**Rafael Frederice** 

# Fluorescência molecular em nanopartículas de sílica marcadas com quercetina e rodamina B

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências (Físico-Química).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen

São Carlos

2009

Dedicatória

Aos meus pais, Italo e Aparecida, por tudo, principalmente pelo apoio durante a conclusão deste trabalho. Tudo que consegui na vida foi com a ajuda de vocês.

À minha irmã Fernanda, pelo incentivo, pela confiança em mim e por sempre ter dito: "Você vai conseguir, vai dar tudo certo."

Amo vocês!

#### Agradecimentos

A Deus, pela vida, o bem mais valioso que existe e que recebemos de graça pelos nossos pais.

Ao Prof. Marcelo, pela orientação, confiança, amizade, incentivo e, principalmente, paciência.

Aos meus amigos de Laboratório: Denis (MP), Manu, Ana, Carol e Robson. Pelas conversas científicas e não-científicas. Principalmente à Ana, minha "co-orientadora", durante o processo de sintetizar bolinhas.

Ao Grupo de Fotoquímica.

Ao Márcio, da CAQI, pela ajuda para enxergar as nossas "bolinhas".

A todos os meus amigos de mestrado e graduação.

Aos moradores do Bloco C – Ala 3, pela amizade desde a graduação.

Ao Klaus (Palito), meu companheiro de casa durante a maior parte do mestrado, pela ótima convivência.

Enfim, a todos que conviveram comigo durante esses anos de USP. Levaria uma tese inteira para citá-los.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pelo apoio institucional.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

"Comece fazendo o necessário, depois faça o possível e, quando menos esperar, você estará fazendo até o impossível." (São Francisco de Assis)

#### Resumo

Nanoesferas de sílica contendo fluoróforos encapsulados (o complexo quercetina-Al<sup>+3</sup> e o corante rodamina B) foram preparadas com alto controle de tamanho e morfologia, utilizando catálise ácida e básica do tetraetilortossilicato (TEOS). As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro da ordem de 200-300 nm, possuindo maior regularidade guando preparadas em meio alcalino. Nas preparações foram utilizados o método de Stöber e o método caroço-casca. Devido à hidrólise da quercetina em meio básico, as partículas funcionalizadas com o flavonóide ou com o complexo quercetina-Al<sup>+3</sup>, apresentaram maior intensidade de emissão sob catálise ácida. No caso da catálise básica, as partículas apresentaram emissão significativa quando preparadas utilizando um sol de alumina, porém foram obtidos paralelepípedos nanométricos. Os decaimentos de fluorescência para o sistema quercetina-alumina são biexponenciais, em concordância com os dois complexos quercetina-Al<sup>+3</sup> formados no interior da nanopartícula de sílica. No caso da rodamina B, foram realizadas medidas de espectroscopia de correlação de fluorescência, que mostraram uma relação entre relaxação difusional com tamanho e autoagregação das partículas.

<u>Palavras-chave</u>: nanopartículas de sílica, espectroscopia de fluorescência, hidrólise alcalina, fluoróforos.

### Abstract

Silica nanospheres doped with quercetin-AI<sup>+3</sup> and rhodamine B were synthesized with high size control and morphology, using acid and basic catalysis of tetraethylorthosilicate (TEOS). The nanoparticle diameter obtained was about 200-300 nm, with higher regularity when synthesized in alkaline media. The Stöber's and core-shell methods were used as preparation methods. Because the alkaline hydrolysis of quercetin, the flavonoid or the quercetin-AI<sup>+3</sup> complex doped nanoparticles showed higher emission intensity when acid catalysis was used. When basic catalysis was performed, the particles prepared with an alumina-sol showed expressive emission intensity, but nanometric parallelepipeds were obtained. The quercetin-alumina fluorescence decays are biexponential, agreeing with the two types of quercetin-AI<sup>+3</sup> complexes formed in the nanoparticles domain. In the case of rhodamine B, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements were performed, showing a relation between diffusion relaxation with size and aggregation behavior.

<u>Keywords</u>: silica nanoparticles, fluorescence spectroscopy, alkaline hydrolysis, fluorophores.

# Sumário

	Э
Abstract	6
Sumário	7
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	14
I. INTRODUÇÃO	15
I.1 – Flavonóides [1-2]	15
I.1.1 – Características gerais	15
I.1.2 – Reatividade e complexação com metais	16
I.1.3 – Transferência de próton intramolecular na 3-hidroxiflavona	17
I.1.5 – Complexação entre quercetina o cátion Al <sup>+3</sup>	18
I.2 – Rodamina B	21
I.3 – Nanopartículas de sílica	22
I.3 – Nanopartículas de sílica I.2.1 – Aplicações e preparação	<b>22</b> 22
I.3 – Nanopartículas de sílica I.2.1 – Aplicações e preparação I.2.2 – Método sol-gel [22]	<b>22</b> 22 23
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica</li> <li>I.2.1 – Aplicações e preparação</li> <li>I.2.2 – Método sol-gel [22]</li> <li>I.2.3 –Métodos de preparação, catálise ácida e básica</li> </ul>	<b>22</b> 22 23 24
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica.</li> <li>I.2.1 – Aplicações e preparação</li> <li>I.2.2 – Método sol-gel [22]</li> <li>I.2.3 –Métodos de preparação, catálise ácida e básica</li> <li>II. OBJETIVOS.</li> </ul>	22 22 23 24 24
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica.</li> <li>I.2.1 – Aplicações e preparação</li> <li>I.2.2 – Método sol-gel [22]</li> <li>I.2.3 –Métodos de preparação, catálise ácida e básica</li> <li>II. OBJETIVOS.</li> <li>III. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</li> </ul>	22 23 24 24 27 28
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica</li> <li>I.2.1 – Aplicações e preparação</li> <li>I.2.2 – Método sol-gel [22]</li> <li>I.2.3 –Métodos de preparação, catálise ácida e básica</li> <li>II. OBJETIVOS</li> <li>III. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</li> <li>III.1 – Equipamentos e materiais</li> </ul>	22 23 24 24 27 28 28
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica</li> <li>I.2.1 – Aplicações e preparação</li> <li>I.2.2 – Método sol-gel [22]</li> <li>I.2.3 –Métodos de preparação, catálise ácida e básica</li> <li>II. OBJETIVOS</li> <li>III. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</li> <li>III.1 – Equipamentos e materiais</li></ul>	22 23 24 24 27 28 28 28 28
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica</li></ul>	22 23 24 24 27 28 28 28 28 28 
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica</li></ul>	22 23 24 24 27 28 28 28 28 28 
<ul> <li>I.3 – Nanopartículas de sílica</li> <li>I.2.1 – Aplicações e preparação</li> <li>I.2.2 – Método sol-gel [22]</li> <li>I.2.3 –Métodos de preparação, catálise ácida e básica</li> <li>II. OBJETIVOS</li> <li>III. OBJETIVOS</li> <li>III. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</li> <li>III.1 – Equipamentos e materiais</li> <li>III.2 – Reagentes e soluções</li> <li>IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES</li> <li>IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES</li> <li>IV.1 – Partículas de sílica preparadas com catálise ácida</li> <li>IV.1.1 – Sistema utilizando HCI como catalisador.</li> </ul>	22 23 24 24 27 28 28 28 28 33 35 35 35

IV.1.3 – Preparação em meio ácido utilizando ácido cítrico como molde42
IV.1.4 – Preparação utilizando ácido acético e sem solvente43
IV.2 – Partículas de sílica com quercetina preparadas com catálise básica45
IV.2.1 – Preparação via Stöber com adição de quercetina livre46
IV.2.2 – Preparação via Stöber com adição do complexo quercetina-alumínio
IV.2.3 – Preparação via caroço-casca com adição do complexo quercetina-
alumínio49
IV.3 – Preparação utilizando quercetina e sol de alumina
IV.3.1 – Sistema utilizando quercetina e sol de alumina51
IV.4 – Partículas de sílica com rodamina B preparadas com catálise básica .60
IV.4.1 – Preparação via Stöber60
V 4.2 Proparação polo mótodo caroco-casca
v.4.2 - Fieparação pelo metodo caroço-casca
IV.5 – Análise por Autocorrelação de Fluorescência
IV.5 – Análise por Autocorrelação de Fluorescência

# Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas da flavona (a) e da cromona (b)15
Figura 2: Hidrólise alcalina de um flavonol16
Figura 3: Estrutura do flavonóide quercetina17
Figura 4: Fototautomerização da 3-hidroxiflavona. [1]18
Figura 5: Espectros de absorção de quercetina 10µM em diferentes concentrações
de Al <sup>+3</sup> : 0-10 μM. [1]19
Figura 6: Estruturas dos complexos quercetina-Al <sup>+3</sup> : complexo 1:1 (a) e 2:1 (b)19
Figura 7: Equilíbrio de complexação. Q = quercetina, a = sítio de complexação a, b
= sítio de complexação b, K <sub>1</sub> ,K <sub>2</sub> = constantes de equilíbrio20
Figura 8: Espectros de emissão estacionária de quercetina 10µM em diferentes
concentrações de Al <sup>+3</sup> : 0-10 $\mu$ M. $\lambda_{exc}$ =430 nm. [1]20
Figura 9: Estrutura molecular da Rodamina B21
Figura 10: Espectros de absorção (linha sólida) e de emissão (linha tracejada) da
rodamina B em solução aquosa <b>(a)</b> e em suspensão de argila hectorita <b>(b)</b> . [10]
Figura 11: Estrutura do tetraetilortossilicato (TEOS)23
Figura 12: Mecanismos das reações em catálise básica [42-43]25
Figura 13: Mecanismos das reações em catálise ácida [42-43]26
Figura 14: Esquema de Instrumentação: FN = Filtro de Notch, BS = separador de
feixes (dicróico, ou um cubo com ou sem separação por polarização do sinal).
XYZ = nanoposicionador, APD = Fotodiodo Avalanche, IX71 = microscópio
invertido, PC = microcomputador

Figura 15: Microscópio Invertido Olympus IX71 e instrumentação confocal com
detectores APD31
Figura 16: Fotografia da sala de instrumentação em Fluorescência
Figura 17: Planta baixa da instrumentação para fluorescência resolvida no tempo.
P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> = polarizadores Glan-Laser
Figura 18: Espectros de absorção das soluções sobrenadantes do sistema de
partículas preparadas com ácido clorídrico36
Figura 19: Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol
sistema de partículas preparadas com ácido clorídrico. [Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]= 0-71 $\mu$ M37
Figura 20: Imagens de MEV das partículas de sílica preparadas com ácido
clorídrico: (a) esferas separadas, (b) partículas irregulares e (c) aglomerado de
esferas
Figura 21: Espectros de absorção das soluções sobrenadantes do sistema de
partículas preparado com ácido acético39
Figura 22: Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol
sistema de partículas preparado com ácido acético. [Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] = 0-84 $\mu$ M40
Figura 23: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas com ácido acético.
(a) esferas pouco agregadas, (b) partículas irregulares e (c) aglomerado de
esferas41
Figura 24: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas utilizando ácido
cítrico como molde43
Figura 25: Imagem de MEV das partículas de sílica do sistema preparado com ácido
acético e sem solvente44

Figura 26: Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol sistema de partículas preparado com ácido acético e sem solvente.  $[Al(NO_3)_3] =$ Figura 27: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas com quercetina livre. Figura 28: Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol sistema de partículas preparadas com quercetina livre. Saturação = adição de grande quantidade de alumínio......47 Figura 29: Imagem de MEV das partículas de sílica do sistema preparado com o Figura 30: Esquema representando a nanoesfera de sílica formada pelo método caroço-casca......49 Figura 31: Imagem de MEV das partículas de sílica do sistema preparado pelo método caroço casca utilizando o complexo quercetina-alumínio. ......50 Figura 33: (a) Imagem de MEV das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina (b) emissão estacionária em metanol.  $\lambda_{exc}$ = 430nm, tempo de acumulação = 0.5 s, nº de varreduras = 5......53 Figura 34: Espectro de absorção da suspensão em metanol das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina......54 Figura 35: Decaimentos da suspensão em metanol das partículas preparadas com Figura 36: Espectro de emissão estacionária da suspensão em metanol das partículas de sílica utilizando quercetina e sol de alumina (segunda preparação). 

- Figura 44: Espectros de emissão estacionária (a) e (b) excitação estacionária da suspensão em 2-propanol das partículas de sílica caroço-casca com rodamina

B. λ<sub>exc</sub> = 540nm......66

- Figura 46: Imagem de MEV das partículas de sílica caroço-casca com rodamina B.

- Figura 47: Gráficos de espectroscopia de correlação de fluorescência da suspensão em água do sistema de partículas de sílica caroço-casca com rodamina B: diagrama de contagens (a), distribuição de contagens (b), autocorrelação (c). 69
- Figura 48: Diagrama de contagens para suspensão em água das partículas de sílica caroço-casca com rodamina B deixadas em repouso por 24 h......71

# Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros relativos às curvas de decaimento da suspensão em metanol									
das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina									
Tabela 2: Parâmetros relativos às curvas de decaimento da suspensão em metanol									
das	partículas	preparadas	com	quercetina	е	sol	de	alumina	(segunda
prepa	aração)								60

# I. INTRODUÇÃO

#### I.1 – Flavonóides [1-2]

#### I.1.1 – Características gerais

Flavonóides são polifenóis abrangentes nas plantas, bem como em produtos como chás, vinhos, cerveja e mel [3]. Geralmente, são sólidos cristalinos de cor branca a amarelo-claro. Essas substâncias despertam grande interesse devido às suas propriedades antioxidantes, antialérgicas e antiinflamatórias, tendo aplicação no tratamento de várias doenças.

Quanto à estrutura, os flavonóides têm como base o esqueleto  $C_6$ - $C_3$ - $C_6$  da cadeia da flavona (Figura 1a) e o grupo cromona (figura 1b) é o centro cromofórico da maioria desses compostos.



Figura 1: Estruturas da flavona (a) e da cromona (b).

As diferentes classes de flavonóides são identificadas de acordo com o grau de insaturação e o grau de oxidação do segmento de três carbonos (anel central). Dentro de cada classe, a diferenciação é feita baseada no número e na natureza dos grupos ligados aos anéis, sendo metila e hidroxila os grupos mais comuns. Assim, existem 14 classes de flavonóides, das classes seis estão incluídas na dieta

humana. São elas: flavanóis, flavonóis (como a quercetina e o morin), flavonas, antocianidinas, isoflavonóides e flavononas.

#### I.1.2 – Reatividade e complexação com metais

Os dois anéis laterais das flavonas comportam-se praticamente da mesma maneira que os anéis aromáticos livres. Isto ocorre principalmente com as hidroxiflavonas, nas quais eles comportam-se como fenóis em várias reações. Já o anel pirona (anel central) é o responsável pela maioria das reações típicas destes flavonóides.

Quando em meio básico, os derivados de flavona sofrem hidrólise, com abertura do anel central e formação de chalconas (Figura 2).



Figura 2: Hidrólise alcalina de um flavonol.

Os flavonóides possuem alta reatividade química, podendo ligar-se a polímeros biológicos, agir como agentes antioxidantes e capturar radicais livres. Também possuem alta afinidade por íons metálicos bivalentes, como Pb<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>. Além disso, também podem formar complexos com os metais de transição do quarto período e, principalmente, com o cátion Al<sup>+3</sup>. A maioria destes complexos é

altamente fluorescente, o que permite detectar os flavonóides por fluorimetria, com maior sensibilidade do que por absorção de UV-Visível, técnica que também pode ser empregada.

Quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), o flavonóide utilizado neste trabalho, tem sua estrutura mostrada na Figura 3.



Figura 3: Estrutura do flavonóide quercetina.

Os complexos de quercetina com zinco(II) e com cobre(II), por exemplo, atuam como sondas no estudo da estrutura e função de ácidos nucléicos [4-5]. Quercetina também pode ser utilizada como agente protetor solar [6] e para determinação seletiva de Fe(II) e Fe(III) [7].

#### I.1.3 – Transferência de próton intramolecular na 3-hidroxiflavona

A transferência de próton intramolecular na 3-hidroxiflavona é do tipo intrínseca, quando existe ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio do grupo doador e o grupo receptor, no estado fundamental. No estado excitado, a 3-hidroxiflavona sofre tautomerização por transferência de próton intramolecular entre os grupos hidroxila e carbonila adjacentes, conforme ilustrado na Figura 4.



Figura 4: Fototautomerização da 3-hidroxiflavona. [1]

Nos flavonóides hidroxilados, este processo causa desativação do estado S<sub>1</sub>, resultando em baixa fluorescência. Isto ocorre na quercetina, que não apresenta emissão significativa à temperatura ambiente.

## I.1.5 – Complexação entre quercetina o cátion Al<sup>+3</sup>

A quercetina absorve luz na região de 350-400 nm. Quando se adiciona uma solução contendo cátions Al<sup>+3</sup> a uma solução de quercetina, ocorre complexação do flavonóide com os cátions, resultando na formação de novas espécies, que absorvem na região de 400-500 nm, conforme mostrado na Figura 5.



Figura 5: Espectros de absorção de quercetina 10 $\mu$ M em diferentes concentrações de Al<sup>+3</sup>: 0-10  $\mu$ M. [1]

Observando-se a Figura 5, nota-se que a quercetina possui um máximo de absorção em 372 nm. Com a adição do nitrato de alumínio, ocorre a formação de uma nova banda em 430 nm, devido aos complexos quercetina-Al<sup>+3</sup> formados.

As estruturas dos complexos são apresentadas na Figura 6.



Figura 6: Estruturas dos complexos quercetina-Al<sup>+3</sup>: complexo 1:1 (a) e 2:1 (b).

Como o alumínio pode complexar-se com a carbonila e a hidroxila na posição 3 (sítio **a**) e também com as duas hidroxilas do catecol (sítio **b**), o equilíbrio de complexação pode ser propagado, como representado na Figura 7.

$$Q + Al \xrightarrow{K_1} QAl^a + Al \xrightarrow{K_2} QAl_2 + Q \xrightarrow{K_3} Q_2Al_2^a + Al \xrightarrow{K_4} Q_2Al_3^a + \dots$$

**Figura 7:** Equilíbrio de complexação. Q = quercetina, a = sítio de complexação a, b = sítio de complexação b, K<sub>1</sub>,K<sub>2</sub> = constantes de equilíbrio.

A formação dos complexos inibe a transferência de próton intramolecular no estado excitado, responsável pela baixa emissão. Assim, a intensidade de fluorescência da quercetina aumenta, conforme mostrado na Figura 8. Nota-se o aumento da intensidade do máximo em 493 nm.



Figura 8: Espectros de emissão estacionária de quercetina 10 $\mu$ M em diferentes concentrações de Al<sup>+3</sup>: 0-10  $\mu$ M.  $\lambda_{exc}$ =430 nm. [1]

#### I.2 – Rodamina B

As rodaminas e seus derivados são corantes muito utilizados em microscopia de fluorescência, devido ao seu alto rendimento quântico de emissão. Para a rodamina B, esta propriedade tem o valor de 0,70 em solução etanólica e de 0,32 em solução aquosa [8]. A molécula da rodamina B é mostrada na Figura 8.



Figura 9: Estrutura molecular da Rodamina B.

A rodamina B é solúvel em água, etanol e metanol, sendo uma das sondas mais utilizadas para o estudo de superfícies de argila. Este corante possui máximo de absorção em torno de 540 nm e máximo de emissão em 560-580 nm. O deslocamento das bandas de absorção ou emissão do monômero nas superfícies de argila com relação à posição destas bandas em água pode fornecer informações sobre as propriedades do espaço interlamelar da argila e da interface argila-água [10-13].

A Figura 10 mostra os espectros de absorção e emissão da rodamina B em solução aquosa e em suspensão da argila hectorita natural.



Figura 10: Espectros de absorção (linha sólida) e de emissão (linha tracejada) da rodamina B em solução aquosa (a) e em suspensão de argila hectorita (b). [10]

### I.3 – Nanopartículas de sílica

#### I.2.1 – Aplicações e preparação

Nanopartículas de sílica possuem uma ampla área de aplicações, desde o uso como agentes dispersantes e de recobertura, abrasivos, adsorventes, catalisadores de reações, transportadores de fármacos, indicadores e sondas em sistemas químicos e biológicos, bem como em materiais avançados em óptica e microscopia. Muito interesse tem sido direcionado para o estudo de partículas de sílica nanométricas dopadas com corantes fluorescentes, possibilitando o aumento do rendimento quântico de emissão do fluoróforo quando encapsulado [14-21]. Para isso, uma solução de corante pode ser adicionada à mistura reacional durante a preparação da sílica, ocorrendo a imobilização do fluoróforo no interior da nanopartícula formada.

Tais partículas podem ser preparadas pelo método sol-gel, através das reações de hidrólise e condensação de ortossilicatos. O tetraetilortossilicato (TEOS), mostrado na Figura 11, costuma ser o precursor mais utilizado nessas preparações.



Figura 11: Estrutura do tetraetilortossilicato (TEOS).

#### I.2.2 – Método sol-gel [22]

O método sol-gel envolve, basicamente, a transição de um sistema da fase líquida (o "sol" coloidal) para a fase sólida (o "gel"). Assim, são utilizadas as reações de hidrólise de ortossilicatos (formação do sol) e posterior condensação (formação do gel). Estas reações podem ser catalisadas por ácido ou base. Embora seja mais comum o uso de ácido clorídrico e amônia, outros catalisadores como ácido acético, hidróxido de potássio, aminas, ácido fluorídrico e ácido cítrico também podem ser utilizados.

Em geral, três reações são usadas para descrever o método:

1) Hidrólise do alcóxido ou ortossilicato:

 $Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow HO-Si(OR)_3 + ROH(I)$ 

De acordo com a quantidade de água e catalisador, a hidrólise pode ser completa:

#### $Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow Si(OH)_4 + 4ROH$ (II)

2) Duas moléculas parcialmente hidrolisadas podem ligar-se, resultando na reação de condensação, com a liberação de uma molécula de água (condensação com formação de água).

#### $(OR)_3Si-OH + HO-Si(OR)_3 \rightarrow (OR)_3Si-O-Si(OR)_3 + H_2O$ (III)

 Analogamente ao item anterior, a condensação pode resultar na formação de um álcool.

#### $(OR)_3Si-OR + HO-Si(OR)_3 \rightarrow (OR)_3Si-O-Si(OR)_3 + ROH (IV)$

#### I.2.3 – Métodos de preparação, catálise ácida e básica

Stöber e colaboradores [23] conseguiram, em 1968, preparar nanoesferas de sílica através da hidrólise e policondensação do TEOS, utilizando amônia aquosa como catalisador e etanol como solvente. Desde então, este método ficou conhecido como "Método de Stöber" e tem sido bastante citado para obter esferas de sílica com alto controle de tamanho e morfologia [24-30]. Além do processo alcoólico, a reação também pode ocorrer no interior de microemulsões e/ou micelas reversas, de modo a obter um maior controle devido ao ambiente confinado da micela [18, 31-35].

Além da catálise básica, partículas esféricas também foram obtidas utilizando ácido acético, conforme reportado por Karmakar [36-37]. Neste caso foram obtidas esferas maiores, na faixa de vários micrômetros e com maior grau de aglomeração, bem como partículas irregulares. Outros autores também obtiveram esferas em meio ácido com a utilização de ácidos carboxílicos como moldes [38-41]. O tamanho e a morfologia das partículas dependem do controle de fatores como temperatura e razão molar entre os reagentes (água, precursor, catalisador e também o surfactante, no caso das micelas reversas) e do tipo de precursor.

No caso do catalisador, como citado anteriormente, a catálise básica é preferencial para a obtenção de nanoesferas de sílica. A utilização de ácido ou base interfere nas taxas de hidrólise e condensação, que também devem ser controladas. Em meio ácido, a taxa de hidrólise é maior do que a taxa de condensação. Esta última diminui com o aumento do número de ligações Si-O ao redor do átomo de silício, levando a formação de redes fracamente ramificadas. Já em meio básico, ocorre o contrário. A taxa de condensação é mais rápida do que a taxa de hidrólise e aumenta com o aumento do número de ligações Si-O. Assim redes altamente ramificadas com a estrutura de anéis são geradas.

As reações de hidrólise e condensação ocorridas em meio alcalino são mostradas na Figura 12.



Figura 12: Mecanismos das reações em catálise básica [42-43].

O mecanismo de catálise ácida é apresentado na Figura 13.



Figura 13: Mecanismos das reações em catálise ácida [42-43].

# **II. OBJETIVOS**

Preparar nanopartículas de sílica com controle de forma e tamanho e altamente fluorescentes devido à presença de um fluoróforo encapsulado, através de catálise ácida e básica.

Estudar as características fotofísicas dos sistemas fluoróforo-sílica obtidos para aplicação como marcadores por fluorescência.

### **III. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

#### III.1 – Equipamentos e materiais

Os espectros de absorção foram medidos com um espectrofotômetro Varian/Cary 5G e os espectros de emissão estacionária foram obtidos através de espectrofluorímetro Hitachi F-4500 e de um espectrofluorímetro de contagem de fótons modelo Edinburgh CD 900.

As medidas de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em um Microscópio Eletrônico Zeiss-Leica/440. As amostras de sílica foram suspensas em etanol e, após sonicação, depositadas (uma gota) em suportes de alumínio posteriormente metalizados com ouro em uma metalizadora por sistema de alto vácuo.

O pH do sol de alumina foi controlado utilizando um pHmetro Qualxtron modelo 8010.

As centrifugações, todas feitas a 18 °C e durante 40 minutos, foram feitas em uma centrífuga Hitachi modelo himac CR 20B2.

As medidas de espectroscopia de correlação de fluorescência em microscopia confocal foram realizadas em um sistema tendo como base em um microscópio invertido (Olympus modelo IX71). A excitação foi feita pela porta de epifluorescência do microscópio na qual foi colocado um posicionador xy do focalizador de fibra óptica que direciona o feixe de um laser 532 CW (Verdi operando em baixa intensidade, 50 mW).

A observação da emissão de fluorescência foi feita utilizando-se uma objetiva com elevada abertura numérica (Olympus 60X com NA=1.35). Com uma

combinação apropriada de dicróico e filtros de luz, as amostras foram monitoradas em um nanovolume de excitação.

O sinal de emissão das amostras obtido no IX71 foi medido através de sua porta lateral esquerda onde temos um sistema óptico de filtros (filtros do tipo Notch de banda estreita de alta densidade óptica OD > 6 para evitar qualquer mínimo sinal de excitação e de espalhamento), um pinhole de 80  $\mu$ m centrado pelo uso de um posicionador xy e z, lentes, íris e detectores de fótons.

A detecção por contagem de fótons utiliza dois detectores pontuais do tipo APD, (fotodiodo tipo avalanche) (EG&G Optoelectronics modelo SPCM-AQ-161-FC e um módulo SPCM-AQR-14 da Perkin Elmer). Estes detectores possuem baixo ruído de fundo (contagem de escuro < 100 cps), e uma resposta espectral na região de 430 – 850 nm. Os sinais TTL dos detectores são enviados a um analisador de múltiplos canais (MCA-Tenenelec/Oxford), que registra os histogramas de contagem de fótons operando em modo MCS.

A Figura 14 mostra um esquema simplificado do sistema em operação com o laser de 532 nm (verde).



**Figura 14:** Esquema de Instrumentação: FN = Filtro de Notch, BS = separador de feixes (dicróico, ou um cubo com ou sem separação por polarização do sinal). XYZ = nanoposicionador, APD = Fotodiodo Avalanche, IX71 = microscópio invertido, PC = microcomputador.



O microscópio invertido Olympus IX71 é mostrado na Figura 15.

Figura 15: Microscópio Invertido Olympus IX71 e instrumentação confocal com detectores APD.

Os decaimentos de fluorescência foram realizados através de contagem de fótons, utilizando-se dois espectrômetros, que possuem compartimentos para amostras sólidas ou filmes/membranas depositadas sobre superfícies em configuração "front-face". Os equipamentos utilizados são descritos em artigos recentes publicados por nosso grupo de pesquisa [44-47].

As medidas foram feitas em um espectrômetro com detector do tipo MCP-PMT (R3809U-50, Hamamatsu) resfriado por sistema Peltier. A fonte de excitação utilizada foi um sistema Laser constituído de Laser Verdi/Coherent 5W bombeando um Ti-Safira (Coherent Mira Modelo XW), gerando pulsos de 200 fs na região de 700 - 900 nm. Utilizando-se de um dobrador de freqüência para geração de segundo harmônico são obtidos pulsos para excitação na região de 380 - 420 nm. A eletrônica de contagem foi baseada na nova placa de aquisição TCC 900 da Edinburgh Instruments e os dados foram analisados utilizando o programa FAST.

A Figura 16 mostra a sala de instrumentação do laboratório. Na figura 17, o sistema utilizado na obtenção dos decaimentos está representado esquematicamente.



Figura 16: Fotografia da sala de instrumentação em Fluorescência.



**Figura 17:** Planta baixa da instrumentação para fluorescência resolvida no tempo. P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> = polarizadores Glan-Laser.

### III.2 - Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram:

- Flavonóide quercetina, 98%: Sigma-Aldrich.
- Corante rodamina B, 95%: Sigma-Aldrich.
- Nitrato de alumínio nonahidratado, Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, 98%: Fluka.
- Tetraetilortossilicato (TEOS), 99%: Fluka
- Metanol e etanol, grau P.A.: Synth.
- 2-propanol, grau HPLC: Mallinckrodt.
- Hidróxido de amônio, 28%: Chemis.
- Ácido clorídrico P.A.: Synth.
- Ácido acético P.A.: Synth.

• Hidróxido de sódio 97%: Synth.

Os volumes de corante ou flavonóide utilizados foram obtidos por diluição de estoques  $1 \times 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> de soluções de rodamina ou dos flavonóides em 2-propanol ou metanol. Os volumes de nitrato de alumínio foram obtidos pela diluição de estoques  $1 \times 10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup> em água ou em 2-propanol.

A água utilizada em todos os experimentos foi purificada por sistema Millipore.

# **IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### IV.1 – Partículas de sílica preparadas com catálise ácida

#### IV.1.1 – Sistema utilizando HCI como catalisador.

Para este sistema, utilizou-se o método descrito por Nassar et al. [43]. A razão molar utilizada entre os reagentes foi de 1 TEOS :  $10^{-3}$  HCI :  $10 H_2O$ .

Foram adicionados, nessa ordem:

3 mL de etanol

0,50 mL de TEOS

0,40 mL de água

25 μL de ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>

430  $\mu$ L de quercetina, estoque 1x10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>, [Quercetina]<sub>final</sub>=10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>

Após as adições, o sistema foi agitado à temperatura ambiente durante 30 min e deixado em repouso para a evaporação do solvente. Os cristais amarelos obtidos foram lavados com etanol, metanol e água. Isso foi feito para retirar o flavonóide apenas adsorvido à superfície de sílica.

As lavagens foram acompanhadas por UV-vis, como mostrado na Figura 18.



Figura 18: Espectros de absorção das soluções sobrenadantes do sistema de partículas preparadas com ácido clorídrico.

Observando a Figura 18 nota-se a diminuição do máximo em 372 nm, relacionado à quercetina livre, até que a absorbância deixa de ser significativa. Assim, pode-se garantir que toda a quercetina adsorvida foi eliminada, restando apenas o flavonóide ligado à sílica.

Após as lavagens, o sólido obtido foi macerado e caracterizado por UV-Vis e fluorescência estacionária. Assim, 5,3 mg do sólido foram suspensos em metanol (1 mL) e sonicados, sendo posteriormente diluídos com metanol para 3 mL na cubeta. A esta suspensão de sílica marcada foram feitas várias adições de uma solução aquosa de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 1,49x10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>.


Os espectros de absorção e emissão obtidos são mostrados na Figura 19.

**Figura 19:** Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol sistema de partículas preparadas com ácido clorídrico. [Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]= 0-71 μM

À medida que a concentração de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> aumenta, nota-se a diminuição de intensidade da banda de absorção em 373 nm (quercetina livre) e o aparecimento da banda em 440nm (quercetina complexada). Assim pode-se concluir que houve

formação do complexo quercetina-Al<sup>+3</sup> dentro da partícula de sílica, o que é confirmado pelo aumento de intensidade da banda de emissão em 496 nm, conforme ilustrado na Figura 19 (b).

As partículas de sílica obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme mostrado na Figura 20.



Figura 20: Imagens de MEV das partículas de sílica preparadas com ácido clorídrico: (a) esferas separadas, (b) partículas irregulares e (c) aglomerado de esferas.

Observando a Figura 20, nota-se que foram obtidas esferas monodispersas com diâmetro em torno de 300 nm e baixo grau de aglomeração (a). São observadas, em menor quantidade, algumas partículas irregulares (b), conjuntamente com agregados de partículas esféricas (c).

#### IV.1.2 – Sistema utilizando ácido acético como catalisador

As partículas de sílica foram preparadas como no sistema anterior, porém foram utilizados  $25\mu$ L de ácido acético 0,5 mol.L<sup>-1</sup> como catalisador.

Também foram obtidos cristais amarelados, devido à incorporação da quercetina, que foram lavados com etanol, metanol e água e posteriormente macerados. Os espectros de absorção subseqüentes às lavagens são apresentados na Figura 21.



Figura 21: Espectros de absorção das soluções sobrenadantes do sistema de partículas preparado com ácido acético.

A intensidade do máximo referente à quercetina livre (374 nm) diminuiu significativamente, o que mostrou que o flavonóide ainda presente na sílica, após a lavagem, estava incorporado e não mais adsorvido.

As medidas fotofísicas (UV-Vis e fluorescência estacionária) foram realizadas utilizando uma suspensão contendo 7,6 mg das partículas em 3 mL de metanol, previamente sonicada. Durante as medidas, várias alíquotas de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> foram

adicionadas à suspensão inicial. A Figura 22 apresenta os espectros de emissão e absorção obtidos.



**Figura 22:** Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol sistema de partículas preparado com ácido acético. [Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] = 0-84 μM.

Analogamente ao sistema anterior, nota-se que houve complexação entre quercetina e alumínio pela formação da banda de absorção em 440 nm e do aumento de intensidade de emissão em 497 nm. Comparando-se as Figuras 19 e 22, nota-se também que as intensidades de emissão são maiores para a segunda preparação, o que permite concluir que o sistema utilizando ácido acético possibilitou uma maior incorporação da quercetina na partícula de sílica formada.

As partículas obtidas também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, conforme mostra a Figura 23.



Figura 23: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas com ácido acético. (a) esferas pouco agregadas, (b) partículas irregulares e (c) aglomerado de esferas.

Observando a Figura 23, nota-se que foram obtidas poucas esferas monodispersas (a) com diâmetro aproximado de 300 nm. É observada uma grande quantidade de aglomerados (c) e algumas partículas irregulares (b). Assim pode-se concluir que o método anterior, utilizando ácido clorídrico como catalisador,

possibilitou uma melhor morfologia das partículas, apesar da eficiência menor na emissão por quercetina complexada com Al<sup>+3</sup>.

## IV.1.3 – Preparação em meio ácido utilizando ácido cítrico como molde

Uma das tentativas realizadas para melhorar a morfologia das partículas de sílica foi a utilização de ácido cítrico como molde (ou *template*, em inglês). Um molde é uma substância que pode ser adicionada durante a reação e eliminada do produto por calcinação. O uso de moldes é freqüentemente mencionado na literatura [38-41].

De acordo com Pang [40], os reagentes foram utilizados na razão molar 1 TEOS: 4 H<sub>2</sub>O: 0,01 HCI: 3 EtOH.

Foram adicionados, na seguinte ordem:

0,38 mL de etanol

0,50 mL de TEOS

0,20 mL de HCI 0,1mol.L<sup>-1</sup>

0,20 mL de quercetina 0,01 mol.L<sup>-1</sup> em metanol

O sistema foi agitado com refluxo a 50°C por 3 horas. Logo após, foi resfriado até 25°C, 4,62 mg de ácido cítrico foram adicionados e agitou-se durante mais 10 minutos à temperatura ambiente. O sistema foi então seco à 70°C sob agitação e colocado em estufa à mesma temperatura. Após a secagem, o sólido obtido foi macerado.

O sistema obtido foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura, como mostrado na Figura 24.



Figura 24: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas utilizando ácido cítrico como molde.

As partículas obtidas apresentaram-se irregulares em tamanho e forma, com alto grau de aglomeração. Logo, o método empregado não foi eficiente para melhorar a morfologia do sistema. O sistema obtido apresentou baixa emissão de fluorescência na posterior adição de alumínio, mostrando que a incorporação do flavonóide também não foi eficiente.

#### IV.1.4 – Preparação utilizando ácido acético e sem solvente

A preparação foi baseada no método descrito por Karmakar et al. [36-37]. TEOS, ácido acético e água foram misturados nesta ordem e na razão molar 1 TEOS: 4 ácido acético: 4 H<sub>2</sub>O. A suspensão inicialmente bifásica tornou-se monofásica após agitação. O sistema foi agitado durante 5 minutos, até a suspensão ficar turva e, em seguida, adicionou-se uma solução de quercetina em 2-propanol de modo a obter 1x10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> do flavonóide em suspensão. A mistura reacional ficou em agitação por mais meia hora e foi então centrifugada. O sólido obtido foi seco em estufa a 70°C.

As imagens de microscopia novamente mostraram partículas irregulares com tamanho da ordem de micrômetros, conforme mostrado na Figura 25.



Figura 25: Imagem de MEV das partículas de sílica do sistema preparado com ácido acético e sem solvente.

Foram realizadas medidas de UV-Vis e fluorescência, porém o sistema apresentou baixa intensidade de emissão, mesmo após várias adições de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Também não foi observada a banda de absorção da quercetina complexada. Os resultados são mostrados na Figura 26.



**Figura 26:** Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol sistema de partículas preparado com ácido acético e sem solvente. [Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] = 9-354  $\mu$ M,  $\lambda_{exc}$  = 430 m.

# IV.2 – Partículas de sílica com quercetina preparadas com catálise básica

Em todos os sistemas preparados com catálise básica foi utilizada a razão molar 1 TEOS: 21 H<sub>2</sub>O: 0,5 NH<sub>3</sub> e 2-propanol como solvente.

#### IV.2.1 – Preparação via Stöber com adição de quercetina livre

Os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: TEOS,  $H_2O$  e  $NH_3$ . O sistema foi agitado por 10 a 15 min a 40°C, quando ocorreu turvação da suspensão. Nesse instante adicionou-se quercetina em isopropanol para concentração final  $1x10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>.

A mistura reacional continuou em agitação a 40ºC por mais uma hora e, após ser colocada em gelo, foi centrifugada durante 30 minutos. O sólido obtido foi seco em estufa a 70ºC.

A Figura 27 mostra uma imagem de microscopia obtida para as partículas obtidas.



Figura 27: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas com quercetina livre.

Nota-se que as partículas obtidas apresentam-se esféricas, com diâmetro em torno de 300 nm, embora aglomeradas. Porém, a utilização de base na preparação

pode causar a hidrólise do flavonóide, conforme discutido na Figura 2, o que prejudica a formação do complexo fluorescente quercetina-alumínio.

Assim, nas medidas de UV-Vis e emissão estacionária, apresentadas na Figura 28, o sistema não apresentou emissão significativa quando foi adicionado Al<sup>+3</sup>, provavelmente devido à hidrólise alcalina da quercetina, que ocorre na preparação.



Figura 28: Espectros de absorção (a) e emissão (b) da suspensão em metanol sistema de partículas preparadas com quercetina livre. Saturação = adição de grande quantidade de alumínio.

# IV.2.2 – Preparação via Stöber com adição do complexo quercetina-alumínio

A preparação com base também foi feita utilizando-se o complexo quercetina-Al<sup>+3</sup> 1:1 no lugar do flavonóide livre, para evitar a hidrólise. A razão molar foi a mesma do sistema anterior.

A Figura 29 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura das partículas obtidas.



Figura 29: Imagem de MEV das partículas de sílica do sistema preparado com o complexo quercetina-alumínio.

Nota-se, pela Figura 29, que as partículas obtidas apresentaram forma esférica, com diâmetro na faixa de 200 nm, com baixo grau de aglomeração.

Como no sistema anterior, apesar da boa morfologia, as partículas apresentaram baixa intensidade de emissão, possivelmente devido à hidrólise básica da quercetina.

## IV.2.3 – Preparação via caroço-casca com adição do complexo quercetina-alumínio

O método caroço-casca (do inglês *core-shell*) consiste em uma modificação do método de Stöber e é bastante utilizado para a obtenção de partículas de sílica regulares e altamente fluorescentes [16,27,48].

Neste caso, o precursor é preparado na forma de um complexo fluoróforo-TEOS e adicionado à mistura reacional contendo água, catalisador e solvente. O sistema fica em agitação durante 12 horas e, após o tempo de reação, são adicionadas alíquotas de TEOS, de forma a gerar uma casca protetora que impede a perda de corante pela nanoesfera de sílica formada.

A Figura 30 apresenta esquematicamente uma nanopartícula de sílica obtida pelo método caroço-casca.



Figura 30: Esquema representando a nanoesfera de sílica formada pelo método caroçocasca.

Na preparação realizada, o caroço foi preparado a partir de 500  $\mu$ L de TEOS e 500  $\mu$ L do complexo quercetina-alumínio 1:1, sendo adicionado à mistura contendo 2-propanol, água e amônia. O complexo quercetina-alumínio 1:1 foi obtido pela diluição de 500  $\mu$ L de soluções de quercetina e de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, ambas de concentração 1x10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>, em 4 mL de 2 propanol.

O sistema ficou em agitação à temperatura ambiente durante 12 horas. Após este período, foram adicionadas alíquotas de TEOS de 15 em 15 min, no volume total de 500  $\mu$ L. A mistura reacional foi então centrifugada e o sólido branco obtido guardado em dessecador.

A Figura 31 mostra uma imagem de MEV do sistema obtido.



Figura 31: Imagem de MEV das partículas de sílica do sistema preparado pelo método caroço casca utilizando o complexo quercetina-alumínio.

Nota-se que as esferas obtidas apresentam diâmetro de aproximadamente 200 nm e baixo grau de aglomeração. A intensidade de emissão de fluorescência novamente foi baixa, sugerindo baixa incorporação do flavonóide devido à catálise básica utilizada na preparação.

#### IV.3 – Preparação utilizando quercetina e sol de alumina

O método utilizado foi similar à preparação caroço-casca, resultando no recobrimento de um sol de alumina com o flavonóide quercetina. O sol de alumina consistiu em um gel branco, obtido pela alcalinização de uma solução de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> até pH=7,5.

#### IV.3.1 – Sistema utilizando quercetina e sol de alumina

#### IV.3.1.1 – Preparo do sol de alumina

Primeiramente, adicionou-se 2 mL de Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup> a 18 mL de água, agitando-se durante 10min. A seguir, o pH da solução, inicialmente em torno de 3,5, foi elevado até 7,5. Para isso, foram adicionados 5,3 mL de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. A suspensão foi centrifugada e o produto obtido foi rotulado como sol de alumina.

A Figura 32 mostra uma imagem de microscopia das partículas denominadas sol de alumina.



Figura 32: Imagem de MEV das partículas de sol de alumina.

Observando-se a Figura 32, nota-se que as partículas de alumina, embora nanométricas, apresentam alto grau de aglomeração e irregularidade.

#### IV.3.1.2 – Recobrimento do sol de alumina

O sol de alumina preparado na etapa anterior foi adicionado a 50 mL de 2propanol e sonicado por 5-10min. A seguir adicionou-se, nessa ordem, 1 mL de quercetina  $1 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> em 2-propanol, uma solução contendo 846 µL de água em 4,5 mL de 2-propanol e, simultaneamente, 500 µL de TEOS em 5mL de 2-propanol e 157 µL de NH<sub>4</sub>OH em 5 mL de 2-propanol. Entre cada adição, a mistura reacional foi agitada durante 5min. As quantidades adicionadas estão de acordo com a razão molar 1 TEOS: 21 H<sub>2</sub>O: 0,5 NH<sub>3</sub>.

O sistema foi deixado em agitação à temperatura ambiente durante 24 h e, a seguir, centrifugado. O sólido obtido foi seco ao ar. Posteriormente, foi sonicado com 3mL de HCI 1mol.L<sup>-1</sup> durante 3 min e centrifugado. O produto obtido, de forte coloração amarela, também foi seco ao ar.

O sistema foi analisado por fluorescência estacionária (suspensão em metanol) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos estão representados na Figura 33.



(a)



Figura 33: (a) Imagem de MEV das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina (b) emissão estacionária em metanol.  $\lambda_{exc}$ = 430nm, tempo de acumulação = 0,5 s, nº de varreduras = 5.

As partículas nanométricas obtidas apresentaram-se na forma de paralelepípedos com tamanho da ordem de 300 nm de aresta. O espectro de emissão apresenta alta intensidade e máximo em 530nm, o que confirma a incorporação do flavonóide quercetina e complexação com o cátion Al<sup>+3</sup>, presente

nas partículas de alumina. A formação de complexo também é confirmada pela banda de absorção em 450 nm. O espectro de absorção é mostrado na Figura 34.



Figura 34: Espectro de absorção da suspensão em metanol das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina.

As partículas obtidas foram analisadas por fluorescência resolvida no tempo, também utilizando uma suspensão do sistema em metanol. Todas as medidas foram realizadas mantendo os seguintes parâmetros:

Nº de canais = 1024 Taxa de início (Start rate) = 1,987 kHz Razão tempo/canal: 0,04883 ns = 48,83 ps Delay=2,4 ns Escala de tempo (time range): 50 ns

Os decaimentos foram realizados para diferentes comprimentos de onda de emissão e são mostrados na Figura 35.



Figura 35: Decaimentos da suspensão em metanol das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina: (a)  $\lambda_{em}$  = 490 nm, (b)  $\lambda_{em}$  = 530 nm.

O ajuste biexponencial dos dados é dado pela equação (1):

$$f(t) = A + b_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + b_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right)$$
(1),

na qual  $\tau_1, \tau_2$  são os tempos de vida,  $b_1, b_2$  são os fatores pré-exponenciais e A é o termo independente.

Os fatores pré-exponenciais podem ser normalizados, de acordo com as equações (3) e (4):

$$\tilde{b}_{1} = \frac{b_{1}}{b_{1} + b_{2}}$$
 (2)  $\tilde{b}_{2} = 1 - \tilde{b}_{1}$  (3)

A Tabela 1 apresenta os parâmetros obtidos com o ajuste biexponencial.

Tabela 1: Parâmetros relativos às curvas de decaimento da suspensão em metanol daspartículas preparadas com quercetina e sol de alumina.

λ <sub>em</sub> (nm)	τ <sub>1</sub> (ns)	₿₁	τ <sub>2</sub> (ns)	₿₂	χ²
490	1,28 ± 0,05	0,420	3,62 ± 0,03	0,580	1,020
530	0,38 ± 0,01	0,555	3,46 ± 0,01	0,445	2,301

Nota-se que a melhor curva foi obtida para  $\lambda_{em}$  = 490 nm. A presença de dois tempos de vida distintos é condizente com a presença dos dois complexos formados entre quercetina e alumínio.

O mesmo sistema foi preparado novamente, com algumas modificações nas etapas de secagem. Após as 24h, o sólido resultante da centrifugação foi seco em estufa a 70°C, por 3h. O mesmo ocorreu com o produto da sonicação com HCI, porém este foi seco por apenas 1h.

Novamente foram realizadas medidas de MEV e emissão estacionária. As partículas foram similares ao sistema anterior preparado com alumina:

paralelepípedos com tamanho em torno de 300 nm. O espectro de emissão é mostrado na Figura 36.



**Figura 36:** Espectro de emissão estacionária da suspensão em metanol das partículas de sílica utilizando quercetina e sol de alumina (segunda preparação).  $\lambda_{exc}$  = 430nm, tempo de acumulação = 0,5 s, nº de varreduras = 5.

O espectro de emissão apresenta alta intensidade e máximo em torno de 490 nm, o que confirma a incorporação do flavonóide quercetina na sílica e sua complexação com o cátion Al<sup>+3</sup>, presente nas partículas de alumina. Tal afirmação também é confirmada através do espectro de absorção do sistema em metanol, mostrado na Figura 37.



Figura 37: Espectro de absorção da suspensão em metanol das partículas de sílica utilizando quercetina e sol de alumina (segunda preparação).

A presença do máximo relacionado ao complexo (430-440nm) e a ausência da banda relacionada à quercetina livre (em torno de 370-380nm) permitem afirmar que praticamente todo o flavonóide incorporado está na forma complexada com Al<sup>+3</sup>.

Também foram obtidos decaimento de fluorescência para este sistema, nas mesmas condições do sistema anterior, que são apresentados na Figura 38.





Figura 38: Decaimentos da suspensão em metanol das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina (segunda preparação): (a)  $\lambda_{em}$  = 480 nm, (b)  $\lambda_{em}$  = 490 nm, (c)  $\lambda_{em}$  = 500 nm.

Analogamente ao sistema anterior, o ajuste obtido foi biexponencial e os parâmetros obtidos são apresentados na Tabela 2.

λ <sub>em</sub> (nm)	τ <sub>1</sub> (ns)	₿ <sub>1</sub>	τ <sub>2</sub> (ns)	₿₂	χ²
480	2,70 ± 0,01	0,905	10,9 ± 0,10	0,095	2,374
490	2,27 ± 0,02	0,834	6,42 ± 0,11	0,166	1,580
500	2,47 ± 0,02	0,843	6,95 ± 0,09	0,157	1,507

**Tabela 2:** Parâmetros relativos às curvas de decaimento da suspensão em metanol das partículas preparadas com quercetina e sol de alumina (segunda preparação).

Nota-se que as duas últimas medidas apresentaram melhor ajuste da curva experimental. Novamente são mostrados dois tempos de vida diferentes devido aos dois complexos quercetina-alumínio. Quando comparamos os tempos de vida, notase que a secagem das partículas produziu um sistema com decaimento mais lento e certamente com maior rendimento de fluorescência.

## IV.4 – Partículas de sílica com rodamina B preparadas com

#### catálise básica

Analogamente aos sistemas preparados com quercetina também foi utilizada a razão molar 1 TEOS: 21 H<sub>2</sub>O: 0,5 NH<sub>3</sub> e 2-propanol como solvente.

#### IV.4.1 – Preparação via Stöber

Os reagentes foram utilizados na razão molar citada anteriormente, sendo utilizados 500 µL de TEOS e agitação a 40°C Após 15 min, com a turvação da

mistura reacional, 450  $\mu$ L de rodamina 1x10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> foram adicionados e a suspensão ficou em agitação por mais uma hora. A seguir, o sistema foi resfriado em gelo e, posteriormente, centrifugado.

A fim de eliminar o corante apenas adsorvido na sílica, foram realizadas lavagens com éter etílico. As lavagens foram acompanhadas por fluorescência estacionária, até diminuição do máximo de emissão da rodamina B. A seguir, o sólido obtido foi seco e guardado em dessecador.

Foram obtidas esferas com baixo grau de aglomeração e diâmetro da ordem de 300 nm, conforme mostrado na Figura 39, da análise de microscopia.



Figura 39: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas com rodamina B pelo método de Stöber.

O sistema também foi analisado por emissão estacionária, como mostra a Figura 40. Para a medida, utilizou-se 2,5 mg do sólido obtido em 3 mL de 2propanol, sonicando-se a suspensão por 5 min.



**Figura 40:** Espectros de emissão estacionária da suspensão, em 2-propanol, das partículas de sílica preparadas com rodamina B pelo método de Stöber.  $\lambda_{exc}$ = 530 nm.

O máximo de emissão em 563 nm mostra que houve incorporação da rodamina B nas partículas de sílica.

A fim de obter partículas com maior rendimento quântico de emissão, a preparação foi refeita nas mesmas condições, porém adicionou-se 300  $\mu$ L de rodamina B 1x10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> em 2-propanol. O sistema obtido não foi lavado com éter etílico.

As partículas obtidas, conforme mostra a Figura 41, apresentaram diâmetro em torno de 300 nm e alto grau de aglomeração.



Figura 41: Imagem de MEV das partículas de sílica preparadas com rodamina B pelo método de Stöber (segunda preparação).

Os espectros de emissão e excitação são mostrados na Figura 42. Nota-se um aumento da intensidade de emissão em relação à preparação anterior.





Figura 42: Espectros de emissão (a) e de excitação (b) da suspensão em 2-propanol das partículas de sílica preparadas com rodamina B pelo método de Stöber (segunda preparação).

A incorporação do corante também é confirmada pelo espectro de UV-vis, apresentado na Figura 43, devido à presença da banda em 540 nm.



Figura 43: Espectro de absorção da suspensão em 2-propanol das partículas de sílica preparadas com rodamina B pelo método de Stöber (segunda preparação).

#### V.4.2 – Preparação pelo método caroço-casca

O caroço foi preparado utilizando 150  $\mu$ L de TEOS e 150  $\mu$ L de rodamina B. com [rodamina B] = 5x10<sup>-3</sup>M. A seguir, foi adicionado a uma mistura contendo água, amônia e 2-propanol, sob forte agitação magnética. Após 15 min, a suspensão turvou-se e foi mantida em agitação durante 12 horas.

Após as 12 horas, foram feitas adições de TEOS de 15 em 15 min, resultando em volume total adicionado de 350 μL. O sistema foi centrifugado e com o sólido obtido, de forte coloração avermelhada, foram feitas medidas de emissão estacionária e excitação. Para isso preparou-se uma suspensão contendo 0,2 mg de sólido em 3mL de 2-propanol.

A figura 44 mostra os espectros de emissão e de excitação obtidos.





**Figura 44:** Espectros de emissão estacionária (a) e (b) excitação estacionária da suspensão em 2-propanol das partículas de sílica caroço-casca com rodamina B. λ<sub>exc</sub> = 540nm.

Os espectros de emissão desse sistema também foram obtidos em sólido, para diferentes comprimentos de onda de excitação, e são apresentados na Figura 45. Ocorre um deslocamento de 30 nm do máximo de emissão para o vermelho em relação ao valor obtido em suspensão.



Figura 45: Espectros de emissão estacionária das partículas de sílica caroço-casca com rodamina B (medida realizada com o sólido).

As partículas obtidas apresentam formato esférico e possuem maior grau de aglomeração do que as preparadas pelo método de Stöber, conforme mostra a Figura 46. O diâmetro médio é de aproximadamente 200 nm.



Figura 46: Imagem de MEV das partículas de sílica caroço-casca com rodamina B.

### IV.5 – Análise por Autocorrelação de Fluorescência

Os sistemas de nanopartículas de sílica marcadas com Rodamina B foram analisados em solução altamente diluída (tipicamente concentrações de picomol/litro) por medidas de flutuação e autocorrelação de fluorescência. A Figura 47 mostra os resultados de contagens por canal para tempo de acumulação = 10 ms. A partir da análise dos resultados medidos, pode-se construir um histograma de freqüência de contagem que possui um perfil gaussiano com valor médio de 34,3 contagens e desvio padrão de 6,20. Nota-se que o desvio padrão está acima do valor estatístico de contagem em uma estatística ideal de Poisson, isto é, as flutuações são superiores ao valor de raiz quadrática da média. Estas flutuações são causadas pelo movimento Browniano das partículas de sílica fluorescentes nas imediações do volume confocal de excitação.

Para termos uma idéia da relaxação do processo difusivo, podemos avaliar a função de autocorrelação normalizada das contagens. O resultado obtido é apresentado na Figura 47 (c). Nota-se que a função de autocorrelação G(t) cai à metade do valor inicial em aproximadamente 20 canais, o que representa um tempo de relaxação da ordem de 20x10 ms = 200 ms.





Figura 47: Gráficos de espectroscopia de correlação de fluorescência da suspensão em água do sistema de partículas de sílica caroço-casca com rodamina B: diagrama de contagens (a), distribuição de contagens (b), autocorrelação (c).

Considerando a aproximação de que G(t) é dada por:

$$G(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{t}{\tau_D} \right)^{-1}$$
(4)

na qual <N> é o número médio de partículas no volume confocal,  $\tau_D$  é o tempo de relaxação o qual permite a avaliação da constante de difusão D das partículas, isto é,

$$D = \frac{\lambda^2}{4\tau_D}$$
 (5)

Usando o valor de  $\lambda$  = 532 nm e  $\tau_D$  = 200 ms, avaliamos o coeficiente de difusão das partículas de sílica em 3,5 x 10<sup>-13</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. Usando a relação de Stokes-Einstein podemos avaliar o raio médio (R) destas partículas isto é,

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \tag{6}$$

na qual k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do líquido no qual foi preparada amostra (no caso a água).

Substituindo-se k = 1,38 x 10<sup>-23</sup> J.K<sup>-1</sup>, T = 298 K,  $\eta$  = 0,9 x 10<sup>-3</sup> Pa.s e D = 3,5 x 10<sup>-13</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, obtém-se o raio médio (R) igual a 0,7  $\mu$ M, valor acima do que foi medido pela microscopia, na qual as partículas possuem raio da ordem 0,15  $\mu$ M ou 150 nm. Isto estaria indicando que as soluções de nanopartículas sofrem algum tipo de formação de agregados em solução diluída, pois o potencial eletrostático de superfície não é muito alto. De fato, medidas preliminares do potencial zeta das partículas de sílica indicaram valores da ordem de -30mV. Mais ainda, suspensões não sonicadas e deixadas em repouso por 24 h formam agregados maiores como pode ser verificado pelos chamados *sparks* (pontos focais) de contagem, mostrados

na Figura 48. Isto decorre de grandes partículas agregadas que se situam no volume confocal, são excitadas e emitem cooperativamente, formando uma cavidade de emissão de alto rendimento.



Figura 48: Diagrama de contagens para suspensão em água das partículas de sílica caroço-casca com rodamina B deixadas em repouso por 24 h.

### **V. CONCLUSÕES**

As nanoesferas de sílica foram obtidas utilizando catálise ácida e básica, sendo a catálise básica mais apropriada para a obtenção de esferas com baixo grau de aglomeração e melhor controle de tamanho tendo, em média, 200-300 nm de diâmetro.

No caso da quercetina, a marcação das partículas de sílica em meio básico ocorreu no preparo com sol de alumina. Foram obtidas partículas altamente fluorescentes, mas na forma de paralelepípedos nanométricos, enquanto a catálise ácida propiciou partículas também fluorescentes, mas esféricas e com maior intensidade de emissão. Os decaimentos obtidos revelaram um comportamento biexponencial, que é condizente com as duas espécies de complexos formados entre quercetina e alumínio imobilizados em sílica.

As medidas de flutuações de emissão de fluorescência realizadas com as partículas marcadas com rodamina B permitiram investigar o comportamento de suspensões diluídas e indicaram processos de autoagregação em solução.
## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

[1] GUTIERREZ, A. C. Estudos fotofísicos de derivados poli-hidroxilados de flavona ligados ao cátion Al<sup>+3</sup>. 1999. 96 f. Dissertação (Mestrado em Físico Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

[2] GUTIERREZ, A. C.; GEHLEN, M. H. Time resolved fluorescence spectroscopy of quercetin and morin complexes with Al<sup>3+</sup>. **Spectrochimica Acta Part A,** v. 58, p. 83-89, 2002.

[3] LIANDA, R. L. P.; CASTRO, R. N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. **Química Nova,** v. 31, n. 6, p. 1472-1475, 2008.

[4] JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin zinc(II) complex. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 17, p. 1197-1199, 2007.

[5] NI, Y.; DU, S.; KOKOT, S. Interaction between quercetin–copper(II) complex and DNA with the use of the Neutral Red dye fluorophor probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p. 19-27, 2007.

[6] CHOQUENET, B; COUTEAU, C.; PAPARIS, E.; COIFFARD, L. J. M. Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. **Journal of Natural Products,** v. 71, n. 6, p. 1117-1118, 2008.

[7] BALCERZAK, M.; TYBURSKA, A.; SWIECICKA-FÜCHSEL, E. Selective determination of Fe(III) in Fe(II) samples by UV-spectrophotometry with the aid of quercetin and morin. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 327-334, 2008.

[8] ARBELOA, F. L.; OJEDA, P. R.; ARBELOA, I. L. Fluorescence self-quenching of the molecular forms of rhodamine B in aqueous and ethanolic solutions. **Journal of Luminescence**, v. 44, p. 105-112, 1989.

[9] GREEN, F. **The Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes and indicators.** Milwaukee: Aldrich Chemical Company, 1990. 763 p.

[10] CHAUDHURI, R.; ARBELOA, F. L.; ARBELOA, I. L. Spectroscopic
characterization of the adsorption of rhodamine 3B in hectorite. Langmuir, v. 16, p.
1285-1291, 2000.

[11] ARBELOA, F. L.; CHAUDHURI, R.; LÓPEZ, T. A.; ARBELOA, I. L. Aggregation of rhodamine 3B adsorbed in Wyoming montmorillonite aqueous suspensions.
 Journal of Colloid and Interface Science, v. 246, p. 281-287, 2002.

[12] ARBELOA, F. L.; MARTÍNEZ, V. M.; PRIETO; J. B.; ARBELOA I. L. Adsorption of rhodamine 3B dye on saponite colloidal particles in aqueous suspensions.
Langmuir, v. 18, p. 2658-2664, 2002.

[13] ARBELOA, F. L.; ARBELOA, I. L. AND ARBELOA, T. L. Electronic spectroscopy of rhodamine dyes adsorbed at clay surfaces. Encyclopedia of Surface and Colloid Science, v. 3, p. 2325-2337, 2006.

[14] SANTRA, S.; WANG, K. Development of novel dye-doped silica nanoparticles for biomarker application. **Journal of Biomedical Optics,** v. 6, p. 160-166, 2001.

[15] MACCRAITH, B. D.; MCDONAGH, C. Enhanced fluorescence sensing using sol-gel materials. **Journal of Fluorescence**, v. 12, p. 333-342, 2002.

[16] OW, H; LARSON, D. R.; SRIVASTAVA, M.; BAIRD, B. A.; WEBB, W. W.;
WIESNER U. Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles.
Nanoletters, v. 5, p. 113-117, 2005.

[17] SONG, K.; VALLÉE, R.; VAN DER AUWERAER, M.; CLAYS, K. Fluorophoresmodified silica sphere as emission probe in photonic crystals. Chemical Physics Letters, v. 421, p. 1-4, 2006.

[18] ZHAO, X.; BAGWE, R. P.; TAN, W. Development of organic-dye-doped silica nanoparticles in a reverse microemulsion. **Advanced Materials,** v. 16, n. 2, p. 173-176, 2004.

[19] ROSSI, L. M.; SHI, L.; QUINA, F. H.; ROSENZWEIG, ZEEV. Stöber synthesis of monodispersed luminescent silica nanoparticles for bioanalytical assays.
 Langmuir, v. 21, p. 4277-4280, 2005.

[20] JAKOB, A. M.; SCHMEDAKE, T. A. A novel approach to monodisperse, luminescent silica spheres. **Chemical Materials**, v.18, p. 3173-3175, 2006.

[21] ENRICHI, F.; TRAVE, E.; BERSANI, M. Acid synthesis of luminescent aminefunctionalized or erbium-doped silica spheres for biological applications. **Journal of Fluorescence,** v. 18, p. 507–511, 2008.

[22] BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science:** the physics and chemistry of sol-gel processing. London: Academic Press, 1990. 908 p.

[23] STÖBER, W.; FINK, A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. Journal of Colloid and Interface Science, v. 26, p. 62-69, 1968.

[24] RAO, K. S.; EL-HAMI, K.; KODAKI, T; MATSUSHIGE, K.; MAKINO, K. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. Journal of Colloid and Interface Science, v. 289, p. 125-131, 2005.

[25] CHEN, H.; HE, J. Rapid evaporation-induced synthesis of monodisperse budded silica spheres. Journal of Colloid and Interface Science, v. 316, p. 211-215, 2007.

 [26] NAKAMURA, M.; SHONO, M.; ISHIMURA, K. Synthesis, characterization and biological applications of multifluorescent silica nanoparticles. Analytical Chemistry, v. 79, p. 6507-6514, 2007.

[27] MYUNG HAN LEE, M. H.; BEYER, F. L.; FURST, E. M. Synthesis of monodisperse fluorescent core-shell silica particles using a modified Stöber method for imaging individual particles in dense colloidal suspensions. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 288, p. 114-123, 2005.

[28] TABATABAEI, S.; SHUKOHFAR, A.; AGHABABAZADEH, R.; MIRHABIBI, A. Experimental study of the synthesis and characterization of silica nanoparticles via the sol-gel method. **Journal of Physics: Conference Series,** v. 26, p. 371-374, 2006.

[29] GREEN, D.L.; LIN, J.S.; LAM, Y.-F.; HU, M.Z.-C.; SCHAEFER, D. W.; HARRIS,
M.T. Size, volume fraction, and nucleation of Stöber silica nanoparticles. Journal of
Colloid and Interface Science, v. 266, p. 346-358, 2003.

[30] SIIMAN, O.; JITIANU, A.; BELE, M.; GROM, P.; MATIJEVIC, E. Amplified light scattering and emission of silver and silver core-silica shell particles. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 309, p. 8-20, 2007.

[31] WU, H.; HUO, Q.; VARNUM, S.; WANG, J.; LIU, G.; NIE, Z.; LIU, J.; LIN, Y.
Dye-doped silica nanoparticle labels/protein microarray for detection of protein biomarkers. Analyst, v. 133, p. 1550-1555, 2008.

[32] BAGWE, R. P.; YANG, C.; HILLIARD, L. R.; TAN, W. Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method. Langmuir, v. 20, p. 8336-8342, 2004.

[33] BAGWE, R. P.; HILLIARD, L. R.; TAN, W. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. Langmuir, v. 22, p. 4357-4362, 2006.

[34] SENARATH-YAPA, M. D.; PHIMPHIVONG, S.; COYM, J. W.; WIRTH, M. J.; ASPINWALL, C. A.; SAAVEDRA, S. S. Preparation and characterization of poly(lipid)-coated, fluorophore-doped silica nanoparticles for biolabeling and cellular imaging. **Langmuir**, v. 23, p. 12624-12633, 2007.

[35] ARRIAGADA, F. J.; OSSEO-ASARE, K. Synthesis of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion. Journal of Colloid and Interface Science, v. 211, p. 210-220, 1999.

[36] KARMAKAR, B.; DE, G.; GANGULI, D. Dense silica microspheres from organic and inorganic acid hydrolysis of TEOS. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 272, p. 119-126, 2000.

[37] KARMAKAR, B.; DE, G.; KUNDU, D.; GANGULI, D. Silica microspheres from the system tetraethyl orthosilicate-acetic acid-water. **Journal of Non-Crystalline Solids,** v. 135, p. 29-36, 1991.

[38] LEE, DONG-WOOK; IHM, SON-KI; LEE, KEW-HO. Mesoporous silica framed by sphere-shaped silica nanoparticles. **Microporous and Mesoporous Materials,** v. 83, p. 262-268, 2005.

[39] AN, Y.; CHEN, M.; XUE, Q.; LIU, W. Preparation and self-assembly of carboxylic acid-functionalized silica. Journal of Colloid and Interface Science, v. 311, p. 507-513, 2007.

[40] PANG, J. B.; QIU, K. Y.; WEI, Y. Preparation of mesoporous silica materials with non-surfactant hidroxy-carboxylic acid compounds as templates via sol-gel process. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 283, p. 101-108, 2001.

[41] TAKAHASHI, R.; SATO, S.; SODESAWA, T.; KAWAKITA, M.; OGURA, K. High surface-area silica with controlled pore size prepared from nanocomposite of silica and citric acid. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 104, p. 12184-12191, 2000.

[42] BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. The sol-gel preparation of silica gels. **Journal of Chemical Education**, v. 71, p. 599-602, 1994.

[43] NASSAR, E. J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Influência da catálise
 ácida e básica na preparação da sílica funcionalizada pelo método sol-gel. Química
 Nova, v. 25, n. 1, p. 27-31, 2002.

[44] OLIVEIRA, H. P. M.; GEHLEN, M. H. Electronic energy transfer betweenfluorescent dyes with inter and intramicellar interactions. Chemical Physics, v. 290,p. 85-91, 2003.

[45] OLIVEIRA, H. P. M.; GEHLEN, M. H. Time-resolved fluorescence of cationic dyes covalently bound to poly(methacrylic acid) in rigid media. Journal of Luminescence, v. 121, p. 544-552, 2006.

[46] PEREIRA, R. V.; GEHLEN, M. H. H-bonding assisted intramolecular charge transfer in 1-aminopyrene derivatives Chemical Physics Letters, v. 426, p. 311-317, 2006.

[47] PEREIRA, R. V.; GEHLEN, M. H. Photoinduced intramolecular charge transfer in 9-aminoacridinium derivatives assisted by intramolecular H-bond. Journal of Physical Chemistry A, v. 110, p. 7539-7546, 2006.

[48] LARSON, D. R.; OW, H.; VISHWASRAO, H. D.; HEIKAL, A. A.; WIESNER, U.; WEBB, W. W. Silica nanoparticle architecture determines radiative properties of encapsulated fluorophores. **Chemical Materials,** v. 20, p. 2677-2684, 2008.