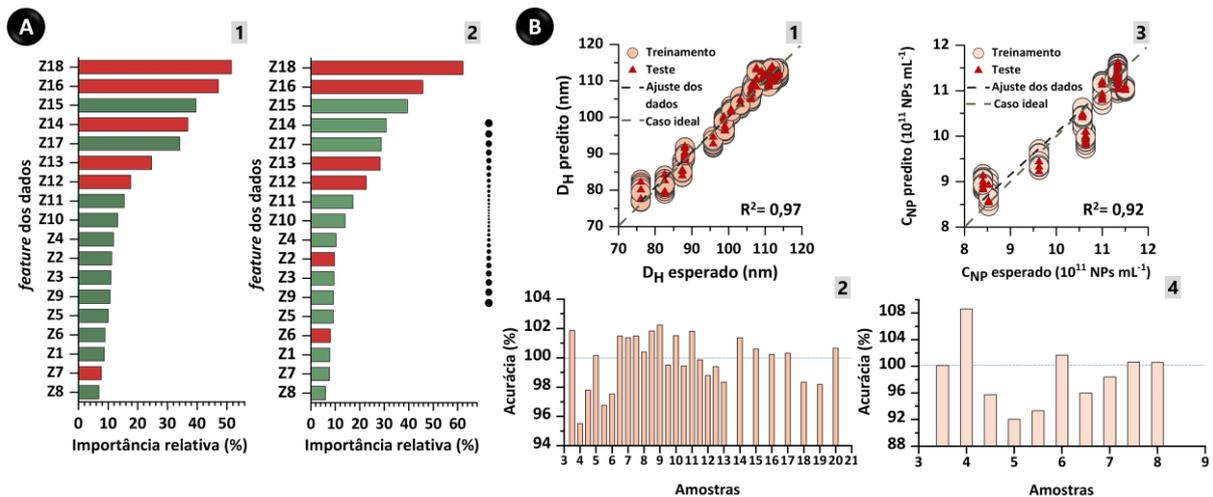


Figura 23. Monitoramento inter-síntese das SiO_2 NPs de 110 nm e processamento de dados por ML. (A) Importância relativa (%) das *features* para determinação de D_H (1) e C_{NP} (2), respectivamente, como previsto pelo SISSO. As *features* utilizadas nas equações 2 e 3 do SISSO estão destacadas em vermelho nos gráficos (1,2). (B) Gráficos de paridade (1,3) e acurácia dos conjuntos de teste (2,4) para os valores de D_H (1,2) e C_{NP} (3,4) para as três sínteses anteriores utilizando SISSO. Figura adaptada da referência 30.

Tabela 4. Erro percentual médio absoluto (*mean absolute percentual erros*, MAPE) para D_H e C_{NP} usando os descritores SISSO. Tabela adaptada da referência 30

Determinação	MAPE Treinamento (%)	MAPE Teste (%)
D_H	1,5	1,6
C_{NP}	1,5	1,9

dados verdadeiros, as acurácias variaram de 95,4% a 102,3% e 91,9% a 108,2% para D_H e C_{NP} , respectivamente, para o conjunto de teste.

A robustez do descritor D_H encontrado pelo SISSO foi avaliada através dos dados de Z , obtidos ao longo de duas novas sínteses das SiO_2NPs de 110 nm ($n = 9$). Neste caso, foram realizados testes cegos em todas as amostras (conjunto de teste). Conforme retratado nas **Figuras 24A,B**, as acurácias para as amostras de 4,0 a 19,0 h variaram de 100,1% a 119,8%. Tais valores são ainda mais aprimorados quando não é considerada as três primeiras amostras (4,0 a 5,0 h), para as quais os erros foram superiores a 15,0%. Neste caso, as maiores acurácias para as duas sínteses foram 109,8% e 115,4%, com a acurácia média global sendo $103,2\% \pm 1,1\%$. Pode-se concluir que o descritor obtido pelo SISSO foi capaz de calcular de forma acurada e robusta o tamanho das NPs, mesmo para o caso dos dados empregados como testes cegos. Superando os problemas de reprodutibilidade inter-síntese

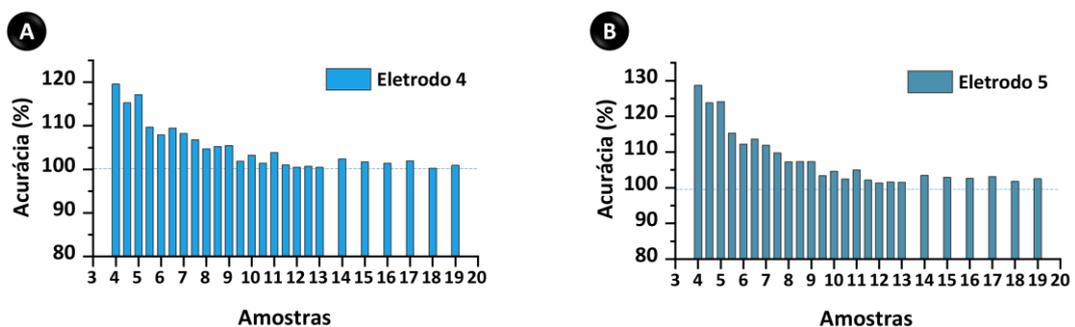


Figura 24. Monitoramento inter-síntese das SiO_2NPs de 110 nm e processamento de dados por ML. Acurácia dos valores de D_H em mais duas sínteses independentes (A) eletrodo 4 e (B) eletrodo 5, usando SISSO. Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. Figura adaptada da referência 30.

PARTE 2. Monitoramento da funcionalização das NPs

4.7. Funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO e sensor capacitivo

A funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO foi realizada através de reações covalentes usando a química do EDC/NHS por permitir ligações entre os grupos carboxila e amina, formando ligações amida estáveis.⁴⁹⁻⁵² A funcionalização foi realizada durante 12,0 h. Novamente, a bomba peristáltica foi empregada para geração do fluxo em um circuito fechado contendo o *chip* de vidro/IDEs com canal milifluídico de PDMS. A funcionalização das NPs com FO foi monitorada por esse *chip* em tempo real e de maneira *in-situ*. Os valores de Z variaram em função de mudanças na carga de superfície das SiO₂NPs-APTES (adsorvidos sobre os IDEs) após ligações covalentes com FO originalmente em solução. Importante ressaltar que a escolha do tamanho de 108 nm foi devido aos protocolos anteriormente estabelecidos de funcionalização para este tamanho de SiO₂NPs, já que para cada tamanho de nanopartícula as quantidades de reagentes precisam ser modificadas e novos estudos de estabilidade precisariam ser conduzidos.

Na **Figura 25**, é apresentada a plataforma empregada no monitoramento e funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO (*link* de vídeo sobre esse sistema está disponível na **Figura 6**), assim como uma imagem de SEM das SiO₂NPs-APTES-FO sobre os IDEs. Um sistema similar ao usado na parte 1 deste trabalho foi aplicado no estudo da funcionalização das NPs com FO. As principais diferenças foram a selagem reversível do sensor por meio de pressão mecânica, como descrito na seção 3.4, e a deposição/adsorção das SiO₂NPs-APTES na região dos IDEs. Diferentes formas de adsorção destas SiO₂NPs-APTES foram testadas (ver **Figura A3** no **Anexo 3**). O preparo que levou à formação de um recobrimento mais uniforme de NPs



Figura 25. Funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO e plataforma de detecção. Reagentes e plataforma analítica utilizados e monitoramento da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO, juntamente com uma imagem SEM dessas SiO₂NPs-APTES funcionalizadas com FO após 12,0 h.

sobre os IDEs foi baseado no gotejamento da suspensão, seguido do seu espalhamento com o auxílio de uma micropipeta e secagem à temperatura ambiente (seção 3.9). Assim, disponibilizando maior área de superfície das NPs-APTES para interagir com FO.

4.8. Caracterização das SiO₂NPs funcionalizadas com APTES e FO

Tamanho, homogeneidade e concentração

O DLS foi utilizado para avaliar o tamanho, homogeneidade e eventual agregação das SiO₂NPs nativas de 108 nm, após funcionalização com APTES (SiO₂NPs-APTES) e ácido fólico (SiO₂NPs-APTES-FO). Valores médios de D_H e PDI foram obtidos ao final da síntese (24,0 h, após purificação) para dispersões em água (SiO₂NPs nativas e SiO₂NPs-APTES). Os diâmetros médios obtidos para as NPs foram de 108,3 ± 1,5 nm (NPs nativas) e 109,0 ± 2,2 nm (SiO₂NPs-APTES) ambas em água. O maior diâmetro das nanopartículas funcionalizadas (SiO₂NPs-APTES) se deve, provavelmente, a molécula de APTES presente em sua superfície. Os valores de PDI foram baixos, sendo iguais a 0,01 ± 0,004 e 0,04 ± 0,006 para as NPs nativas e funcionalizadas, respectivamente (ambas em água). Esses resultados demonstram que as SiO₂NPs antes e após a funcionalização podem ser consideradas altamente monodispersas.⁹⁰

Comparados os valores de D_H em KCl (100,7 ± 0,9 nm), com das NPs em água (108,3 ± 1,5 nm), o diâmetro fica mais elevado devido à forte solvatação mediada por ligações de hidrogênio das SiO₂NPs com as moléculas de água.⁸⁹ O mesmo acontece para a SiO₂NPs-APTES os valores de D_H em KCl (107,8 ± 1,7 nm) e em água (109,0 ± 2,2 nm). No caso do PDI os valores ficaram abaixo de 0,04 em todos os casos, mantendo a homogeneidade independente do meio utilizado.

No caso das SiO₂NPs-APTES-FO, o valor de D_H foi obtido ao final da funcionalização (12,0 h, após purificação). O diâmetro médio destas NPs dispersas em água foi igual a 132,5 ± 1,7 nm. Comparando o diâmetro das NPs nativas com as SiO₂NPs-APTES-FO é observado um aumento no D_H que pode ter ocorrido devido a um grau sutil de agregação, após o processo de adição do ácido fólico ou pela modificação estrutural da nanopartícula, considerando que o FO é hidrofóbico e isso gera uma alteração em como as moléculas de água que interagem com as NPs.¹¹⁵ No caso do PDI, o valor foi igual a 0,08 ± 0,01, demonstrando a homogeneidade de tamanho das NPs. O valor de D_H médio para estas NPs em KCl foi de 1.175,0 ± 578 nm e o PDI igual a 2,1 ± 2,9, neste caso, o aumento da força iônica levou a instabilidade coloidal e conseqüentemente, a agregação das nanopartículas (distribuição

heterogênea de tamanho). Esses dados foram cruciais para avaliar qual a quantidade de reagentes a serem usadas na etapa de monitoramento da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO sobre os IDEs, serão abordadas na seção **4.10**.

Conforme pode ser observado nas imagens de SEM presentes nas **Figuras 26A,B**, em ambos os casos, as nanopartículas apresentaram distribuições de tamanho uniformes e formato quase esférico. Os valores de D_{SEM} foram de $84,7 \pm 0,5$ e $93,5 \pm 0,4$ nm para as amostras NPs nativas e SiO₂NPs-APTES (ao final da síntese), respectivamente. Como já citado anteriormente, os tamanhos por SEM foram inferiores aos valores registrados por DLS devido aos princípios fundamentais de medida dessas técnicas^{20,90,91}. Nesse último caso, como esperado, as SiO₂NPs funcionalizadas com APTES tiveram maior diâmetro. Além disso, o método de adsorção adicionando uma gota das NPs sobre o eletrodo se mostrou promissor, pois possibilitou a cobertura dos IDEs com as SiO₂NPs-APTES. Esse é um fator crucial para a realização da etapa seguinte, referente ao monitoramento *in-situ* da funcionalização das SiO₂NPs-APTES adsorvidas sobre o eletrodo com FO. Essas análises foram realizadas pelo sensor utilizando o método de selagem reversível por meio de pressão mecânica (ver **Figura 3**). Também foram feitas imagens de SEM e a distribuição de tamanho das SiO₂NPs-APTES-FO (ver **Figura A4** no **Anexo 3**). O valor de D_{SEM} foi igual a $93,9 \pm 1,2$ nm, minimamente superior ao diâmetro das SiO₂NPs-APTES. Sendo assim, não é possível concluir que essa

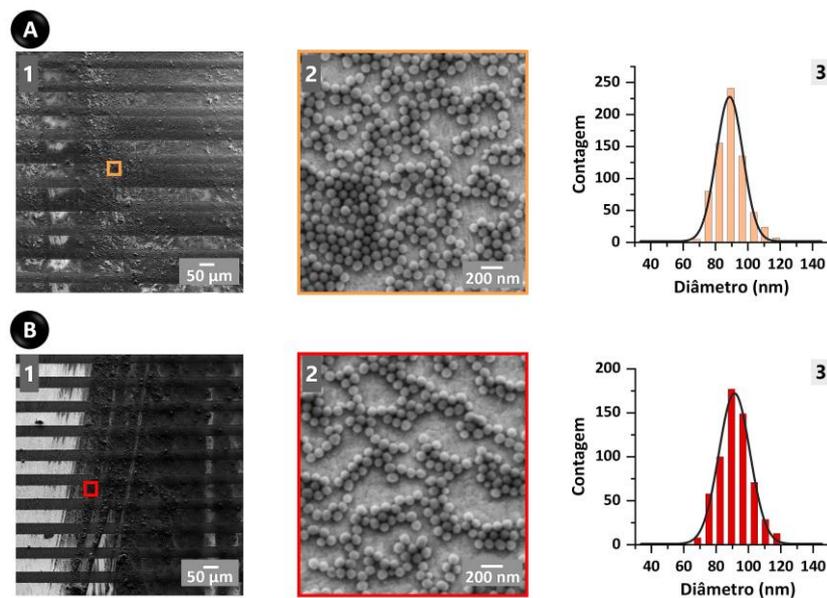


Figura 26. Análise de SEM das SiO₂NPs nativas e funcionalizadas com APTES sobre a região do IDEs. Imagens de SEM (1,2) e distribuição de tamanho (3) das (A) SiO₂NPs nativas de 108 nm e (B) SiO₂NPs-APTES.

diferença de tamanho seria devido a funcionalização com FO, pois pode ser apenas uma variação entre as amostras analisadas.

Concentração mássica

Outra análise realizada foi a gravimetria para determinar a concentração mássica das SiO₂NPs-APTES. O seu valor médio foi de $9,0 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$.⁷⁵ Este resultado é importante, pois é aplicado no cálculo das quantidades dos reagentes a serem utilizados na funcionalização com ácido fólico (biorreceptor a ser ancorado covalentemente sobre as nanopartículas-APTES, seção 3.6).

Estabilidade coloidal

O potencial zeta (ζ) foi medido para avaliarmos a estabilidade coloidal das SiO₂NPs (108 nm), SiO₂NPs-APTES e SiO₂NPs-APTES-FO dispersas. Potenciais negativos foram obtidos devido à presença de grupos silanóis desprotonados na superfície das SiO₂NPs, isso ocorre quando as NPs dispersas estão em meios cujo pH são maiores que 4,0.^{29,83–85} Os potenciais zeta em água e KCl foram, respectivamente, $-50,6 \pm 2,1$ e $-51,9 \pm 1,7$ mV, demonstrando a estabilidade da NPs independente do meio utilizado (lembrando que para as NPs serem consideradas estáveis, o potencial zeta em módulo deve ser maior que 30,0 mV).^{100,101}

Para as SiO₂NPs-APTES, os potenciais zeta obtidos foram $-48,6 \pm 2,2$ (em água, pH= 7,0) e $-38,4 \pm 1,8$ mV (em KCl), demonstrando que ambas as dispersões eram estáveis. Nota-se que o potencial ainda é negativo, mesmo após a funcionalização com o grupamento amina (NH₂) que podem estar protonados, isso pode ser explicado por ainda haver grupos silanóis disponíveis na superfície da NPs, devido ao recobrimento heterogêneo da superfície com a molécula de APTES (pI= 7,30).¹¹⁶ No caso das SiO₂NPs-APTES em KCl, o valor é menos negativo, como esperado. Provavelmente, o aumento da força iônica levou a uma concentração dos íons em solução, modificando as interações eletrostáticas entre as NPs e a solução. Esses íons causam um envelopamento das NPs, neutralizando parcialmente as cargas elétricas, diminuindo o valor de potencial zeta.⁸³

No caso das SiO₂NPs-APTES-FO, o potencial zeta em água foi igual a $-43,6 \pm 0,6$ mV. Comparando com as SiO₂NPs nativas de 108 nm o valor de potencial zeta foi menos negativo, diferente do esperado após a adição do FO. Conforme descrito por Gazzali e colaboradores,¹¹⁵ a molécula de ácido fólico em pH de 4,9-5,5 está em sua forma ácida (sem

carga). Enquanto isso, em meio básico o ácido fólico tem carga negativa (pH= 10,0-10,5) (ver **Figura A5** no **Anexo 3**).¹¹⁷ Contudo, a diminuição observada no valor de potencial zeta pode ser devido a uma oclusão de cargas negativas da superfície das nanopartículas causada pelo FO, ou por um grau sutil de agregação das SiO₂NPs-APTES-FO.^{53,115} O valor de potencial zeta foi $-29,5 \pm 0,9$ em KCl. Esse valor confirma que o aumento da força iônica leva a desestabilização da dispersão gerando a agregação das NPs.⁵³

4.9. Composição química da superfície das SiO₂NPs com e sem funcionalização por XPS

A técnica de XPS foi utilizada para investigar a funcionalização das NPs com FO através do monitoramento do pico N 1s. Os espectros em alta resolução dos picos N 1s e C 1s são apresentados nas **Figuras 27** e **28**, respectivamente. Na **Tabela 5** estão presentes os valores de porcentagem relativa dos elementos (C, N, O e Si) nas diferentes amostras analisadas, esses foram obtidos por meio do tratamento de dados feito no *software CasaXPS*. A partir desses dados, foram calculados os valores de PEF_{N1s} utilizando a porcentagem relativa do N 1s presente nas amostras de SiO₂NPs-APTES modificadas com FO.

Para a amostra de SiO₂NPs-APTES modificada com FO por 6,0 h (1,18% de N1s), o valor de PEF_{N1s} foi assumido como sendo a 100%, devido à saturação da porcentagem relativa de N 1s. Os valores de PEF_{N1s} tiveram um aumento mais elevado entre 1,0 e 2,0 h (**Figuras 27A,B**), alcançando quase 90,0% do total da funcionalização. Posteriormente, a porcentagem de PEF_{N1s} tendeu a uma estabilização após 3,0 h de funcionalização.

Tabela 5. Porcentagem relativa dos elementos para as diferentes amostras analisadas por XPS

Amostras	Porcentagem relativa dos elementos (%)			
	N 1s	C 1s	O 1s	Si 2p
SiO ₂ NPs	0	1,64	64,73	33,63
SiO ₂ NPs-APTES	0,19	2,26	64,06	33,48
SiO ₂ NPs-APTES-FO (1,0 h)	0,81	5,90	60,69	32,60
SiO ₂ NPs-APTES-FO (2,0 h)	1,05	9,30	58,56	31,09
SiO ₂ NPs-APTES-FO (3,0 h)	1,08	6,51	60,25	32,15
SiO ₂ NPs-APTES-FO (4,0 h)	1,16	9,23	58,23	31,37
SiO ₂ NPs-APTES-FO (5,0 h)	1,18	7,70	59,76	31,35
SiO ₂ NPs-APTES-FO (6,0 h)	1,18	7,38	60,07	31,37

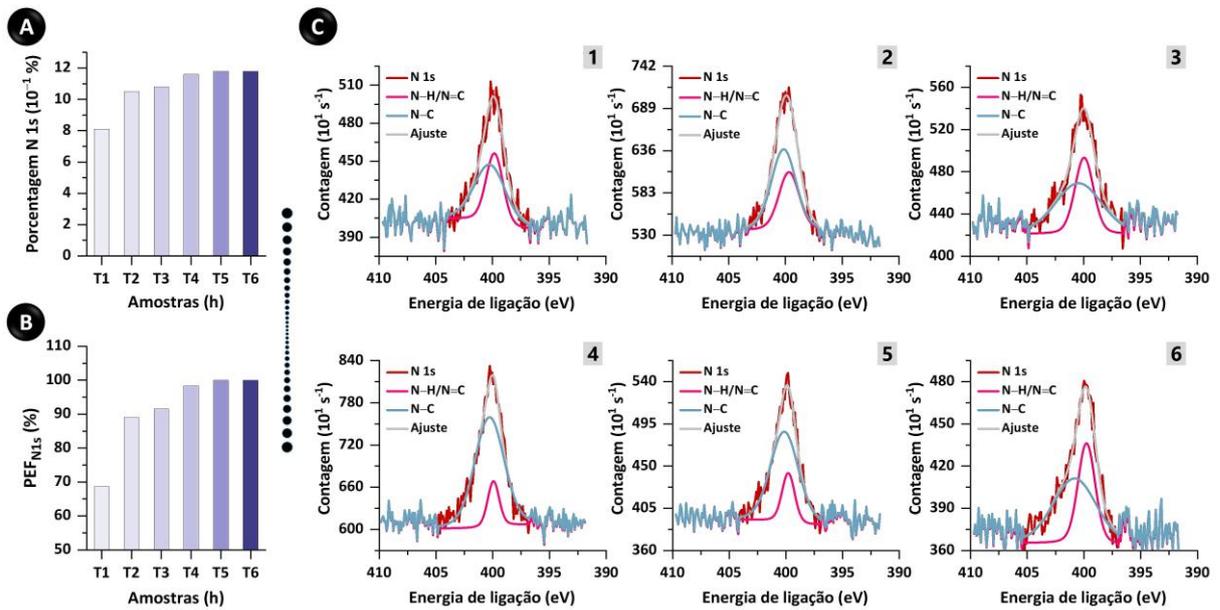


Figura 27. Caracterização das SiO₂NPs nativas e funcionalizadas por XPS. (A) Gráfico de percentagem relativa do N 1s por XPS. (B) Gráfico da percentagem de evolução da funcionalização (PEF_{N1s}) das SiO₂NPs-APTRES com FO. Espectros de XPS em alta resolução do elemento N 1s para as (C) SiO₂NPs-APTRES-FO após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização.

Nota-se uma ausência de picos para o N 1s, conforme esperado, já que este espectro é referente as SiO₂NPs sem funcionalização (ver **Figura A6A** no **Anexo 3**).^{20,94} No entanto, é possível observar a presença de dois picos, correspondentes as ligações C–NH₂ (399,5 eV) e C–NH₃⁺ (402,4 eV), resultantes da molécula de APTRES presente na superfície das NPs (ver **Figura A6B** no **Anexo 3**).^{20,94} No caso das SiO₂NPs-APTRES-FO, novamente existem dois picos (independente da amostra), provavelmente devido as ligações N–H/C=N (399,8 eV) e N–C (400,2 eV), estes podem ser provenientes da molécula de FO (**Figura 27C**).¹¹⁸

No caso dos espectros do C 1s, o sinal do carbono apresentado para as NPs nativas é advento de contaminação (**Figura 28A**), conforme relatado na literatura.⁹⁴ Contudo, para as SiO₂NPs-APTRES, as ligações C–C/C–H (284,7 eV) e C–O/C–N (286,0 eV) podem ser referentes a funcionalização feita com APTRES (**Figura 28B**).⁹⁴ Ademais, para as amostras com ácido fólico, é observado o pico para a ligação C=O (~288,0 eV) (**Figura 28C**), em todos os tempos analisados.^{94,118,119} Também foram obtidos os espectros em alta resolução dos elementos O 1s e Si 2p (ver **Figuras A7,8** no **Anexo 3**).⁹⁴

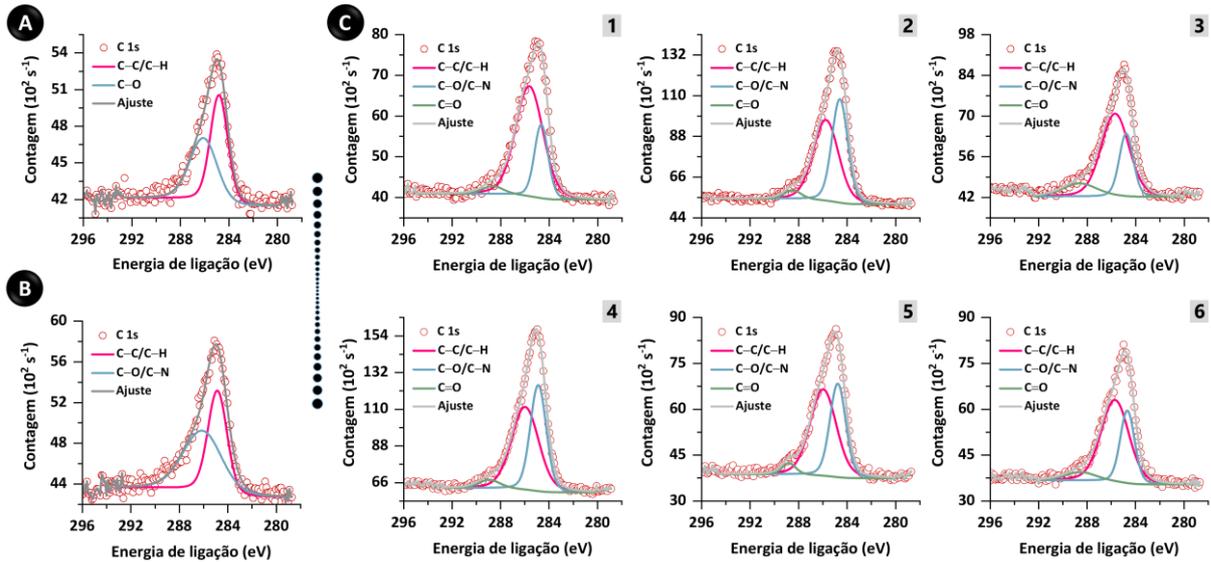


Figura 28. Espectros de XPS em alta resolução do elemento C 1s para as (A) SiO₂NPs nativas de 108 nm, (B) SiO₂NPs-APTES e (C) SiO₂NPs-APTES-FO após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização.

4.10. Monitoramento da funcionalização das SiO₂NPs com ácido fólico pelo sensor

O sensor milifluídico já utilizado no estudo anterior também foi aplicado no monitoramento *in-situ* da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO em tempo real. Lembrando que essa análise se deu com as SiO₂NPs-APTES já adsorvidas sobre a região dos IDEs (**Figura 26B**). Primeiramente, foi realizada a lixiviação do eletrodo durante um total de 2,5 h, momento em que os valores de impedância ficaram constantes (ver **Anexo 3, Figura A9**). Logo após essa etapa foram realizadas as medidas de Z para monitorar a funcionalização das NPs com FO.

Como citado anteriormente na seção 4.3, a partir do ângulo de fase foi possível definir as regiões de frequência onde as repostas de Z são governadas por fenômenos capacitivos e resistivos. Conforme pode ser observado na **Figura 29A** (ver também **Anexo 3, Figura A10**), as repostas de Z foram predominantemente capacitivas até a frequência de $1,0 \cdot 10^4$ Hz ($\Phi > 45^\circ$), conforme demarcado pela linha tracejada. Depois desta frequência, se inicia a região majoritariamente resistiva ($\Phi < 45^\circ$; $> 1,0 \cdot 10^4$ Hz).⁸² Sendo assim, conclui-se que as repostas de Z são governadas por fenômenos capacitivos na maior parte das frequências aplicadas (fato constatado também por ML, esses dados serão discutidos na seção 4.13). No caso do espectro de Bode em diferentes tempos, a tendência da curva exibe um perfil típico, conforme pode ser observado na **Figura 29B**. Neste gráfico, Z diminui com a frequência na região capacitiva (até $1,0 \cdot 10^4$ Hz). Ao observar a ampliação feita na região de $1,0 \cdot 10^2$ a $1,0 \cdot 10^5$

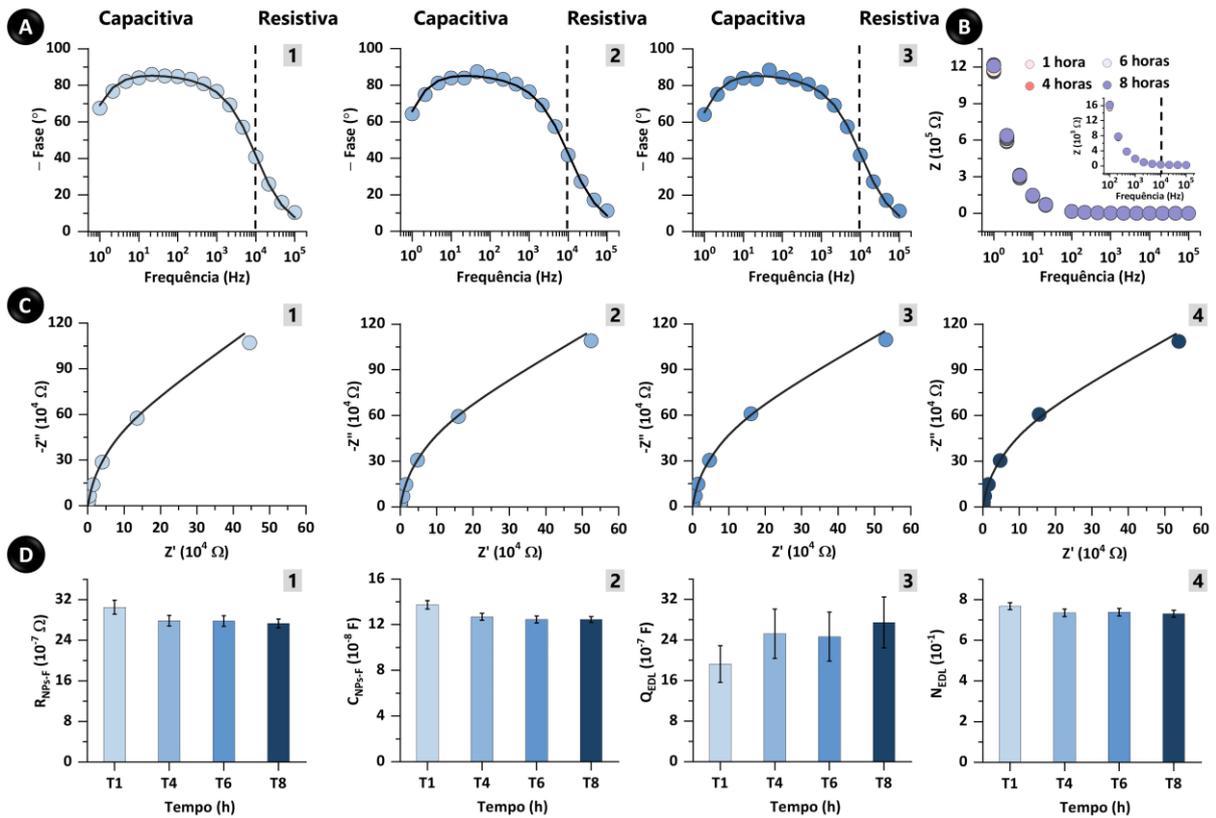


Figura 29. Monitoramento em tempo real da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com o FO. (A) Gráficos de Bode ângulo de fase depois de 1,0 (1); 4,0 (2) e 6,0 (3) de funcionalização. (B) Espectro de Z vs. frequência (Bode) em alguns períodos de síntese, como discriminado. A linha pontilhada separa as frequências correspondentes a região capacitiva e resistiva do sensor. (C) Gráficos de Nyquist depois de 1,0 (1); 4,0 (2); 6,0 (3) e 8,0 h (4) de funcionalização. (D) Gráficos com os valores dos elementos do circuito equivalente C_{NPs-F} (1), R_{NPs-F} (2), Q_{EDL} (3) e N_{EDL} (4).

Hz (ver inserção na **Figura 29B**), é possível verificar que a constância dos valores de Z ocorre após a frequência de 1,0 10⁴ Hz (região resistiva), concordando com as regiões já definidas pelo ângulo de fase. Os intervalos de confiança ($\alpha = 0,05$ e $n = 10$) variaram entre 3,6 10⁻² e 1,0 10⁴ Ω para as frequências de 1,0 10⁰ a 1,0 10⁵ Hz. Através da observação de um único gráfico de Bode fica evidente como diversos fenômenos influenciam as respostas de Z.

Os gráficos de Nyquist ($n = 10$) obtidos após 1,0; 4,0; 6,0 e 8,0 h de funcionalização são apresentados na **Figura 29C**. O circuito equivalente sugerido seguiu a modelagem proposta para eletrodos recobertos, visto que as SiO₂NPs-APTES estavam adsorvidas sobre a região do IDEs.^{81,82,102} Os elementos adicionados foram a capacitância das NPs funcionalizadas adsorvidas (C_{NPs-F}) em paralelo com a sua resistência de carregamento (R_{NPs-F}), ficando em série com a capacitância da EDL (Q_{EDL}) e a resistência da solução (R_s). Devido a heterogeneidade

da superfície do eletrodo a capacitância da EDL foi representada pelo elemento de fase constante (Q_{EDL}).¹⁰³ Os dados de R_s obtidos foram de 2,0; 2,0; 2,1 e 2,0 $10^2 \Omega$ para 1,0; 4,0; 6,0 e 8,0 h, respectivamente. Nota-se que os valores se mantiveram praticamente constantes, o que era esperado, uma vez que a funcionalização das SiO_2NPs -APTES com FO ocorre na superfície do eletrodo. Como apresentado na **Figura 29D**, os valores de R_{NPs} e Q_{EDL} foram baixos mesmo ocorrendo uma pequena variação ao longo do tempo, o que significa que mesmo com a adsorção das SiO_2NPs -APTES sobre a região dos IDEs, o carregamento da interface ainda é eficiente. Como esses valores de R_{NPs-F} e Q_{EDL} foram baixos isso indica que as respostas de impedância resistivas são governadas por R_s . Um dado interessante é que o valor médio global do N_{EDL} (expoente de Q_{EDL} que varia de 0 a 1), sendo igual a $0,74 \pm 0,02$, observa-se que este valor ficou abaixo de 1 (considerando todos os tempos analisados), demonstrando novamente a não idealidade do sistema empregado, uma vez que superfície do eletrodo é considerada heterogênea.¹²⁰ Na **Figura 30A**, temos um esquema representando o circuito equivalente proposto.

Conforme mostrado na **Figura 30B**, em todas as frequências analisadas os perfis das curvas foram semelhantes, com um aumento nos valores de Z até 4,0 h e posteriormente sua estabilização. Neste caso, a diminuição gradual no valor de capacitância das NPs (C_{NPs-F} , ver **Figura 29D**), acontece provavelmente pelo fato da carga das SiO_2NPs -APTES ($\zeta = -48,6 \pm 2,2$ mV) se tornarem menos negativas com o aumento da funcionalização com FO ($\zeta = -43,6 \pm 0,6$ mV, ver seção 4.8), gerando uma diminuição do acúmulo de cargas das SiO_2NPs -APTES-FO na EDL, justificando o aumento dos valores de Z , como observado.

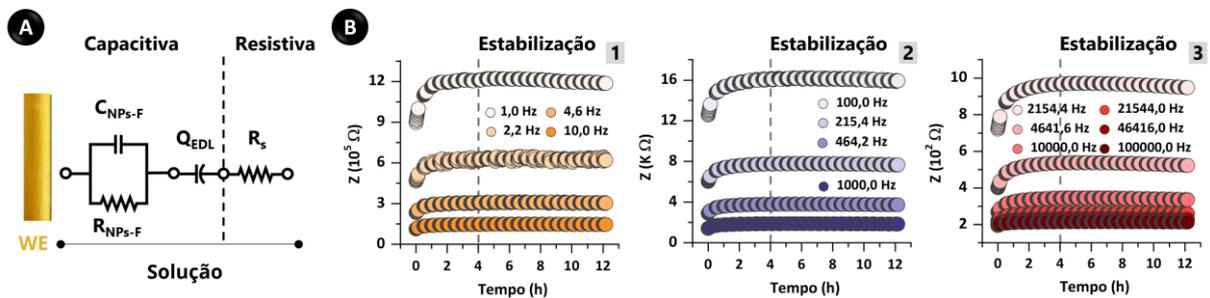


Figura 30. Monitoramento em tempo real da funcionalização das SiO_2NPs -APTES com o FO. (A) Esquema representando o circuito equivalente. Os elementos do circuito equivalente são: C_{NPs-F} , R_{NPs-F} , Q_{EDL} (região capacitiva) e a R_s (região resistiva). (B) Gráficos de impedância vs. tempo em diferentes frequências (1–3).

4.11. Determinação da porcentagem de evolução da funcionalização

A determinação da PEF_{N1s} para as SiO_2NPs -APTES funcionalizadas com FO empregando o *chip* foi inicialmente feita por análise univariada, usando valores de impedância nas frequências de $1,0 \cdot 10^1$ e $1,0 \cdot 10^3$ Hz. As curvas analíticas obtidas e os gráficos de paridade (dados esperados por XPS vs. dados previstos pelo sensor) são mostrados na **Figura 31A**. No caso da curva analítica foram usados os valores de impedância normalizada, conforme descrito na seção **3.10**.

A curva analítica e a acurácia foram obtidas para as amostras entre 1,0 e 6,0 h, para cada frequência. Para as duas frequências escolhidas, os valores de Z_n aumentaram linearmente com a PEF_{N1s} ($R^2 \geq 0,91$), com intervalos de confiança variando de $0,4 \cdot 10^0$ a $4,2 \cdot 10^2$ ($\alpha = 0,05$ e $n = 10$) para ambos os casos. Estes dados demonstram uma boa acurácia inter-funcionalização para as amostras de 1,0 a 6,0 h. Os gráficos de paridade tiveram um $R^2 \geq 0,95$. Como demonstrado na **Figura 31B**, as acurácias variaram entre 97,2 % e 109,0 % para Z_n em $1,0 \cdot 10^1$ Hz e entre 95,9 % e 106,2 % para Z_n em $1,0 \cdot 10^3$ Hz.

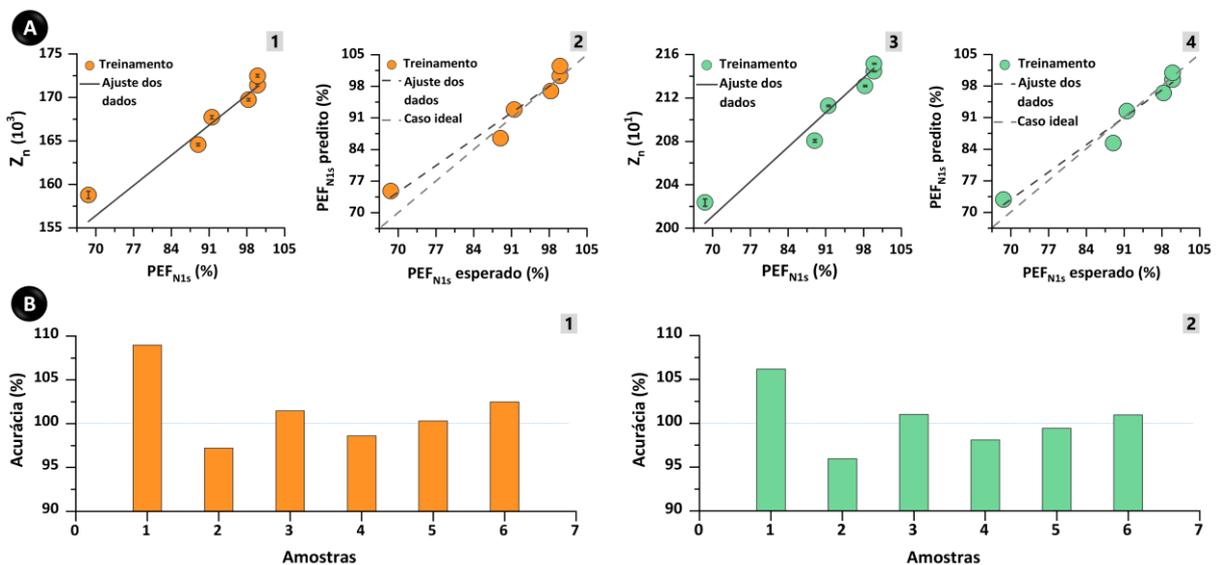


Figura 31. Determinação da PEF_{N1s} da funcionalização das SiO_2NPs -APTES com FO pelo sensor. (A) Curvas analíticas (1,3) e gráficos de paridade (2,4) tomando os dados de Z_n em $1,0 \cdot 10^1$ (1,2) e $1,0 \cdot 10^3$ Hz (3,4). Os conjuntos de treinamento, juntamente com os ajustes de dados e casos ideais, são enfatizados nos gráficos. (B) Acurácias resultantes obtidas de Z_n em $1,0 \cdot 10^1$ (1) e $1,0 \cdot 10^3$ Hz (2). As amostras foram identificadas de acordo com o tempo de coleta (em h) ao longo da funcionalização com FO.

4.12. Reprodutibilidade

A mesma equação de regressão linear da curva analítica adquirida antes para Z_n em $1,0 \cdot 10^1$ Hz foi aplicada no cálculo da PEF_{N1s} para outras três funcionalizações das SiO_2NPs -APTES com FO ($n = 10$). Assim, eletrodos novos e distintos foram usados para cada caso. Conforme pode ser observado na **Figura 32A**, não é observada uma discrepância notável dos novos valores calculados de PEF_{N1s} em relação aos dados verdadeiros (determinados por XPS), as acurácias ficaram entre 97,2 % e 109,0 %. No entanto, conforme pode ser observado nas imagens de SEM apresentadas na **Figura 32C**, é observada uma adsorção heterogênea das NPs sobre o IDEs de Au. Os valores de D_{SEM} foram iguais a $96,6 \pm 0,4$ nm (eletrodo 1) e $97,1 \pm 0,1$ nm (eletrodo 2).

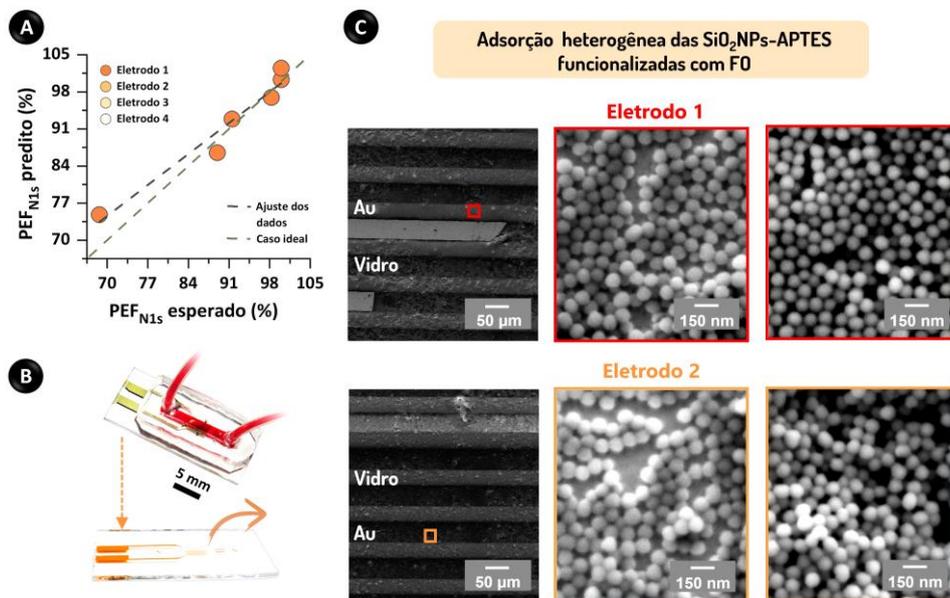


Figura 32. Monitoramento da funcionalização das SiO_2NPs -APTES com FO usando sensores distintos e investigação de adsorção. **(A)** Gráficos de paridade de quatro funcionalizações independentes (eletrodos 1, 2, 3 e 4) aplicando a equação da curva analítica previamente obtida para Z_n em $1,0 \cdot 10^1$ Hz (eletrodo 1). Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. **(B)** Imagens ópticas do dispositivo e vidro destacado para imagens SEM. **(C)** Nanopartículas adsorvidas sobre a região dos IDEs. Imagens SEM, após 12,0 h de funcionalização para dois dispositivos distintos (eletrodos 1 e 2), conforme indicado.

4.13. Reprodutibilidade garantida por ML

Uma análise mais detalhada foi realizada por ML (SISSO) (**Figura 22**), devido à possibilidade em utilizar todo o espectro de impedância na obtenção de um único descritor a ser empregado nos cálculos dos valores de PEF_{N1s} . A vantagem do ML é evitar perda de informações relevantes do espectro, já que todas as frequências são analisadas na obtenção dos modelos pelo método SISSO, diferentemente da regressão linear univariada em que a equação da reta se refere a apenas uma frequência (seção 4.11).

O novo descritor determinado pelo SISSO foi capaz de garantir o cálculo dos valores de PEF_{N1s} de forma reprodutível e acurada, por meio de uma única medida, usada como referência para realização dos cálculos seguintes. Para a equação abaixo, apenas 6 *features* de entrada foram utilizadas de um total de 14 *features* (Z_n vs. frequências, Z_n calculado conforme descrito na seção 3.10) para calcular os valores de PEF_{N1s} .

$$PEF_{N1s} = c_1 * [(Z_{n7} + Z_{n8}) / (Z_{n8} * Z_{n13})] + c_2 * \left[\left(\frac{Z_{n1}}{Z_{n3}} \right) / \left(\frac{Z_{n2}}{Z_{n3}} \right) \right] + c_3 \quad (\text{eq. 4})$$

Os subscritos de Z_n referem-se às frequências selecionadas pelo modelo (ver **Tabela A2** no **Anexo 3**). Na **Tabela 6**, estão presentes os valores das constantes (c_1 a c_3) da equação 4. Além disso, os dados corroboram com a hipótese de que as respostas de Z são governadas por fenômenos capacitivos e resistivos. As frequências mais utilizadas na equação 4 foram abaixo de $1,0 \cdot 10^4$ Hz, onde as respostas de Z são governadas por fenômenos capacitivos. As porcentagens referentes a importância relativa das *features* de Z_n para a determinação da PEF_{N1s} , podem ser observadas na **Figura 33A**. A mesma explicação para o estudo anterior é válida neste caso, as *features* selecionadas foram as que calcularam de forma mais acurada as PEF_{N1s} .

Tabela 6. Constantes para PEF_{N1s} obtidas pelo SISSO

Equação	Constantes	Valores
PEF_{N1s}	C_1	$-8,843 \cdot 10^4$
	C_2	$3,9368 \cdot 10^0$
	C_3	$1,1463 \cdot 10^3$

Na **Figura 33B**, estão presentes os gráficos de paridade (PEF_{N1s} previsto vs. esperado) resultantes dos valores obtidos após a aplicação das eq. 4. O valor de R² obtido foi igual a 0,98, indicando uma boa linearidade nos valores de treinamento. O valor de raiz dos erros quadráticos médios (*root mean square error*, RMSE) obtido pelo SISSO foi de 1,5 % para o grupo de treinamento utilizando os dados de uma funcionalização. Na **Tabela 7**, são descritos os erros percentuais absolutos médios.

Tabela 7. Erro percentual médio absoluto (*mean absolute percentual errors*, MAPE) para PEF_{N1s} usando o descritor SISSO

Determinação	MAPE Treinamento (%)
PEF _{N1s}	3,5

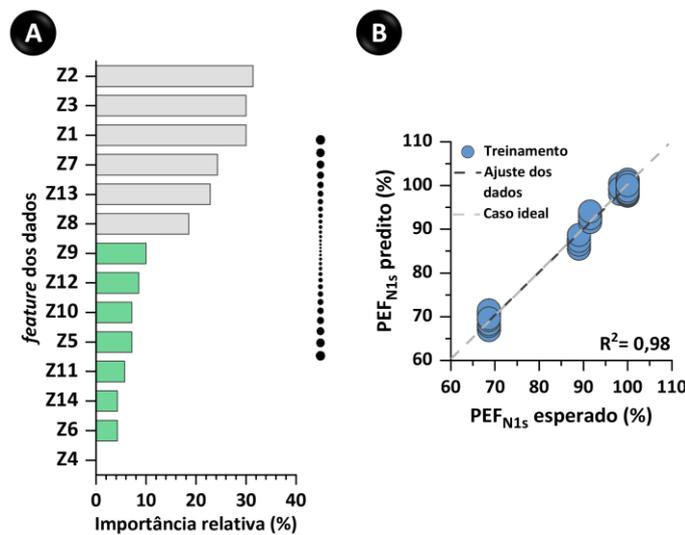


Figura 33. Monitoramento da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO e processamento de dados por ML. (A) Importância relativa (%) das *features* para determinação da PEF_{N1s}, como previsto pelo SISSO. As *features* utilizadas na equação 4 do SISSO estão destacadas em cinza no gráfico. (B) Gráfico de paridade do conjunto de treinamento para os valores de PEF_{N1s} de uma funcionalização obtido utilizando o SISSO.

A robustez da equação 4 foi avaliada utilizando os valores de Z_n adquiridos no monitoramento de quatro novas funcionalizações das SiO₂NPs-APTES com FO ($n = 10$) em eletrodos diferentes. Para isso, os testes cegos foram realizados em todas as amostras (conjunto de teste). Na **Figura 34A**, pode ser observados os valores de acurácia para cada funcionalização separadamente. Neste caso, as acurácias variaram entre $91,8 \pm 0,9$ % e $97,2 \pm 0,8$ % para as amostras com os tempos de 1,0 a 6,0 h. Novamente, o SISSO se mostrou eficiente ao calcular

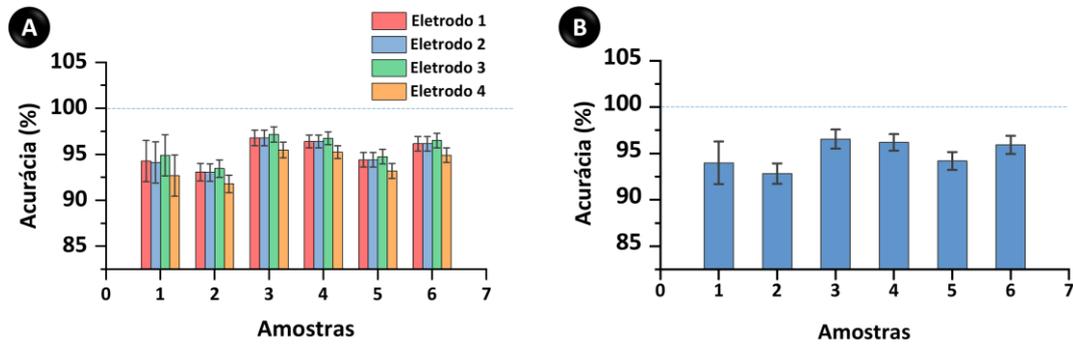


Figura 34. Monitoramento da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO e processamento de dados por ML. (A) Acurácia dos valores de PEF_{N1s} para quatro funcionalização separadamente (eletrodos de 1 a 4) por SISSO. Importante destacar para este gráfico que a palavra eletrodo equivale a sensor. (B) Acurácia média dos valores de PEF_{N1s} das quatro funcionalizações por amostra usando SISSO.

os valores de PEF_{N1s} para os testes cegos. Superando o desafio relacionado a reprodutibilidade das respostas de Z_n em monitoramentos diferentes ao empregar eletrodos distintos. Na **Figura 34B**, são apresentados os valores de acurácia média das quatro funcionalizações utilizadas como teste cego. Os valores de acurácia média variaram de $92,8 \pm 1,1 \%$ a $96,6 \pm 1,1 \%$.

5. CONCLUSÕES

Baseada em um sensor milifluídico impedimétrico com dados processados por ML, propomos uma nova plataforma para monitorar a síntese e a funcionalização das SiO₂NPs em tempo real e de maneira *in-situ*. No primeiro caso, essa estratégia superou as interferências resultantes da adsorção das nanopartículas sobre as respostas de eletrodos polarizáveis ao longo da síntese, possibilitando a determinação *in-situ* e em tempo real de múltiplos parâmetros das NPs (tamanho e concentração) a partir de uma única medida de Z vs. frequência. Descritores simples ajustados pelo método de SISSO foram capazes de garantir a multideterminação do D_H e C_{NP}, atendendo a um compromisso entre acurácia e velocidade/simplicidade computacionais. Tais características favorecem a implementação de plataformas analíticas assistidas por ML *sample-to-answer* em *smartphones*, promovendo análises simples por dispensar o tratamento de dados pelo operador.⁶⁰ Deve-se enfatizar também que esses dados mostram a potencialidade do uso de ML para, a partir da seleção inteligente de apenas determinadas *features* dos espectros gerados pelo sensor, obtermos modelos de regressão com uma maior capacidade de predição em comparação com rotinas tradicionais baseadas em respostas univariadas.¹²¹ Neste trabalho, as *features* selecionadas pelo SISSO concordaram com a nossa hipótese sobre a relevância da diversificação química dos gráficos de Bode ou, mais especificamente, de ambos os fenômenos que regem Z, os capacitivos e os resistivos, para o sucesso da aplicação. A interpretação físico-química dos modelos por ML é desafiadora e vem sendo alvo de discussão quando convergindo a ciência de dados com as ciências naturais, sejam teóricas ou experimentais.¹²² Os resultados obtidos nesta primeira parte foram publicados na revista *ACS Sensors* (**Anexo 3, Figura A11**).³⁰

Como o sensor apresenta um princípio de resposta universal, uma segunda parte do trabalho consistiu em monitorar a funcionalização química das SiO₂NPs-APTES com FO, um direcionador para interação com células tumorais. Enquanto Z variou ao longo da síntese, certamente, em função da resistência da solução e de propriedades capacitivas da interface (NPs e EDL), as variações de Z com o processo de funcionalização foram atribuídas principalmente à diminuição gradual da capacitância das NPs, resultado da redução do potencial do conjugado SiO₂NPs-APTES após reação com FO conforme mostrado através de medidas de potencial zeta. Mais uma vez, a diversificação química dos gráficos de Bode foi essencial para a determinação acurada da porcentagem da evolução de funcionalização, PEF_{N1s}, das nanopartículas via o uso de um descritor simples gerado pelo SISSO. Para esse monitoramento, a etapa de preparo do sensor foi baseada em um protocolo simples para adsorção das SiO₂NPs-APTES, envolvendo as etapas de gotejamento da suspensão, espalhamento com microponteira plástica e secagem à

temperatura ambiente. Os resultados obtidos nesta segunda parte serão submetidos em breve ao periódico *ACS Sensors*.

Com base em considerações feitas anteriormente, a tecnologia descrita neste projeto pode auxiliar a produção de SiO₂NPs em larga-escala com reprodutibilidade uma vez que ela leva a um controle de qualidade das suas propriedades em tempo real. Nesse caso, a duração do processo de síntese deixa de ser definida por um tempo específico, e passar a ser variável sendo finalizada logo após a obtenção das propriedades desejadas do NM. Além disso, o nosso sistema pode ser útil para a área de ciência de materiais por possibilitar estudos sobre a cinética de síntese e a eficiência de funcionalização química, como mostrado, os quais são essenciais para a obtenção, por exemplo, de nanomedicamentos mais eficazes.^{31,123–125} No entanto é importante ressaltar que este método não é capaz de realizar uma caracterização química nos moldes de uma análise espectroscópica, ou seja, esta plataforma não substitui caracterizações já bem estabelecidas na literatura. Ademais, espera-se que a plataforma possa ser estendida a outros materiais e que ela possa ser usada para monitorar em tempo real as transformações dos NMs, como a formação da coroa de proteína e de agregados.^{86,87} Por exemplo, como recentemente demonstrado na literatura, foi possível avaliar a dinâmica de formação das camadas da coroa de proteína, mole e dura, sobre NPs de carbono usando um dispositivo microfluídico impedimétrico.³² Essas transformações são cruciais em meios complexos por conferirem aos NMs uma identidade própria, com novas propriedades. Em outras palavras, as entidades coloidais formadas passam a governar as propriedades funcionais e a toxicidade dos NMs,⁸⁷ de modo que o estudo das suas transformações fornece informações importantes sobre nanotoxicologia¹²⁶ e medicina de precisão.¹²⁷ Como conclusão final, embora os dados obtidos até o momento sejam promissores, a aplicação futura do método a demais NMs e em diferentes cenários será imprescindível para uma investigação criteriosa da sua robustez e margem de aplicabilidade.

Existem algumas perspectivas que podem ser avaliadas futuramente neste trabalho. Uma das possibilidades seria variar as configurações do dispositivo empregado, por exemplo, diminuindo a largura e o espaço entre os IDEs. Assim como avaliar diferentes vazões do sensor. Neste sentido, estudos adicionais podem ser conduzidos na tentativa de gerar um ambiente com fluxo mais controlado, avaliando o transporte de massa por difusão e convecção, podendo ser usado um regime de difusão laminar que evita a ocorrência de gradientes térmicos tornando as medidas mais estáveis. Sendo um método promissor para sintetizar as NPs com

reprodutibilidade em larga escala.³⁸ Ademais, uma outra opção seria empregar essa plataforma para avaliar a estabilidade coloidal em função do tempo de armazenamento das SiO₂NPs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Fadel, T. R.; Farrell, D. F.; Friedersdorf, L. E.; Griep, M. H.; Hoover, M. D.; Meador, M. A.; Meyyappan, M. Toward the Responsible Development and Commercialization of Sensor Nanotechnologies. *ACS Sens.* **2016**, *1*, 207–216.
- (2) Lang, X.; Wang, T.; Sun, M.; Chen, X.; Liu, Y. Advances and Applications of Chitosan-Based Nanomaterials as Oral Delivery Carriers: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *154*, 433–445.
- (3) Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Song, F.; Liu, R.; Guo, H.; Olsen, D. W. H.; Cohen, Y.; Emili, A.; Chan, W. C. W. Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 2439–2455.
- (4) Cai, X.; Liu, X.; Jiang, J.; Gao, M.; Wang, W.; Zheng, H.; Xu, S.; Li, R. Molecular Mechanisms, Characterization Methods, and Utilities of Nanoparticle Biotransformation in Nanosafety Assessments. *Small* **2020**, *16* (36), 1907663.
- (5) Moore, C. J.; Montón, H.; O’Kennedy, R.; Williams, D. E.; Nogués, C.; Crean, C.; Gubala, V. Controlling Colloidal Stability of Silica Nanoparticles During Bioconjugation Reactions with Proteins and Improving Their Longer-Term Stability, Handling and Storage. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (10), 2043–2055.
- (6) Caracciolo, G.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35* (3), 257–264.
- (7) Donahue, N. D.; Acar, H.; Wilhelm, S. Concepts of Nanoparticle Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Kinetics in Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *143*, 68–96.
- (8) Hu, B.; He, M.; Chen, B. Magnetic Nanoparticle Sorbents. In *Solid-Phase Extraction*; Elsevier, 2019; pp 235–284.
- (9) The Nanodatabase <https://www.nanodb.dk/> (accessed 2020 -12 -14).
- (10) Hansen, S. F.; Hansen, O. F. H.; Nielsen, M. B. Advances and Challenges Towards Consumerization of Nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15*, 964–965.
- (11) Pistilli, M. Why Invest in Nanotech Stocks?
- (12) Food and Drug Administration. *Nanotechnology—Over a Decade of Progress and Innovation: A Report by the U.S. Food and Drug Administration*; 2020.
- (13) Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle Colloidal Stability in Cell

- Culture Media and Impact on Cellular Interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287–6305.
- (14) Wagner, V.; Dullaart, A.; Bock, A. K.; Zweck, A. The Emerging Nanomedicine Landscape. *Nat Biotechnol* **2006**, *24* (10), 1211–1217.
- (15) Oroojalian, F.; Charbgo, F.; Hashemi, M.; Amani, A.; Yazdian-Robati, R.; Mokhtarzadeh, A.; Ramezani, M.; Hamblin, M. R. Recent Advances in Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Kidney. *J. Control Release* **2020**, *321*, 442–462.
- (16) Argyo, C.; Weiss, V.; Bra, C.; Bein, T. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as a Universal Platform for Drug Delivery. *Chem. Mater.* **2013**, *26*, 435–451.
- (17) Tang, L.; Cheng, J. Nonporous Silica Nanoparticles for Nanomedicine Application. *Nano Today* **2013**, *8* (3), 290–312.
- (18) Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-Based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2826–2885.
- (19) Doane, T. L.; Burda, C. The Unique Role of Nanoparticles in Nanomedicine: Imaging, Drug Delivery and Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2885–2911.
- (20) Capeletti, L. B.; Oliveira, J. F. A. de; Loiola, L. M. D.; Galdino, F. E.; Santos, D. E. da S.; Soares, T. A.; Freitas, R. de O.; Cardoso, M. B. Gram-Negative Bacteria Targeting Mediated by Carbohydrate–Carbohydrate Interactions Induced by Surface-Modified Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29* (48), 1904216.
- (21) Picco, A. S.; Mondo, G. B.; Ferreira, L. F.; de Souza, E. E.; Peroni, L. A.; Cardoso, M. Protein Corona Meets Freeze-Drying: Overcoming the Challenges of Colloidal Stability, Toxicity, and Opsonin Adsorption. *Nanoscale* **2020**, *13* (2), 753–762.
- (22) Kou, L.; Bhutia, Y. D.; Yao, Q.; He, Z.; Sun, J.; Ganapathy, V. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation Across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1–16.
- (23) Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M. Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers to Drug Delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (9), 941–951.
- (24) Huang, K.-W.; Hsu, F.-F.; Qiu, J. T.; Chern, G.-J.; Lee, Y.-A.; Chang, C.-C.; Huang, Y.-T.; Sung, Y.-C.; Chiang, C.-C.; Huang, R.-L.; Lin, C.-C.; Dinh, T. K.; Huang, H.-C.; Shih, Y.-C.; Alson, D.; Lin, C.-Y.; Lin, Y.-C.; Chang, P.-C.; Lin, S.-Y.; Chen, Y. Highly Efficient and Tumor-Selective Nanoparticles for Dual-Targeted Immunogene Therapy Against Cancer. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaax5032.

- (25) Xu, C.; Nam, J.; Hong, H.; Xu, Y.; Moon, J. J. Positron Emission Tomography-Guided Photodynamic Therapy with Biodegradable Mesoporous Silica Nanoparticles for Personalized Cancer Immunotherapy. *ACS Nano* **2019**, *13* (10), 12148–12161.
- (26) Green, D. L.; Lin, J. S.; Lam, Y.-F.; Hu, M. Z.-C.; Schaefer, D. W.; Harris, M. T. Size, Volume Fraction, and Nucleation of Stober Silica Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *266*, 346–358.
- (27) Croissant, J. G.; Fatieiev, Y.; Khashab, N. M. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (9), 1604634.
- (28) Scheffer, F. R.; Silveira, C. P.; Morais, J.; Bettini, J.; Cardoso, M. B. Tailoring Pseudo-Zwitterionic Bifunctionalized Silica Nanoparticles: From Colloidal Stability to Biological Interactions. *Langmuir* **2020**, *36*, 10756–10763.
- (29) *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*; Bergna, H. E., Roberts, W. O., Eds.; CRC Press: New York, 2006; Vol. 131.
- (30) Ferreira, L. F.; Giordano, G. F.; Gobbi, A. L.; Piazzetta, M. H. O.; Schleder, G. R.; Lima, R. S. Real-Time and In Situ Monitoring of the Synthesis of Silica Nanoparticles. *ACS Sens.* **2022**, *7* (4), 1045–1057.
- (31) Shimizu, F. M.; Pasqualetti, A. M.; Todão, F. R.; de Oliveira, J. F. A.; Vieira, L. C. S.; Gonçalves, S. P. C.; da Silva, G. H.; Cardoso, M. B.; Gobbi, A. L.; Martinez, D. S. T.; Oliveira, O. N.; Lima, R. S. Monitoring the Surface Chemistry of Functionalized Nanomaterials with a Microfluidic Electronic Tongue. *ACS Sens.* **2018**, *3*, 716–726.
- (32) Srivastava, I.; Khan, M. S.; Dighe, K.; Alafeef, M.; Wang, Z.; Banerjee, T.; Ghonge, T.; Grove, L. M.; Bashir, R.; Pan, D. On-Chip Electrical Monitoring of Real-Time “Soft” and “Hard” Protein Corona Formation on Carbon Nanoparticles. *Small Methods* **2020**, *4* (7), 200099.
- (33) Ferreira, L. F.; Picco, A. S.; Galdino, F. E.; Albuquerque, L. J. C.; Berret, J.-F.; Cardoso, M. B. Nanoparticle–Protein Interaction: Demystifying the Correlation between Protein Corona and Aggregation Phenomena. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 28559–28569.
- (34) Rosati, G.; Idili, A.; Parolo, C.; Fuentes-Chust, C.; Calucho, E.; Hu, L.; Silva, C. de C. C. e; Rivas, L.; Nguyen, E. P.; Bergua, J. F.; Álvarez-Diduk, R.; Muñoz, J.; Junot, C.; Penon, O.; Monferrer, D.; Delamarche, E.; Merkoçi, A. Nanodiagnostics to Face SARS-

- CoV-2 and Future Pandemics: From an Idea to the Market and Beyond. *ACS Nano* **2021**, *15*, 17137–17149.
- (35) Kwon, O. S.; Song, H. S.; Park, T. H.; Jang, J. Conducting Nanomaterial Sensor Using Natural Receptors. *Chem. Rev.* **2018**, *119* (1), 36–93.
- (36) Schroeder, V.; Savagatrup, S.; He, M.; Lin, S.; Swager, T. M. Carbon Nanotube Chemical Sensors. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (1), 599–663.
- (37) Phillips, T. W.; Lignos, I. G.; Maceiczky, R. M.; deMello, A. J.; deMello, J. C. Nanocrystal Synthesis in Microfluidic Reactors: Where Next? *Lab Chip* **2014**, *14*, 3172–3180.
- (38) Riche, C. T.; Roberts, E. J.; Gupta, M.; Brutchey, R. L.; Malmstadt, N. Flow Invariant Droplet Formation for Stable Parallel Microreactors. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10780.
- (39) Bobo, D.; Robinson, K. J.; Islam, J.; Thurecht, K. J.; Corrie, S. R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373–2387.
- (40) Walkey, C. D.; Chan, W. C. W. Understanding and Controlling the Interaction of Nanomaterials with Proteins in a Physiological Environment. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2780–2799.
- (41) Kumar, A.; Mansuour, H. M.; Friedman, A.; Blough, E. R. *Nanomedicine in Drug Delivery*; Boca Raton: CRC Press, 2013.
- (42) Saha, K.; Rahimi, M.; Yazdani, M.; Kim, S. T.; Moyano, D. F.; Hou, S.; Das, R.; Mout, R.; Rezaee, F.; Mahmoudi, M.; Rotello, V. M. Regulation of Macrophage Recognition through the Interplay of Nanoparticle Surface Functionality and Protein Corona. *ACS Nano* **2016**, *10* (4), 4421–4430.
- (43) Schneid, A. da C.; Silveira, C. P.; Galdino, F. E.; Ferreira, L. F.; Bouchmella, K.; Cardoso, M. B. Colloidal Stability and Redispersibility of Mesoporous Silica Nanoparticles in Biological Media. *Langmuir* **2020**, *36*, 11442–11449.
- (44) Rahman, M.; Laurent, S.; Tawil, N.; Yahia, L.; Mahmoudi, M. *Protein-Nanoparticle Interactions*; Springer Series: Berlin, Heidelberg, 2013.
- (45) Nel, A. E.; Mädler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding Biophysicochemical Interactions at the Nano-Bio Interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (7), 543–557.
- (46) Frickenstein, A. N.; Hagood, J. M.; Britten, C. N.; Abbott, B. S.; McNally, M. W.; Vopat, C. A.; Patterson, E. G.; MacCuaig, W. M.; Jain, A.; Walters, K. B.; McNally, L. R.

- Mesoporous Silica Nanoparticles: Properties and Strategies for Enhancing Clinical Effect. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (4), 570.
- (47) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the Clinic: An Update. *Bioeng. Transl. Med.* **2019**, *4* (3), e10143.
- (48) Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T. F. An Overview of Active and Passive Targeting Strategies to Improve the Nanocarriers Efficiency to Tumour Sites. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, *71* (8), 1185–1198.
- (49) Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaële, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angelo, J.; Cattel, L.; Couvreur, P. Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1452–1464.
- (50) Yang, S. J.; Lin, F. H.; Tsai, K. C.; Wei, M. F.; Tsai, H. M.; Wong, J. M.; Shieh, M. J. Folic Acid Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 679–689.
- (51) Ni, J.; Wang, Q.; Yang, W.; Zhao, M.; Zhang, Y.; Guo, L.; Qiu, B.; Lin, Z.; Yang, H. H. Immobilization Free Electrochemical Biosensor for Folate Receptor in Cancer Cells Based on Terminal Protection. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 496–501.
- (52) Bai, R. G.; Muthoosamy, K.; Tuvikene, R.; Manickam, S.; Ming, H. N. Highly Sensitive Electrochemical Biosensor Using Folic Acid-Modified Reduced Graphene Oxide for the Detection of Cancer Biomarker. *Nanomaterials* **2021**, *11* (5).
- (53) De Oliveira, L. F.; Bouchmella, K.; Gonçalves, K. D. A.; Bettini, J.; Kobarg, J.; Cardoso, M. B. Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. *Langmuir* **2016**, *32*, 3217–3225.
- (54) Nicoliche, C. Y. N.; de Oliveira Jr., O. N.; Lima, R. S. Multidimensional Sensors: Classification, Nanoprobes, and Microfluidics. In *Handbook on Miniaturization in Analytical Chemistry: Application of Nanotechnology*; Hussain, C., Ed.; Elsevier, 2020; pp 185–219.
- (55) Ismail, I.; Hwang, Y.-H.; Joo, S.-T. Low-Temperature and Long-Time Heating Regimes on Non-Volatile Compound and Taste Traits of Beef Assessed by the Electronic Tongue System. *Food Chem.* **2020**, *320*, 126656.
- (56) Wasilewski, T.; Migoń, D.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Critical Review of Electronic Nose and Tongue Instruments Prospects in Pharmaceutical Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1077*, 14–29.

- (57) Braunger, M. L.; Fier, I.; Rodrigues, V.; Arratia, P. E.; Riul Jr., A. Microfluidic Mixer with Automated Electrode Switching for Sensing Applications. *Chemosensors* **2020**, *8* (13).
- (58) de Oliveira, R. A. G.; Nicoliche, C. Y. N.; Pasqualetti, A. M.; Shimizu, F. M.; Ribeiro, I. R.; Melendez, M. E.; Carvalho, A. L.; Gobbi, A. L.; Faria, R. C.; Lima, R. S. Low-Cost and Rapid-Production Microfluidic Electrochemical Double-Layer Capillary Capacitors for Fast and Sensitive Breast Cancer Diagnosis. *Anal. Chem.* **2018**, S1–S10.
- (59) Nicoliche, C. Y. N.; Costa, G. F.; Gobbi, A. L.; Shimizu, F. M.; Lima, R. S. Pencil Graphite Core for Pattern Recognition Applications. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 4623–4626.
- (60) Nicoliche, C. Y. N.; de Oliveira, R. A. G.; da Silva, G. S.; Ferreira, L. F.; Rodrigues, I. L.; Faria, R. C.; Fazzio, A.; Carrilho, E.; de Pontes, L. G.; Schleder, G. R.; Lima, R. S. Converging Multidimensional Sensor and Machine Learning Toward High-Throughput and Biorecognition Element-Free Multidetermination of Extracellular Vesicle Biomarkers. *ACS Sens.* **2020**, *5* (7), 1864–1871.
- (61) Silva, G. S. da; Oliveira, L. P. de; Costa, G. F.; Giordano, G. F.; Nicoliche, C. Y. N.; Silva, A. A. da; Khan, L. U.; Silva, G. H. da; Gobbi, A. L.; Silveira, J. v; Filho, A. G. S.; Schleder, G. R.; Fazzio, A.; Martinez, D. S. T.; Lima, R. S. Ordinary Microfluidic Electrodes Combined with Bulk Nanoprobe Produce Multidimensional Electric Double-Layer Capacitances Towards Metal Ion Recognition. *Sens. Actuators B: Chem.* **2020**, *305*, 127482.
- (62) Barbosa, J. A.; Freitas, V. M. S.; Vidotto, L. H. B.; Schleder, G. R.; de Oliveira, R. A. G.; da Rocha, J. F.; Kubota, L. T.; Vieira, L. C. S.; Tolentino, H. C. N.; Neckel, I. T.; Gobbi, A. L.; Santhiago, M.; Lima, R. S. Biocompatible Wearable Electrodes on Leaves toward the On-Site Monitoring of Water Loss from Plants. *ACS Appl Mater Interfaces* **2022**, *14* (20), 22989–23001.
- (63) Shimizu, F. M.; Todão, F. R.; Gobbi, A. L.; Oliveira, O. N.; Jr., C. D. G.; Lima, R. S. Functionalization-Free Microfluidic Electronic Tongue Based on a Single Response. *ACS Sens.* **2017**, *2*, 1027–1034.
- (64) Ouyang, R.; Curtarolo, S.; Ahmetcik, E.; Scheffler, M.; Ghiringhelli, L. M. SISSO: A Compressed-Sensing Method for Identifying the Best Low-Dimensional Descriptor in an Immensity of Offered Candidates. *Phys. Rev. Mater.* **2018**, *2* (8), 083802.

- (65) Giordano, G. F.; Vieira, L. C. S.; Gomes, A. O.; de Carvalho, R. M.; Kubota, L. T.; Fazzio, A.; Schleder, G. R.; Gobbi, A. L.; Lima, R. S. Distilling Small Volumes of Crude Oil. *Fuel* **2021**, *285*, 119072.
- (66) Giordano, G. F.; Freitas, V. M. S.; Schleder, G. R.; Santhiago, M.; Gobbi, A. L.; Lima, R. S. Bifunctional Metal Meshes Acting as a Semipermeable Membrane and Electrode for Sensitive Electrochemical Determination of Volatile Compounds. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (30), 35914–35923.
- (67) Giordano, G. F.; Ferreira, L. F.; Bezerra, Í. R. S.; Barbosa, J. A.; Costa, J. N. Y.; Pimentel, G. J. C.; Lima, R. S. Machine Learning Toward High-Performance Electrochemical Sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2023**.
- (68) Lima, R. S.; Segato, T. P.; Gobbi, A. L.; Coltro, W. K. T.; Carrilho, E. Doping of a Dielectric Layer as a New Alternative for Increasing Sensitivity of the Contactless Conductivity Detection in Microchips. *Lab Chip* **2011**, *11* (24), 4148–4151.
- (69) Moraes, F. C.; Lima, R. S.; Segato, T. P.; Cesarino, I.; Cetino, J. L. M.; Machado, S. A. S.; Gomez, F.; Carrilho, E. Glass/PDMS Hybrid Microfluidic Device Integrating Vertically Aligned SWCNTs to Ultrasensitive Electrochemical Determinations. *Lab Chip* **2012**, *12* (11), 1959–1962.
- (70) Lima, R. S.; Piazzetta, M. H. O.; Gobbi, A. L.; Rodrigues-Filho, U. P.; Nascente, P. A. P.; Coltro, W. K. T.; Carrilho, E. Contactless Conductivity Biosensor in Microchip Containing Folic Acid as Bioreceptor. *Lab Chip* **2012**, *12* (11), 1963–1966.
- (71) Daikuzono, C. M.; Dantas, C. A. R.; Volpati, D.; Constantino, C. J. L.; Piazzetta, M. H. O.; Gobbi, A. L.; Taylor, D. M.; Oliveira Jr., O. N.; Riul Jr., A. Microfluidic Electronic Tongue. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *207*, 1129–1135.
- (72) Braunger, M. L.; Shimizu, F. M.; Jimenez, M. J. M.; Amaral, L. R.; Piazzetta, M. H. de O.; Gobbi, A. L.; Magalhães, P. S. G.; Rodrigues, V.; Oliveira Jr., O. N.; Riul Jr., A. Microfluidic Electronic Tongue Applied to Soil Analysis. *Chemosensors* **2017**, *5* (2).
- (73) Daikuzono, C. M.; Shimizu, F. M.; Manzoli, A.; Riul Jr., A.; Piazzetta, M. H. O.; Gobbi, A. L.; Correa, D. S.; Paulovich, F. v.; Oliveira Jr., O. N. Information Visualization and Feature Selection Methods Applied to Detect Gliadin in Gluten-Containing Foodstuff with a Microfluidic Electronic Tongue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (23), 19646–19652.
- (74) Zhang, Y. S.; Aleman, J.; Shin, S. R.; Kilic, T.; Kim, D.; Shaegh, S. A. M.; Massa, S.; Riahi, R.; Chae, S.; Hu, N.; Avci, H.; Zhang, W.; Silvestri, A.; Nezhad, A. S.; Manbohi,

- A.; de Ferrari, F.; Polini, A.; Calzone, G.; Shaikh, N.; Alerasool, P.; Budina, E.; Kang, J.; Bhise, N.; Ribas, J.; Pourmand, A.; Skardal, A.; Shupe, T.; Bishop, C. E.; Dokmeci, M. R.; Atala, A.; Khademhosseini, A. Multisensor-Integrated Organs-on-Chips Platform for Automated and Continual In Situ Monitoring of Organoid Behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114* (12), E2293–E2302.
- (75) Picco, A. S.; Ferreira, L. F.; Liberato, M. S.; Mondo, G. B.; Cardoso, M. B. Freeze-Drying of Silica Nanoparticles: Redispersibility Toward Nanomedicine Applications. *Nanomed.* **2018**, *13* (2), 179–190.
- (76) Benoit, D. S. W.; Srinivasan, S.; Shubin, A. D.; Stayton, P. S. Synthesis of Folate-Functionalized RAFT Polymers for Targeted SiRNA Delivery. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2708–2714.
- (77) Schneid, A. C.; Ribeiro, I. R. S.; Galdino, F. E.; Bettini, J.; Cardoso, M. B. Degradable and Colloidally Stable Zwitterionic-Functionalized Silica Nanoparticles. *Nanomed.* **2021**, *16* (2), 85–96.
- (78) Kumar, R.; Chen, H.-T.; Escoto, J. L. v.; Lin, V. S.-Y.; Pruski, M. Template Removal and Thermal Stability of Organically Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (18), 4319–4327.
- (79) Grudzien, R. M.; Grabicka, B. E.; Jaroniec, M. Adsorption Studies of Thermal Stability of SBA-16 Mesoporous Silicas. *App. Surf. Sci.* **2007**, *253* (13), 5660–5665.
- (80) Kleitz, F.; Schmidt, W.; Schüth, F. Calcination Behavior of Different Surfactant-Templated Mesostructured Silica Materials. *Microporous Mesoporous Mater.* **2003**, *65* (1), 1–29.
- (81) Bockris, J. O.; Reddy, A. K. N.; Gamboa-Aldeco, M. *Modern Electrochemistry: Fundamentals of Electrode Processes*, 2nd ed.; Kluwer Academic Publishers: New York, 2002.
- (82) Bard, A. L.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, 2001.
- (83) Shi, Y.-R.; Ye, M.-P.; Du, L.-C.; Weng, Y.-X. Experimental Determination of Particle Size-Dependent Surface Charge Density for Silica Nanospheres. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (41), 23764–23771.
- (84) Atalay, S.; Ma, Y.; Qian, S. Analytical Model for Charge Properties of Silica Particles. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *425*, 128–130.
- (85) Barisik, M.; Atalay, S.; Beskok, A.; Qian, S. Size Dependent Surface Charge Properties of Silica Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (4), 1836–1842.

- (86) Qiu, T. A.; Clement, P. L.; Haynes, C. L. Linking Nanomaterial Properties to Biological Outcomes: Analytical Chemistry Challenges in Nanotoxicology for the Next Decade. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (91), 12787–12803.
- (87) Milosevic, A.; Romeo, D.; Wick, P. Understanding Nanomaterial Biotransformation: An Unmet Challenge to Achieving Predictive Nanotoxicology. *Small* **2020**, *16* (36), 1907650.
- (88) Han, Y.; Lu, Z.; Teng, Z.; Liang, J.; Guo, Z.; Wang, D.; Han, M.-Y.; Yang, W. Unraveling the Growth Mechanism of Silica Particles in the Stöber Method: In Situ Seeded Growth Model. *Langmuir* **2017**, *33* (23), 5879–5890.
- (89) Bockris, J. O.; Reddy, A. K. N. *Modern Electrochemistry I: Ionics*, 2nd ed.; Kluwer Academic Publishers: New York, 2002.
- (90) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? *J. Control Release* **2016**, *235*, 337–351.
- (91) Mourdikoudis, S.; Pallares, R. M.; Thanh, N. T. K. Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale* **2018**, *10*, 12871–12934.
- (92) Li, S.; Wan, Q.; Qin, Z.; Fu, Y.; Gu, Y. Understanding Stöber Silica's Pore Characteristics Measured by Gas Adsorption. *Langmuir* **2015**, *31*, 824–832.
- (93) Rahman, I. A.; Padavettan, V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 132424.
- (94) Sosa, N.; Chanlek, N.; Wittayakun, J. Facile Ultrasound-Assisted Grafting of Silica Gel by Aminopropyltriethoxysilane for Aldol Condensation of Furfural and Acetone. *Ultrason. Sonochem.* **2020**, *62*, 104857.
- (95) Austin, J.; Minelli, C.; Hamilton, D.; Wywijas, M.; Jones, H. J. Nanoparticle Number Concentration Measurements by Multi-Angle Dynamic Light Scattering. *J. Nanoparticle Res.* **2020**, *22* (5), 108.
- (96) Labrosse, A.; Burneau, A. Characterization of Porosity of Ammonia Catalysed Alkoxysilane Silica. *J. Non. Cryst. Solids* **1997**, *221*, 107–124.
- (97) Li, S.; Wan, Q.; Qin, Z.; Fu, Y.; Gu, Y. Unraveling the Mystery of Stöber Silica's Microporosity. *Langmuir* **2016**, *32*, 9180–9187.

- (98) Eren, N. M.; Jones, O. G.; Campanella, O. H. Changes in the Rheology of Nano-Structured Suspensions by Adsorption of the Protein α -Lactalbumin on the Surface of Silica Particles. *Rheol. Acta* **2015**, *54* (8), 735–744.
- (99) Wu, S. H.; Mou, C.-Y.; Lin, H. P. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (9), 3862–3875.
- (100) Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloid Science*; Academic Press Limited: London, 1988.
- (101) Galdino, F. E.; Picco, A. S.; Sforca, M. L.; Cardoso, M. B.; Loh, W. Effect of Particle Functionalization and Solution Properties on the Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Onto Silica Nanoparticles. *Colloids Surf. B* **2020**, *186*, 110677.
- (102) Orazem, M. E.; Tribollet, B. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*; Wiley: New Jersey, 2008.
- (103) Bredar, A. R. C.; Chown, A. L.; Burton, A. R.; Farnum, B. H. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Metal Oxide Electrodes for Energy Applications. *ACS Appl. Energy Mater.* **2020**, *3* (1), 66–98.
- (104) Sagu, J. S.; Wijayantha, K. G. U.; Tahir, A. A. The Pseudocapacitive Nature of CoFe₂O₄ Thin Films. *Electrochim. Acta* **2017**, *246*, 870–878.
- (105) Garrote, B. L.; Santos, A.; Bueno, P. R. Perspectives on and Precautions for the Uses of Electric Spectroscopic Methods in Label-Free Biosensing Applications. *ACS Sens.* **2019**, *4* (9), 2216–2227.
- (106) Razafiarison, T.; Silván, U.; Meier, D.; Snedeker, J. G. Surface-Driven Collagen Self-Assembly Affects Early Osteogenic Stem Cell Signaling. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (12), 1481–1492.
- (107) Li, S.; Cui, H.; Yuan, Q.; Wu, J.; Wadhwa, A.; Eda, S.; Jiang, H. AC Electrokinetics-Enhanced Capacitive Immunosensor for Point-of-Care Serodiagnosis of Infectious Diseases. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *51*, 437–443.
- (108) Mahmoodi, S. R.; Xie, P.; Zachs, D. P.; Peterson, E. J.; Graham, R. S.; Kaiser, C. R. W.; Lim, H. H.; Allen, M. G.; Javanmard, M. Single-Step Label-Free Nanowell Immunoassay Accurately Quantifies Serum Stress Hormones Within Minutes. *Sci. Adv.* **2021**, *7* (27), eabf4401.
- (109) Nicoliche, C. Y. N.; Pascon, A. M.; Bezerra, Í. R. S.; de Castro, A. C. H.; Martos, G. R.; Bettini, J.; Alves, W. A.; Santhiago, M.; Lima, R. S. In Situ Nanocoating on Porous Pyrolyzed Paper Enables Antibiofouling and Sensitive Electrochemical Analyses in Biological Fluids. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14* (2), 2522–2533.

- (110) Batista, C. V. S.; Mercês, L.; Costa, C. A. R.; de Camargo, D. H. S.; Bufon, C. C. B. High-Performance Ultrathin Molecular Rectifying Diodes Based on Organic/Inorganic Interface Engineering. *Adv. Funct. Mater.* **2022**, *32* (6), 2108478.
- (111) Duffy, D. C.; Cooper McDonald, J.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(Dimethylsiloxane). *Anal. Chem.* **1998**, *70* (23), 4974–4984.
- (112) Cooper McDonald, J.; Whitesides, G. M. Poly(Dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35* (7), 491–499.
- (113) Schleder, G. R.; Padilha, A. C. M.; Acosta, C. M.; Costa, M.; Fazzio, A. From DFT to Machine Learning: Recent Approaches to Materials Science– A Review. *J. Phys. Materials* **2019**, *2* (3), 032001.
- (114) Ouyang, R.; Ahmetcik, E.; Carbogno, C.; Scheffler, M.; Ghiringhelli, L. M. Simultaneous Learning of Several Materials Properties from Incomplete Databases With Multi-Task SISSO. *J. Phys. Materials* **2019**, *2* (2).
- (115) Gazzali, A. M.; Lobry, M.; Colombeu, L.; Acherar, S.; Azaïs, H.; Mordon, S.; Arnoux, P.; Baros, F.; Vanderesse, R.; Frochot, C. Stability of Folic Acid Under Several Parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *93*, 419–430.
- (116) Bini, R. A.; Marques, R. F. C.; Santos, F. J.; Chaker, J. A.; Jafelicci, M. Synthesis and Functionalization of Magnetite Nanoparticles with Different Amino-Functional Alkoxysilanes. *J. Magn. Magn. Mater.* **2012**, *324* (4), 534–539.
- (117) Premjit, Y.; Pandey, S.; Mitra, J. Recent Trends in Folic Acid (Vitamin B9) Encapsulation, Controlled Release, and Mathematical Modelling. *Food Rev. Int.* **2022**, 1–36.
- (118) Bhunia, S. K.; Maity, A. R.; Nandi, S.; Stepensky, D.; Jelinek, R. Imaging Cancer Cells Expressing the Folate Receptor with Carbon Dots Produced from Folic Acid. *ChemBioChem* **2016**, *17* (7), 614–619.
- (119) Bertel, L.; Ospina, R.; Miguel García-Martín, J.; Miranda, D. A. Experimental Analysis of Folic Acid Adsorption on TiO₂ Thin-Films. *J. Vac. Sci. Technol. A* **2022**, *40* (3), 033411.
- (120) Von Hauff, E. Impedance Spectroscopy for Emerging Photovoltaics. *J. Phys. Chem.* **2019**, *123* (18), 11329–11346.

- (121) Ayres, L. B.; Gomez, F. J. V.; Linton, J. R.; Silva, M. F.; Garcia, C. D. Taking the Leap Between Analytical Chemistry and Artificial Intelligence: A Tutorial Review. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1161*, 338403.
- (122) George, J.; Hautier, G. Chemist versus Machine: Traditional Knowledge versus Machine Learning Techniques. *Trends Chem.* **2021**, *3* (2), 86–95.
- (123) Baer, D. R.; Amonette, J. E.; Engelhard, M. H.; Gaspar, D. J.; Karakoti, A. S.; Kuchibhatla, S.; Nachimuthu, P.; Nurmi, J. T.; Qiang, Y.; Sarathy, V.; Seal, S.; Sharma, A.; Tratnyek, P. G.; Wang, C. M. Characterization Challenges for Nanomaterials. *Surf. Interface Anal.* **2008**, *40*, 529–537.
- (124) Engelhard, M. H.; Droubay, T. C.; Du, Y. X-Ray Photoelectron Spectroscopy Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier, 2016; pp 716–724.
- (125) Hinkov, B.; Pilat, F.; Lux, L.; Souza, P. L.; David, M.; Schwaighofer, A.; Ristanić, D.; Schwarz, B.; Detz, H.; Andrews, A. M.; Lendl, B.; Strasser, G. A Mid-Infrared Lab-on-a-Chip for Dynamic Reaction Monitoring. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 4753.
- (126) Khan, L. U.; da Silva, G. H.; de Medeiros, A. M. Z.; Khan, Z. U.; Gidlund, M.; Brito, H. F.; Moscoso-Londoño, O.; Muraca, D.; Knobel, M.; Pérez, C. A.; Martinez, D. S. T. Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles Concurrently Coated with Chitosan and GdOF:Ce³⁺,Tb³⁺ Luminophore for Bioimaging: Toxicity Evaluation in the Zebrafish Model. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2* (6), 3414–3425.
- (127) Ribeiro, I. R. S.; Galdino, F. E.; Silveira, C. P.; Cardoso, M. B. Precision Medicine Based on Nanoparticles: The Paradigm Between Targeting and Colloidal Stability. *Nanomed.* **2021**, *16* (17), 1451–1456.

ANEXOS

ANEXO 1

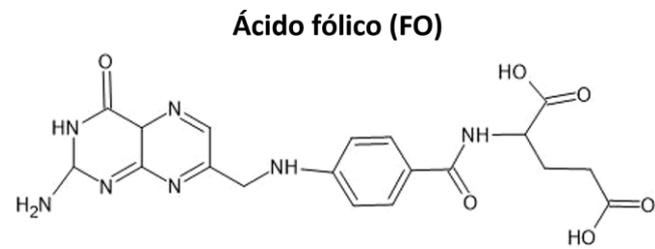


Figura A1. Estrutura química do ácido fólico empregado na segunda etapa de funcionalização das SiO₂NPs-APTES.

ANEXO 2

A seguir, é possível verificar a conversão da concentração medida por meio de DLS (C_{DLS} , $1,1 \cdot 10^{12} \pm 8,8 \cdot 10^{10}$ NPs mL^{-1} após 24,0 h de síntese em etanol, antes da purificação) em g L^{-1} :

$$C_{DLS} = 1,1 \cdot 10^{12} \text{ NPs mL}^{-1} = 1,1 \cdot 10^{15} \text{ NPs L}^{-1} \quad (\text{eq. 5})$$

Densidade da sílica (d_{silica}):⁷⁵

$$d_{\text{silica}} = 1,9 \text{ g mL}^{-1} = 1,9 \cdot 10^6 \text{ g m}^3 \quad (\text{eq. 6})$$

Considerando o raio por SEM (r_{SEM}) para calcular a massa sólida das nanopartículas. Temos:

$$r_{SEM} = \frac{95,9}{2} = 48,0 \text{ nm} \quad (\text{eq. 7})$$

Calculando o volume esférico (V_{esfera}):

$$V_{\text{esfera}} = \frac{4 \pi r_{SEM}^3}{3} \quad (\text{eq. 8})$$

$$V_{\text{esfera}} = \frac{4 \pi (48,0 \text{ nm})^3}{3} = 4,6 \cdot 10^{-16} \text{ m}^3 \quad (\text{eq. 9})$$

Sendo assim, a massa das SiO_2 NPs (m_{NP}) usando a densidade da sílica obtida é:

$$m_{NP} = d_{\text{silica}} V_{\text{esfera}} = 1,9 \cdot 10^6 \times 4,6 \cdot 10^{-16} = 8,8 \cdot 10^{-16} \text{ g} \quad (\text{eq. 10})$$

Por fim, C_{DLS} em L^{-1} pode ser calculada da seguinte forma:

$$C_{DLS} = m_{NP} \times 1,1 \cdot 10^{15} \text{ NPs L}^{-1} = 8,8 \cdot 10^{-16} \times 1,1 \cdot 10^{15} = 0,9 \text{ g L}^{-1} \quad (\text{eq. 11})$$

ANEXO 3

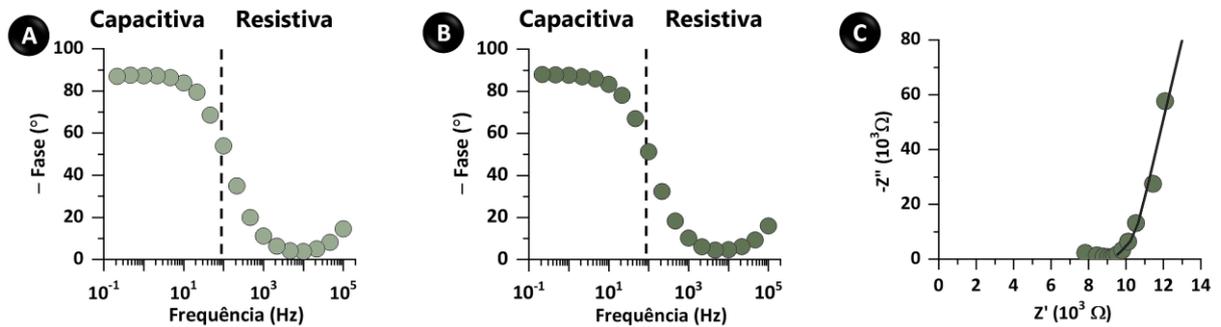


Figura A2. Monitoramento em tempo real das SiO₂NPs de 110 nm. Gráficos de Bode ângulo de fase depois de (A) 12,0 e (B) 21,0 h de síntese. Gráfico de Nyquist depois de (C) 21,0 h de síntese.

Tabela A1. Definição dos números subscritos das “*features* de Z” obtidas pelo sensor e avaliadas pelo SISSO. Em vermelho estão destacadas as frequências presentes nas equações 2 e 3. Tabela adaptada da referência 30.

Número subscrito	Frequência (Hz)
1	0,2
2	0,5
3	1,0
4	2,2
5	4,6
6	10,0
7	21,5
8	46,4
9	100,0
10	215,4
11	464,2
12	1000,0
13	2154,4
14	4641,6
15	10000,0
16	21544,0
17	46416,0
18	100000,0

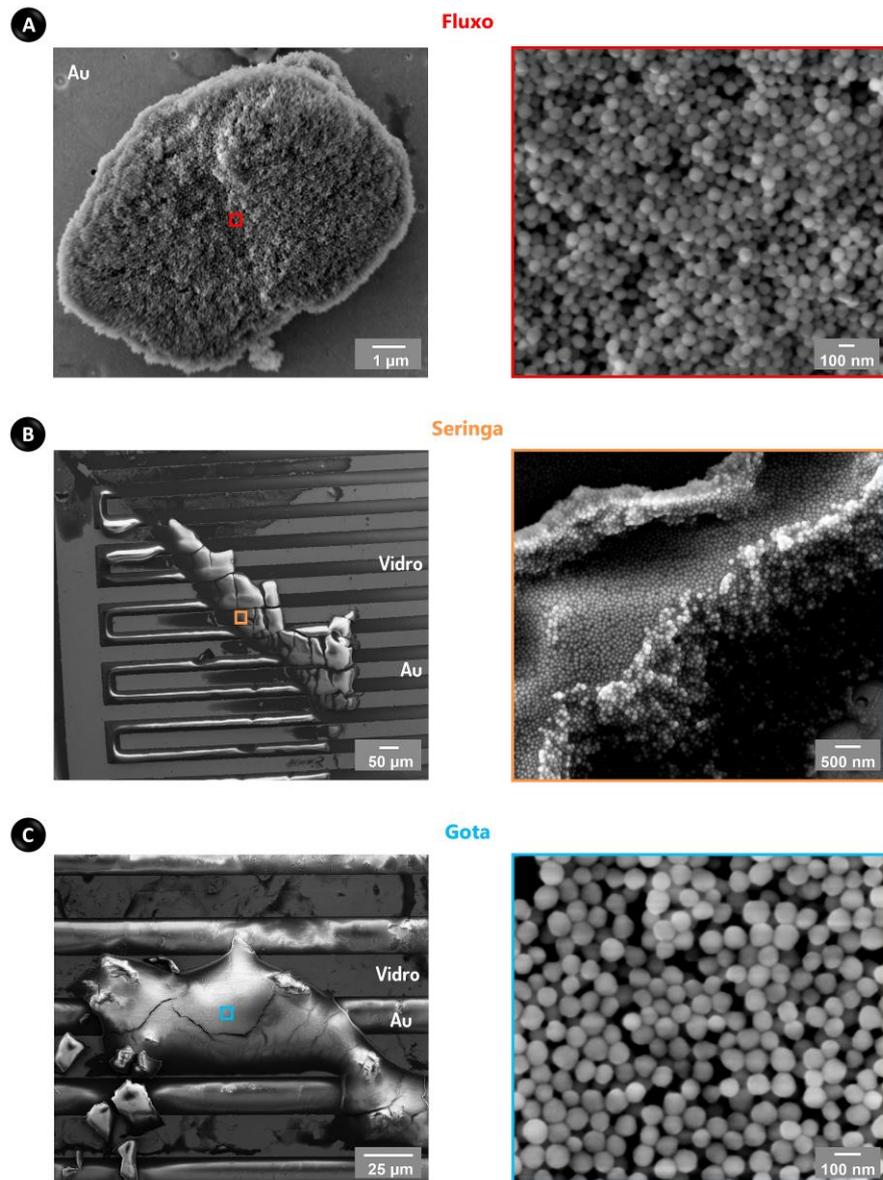


Figura A3. Análise de SEM dos métodos de adsorção das SiO₂NPs-APTES sobre a região do IDEs. Imagens de SEM dos três tipos de preparo: (A) fluxo de 900,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ das NPs por meio da bomba peristáltica, (B) injeção da dispersão com uma seringa de 1,0 mL e (C) gota com as NPs, sem espalhar com uma microponteira.

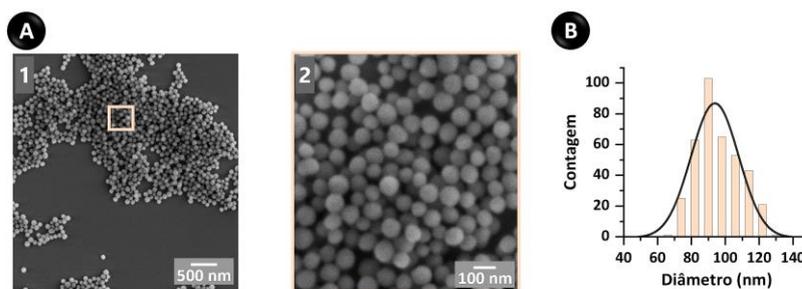


Figura A4. Análise de SEM das SiO₂NPs-APTES-FO sobre substrato de silício. (A) Imagens de SEM (1,2) e (B) distribuição de tamanho.

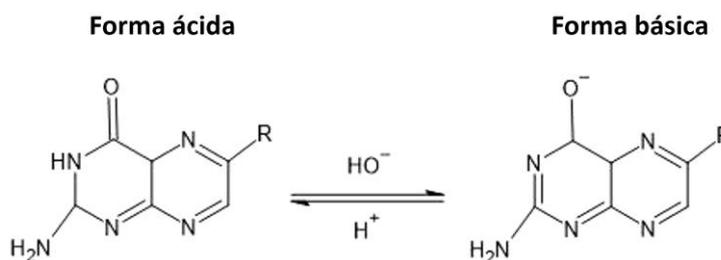


Figura A5. Reação de equilíbrio da molécula de ácido fólico demonstrando a forma ácida e básica ($\text{R} = \text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_5\text{N}_2$). Nesta imagem é representada a estrutura do ácido fólico que fica disponível no meio e que irá interagir com o receptor folato.¹¹⁵

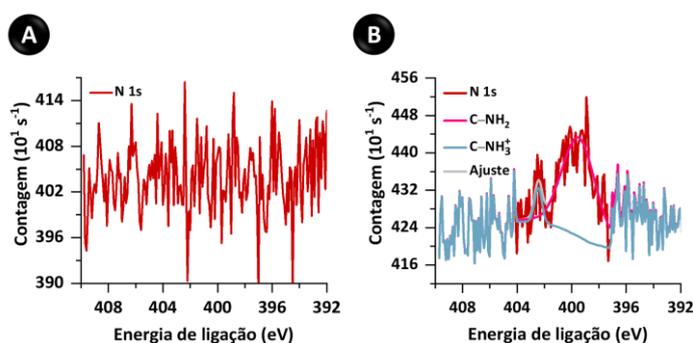


Figura A6. Espectros de XPS em alta resolução do elemento N 1s para as (A) SiO_2NPs nativas de 108 nm e (B) $\text{SiO}_2\text{NPs-APTES}$.

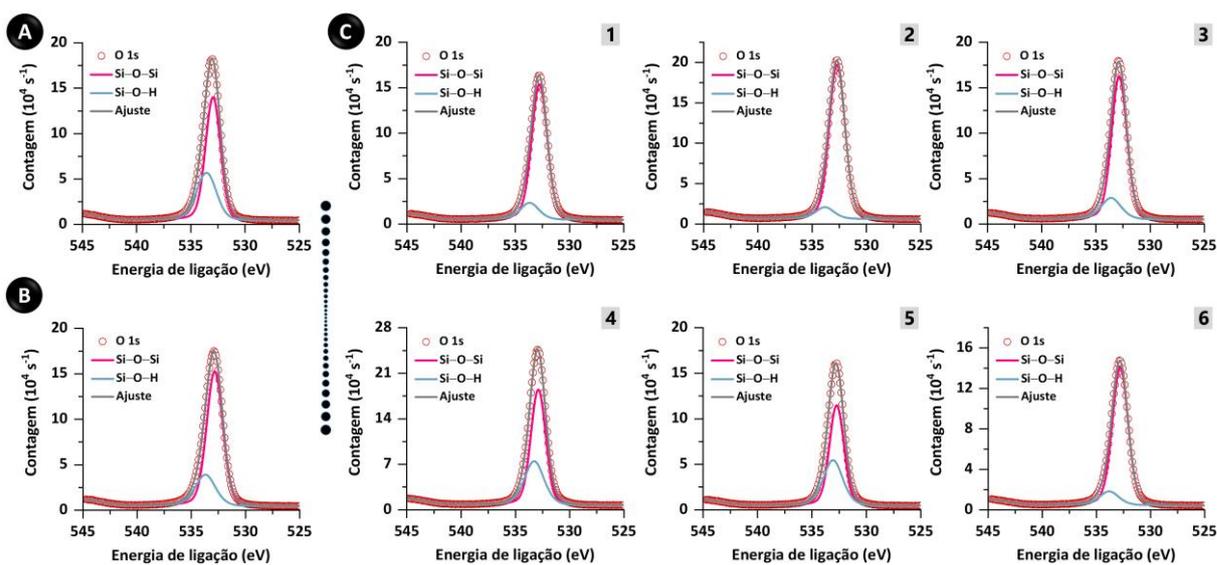


Figura A7. Espectros de XPS em alta resolução do elemento O 1s para as (A) SiO_2NPs nativas de 108 nm, (B) $\text{SiO}_2\text{NPs-APTES}$ e (C) $\text{SiO}_2\text{NPs-APTES-FO}$ após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização.

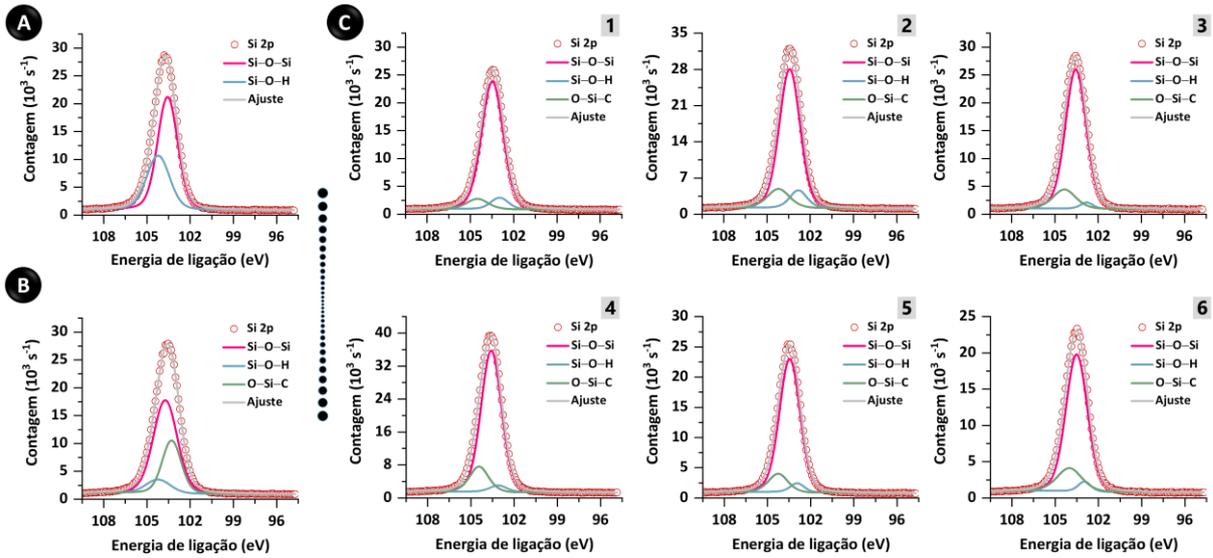


Figura A8. Espectros de XPS em alta resolução do elemento Si 2p para as (A) SiO₂NPs nativas de 108 nm, (B) SiO₂NPs-APTES e (C) SiO₂NPs-APTES-FO após 1,0 h (1); 2,0 h (2); 3,0 h (3); 4,0 h (4); 5,0 (5) e 6,0 h (6) de funcionalização.

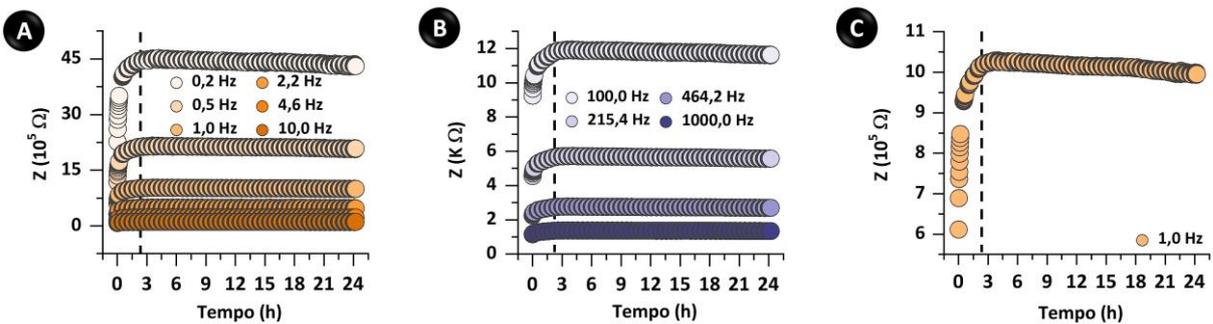


Figura A9. Monitoramento em tempo real da lixiviação com DMSO/MES das SiO₂NPs-APTES. (A, B e C) Gráficos de Z vs. tempo em diferentes frequências demonstrando a estabilização do sinal de impedância após 2,5 horas.

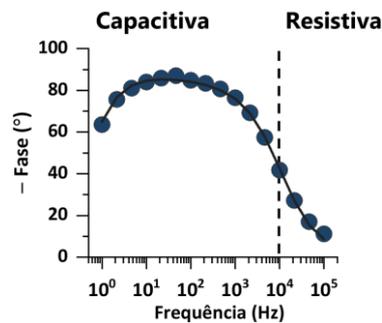


Figura A10. Monitoramento em tempo real da funcionalização das SiO₂NPs-APTES com FO. Gráficos de Bode ângulo de fase após 8,0 h de funcionalização.

Tabela A2. Definição dos números subscritos das “*features* de Z_n ” obtidas pelo sensor e avaliadas pelo SISSO. Em vermelho estão destacadas as frequências presentes na equação 4.

Número subscrito	Frequência (Hz)
1	1,0
2	2,2
3	4,6
4	10,0
5	100,0
6	215,4
7	464,2
8	1000,0
9	2154,4
10	4641,6
11	10000,0
12	21544,0
13	46416,0
14	100000,0



Figura A11. QRC com direcionamento ao arquivo PDF do artigo referente à parte I do trabalho publicado no periódico *ACS Sensors*³⁰ da editora *American Chemical Society*.