

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS**

**DANIELLE BRUNA PETTI**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE SÍLICA**  
**MESOPOROSA COM PROPRIEDADES FLUORESCENTES**

Diadema, 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS**

**DANIELLE BRUNA PETTI**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE SÍLICA  
MESOPOROSA COM PROPRIEDADES FLUORESCENTES**

Trabalho de conclusão de curso da unidade curricular Projetos Dirigidos em  
Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em  
Química.

Prof. Dr. Marcos Augusto Bizeto  
Orientador

Diadema, 2017

## Ficha Catalográfica

Bruna Petti, Danielle

**Síntese de nanopartículas híbridas de sílica mesoporosa com propriedades fluorescentes** / Danielle Bruna Petti. -- Diadema, 2017.

62 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de São Paulo - *Campus* Diadema, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Augusto Bizeto

1. Nanopartículas fluorescentes. 2. Sílica mesoporosa. 3. Fluoresceína.

CDD 620.5

*Dedico este trabalho aos meus pais Sergio e Roselene Petti, que tanto lutaram para a construção da minha felicidade e para que alcançasse meus objetivos, através de muita paciência e, principalmente, amor.*

*Aos meus pais e minha irmã Geovana, que diariamente acompanharam minha jornada na graduação, vibraram por cada conquista e me encorajaram em cada obstáculo. Agradeço pelo silêncio, paciência e apoio emocional quando se fizeram necessários. Obrigada por sempre, com muita alegria e simplicidade, me guiarem com suas palavras, e me reerguerem frente ao cansaço e temor. Sem vocês, eu não seria nada.*

*Ao Pedro Luvizeto pelo amor incondicional, por todo o companheirismo, dedicação e compreensão em cada ausência. Sem você, esta caminhada não teria sido a mesma.*

*A todos os meus amigos da faculdade, em especial da Química 06, que amadureceram comigo e compartilharam momentos/experiências ao longo destes anos, contribuindo diretamente para a execução deste trabalho.*

*Aos docentes da UNIFESP, por todo o conhecimento e suporte transmitidos no decorrer do curso de Química. Cada aprendizagem contribuiu para a construção de minha carreira.*

*Em especial, meus sinceros agradecimentos ao Prof.º Marcos Augusto Bizeto, que durante quatro anos, acreditou em mim. Agradeço pela orientação, respeito, considerações, ensinamentos e confiança. Expresso minha grande admiração por sua competência profissional, e gratidão por todo apoio e amizade recebidos.*

## RESUMO

O estudo de partículas inorgânicas capazes de transportar moléculas bioativas no meio fisiológico vem sendo amplamente explorado com o intuito de produzir tratamentos mais eficientes para doenças como o câncer. As sílicas mesoporosas constituem um sistema inorgânico promissor para desempenhar essa função, as quais possibilitam a imobilização, transporte e liberação modificada de fármacos e biomoléculas no meio biológico com grande eficiência. Diferentes funcionalidades podem ser agregadas a essas partículas por meio de modificações químicas, de maneira a produzir materiais capazes de atuarem não só no tratamento como no diagnóstico (por imagem) de doenças. Neste sentido, a abordagem experimental via pós-funcionalização e co-condensação, envolveu a formação de uma ligação covalente entre a fluoresceína e a matriz inorgânica de sílica, esta que foi analisada pelas técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub>, análise termogravimétrica e difratometria de raios X, de modo a produzir nanopartículas mesoporosas fluorescentes. A ligação descrita se deu através da reação do grupo epóxi presente no glicidilóxi-propiltrimetoxisilano com o grupo ácido carboxílico presente na fluoresceína, onde suas evidências de formação foram analisadas por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier. As propriedades espectroscópicas foram averiguadas por espectroscopia eletrônica de absorção e fluorescência no ultravioleta e visível e seu desempenho como sonda fisiológica foi confirmado para a pós-funcionalização onde o agente sililante foi previamente funcionalizado com o agente fluoróforo, para posterior acoplamento da fluoresceína, sendo o mecanismo liga-desliga atestado para mudanças do meio ácido para neutro/básico.

Palavras-chave: *nanopartículas fluorescentes; sílica mesoporosa; fluoresceína.*

**ABSTRACT**

The study of inorganic particles capable of transporting bioactive molecules in the physiological environment has been widely explored in order to produce more efficient treatments for diseases such as cancer. Mesoporous silicas constitute a promising inorganic system to perform this function, which enables the immobilization, transport and modified release of drugs and biomolecules in the biological medium with great efficiency. Different functionalities can be added to these particles by means of chemical modifications, in order to produce materials capable of acting not only in the treatment but also in the diagnosis (by image) of diseases. In this sense, the experimental approach, via post-functionalization and co-condensation, involved the formation of a covalent bond between fluorescein and the inorganic silica matrix, which was analyzed by Fourier transform infrared absorption spectroscopy techniques, N<sub>2</sub> adsorption and desorption isotherms, thermogravimetric analysis and X-ray diffraction, in order to produce fluorescent mesoporous nanoparticles. The described bonding occurred through the reaction of the epoxy group present on the glycidyoxypropyltrimethoxysilane with the carboxylic acid group present in fluorescein, where its evidences of formation were analyzed by Fourier transform infrared absorption spectroscopy. The spectroscopic properties were verified by ultraviolet-visible and fluorescence spectroscopy and its performance as a physiological probe was confirmed for the post-functionalization where the silylating agent was first functionalized with the fluorophore agent, for later coupling of the fluorescein, being the mechanism on/off switch for acid to neutral/basic changes.

Keywords: Fluorescent nanoparticles; mesoporous silica; fluorescein.

**SUMÁRIO**

<b>Resumo</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Lista de Figuras</b> .....	x
<b>Lista de Abreviações e Estruturas Químicas</b> .....	xiii
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Aplicações biomédicas das sílicas mesoporosas fluorescentes.....	2
1.1.1. Propriedades Espectroscópicas da Fluoresceína.....	3
<b>2. Objetivos</b> .....	7
<b>3. Procedimentos Experimentais</b> .....	7
3.1. Reagentes .....	7
3.2. Síntese da nanopartícula de sílica mesoporosa.....	8
3.3. Funcionalização das Nanopartículas de Sílica Mesoporosa.....	8
3.3.1. Método 1) Pós-funcionalização das nanopartículas com GPTMS e posterior acoplamento da fluoresceína .....	10
3.3.1.1. Funcionalização da NPSM com GPTMS – Etapa I .....	10
3.3.1.2. Acoplamento da Fluoresceína na NPSM funcionalizada com GPTMS – Etapas II e III.....	11
3.3.2. Método 2) Funcionalização utilizando o GPTMS pré-modificado com fluoresceína.....	11
3.3.2.1. Pré-Modificação do agente sililante GPTMS com Fluoresceína - Etapas IV e V.....	12
3.3.2.2. Pós-funcionalização das nanopartículas com o agente sililante pré-modificado GPTMS-FL - Etapa VI.....	13
3.3.2.2.1. Etapas de tratamento com acetona – Etapa VI.....	13
3.3.2.3. Síntese direta por co-condensação da nanopartícula funcionalizada utilizando o agente sililante pré-modificado GPTMS-FLTsOH – Etapa VII .....	14
3.4. Equipamentos utilizados para caracterização .....	15
<b>4. Resultados e Discussões</b> .....	15
4.1. Propriedades estruturais e texturais das nanopartículas de sílica mesoporosa ....	15
4.2. Funcionalização das nanopartículas e acoplamento da FL.....	20
4.2.1. Método 1: Pós-funcionalização da NPSM com GPTMS e posterior acoplamento da FL.....	20

---

4.2.1.1. Caracterização do precursor NPSM-GP.....	21
4.2.1.2. Acoplamento da Fluoresceína na NPSM funcionalizada com GPTMS: (NPSM-GP)FLtolueno e (NPSM-GP)FLDMSO .....	23
4.2.2. Método 2: Funcionalização utilizando o GPTMS pré-modificado com fluoresceína e posterior acoplamento da NPSM.....	27
4.2.2.1. Caracterização do silano pré-modificado GPTMS-FL .....	27
4.2.2.2. Nanopartículas produzidas por pós-funcionalização com GPTMS-FL: NPSM(GP-FL).....	29
4.2.2.3. Nanopartículas produzidas por co-condensação utilizando o GPTMS-FL: CTA@NPSM(GP-FL) .....	31
4.3. Propriedades Espectroscópicas das NPSM funcionalizadas .....	33
4.3.1. Propriedades Espectroscópicas em Meio Aquoso .....	34
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>45</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Imagens de microscopia de fluorescência registrada usando a fluoresceína isotiocianato como agente de contraste. Figura adaptada de (LI et al., 2012).....	3
Figura 2 - Estruturas moleculares da fluoresceína em suas formas (a) quinoide e (b) lactona.....	4
Figura 3 - Solvatocromismo da fluoresceína em diferentes solventes. Da esquerda para a direita: hexano, tolueno, etanol, H <sub>2</sub> O DI, DMSO e acetona.....	5
Figura 4 - Esquema simplificado do diagrama de orbitais moleculares relacionados ao solvatocromismo oriundo de uma interação HOMO-LUMO. Figura adaptada de (SHRIVER, D. F.; ATKINS, 2003).....	6
Figura 5 - Diagrama esquemático das transições eletrônicas na FL em pH neutro.....	6
Figura 6 - Esquema simplificado das rotas de obtenção das sílicas mesoporosas funcionalizadas por co-condensação e pós-funcionalização. Figura adaptada de (HOFFMANN et al., 2006).....	9
Figura 7 - Esquemas simplificados das rotas sintéticas utilizadas para obtenção das NPSM funcionalizadas com FL.....	9
Figura 8 - Fluxograma mostrando as etapas da rota sintética referente à obtenção das nanopartículas de sílica mesoporosa com fluoresceína covalentemente ligada partindo do precursor NPSM-GP, conforme o Esquema 1 da Figura 7. ....	10
Figura 9 - Fluxograma mostrando as etapas sintéticas envolvidas com a obtenção das nanopartícula de sílica mesoporosa com FL utilizando o precursor GPTMS-FL, conforme o Método 2 descrito na Figura 7.....	12
Figura 10 - Difratogramas de raios X das nanopartículas com poros preenchidos pelo molde (CTA@NPSM) e após remoção por extração com EtOH/HCl (NPSM).....	16
Figura 11 - Espectros de FTIR da NPSM antes e após a remoção do molde.....	18
Figura 12 - Curvas termogravimétricas da CTA@NPSM e NPSM. As curvas superiores são referentes à liberação de H <sub>2</sub> O e CO <sub>2</sub> oriundas da decomposição térmica das amostras monitoradas por um espectrômetro de massa acoplado. ....	19
Figura 13 - Imagem de MET da NPSM.....	19
Figura 14 - Isotermas de adsorção e dessorção de N <sub>2</sub> na NPSM.....	20
Figura 15 - Reação de funcionalização da NPSM com o agente sililante GPTMS.....	21
Figura 16 - Curva termogravimétrica da NPSM-GP produzida por pós-funcionalização e sua primeira derivada.....	22

Figura 17 - Espectros de FTIR da NPSM e NPSM-GP.....	23
Figura 18 - Equilíbrio das espécies de fluoresceína na sua forma lactona (não fluorescente com anel fechado) e ácido carboxílico (fluorescente com anel aberto).....	24
Figura 19 - Reação de esterificação entre o anel epóxi do agente sililante GPTMS e a fluoresceína em sua forma ácido carboxílico. ....	24
Figura 20 - Difrátogramas de raios X da FL e das nanopartículas modificadas por pós-funcionalização pelo Método I: (NPSM-GP)FL <sub>tolueno</sub> e seus tratamentos com solventes. ....	25
Figura 21 - Espectros de FTIR da (NPSM-GP)FL <sub>tolueno</sub> e (NPSM-GP)FL <sub>DMSO</sub> .....	26
Figura 22 - Difrátograma de raios X de GPTMS-FL. ....	28
Figura 23 - Espectros de FTIR para o GPTMS e GPTMS-FL. ....	29
Figura 24 - Difrátogramas de raios X das nanopartículas modificadas por pós-funcionalização pelo Método II, NPSM(GP-FL) <sub>pós-síntese</sub> e NPSM(GP-FL).....	30
Figura 25 - Espectros de FTIR da região da banda referente ao estiramento do grupo carbonila (C=O) da sílica pós-funcionalizada NPSM(GP-FL) e das amostras pós-síntese e após tratamento com acetona.....	31
Figura 26 - Difrátogramas de raios X dos sólidos obtidos após a funcionalização via síntese direta CTA@NPSM(GP-FL) e nanopartícula de sílica densa NPS(GP-FL).....	32
Figura 27 - Espectros de FTIR da CTA@NPSM(GP-FL) produzida por síntese direta e da partícula de sílica densa NPS(GP-FL).....	33
Figura 28 - Equilíbrios de protonação e desprotonação da fluoresceína. Figura adaptada de (NADERI; FARAJTABAR; GHARIB, 2014). ....	34
Figura 29 - Fotografias das nanopartículas de sílica com fluoresceína mostrando a diferença de coloração. (A) FL, (B) NPSM(GP-FL), (C) (NPSM-GP)FL, (D) CTA@NPSM(GP-FL) e (E) NPS(GP-FL).....	35
Figura 30 - Espectros de RD das nanopartículas de sílica funcionalizadas com fluoresceína.....	36
Figura 31 - Espectros eletrônicos de absorção da solução de FL em pH 5, 7 e 9.....	38
Figura 32 – Espectros eletrônicos de absorção da dispersão de CTA@NPSM(GP-FL) em pH 5, 7 e 9.....	39
Figura 33 – Espectros eletrônicos de absorção da dispersão de (NPSM-GP)FL <sub>tolueno</sub> em pH 5, 7 e 9. ....	40
Figura 34 – Espectros eletrônicos de absorção das dispersões de NPS(GP-FL) em pH 5, 7 e 9. ....	41

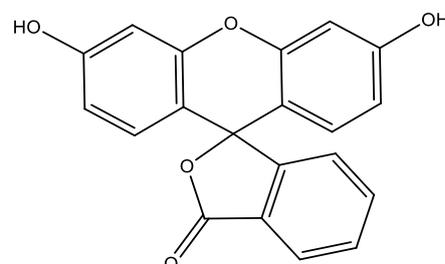
---

Figura 35 – Espectros eletrônicos de absorção da dispersão de NPSM(GP-FL) em pH 5, 7 e 9. ....	42
Figura 36 - Espectros de fluorescência em pH 5, 7 e 9 da (A) solução de FL e (B) dispersão de NPSM(GP-FL) com excitação em 487 nm.....	43
Figura 37 – Esquema do dispositivo liga-desliga produzido pela reação de hidrólise da ligação éster formada entre as nanopartículas de sílica e a fluoresceína.....	44

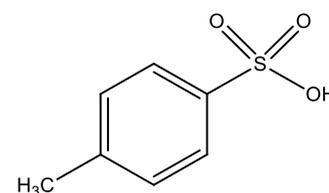
**LISTA DE ABREVIÇÕES E ESTRUTURAS QUÍMICAS**

*Reagentes e compostos:*

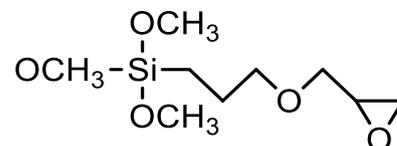
FL: Fluoresceína



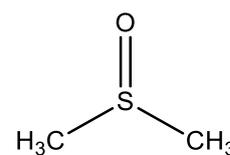
TsOH: Ácido para-tolueno sulfônico.



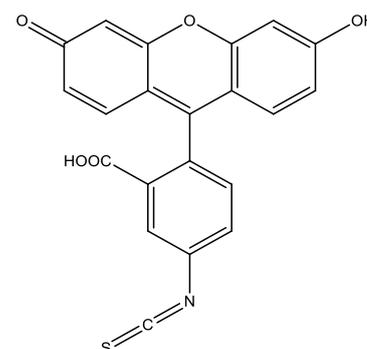
GPTMS: Glicidilóxi propil trimetoxissilano.



DMSO: Dimetilsulfóxido.



FITC: Fluoresceína Isotiocianato.



TEOS: Tetraetilortossilicato

MCM-41: Mobil Composition of Matter nº41.

NPSM: Nanopartícula de Sílica Mesoporosa.

NH<sub>4</sub>OH: Hidróxido de amônio.

CTAB: Brometo de hexadeciltrimetiamônio.

TEA: Trietanolamina.

EtOH: Álcool etílico absoluto.

HCl: Ácido clorídrico.

*Técnicas para Caracterização:*

DRX: Difractometria de Raios X.

FTIR: Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier.

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão.

UV-VIS: Espectroscopia Eletrônica de Absorção no Ultravioleta e Visível.

ATG: Análise termogravimétrica.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de partículas inorgânicas capazes de transportar fármacos e moléculas bioativas como de ácidos nucleicos é um tema de grande interesse científico e tecnológico. Alternativas terapêuticas mais eficientes e seguras para o tratamento de vários tipos de doenças, principalmente do câncer, poderão vir a ser oferecidas com o uso desses carregadores, que são capazes não só de proteger a droga contra degradação química, como de permitir a liberação de maneira controlada e/ou prolongada com especificidade, isto é, sem atingir os tecidos e células saudáveis. Neste cenário, as sílicas mesoporosas são consideradas sistemas inorgânicos de grande potencial para uso em aplicações biomédicas em razão de suas propriedades químicas e estruturais (TAO, 2014; WANG et al., 2015; WU; HUNG; MOU, 2011).

As partículas de sílicas mesoporosas apresentam domínios estruturais distintos e com diferentes funcionalidades. A extensa rede de poros cilíndricos estruturais de dimensões nanométricas, ordenadamente distribuídos pela partícula e precisamente controlados por síntese, confere ao material grande área superficial (da ordem de  $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) e volume livre (ao redor de  $1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ), o que permite a imobilização de grandes quantidades de moléculas em seu interior. As paredes inorgânicas de  $\text{SiO}_2$  conferem ao material estabilidade térmica e química. Por apresentarem grande quantidade de grupos silanóis ( $\text{Si-OH}$ ) terminais reativos, as partículas podem ser facilmente modificadas quimicamente de maneira a possibilitar ajustar a interação estabelecida entre a partícula com as espécies a serem imobilizadas nos poros, além de permitir a criação de mecanismos para controlar a liberação das moléculas imobilizadas em seu interior (ZHANG; LI; YU, 2014). Além disso, a superfície externa das partículas pode ser modificada independentemente da superfície interna dos poros e com isso proporcionar possibilidade de controle da interação da partícula no meio biológico. Além desses atributos físico-químicos, as sílicas mesoporosas apresentam biocompatibilidade (ASEFA; TAO, 2012), pouca citotoxicidade (ASEFA; TAO, 2012; GARCIA-BENNETT, 2011) e capacidade de internalização celular (RADU et al., 2004; SLOWING; TREWYN; LIN, 2006; TREWYN et al., 2008), fatores que são muito importantes para uso em aplicações biomédicas.

O primeiro trabalho demonstrando o uso de uma sílica mesoporosa como carregador de fármaco foi publicado em 2001 (VALLET-REGI et al., 2001), no qual o anti-inflamatório ibuprofeno foi imobilizado na sílica MCM-41 e a posterior liberação foi avaliada *in vitro* em meio de fluido corporal simulado.

Desde então inúmeros outros tipos de fármacos (anti-inflamatórios, antibióticos, anticâncer, ente outros) foram imobilizados em sílicas mesoporosas e tiveram seu perfil de liberação estudados em diferentes meios (MANZANO; VALLET-REGÍ, 2010).

Além de fármacos e espécies bioativas, outros componentes podem ser agregados às sílicas mesoporosas, tornando-as “inteligentes” e multifuncionais, capazes não só de controlar a difusão de espécies pela abertura e fechamento do acesso aos poros a partir de estímulos externos (SONG; YANG, 2015) como o uso conjunto na terapia e no diagnóstico de doenças (CHEN et al., 2013; TAO, 2014; VIVERO-ESCOTO; HUXFORD-PHILLIPS; LIN, 2012).

O controle da difusão de espécies nos poros da sílica pode ser realizado por diferentes estímulos externos, como incidência de luz, mudança de temperatura, alterações químicas do meio, entre outros, por exemplo, funcionalizando os poros da sílica com cumarim, com a incidência de comprimentos de onda específicos produz-se a dimerização da molécula, fechando a passagem dos canais dos poros.

### ***1.1. Aplicações biomédicas das sílicas mesoporosas fluorescentes***

Sistemas multifuncionais relacionando diagnóstico e tratamento podem ser gerados combinando a capacidade de carregamento de drogas das sílicas mesoporosas com os mecanismos de controle de difusão ao longo dos poros e de formação de imagens.

Partículas rastreáveis no meio biológico e que ainda auxiliam na formação de imagens do meio para diagnóstico, podem ser geradas pela incorporação de fluoróforos à sílica mesoporosa. Com esse intuito já foram incorporadas nas sílicas mesoporosas corantes orgânicos fluorescentes (LIN et al., 2005), *quantum dots* (HU; ZRAZHEVSKIY; GAO, 2009) e complexos com lantanídeos (FENG et al., 2010). Outro aspecto interessante da sílica fluorescente é que ela pode também atuar como uma sonda ótica, dependendo do fluoróforo a ela integrado, por exemplo, para determinar o pH intracelular a partir da análise das alterações espectrais ocorridas no meio fisiológico (TSOU et al., 2015).

Nos últimos anos, as sílicas mesoporosas que apresentam propriedades fluorescentes emergiram como uma classe em destaque, onde podem atuar em conjunto para detecção de sensibilidade, bioimagem, transporte de drogas etc. (ZHOU et al., 2014). Marcadores fluorescentes são hoje, uma forma simples e efetiva de rastreamento, e assim, conseguem acompanhar a alta demanda de estudos proveniente do crescimento e diversificação de doenças complexas (LEI, J.; WANG, L.; ZHANG, 2011). Ademais, exibem alta hidrofobicidade, biocompatibilidade e estabilidade em meio fisiológico, quando comparada

com outras técnicas de partículas fluorescentes, como *quantum dots* (BAE; TAN; HONG, 2012).

### 1.1.1. *Propriedades Espectroscópicas da Fluoresceína*

A modificação de nanopartículas recobertas por estruturas fluorescentes utilizando alterações superficiais traz uma gama de melhorias em bioaplicações, como reconhecimento e imagens seletivas (RUEDAS-RAMA et al., 2012) e a fluoresceína destaca-se como uma das sondas fluorescentes mais populares para uso em aplicações biológicas, conforme mostra a Figura 1.

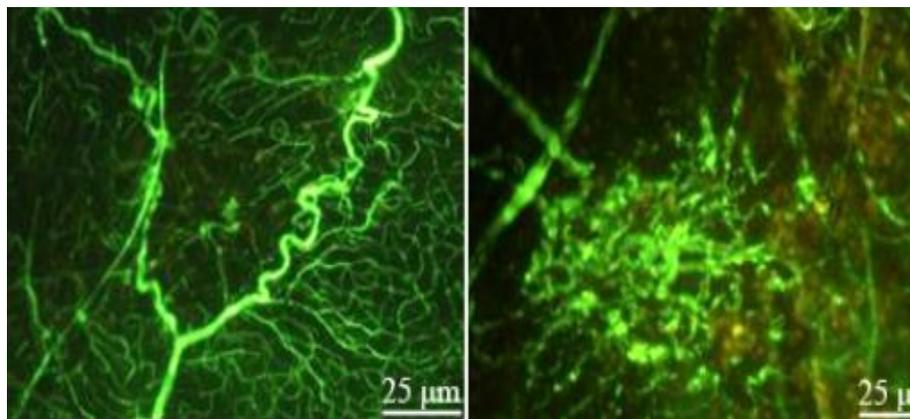


Figura 1 - Imagens de microscopia de fluorescência registrada usando a fluoresceína isotiocianato como agente de contraste. Figura adaptada de (LI et al., 2012).

Sua complexa estrutura oferece propriedades espectrais especiais, como intensa absorção e fluorescência na região do visível e alta foto-estabilidade. Tais propriedades, combinadas com baixa toxicidade e habilidade de se ligar em espécies biomoleculares e iônicas, fazem da fluoresceína uma grande candidata para ensaios biomédicos, tanto como rastreador, como sonda em meio fisiológico (NADERI; FARAJTABAR; GHARIB, 2014; UENO et al., 2004). Em contraste desta aplicação, sua estrutura química, mostrada na Figura 2, reflete complexas propriedades físico-químicas, como a existência de diversas espécies provenientes de equilíbrios ácido-base (BATISTELA et al., 2010).

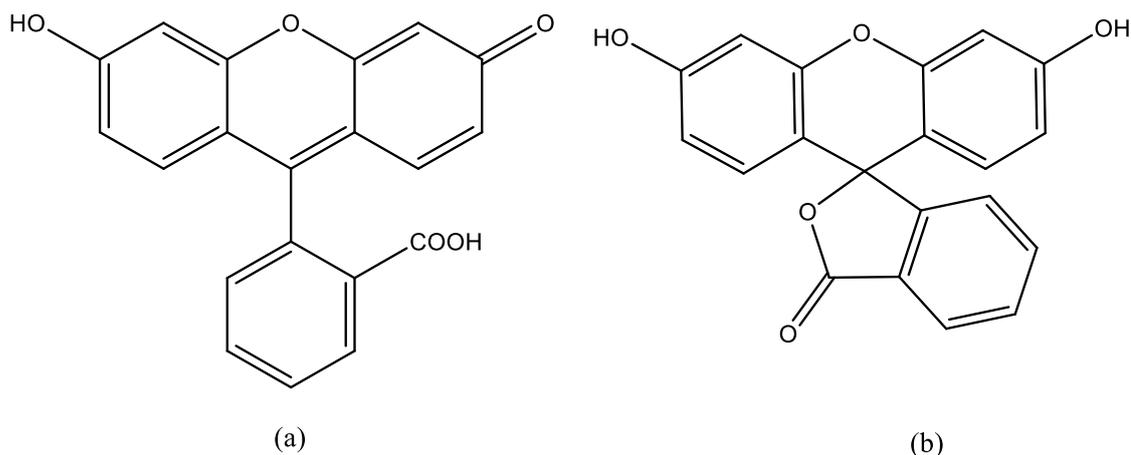


Figura 2 - Estruturas moleculares da fluoresceína em suas formas (a) quinóide e (b) lactona.

A estrutura química da fluoresceína, comercialmente encontrada em sua forma sal de sódio ou neutra, consiste em duas porções, a benzênica e xantênica. Estas porções, classificadas como ortogonais, existem como dois sistemas  $\pi$  independentes devido à interação muito fraca entre as duas nuvens de elétrons. Por outro lado, em solução, a rotação da porção fenila leva ao desvio da posição ortogonal e, portanto, a sobreposição das nuvens de elétrons dos dois sistemas (HIRABAYASHI et al., 2015). O anel xantênico é comumente denominado como fluoróforo, porém a modificação química de qualquer um dos dois sistemas  $\pi$  pode afetar as propriedades de fluorescência, através de diferentes mecanismos (ZHANG; ZHANG; LIU, 2014).

Estudos realizados atestam que muitos grupos funcionais são frequentemente incorporados ao anel benzênico, com o intuito de ajustar e refinar sua adaptabilidade, como solubilidade e reatividade do anel fenólico, que pode culminar na facilidade de reações de funcionalização com demais substratos. Tais modificações, no entanto, podem exercer grande efeito nas propriedades da sonda, mesmo que o fluoróforo permaneça inalterado (UENO et al., 2004). Um exemplo desta modificação, que é fortemente explorado e utilizado é a fluoresceína isotiocianato (FITC), cujo grupo reativo  $-N=C=S$  contido na porção benzênica é facilmente acoplado nas mais diversas superfícies, incluindo nanopartículas. Esta extensão na estrutura da molécula da fluoresceína não provoca mudanças significativas em sua fluorescência original e, sendo assim, este derivado é amplamente utilizado para bioaplicações, (BAE; TAN; HONG, 2012) principalmente realizando a função de rastreador de transporte de drogas (LEI, J.; WANG, L.; ZHANG, 2011) e sensores intracelulares, uma vez que tais nanocompósitos (WANG; LEI; ZHANG, 2009), ligados pela porção isotiocianato, não perdem suas propriedades espectrais, independente do meio fisiológico em

que se encontra, ou mediante mudança em seu ambiente, restringindo sua aplicação como sonda fisiológica.

Para que estudos de fluorescência com a fluoresceína sejam realizados é importante a correta seleção do solvente, pois as interações que se estabelecem, como ligações de hidrogênio, provocam alterações de suas propriedades espectrais (NADERI; FARAJTABAR, 2016). A Figura 3 ilustra o fenômeno de solvatocromismo aplicado à molécula de fluoresceína. As diferenças de coloração observadas nas soluções são em parte resultantes da mudança da constante dielétrica do solvente e de sua solubilidade. A FL é solúvel em etanol, H<sub>2</sub>O DI, DMSO e acetona, e pouco solúvel em hexano e tolueno.

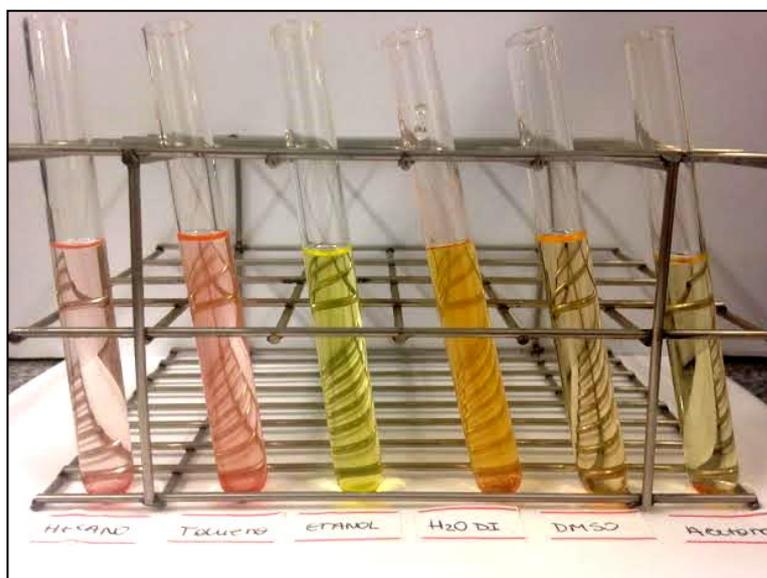


Figura 3 - Solvatocromismo da fluoresceína em diferentes solventes. Da esquerda para a direita: hexano, tolueno, etanol, H<sub>2</sub>O DI, DMSO e acetona.

Tal fenômeno, segundo a IUPAC, é definido como o deslocamento sofrido pela banda de absorção ou emissão de acordo com a mudança de polaridade do solvente em que a substância se encontra. Este fenômeno é usualmente explicado pela interação ácido – base de Lewis do soluto e do solvente que envolve combinação entre orbitais HOMO-LUMO conforme esquema apresentado na Figura 4. A coloração da FL é decorrente da transição eletrônica entre os orbitais HOMO → LUMO da molécula, os quais possuem níveis de energias bem definidos. Com a interação com os orbitais do solvente, forma-se um aduto (FL:Solvente) que passa a apresentar os níveis HOMO-LUMO com energias diferentes da molécula de FL, o que resulta em alteração da cor e deslocamentos dos máximos das bandas de absorção e emissão (NADERI; FARAJTABAR; GHARIB, 2014).

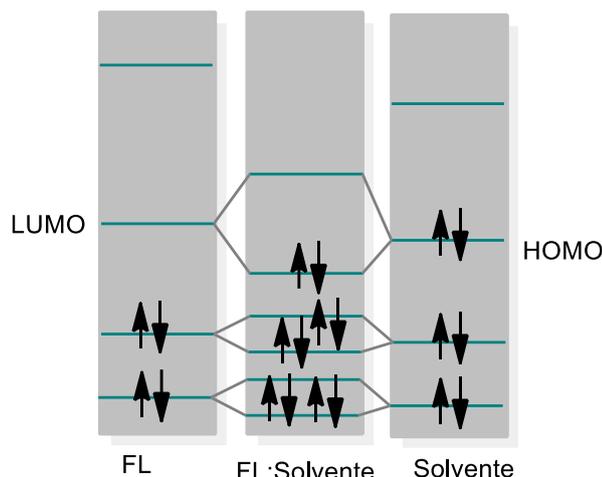


Figura 4 - Esquema simplificado do diagrama de orbitais moleculares relacionados ao solvatochromismo oriundo de uma interação HOMO-LUMO. Figura adaptada de (SHRIVER, D. F.; ATKINS, 2003).

Outro fenômeno muito importante que ocorre na molécula de fluoresceína é o de luminescência, definido pela emissão de luz por alguma substância, ocorrendo a partir de estados eletrônicos excitados, e que é usualmente dividida em duas categorias diferentes: a fluorescência e fosforescência. A fluorescência, fenômeno observado nesta molécula e mostrado na Figura 5, é a emissão de luz por meio de uma transição eletrônica permitida a partir de um estado excitado singlete para o estado fundamental também singlete. Por conta disso, o retorno para o estado fundamental com a emissão de um fóton é totalmente permitido e ocorre de maneira rápida. Na fosforescência ocorre um processo chamado de cruzamento intersistema pelo qual ocorre uma mudança na multiplicidade de spin do estado excitado de singlete para tripleto. O decaimento para o estado fundamental passa a ser proibido e as taxas de emissão ocorrem de forma mais lenta do que observado para a fluorescência.

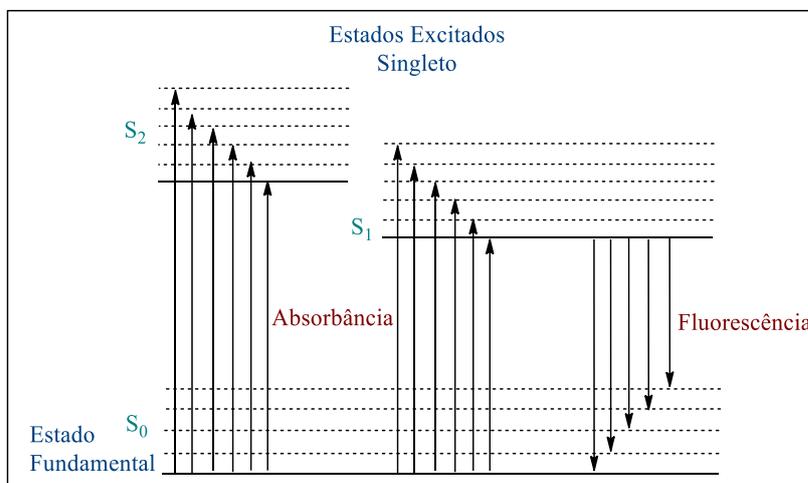


Figura 5 - Diagrama esquemático das transições eletrônicas na FL em pH neutro.

Assim, o tautômero mais estudado por demais estudos refere-se ao diânion, relatado por sua variação de solvente que, à medida que é modificado de H<sub>2</sub>O para DMSO, o máximo de absorção e fluorescência, em 520 nm, é deslocado para maiores comprimentos de onda. Tal observação é baseada nas ligações de hidrogênio entre a forma diânion e o solvente, onde se apresenta com maior força no estado fundamental, aumentando a distâncias deste nível com o excitado, à medida que a capacidade de ligações de hidrogênio do solvente aumenta (BHAGI et al., 2013; MCQUEEN et al., 2010). Os espectros de absorção apresentam comprimentos de onda menores após a formação de ligações de hidrogênio. Este padrão pode ser observado com a estabilização do estado fundamental, uma vez quando o poder de doação de ligação de hidrogênio dos meios aumenta. Quando na ausência de ligações de hidrogênio, a interação eletrostática prevalece, ou seja, para solventes não apróticos, é entendido que os deslocamentos espectrais deverão ocorrer em função da polaridade do meio (BATISTELA et al., 2010; BHAGI et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo foi preparar nanopartículas de sílica mesoporosa com propriedades fluorescentes, para atuação como possíveis sondas no meio fisiológico.

Os objetivos específicos, neste processo, foram estudar diferentes condições sintéticas para a formação da ligação covalente entre a fluoresceína e o glicidilóxi-propiltrimetoxisilano e avaliar as alterações espectrais da molécula de fluoresceína imobilizada em diferentes meios e solventes que possam ser utilizadas como sonda.

## 3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 3.1. Reagentes

Para a produção das nanopartículas de sílica mesoporosa (NPSM), foram utilizados os reagentes tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich, brometo de hexadeciltrimetamônio (CTAB) adquirido da Merck, trietanolamina (TEA) adquirida da Mallinckrodt, álcool etílico absoluto (EtOH) adquirido da Synth, HCl adquirido da Synth e água (H<sub>2</sub>O) deionizada produzida por um sistema Millipore – Direct Q.

Para a funcionalização das NPSM foram utilizados os reagentes glicidilóxi-propiltrimetoxisilano (GPTMS) adquirido da Aldrich, tolueno, hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), acetona e dimetilsulfóxido (DMSO), todos adquiridos da Synth, ácido para-tolueno sulfônico (TsOH) adquirido da Vetec e a Fluoresceína *free acid* (FL) adquirida da Aldrich.

### 3.2. *Síntese da nanopartícula de sílica mesoporosa*

O preparo de dispersões de sílica mesoporosa é baseado na hidrólise de TEOS ao redor de moldes estruturais formados por agregados micelares do surfactante catiônico CTAB na presença de trietanolamina (MÖLLER; KOBLER; BEIN, 2007). Assim, a síntese das NPSM envolveu a mistura dos reagentes CTAB, TEA, EtOH, TEOS e H<sub>2</sub>O deionizada na proporção molar de 1,0 TEOS : 0,27 CTAB : 1,0 TEA : 137 H<sub>2</sub>O : 6,2 EtOH (MÖLLER; KOBLER; BEIN, 2007).

Foi transferido para um balão de fundo redondo uma alíquota de 20 mL da chamada ‘Solução Estoque’ previamente preparada a partir de uma mistura nas proporções de 1,0 CTAB : 3,9 TEA : 525 H<sub>2</sub>O : 23 EtOH, a qual foi aquecida à 60°C. Quando a solução atingiu a temperatura desejada, foram adicionados 1,543 mL de TEOS gota a gota, sob constante agitação. Após 10 minutos, foi observada a formação de um precipitado branco, e após 140 minutos, a solução foi resfriada até temperatura ambiente.

O sólido formado nesta etapa, ainda contendo o direcionador estrutural preenchendo os poros das partículas será identificado ao longo do texto pela sigla CTA@NPSM. O material produzido nesta etapa foi caracterizado por difratometria de raios X (DRX), espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (ATG). Para obtenção das nanopartículas mesoporosas, o molde deve ser removido, o que neste estudo foi feito por extração com uma mistura de etanol/HCl (MÖLLER; KOBLER; BEIN, 2007; URATA et al., 2009). O sólido da CTA@NPSM foi disperso em 45 mL de uma mistura de etanol (40 mL) e HCl concentrado (5 mL), sob constante agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Depois desse período, o sólido foi isolado por filtração em membrana de celulose regenerada (Milipore – Microclar) com poros de 0,22 µm, repetindo-se o processo por mais 2 vezes com novas soluções de remoção.

O sólido obtido nesse processo será identificado ao longo do texto como NPSM e após secagem em estufa foi caracterizado por DRX, FTIR, ATG, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a porosidade foi confirmada por isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub>.

### 3.3. *Funcionalização das Nanopartículas de Sílica Mesoporosa*

A funcionalização química da NPSM pode ser realizada por dois processos: por pós-funcionalização, após o processo de preparação da sílica mesoporosa e remoção do molde, pela reação de condensação dos grupos silanóis superficiais com o agente sililante

modificado; ou por meio de uma síntese direta (co-condensação), também utilizando o agente sililante, no momento da formação da mesoestrutura, como esquematicamente mostrado na Figura 6.

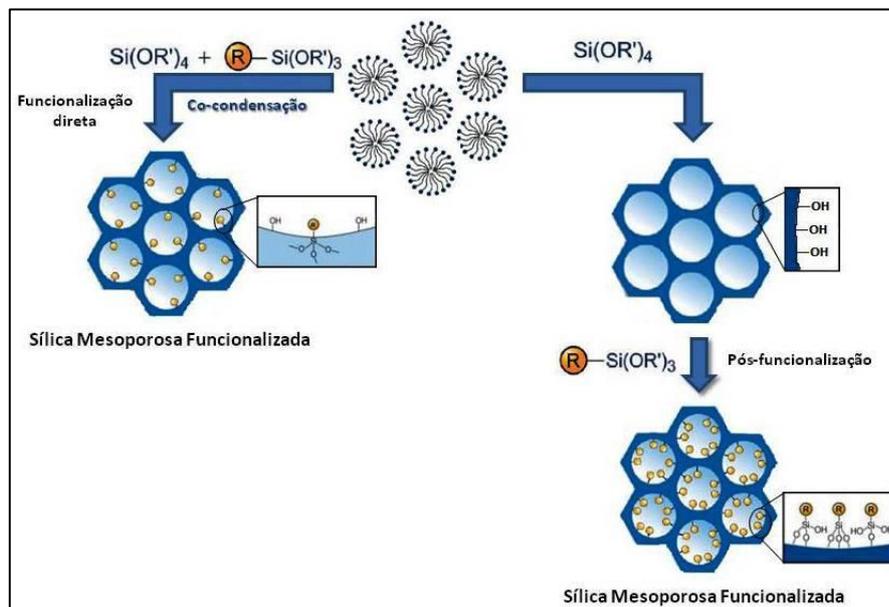


Figura 6 - Esquema simplificado das rotas de obtenção das sílicas mesoporosas funcionalizadas por co-condensação e pós-funcionalização. Figura adaptada de (HOFFMANN et al., 2006).

Neste trabalho, foram avaliados os métodos de pós-funcionalização e co-condensação, utilizando o agente sililante GPTMS, em duas principais vias sintéticas: Método (1) funcionalização da nanopartícula de sílica mesoporosa com o GPTMS e posterior funcionalização à FL, e Método (2) pré-modificação do agente sililante GPTMS com a FL formando o FL-Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, e posterior funcionalização à nanopartícula de sílica mesoporosa, conforme exemplifica a Figura 7.

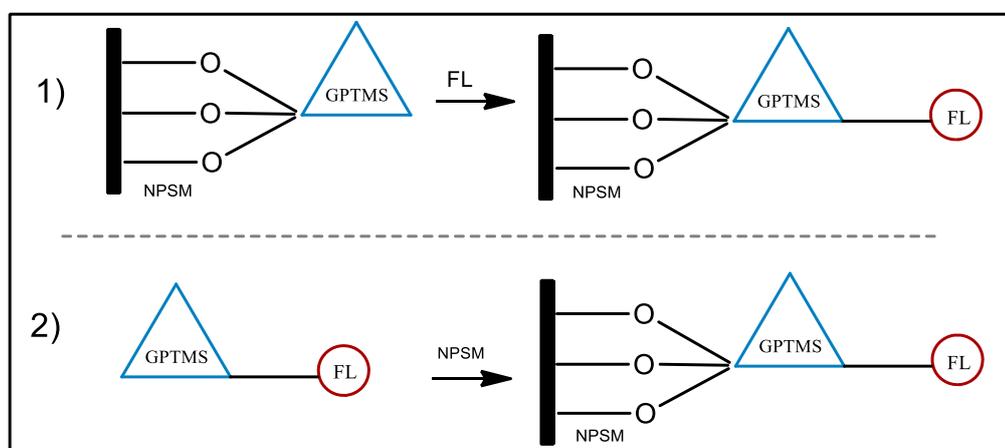


Figura 7 - Esquemas simplificados das rotas sintéticas utilizadas para obtenção das NPSM funcionalizadas com FL.

### 3.3.1. Método 1) Pós-funcionalização das nanopartículas com GPTMS e posterior acoplamento da fluoresceína

O procedimento experimental relacionado à síntese das nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas pelo Método 1 mostrado no esquema da Figura 7 é descrito resumidamente no fluxograma da Figura 8. O detalhamento de cada etapa sintética apresentada no fluxograma será dado adiante.

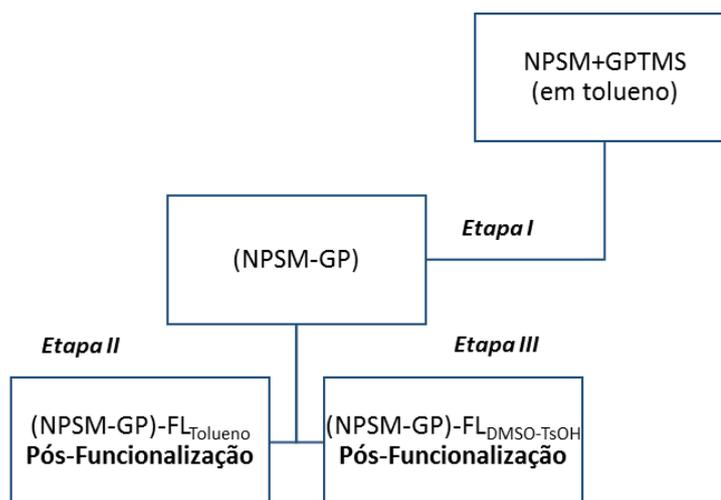


Figura 8 - Fluxograma mostrando as etapas da rota sintética referente à obtenção das nanopartículas de sílica mesoporosa com fluoresceína covalentemente ligada partindo do precursor NPSM-GP, conforme o Esquema 1 da Figura 7.

#### 3.3.1.1. Funcionalização da NPSM com GPTMS – Etapa I

A primeira etapa, abordada na Figura 8, para a funcionalização da NPSM, foi modificá-la com o agente sililante e, posteriormente, adicionar ao meio reacional o agente fluoróforo para formação da ligação covalente. Para esta etapa de síntese, foram dispersas 300 mg de NPSM em 30 mL de tolueno (previamente destilado e seco com sulfato de magnésio) e em seguida adicionados 0,4538 mL de GPTMS (1,92 mmol). Um sistema de aquecimento com um condensador de bolas e banho de silicone foi montado, e para evitar o contato com a umidade advinda do ar, foi adicionado um tubo secante (composto de sílica e algodão) ao condensador. O sistema foi então agitado com o auxílio de uma barra magnética, e a temperatura da solução foi elevada até o refluxo ser atingido, onde o mesmo permaneceu por 24 horas. Após, tanto em forma de solução, como em forma de sólido, que foi seco em estufa e caracterizado por FTIR, DRX e ATG, ambas as pré-modificações foram armazenadas. O composto produzido nesta etapa será identificado ao longo do texto como NPSM-GP.

### ***3.3.1.2. Acoplamento da Fluoresceína na NPSM funcionalizada com GPTMS – Etapas II e III***

Este procedimento foi executado de duas maneiras distintas conforme descrito na Figura 8. No primeiro (Etapa II) foi avaliada a reação de funcionalização da FL ao anel epóxi do grupo glicidilóxiopropil em tolueno sem a presença de TsOH. Já no procedimento descrito na Etapa III, foi utilizado o solvente DMSO na presença de TsOH. Na ausência de ácido espera-se que a FL esteja na sua forma lactona original e com a adição do ácido ao meio reacional espera-se que o equilíbrio se desloque para forma quinoide neutra mostrada na Figura 2.

Na Etapa II, a dispersão NPSM-GP foi transferida para um balão e a ela foram adicionados 10 ml de uma solução contendo 0,6380 g de FL (1,92 mmol) em tolueno. O sistema permaneceu em refluxo e sob agitação constante por 24 horas. Após este período, o sólido foi isolado por filtração em membrana, lavado com alíquotas de tolueno e por fim, seco em estufa. A caracterização foi feita por FTIR e DRX, e o filtrado armazenado para posterior recuperação do solvente.

A fim de eliminar a FL não ligada covalentemente que tenha permanecido na matriz mesoporosa, o sólido foi disperso em 30 mL de acetona e agitado à temperatura ambiente por 24 horas e depois, o mesmo procedimento foi repetido com o solvente DMSO. Após cada etapa de lavagem, o sólido isolado por filtração e seco em estufa, foi caracterizado por DRX e FTIR. O sólido isolado na última etapa de lavagem foi também caracterizado por UV-VIS e fluorescência, e será identificado ao longo do texto como (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub>.

Na etapa III, 0,0948 g da nanopartícula funcionalizada com NPSM-GP foram dispersas em 20 mL de uma solução de DMSO contendo 0,0133 g de FL e 0,0069 g de TsOH (1 : 1) e transferidos para um balão onde permaneceu sob refluxo durante 24 horas. Após este período, o sólido foi isolado por filtração em membrana, seco em estufa e caracterizado por FTIR e DRX. O composto produzido na presença de TsOH será identificado ao longo do texto como (NPSM-GP)FL<sub>DMSO</sub>.

### ***3.3.2. Método 2) Funcionalização utilizando o GPTMS pré-modificado com fluoresceína***

O procedimento experimental relacionado à síntese das nanopartículas de sílica mesoporosas funcionalizadas pelo Método 2 apresentado na Figura 7 é apresentado resumidamente no fluxograma mostrado na Figura 9. O detalhamento sintético de cada etapa mostrada será dado adiante.

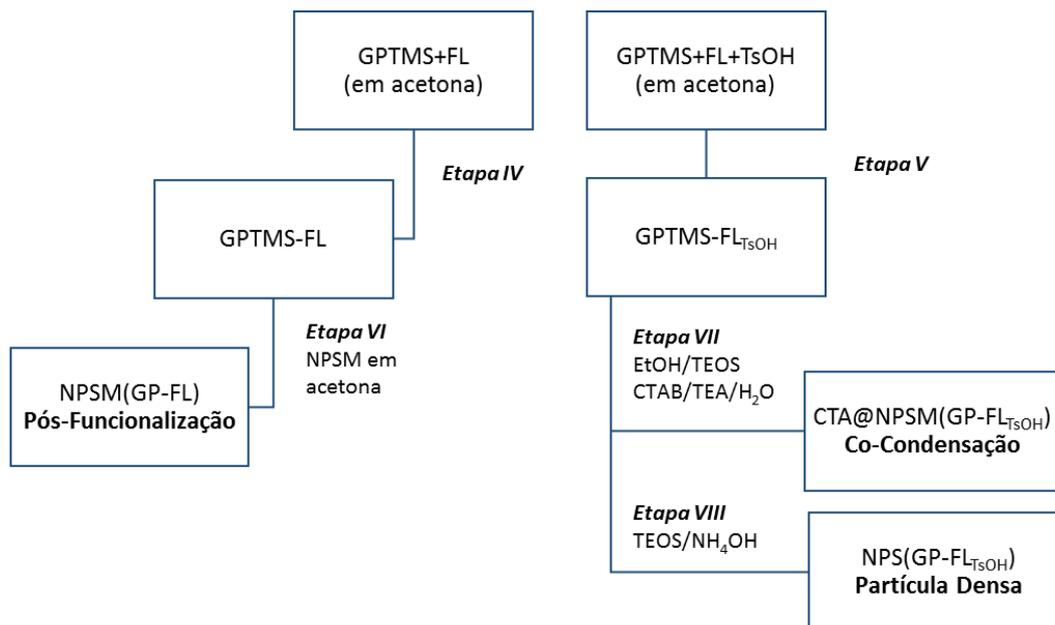


Figura 9 - Fluxograma mostrando as etapas sintéticas envolvidas com a obtenção das nanopartícula de sílica mesoporosa com FL utilizando o precursor GPTMS-FL, conforme o Método 2 descrito na Figura 7.

### 3.3.2.1. Pré-Modificação do agente sililante GPTMS com Fluoresceína - Etapas IV e V

Neste procedimento, anterior ao processo de funcionalização das NPSM, o agente sililante GPTMS foi pré-modificado com FL, e tal modificação foi realizada de duas maneiras distintas: uma utilizando a FL na forma lactona, como recebida, (Etapa IV da Figura 9) e outra utilizando TsOH para obtenção do grupo ácido carboxílico (Etapa V da Figura 9), conforme mostrado na Figura 2.

Para a Etapa IV, foram dissolvidos 0,6380 g (1,92 mmol) de FL em 30 mL de acetona em um balão volumétrico de fundo redondo, onde a ele foram adicionados 0,4538 mL (1,92 mmol) de GPTMS. O sistema permaneceu em agitação por 24 horas, e após, a solução refluxada foi transferida a um tubo falcon, a qual foi centrifugada, com o intuito de ser obtida a deposição de GPTMS-FL. O sólido foi então transferido para o sistema de filtração por membrana e lavado com alíquotas de acetona, não sendo observado o desprendimento da coloração vermelha do sólido. Em seguida, foi seco em estufa e caracterizado por FTIR, UV-VIS, DRX e Fluorescência. Esta pré-modificação será identificada ao longo do texto como GPTMS-FL.

Já para o procedimento da Etapa V, foram dissolvidos 50 mg de FL (0,0001 mol) em 10 mL de acetona. Paralelamente, foram adicionados 0,0285 g de TsOH (0,0001 mol) à 10 mL

de acetona. Ambas as soluções foram transferidas para um balão volumétrico de fundo redondo, e a ele foram adicionados 0,0355 mL (0,0001 mol) de GPTMS, representando assim uma proporção molar de 1,0 FL: 1,0 TsOH: 1,0 GPTMS, a qual permaneceu em sistema de refluxo por 24 horas. Após, a solução sob o rótulo GPTMS-FL<sub>TsOH</sub> foi armazenada.

As caracterizações para esta etapa da reação foram dificultadas, principalmente pelo procedimento para se adquirir o sólido, pois no caso de filtração ou roto-evaporação, iria ser obtido um sólido com uma porção relativamente grande em massa deste ácido. Dessa forma, a utilização deste intermediário para as etapas seguintes foi em solução e a caracterização deste agente de partida foi baseada naquele sintetizado através da Etapa IV (GPTMS-FL), isento da adição de TsOH.

### ***3.3.2.2. Pós-funcionalização das nanopartículas com o agente sililante pré-modificado GPTMS-FL - Etapa VI***

A pós-funcionalização das partículas de sílica é realizada a partir da redispersão do material em um determinado solvente, e à ele, é adicionado o agente sililante modificado. A Etapa VI correspondente à síntese de NPSM funcionalizada através do processo de pós-funcionalização envolve a incorporação do agente sililante GPTMS modificado com FL *free acid*, sem adição de ácido (GPTMS-FL), descrita na Etapa IV.

Para isso, em um béquer, o sólido GPTMS-FL foi solubilizado em 15 mL de acetona e paralelamente, 300 mg de NPSM foram solubilizadas em 15 mL de acetona. Ambas as soluções foram transferidas para um balão de fundo redondo, e foram mantidas em refluxo durante 24 horas.

Em seguida, após resfriamento, a solução adquirida foi levada a um sistema de filtração com membrana, onde o sólido foi lavado com alíquotas de acetona. O mesmo foi seco em estufa, e posteriormente armazenado, bem como o filtrado. Ambos, o sólido e filtrado, foram tratados com acetona, de modo a retirar a FL que não havia sido incorporada à nanopartícula, e que potencialmente estaria adsorvida na superfície.

#### ***3.3.2.2.1. Etapas de tratamento com acetona – Etapa VI***

O sólido NPSM(GP-FL)<sub>pós síntese</sub> foi caracterizado por FTIR e DRX e foi purificado através do processo de diálise em solução de H<sub>2</sub>O deionizada. Nesse procedimento, o sólido foi transferido para um tubo de diálise (Milipore) com uma membrana de 3.500 Da, e foi imerso em 250 mL de H<sub>2</sub>O deionizada. A troca da solução de diálise foi realizada a cada 24

horas, por duas vezes. Após a segunda lavagem, a solução foi transferida ao sistema de filtração por membrana, onde o sólido obtido foi seco em estufa e caracterizado por FTIR.

Adicionalmente, foi realizada a purificação do filtrado obtido logo após o refluxo, através do processo de roto-evaporação, seguido de purificação por diálise e filtração por membrana, onde o sólido foi seco em estufa e caracterizado por FTIR.

Por fim, com o intuito de finalizar a etapa de purificação, os sólidos obtidos e caracterizados anteriormente foram, juntos, resuspensos em 50 mL de acetona em um béquer sob agitação, durante 24 horas. Após, o meio reacional foi transferido para o sistema de filtração em membrana, onde o sólido de interesse final foi analisado por FTIR, UV-VIS, DRX e Fluorescência, e será identificado ao longo do texto como NPSM(GP-FL).

### ***3.3.2.3. Síntese direta por co-condensação da nanopartícula funcionalizada utilizando o agente sililante pré-modificado GPTMS-FL<sub>TsOH</sub> – Etapa VII***

Para a funcionalização por co-condensação, foi utilizado o agente sililante funcionalizado com FL em meio acidificado com TsOH. Para a síntese, foram utilizados os mesmos reagentes que compõem a síntese da nanopartícula de sílica mesoporosa, com adição do agente sililante: (GPTMS-FL<sub>TsOH</sub> + TEOS) : CTAB : TEA : H<sub>2</sub>O : EtOH.

Em um béquer, foi adicionado o agente sililante modificado juntamente com TEA e TEOS. Foi utilizada a proporção 95% TEOS : 5% GPTMS-FL<sub>TsOH</sub>, logo, foram adicionados 0,6363 mL de TEOS seguidos de 0,3762 mL de TEA, que permaneceram sob agitação e temperatura de 56°C, durante 2 horas.

Paralelamente, em um balão volumétrico de fundo redondo, foram adicionados 7,02 mL de H<sub>2</sub>O deionizada, 1,02 mL de EtOH e 0,2806 g de CTAB, sob agitação e temperatura de 56°C, durante 2 horas. Após esse período, a solução contida no béquer foi adicionada, gota a gota, ao meio reacional contido no balão volumétrico. Após a adição de toda a solução ao balão, o mesmo permaneceu por aquecimento a 56°C e 2 horas de agitação. Em seguida, posterior ao resfriamento, a solução foi transferida para um sistema de filtração em membrana, onde o sólido foi lavado com alíquotas de acetona. Por fim, o mesmo foi seco em estufa e caracterizado por FTIR, UV-VIS, DRX e Fluorescência. O composto produzido nesta etapa será identificado ao longo do texto como CTA@NPSM(GP-FL).

Para fins de comparação, foi sintetizada a nanopartícula de sílica do mesmo modo como foi realizada a co-condensação, porém sem a adição do direcionador estrutural CTAB (Etapa VIII), com o objetivo de se produzir uma partícula densa não mesoestruturada. O composto produzido nesta etapa será identificado ao longo do texto como NPS(GP-FL).

### **3.4. Equipamentos utilizados para caracterização**

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram registrados em um equipamento Shimadzu, modelo Prestige 21, no modo reflectância difusa utilizando o acessório DRIFT, com resolução de  $1\text{ cm}^{-1}$  e 256 varreduras, onde todas as amostras caracterizadas foram diluídas em KBr.

Os espectros eletrônicos de absorção, no modo absorbância, reflectância e fluorescência, foram registrados em um espectrofotômetro Ocean Optics USB4000 operado por fibra ótica e lâmpadas de Deutério e Tungstênio.

Os difratogramas de raios X de amostras na forma de pó foram registrados em um difratômetro Rigaku, modelo Miniflex, usando a radiação  $K\alpha$  do Cu, na região de  $2\theta$  de 1,5 a 15 graus usando uma voltagem de 30 kV e corrente de 15 mA.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram registradas em um microscópio JEOL/JEM 2100, operando a 200 kV, onde as amostras foram preparadas gotejando-se uma dispersão do material em isopropanol sobre um porta amostra de cobre, recoberto com uma camada de carbono amorfo.

As isotermas de adsorção e dessorção de  $N_2$  foram registradas em um equipamento Micromeritics ASAP 2020, onde as amostras foram degaseificadas à temperatura ambiente sob pressão reduzida por 12 horas antes da realização das medidas.

As análises termogravimétricas foram registradas em um equipamento Netzsch Thermoanalyser, modelo TGA/DSC 490 PC Luxx, sob uma taxa de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e fluxo de  $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de ar, contendo um espectrômetro de massas Aëolos 403C acoplado para análise dos gases liberados.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Propriedades estruturais e texturais das nanopartículas de sílica mesoporosa**

As NPSM são sintetizadas a partir da hidrólise controlada do TEOS ao redor de moldes direcionadores estruturais formados por agregados micelares do surfactante  $\text{CTA}^+$ . As paredes inorgânicas formadas nesse processo são constituídas de unidades tetraédricas  $-\text{[SiO}_4\text{]}-$  conectadas aleatoriamente pelos vértices produzindo uma estrutura amorfa. Entretanto, a combinação das micelas com as paredes inorgânicas forma uma mesoestrutura que apresenta um padrão parcialmente ordenado de repetição, que pode ser identificado por difratometria de raios X na região de baixo ângulo. O pico de difração observado ao redor de 2,2 graus nos

difratogramas de raios X mostrados na Figura 10 é atribuído a esta organização. Nas sílicas mesoporosas ordenadas com arranjo hexagonal, como a MCM-41 e a SBA-15, esse pico é atribuído à distância interplanar (100). Já em sílicas com arranjo cúbico como a MCM-48 esse pico é atribuído ao plano (211). Como nos difratogramas registrados só aparece um pico de difração na região de baixo ângulo, não é possível estabelecer o tipo de arranjo das NPSM sintetizadas. Entretanto, como a quantidade de direcionador estrutural utilizado na síntese está na faixa designada para obtenção da organização hexagonal, o pico de difração será atribuído como referente à distância interplanar (100). Essa distância equivale ao diâmetro do poro somado a espessura da parede inorgânica, o que calculado a partir da equação de Bragg equivale a 40 Å, sendo este valor consistente com o esperado para partículas mesoporosas com arranjo hexagonal produzidas utilizando agregados micelares de  $\text{CTA}^+$  como molde. Na região de alto ângulo é observado apenas um halo ao redor de 20 graus corroborando com a formação de uma mesoestrutura inorgânica com paredes amorfas. Com a remoção do molde, observa-se um ganho de intensidade deste pico de difração, resultado do aumento do contraste eletrônico entre as paredes inorgânicas e os poros vazios.

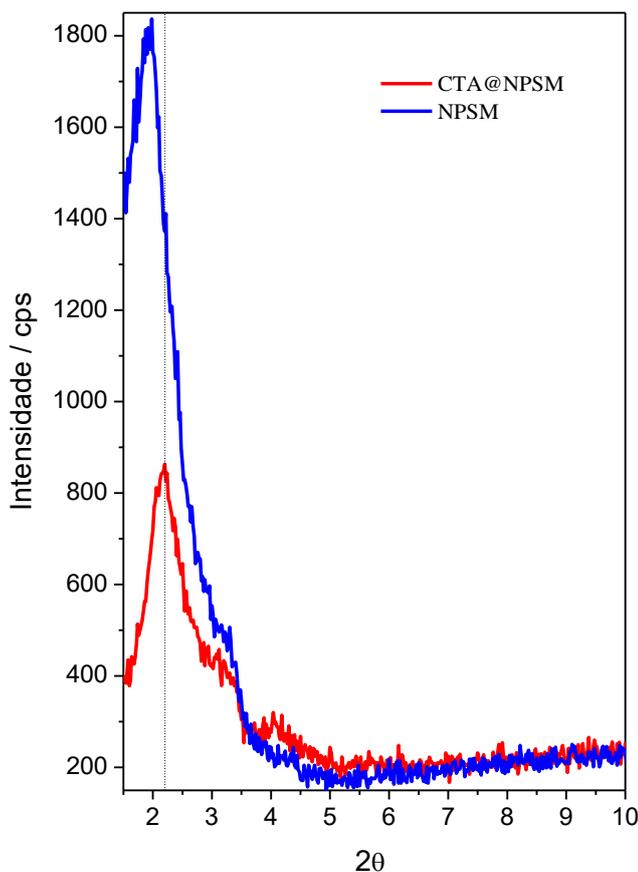


Figura 10 - Difratogramas de raios X das nanopartículas com poros preenchidos pelo molde (CTA@NPSM) e após remoção por extração com EtOH/HCl (NPSM).

O procedimento de remoção do molde mais eficiente é a calcinação, mas no caso de nanopartículas esse procedimento não é recomendado devido a promover agregação irreversível entre as nanopartículas. Por essa razão, a remoção foi realizada por meio de extração com solventes. Este procedimento tem o inconveniente de ser um muito mais trabalhoso que a calcinação, pois envolve várias etapas de filtração/centrifugação e redispersão, o que devido ao tamanho e estabilidade coloidal das partículas, produz perdas e entupimento dos poros da membrana de filtração.

O processo de remoção do molde foi acompanhado por FTIR monitorando o desaparecimento das bandas características do CTA<sup>+</sup> e as bandas mais relevantes são destacadas na Figura 11. As principais bandas do CTA<sup>+</sup> ocorrem em 2927 cm<sup>-1</sup> e 2860 cm<sup>-1</sup> referentes ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H da cadeia alquílica e em 1478 cm<sup>-1</sup> referente à deformação angular da ligação C-H. A banda em 3620 cm<sup>-1</sup> é característica de grupos silanóis superficiais ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ) envolvidos em interações eletrostáticas com a porção polar das micelas de surfactante e em 1693 cm<sup>-1</sup> é atribuída a moléculas de água organizadas por ligações de hidrogênio, possivelmente em monocamada na interface entre as micelas e a parede inorgânica (SHEN; WU, 2003; URATA et al., 2009).

As outras bandas que aparecem no espectro são referentes ao esqueleto inorgânico da sílica. As bandas em 3362 cm<sup>-1</sup>, 3425 cm<sup>-1</sup> e 3462 cm<sup>-1</sup> observadas são referentes ao estiramento das ligações O-H de grupos silanóis ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ). A deformação angular dessa ligação ocorre em 1627 cm<sup>-1</sup>. As bandas em 1093 cm<sup>-1</sup> e em 1238 cm<sup>-1</sup> são referentes ao estiramento das ligações siloxanos (Si-O-Si). Já a banda em 962 cm<sup>-1</sup> é referente à deformação angular Si-OH e em 799 cm<sup>-1</sup> à deformação angular das ligações Si-O-Si. Por fim, a banda em 464 cm<sup>-1</sup> é referente ao rocking do Si-O-Si (URATA et al., 2009).

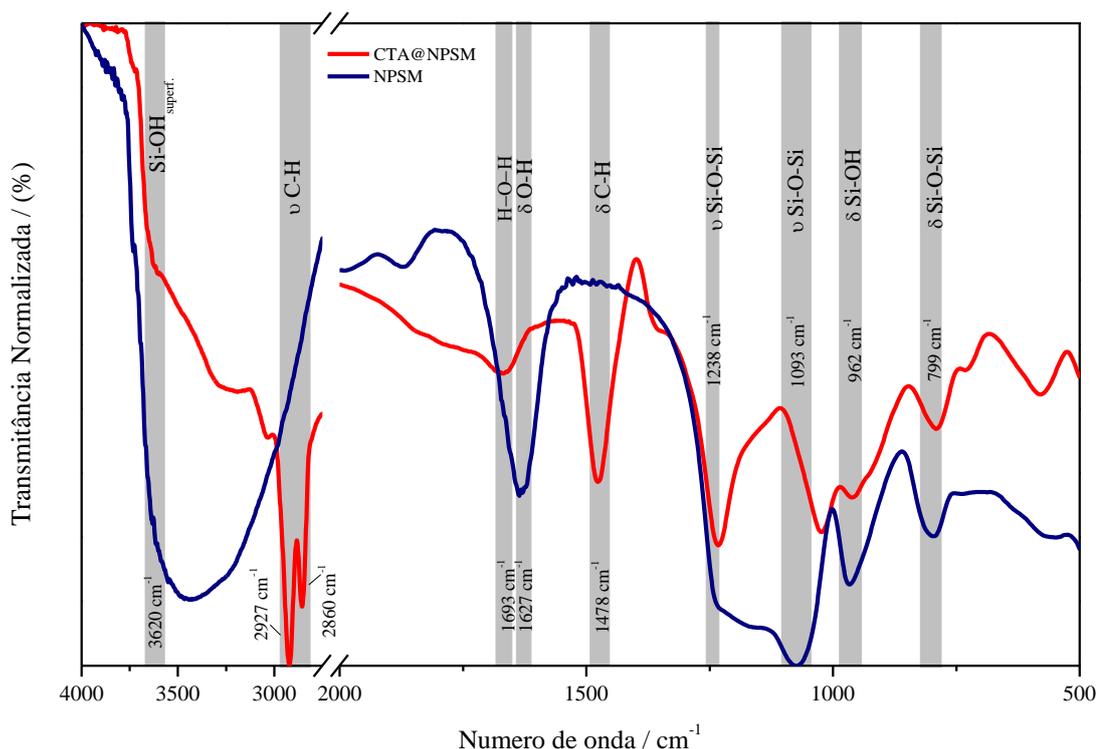


Figura 11 - Espectros de FTIR da NPSM antes e após a remoção do molde.

A remoção completa das moléculas de molde também foi confirmada por ATG, conforme curvas de perda de massa mostradas na Figura 12. Na CTA@NPSM a quantidade de massa perdida é de 46,6 % em três eventos distintos. No primeiro, que vai da temperatura ambiente a 125°C, ocorre a liberação de moléculas de H<sub>2</sub>O adsorvidas, como pode ser confirmado pela curva de liberação de H<sub>2</sub>O, mostrada na parte superior do gráfico, registrada por um espectrômetro de massa acoplado ao sistema. No segundo evento, que vai de 125 a 317°C, a decomposição térmica do CTA<sup>+</sup> se inicia, evidenciada pelo início da liberação de CO<sub>2</sub>. Acima de 317°C, no terceiro evento de perda de massa, ocorre a taxa máxima de liberação de H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> referente à decomposição térmica do CTA<sup>+</sup>. Após a extração do molde, não é mais detectada a liberação de CO<sub>2</sub> pelo espectrômetro de massas, o que indica a completa remoção do CTA<sup>+</sup>. Só é observada a liberação de moléculas de H<sub>2</sub>O em 2 eventos: o primeiro referente a moléculas adsorvidas na estrutura e o segundo, acima de 150°C, referente à liberação de água formada na reação de condensação de grupos silanóis superficiais e estruturais.

A partir destas observações foi realizada a estimativa da composição química do material, a qual foi obtida como sendo (C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>N)<sub>0,18</sub>SiO<sub>2</sub>, o que representa 2,9 mmol de CTA<sup>+</sup> por 1 g de NPSM.

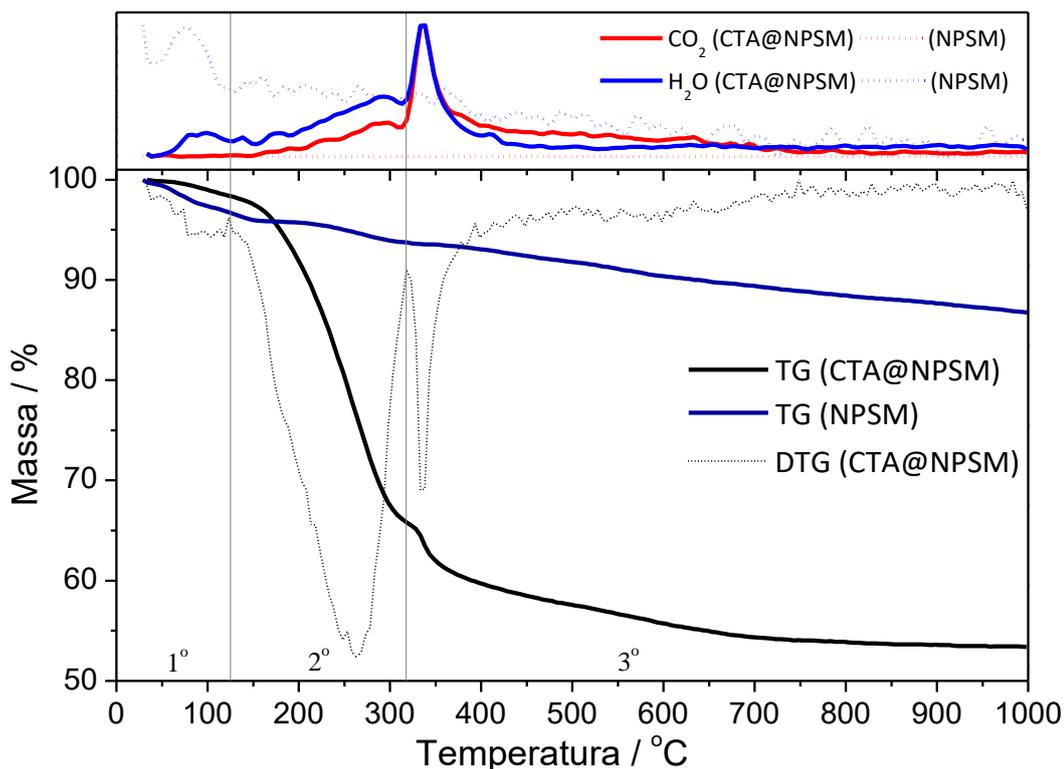


Figura 12 - Curvas termogravimétricas da CTA@NPSM e NPSM. As curvas superiores são referentes à liberação de H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> oriundas da decomposição térmica das amostras monitoradas por um espectrômetro de massa acoplado.

A Figura 13 traz a imagem de MET da NPSM, onde são observadas nanopartículas com formato esférico, diâmetro médio ao redor de 90 nm e pouca aglomeração. Os poros estruturais aparecem como pontos claros ao longo das nanopartículas e são apresentados em um arranjo parcialmente ordenado, como já indicado pelo DRX (Figura 10).

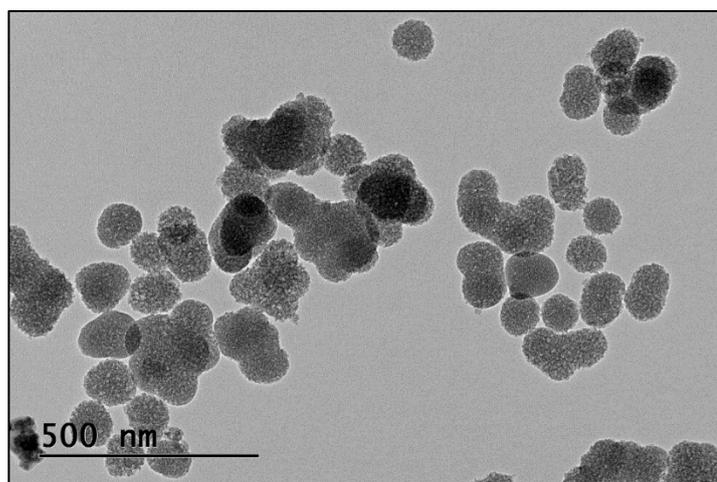


Figura 13 - Imagem de MET da NPSM.

As isotermas de adsorção e dessorção de  $N_2$  registradas na temperatura do  $N_2$  líquido (Figura 14) apresentam um perfil tipo IV, típico de material mesoporoso. A área superficial determinada pelo método BET foi de  $766 \text{ m}^2/\text{g}$  e o volume de poros, determinado pela curva de dessorção usando o método BJH, foi de  $0,93 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Ademais, o diâmetro de poro foi estimado a  $42 \text{ \AA}$ , que é um valor compatível com o tamanho dos agregados micelares de  $\text{CTA}^+$ .

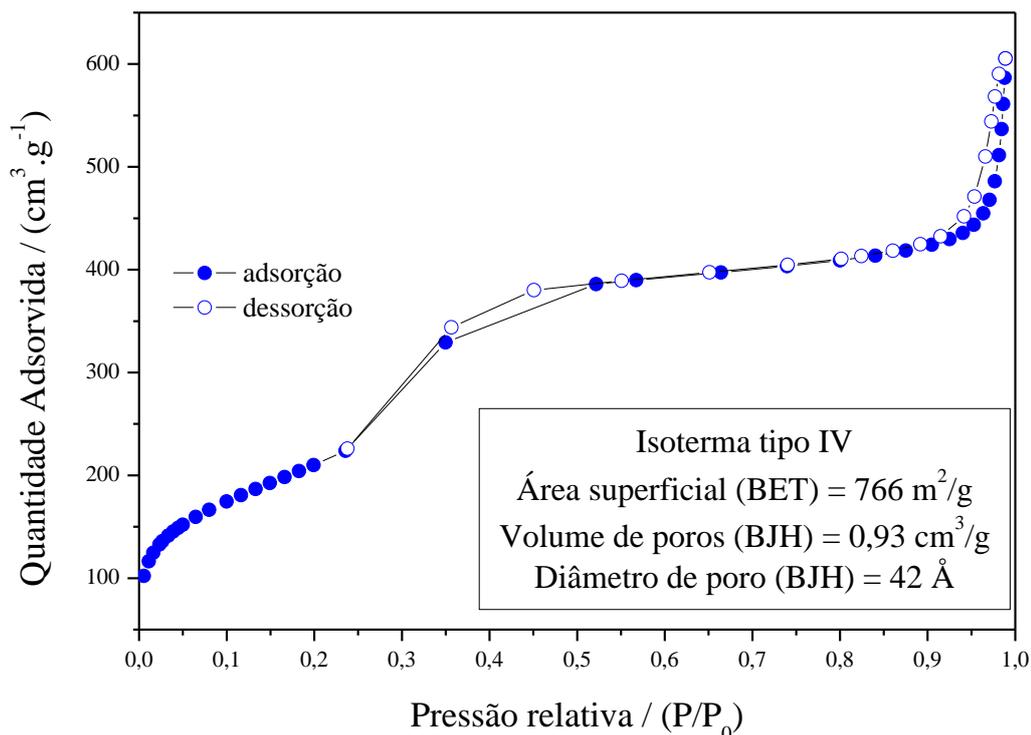


Figura 14 - Isotermas de adsorção e dessorção de  $N_2$  na NPSM.

#### 4.2. Funcionalização das nanopartículas e acoplamento da FL

##### 4.2.1. Método 1: Pós-funcionalização da NPSM com GPTMS e posterior acoplamento da FL

Uma das alternativas apresentadas para sintetizar as nanopartículas de sílica mesoporosas com propriedades fluorescentes foi através da funcionalização da NPSM com o agente sililante GPTMS, para posterior funcionalização da FL, como procedimento descrito no Método 1 da Figura 7. Assim, a superfície foi funcionalizada através da reação de silanização conforme mostrada na Figura 15.

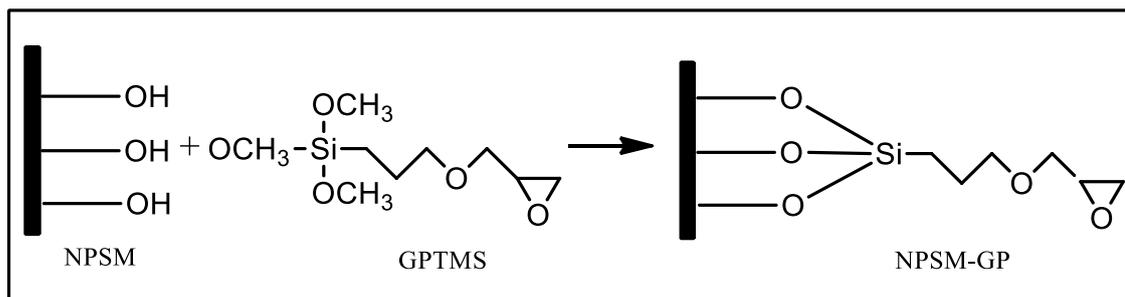


Figura 15 - Reação de funcionalização da NPSM com o agente sililante GPTMS.

#### 4.2.1.1. Caracterização do precursor NPSM-GP

A decomposição térmica da fração orgânica da molécula de GPTMS na NPSM-GP foi confirmada por ATG (Figura 16). Na NPSM-GP a quantidade de massa perdida é de 25,5 % em dois eventos distintos. No primeiro, que vai da temperatura ambiente a 209°C, ocorre a liberação de moléculas de H<sub>2</sub>O adsorvidas, sendo confirmado pela curva de liberação de H<sub>2</sub>O, mostrada na parte superior do gráfico. No segundo evento, a partir de 209°C, a decomposição térmica do GPTMS é iniciada, sendo evidenciada pelo início da liberação de CO<sub>2</sub>. Em 270°C ocorre a taxa máxima de liberação de H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> referente à decomposição térmica do GPTMS. A partir destas observações, a composição química do material foi obtida como sendo (C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>Si)<sub>0,10</sub>SiO<sub>2</sub>, o que representa 0,002 mmol de GPTMS por 1 g de NPSM. Esta análise foi fundamental para a seleção do número de mols de FL a serem adicionados ao meio reacional posteriormente.

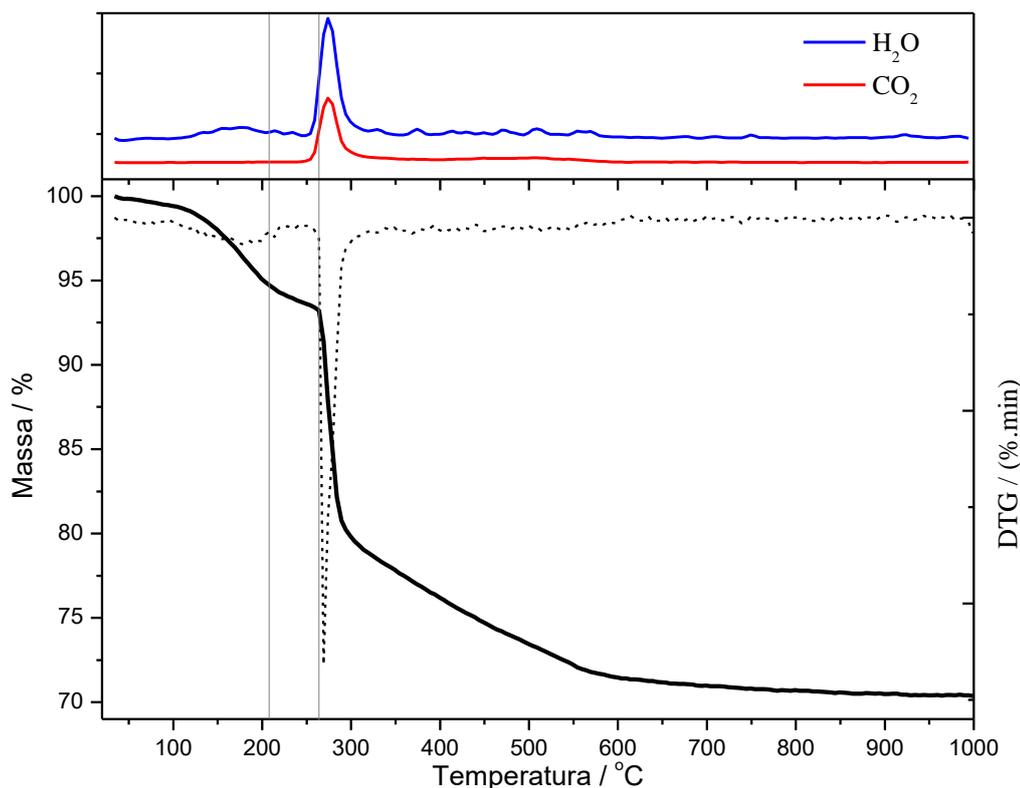


Figura 16 - Curva termogravimétrica da NPSM-GP produzida por pós-funcionalização e sua primeira derivada.

A Figura 17 apresenta os espectros de FTIR registrados da NPSM e NPSM-GP. Em destaque, encontram-se as evidências da presença de GPTMS na NPSM. O estiramento simétrico e assimétrico de  $-\text{CH}_2-$  (cadeias alquílicas) em torno de  $2940\text{ cm}^{-1}$  e  $2870\text{ cm}^{-1}$  (FONTINHA; SALTA; ZHELUDKEVICH, 2013; LEE et al., 2015). O estiramento de anel fraco da ligação C-O-C de anel epóxi entre a região de  $1230\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$ . As deformações de anel assimétrica na região de  $815\text{--}950\text{ cm}^{-1}$  e simétrica na região de  $750\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  (FONTINHA; SALTA; ZHELUDKEVICH, 2013; NETO et al., 2015). Existe também na molécula de GPTMS um segundo grupo éter (C-O-C) na porção alquílica, onde seu estiramento ocorre em  $1174\text{ cm}^{-1}$ . Ademais, na região entre  $1350\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  encontram-se bandas referentes às deformações angulares simétrica e assimétrica da ligação  $-\text{CH}_2-$  de cadeias alquílicas.

Já o estiramento referente à ligação  $\text{Si-O-CH}_3$  é caracterizado por uma banda intensa em  $2100\text{ cm}^{-1}$  e uma de intensidade mais fraca em aproximadamente  $1200\text{ cm}^{-1}$  (LEE et al., 2015; ŠAPIČ et al., 2014), as quais não são observadas neste espectro, como o esperado, comprovando que a funcionalização ocorreu através dos grupos metóxi ( $-\text{OCH}_3$ ) à matriz da NPSM.

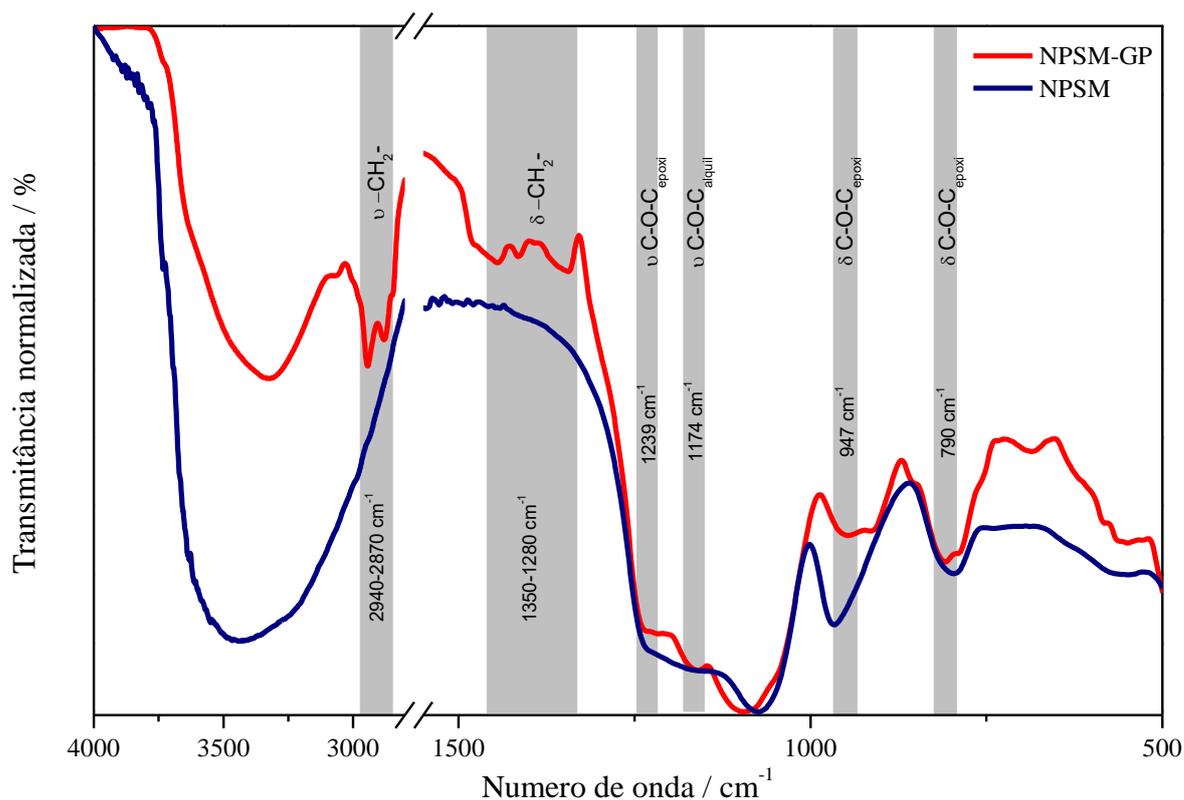


Figura 17 - Espectros de FTIR da NPSM e NPSM-GP.

#### 4.2.1.2. Acoplamento da Fluoresceína na NPSM funcionalizada com GPTMS: (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> e (NPSM-GP)FL<sub>DMSO</sub>

A FL de partida foi adquirida na forma lactona, não fluorescente, a qual teve que ser transformada em uma espécie fluorescente. Em meio aquoso, a abertura do anel lactona pode ocorrer por hidrólise ácida ou básica, originando a forma ácida da fluoresceína, que é fluorescente, como mostra a Figura 18 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (GRIMM et al., 2016). Entretanto, como a reação de acoplamento da FL à NPSM-GP deve ser feita em meio não aquoso, a tentativa de abertura do anel lactona foi realizada pela adição do ácido orgânico TsOH ao meio reacional.

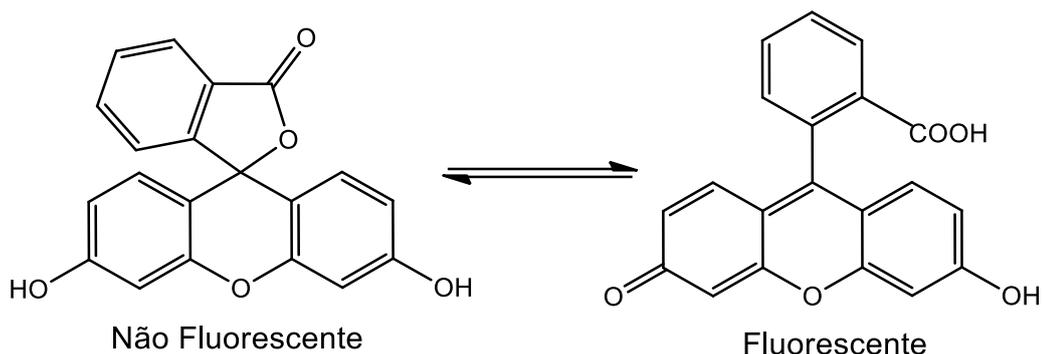


Figura 18 - Equilíbrio das espécies de fluoresceína na sua forma lactona (não fluorescente com anel fechado) e ácido carboxílico (fluorescente com anel aberto).

Em meio aquoso a abertura do anel epóxi é catalisada por ácido ou base e pode resultar na adição da água formando um álcool. A proposta estudada neste projeto envolveu a reação em meio não aquoso do grupo ácido carboxílico presente na FL com o anel epóxi presente na NPSM-GP formando assim, uma ligação covalente éster que une as espécies (Figura 19), da mesma forma como já foi realizado com o fármaco ibuprofeno (TOURNE-PETEILH et al., 2003).

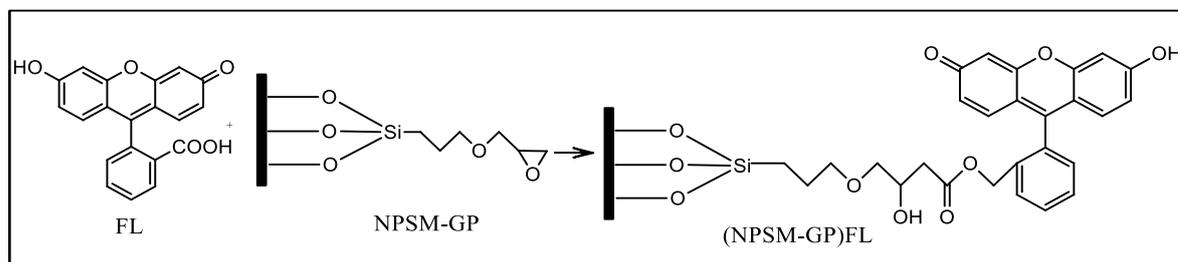


Figura 19 - Reação de esterificação entre o anel epóxi do agente sililante GPTMS e a fluoresceína em sua forma ácido carboxílico.

Os difratogramas de raios X foram registrados para a FL, (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> e seus tratamentos com os solventes acetona e DMSO, e são mostrados na Figura 20. Para nenhuma das pós-funcionalizações foi possível observar a presença do pico de difração ao redor de 2,2 graus. Em relação às intensidades destas funcionalizações, é notável que a adição de fluoresceína ao prévio material de partida NPSM-GP aumentou sua intensidade até o sólido final obtido, devido ao aumento de contraste eletrônico entre as paredes inorgânicas e os poros.

Ademais, os difratogramas de raios X informam para o presente trabalho uma característica fundamental para a eleição da NPSM com melhor propriedade fluorescente e que seja capaz de agir como sonda. Tais funcionalizações não devem resultar em

nanopartículas com FL adsorvida, ou seja, toda a FL que for detectada no material deve estar covalentemente ligada à estrutura da NPSM. Frente a esta observação, nota-se que logo após a síntese da (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> pós síntese, existia FL adsorvida em sua matriz, comprovada pelos picos a partir de 10 graus e que são característicos do difratograma da FL. Em relação às lavagens por acetona e posteriormente DMSO, afirma-se que este último solvente utilizado para tratamento reproduziu a função de remoção de toda a FL que estava adsorvida nas etapas anteriores, sendo confirmado pelo desaparecimento de picos de difração a partir de 10 graus. Tais observações indicam que o DMSO foi o solvente responsável pela eliminação total da fluoresceína não ligada covalentemente à matriz mesoporosa.

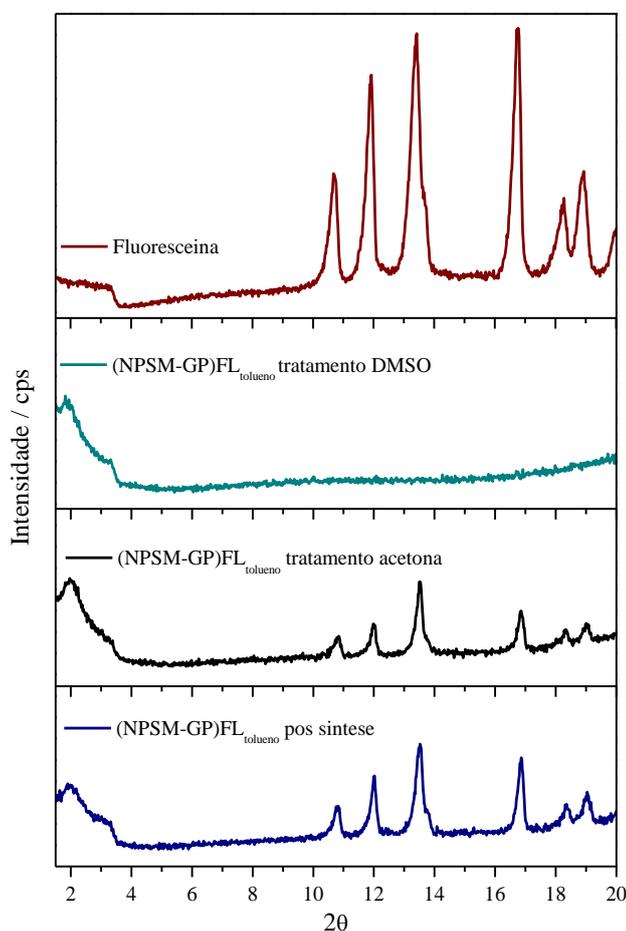


Figura 20 - Difratogramas de raios X da FL e das nanopartículas modificadas por pós-funcionalização pelo Método I: (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> e seus tratamentos com solventes.

Os espectros de FTIR também foram registrados para as NPSM modificadas via pós-funcionalização pelo Método 1, e são mostradas na Figura 21. Ambas as pós-funcionalizações partiram do mesmo precursor NPSM-GP e se diferenciam através do solvente utilizado, sendo a adição de TsOH ocorrida naquela em que se utilizou DMSO.

Ao comparar os espectros de FTIR da NPSM-GP (Figura 17) e (NPSM-GP)FL<sub>DMSO</sub> (Figura 21), nota-se uma semelhança eminente entre ambos. Para este último, o meio foi acidificado com TsOH para auxiliar a abertura do anel lactona, em meio de DMSO, e enquanto em solução, a mesma se apresentou na coloração amarelo escuro. Ao filtrar-se o meio reacional, foi observado que o filtrado encontrou-se da mesma forma colorido, e o sólido obtido no papel de filtro possuía coloração branca, similar à NPSM isolada e ao seu precursor NPSM-GP. Dessa forma, pode ser inferido que o DMSO, assim como na última etapa de tratamento da (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> (Figura 20) retirou junto a si toda a fluoresceína do meio reacional, afirmando novamente que a interação da estrutura da fluoresceína com o solvente aprótico DMSO é muito forte, sendo a (NPSM-GP)FL<sub>DMSO</sub> excluída dentre as NPSM com potencial propriedade fluorescente.

A diferença mais eminente entre as funcionalizações pelo Método 1 encontra-se na banda destacada em aproximadamente  $1410\text{ cm}^{-1}$ , que apresenta-se mais forte quando em DMSO e que pode ser atribuída como a deformação angular da ligação  $-\text{CH}_2-$  de cadeias alquílicas. Além disso, destaca-se o estiramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$  de ésteres, evidenciada para a (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> em aproximadamente  $1730\text{ cm}^{-1}$ , indicando a possível formação da ligação éster após o acoplamento da FL ao precursor NPSM-GP.

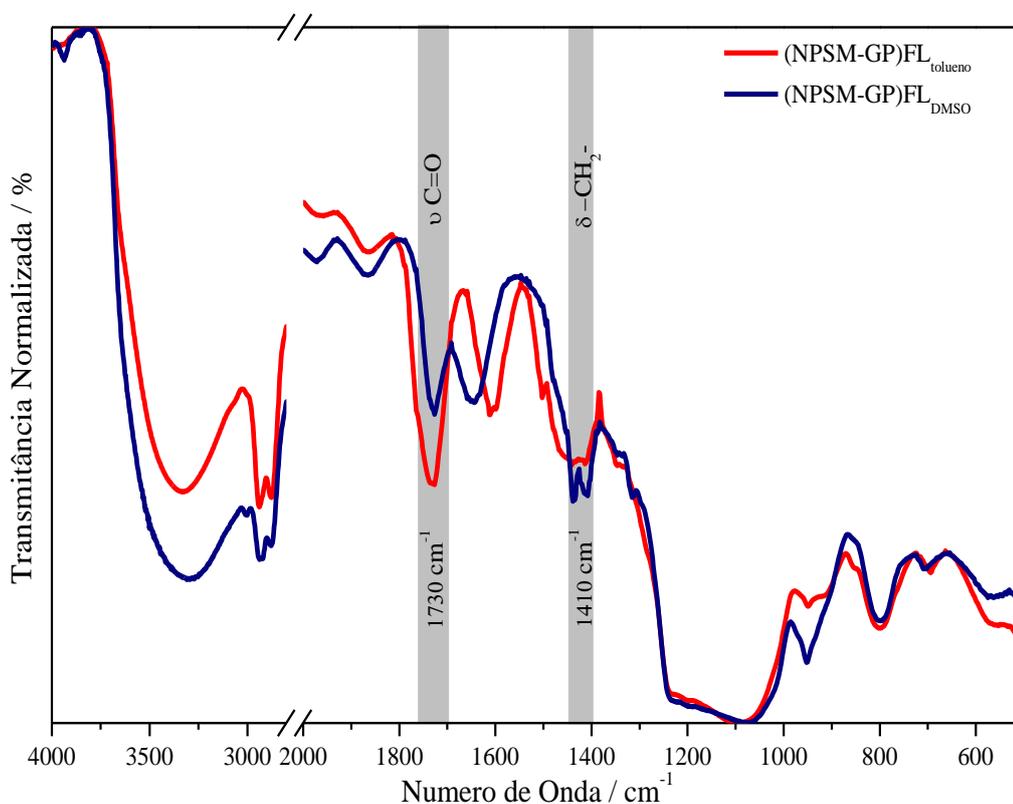


Figura 21 - Espectros de FTIR da (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> e (NPSM-GP)FL<sub>DMSO</sub>.

#### **4.2.2. Método 2: Funcionalização utilizando o GPTMS pré-modificado com fluoresceína e posterior acoplamento da NPSM**

Outra rota avaliada para sintetizar as nanopartículas de sílica mesoporosas fluorescentes foi através da pré-modificação do agente sililante GPTMS com a fluoresceína para posterior funcionalização da NPSM ou via síntese direta por co-condensação, conforme procedimento descrito nas Etapas IV, V, VI e VII da Figura 9.

##### **4.2.2.1. Caracterização do silano pré-modificado GPTMS-FL**

A reação química de modificação do agente sililante envolve uma reação de abertura do anel epóxi do GPTMS pelo grupo ácido carboxílico da molécula de fluoresceína na forma ácida, conforme mostrado na Figura 19. Para preservar os grupos metoxisilano  $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si-R}$  necessários ao posterior acoplamento à estrutura inorgânica, a reação deve ser realizada em solventes adequados e anidros. Esta reação foi também avaliada na presença de TsOH, entretanto, devido à complicações para o isolamento do material, os resultados da caracterização apresentado serão daquele sintetizado através da Etapa IV, isento da adição de TsOH.

A Figura 22 apresenta o difratograma de raios X do silano pré-modificado GPTMS-FL isolado do meio reacional. Na região de alto ângulo, um halo referente a materiais amorfos ao redor de 20 graus indicaria que houve a condensação entre os grupos metóxi da estrutura  $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$  no GPTMS-FL, porém este halo não é observado. Ademais, nota-se que os picos de difração observados a partir de 10 graus, em comparação com a FL (Figura 20) são idênticos. Isso provavelmente é uma indicação de que sobrou FL sem reagir (ou dissolver no meio reacional), mesmo usando uma relação molar de 1 : 1 na reação de pré-modificação do GPTMS.

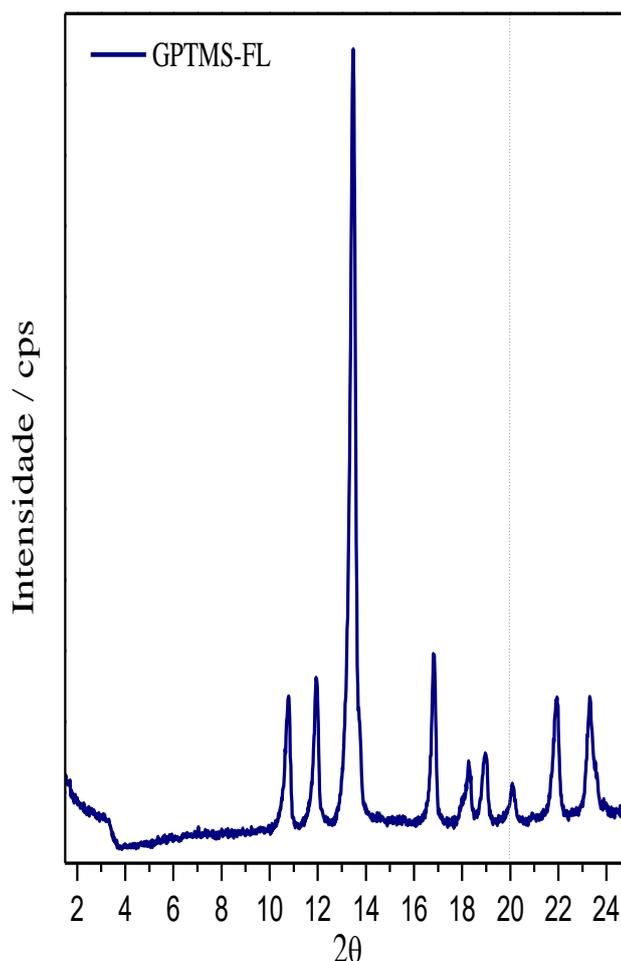


Figura 22 - Difratoograma de raios X de GPTMS-FL.

A Figura 23 apresenta os espectros de FTIR registrados para o GPTMS e GPTMS-FL sem adição de TsOH. A molécula de GPTMS possui bandas características que após a reação de esterificação, segundo a literatura (FONTINHA; SALTA; ZHELUDKEVICH, 2013), seu desaparecimento ou perda de intensidade servem de monitoramento da abertura do anel epóxi. Estas bandas referem-se ao estiramento assimétrico da ligação C-H de epóxi em aproximadamente  $3057\text{ cm}^{-1}$  e o simétrico em  $2999\text{ cm}^{-1}$  que não são observadas no espectro, como o esperado. A banda em  $1255\text{ cm}^{-1}$  representa o modo de respiração do anel, que também não consta nesta região e a deformação angular assimétrica do anel epóxi em  $907\text{ cm}^{-1}$  e simétrica em  $851\text{ cm}^{-1}$  que também não foram detectadas no devido espectro (FONTINHA; SALTA; ZHELUDKEVICH, 2013).

Além disso, é importante confirmar o não aparecimento das bandas referente à ligação siloxano (Si-O-Si) no GPTMS-FL, cujo estiramento ocorre em  $1093\text{ cm}^{-1}$  e  $1238\text{ cm}^{-1}$  e a deformação angular em  $799\text{ cm}^{-1}$ . Conforme também destacado no espectro da Figura 23, tais

regiões não remetem nenhuma banda como o esperado, indicando que a pré-modificação do agente sililante por fluoresceína não gerou condensação dos grupos metóxi.

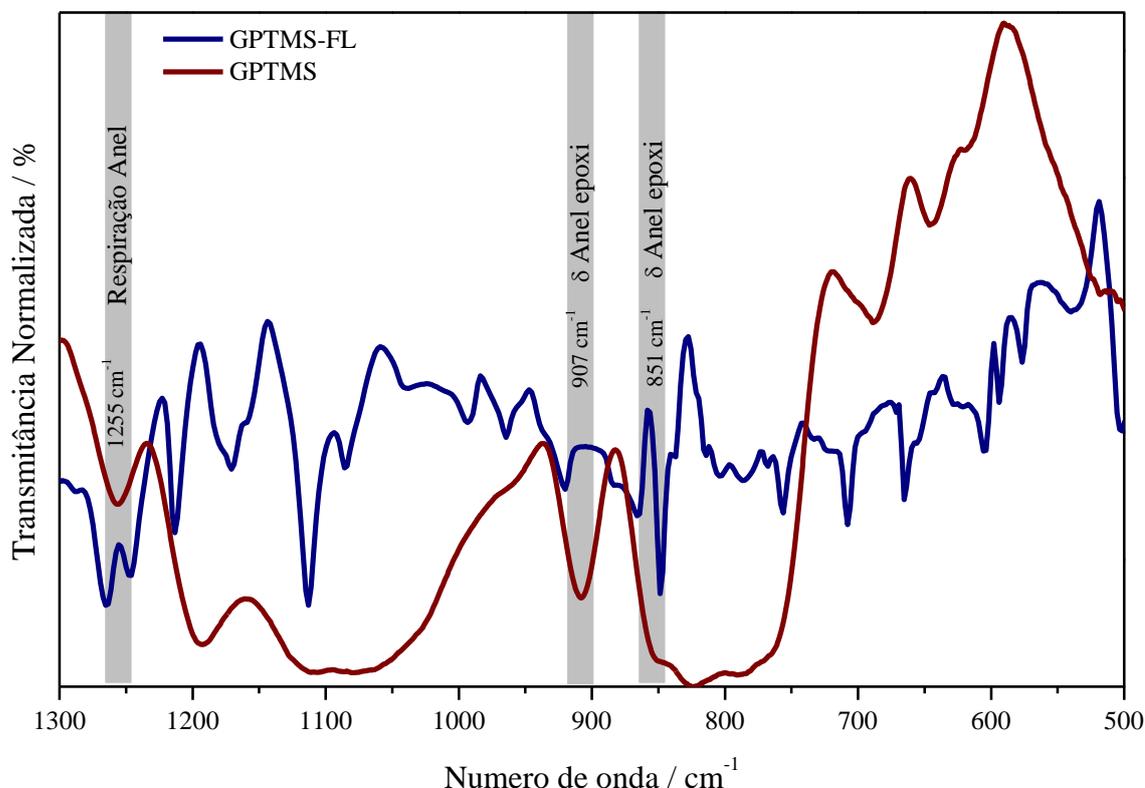


Figura 23 - Espectros de FTIR para o GPTMS e GPTMS-FL.

#### 4.2.2.2. Nanopartículas produzidas por pós-funcionalização com GPTMS-FL: NPSM(GP-FL)

Os difratogramas de raios X foram registrados para a NPSM(GP-FL)<sub>pós síntese</sub> e NPSM(GP-FL), e são mostrados na Figura 24. Primeiramente, é possível observar que o pico de difração observado ao redor de 2,2 graus para a NPSM (Figura 10) é também observado para a pós-funcionalização, fato que atesta a síntese de nanopartículas parcialmente ordenadas. Ao funcionalizar a NPSM com o precursor GPTMS-FL, observa-se que houve um ganho de intensidade, resultado do aumento de contraste eletrônico entre as paredes inorgânicas e os poros. Observando os picos de difração da FL (Figura 20), nota-se que existem picos a partir de  $2\theta$  igual a 10 graus para ambas as NPSM funcionalizadas. Tais picos referem-se a padrões da molécula de FL, indicando que já no procedimento de pré-modificação do agente sililante houve resquícios de FL comprovados no GPTMS-FL (Figura 22) e que ao inseri-lo junto à NPSM, mesmo que a reação de esterificação tenha ocorrido, é possível afirmar que existe FL que não foi covalentemente ligada, sendo potencialmente

herdada deste precursor. Etapas de purificação foram realizadas para a remoção da fluoresceína utilizando acetona, um solvente em que a mesma se apresenta muito solúvel, mas que não foi eficaz na retirada do fluoróforo não ligado à estrutura em nenhuma das etapas, fato este também observado no tratamento de  $(\text{NPSM-GP})\text{FL}_{\text{tolueno}}$  por acetona (Figura 20).

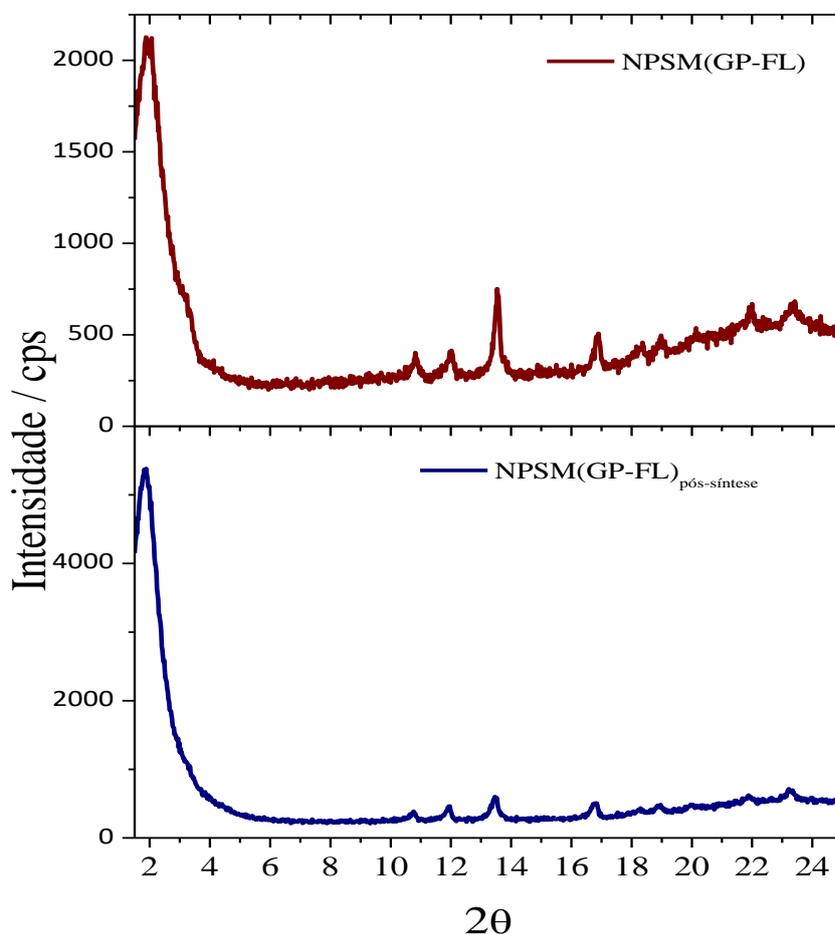


Figura 24 - Difratogramas de raios X das nanopartículas modificadas por pós-funcionalização pelo Método II,  $(\text{NPSM(GP-FL)})_{\text{pós-síntese}}$  e  $(\text{NPSM(GP-FL)})$ .

A Figura 25 apresenta os espectros de FTIR registrados para a pós-funcionalização pelo Método II, incluindo sua etapa logo após a síntese e seu tratamento com acetona. A região em destaque representa a banda referente ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  de ligação éster, evidenciando que apesar de existir FL livre comprovada, é possível que a ligação éster tenha ocorrido entre o agente sililante e a FL. Logo após adição de NPSM ao precursor  $\text{GPTMS-FL}$ , a  $(\text{NPSM(GP-FL)})_{\text{pós-síntese}}$  apresenta este estiramento em  $1695\text{ cm}^{-1}$ . Quando este sólido foi tratado com acetona, para eliminar a FL residual (adsorvida), a  $(\text{NPSM(GP-FL)})_{\text{tratamento}}$  apresentou um deslocamento desta banda para uma região de maior frequência ( $1714\text{ cm}^{-1}$ ), conjuntamente com seu alargamento. A  $(\text{NPSM(GP-FL)})$  apresentou uma banda em  $1708\text{ cm}^{-1}$  também com o

mesmo alargamento, confirmando que apesar de não retirar a FL adsorvida, as etapas de tratamento com acetona resultaram em poucas mudanças nas propriedades estruturais dos compostos em questão.

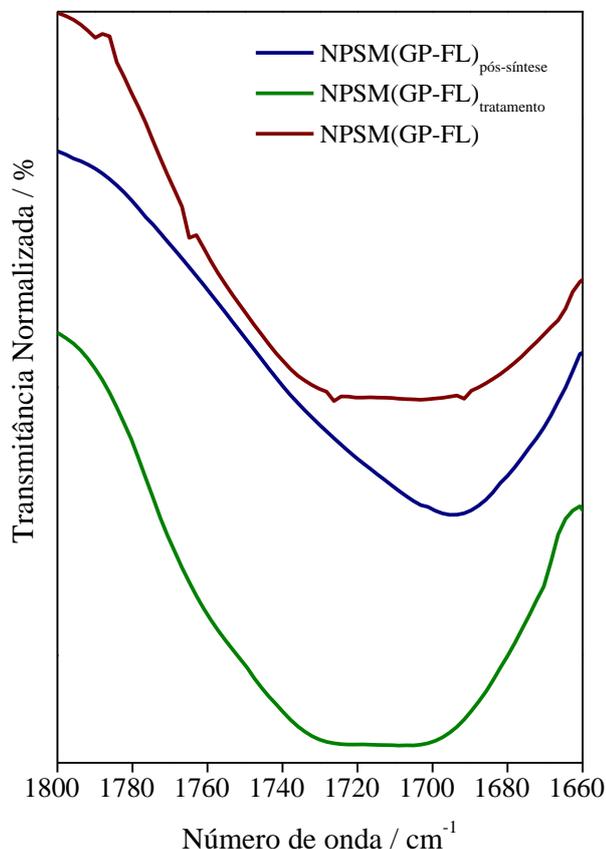


Figura 25 - Espectros de FTIR da região da banda referente ao estiramento do grupo carbonila (C=O) da sílica pós-funcionalizada NPSM(GP-FL) e das amostras pós-síntese e após tratamento com acetona.

#### 4.2.2.3. Nanopartículas produzidas por co-condensação utilizando o GPTMS-FL: CTA@NPSM(GP-FL)

Os difratogramas de raios X registrados das nanopartículas obtidas por síntese direta CTA@NPSM(GP-FL) e partícula densa NPS(GP-FL) são mostrados na Figura 26. É possível observar que a funcionalização via co-condensação não possui seus poros ordenados, uma vez que não apresenta o pico de difração característico para tal ordenamento parcial ao redor de 2,2 graus, indicando que tal procedimento de síntese impacta na ordenação dos poros, diferentemente do obtido para a NPSM(GP-FL). Estudos realizados (MO; BEIN, 2017) confirmam o resultado esperado da ausência de ordenamento via síntese direta.

Apesar disso, a característica mais relevante para o presente trabalho é o fato de o composto não apresentar demais picos de difração a partir de  $2\theta$  igual a 10 graus, indicando que esta funcionalização não apresentou fluoresceína adsorvida, ou seja, a coloração amarelado-claro do material diz respeito apenas à fluoresceína covalentemente ligada. Esta, quando comparada à nanopartícula densa, confirma a influência do direcionador estrutural CTAB, uma vez que nenhum pico de difração é observado para a partícula densa, como o esperado, uma vez que é um material não mesoestruturado. Além disso, a NPS(GP-FL) não apresenta picos a partir de 10 graus, indicando a ausência de FL adsorvida em sua estrutura, confirmando que no processo de hidrólise de sua formação, a FL presente no meio reacional foi incorporada na parte interna da nanopartícula.

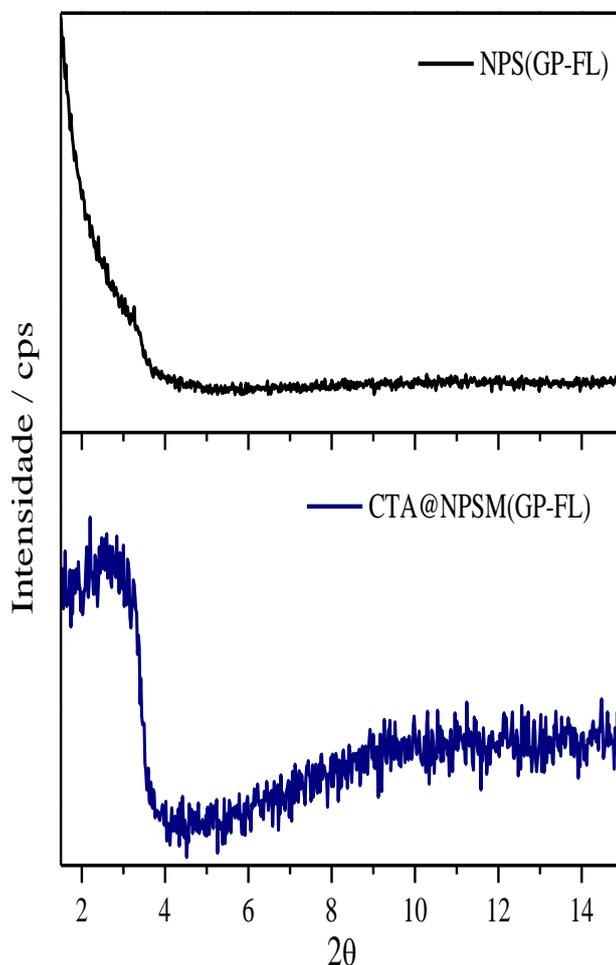


Figura 26 - Difratogramas de raios X dos sólidos obtidos após a funcionalização via síntese direta CTA@NPSM(GP-FL) e nanopartícula de sílica densa NPS(GP-FL).

A Figura 27 apresenta os espectros de FTIR registrados para a nanopartícula funcionalizada via co-condensação e partícula densa para fins de comparação. As principais bandas que atestam a presença do direcionador estrutural CTAB ocorrem em  $2926\text{ cm}^{-1}$  e

2851  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C-H da cadeia alquílica e em 1473  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação angular da ligação C-H, bandas estas que não são observadas para a NPS(GP-FL), como o esperado, pois não possuem uma estrutura mesoporosa devido à ausência do molde. A banda em 3639  $\text{cm}^{-1}$  é característica forte de grupos silanóis superficiais ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ) envolvidos em interações eletrostáticas com a porção polar das micelas de surfactante, confirmando que a co-condensação foi realizada com êxito (SHEN; WU, 2003; URATA et al., 2009). Por fim, a banda característica na região de 1726  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação C=O, evidenciando que a ligação éster pode ter ocorrido e a FL encontra-se covalentemente ligada à matriz mesoporosa.

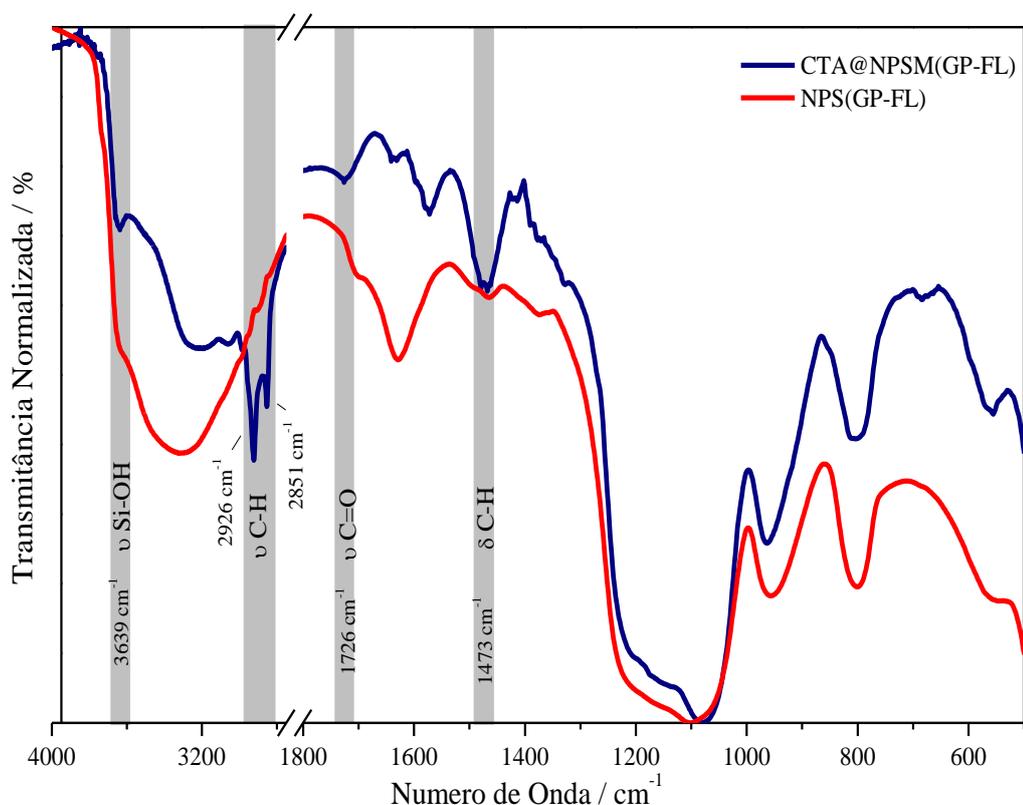


Figura 27 - Espectros de FTIR da CTA@NPSM(GP-FL) produzida por síntese direta e da partícula de sílica densa NPS(GP-FL).

#### 4.3. Propriedades Espectroscópicas das NPSM funcionalizadas

A verificação do comportamento da FL baseia-se em diferentes variáveis a qual é dependente, sendo abordado neste estudo, o solvente e pH do meio, que se estendeu também para as NPSM funcionalizadas. Salienta-se que a análise das diferentes espécies de fluoresceína por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível é complexa devido às

extensas bandas espectrais sobrepostas, justificando o crescente número de estudos (BATISTELA et al., 2010) realizados para o entendimento destes equilíbrios.

#### 4.3.1. Propriedades Espectroscópicas em Meio Aquoso

A FL apresenta um equilíbrio complexo de protonação e desprotonação onde em meio aquoso envolvem sete espécies conhecidas, conforme mostrado na Figura 28: As espécies catiônica ( $FH_3^+$ ) e diânion ( $F^{2-}$ ) são as formas prevalentes em pH extremo, sendo a primeira em pH baixo e a segunda em pH alto ou neutro. À medida que ocorre a diminuição do pH, a protonação leva ao monoânion ( $FH^-$ ), que existe como dois possíveis tautômeros, o carboxilato e o fenolato. Uma subsequente diminuição do pH produz a forma neutra ( $FH_2$ ), que exibe três estruturas possíveis, designadas de lactona, zwitteriônica e quinóide (BATISTELA et al., 2010).

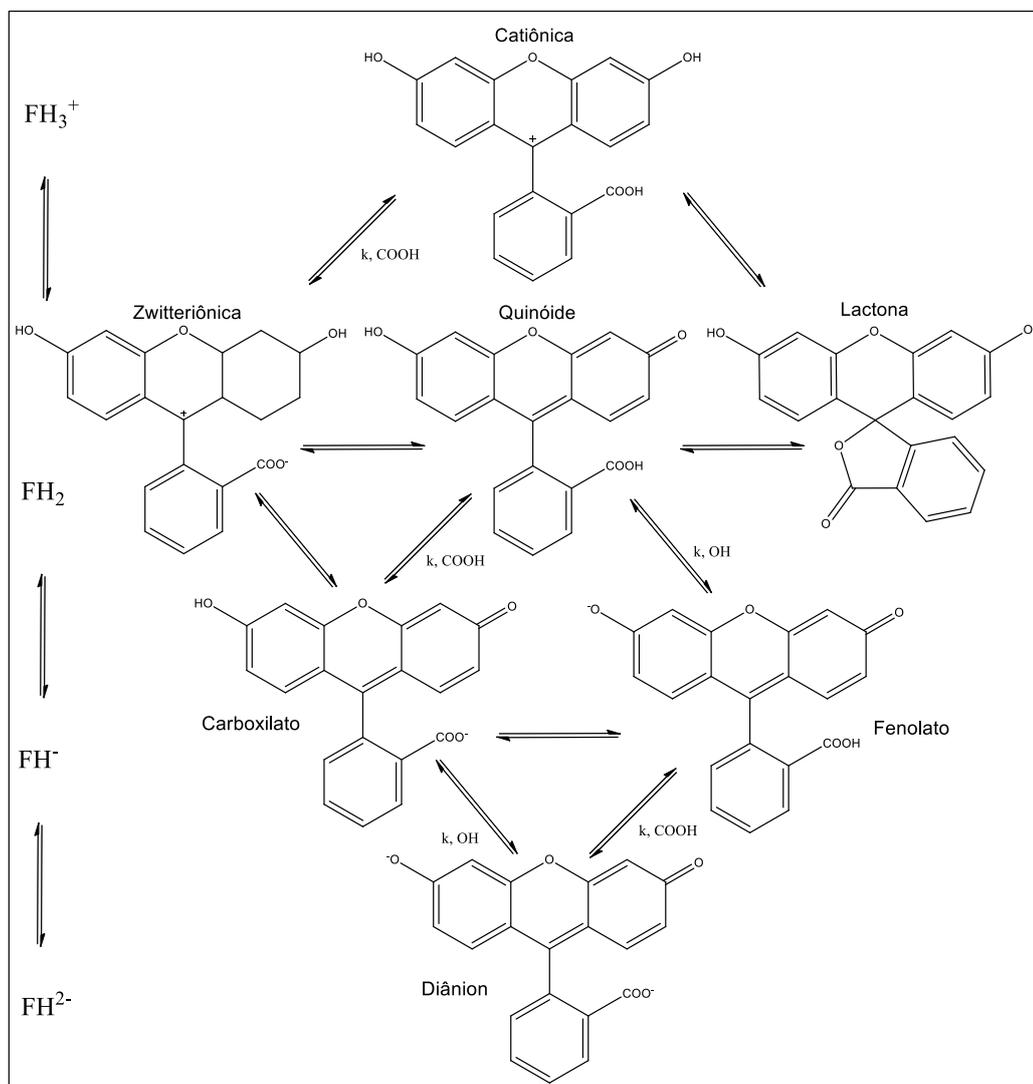


Figura 28 - Equilíbrios de protonação e desprotonação da fluoresceína. Figura adaptada de (NADERI; FARAJTABAR; GHARIB, 2014).

Tais características da FL também foram detectadas quando imobilizada nas NPSM. A coloração dos compostos preparados não foi a mesma, como mostrado na Figura 29, demonstrando que o método sintético adotado alterou as propriedades espectroscópicas. A coloração observada na NPSM(GP-FL) é parecida com a da FL pura, causada pela presença de FL sólida residual, como já descrito anteriormente. A coloração das outras nanopartículas é mais clara e, também, relativamente diferentes entre si, como pode ser observado nos espectros de reflectância difusa (RD) registrados na Figura 30.

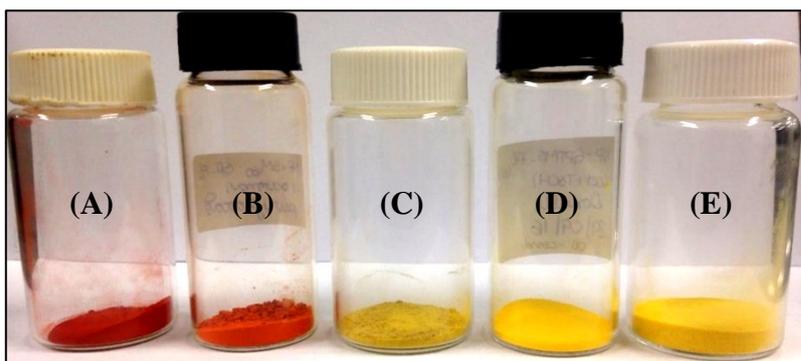


Figura 29 - Fotografias das nanopartículas de sílica com fluoresceína mostrando a diferença de coloração. (A) FL, (B) NPSM(GP-FL), (C) (NPSM-GP)FL, (D) CTA@NPSM(GP-FL) e (E) NPS(GP-FL).

Como a reflectância é inversamente proporcional à absorbância, os espectros são invertidos, isto é, valores maiores de reflectância correspondem a uma menor absorbância. Observa-se nos espectros registrados (Figura 30) que a absorbância é grande na região do violeta e azul, sendo menor na região do amarelo-vermelho.

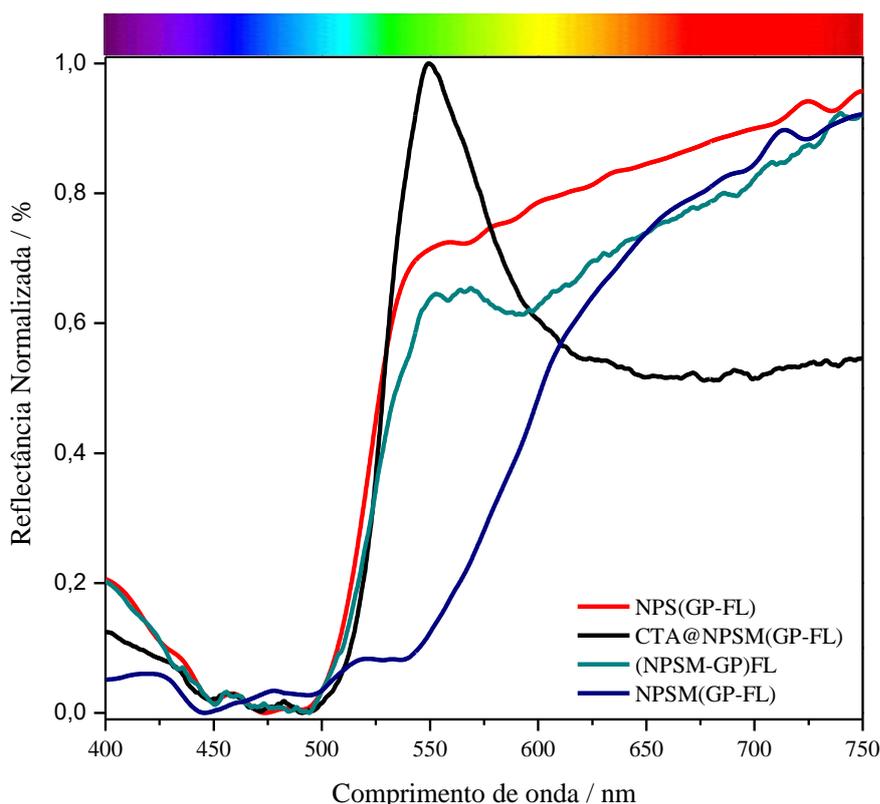


Figura 30 - Espectros de RD das nanopartículas de sílica funcionalizadas com fluoresceína.

Os efeitos das condições de pH nas propriedades espectroscópicas dos compostos preparados foram avaliados. Os espectros de absorção da solução de FL em diferentes pH são mostrados na Figura 31. Em pH ácido, a espécie predominante em equilíbrio é a catiônica, através das sucessivas protonações que o meio com íons  $H^+$  proporciona, e sua predominância segundo estudos já realizados (BATISTELA et al., 2010; BHAGI et al., 2013) é caracterizada por uma banda centrada em 437 nm. Já no presente trabalho, nota-se um máximo de absorção em 464 nm. Outro aspecto a ser considerado para esta solução é a presença de precipitado depositado, sendo um indicativo de que a FL não se apresentou solúvel, fato este justificado por ainda estar em uma forma neutra, provavelmente a original lactona, dificultando assim sua solubilidade no meio. Este precipitado é um indicativo de que a acidificação do meio não foi suficiente para deslocar o equilíbrio da forma lactona para a catiônica.

Em contrapartida, para o pH 7, estudos demonstram que a determinação dos equilíbrios da fluoresceína em pH neutro é considerada dificultada ou até impossível de determinar, uma vez que as espécies intermediárias presentes nesta solução apresentam uma extensa sobreposição de bandas, tornando a verificação dependente de métodos computacionais e quimiométricos (BATISTELA et al., 2010). Em água pura, de acordo com a

literatura, a FL apresenta um máximo de absorção em 490 nm e já foi reportado também como sendo este máximo em 494 nm (TATAR; KACIK; TARJANYI, 2016), que pode ser atribuído à transição eletrônica a partir do estado fundamental ( $S_0$ ) ao primeiro estado excitado ( $S_1$ ). É reportado também um ombro em aproximadamente 470 nm, atribuído à transição do estado fundamental ( $S_0$ ) para o segundo estado singlete excitado ( $S_2$ ). Para a FL pura no presente trabalho, foi observado um máximo de absorção em 487 nm, sem a presença do ombro em 470 nm, ou seja, o aumento do pH para a FL deslocou o máximo de absorção para um maior comprimento de onda. Além disso, observa-se que quando o pH é aumentado de 5 para 7, a FL se transforma em uma espécie mais carregada do que a lactona, tornando-se mais solúvel, fato comprovado pela coloração amarela da solução, podendo existir como a espécie diânion.

Já em condições alcalinas, a fluoresceína se apresenta majoritariamente na forma diânion, exibindo como característica um máximo de absorção em 490 nm (MCQUEEN et al., 2010), e experimentalmente neste trabalho, foi detectado um máximo de absorção em 487 nm e solução colorida. Observa-se que conforme aumento do pH de 7 para 9, não houve deslocamento do máximo de absorção ou mudança da coloração da solução, indicando que um maior número de espécies  $^-OH$  não possuíram mais influência na mudança da espécie da FL, fato este que apenas foi comprovado quando o pH foi alterado de 5 para 7. Apesar de não serem encontradas diferenças entre o meio neutro e básico, ainda afirma-se que a espécie da FL predominante em ambas as soluções já não é mais a espécie lactona, afirmando a possibilidade da existência da espécie diânion.

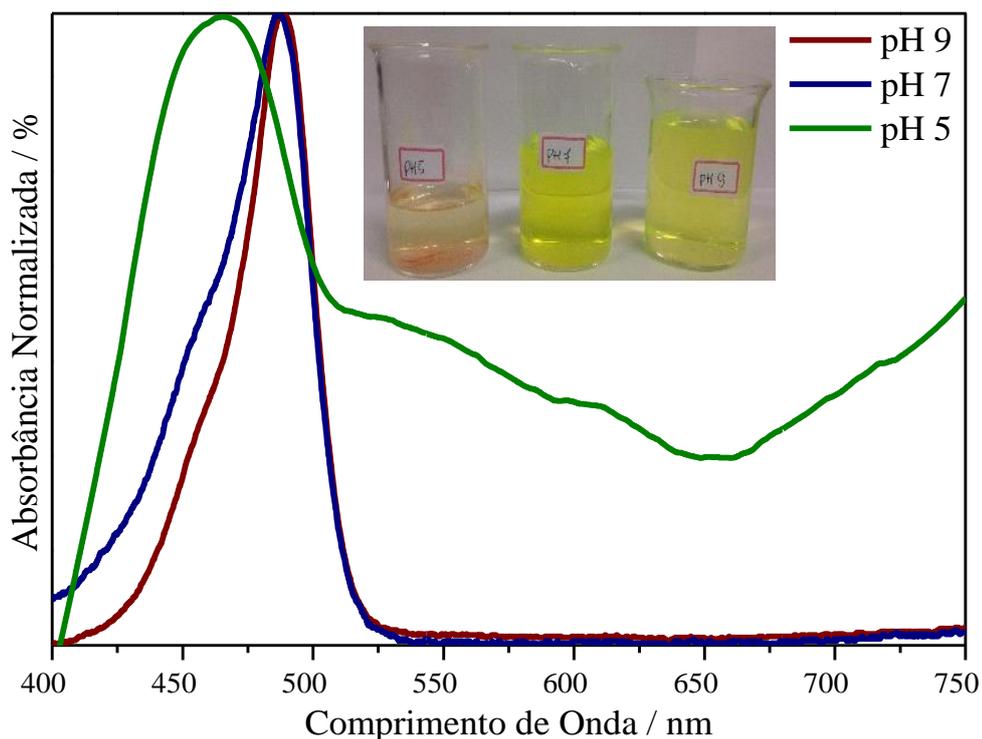


Figura 31 - Espectros eletrônicos de absorção da solução de FL em pH 5, 7 e 9.

Os espectros de absorbância da dispersão de CTA@NPSM(GP-FL) em diferentes pH são mostrados na Figura 32. É possível observar que assim como a solução de FL, existe precipitado depositado em pH 5, indicando que possivelmente a FL existe como uma espécie neutra, sendo seu máximo de absorção determinado em 503 nm. O aumento do pH resultou em uma dispersão neutra, a qual não foi observado mudanças na absorção, que se manteve em 503 nm. A presença de precipitado em pH 7 indica que a alcalinização da dispersão não foi capaz de modificar a espécie da FL. Quando aumenta-se o pH para 9, é notável um pequeno deslocamento para um maior comprimento de onda, 509 nm, porém ainda apresentando precipitados depositados. Assim, apesar de a CTA@NPSM(GP-FL) apresentar máximos de absorções maiores do que a FL em solução (Figura 31), é evidente que as propriedades espectrais da FL quando funcionalizada através da síntese direta sofrem modificações muito singelas de acordo com ajustes realizados no meio, não sendo esta característica considerada viável para a aplicação como sonda, além de a presença de precipitado em todos os pH corroborarem para a não alteração da forma neutra, indicando uma possível ausência de fluorescência para esta NPSM.

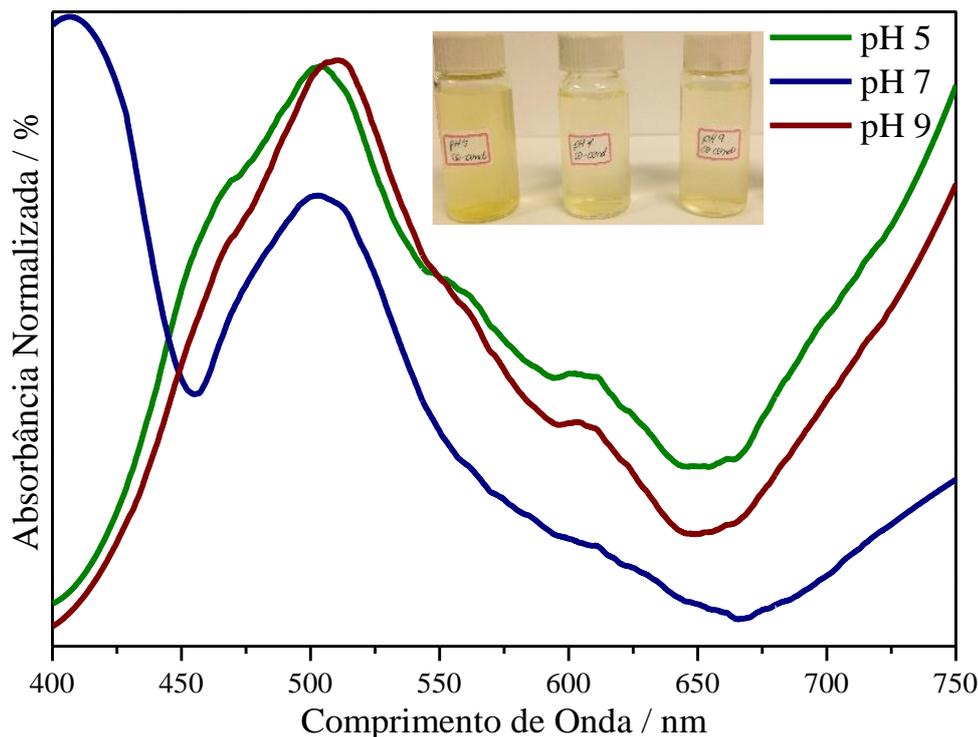


Figura 32 – Espectros eletrônicos de absorção da dispersão de CTA@NPSM(GP-FL) em pH 5, 7 e 9.

Os espectros de absorbância das dispersões de (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> em diferentes pH são mostrados na Figura 33. Assim como a solução de FL em pH 5, a dispersão de (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> apresenta precipitado depositado, indicando a presença de uma espécie neutra, apesar de seu máximo de absorção estar em um comprimento de onda menor, 406 nm. Já em meio neutro e básico, apresentam máximos de absorção em 483 e 487 nm respectivamente, indicando que a mudança para o meio neutro resulta em uma resposta de modificação na propriedade espectral, porém da forma neutra para a básica, a adição de íons OH<sup>-</sup> no meio quase não altera tal propriedade. Vale salientar que, apesar de possuírem comprimentos de onda parecidos com a solução da FL em pH 5 e 7, ainda apresentam precipitado e pouca mudança na coloração da dispersão é observada, sendo provável que tal solução não apresente fluorescência.

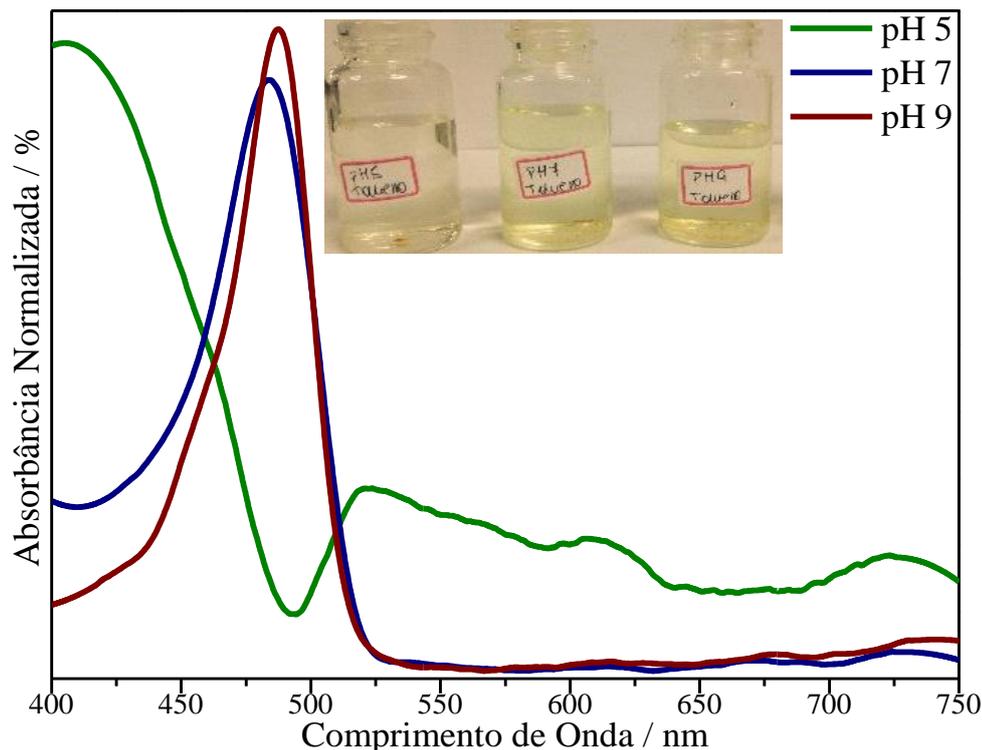


Figura 33 – Espectros eletrônicos de absorção da dispersão de (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> em pH 5, 7 e 9.

As dispersões da NPS(GP-FL) em diferentes pH é reportada na Figura 34. Para pH 5 apresenta um máximo de absorção em 487 nm, assim como a solução de FL (Figura 31). Quando a dispersão é modificada para meio neutro, seu máximo de absorção é deslocado para um comprimento de onda menor, 467 nm, e aumentando o pH para 9, seu comportamento volta a se repetir como em pH 5, porém nenhuma das modificações fez com que ocorresse mudança na coloração, uma vez que o precipitado ainda é encontrado. Por se tratar de uma nanopartícula densa, a presença de precipitado e, conseqüentemente inalteração da coloração conforme mudança no meio indica que devido ao processo de hidrólise de sua formação, a FL encontra-se interna à matriz de sílica, refletindo na ausência de resposta da NPS à mudança do meio, uma vez que não existe FL na superfície externa da mesma para esta modificação, sendo muito provável que não seja observado fluorescência para este composto, como esperado. Esta análise confirma a importância da utilização da nanopartícula mesoporosa como alvo de funcionalização para nanopartículas de sílica fluorescentes.

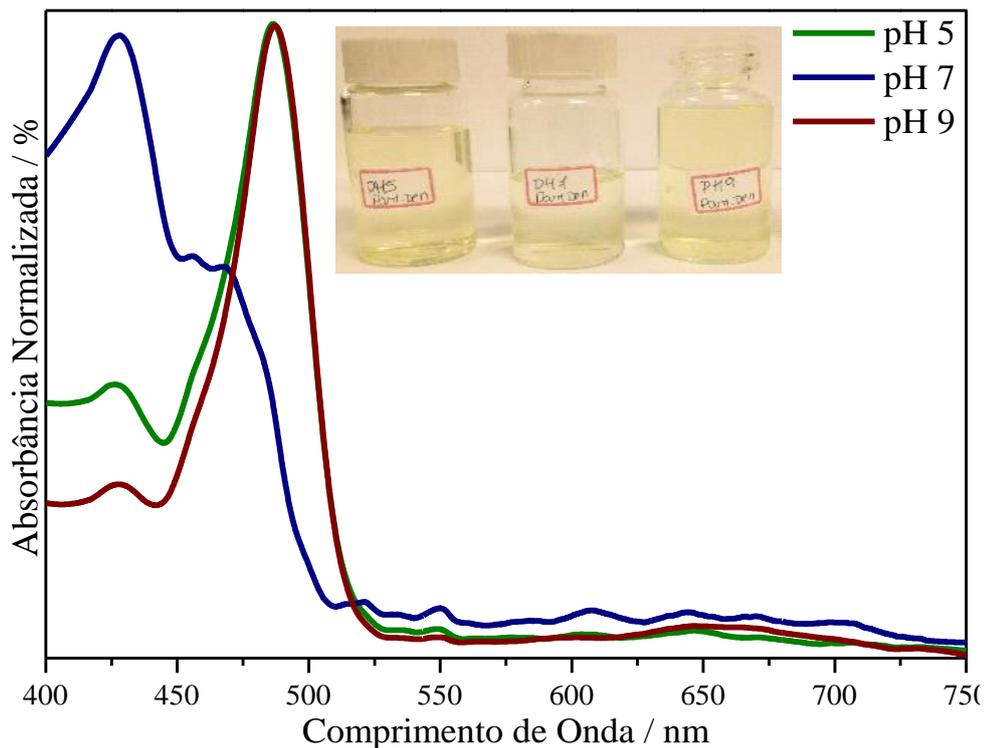


Figura 34 – Espectros eletrônicos de absorção das dispersões de NPS(GP-FL) em pH 5, 7 e 9.

Por fim, as absorvâncias relativas à NPSM(GP-FL) são reportadas na Figura 35. É perceptível que o comportamento desta dispersão é idêntico ao da solução de FL em sua forma pura. Tal comportamento refere-se ao seu precursor GPTMS-FL e a própria NPSM(GP-FL) possuírem FL adsorvida em sua estrutura, levando-a a apresentar exatamente a mesma coloração e máximos de absorção que a FL pura (Figura 31).

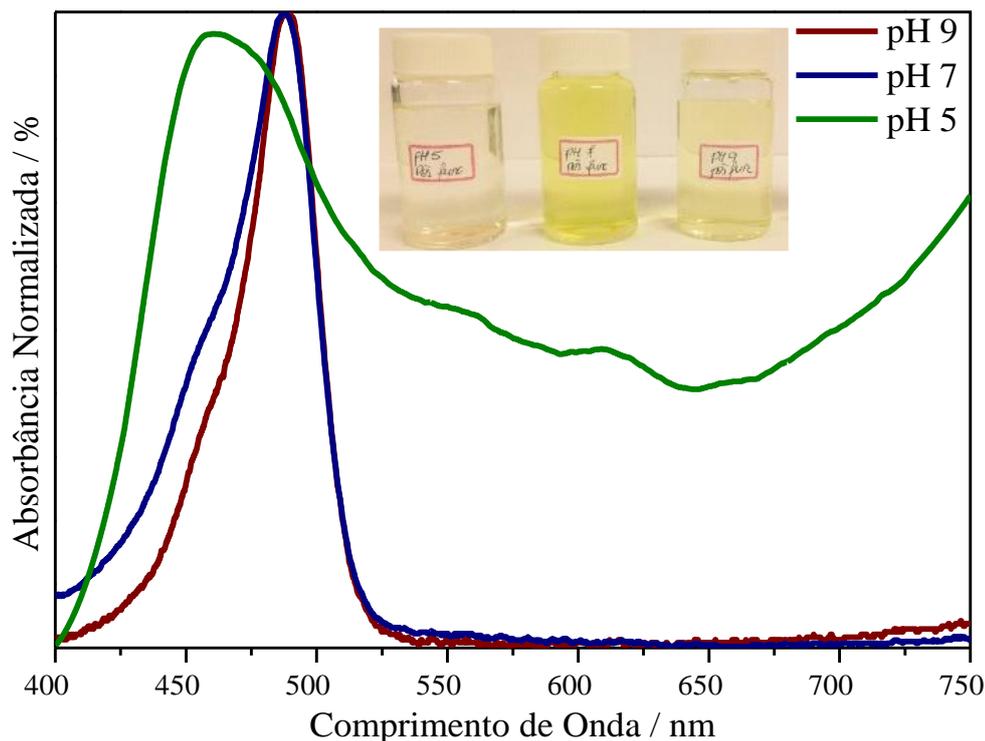


Figura 35 – Espectros eletrônicos de absorção da dispersão de NPSM(GP-FL) em pH 5, 7 e 9.

O estudo de fluorescência foi realizado para todas as soluções de FL e dispersões de NPSM funcionalizadas acima citados, e tais respostas são mostradas na Figura 36. Ao executar cada medida de fluorescência, foi possível observar que apenas àquelas que apresentaram mudança em sua coloração, bem como comprimentos de onda similares à FL, que apresentaram fluorescência: são elas a (A) solução de FL em pH 7 e 9, bem como as (B) dispersões de GPTMS-FL e NPSM(GP-FL) também em pH 7 e 9, todas excitadas em 487 nm e com resposta de emissão em aproximadamente 520 nm.

Fluoróforo é uma espécie que absorve fótons de uma dada energia, produzindo um estado excitado que retorna ao estado fundamental radiativamente, emitindo fótons em um comprimento de onda maior (ROYER, 1995). A excitação da fluorescência é influenciada por sua simetria molecular, sendo a espécie diânion, a menos simétrica, a mais fluorescente. Esta é a forma molecular que deve estar presente na solução de FL e dispersões de GPTMS-FL e NPSM(GP-FL) em pH 7 e 9. Já o indicativo da presença da forma neutra nas dispersões de CTA@NPSM(GP-FL) e (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub> está relacionada com a deposição das partículas (pouca estabilidade coloidal) e por não apresentarem fluorescência.

Dessa forma, tais argumentos indicam que foi possível sintetizar uma NPSM funcionalizada com FL e com propriedade fluorescente, uma vez que sua resposta varia em relação ao pH em que se encontra, mesmo que esta fluorescência esteja diretamente

relacionada à FL adsorvida à matriz inorgânica, também comprovada em seu precursor GPTMS-FL. Já para as NPSM funcionalizadas que não fluoresceram, CTA@NPSM(GP-FL) e (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub>, para ambas já foi comprovado que não existe FL adsorvida em sua matriz. Assim, pode ser inferido que caso a reação de esterificação tenha ocorrido com êxito, a fluoresceína apresenta-se covalentemente ligada à NPSM, porém não mais na forma lactona, uma vez que tal ligação evidencia a abertura do anel lactona, ou seja, a FL existente encontra-se como espécie neutra quinoide ou zwitteriônica. Ademais, supõe-se que a ausência de fluorescência pode estar atrelada tanto ao fato da ligação covalente tornar a FL ligada uma espécie não fluorescente, como de suas duas supostas espécies neutras não respondem à mudanças de pH, diferentemente da lactona.

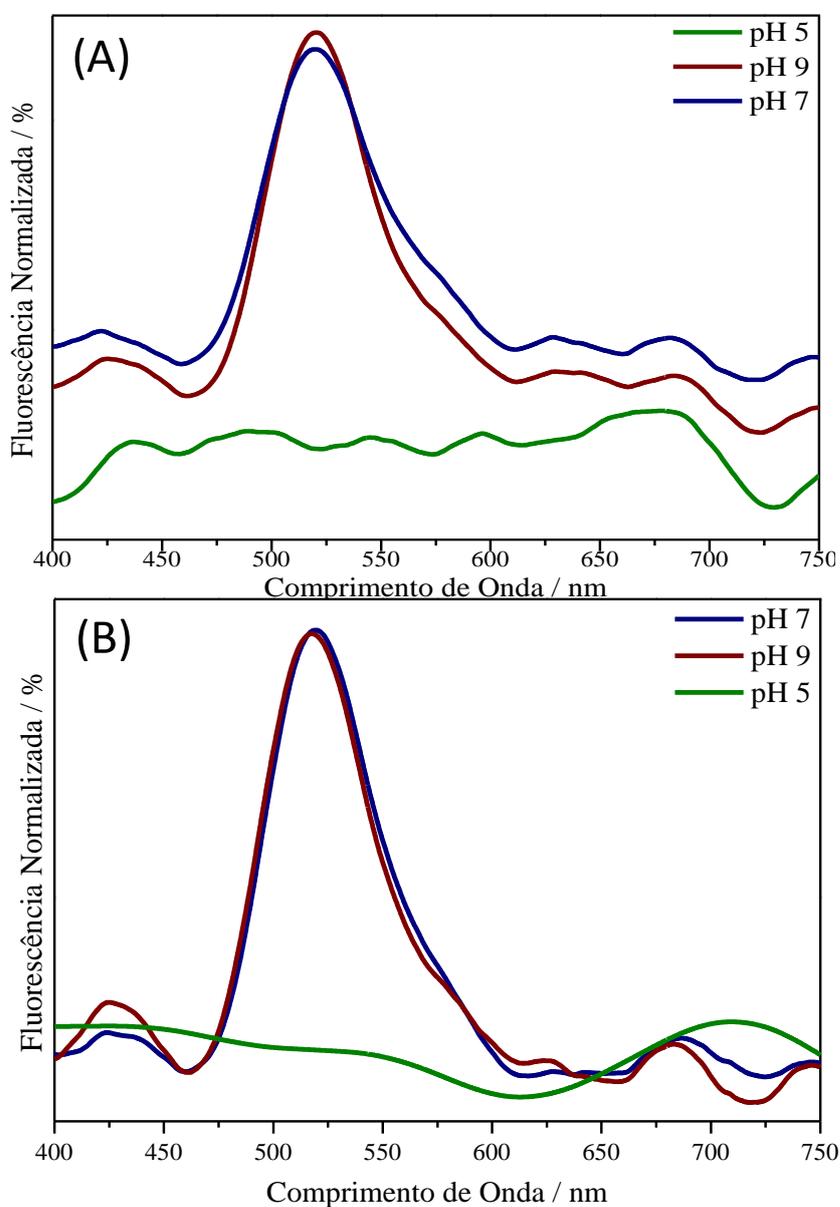


Figura 36 - Espectros de fluorescência em pH 5, 7 e 9 da (A) solução de FL e (B) dispersão de NPSM(GP-FL) com excitação em 487 nm.

Os resultados da espectroscopia de fluorescência indicam que o acoplamento da fluoresceína às nanopartículas pela reação estudada, modificou as propriedades espectroscópicas da mesma, tornando-as não fluorescentes, diferentemente do que ocorre com a FITC, que é comumente utilizada para produzir nanopartículas fluorescentes rastreáveis no meio biológico. Isto indica que o acoplamento ao GPTMS poderia ter ocorrido pelo grupo ácido carboxílico do anel benzênico ou pelas hidroxilas do anel xantênico. Em ambos os casos as propriedades fluorescentes podem ser alteradas (ZHANG; ZHANG; LIU, 2014). Portanto, a confirmação da formação desta ligação deverá ser realizada por técnicas mais precisas como a espectroscopia Raman e de ressonância magnética nuclear. Entretanto, a fluorescência poderá ser retomada numa eventual hidrólise da ligação éster formada, o que causaria a liberação da FL em uma forma fluorescente. Isso resulta em um dispositivo com propriedades do tipo liga-desliga (Figura 37), o qual pode ser utilizado, dentre outras possibilidades, como um sensor de pH do meio e também para monitorar, por exemplo, a degradação da nanopartícula no meio fisiológico.

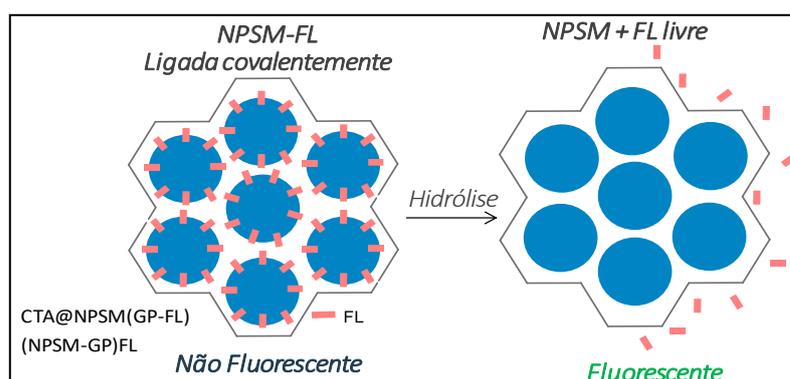


Figura 37 – Esquema do dispositivo liga-desliga produzido pela reação de hidrólise da ligação éster formada entre as nanopartículas de sílica e a fluoresceína.

## 5. CONCLUSÕES

Neste estudo foram produzidas nanopartículas com fluoresceína covalentemente ligada à estrutura inorgânica a partir da reação de acoplamento entre o grupo epóxi do GPTMS e a fluoresceína pelos métodos de co-condensação e pós-funcionalização. A formação da respectiva ligação éster foi evidenciada pela espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho. A espectroscopia Raman deverá ser utilizada para confirmação da formação desta ligação.

Os ensaios de fluorescência mostraram que as sílicas contendo a fluoresceína ligada covalentemente (CTA@NPSM(GP-FL) e (NPSM-GP)FL<sub>tolueno</sub>) não apresentaram

fluorescência. Só foi observada fluorescência nas nanopartículas onde havia moléculas de fluoresceína adsorvidas, que foram liberadas na solução durante o ensaio. A reação de acoplamento da fluoresceína às nanopartículas modificou as propriedades espectroscópicas da fluoresceína. Entretanto, é possível que a fluorescência seja observada quando ocorrer a hidrólise da ligação éster formada.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEFA, T.; TAO, Z. Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 11, p. 2265–2284, 2012.

BAE, S. W.; TAN, W.; HONG, J.-I. Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: new tools for bioapplications. **Chemical Communications**, v. 48, n. 17, p. 2270, 2012.

BATISTELA, V. R. et al. Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies. **Dyes and Pigments**, v. 86, n. 1, p. 15–24, 2010.

BHAGI, A. et al. Fluorescein prototropism within poly(ethylene glycol)s and their aqueous mixtures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 17, p. 5230–5240, 2013.

CHEN, N.-T. et al. Theranostic applications of mesoporous silica nanoparticles and their organic/inorganic hybrids. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 25, p. 3128, 2013.

FENG, J. et al. Novel Multifunctional Nanocomposites: Magnetic Mesoporous Silica Nanospheres Covalently Bonded with Near-Infrared Luminescent Lanthanide Complexes. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3596–3600, mar. 2010.

FONTINHA, I. R.; SALTA, M. M.; ZHELUDKEVICH, L. EIS Study of Amine Cured Epoxy-silica-zirconia Sol-gel Coatings for Corrosion Protection of the Aluminium Alloy EN AW 6063. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 31, n. 6, p. 307–319, 2013.

GARCIA-BENNETT, A. E. Synthesis, toxicology and potential of ordered mesoporous materials in nanomedicine. **Nanomedicine (London, England)**, v. 6, n. 5, p. 867–877, 2011.

GRIMM, J. B. et al. Virginia Orange: A Versatile, Red-Shifted Fluorescein Scaffold for Single- And Dual-Input Fluorogenic Probes. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 474–480, 2016.

HIRABAYASHI, K. et al. Analysis of Chemical Equilibrium of Silicon-Substituted Fluorescein and Its Application to Develop a Scaffold for Red Fluorescent Probes. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 17, p. 9061–9069, 2015.

HOFFMANN, F. et al. Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 20, p. 3216–3251, 12 maio 2006.

HU, X.; ZRAZHEVSKIY, P.; GAO, X. Encapsulation of Single Quantum Dots with Mesoporous Silica. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 37, n. 10, p. 1960–1966, out. 2009.

LEE, C. Y. et al. Use of silane-functionalized graphene oxide in organic photovoltaic cells and organic light-emitting diodes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 14, p. 9369–9374, 2015.

LEI, J.; WANG, L.; ZHANG, J. Superbright Multifluorescent as Trackable Transport Carrier for Drug. **American Chemical Society**, v. 5, n. 5, p. 3447–3455, 2011.

LI, J. et al. Silencing of Rac1 expression via RNA interference inhibits retinal neovascularization in rats. **Molecular Vision**, v. 18, p. 1354–1360, 2012.

LIN, Y.-S. et al. Well-Ordered Mesoporous Silica Nanoparticles as Cell Markers. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 18, p. 4570–4573, 2005.

MANZANO, M.; VALLET-REGÍ, M. New developments in ordered mesoporous materials for drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 27, p. 5593, 2010.

MCQUEEN, P. D. et al. On the intrinsic photophysics of fluorescein. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 48, p. 9193–9196, 2010.

MO, K.; BEIN, T. Talented Mesoporous Silica Nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 29, n. 1, p. 371–388, 2017.

MÖLLER, K.; KOBLER, J.; BEIN, T. Colloidal suspensions of nanometer-sized mesoporous silica. **Advanced Functional Materials**, v. 17, n. 4, p. 605–612, 2007.

NADERI, F.; FARAJTABAR, A. Solvatochromism of fluorescein in aqueous aprotic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 221, p. 102–107, 2016.

NADERI, F.; FARAJTABAR, A.; GHARIB, F. Solvatochromic and preferential solvation of fluorescein in some water-alcoholic mixed solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 190, p. 126–132, 2014.

NETO, E. P. F. et al. The Effect of Ormosil Matrix Composition and Alkaline Earth Metal Doping on the Photochromic Response of Ormosil-Phosphotungstate Films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2598–2606, 2015.

RADU, D. R. et al. A Polyamidoamine Dendrimer-Capped Mesoporous Silica Nanosphere-Based Gene Transfection Reagent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 41, p. 13216–13217, out. 2004.

ROYER, C. A. Fluorescence spectroscopy. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 40, p. 65–89, 1995.

RUEDAS-RAMA, M. J. et al. Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 751, p. 1–23, 2012.

ŠAPIČ, I. M. et al. Vibrational analysis of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane polymer. **Macromolecular Symposia**, v. 339, n. 1, p. 122–129, 2014.

SHEN, Y.; WU, P. Two-Dimensional ATR–FTIR Spectroscopic Investigation on Water Diffusion in Polypropylene Film: Water Bending Vibration. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 18, p. 4224–4226, 2003.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. . H. Química Inorgânica. **Bookman**, v. 3, p. 808, 2003.

SLOWING, I.; TREWYN, B. G.; LIN, V. S.-Y. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 46, p. 14792–14793, 2006.

SONG, N.; YANG, Y.-W. Molecular and supramolecular switches on mesoporous silica nanoparticles. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 11, p. 3474–3504, 2015.

TAO, Z. Mesoporous silica-based nanodevices for biological applications. **RSC Advances**, v. 4, n. 36, p. 18961, 2014.

TATAR, P.; KACIK, D.; TARJANYI, N. Fluorescein filled photonic crystal fiber sensor for simultaneous ultraviolet light and temperature monitoring. **Optical Fiber Technology**, v. 30, p. 8–11, 2016.

TOURNE-PETEILH, C. et al. Synthesis and characterisation of ibuprofen-anchored MCM-41 silica and silica gel. **New Journal of Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1415, 2003.

TREWYN, B. G. et al. Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, n. 1, p. 23–29, 2008.

TSOU, C.-J. et al. Local pH tracking in living cells. **Nanoscale**, v. 7, n. 9, p. 4217–4225, 2015.

UENO, T. et al. Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 43, p. 14079–14085, 2004.

URATA, C. et al. Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silica nanoparticles. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 34, p. 5094–5096, 2009.

VALLET-REGI, M. et al. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 2, p. 308–311, fev. 2001.

VIVERO-ESCOTO, J. L.; HUXFORD-PHILLIPS, R. C.; LIN, W. Silica-based nanopores for biomedical imaging and theranostic applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2673, 2012.

WANG, L.; LEI, J.; ZHANG, J. Building of multifluorescent mesoporous silica nanoparticles. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 16, p. 2195–2197, 2009.

WANG, Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 313–

327, 2015.

WU, S.; HUNG, Y.; MOU, C. Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers. **Chemical Communications**, v. 47, n. 36, p. 9972, 2011.

ZHANG, L.; LI, Y.; YU, J. C. Chemical modification of inorganic nanostructures for targeted and controlled drug delivery in cancer treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 5, p. 452, 2014.

ZHANG, X. F.; ZHANG, J.; LIU, L. Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: Lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra. **Journal of Fluorescence**, v. 24, n. 3, p. 819–826, 2014.

ZHOU, H. et al. A facile and in situ approach to fluorescent mesoporous silica and its applications in sensing and bioimaging. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 45, p. 9625–9630, 2014.