Renan Camurça Fernandes Leitão

Híbrido inorgânico-orgânico formado por nanozeólita L e ftalocianina de silício com potencial aplicação na descontaminação de água através da luz solar

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Queiroz de Albuquerque

São Carlos – SP

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, por
todo o amor e empenho para a minha
formação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Queiroz de Albuquerque, por todas as oportunidades, conselhos e aprendizados que me foram fornecidos;

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão pelo empenho e colaboração com o meu projeto de Mestrado;

Aos colegas do Laboratório de Química Supramolecular, aos quais tive o prazer de compartilhar momentos de felicidade nos últimos dois anos;

À minha família, pelo amor recebido ao longo da minha vida e por todo apoio que tive desde o momento que decidi morar em São Carlos;

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos, aos quais estão sempre em minha mente mesmo apesar da distância nos últimos anos;

À minha noiva, Anna Cecília, por todo o amor compartilhado e por todo o empenho para estar sempre ao meu lado em todos os momentos;

A Deus, por me dar proteção e forças para seguir em frente, sempre!

*“The most technologically efficient machine that man
has ever invented is the book.”*

Northrop Frye

RESUMO

Leitão, R. C. F. **Híbrido inorgânico-orgânico formado por nanozeólita L e ftalocianina de silício com potencial aplicação na descontaminação de água através da luz solar**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Um híbrido inorgânico-orgânico formado por nanozeólita L (nZeol-L) funcionalizada em sua superfície com ftalocianina de silício (SiPC) foi investigado visando uma potencial aplicação para descontaminação de água, via geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que por sua vez é citotóxico para sistemas biológicos. Ftalocianinas são corantes orgânicos que possuem comprovada eficiência na geração de oxigênio singlete. No entanto, estes corantes possuem tendência para formar agregados, o que torna ineficiente a formação de $^1\text{O}_2$. nZeol-L constitui-se como um material apropriado para suportar SiPC covalentemente em sua superfície com o objetivo de prevenir o processo de agregação, mantendo assim as propriedades fotofísicas dos monômeros do corante. Neste estudo, um híbrido foi preparado visando a fotoinativação da bactéria *E. coli* (facilmente encontrada em água contaminada) através da luz solar natural. A superfície da nanozeólita L foi funcionalizada com o fotossensibilizador (SiPC) e com moléculas de 3-aminopropiltietoxissilano (APTES) para criar cargas positivas na superfície do material, tornando o híbrido capaz de interagir eletrostaticamente com a superfície negativa das bactérias. Testes de viabilidade celular foram realizados com dois tipos de células: BALB/c 3T3 clone A31 (como estudo piloto) e células de *E. coli* suspensas em uma solução de PBS (pH 7,4) com a presença do híbrido (nZeol-SiPC/APTES). Foi verificada uma alta eficiência de nZeol-SiPC/APTES em induzir a morte de ambas as células em grande quantidade e dentro de um curto período de tempo. Estes resultados indicam que o nanomaterial (nZeol-SiPC/APTES) possui uma potencial aplicação para a descontaminação de água, quando ativado pela luz do sol.

Palavras-chave: Fotoinativação. *Escherichia coli*. Luz solar. Descontaminação de água.

ABSTRACT

Leitão, R. C. F. **Inorganic-organic hybrid based on nanozeolite L and silicon phthalocyanine with potential application in water decontamination by sunlight.** 2015. 96 p. Dissertation (Master degree in Chemistry) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

An inorganic-organic hybrid based on nanozeolite L (nZeol-L) surface-functionalized with silicon phthalocyanine (SiPC) has been investigated aiming its future use in water decontamination by singlet oxygen generation, which is cytotoxic for biological systems. Phthalocyanines are dyes with great efficacy in singlet oxygen generation. However, these dyes have tendency to form aggregates, and hence, the formation of this reactive species of molecular oxygen turns to be inefficient. nZeol-L is an appropriate material to covalently support SiPC on its surface to avoid the aggregation process, thereby maintaining the photophysical properties of the monomer. In this study, a hybrid was prepared aiming the photoinactivation of *E. coli* bacteria (which is easily found in contaminated water) by natural sunlight. The nanozeolite L surface was functionalized with the photosensitizer (SiPC) and then with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) molecules to create a positive charge on the material surface, enabling the hybrid to interact with the negative charge to the *E. coli* bacteria. Cell viability tests were performed with two types of cells: BALB/c 3T3 clone A31 (as a pilot study) and *E. coli* cells suspended in PBS solution (pH 7.4) in the presence of the hybrid (here called nZeol-SiPC/APTES). It was verified that nZeol-SiPC/APTES gives rise to the death of the both cells in a large quantity and within a short time interval. These results indicate that the nanomaterial (nZeol-SiPC/APTES) has potential application for water decontamination when activated by sunlight.

Keywords: Photoinactivation. *Escherichia coli*. Sunlight. Water decontamination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferentes estruturas de ftalocianinas. A) ftalocianina de di-hidrogênio; B) di-hidroxi-ftalocianina de silício; C) ftalocianina de cobre (II); D) 2,9,16,23-tetra-terc-butil-29H,31H-di-hidroxi-ftalocianina de silício.....	18
Figura 2 - Transições energéticas da banda Q de absorção (seta vermelha) e banda B ou banda Soret de absorção (setas azuis).....	18
Figura 3 - Diversas aplicações com moléculas de ftalocianinas.....	19
Figura 4 - Disposição dos elétrons nos orbitais.....	20
Figura 5 – (a) Mecanismo de geração de oxigênio singleto por ftalocianinas; (b) Estados excitados de um sensibilizador levando a geração de espécies reativas do oxigênio molecular através dos mecanismos do tipo I e II.	21
Figura 6 - Emissão de oxigênio singleto detectada via excitação da ftalocianina.	22
Figura 7 - Representação de diferentes estruturas de zeólitas.	22
Figura 8 - Representação estrutural da zeólita L. (a) imagem frontal com sete canais de entrada; (b) imagem lateral de um canal; (c) dimensões do canal da zeólita L....	24
Figura 9 - Imagens de micro zeólitas L obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): (a) visão lateral; (b) visão frontal dos cristais.....	24
Figura 10 - Modos vibracionais para a molécula de água e valores de suas principais bandas de infravermelho.....	26
Figura 11 - Representação de um processo de absorção do estado eletrônico fundamental S_0 , para o estado excitado S_1 com diferentes níveis vibracionais.	27
Figura 12 - Luz incidente e luz transmitida de uma amostra e os termos expressados pela Lei de Beer.	28
Figura 13 - Reflectância externa da luz em uma superfície: especular e difusa.	28
Figura 14 - (a) Visão frontal de uma esfera de integração da marca Shimadzu, modelo ISR-2600 plus; (b) diagrama do sistema óptico.....	29
Figura 15 - Representação simplificada do diagrama de Jablonski: Processos de excitação e emissão por fluorescência e fosforescência.....	30
Figura 16 - (a) Impressão digital de uma criança de doze anos sobre uma “antiga gramática francesa” tratada com ninidrina; (b) reprodução da impressão digital em um “papel novo” também tratado com ninidrina.	32
Figura 17 - Ilustração do nanomaterial (nZeol-SiPC/APTES) agindo sobre a bactéria E. coli quando ativado por luz solar natural.....	34

Figura 18 - Espectro da primeira área analisada por EDS de nanozeólita L.....	44
Figura 19 - Espectro da segunda área analisada por EDS de nanozeólita L.	45
Figura 20 - Espectro da terceira área analisada por EDS de nanozeólita L.....	45
Figura 21 - Espectro de infravermelho dos cristais de nanozeólita L.	46
Figura 22 - Espectro de absorção UV-vis de SiPC (10^{-5} mol L ⁻¹) em diclorometano realizado em temperatura ambiente.....	47
Figura 23 - Espectros de absorção UV-vis obtidos por reflectância difusa de SiPC e nZeol-SiPC no estado sólido e dissolvidos em KBr.....	48
Figura 24 - Espectros de excitação e emissão de nZeol-SiPC em diclorometano.	50
Figura 25 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) de nZeol-L.	51
Figura 26 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) de SiPC.	52
Figura 27 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) de nZeol-SiPC.	52
Figura 28. Representação da ligação entre nZeol-L e SiPC.	53
Figura 29 - Teste da ninidrina realizado com APTES (a) e nZeol-SiPC-APTES (b) e os respectivos espectros de absorção UV-vis.....	54
Figura 30 - Ensaio de viabilidade celular de BALB/c mantidas no escuro (barras cinza) e expostas à luz artificial branca (barras laranja) nos diferentes intervalos de tempo.	56
Figura 31 - Ensaio de viabilidade celular de BALB/c + nZeol-SiPC/APTES mantidas no escuro (barras azuis) e expostas à luz artificial branca (barras vermelhas) nos diferentes intervalos de tempo.	57
Figura 32 - Ensaio de viabilidade celular de BALB/c mantidas no escuro (barras cinza) e expostas à luz solar natural (barras laranja) nos diferentes intervalos de tempo.	58
Figura 33 - Ensaio de viabilidade celular de BALB/c + nZeol-SiPC/APTES mantidas no escuro (barras azuis) e expostas à luz solar natural (barras vermelhas) nos diferentes intervalos de tempo.	59
Figura 34 - Imagens obtidas por microscopia de células de BALB/c antes do tratamento com luz do sol (a) e depois de 30 minutos de exposição à luz solar com o nanomaterial (b). Foi utilizado um microscópio Olympus com ampliação de 10X.....	60
Figura 35 - Ensaio de viabilidade celular de bactérias E. coli mantidas no escuro (barras cinza) e expostas à luz solar natural (barras laranja) nos diferentes intervalos de tempo.	61
Figura 36 - Ensaio de viabilidade celular de bactérias E. coli + nZeol-SiPC/APTES	

mantidas no escuro (barras azuis) e expostas à luz solar (barras vermelhas) nos diferentes intervalos de tempo.	62
Figura 37 - Efeito da luz do sol natural (1000 W m^{-2}) para a fotoinativação de bactérias (<i>E. coli</i>) sem (linha azul) e na presença de nZeol-SiPC (linha vermelha) nos primeiros 30 min dos testes de fotoinativação.....	63
Figura 38 - Imagens obtidas por microscopia de células de <i>E. coli</i> antes (a) e depois (b) do tratamento com luz solar e nZeol-SiPC/APTES. Foi utilizado um microscópio Olympus com ampliação de 100X.....	64
Figura 39 - Visão lateral simplificada dos nanocanaís de zeólita L com moléculas corantes encapsuladas (= elipsóides coloridos), que podem ser diretamente irradiadas com a luz do sol, dando origem à transferência de energia em cascata para excitar SiPC.	66
Figura 40 - Ilustração simplificada do processo de fotoinativação de bactérias por nZeol-SiPC funcionalizadas no vidro sob a ação da luz solar.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos químicos.	35
Tabela 2 - Sistemas biológicos.	36
Tabela 3 - Média da composição elementar de nZeol-L obtida pelas três áreas analisadas por EDS.....	46
Tabela 4 - Perda de massa observada em nZeol-L, SiPC e nZeol-SiPC com seus respectivos picos de degradação.	53
Tabela 5 - Porcentagem de células de BALB/c mortas em 30 minutos para todos os sistemas apresentados nas figuras 30, 31, 32 e 33.	60
Tabela 6 - Evolução histórica das zeólitas sintéticas.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
a.C.	Antes de Cristo
ABW	Zeólita tipo Li-A (Barrer e White)
APTES	3-aminopropiltrietoxisilano
BALB/c	Células de fibroblasto de camundongo BALB/c 3T3 clone A31
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
D6R	Anéis duplos de 6 membros
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERD	Espectroscopia de Reflectância Difusa
FBS	Soro fetal bovino
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
LB	Meio Luria Broth
LTA	Zeólita Linde tipo A
LTL	Zeólita Linde tipo L
MEP	Zeólita “Melanophlogite”
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
nm	Nanômetros
nZeol-L	Nanozeólita L
PBS	Tampão fostato-salino
PC	Ftalocianina
pH	Potencial hidrogeniônico
SiPC	2,9,16,23-tetra- <i>terc</i> -butil-29 <i>H</i> ,31 <i>H</i> -di-hidroxi-ftalocianina de silício
TGA	Análise termogravimétrica
THM	Trihalometanos
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
π	Pi

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Água contaminada: Um problema mundial.....	14
1.1.2 Métodos de descontaminação de água.....	15
1.1.3 Descontaminação de água através da luz solar	16
1.2 Ftalocianinas	17
1.2.1 Espectros eletrônicos de ftalocianinas	18
1.2.2 Aplicações das ftalocianinas.....	19
1.2.3 Geração de oxigênio singlete por ftalocianinas	19
1.3 Zeólitas	22
1.3.1 Zeólita L.....	23
1.4 Técnicas de caracterização	25
1.4.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)	25
1.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	25
1.4.3 Espectroscopia de absorção molecular UV-vis	26
1.4.4 Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD)	28
1.4.5 Espectroscopia de excitação e emissão.....	29
1.4.6 Análise termogravimétrica (TGA)	30
1.4.7 Análise qualitativa da presença APTES na superfície da zeólita L (teste da ninidrina).....	31
1.4.8 Análise em citometria de fluxo	32
1.4.9 Microscopia de campo claro.....	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivos gerais.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Materiais.....	35
3.2 Reação de Funcionalização de nanozeólita L (nZeol-L) com 2,9,16,23-tetra- <i>terc</i> -butil-29 <i>H</i> ,31 <i>H</i> -di-hidroxi-ftalocianina de silício (SiPC)	36
3.3 Aaminação da superfície externa de nZeol-SiPC com 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES).....	36
3.4 Ensaios de viabilidade de células expostas a nZeol-SiPC/APTES e luz artificial e luz solar natural	37
3.4.1 Cultivo das células de BALB/c.....	37
3.4.2 Ensaios de viabilidade celular de BALB/c sob a irradiação de luz artificial branca e luz solar natural	38
3.4.3 Cultivo das células da bactéria <i>E. coli</i>	39
3.4.4 Ensaios de viabilidade celular de <i>E. coli</i> sob a irradiação de luz solar natural	39

3.5 Caracterização dos materiais	40
3.5.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)	40
3.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	40
3.5.3 Espectroscopia de absorção molecular UV-vis	40
3.5.4 Espectroscopia de reflectância difusa	41
3.5.5 Espectroscopia de excitação e emissão.....	41
3.5.6 Análise termogravimétrica (TG).....	42
3.5.7 Análise qualitativa da presença APTES na superfície da zeólita L (teste da ninidrina).....	42
3.5.8 Microscopia de campo claro.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
4.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)	44
4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	46
4.3 Espectroscopia de absorção molecular UV-vis	47
4.4 Espectroscopia de reflectância difusa	48
4.5 Espectroscopia de excitação e emissão.....	49
4.6 Análise termogravimétrica (TGA)	50
4.7 Análise qualitativa da presença APTES na superfície da zeólita L (teste da ninidrina).....	54
4.8 Testes de viabilidade celular.....	55
4.8.1 Ensaios com BALB/c 3T3 clone A31 (luz artificial).....	55
4.8.2 Ensaios com BALB/c 3T3 clone A31 (Luz solar)	57
4.8.3 Ensaios com a bactéria <i>E. coli</i> (luz solar).....	61
5 CONCLUSÕES	65
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXO A - Evolução histórica das zeólitas sintéticas.....	81
ANEXO B – Artigo submetido para periódico.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Água contaminada: Um problema mundial

A água é considerada como sendo uma substância de grande importância para a manutenção e conservação da vida e dos ecossistemas (WOLKMER, PIMMEL, 2013). Todavia, o uso negligente da água poderá fazer com que esse recurso, até então taxado como inesgotável, venha a faltar (OLIVO; ISHIKI, 2014). Segundo o Ministério da Saúde, a qualidade da água tem sido comprometida pelo lançamento de efluentes e resíduos, desde a sua fonte (BRASIL, 2006), sendo esta ainda bastante propensa à contaminação por microorganismos patogênicos (CARIELO, 2011).

Água contaminada está entre as maiores causas de mortes no mundo, levando a morte cerca de 5 milhões de pessoas por ano, das quais as crianças são as maiores vítimas, com cerca de 8 mortes por segundo (BLANCO et al., 2009). De acordo com um recente relatório publicado pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO, 2015), embora se tenha obtido alguns avanços nas últimas décadas com relação ao maior acesso de pessoas a água potável e serviços de saneamento, 748 milhões de pessoas ainda não tem acesso a fontes de água própria para consumo, e 2,5 bilhões de pessoas não possuem saneamento adequado. Além disso, mesmo instalações de saneamento que já foram melhoradas ainda não conseguem ser eficazes, e, conseqüentemente, estima-se que 1,8 bilhões de pessoas bebem água contaminada com bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*), as quais indicam a presença de contaminação fecal (UNESCO, 2015).

Além disso, as descargas industriais de efluentes vêm aumentando nos últimos anos, caracterizando-se um problema socioambiental, já que muitos dos resíduos que são produzidos contêm substâncias que podem ser tóxicas (SOUZA; PERALTA-ZAMORA, 2006). Assim, torna-se imprescindível que se busque manter o derramamento dos efluentes dentro dos limites propostos na legislação ambiental (BRITO; SILVA, 2012).

O uso da água no mundo está se aproximando do limite que o planeta consegue dispor. Isso ocorre devido ao aumento demográfico e conseqüente diminuição da qualidade da água disponível para consumo, gerada pela destruição

dos ecossistemas e empobrecimento da biodiversidade em escala global (BOGARDI et al., 2012). Não somente por questões de escassez, mas, também, por fatores relacionados à contaminação, assuntos relacionados à água estão entre os temas centrais de discussão em nossa sociedade e representam um grande desafio para o futuro (BAGATIN et al., 2014).

Dentre as soluções para a melhoria da qualidade da água, estão inúmeros trabalhos que vêm sendo desenvolvidos para a criação de novos materiais como candidatos para complementar, aperfeiçoar ou mesmo substituir técnicas de descontaminação já existentes (BRILLAS; MARTÍNEZ-HUITLECITAR, 2015) para assim minimizar os danos causados ao meio ambiente.

1.1.2 Métodos de descontaminação de água

Métodos de descontaminação de água vêm sendo desenvolvidos pelo homem desde 4000 a.C. (CRITTENDEN et al., 2012). Atualmente, o método de descontaminação mais comum é a cloração, utilização do cloro para oxidação de espécies contaminantes. Desde o seu primeiro uso em 1908, este método permitiu uma considerável redução da mortalidade causada por doenças associadas à água contaminada. Porém, na década de 70, estudos revelaram que a reação do cloro com moléculas orgânicas pode levar a geração de subprodutos tóxicos, que por sua vez podem causar câncer (MORRIS et al., 1992).

São descritos vários outros métodos de descontaminação de água usando sistemas diferentes, como a flotação - método bastante eficiente e de baixo custo para a recuperação de óleo na água (SILVA et al., 2011; SILVA, 2008; THOMAS, 2004), eletroquímico, filtração (CAMPOS et al., 2012), nanopartículas de TiO_2 (YOUNAS et al., 2014; CHEN; SELLONI, 2014), via degradação fotocatalítica, bem como a remoção de poluentes por processos de adsorção (KHAN; HASAN; JHUNG, 2013; APUL et al., 2013) - método de baixo custo e efetivo para a descontaminação de água que utiliza materiais absorventes como carvão ativado e alguns polímeros naturais como a quitosana (DOTTO et al., 2011). Porém, para que um material absorvente seja aceitável, ele deve além de exibir características como baixo custo ter disponibilidade, alta capacidade e alta taxa de adsorção, alta seletividade, eficiência na remoção de diversos corantes, todas as características apresentadas em um único material (CRINI; BADOT, 2008).

Dada a dificuldade em obter materiais que sejam eficientes e aceitáveis, e levando-se em consideração a alta demanda por novos sistemas de descontaminação, que surge devido às limitações, geração de subprodutos tóxicos ou mesmo alto custo de algumas tecnologias, torna-se necessária a criação de novos sistemas de descontaminação de água, principalmente de baixo custo, por exemplo, utilizando a luz solar como fonte de energia.

1.1.3 Descontaminação de água através da luz solar

A cada dia, uma grande quantidade de energia solar atinge o planeta terra e em apenas 1 hora, tal energia recebida é superior ao consumo de toda a sociedade durante 1 ano (LEWIS, 2007; BLANKENSHIP et al., 2011). Isso, somado ao baixo custo desta fonte de energia, traz como desafio a necessidade de entendimento sobre processos que vão desde o controle da captura da radiação, estoque e sua utilização pelo homem (SCHOLLES et al., 2011).

O uso da luz solar como alternativa para eliminar patógenos e contaminantes químicos presentes na água, é um método conhecido e de comprovada eficiência reportada em diferentes trabalhos nas últimas décadas (CASLAKE et al., 2004; SILTON et al., 2002; CALKINS; BUCKLES; MOELLER, 1976). Um dos métodos de descontaminação de água conhecido como "foto-Fenton" utiliza a luz solar (região do UV) e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe(II)}$, a fim de oxidar poluentes presentes na água com valores de pH em torno de 3 (PÉREZ-ESTRADA, 2005). Contudo, esse método possui um inconveniente, já que o ácido utilizado para manter o baixo pH, associado com os subprodutos gerados na reação foto-Fenton podem ser prejudiciais ao meio ambiente.

Agências internacionais e organizações não governamentais têm utilizado hipoclorito de sódio e luz do sol para a descontaminação de água em áreas rurais. Embora tais sistemas tenham se mostrado eficientes na redução de doenças gastrointestinais, substâncias orgânicas presentes na fonte dessas águas podem reagir com o hipoclorito de sódio formando trihalometanos (THM), e pesquisas indicam que estes subprodutos podem aumentar o risco de câncer de bexiga. (SHANNON et al., 2008; CDC, 2000).

O fato é que não existe um sistema de descontaminação que possa funcionar em todas as circunstâncias (CDC, 2000). Como já exposto, cada método possui

vantagens e desvantagens. Por esta razão, novos sistemas de descontaminação de água continuam sendo desenvolvidos para complementar ou mesmo substituir métodos já existentes. Entre estes, diversos trabalhos reportam ftalocianinas como moléculas com potencial utilização para a descontaminação de água utilizando a luz solar (BONNETT et al., 2006; KUZNETSOVA et al., 2007; ZHANG et al., 2013).

1.2 Ftalocianinas

Ftalocianinas (PCs) representam uma classe de corantes obtidos exclusivamente por via sintética, ao contrário de porfirinas, que são semelhantes a PC, mas podem ser encontradas na natureza (ŁAPOK, 2006). A descoberta de PC ocorreu de forma acidental em 1907 por Braun e Tcherniac e foram primeiramente utilizadas por Linstead em 1933 (NAS et al., 2013).

Estas moléculas são formadas por quatro unidades isoindol ligadas através de átomos de nitrogênio formando um sistema aromático com 18 elétrons π conjugados (TORRES, 2006). A estrutura planar de ftalocianinas naturalmente induz a uma elevada associação destas moléculas por interações do tipo π - π . A agregação diminui consideravelmente propriedades fotofísicas de PC que são encontradas na forma monomérica. Visando resolver este problema, diversas alterações estruturais em PCs já foram reportadas como métodos eficientes não só para reduzir a associação molecular, mas também para aumentar a solubilidade desses corantes em diversos solventes (KADISH; SMITH; GUILARD, 2012). Uma das principais características de PCs é a possibilidade da inserção de diversos metais no centro de sua estrutura. Estes átomos podem ser utilizados para coordenar ligações axiais, conferindo a molécula uma geometria menos susceptível a agregação (ZHU et al., 2006). Outro método utilizado trata-se da inserção de grupos volumosos nos anéis periféricos, por exemplo, grupamentos terc-butilícos, reduzindo assim a agregação por efeitos estéricos (ISAGO; MIURA; OYAMA, 2008; ISAGO, 2012). As estruturas de quatro tipos de moléculas de PC estão representadas na figura 1.

Figura 1 - Diferentes estruturas de ftalocianinas. A) ftalocianina de di-hidrogênio; B) di-hidroxi-ftalocianina de silício; C) ftalocianina de cobre (II); D) 2,9,16,23-tetra-*tert*-butil-29*H*,31*H*-di-hidroxi-ftalocianina de silício.

1.2.1 Espectros eletrônicos de ftalocianinas

Os espectros eletrônicos de ftalocianinas possuem duas bandas principais de absorção, ambas originadas de transições π - π^* . A primeira, mais energética, é conhecida como banda B ou banda Soret, em referência a Jacques-Louis Soret, que em 1883 identificou esta intensa banda na região do azul estudando porfirinas (PLATTEN; COSTESÈQUE, 2004). A banda B consiste de duas transições, B_1 e B_2 , entre os níveis $b_{2u} \rightarrow e_g$ e entre $a_{2u} \rightarrow e_g$. A segunda banda, que possui maior intensidade de absorção, é conhecida como Banda Q e refere-se à transição $a_{1u} \rightarrow e_g$ (NYOKONG, 2010). As transições energéticas entre os níveis estão representadas na figura 2.

Figura 2 - Transições energéticas da banda Q de absorção (seta vermelha) e banda B ou banda Soret de absorção (setas azuis).

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de NYOKONG, 2010.

1.2.2 Aplicações das ftalocianinas

Fatores como a elevada absorção de luz no vermelho, alto rendimento quântico, tempos de vida longo e alta estabilidade térmica (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002; KIM et al., 2009) tornam ftalocianinas materiais aplicáveis em diversos setores tecnológicos (figura 3). Dentre as possíveis utilidades, destaca-se o uso destes corantes para a geração de oxigênio singlete, espécie reativa do oxigênio frequentemente estudada para propósitos medicinais e ambientais (NISHIYAMA et al., 2009; STUCHINSKAYA et al., 2011; VANKAYALA et al., 2013; LONG et al., 2013; PASPARAKIS, 2013; CHATTERJEE; DASGUPTA, 2005; SUN; XU, 2009; ZANJANCHI; EBRAHIMIAN; ARVAND, 2010).

Figura 3 - Diversas aplicações com moléculas de ftalocianinas.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de WÖHRLE et al., 2012.

1.2.3 Geração de oxigênio singlete por ftalocianinas

Como citado anteriormente, uma das aplicações de ftalocianinas refere-se ao uso destas para geração de $^1\text{O}_2$. Oxigênio é fundamental para a manutenção da vida e foi criado em largas quantidades na atmosfera terrestre a cerca de 2,2 bilhões de anos pela fotossíntese de cianobactérias (HALLIWELL, 2006). No entanto, na presença de luz, espécies reativas de oxigênio, por exemplo, $^1\text{O}_2$, podem ser criadas tornando-se fatais para sistemas biológicos.

A origem dos estados singletos excitados no O_2 está na disposição dos elétrons nos orbitais moleculares antiligantes $\pi^* 2p_y$ e $\pi^* 2p_z$ (LEE, 1999), como demonstrado na figura 4.

Figura 4 - Disposição dos elétrons nos orbitais.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de LEE, 1999.

A diferença de energia entre os estados $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Sigma_g^+$ corresponde a uma emissão em 762,1 nm, enquanto observa-se emissão em 1268,7 nm para as transições $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g$ (KAGAN, 1993). Esta última transição é a que confere interesse para aplicação em sistemas biológicos, uma vez que o tempo de vida do estado $^1\Sigma_g^+$ é muito curto, sendo rapidamente desativado para o estado $^1\Delta_g$ (RONSEIN, 2006).

Ftalocianinas são eficientes para a síntese fotoquímica de 1O_2 . Após um processo de foto-excitação, PC em seu estado tripleto excitado realiza transferência de energia, por colisão, para moléculas de oxigênio no estado fundamental (3O_2), levando a formação da espécie reativa do oxigênio (figura 5.a). Este processo de transferência de energia é conhecido como “mecanismo tipo II”, assim nomeado para diferir do processo em que fotossensibilizadores excitados reagem com oxigênio via transferência de elétrons - mecanismo tipo I (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002) (figura 5.b).

Figura 5 – (a) Mecanismo de geração de oxigênio singleto por ftalocianinas; (b) Estados excitados de um sensibilizador levando a geração de espécies reativas do oxigênio molecular através dos mecanismos do tipo I e II.

Fonte: (a) Adaptação de Leitão (2015) a partir de ISHII, 2012; (b) Adaptação de Leitão a partir de DEROSA; CRUTCHLEY, 2002.

Como citado em sessões anteriores, ftalocianinas tendem a agregar facilmente tornando ineficiente a geração de 1O_2 . Recentemente mostrou-se que zeólita do tipo L pode ter sua superfície utilizada como suporte para ftalocianinas, evitando a agregação de PC e mantendo assim, uma eficiente geração de 1O_2 após sua excitação com luz artificial vermelha. A emissão referente ao estado $^1\Delta_g$ (figura 6) pôde ser detectada com o material suspenso em CH_2Cl_2 (STRASSERT et al., 2009).

Figura 6 - Emissão de oxigênio singlete detectada via excitação da ftalocianina.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de STRASSERT et al., 2009.

1.3 Zeólitas

Zeólitas (do grego *zein* = ferver e *lithos* = pedra), são aluminosilicatos cristalinos hidratados de fórmula geral $M_{x/n}^{n+}[(AlO_2)_x(SiO_2)_y]^{x-}$, formados por unidades tetraédricas de SiO_4 e AlO_4 conectadas por átomos de oxigênio (JIANG; BABARAOA; HUA, 2011). O termo zeólita foi atribuído em 1756, pelo mineralogista sueco Cronstedt. Em 1925, Weigel e Steinhoff reportaram o uso destes minerais inorgânicos como peneiras moleculares (MUBASHIR et al., 2015). Porém, foi por volta da década de 50 que a indústria passou a explorar amplamente estes materiais, com destaque para aplicação em catálise química (SMIT; MAESEN, 2008). Para tal fim, cerca de 1 milhão de toneladas deste material são produzidas anualmente pela indústria (VERHEYEN et al., 2014). Algumas estruturas estão representadas na figura 7.

Figura 7 - Representação de diferentes estruturas de zeólitas.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de BAERLOCHER; MCCUSKER; OLSON, 2007.

Existem mais de 200 tipos de zeólitas, porém um pequeno número é comercializado (PÉREZ-RAMÍREZ, 2012), além de serem sintéticas em sua maioria. No anexo A, apresenta-se uma breve evolução histórica das zeólitas sintéticas.

Embora zeólitas de ocorrência natural possuam baixo custo e interessantes aplicações, por exemplo, em processos de purificação de água (WANG; PENG, 2010; MISAEILIDES, 2011) sua baixa pureza e baixo desempenho em processos de separação os tornam menos aplicáveis nas indústrias do que as zeólitas sintéticas (ACKLEY; REGE; SAXENA, 2003).

São diversas as características na zeólita que a tornam interessantes para diversas aplicações, por exemplo, possuem alta estabilidade térmica, alta seletividade através de seus poros - que podem ser utilizados para aplicações desde a separação de gases (PHAN et al., 2010) até reações de polimerização (SCelta, et al., 2014) - além de possuírem uma elevada área superficial que pode servir de suporte para moléculas (GAO et al., 2015).

1.3.1 Zeólita L

Zeólitas do tipo L (em referência a divisão Linde da Union Carbide) são aluminossilicatos que apresentam estrutura aniônica, característica esta que surge da carga negativa de cada tetraedro formado por Al^{3+} e oxigênio (JOHNSON; ARSHAD, 2014). A estequiometria de uma cela unitária da zeólita L é representada pela fórmula $(M^+)_9[(AlO_2)^{9-} (SiO_2)_{27}] nH_2O$, com $n = 21$ em 100% de hidratação (WANG et al., 2009). Cristais de zeólita L podem ser obtidos em diferentes formas, por exemplo, em disco ou cilíndricas, com tamanhos que podem variar de 30 a 40000 nm (KEHR et al., 2010). A estrutura de nZeol-L possui canais unidimensionais (figura 8.a).

Figura 8 - Representação estrutural da zeólita L. (a) imagem frontal com sete canais de entrada; (b) imagem lateral de um canal; (c) dimensões do canal da zeólita L.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de RUIZ et al., 2005.

Através de ligações intermediadas por átomos de oxigênio, anéis duplos de 6 membros (D6R) formam colunas ao longo de um eixo c (figura 8.b). A entrada dos possuem diâmetros livre de 0,71 nm e celas unitárias com 0,75 nm de e 1,26 nm de diâmetro interno livre (figura 8.c) (RUIZ et al., 2005). Cristais de zeólita L apresentam simetria hexagonal, como pode ser visualizado por microscopia eletrônica de varredura na figura 9.

Figura 9 - Imagens de micro zeólitas L obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): (a) visão lateral; (b) visão frontal dos cristais.

Fonte: Autoria própria

1.4 Técnicas de caracterização

1.4.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios X – EDS (do inglês *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*), realizada em conjunto com um microscópio eletrônico de varredura (MEV), permite a análise elementar de um material através da emissão de raios X, estes provenientes do bombardeamento de um feixe de elétrons na região analisada. Os raios X emitidos são detectados e convertidos em um espectro do número de raios X emitidos versus suas energias. A energia emitida dos raios X é característica do elemento que a emitiu, e assim os mesmos podem ser identificados na amostra (OUNSI et al., 2008).

1.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de absorção no infravermelho (IR, do inglês *Infrared spectroscopy*) é uma técnica utilizada para investigar as propriedades vibracionais de moléculas causadas pela absorção da radiação infravermelha (BOKOBZA, 2002). Tal absorção envolve diferenças de energia entre os estados vibracionais e rotacionais da molécula, onde uma regra de seleção determina que para tais transições, a absorção de luz infravermelha só poderá ocorrer se a vibração levar a uma mudança no momento dipolo da molécula (KAČURÁKOVÁ; WILSON, 2001). Os modos vibracionais apresentados pelas moléculas podem ser de estiramento ou de deformação (STUART, 2004). Na figura 10, estão apresentados os três tipos de modos vibracionais para a molécula de água e suas principais bandas de infravermelho.

Figura 10 - Modos vibracionais para a molécula de água e valores de suas principais bandas de infravermelho.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de STUART, 2004.

Nesta técnica, destaca-se a possibilidade de analisar uma grande variedade de amostras tanto qualitativa quanto quantitativamente, em quantidades microscópicas e com diferentes temperaturas e estados físicos. Os espectros são obtidos plotando-se a intensidade seja no modo absorbância ou transmitância, versus o comprimento de onda (LARKIN, 2011).

O espectro de infravermelho é dividido em três regiões: infravermelho próximo (12800 - 4000 cm⁻¹), médio (4000 - 400 cm⁻¹) e longo (400 - 10 cm⁻¹) (XU et al., 2013). Destas, um grande número de aplicações refere-se ao uso da região do infravermelho médio, uma vez que um grande número de moléculas sofrem vibrações característica nesta região (SCHLIESSER; PICQUÉ; HÄNSCH, 2012).

Dentre as instrumentações disponíveis para análise de infravermelho, a espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido a mais comum, uma vez que apresentam diversas vantagens em relação a outros instrumentos dispersivos, como uma maior velocidade de aquisição de dados e melhor resolução dos resultados. O espectrofotômetro FTIR possui um interferômetro de Michelson que detecta todos os comprimentos de onda simultaneamente, e os sinais obtidos são processados através de uma operação matemática conhecida como transformada de Fourier (SKOOG et al., 2006).

1.4.3 Espectroscopia de absorção molecular UV-vis

Através da técnica de espectroscopia de absorção molecular na região do UV-vis (que abrange a radiação eletromagnética entre 190 e 700 nm), é possível investigar a interação de uma determinada amostra com a luz. Assim, ao incidir luz

na amostra, esta luz passa através de uma substância em solução, onde parte da luz é transmitida através da amostra, e a outra parte é absorvida (UPSTONE, 2000).

Deste modo, pode-se inferir que a transmitância (T) é a medida da fração de luz que passa pela amostra, comumente expressada em porcentagem (equação 1.a), e pode ser relacionada com a absorbância (A) através da equação 1.b, onde I_0 refere-se à intensidade de luz que entra na amostra (incidente) e I_t refere-se à luz que sai da amostra (transmitida).

$$\% T = (I_t / I_0) \times 100 \quad (1.a)$$

$$A = -\log T \quad (1.b)$$

A absorção de fótons de radiação UV-vis por moléculas dá origem a transições eletrônicas, ocorrendo assim mudanças em seus estados eletrônicos e vibracionais (WARDLE, 2009) (figura 11).

Figura 11 - Representação de um processo de absorção do estado eletrônico fundamental S_0 , para o estado excitado S_1 com diferentes níveis vibracionais.

Fonte: Autoria própria.

A relação entre a absorbância e a concentração de uma amostra é descrita pela lei de Lambert-Beer, também conhecida como Lei de Beer. Esta lei é fundamental para a espectroscopia de absorção e torna possível a obtenção da concentração de uma amostra, se conhecidos os outros termos expressos através da equação $A = \epsilon bc$, onde, A refere-se a absorbância, ϵ (*epsilon*) representa a absorvidade molar (capacidade de absorção de luz de 1 mol de uma determinada substância), expressa nas unidades $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, b, que refere-se ao caminho óptico,

normalmente expresso em centímetros, e c , como a concentração da espécie analisada, expressa em mol L^{-1} (HARRIS, 2011) (figura 12).

Figura 12 - Luz incidente e luz transmitida de uma amostra e os termos expressados pela Lei de Beer.

Fonte: Autoria própria.

1.4.4 Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD)

Através da técnica de espectroscopia de reflectância difusa, é possível obter informações sobre as propriedades de absorção de uma amostra sólida, já que o método convencional de transmitância não permite essa análise. Assim sendo, a reflectância difusa é classificada como uma técnica de reflexão externa, onde a luz que incide sobre uma amostra é espalhada aleatoriamente, ao contrário da técnica de reflexão externa (especular), onde o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência (figura 13) (KHOSHESAB, 2012).

Figura 13 - Reflectância externa da luz em uma superfície: especular e difusa.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de KHOSHESAB, 2012.

A análise de ERD é realizada em um acessório (esfera de integração) que é acoplado a um espectrofotômetro UV-vis, ilustrado na figura 14.

Figura 14 - (a) Visão frontal de uma esfera de integração da marca Shimadzu, modelo ISR-2600 plus; (b) diagrama do sistema óptico.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de SHIMADZU, 2015.

Relacionando ERD ao objetivo do presente trabalho, esta técnica tem sido explorada de forma eficiente para obtenção de espectros de absorção UV-vis de espécies presentes na superfície de zeólitas (GRUBERT et al., 1998; MAZZOCUT et al., 2014; GAO et al., 2015). Em solução, este aluminossilicato torna ineficiente a medida de transmitância por causar dispersão de luz.

Normalmente, as amostras a serem analisadas por ERD são diluídas em uma matriz não absorvente, como o brometo de potássio com concentração da amostra entre 5 e 10% da massa de KBr). Tal procedimento é realizado visando melhorar a qualidade do espectro, uma vez que a matriz não absorvente aumenta a proporção de reflectância difusa na luz refletida (KHOSHESAB, 2012).

1.4.5 Espectroscopia de excitação e emissão

Após uma molécula absorver energia e ser promovida para um estado excitado de maior energia (seção 1.5.3), uma série de processos de relaxamento podem ocorrer no retorno do sistema para o estado fundamental, como demonstrado de forma simplificada pelo diagrama de Jablonski (figura 15).

Figura 15 - Representação simplificada do diagrama de Jablonski: Processos de excitação e emissão por fluorescência e fosforescência.

Fonte: Autoria própria.

O processo rápido de fotoluminescência através do excesso de energia liberada como fótons denomina-se fluorescência, ao contrário da fosforescência, em que se observa uma maior duração no processo de relaxação. Uma importante característica da técnica de fluorescência é a alta sensibilidade na análise, o que permite analisar amostras em baixas concentrações, quando comparada com a espectroscopia de absorção (SKOOG et al., 2006).

Espectros de excitação e emissão de uma determinada amostra são obtidos utilizando-se um equipamento denominado espectrofluorímetro. Um espectro de emissão mede a distribuição dos comprimentos de onda da emissão com excitação em comprimento de onda único e constante. Já, o espectro de excitação é dependente da intensidade de emissão, ou seja, é monitorada a emissão em um comprimento de onda específico, mediante o varrimento do comprimento de onda de excitação (LAKOWICZ, 2007).

1.4.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*) é uma técnica rápida e precisa que fornece informações sobre a perda de massa de uma amostra por decomposição térmica ao longo do tempo (CORTÉS; BRIDGWATER, 2015). A variação da massa é medida em uma balança com elevada

sensibilidade e o experimento pode ser conduzido com atmosfera controlada, por exemplo, em meio inerte com gás N₂. As amostras podem ser aquecidas com temperaturas superiores a 1000°C e as razões de aquecimento são controladas de acordo com a amostra analisada, usualmente 5 ou 10°C.min⁻¹.

Na termogravimetria, a derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) é registrada em função da temperatura ou tempo. Ao contrário da curva de TG, por DTG (do inglês *Derivative Thermogravimetric*) é possível indicar com exatidão os pontos em que a velocidade de decomposição do material analisado é máxima, o número de etapas de degradação envolvidas, dentre outras informações que tornam mais completa a interpretação da análise térmica (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

1.4.7 Análise qualitativa da presença APTES na superfície da zeólita L (teste da ninidrina)

Em 1910, Siegfried Ruhemann demonstrou que aminas primárias reagem com ninidrina formando um composto roxo. Desde então, o corante formado, conhecido como reagente de Ruhemann, passou a ser utilizado em diversas aplicações para analisar e caracterizar espécies contendo aminas (FRIEDMAN, 2004).

Em 1954, reportou-se detalhadamente a utilização de ninidrina para identificação de impressões digitais. Resumidamente, uma solução de ninidrina em acetona (0,2 %) foi borrifada em diferentes folhas de papel e após alguns minutos em uma estufa a 80°C, a impressão foi revelada em ambas as folhas (figura 16) devido à presença dos aminoácidos derivados das células da pele humana (ODÉN; VON HOFSTEN, 1954).

Figura 16 - (a) Impressão digital de uma criança de doze anos sobre uma “antiga gramática francesa” tratada com ninidrina; (b) reprodução da impressão digital em um “papel novo” também tratado com ninidrina.

Fonte: Adaptação de Leitão (2015) a partir de ODÉN; VON HOFSTEN, 1954.

Além da caracterização colorimétrica, nos quais diferentes cores e intensidades podem ser obtidas dependendo do tipo e da concentração do composto amino analisado, o reagente de Ruhemman pode também ser identificado por espectroscopia de absorção UV-vis, que para este composto apresenta duas bandas de absorção características em torno de 400 e 570 nm.

Deste modo, diversos trabalhos reportam uma eficiente determinação qualitativa de moléculas de APTES (ao qual contém um grupamento -NH_2) covalentemente ligadas em superfícies de sílica e zeólita L, utilizando-se o teste da ninidrina (PEREIRA et al., 2011; RUIZ-SANCHEZ et al., 2012; BRÜHWILER; CALZAFERRI, 2005).

1.4.8 Análise em citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que tem sido utilizada como uma ferramenta importante para determinar os valores quantitativos da viabilidade celular em testes de citotoxicidade de materiais (ZUCKER et al., 2010), na análise em alto rendimento de várias partículas individuais ao mesmo tempo (AGHAEIPOUR et al., 2011).

O citômetro de fluxo é composto pelo sistema de fluídos, o sistema de feixes de lasers, o sistema de captura óptica e eletrônica e o sistema de análise de dados - computador externo (BROWN; WITTEWER, 2000). A técnica consiste no bombeamento da amostra, com tamanho de 1-100 μm , pelo sistema de fluídos

passando através do sistema de lasers com diferentes comprimentos de onda, onde ocorre excitação das moléculas. A dispersão da luz é coletada por dois ângulos, um de dispersão frontal que fornece a medida da área de superfície da partícula, e um de dispersão lateral de reflexão e refração da luz, utilizado para quantificar as partículas (FAYOL et al., 2012). Essa captura de luz é realizada por fotodetectores, através da observação do comportamento da luz após a passagem da amostra, determinando a informação que será analisada (GIVAN, 2013).

Desta forma, os resultados são obtidos através da medida e da análise de dispersão da luz e emissão de fluorescência (AGHAEIPOUR et al., 2013) resultantes dos sinais de partículas fotossensíveis (LUDWIG et al., 2011).

1.4.9 Microscopia de campo claro

O campo claro é uma ferramenta de microscopia óptica utilizada para visualizar amostras biológicas (ao natural ou coradas) com tamanho mínimo de aproximadamente 2 μm , que assegura resultados significativos de importância em vários campos de pesquisa desde as observações realizadas por Robert Hooke em 1600 (WILSON; BACIC, 2012). É utilizado para observar processos biológicos fornecendo dados sobre a morfologia celular (ZARITSKY et al., 2011) quando a luz passa pelo artefato, produzindo uma imagem escura sobre um fundo brilhante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Fotoinativar células da bactéria *E. coli*, através da geração de oxigênio singlete por um híbrido inorgânico-orgânico formado por nanozeólita L (nZeol-L) funcionalizada em sua superfície com ftalocianina de silício (SiPC) e ativado por luz solar natural.

2.2 Objetivos específicos

- Funcionalizar nanozeólita L com ftalocianina de silício (nZeol-SiPC);
- Carregar positivamente a superfície de nZeol-SiPC com moléculas de 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES), tornando o material hábil para interagir eletrostaticamente com a membrana negativa da bactéria *E. coli*;
- Caracterizar o nanomaterial;
- Realizar testes de viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo, com células de mamífero (BALB/c 3T3 clone A31) e, posteriormente, com a bactéria *E. coli*.

Figura 17 - Ilustração do nanomaterial (nZeol-SiPC/APTES) agindo sobre a bactéria *E. coli* quando ativado por luz solar natural.

Fonte: Autoria própria.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Na tabela 1, são apresentados os produtos químicos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa e na tabela 2, são apresentadas as informações sobre os sistemas biológicos utilizados. Soluções foram preparadas utilizando água deionizada Milli-Q (Millipore, 18,2 MΩ.cm a 25 °C).

Tabela 1 - Produtos químicos.

Reagente	Teor	Procedência
1-Butanol	99,9 %	Sigma-Aldrich
3- aminopropiltrietoxisilano (APTES)	≥ 98,0%	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de Sódio	99,7-100,3%	AMRESCO
Brometo de Potássio	99,0 %	Vetec
Clorobenzeno	99,8%	Sigma-Aldrich
Clorobenzeno	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
Diclorometano	99,5 %	Synth
Dulbeco Modificado PBS sem magnésio, cálcio e antibiótico	-	Life technologies
Etanol	99,0 %	Sigma-Aldrich
Genapol® X-080	-	Sigma-Aldrich
Glucose	-	AMRESCO
Guava ViaCount® Reagent para citometria de fluxo	-	Merck-Millipore
Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Sem fenol, bicarbonato e com glutamina (pH 7,4)	-	Cultilab
Meio Luria Broth (LB)	-	Sigma Aldrich
Nanocristais de Zeolita L (Lucidot® NZL 40)	-	Clariant GmbH
Ninidrina	99,0 %	Vetec
2,9,16,23-tetra- <i>terc</i> -butil-29 <i>H</i> ,31 <i>H</i> -di-hidroxi-ftalocianina de silício	80,0 %	Sigma-Aldrich
Solução de Penicilina/Estreptomicina	-	Vitrocell Embriolife
Soro fetal bovino (FBS). Estéril, inativo e sem micoplasma,	-	Vitrocell Embriolife
Tolueno	99,5 %	Synth
Trietilamina	99,0 %	Vetec
Tripsina com EDTA. Com bicarbonato, sódio e antibiótico	-	Vitrocell Embriolife
Vermelho de fenol	-	Sigma-Aldrich

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Sistemas biológicos.

Reagente	Código	Procedência
<i>Escherichia coli</i>	0696	Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI)
Células de fibroblasto de camundongo BALB/c 3T3 clone A31	0047	Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ)

Fonte: Autoria própria.

3.2 Reação de Funcionalização de nanozeólita L (nZeol-L) com 2,9,16,23-tetra-*terc*-butil-29*H*,31*H*-di-hidroxi-ftalocianina de silício (SiPC)

Nanocristais de zeólita L foram previamente secos em forno mufla por 24 horas a 250°C. Após a secagem, 300 mg dos nanocristais foram transferidos para um recipiente de teflon seco. Em seguida, 50 mL de clorobenzeno anidro foram adicionados ao recipiente de teflon e o sistema foi fechado e colocado em banho de ultrassom por 30 minutos, visando diminuir a aglomeração dos nanocristais. Passados 30 minutos, 60 mg de SiPC foram adicionadas ao sistema e, por 10 min, foi realizado o borbulhamento de gás N₂ para evitar a presença de umidade na amostra. Novamente, o sistema foi levado ao banho de ultrassom por 30 minutos e, posteriormente, deixado em refluxo a 135°C em banho de óleo de silicone por 6 horas com agitação magnética. Após a reação de funcionalização, a amostra foi centrifugada por 15 minutos em 14.000 rpm, para separar o nanomaterial (nZeol-SiPC) do solvente, que foi descartado. Finalmente, o nanomaterial foi lavado sequencialmente para a retirada do excesso de corante com clorobenzeno, tolueno, diclorometano e solução de genapol 0,2% até a obtenção de um sobrenadante translúcido, ou seja, do material com total ausência de moléculas de SiPC que não foram ligadas covalentemente aos cristais de zeólita L. Semelhante procedimento foi reportado na literatura (STRASSERT et al., 2009; GRÜNER et al., 2013).

3.3 Aaminação da superfície externa de nZeol-SiPC com 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES)

Em um tubo de teflon, foram suspensos 20 mg de nZeol-SiPC em 10 mL de tolueno anidro e levou-se o sistema ao banho de ultrassom por 30 minutos. Após, 0,1 mL de trietilamina foi adicionado à suspensão e novamente o sistema foi levado

a banho de ultrassom de 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de APTES e a amostra foi submetida a refluxo durante 2 horas, sob uma atmosfera de nitrogênio. Após arrefecimento, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 14.000 rpm para coleta do nanomaterial e em seguida lavada com tolueno, e duas vezes com etanol. Finalmente, a amostra foi seca em estufa durante 24h a 70°C. O procedimento foi realizado seguindo um modelo da literatura de modificação de superfície sílica com moléculas de APTES (KALLURY; MACDONALD; THOMPSON, 1994).

3.4 Ensaios de viabilidade de células expostas a nZeol-SiPC/APTES e luz artificial e luz solar natural

Os ensaios foram realizados em parceria com o Grupo de Química Medicinal do Instituto de Química de São Carlos, com a colaboração do Prof. Dr. Andrei Leitão. Nesta seção, serão expostos os procedimentos utilizados para o cultivo das células, bem como os procedimentos para análise do número de células mortas pela técnica de citometria de fluxo. Embora o principal objetivo deste trabalho tenha sido a fotoinativação de uma espécie presente em água contaminada (bactéria *E. coli*), realizou-se testes iniciais de viabilidade celular com uma linhagem de células de fibroblasto de camundongo (BALB/c 3T3 clone A31). De acordo com o *guia* EEC/OECD para testes químicos nº 432 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, *Organization for Economic Cooperation and Development* - OECD), as células da linhagem BALB/c 3T3 são comumente utilizadas em testes para a avaliação da citotoxicidade de substâncias químicas quando submetidas à irradiação com luz (OECD, 2004). Assim, como ensaio piloto, essas células foram utilizadas para fornecer dados iniciais relativos à eficácia de nZeol-SiPC/APTES frente a um sistema biológico. Adicionalmente, foi possível comparar os resultados obtidos de testes realizados com luz solar natural e luz artificial branca. Em outra etapa, realizaram-se os ensaios de viabilidade celular com a bactéria *E. coli*.

3.4.1 Cultivo das células de BALB/c

As células cultivadas foram mantidas na estufa com 5% de CO₂, a 37°C e 90% de umidade, em meio DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)

suplementado com 3,5 g/L de glicose, 10% de FBS (Soro fetal bovino) e 1% de solução penicilina/estreptomicina.

Para a preparação da suspensão celular, utilizou-se uma solução 0,25% tripsina/EDTA (10 minutos de incubação na estufa). Para a neutralização da ação da tripsina, adicionou-se uma solução 20% FBS em PBS (tampão fosfato-salino). A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi removido e as células foram suspensas em 1mL de meio de cultura pra contagem da concentração em câmara de Neubauer. A concentração celular determinada foi de 1×10^6 cel mL⁻¹.

3.4.2 Ensaio de viabilidade celular de BALB/c sob a irradiação de luz artificial branca e luz solar natural

Para avaliar a eficácia do nanomaterial em fotoinativar células BALB/c 3T3 clone A31, quando ativado por luz, um primeiro sistema (a), em um tubo Falcon contendo uma suspensão de 1 mg de nZeol-SiPC/APTES em 1,5 mL de PBS (pH 7,4), foi levado a banho de ultrassom por 10 minutos e depois transferido para uma cubeta de quartzo, seguido pela adição de 0,5 mL de uma suspensão de BALB/c em PBS de concentração 1×10^6 cel mL⁻¹. Após diluição, estabeleceu-se uma concentração final de células no sistema em $2,5 \times 10^5$ cel mL⁻¹. Outro sistema (b), contendo células com mesma concentração utilizada em (a) e sem o nanomaterial, foi preparado visando avaliar a quantidade de células mortas apenas em função da radiação. Ambos os sistemas (a e b) foram expostos à luz artificial branca, em agitação magnética constante e temperatura ambiente. Em 0, 30, 60 e 90 minutos, foram coletados 0,1 mL de cada cubeta e transferidos para uma placa de 96 poços para medição da viabilidade. Também, foram realizados controles com as células suspensas em PBS com e sem a presença do nanomaterial, ambos em total ausência de luz. Para a medição da quantidade de células mortas, as amostras coletadas na placa de 96 poços nos diferentes intervalos de tempo foram analisadas utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. A detecção da resposta celular foi realizada após a incubação das amostras (todas em triplicata) por 5 minutos com o reagente ViaCount® no escuro, com análise realizada em um equipamento Guava EasyCyte 8HT (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt) usando o módulo Guava ViaCount Software. A intensidade da luz artificial branca utilizada no

experimento foi medida em 300 W m^{-2} utilizando-se um medidor de irradiância portátil.

3.4.3 Cultivo das células da bactéria *E. coli*

As bactérias *Escherichia coli* foram cultivadas em meio Luria-Broth (LB) em temperatura ambiente. Uma passagem foi realizada um dia antes da análise, seguido de incubação e análise dos resultados por citometria de fluxo após 12 horas. A contagem das células foi realizada com o reagente ViaCount® (Merck) seguindo procedimentos do fabricante. Devido ao elevado número de células, foram realizadas diluições para atingir a concentração de $4 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$.

3.4.4 Ensaios de viabilidade celular de *E. coli* sob a irradiação de luz solar natural

Em um tubo Falcon, um sistema (a) contendo uma suspensão de 1 mg de nZeol-SiPC/APTES em 1,5 mL de PBS (pH 7,4), foi levado a banho de ultrassom por 10 minutos e depois transferido para uma cubeta de quartzo, seguido pela adição de 0,5 mL de uma suspensão de *E. coli* em PBS de concentração $4 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$. Após diluição, estabeleceu-se uma concentração final de células no sistema em $1,0 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$. Outro sistema (b), contendo a mesma concentração de bactérias, porém sem nanomaterial, foi preparado visando avaliar a quantidade de células mortas apenas em função da radiação. Ambos os sistemas (a e b) foram expostos à luz solar natural, sob uma agitação magnética constante e temperatura ambiente. Em 0, 30, 60 e 90 minutos, foram coletados 0,1 mL de cada cubeta e em seguida transferidos para uma placa de 96 poços para medição de viabilidade celular. Também, foram realizados controles com as células diluídas em PBS com e sem a presença do nanomaterial, ambos em total ausência de luz. Uma diluição foi feita para reduzir a concentração de células para $5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ e então 50 μL de células foram misturados com 200 μL do reagente ViaCount®, seguidos por pelo menos 5 minutos de incubação. A análise foi realizada utilizando-se o equipamento Guava EasyCyte 8HT (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt) e o perfil de viabilidade foi obtido através do programa Guava Incyte dentro do pacote de programas GuavaSoft 2.7. Os testes foram realizados em dois dias independentes,

ambos com intensidade de luz solar medida em aproximadamente 1000 W m^{-2} .

3.5 Caracterização dos materiais

3.5.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

Utilizou-se a técnica de EDS para caracterizar através de uma análise qualitativa e semiquantitativa os elementos presentes nos nanocristais de zeólita L. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI, do Instituto de Química de São Carlos, em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (*Atmosphere Thin Window*), de resolução de 133 eV à 5,9 keV e área de 10mm^2 quadrado, acoplado a um Microscópio Eletrônico ZEISS LEO 440 (Cambridge, England). Utilizou-se um padrão de cobalto para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, *dead time* de 30%, corrente de 2,82 A e *I probe* de 2,5nA. As medidas foram feitas em três diferentes áreas, cada uma com $640 \times 640 \mu\text{m}$ e uma média final pode ser obtida.

3.5.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

De forma complementar as análises por EDS, os cristais de nanozéolita L também foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho.

As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI, do Instituto de Química de São Carlos, em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo IRAffinity 1. Foram obtidos espectros no modo transmitância, com faixa de medição de 400 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 34 *scans*.

A amostra de nanozeólita L em pó foi prensada com brometo de potássio (KBr) para o preparo da pastilha de medição.

3.5.3 Espectroscopia de absorção molecular UV-vis

O tipo de molécula de ftalocianina utilizada no presente trabalho, 2,9,16,23-tetra-*terc*-butil-29*H*,31*H*-di-hidroxi-ftalocianina de silício, pôde ser

caracterizada através de seu espectro de absorção UV-vis com varredura na região de 300 a 750 nm. As análises foram feitas em um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-2600 no Laboratório de Química Supramolecular do IQSC.

Para medição, utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm, sendo a esta adicionado 3 mL de uma solução 10^{-5} mol L⁻¹ de ftalocianina solubilizada em diclorometano.

3.5.4 Espectroscopia de reflectância difusa

O espectro de absorbância na região UV-vis da amostra sólida de nZeol-SiPC foi obtido utilizando-se a técnica de reflectância difusa no modo absorbância. Adicionalmente, mediu-se a absorbância de uma amostra sólida de SiPC pura. Ambas as amostras sólidas foram diluídas em KBr. A obtenção dos espectros foi realizada utilizando o sulfato de bário (BaSO₄) como referência e com varredura na região de 300 a 750 nm. Utilizou-se um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-2600 equipado com uma esfera de integração ISR-2600.

3.5.5 Espectroscopia de excitação e emissão

As propriedades fotofísicas de nZeol-SiPC também foram analisadas por espectros de excitação do sólido suspenso em diclorometano. As análises foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI, do Instituto de Química de São Carlos, em um Espectrofluorímetro – Marca Hitachi – modelo F-4500.

Uma massa de 1 mg de nZeol-SiPC foi inicialmente suspensa em 3 mL de diclorometano em uma cubeta de quartzo para fluorescência e espectros de excitação e emissão foram obtidos com $\lambda_{\text{emissão}}$ em 730 nm e $\lambda_{\text{excitação}}$ em 640 nm. Algumas diluições foram necessárias para obtenção dos espectros, impossibilitando a real determinação da concentração do sólido, uma vez que o mesmo não pode ser solubilizado. A homogeneidade do sistema não pôde ser garantida, mesmo em agitação constante, devido a observação de uma maior quantidade de sólido depositado no fundo da cubeta.

3.5.6 Análise termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas a fim de avaliar a temperatura de decomposição térmica da molécula de ftalocianina de silício para assim, através da perda de sua massa, poder mensurar o grau de cobertura na superfície de nanozeólita L por esta molécula após a reação de funcionalização descrita no tópico 3.2. Para isto, três tipos de amostras sólidas foram analisadas: Cristais de nanozeólita L (nZeol-L), moléculas de ftalocianina de silício (SiPC) e cristais de nanozeólita L funcionalizados com ftalocianina de silício (nZeol-SiPC).

A caracterização foi realizada no Grupo de Reatores Químicos e Catálise Heterogênea do Instituto de Química de São Carlos. Utilizou-se um equipamento da marca Mettler Toledo, modelo TGA/DSC 1. Os ensaios foram realizados em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹), taxa de aquecimento de 5°C/min, com temperatura de aquecimento entre de 25 a 1000°C.

3.5.7 Análise qualitativa da presença APTES na superfície da zeólita L (teste da ninidrina)

A presença de moléculas de APTES que foram ligadas covalentemente na superfície zeolítica através de ligações Si-O-Si (Seção 3.3), pôde ser verificada qualitativamente pelo teste da ninidrina. Inicialmente, a solução teste de ninidrina foi preparada dissolvendo-se 0,5 gramas de ninidrina 99% em 40 mL de 1-butanol e 10 mL de água deionizada Milli-Q (HUBER; CALZAFERRI, 2004). Em seguida, a 3 mL da solução teste de ninidrina, adicionou-se 10 mg de nZeol-SiPC-APTES. O sistema foi agitado em temperatura ambiente por 30 minutos. Após, o sistema foi centrifugado e imagens foram obtidas da coloração da solução de ninidrina antes e após a inserção do nanomaterial, visando assim identificar uma coloração roxa característica do reagente de Ruhemann. A presença de APTES também pode ser identificada por espectroscopia de absorção UV-vis da solução. Seguindo os mesmos procedimentos da análise de ninidrina em agitação com nZeol-SiPC-APTES, realizou-se o teste da ninidrina com a adição de APTES livre para fins de comparação.

3.5.8 Microscopia de campo claro

Imagens de microscopia de campo claro dos sistemas biológicos BALB/c 3T3 clone A31 foram obtidas no Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações do Instituto de Química de São Carlos, utilizando-se um microscópio Olympus (modelo CKX41) e aumento de 10X. Imagens da bactéria *E. coli* foram obtidas no Grupo de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos, utilizando-se um microscópio Olympus (modelo BX41) e aumento de 100X.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

A análises qualitativa e semiquantitativa dos nanocristais de zeólita L foram obtidas por EDS. As figuras 18, 19 e 20, respectivamente, representam os espectros de três diferentes áreas de uma amostra contendo cristais de nanozeólita L pura, e a média está representada na tabela 3.

Figura 18 - Espectro da primeira área analisada por EDS de nanozeólita L.

Figura 19 - Espectro da segunda área analisada por EDS de nanozeólita L.

Figura 20 - Espectro da terceira área analisada por EDS de nanozeólita L.

Tabela 3 - Média da composição elementar de nZeol-L obtida pelas três áreas analisadas por EDS.

Elemento	% (m/m)
Oxigênio (O)	37,13
Alumínio (Al)	10,76
Silício (Si)	31,23
Potássio (K)	20,88

Por EDS, observou-se a presença de potássio como contra-íon presente nos canais da zeólita. Este metal foi inserido através de uma troca iônica, em que 1 mg de zeólita L foi suspensa em 2 mL de uma solução 1 mol L^{-1} de KBr, sob agitação, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Tal procedimento visa eliminar resíduos ácidos do processo comercial de síntese dos cristais.

Através dos resultados expostos na tabela 3, verifica-se uma eficiente troca iônica, bem como uma razão Si/Al de aproximadamente 3. Por ser uma análise semi-quantitativa, o principal objetivo da caracterização por EDS foi à determinação qualitativa dos elementos presentes na zeólita L.

4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Por espectroscopia de infravermelho, foi possível fazer uma caracterização da estrutura da zeólita L, com interpretação baseada na atribuição de bandas para certos grupos estruturais do aluminossilicato (figura 21).

Figura 21 - Espectro de infravermelho dos cristais de nanozeólita L.

No intervalo $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ verificaram-se intensas transições vibracionais que são atribuídas a vibrações tetraédricas internas resultantes de estiramento assimétrico ($\nu_{\text{as}}(\text{T-O-T})$), onde T= Si, Al. As transições vibracionais identificadas em $700\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$ são atribuídas aos modos de estiramento simétrico envolvendo principalmente os átomos tetraédricos ($\nu_{\text{s}}(\text{T-O-T})$). A banda de $600\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ está relacionada com a presença de anéis duplos de 6 membros (D6R), característicos da estrutura. Os modos de estiramento são sensíveis à relação Si / Al e podem mudar para uma frequência mais baixa aumentando-se o número de átomos de alumínio tetraédrico (RUIZ, 2006). As transições vibracionais verificadas em $1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ e $3200\text{-}3700 \text{ cm}^{-1}$, estão relacionadas com a presença de moléculas de água, facilmente capturada da atmosfera pelos cristais de zeólita.

4.3 Espectroscopia de absorção molecular UV-vis

Previamente à funcionalização de nanozeólita L com SiPC, foi obtido o espectro eletrônico na região UV-vis da ftalocianina dissolvida em diclorometano (figura 22), uma vez que estas moléculas são pouco solúveis em água.

Figura 22 - Espectro de absorção UV-vis de SiPC ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diclorometano realizado em temperatura ambiente.

Na figura 22, observa-se a presença das duas bandas principais de absorção que são características de ftalocianinas (Banda Soret e banda Q). Para a espécie analisada (2,9,16,23-tetra-*terc*-butil-29*H*,31*H*-di-hidroxi-ftalocianina de silício) verificou-se um máximo de absorção em 355 nm, referente a banda Soret, e um máximo de absorção em 679 nm, referente a banda de maior intensidade (banda Q).

4.4 Espectroscopia de reflectância difusa

Após a reação de funcionalização de nanozeólita L com ftalocianina, pôde-se obter o espectro de absorção da amostra sólida do nanomaterial resultante (nZeol-SiPC), representado na figura 23 (linha vermelha).

Figura 23 - Espectros de absorção UV-vis obtidos por reflectância difusa de SiPC e nZeol-SiPC no estado sólido e dissolvidos em KBr.

Adicionalmente, obteve-se o espectro da uma amostra sólida de SiPC pura (linha azul). A obtenção do espectro de absorção por reflectância difusa do sólido serviu como uma primeira análise para verificar a presença do corante SiPC na superfície zeolítica, através da identificação de suas bandas características de

absorção. Os espectros de absorção dos sólidos obtidos por reflectância difusa, quando comparados aos espectros de absorção de SiPC obtidos de uma solução (fig. 22), apresentaram bandas mais largas, característica esta que surge devido a maior agregação das moléculas de ftalocianinas em virtude do aumento das interações intermoleculares que surgem na amostra sólida (TOMA; BONIFACIO; ANAISSI, 2005; MI et al., 2003).

Ainda, comparando os dois espectros de absorção por reflectância difusa mostrados na figura 23, observa-se que além do maior alargamento das bandas em relação ao espectro obtido de uma solução (figura 22), ambos os espectros apresentaram um desvio da banda Q para a região do vermelho. Embora seja mais comum à presença de arranjos cofaciais (agregados tipo H) em ftalocianinas, o que levaria a um deslocamento para a região do azul, reporta-se na literatura que a presença de substituintes volumosos em ftalocianinas pode levar a formação de agregados do tipo J, observando-se neste caso um deslocamento da banda Q de absorção para a região do vermelho (NYOKONG, 2010; ISAGO, 2003). De fato, este foi o comportamento observado na ftalocianina utilizada neste trabalho, que contém grupamentos volumosos terc-butílicos. Por fim, também é válido destacar que o espectro de nZeol-SiPC por reflectância difusa (linha vermelha) apresentou um menor alargamento das bandas em relação ao espectro de SiPC pura (linha azul), que está associado a menor quantidade de espécies aglomeradas do corante após serem suportados na superfície da nanozeólita L.

4.5 Espectroscopia de excitação e emissão

Foram obtidos espectros de excitação e emissão de nZeol-SiPC em diclorometano (figura 24). Uma intensidade máxima de 679 nm foi observada no espectro de excitação, o que coincide com o máximo observado no espectro de absorção de SiPC em solução 10^{-5} mol.L⁻¹ (figura 22), onde predominam as espécies monoméricas do corante. Tal evidência comprova que as propriedades monoméricas de SiPC são mantidas em nZeol-SiPC. Estudos prévios já demonstraram que a excitação de SiPC na forma monomérica está diretamente relacionada com a produção de ¹O₂ através de uma forte emissão observada em 1270 nm (GRÜNER et al., 2013; STRASSERT et al., 2009). Neste trabalho, a excitação de SiPC levou a uma emissão desta molécula com máximo de intensidade em 684 nm (figura 24,

linha azul). Portanto, tais resultados indicam que o híbrido apresentado neste trabalho pode ser adequado para processos de fotodegradação, uma vez que as propriedades fotofísicas de SiPC são mantidas na superfície da zeólita.

Figura 24 - Espectros de excitação e emissão de nZeol-SiPC em diclorometano.

4.6 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas permitiram identificar SiPC e estimar o grau de cobertura da superfície dos cristais de zeólita L por estas moléculas, através da análise da perda de massa identificada em suas temperaturas de degradação.

As figuras 25, 26 e 27 representam as análises realizadas com nZeol-L, SiPC e nZeol-SiPC, respectivamente. A perda de massa dos respectivos materiais encontra-se representada pela curva termogravimétrica (linha preta) e a primeira derivada da curva (linha azul). A partir da análise de nZeol-L (figura 25), verificou-se uma perda de massa de 10,34% até a temperatura de 250 °C. Esta perda está associada à presença de moléculas de água, facilmente capturadas pela atmosfera pela estrutura hidrofílica das zeólitas. Uma vez que cristais zeolíticos podem suportar elevadas temperaturas, uma massa residual de 89,54% foi obtida após aquecimento até 1000 °C. A análise com moléculas de SiPC (figura 26), permitiu avaliar a

decomposição térmica do material orgânico para posterior comparação com as curvas termogravimétricas de moléculas SiPC suportadas em nanozeólita L. A decomposição de SiPC ocorreu em pelo menos 2 etapas, com temperaturas máximas observadas em 380 e 565 °C. Entre 250 e 450 °C, 46,40% do material foi degradado seguido de 39,70% entre 450 e 700 °C, sendo, portanto estas duas faixas de temperaturas responsáveis pela maior taxa de degradação de SiPC. Na figura 27, apresenta-se a análise dos cristais de nanozeólita L funcionalizados com o corante (nZeol-SiPC). Entre 25 e 250 °C verificou-se uma perda de massa em torno de 8,44%, taxa menor que quando observado apenas os cristais de zeólita na figura 25, o que condiz com o fato dos cristais de zeólita diminuírem sua afinidade por moléculas de H₂O após serem funcionalizados com ftalocianinas, que são moléculas hidrofóbicas. Assim como na figura 26, quando analisado apenas SiPC, observou-se pelo menos 2 pontos de degradação referentes a presença do corante, com temperaturas máximas observadas em 360 e 465 °C. Entre 250 e 450 °C 3,25% do material foi degradado, seguido de 3,26% entre 450 e 700 °C.

Figura 25 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) de nZeol-L.

Figura 26 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) de SiPC.

Figura 27 - Curvas termogravimétricas (TG e DTG) de nZeol-SiPC.

Na tabela 4, são apresentados os valores de perda de massa (%) nos intervalos de tempo para as amostras analisadas, bem como suas respectivas massas residuais.

Tabela 4 - Perda de massa observada em nZeol-L, SiPC e nZeol-SiPC com seus respectivos picos de degradação.

Amostra	Perda de Massa (%)			
	25 - 250°C	250-450°C	450-700°C	Massa residual (%)
nZeol-L	10,34	$16,95 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-1}$	89,54
SiPC	1,20	46,40	39,70	12,7
nZeol-SiPC	8,44	3,25	3,26	85,05

Consta na literatura que, dadas as dimensões de cada cristal de zeólita L, com 50 nm de altura e também de comprimento, área superficial de 12000 nm^2 e geometria aproximada de um cilindro, é possível estimar que um máximo de 6×10^3 moléculas SiPC (área estimada em 2 nm^2) podem ser ancoradas na superfície de cada cristal de nanozeólita L, via ligação covalente entre grupos SiOH presentes na superfície da zeólita L e grupos OH axiais ligados ao átomo central de silício em SiPC, formando assim ligações covalentes Si-O-Si (STRASSERT et al., 2009), como ilustrado na figura 28.

Figura 28. Representação da ligação entre nZeol-L e SiPC.

Fonte: Autoria própria.

Desta forma, foi possível mensurar uma quantidade de moléculas de SiPC da ordem de 12×10^3 por cristal de nanozeólita, valor este acima do proposto teoricamente, porém na mesma ordem de grandeza, comprovando a eficiência da reação de funcionalização da zeólita L com SiPC descrita na seção 3.2 deste trabalho.

4.7 Análise qualitativa da presença APTES na superfície da zeólita L (teste da ninidrina)

Seguindo os procedimentos descritos na seção 3.5.7, foi possível identificar qualitativamente a presença de APTES ligado covalentemente na superfície de nZeol-SiPC, através formação do reagente de Ruhemann, o qual exibe uma intensa coloração violeta. De forma complementar, as bandas características do reagente de Ruhemann puderam ser identificadas (figura 29.a e 29.b).

Figura 29 - Teste da ninidrina realizado com APTES (a) e nZeol-SiPC-APTES (b) e os respectivos espectros de absorção UV-vis.

Em ambos os testes, verificou-se a coloração violeta característica da presença de APTES. Bandas com máximo de absorção característicos do reagente de Ruhemman foram identificadas em 413 e 573 nm em (a) e 414 e 577 nm em (b). A diferença de intensidade da cor roxa é proporcional à concentração dos grupos amino.

4.8 Testes de viabilidade celular

4.8.1 Ensaios com BALB/c 3T3 clone A31 (luz artificial)

Os primeiros ensaios de viabilidade celular de BALB/c foram realizados expondo as células (em solução de PBS), com e sem a presença de nZeol-SiPC/APTES à luz artificial branca. Também, foi realizado o controle das amostras em total ausência de luz.

Na figura 30, verifica-se o controle celular de BALB/c no escuro (barras cinza) com a viabilidade permanecendo no mesmo patamar durante o experimento. Porém, quando expostas a luz artificial branca (barras laranja), verifica-se um pequeno decréscimo da viabilidade, com 90,1% das células permanecendo vivas até 90 minutos.

Figura 30 - Ensaio de viabilidade celular de BALB/c mantidas no escuro (barras cinza) e expostas à luz artificial branca (barras laranja) nos diferentes intervalos de tempo.

Na figura 31, encontram-se representados os resultados da ação de nZeol-SiPC sobre as células de BALB/c. No primeiro caso (barras azuis), analisou-se a viabilidade da amostra no escuro, permitindo assim, uma observação da citotoxicidade do nanomaterial sobre as células. Verificou-se um decréscimo gradual da viabilidade a partir do primeiro intervalo, e uma viabilidade de 75,1% foi verificada na última medição em 90 minutos. Porém, o sistema exposto à luz artificial branca (barras vermelhas) ocasionou um elevado decréscimo no número de células mortas em virtude dos efeitos causados pela fotoativação de nZeol-SiPC/APTES com a luz artificial branca. Com isso, apenas 8,9% de viabilidade celular foi verificada no último intervalo medido em 90 minutos. Verificou-se também, que o maior decréscimo no número de células vivas ocorreu entre 30 e 60 minutos.

Figura 31 - Ensaios de viabilidade celular de BALB/c + nZeol-SiPC/APTES mantidas no escuro (barras azuis) e expostas à luz artificial branca (barras vermelhas) nos diferentes intervalos de tempo.

Portanto, constatou-se a eficiência do nanomaterial em fotoinativar células de BALB/c quando ativado pela luz, com um número significativo de células mortas (91,1 %) ao final dos testes, valor este significativamente maior que o número de células mortas apenas por ação da luz (9,9 %) e por citotoxicidade do nanomaterial (24,9 %).

4.8.2 Ensaios com BALB/c 3T3 clone A31 (Luz solar)

Após a comprovação da eficiência de nZeol-SiPC/APTES na fotoinativação de células de BALB/c sob irradiação com luz artificial branca, realizaram-se testes com luz solar natural, seguindo os mesmos procedimentos dos testes com luz artificial.

Na figura 32, verifica-se o controle celular de BALB/c no escuro (barras cinza) com a viabilidade permanecendo no mesmo patamar durante o experimento, assim como exposto na figura 30. Porém, quando irradiadas com a luz solar natural (barras

laranja), verificou-se um elevado decréscimo da viabilidade, com maiores danos causados apenas a partir de 60 minutos, onde a viabilidade celular decresceu de 90,4 para 41,2% no último intervalo (90 minutos).

Figura 32 - Ensaio de viabilidade celular de BALB/c mantidas no escuro (barras cinza) e expostas à luz solar natural (barras laranja) nos diferentes intervalos de tempo.

Na figura 33, as barras azuis representam os testes de viabilidade realizados com nZeol-SiPC/APTES no escuro, assim como também mostrado na figura 31. Tais resultados permitem verificar que mesmo havendo citotoxicidade do nanomaterial frente às células, só observa-se um acentuado número de células mortas quando nZeol-SiPC/APTES é ativado pela luz solar (barras vermelhas). No primeiro intervalo (entre 0 e 30 minutos), apenas 8,7% de viabilidade foi verificada, permanecendo este valor com pequenas alterações até o último intervalo analisado.

Figura 33 - Ensaios de viabilidade celular de BALB/c + nZeol-SiPC/APTES mantidas no escuro (barras azuis) e expostas à luz solar natural (barras vermelhas) nos diferentes intervalos de tempo.

Ainda, verificando-se a viabilidade das células com o nanomaterial e sob a ação da luz, um menor tempo foi necessário para matá-las quando o sistema foi exposto à luz solar (figura 33, barras vermelhas) do que quando exposto à luz artificial branca (figura 31, barras vermelhas), o que está de acordo com a maior intensidade da luz do sol, permitindo assim, uma maior eficiência do nanomaterial na fotoinativação das células de BALB/c. Tal conclusão pode ser visualizada na tabela 5, onde todos os dados de viabilidade celular obtidos são comparados no primeiro intervalo de 30 minutos.

Tabela 5 - Porcentagem de células de BALB/c mortas em 30 minutos para todos os sistemas apresentados nas figuras 30, 31, 32 e 33.

Amostras	Porcentagem de células fotoativadas até o intervalo de 30 min. (%)
BALB/c (escuro)	0
nZeol-SiPC/APTES + BALB/c (escuro)	5,3
BALB/c (luz artificial)	0
nZeol-SiPC/APTES + BALB/c (luz Artificial)	25,6
BALB/c (luz solar)	2,6
nZeol-SiPC/APTES + BALB/c (luz solar)	91,3

Os resultados apresentados indicam que, embora células de BALB/c sejam levadas à morte apenas por danos causados pela luz ou somente pela citotoxicidade do nanomaterial, apenas quando o sistema é exposto à luz, ou seja, quando nZeol-SiPC/APTES é fotoativado, uma elevado número de células de BALB/c são mortas, onde, em apenas 30 minutos de exposição à luz solar, 91,3% de morte celular foi observada.

Adicionalmente, foram obtidas imagens por microscopia de campo claro (ampliação de 10 X) das células de BALB/c antes (figura 34.a) e depois (figura 34.b) de 30 minutos de tratamento com luz do sol e nZeol-SiPC/APTES. Não foi possível observar células intactas após a ação do nanomaterial ativado pela luz (figura 34.b), o que está de acordo com a elevada quantidade de células mortas detectadas por citometria de fluxo.

Figura 34 - Imagens obtidas por microscopia de células de BALB/c antes do tratamento com luz do sol (a) e depois de 30 minutos de exposição à luz solar com o nanomaterial (b). Foi utilizado um microscópio Olympus com ampliação de 10X.

4.8.3 Ensaios com a bactéria *E. coli* (luz solar)

Uma vez verificada uma maior eficiência do híbrido nZeol-SiPC em fotoinativar BALB/c com a luz solar, realizaram-se os ensaios de viabilidade com a bactéria *E. coli*, utilizando-se apenas luz solar como fonte de excitação, atendendo ao principal objetivo do trabalho.

Como indicado na figura 35, a viabilidade celular da *E. coli* mantida no escuro (controle celular), permaneceu no mesmo patamar ao longo dos intervalos. Ao contrário, quando as bactérias foram expostas à luz solar, observou-se morte celular, com aproximadamente 69,7% de viabilidade celular detectada após o último intervalo de tempo (90 minutos).

Figura 35 - Ensaios de viabilidade celular de bactérias *E. coli* mantidas no escuro (barras cinza) e expostas à luz solar natural (barras laranja) nos diferentes intervalos de tempo.

Na figura 36, os resultados dos ensaios realizados com *E. coli* sob a ação de nZeol-SiPC/APTES no escuro (barras azuis), mostram que o nanomaterial não

apresentou citotoxicidade as bactérias, que permaneceram com viabilidade em torno de 100% até o último intervalo avaliado. No entanto, quando o sistema foi exposto à luz solar (barras vermelhas), a ativação de nZeol-SiPC/APTES induziu um rápido decréscimo no número de células vivas, onde apenas 34,8 % das bactérias foram detectadas vivas já no primeiro intervalo medido em 30 minutos. Este valor sofreu pequenas alterações até o último intervalo observado (90 min).

Figura 36 - Ensaios de viabilidade celular de bactérias *E. coli* + nZeol-SiPC/APTES mantidas no escuro (barras azuis) e expostas à luz solar (barras vermelhas) nos diferentes intervalos de tempo.

Como apresentado na figura 35, a exposição das bactérias à luz solar sem a presença do nanomaterial induziu a morte de bactérias. Isto é consistente com o fato de que a irradiação solar pode inibir a replicação do DNA e também induzir mutações na bactéria. No entanto, sabe-se que a morte celular induzida unicamente pela luz solar pode ser lenta nos primeiros minutos de exposição devido a mecanismos de autodefesa dessas células (RINCÓN; PULGARIN, 2003). Os resultados apresentados na figura 37, referente aos primeiros 30 minutos dos testes

de fotoinativação, mostram um rápido decréscimo do número de bactérias vivas quando em presença de nZeol-SiPC/ APTES e luz natural, em comparação com a morte de bactérias expostas à luz solar sem a presença do nanomaterial.

Figura 37 - Efeito da luz do sol natural (1000 W m^{-2}) para a fotoinativação de bactérias (*E. coli*) sem (linha azul) e na presença de nZeol-SiPC (linha vermelha) nos primeiros 30 min dos testes de fotoinativação.

Estudos futuros poderão trazer maiores esclarecimentos em relação à quantidade de células que podem ser mortas pelo nanomaterial, por exemplo, modificando-se a concentração de nZeol-SiPC/APTES até a detecção de um valor máximo para a fotoinativação das bactérias.

Imagens foram obtidas por microscopia (ampliação de 100 X) das células de *E. coli* antes (figura 38.a) e depois (figura 38.b) de 90 minutos de tratamento com luz do sol e n-Zeol-SiPC/APTES. Embora tenha sido possível detectar bactérias vivas após os 90 minutos de ação do nanomaterial (figura 36), este número foi visivelmente inferior a quantidade de bactérias vivas visualizadas antes do tratamento com o nanomaterial e luz solar natural, portanto, em concordância com os ensaios de viabilidade celular.

Figura 38 - Imagens obtidas por microscopia de células de *E. coli* antes (a) e depois (b) do tratamento com luz solar e nZeol-SiPC/APTES. Foi utilizado um microscópio Olympus com ampliação de 100X.

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, evidenciou-se que o híbrido inorgânico-orgânico desenvolvido (nZeol-SiPC/APTES) apresentou desempenho eficiente, quando ativado por luz solar, para induzir a fotoinativação de células de camundongo BALB/c 3T3 clone A31 e células da bactéria *E. coli*.

Os ensaios de viabilidade de celular mostraram que em apenas 30 minutos, mais que 90% das células de BALB/c em suspensão de PBS com nZeol-SiPC/APTES e expostas à luz solar foram mortas, ao contrário das células expostas à mesma fonte de luz e sem a presença do nanomaterial. Os ensaios realizados com a bactéria *E. coli* também evidenciaram uma eficiente ação do nanomaterial, onde apenas 30 minutos foram necessários para fotoinativar aproximadamente 65% das bactérias.

Uma vez que este nanomaterial, induzido por luz solar, obteve resultados eficientes nos primeiros ensaios, este sistema torna-se um candidato promissor para ser aplicado em processos de descontaminação de água aproveitando a energia solar disponível e que atualmente ainda é pouco aproveitada em processos tecnológicos. Com isso, uma nova etapa com novos e extensivos testes serão necessárias para avaliar a eficiência do nanomaterial frente a outras espécies patogênicas e/ou contaminantes químicos presentes em água contaminada.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Uma análise da eficiência do nanomaterial deverá ser realizada em soluções com diferentes valores de pH;
- Utilização de diferentes concentrações de nanomaterial no sistema, visando a determinação de uma concentração ideal para a fotoinativação de espécies contaminantes com nZeol-SiPC;
- Atualmente, um projeto desenvolvido pela estudante de Mestrado Loren Nieto Trujillo no Laboratório de Química Supramolecular do IQSC, analisa a transferência de energia entre corantes encapsulados nos canais da zeólita L. Assim, em uma próxima etapa será avaliada a transferência de energia deste sistema para ftalocianinas funcionalizadas na superfície da zeólita L com o intuito de melhorar a eficiência de SiPC na geração de $^1\text{O}_2$. A figura 39 representa o processo de transferência de energia no sistema.

Figura 39 - Visão lateral simplificada dos nanocanais de zeólita L com moléculas corantes encapsuladas (= elipsóides coloridos), que podem ser diretamente irradiadas com a luz do sol, dando origem à transferência de energia em cascata para excitar SiPC.

- Desenvolvimento de um sistema de descontaminação com nZeol-SiPC/APTES funcionalizada na superfície de um vidro. A figura 40 ilustra de forma simplificada o possível sistema;

Figura 40 - Ilustração simplificada do processo de fotoinativação de bactérias por nZeol-SiPC funcionalizadas no vidro sob a ação da luz solar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKLEY, M. W.; REGE, S. U.; SAXENA, H. Application of natural zeolites in the purification and separation of gases. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 61, n. 1–3, p. 25–42, 2003. Doi: 10.1016/S1387-1811(03)00353-6.

AGHAEIPOUR, N.; FINAK, G.; HOOS, H.; MOSMANN, T. R.; BRINKMAN, R.; GOTTARDO, R.; SCHEUERMANN, R. H. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. **Nature Methods**, v. 10, p. 228–238, 2013. Doi: 10.1038/nmeth.2365.

AGHAEIPOUR, N.; NIKOLIC, R.; HOOS, H. H.; BRINKMAN, R. R. Rapid cell population identification in flow cytometry data. **Cytometry Part A**, v. 79A, n. 1, p. 6–13, 2011. Doi: 10.1002/cyto.a.21007.

BAERLOCHER, C.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. **Atlas of zeolite framework types**. Amsterdam: Elsevier, 2007. 398 p.

BLANCO, J.; MALATO, S.; FERNÁNDEZ-IBAÑEZ, P.; ALARCÓN, D.; GERNJAK, W.; MALDONADO, M. I. Review of feasible solar energy applications to water processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6–7, p. 1437–1445, 2009. Doi: 10.1016/j.rser.2008.08.016.

BLANKENSHIP, R. E.; TIEDE, D. M.; BARBER, J.; BRUDVIG, G. W.; FLEMING, G.; GHIRARDI, MARIA.; GUNNER, M. R.; JUNGE, W.; KRAMER, D. M.; MELIS, A.; MOORE, T. A.; MOSER, C. C.; NOCERA, D. G.; NOZIK, A. J.; ORT, D. R.; PARSON, W. W.; PRINCE, R. C.; SAYRE, R. T. Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. **Science**, v. 332, n. 6031, p. 805-809, 2011. Doi: 10.1126/science.1200165.

BOGARDI, J. J.; DUDGEON, D.; LAWFORD, R.; FLINKERBUSCH, E.; MEYN, A.; PAHL-WOSTL, C.; VIELHAUER, K.; VÖRÖSMARTY, C. Water security for a planet under pressure: interconnected challenges of a changing world call for sustainable solutions. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 4, n.1, p. 35–43, 2012. Doi: 10.1016/j.cosust.2011.12.002.

BOKOBZA, L. Origin of near-infrared absorption bands. In: SIESLER, H. W.; OZAKI, Y.; KAWATA, S.; HEISE, H. M. (Ed.). **Near-Infrared spectroscopy: principles, instruments, applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 348 p.

BONNETT, R.; KRYSTEVA, M. A.; LALOV, I. G.; ARTARSKY, S. V. Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1269–1275, 2006. Doi: 10.1016/j.watres.2006.01.014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2014.

BRILLAS, E.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 166–167, p. 603–643, 2015.

BRITO, N. N.; DE SILVA, V. B. M. Processo oxidativo avançado e sua aplicação ambiental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v. 1, n. 3, p. 36-47, 2012. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/reec/article/view/17000>>. Acesso em: 05 jun. 2014.

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221-1229, 2000. Disponível em: <<http://www.clinchem.org/content/46/8/1221.long>>. Acesso em: 24 ago. 2014.

BRÜHWILER, D.; CALZAFERRI, G. Selective functionalization of the external surface of zeolite L. **Comptes Rendus Chimie**, v. 8, n. 3–4, p. 391–398, 2005. Doi: 10.1016/j.crci.2004.11.008.

CAMPOS, W. K. S.; BUARQUE, F. S.; MACÊDO JÚNIOR, R. O.; SILVA, D. P.; RUZENE, D. S. Estudo sobre as principais tecnologias para tratamento da água produzida. **Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 1, n.15, p. 141-152, 2012. Disponível em: <<https://periodicos.set.edu.br/index.php/cadernoexatas/article/view/275/134>>. Acesso em: 01 jan. 2014.

CARIELO, G. **Desenvolvimento de um sistema para descontaminação de água por pasteurização solar**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

CASLAKE, L. F.; CONNOLLY, D. J.; MENON, V.; DUNCANSON, C. M.; ROJAS, R.; TAVAKOLI, J. Disinfection of contaminated water by using solar irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1145-1151, 2004. Doi: 10.1128/AEM.70.2.1145-1150.2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Safe water systems for the developing world: A handbook for implementing household-based water treatment and safe storage projects.** ACT International: Atlanta, 2000. Disponível em: < http://www.cdc.gov/safewater/manual/sws_manual.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2014.

CHATTERJEE, D. DASGUPTA, S. Visible light induced photocatalytic degradation of organic pollutants. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 6, n. 2–3, p. 186–205, 2005. Doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2005.09.001.

CHEN, X.; SELLONI, A. Introduction: titanium dioxide (TiO₂) nanomaterials. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 19, p. 9281–2, 2014. Doi: 10.1021/cr500422r.

CORTÉS, A. M.; BRIDGWATER, A. V. Kinetic study of the pyrolysis of miscanthus and its acid hydrolysis residue by thermogravimetric analysis. **Fuel Processing Technology**, v. 138, p. 184–193, 2015. Doi: 10.1016/j.fuproc.2015.05.013.

CRINI, G.; BADOT, P.-M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 4, p. 399–447, 2008. Doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001.

CRITTENDEN, J. C.; TRUSSELL, R. R.; HAND, D. W.; HOWE, K. J.; TCHOBANOGLOUS, G. **MWH's water treatment: principles and design.** New York: Wiley, 2012. 1920 p.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233–234, p. 351–371, 2002. Doi: 10.1016/S0010-8545(02)00034-6.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; GONÇALVES, J. O.; PINTO, L. A. A. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Química Nova**, v. 34, n.7, 2011. Doi: 10.1590/S0100-40422011000700017.

FAYOL, D.; LUCIANI, N.; LARTIGUE, L.; GAZEAU, F.; WILHELM, C. Managing magnetic nanoparticle aggregation and cellular uptake: a precondition for efficient stem-cell differentiation and MRI tracking. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 2, p. 312, 2012. Doi: 10.1002/adhm.201200294.

FLANIGEN, E. M.; ROBERT, W.B.; STEPHEN, T. W. Introduction. In: KULPRATHIPANJA, S. (Ed.). **Zeolites in industrial separation and catalysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. p. 1–26. Doi: 10.1002/9783527629565.ch1.

FRIEDMAN, M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 385–406, 2004. Doi: 10.1021/jf030490p.

GAO, J.; ZHENG, Y.; JEHNG, J.-M.; TANG, Y.; WACHS, I. E.; PODKOLZIN, S. G. Identification of molybdenum oxide nanostructures on zeolites for natural gas conversion. **Science**, v. 348, n. 6235, p. 686-690, 2015. Doi: 10.1126/science.aaa7048.

GIVAN, A. L. **Flow cytometry**: first principles. 2. ed. New York: John Wiley, 2013. 277 p.

GRUBERT, G.; WARK, M.; JAEGER, N. I.; SCHULZ-EKLOFF, G.; TKACHENKO, O. P. Reduction kinetics of zeolite-hosted mono-and polynuclear titanium oxide species followed by UV/Vis diffuse reflectance spectroscopy: influence of location and coordination. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 10, p. 1665-1671, 1998. Doi: 10.1021/jp9729730.

GRÜNER, M.; SIOZIOS, V.; HAGENHOFF, B.; BREITENSTEIN, D.; STRASSERT, C. A. Structural and photosensitizing features of phthalocyanine--zeolite hybrid nanomaterials. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 6, p. 1406-12, 2013. Doi: 10.1111/php.12141.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006. Doi: 10.1104/pp.106.077073.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Tradução de Jairo Bordinhão, Júlio Carlos Afonso, Mauro dos Santos de Carvalho, Milton Roedel Salles, Oswaldo Barcia Esteves. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011. 876 p.

HUBER, S.; CALZAFERRI, G. Sequential functionalization of the channel entrances of zeolite L crystals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 48, p. 6738–6742, 2004. Doi: 10.1002/anie.200461114.

IONASHIRO, M.; CAIRES, F. J.; GOMES, D. J. C. **Giolito**: Fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial / calorimetria exploratória diferencial. São Paulo: Giz Editorial, 2014. 192 p.

ISAGO, H. Spectral properties of a novel antimony(III)-phthalocyanine complex that behaves like J-aggregates in non-aqueous media. **Chemical Communications**, v. 7, n. 15, p. 1864-5, 2003. Doi: 10.1039/B304089E.

ISAGO, H.; KAGAYA, Y.; OYAMA, Y.; FUJITA, H.; SUGIMORI, T. The syntheses of amphiphilic antimony(V)-phthalocyanines and spectral investigation on their aggregation behaviors in aqueous and non-aqueous solutions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 111, p. 91-98, 2012. Doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.02.021.

ISAGO, H.; MIURA, K.; OYAMA, Y. Synthesis and properties of a highly soluble dihydroxo(tetra-tert-butylphthalocyaninato)antimony(V) complex as a precursor toward water-soluble phthalocyanines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 3, p. 380–387, 2008. Doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.10.022.

ISHII, K. Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, p. 1556–1568, 2012. Doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.022.

JIANG, J.; BABARAOA, R.; HUA, Z. Molecular simulations for energy, environmental and pharmaceutical applications of nanoporous materials: from zeolites, metal–organic frameworks to protein crystals. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 3599-3612, 2011. Doi: 10.1039/C0CS00128G.

JOHNSON, E. B. G.; ARSHAD, S. E. Hydrothermally synthesized zeolites based on kaolinite: A review. **Applied Clay Science**, v. 97–98, p. 215–221, 2014. Doi: 10.1016/j.clay.2014.06.005.

KAČURÁKOVÁ, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 4, p. 291–303, 2001. Doi:10.1016/S0144-8617(00)00245-9.

KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILAR, R. **The porphyrin handbook**: phthalocyanines: properties and materials. Amsterdam: Elsevier, 2012. 284 p.

KAGAN, J. **Organic photochemistry**: Principles and applications. London: Academic Press, 1993. 234 p.

KALLURY, K. M. R.; MACDONALD, P. M.; THOMPSON, M. Effect of surface water and base catalysis on the silanization of silica by (aminopropyl)alkoxysilanes studied by X-ray photoelectron spectroscopy and ^{13}C cross-polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance. **Langmuir**, v. 10, n. 2, p. 492–499, 1994. Doi: 10.1021/la00014a025.

KEHR, N. S.; RIEHEMANN, K.; EL-GINDI, J.; SCHÄFER, A.; FUCHS, H.; GALLA, H.-J.; DE COLA, L. Cell adhesion and cellular patterning on a self-assembled monolayer of zeolite L crystals. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 14, p. 2248–2254, 2010. Doi: 10.1002/adfm.201000205.

KIM, Y. D.; KIM, J. P.; KWON, O. S.; CHO, I. H. The synthesis and application of thermally stable dyes for ink-jet printed LCD color filters. **Dyes and Pigments**, v. 81, n. 1, p. 45–52, 2009. Doi: 10.1016/j.dyepig.2008.09.006.

KHAN, N. A.; HASAN, Z.; JHUNG, S. H. Adsorptive removal of hazardous materials using metal-organic frameworks (MOFs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 444–456, 2013. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.11.011.

KHOSHESAB, Z. M. Reflectance IR spectroscopy. In: THEOPHANIDES, T. M. (Ed.). **Infrared spectroscopy: materials science, engineering and technology**. Rijeka: InTech, 2012. p. 233–244.

KUZNETSOVA, N. A.; MAKAROV, D. A.; KALIYA, O. L.; VOROZHTSOV, G. N. Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, n. 3, p. 487–491, 2007. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.04.064.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer Science & Business Media, 2007. 980 p.

ŁAPOK, Ł. **Synthesis and photocatalytic properties of new water-soluble phthalocyanines and related compounds**. 2006. 219 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Naturais) – Instituto de Orgânica e Química Macromolecular, Universidade de Bremen, Bremen, 2006. Disponível em: <<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/dissts/Bremen/Lapok2006.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2015.

LARKIN, P. **Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation**. Amsterdam: Elsevier, 2011. 230 p.

LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão concisa**. Tradução de Henrique E. Toma, Koiti Araki e Reginaldo C. Rocha. 5. ed. São Paulo: Blucher, 1999. 527 p.

LEWIS, N. S. Toward cost-effective solar energy use. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 798-801, 2007. Doi: 10.1126/science.1137014.

LONG, R.; MAO, K.; YE, X.; YAN, W.; HUANG, Y.; WANG, J.; FU, Y.; WANG, X.; WU, X.; XIE, Y. AND XIONG, Y. Surface facet of palladium nanocrystals: A key parameter to the activation of molecular oxygen for organic catalysis and cancer treatment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 3200–3207, 2013. Doi: 10.1021/ja311739v.

LUDWIG, D. B.; TROTTER, J. T.; GABRIELSON, J. P.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Flow cytometry: A promising technique for the study of silicone oil-induced particulate formation in protein formulations. **Analytical Biochemistry**, v. 410, n. 2, p. 191–199, 2011. Doi: 10.1016/j.ab.2010.12.008.

MAZZOCUT, A.; COUTINO-GONZALEZ, E.; BAEKELANT, W.; SELS, B.; HOFKENS, J.; VOSCH, T. Fabrication of silver nanoparticles with limited size distribution on TiO₂ containing zeolites. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 18690-18693, 2014. Doi: 10.1039/c4cp02238f.

MI, J.; GUO, L.; LIU, Y.; LIU, W.; YOU, G.; QIAN, S. Excited-state dynamics of magnesium phthalocyanine thin film. **Physics Letters A**, v. 310, n. 5–6, p. 486–492, 2003. Doi: 10.1016/S0375-9601(03)00458-4.

MISAELIDES, P. Application of natural zeolites in environmental remediation: A short review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 144, n. 1–3, p. 15–18, 2011. Doi: 10.1016/j.micromeso.2011.03.024.

MORRIS, R. D.; AUDET, A. M.; ANGELILLO, I. F.; CHALMERS, T. C.; MOSTELLER, F. Chlorination, chlorination by-products, and cancer: a meta-analysis. **American Journal of Public Health**, v. 82, n. 7, p. 955-963. 1992. Doi:10.2105/AJPH.82.7.955.

MUBASHIR, M.; YEONG, Y. F.; NAZRI, N. S. B. M.; LAU, K. K. Accelerated synthesis of deca-dodecasil 3 rhombohedral (DDR3) zeolite crystals via hydrothermal growth coupled with ultrasonic irradiation method. **RSC Advances**, v. 5, p. 22658-22664, 2015. Doi: 10.1039/C5RA00009B.

NAS, A.; KAHRIMAN, N.; KANTEKIN, H.; YAYLI, N.; DURMUŞ, M. The synthesis of novel unmetallated and metallated phthalocyanines including (E)-4-(3-cinnamoylphenoxy) groups at the peripheral positions and photophysical properties of their zinc phthalocyanine derivatives. **Dyes and Pigments**, v. 99, n. 1, p. 90–98, 2013. Doi: 10.1016/j.dyepig.2013.04.014.

NISHIYAMA, N.; NAKAGISHI, Y.; MORIMOTO, Y.; LAI, P. S.; MIYAZAKI, K.; URANO, K.; HORIE, S.; KUMAGAI, M.; FUKUSHIMA, S.; CHENG, Y.; JANG, W. D.; KIKUCHI, M.; KATAOKA, K. Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 3, p. 245–251, 2009. Doi: 10.1016/j.jconrel.2008.10.010.

NYOKONG, T. Electronic spectral and electrochemical behavior of near infrared absorbing metallophthalocyanines. In: JIANG, J. (Ed.). **Functional phthalocyanine molecular materials**. New York: Springer Science & Business Media, 2010. 325 p. Doi: 10.1007/978-3-642-04752-7.

ODÉN, S.; VON HOFSTEN, B. Detection of fingerprints by the ninhydrin reaction. **Nature**, v. 173, p. 449 – 450, 1954. Doi:10.1038/173449a0.

OECD. **OECD Guideline for the testing of chemicals**: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. Paris: OECD, 2004. Doi: 10.1787/9789264071162-en.

OLIVO, A. M.; ISHIKI, H. M. Brasil frente à escassez de água. **Colloquium Humanarum**, v. 11, n. 3, p.41-48, 2014. Doi: 10.5747/ch.2014.v11.n3.h170.

OUNSI, H.F.; AL-SHALAN, T.; SALAMEH, Z.; GRANDINI, S.; FERRARI, M. Quantitative and qualitative elemental analysis of different nickel-titanium rotary instruments by using scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 1, p. 53-5, 2008. Doi: 10.1016/j.joen.2007.09.009.

PASPARAKIS, G. Light-induced generation of singlet oxygen by naked gold nanoparticles and its implications to cancer cell phototherapy. **Small**, v. 9, n. 24, p. 4130–4134, 2013. Doi: 10.1002/smll.201301365.

PEREIRA, C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, A. M.; ARAÚJO, J. P.; BLANCO, G.; PINTADO, J. M.; FREIRE, C. [VO(acac)₂] hybrid catalyst: from complex immobilization onto silica nanoparticles to catalytic application in the epoxidation of geraniol. **Catalysis Science & Technology**, v. 1, n. 5, p. 784-793, 2011. Doi: 10.1039/C1CY00090J.

PÉREZ-ESTRADA, L. A.; MALATO, S.; GERNJAK, W.; AGÜERA, A.; THURMAN, E. M.; FERRER, I.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Photo-fenton degradation of diclofenac: Identification of main intermediates and degradation pathway. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 21, p. 8300-8306, 2005. Doi: 10.1021/es050794n.

PÉREZ-RAMÍREZ, J. Zeolite nanosystems: Imagination has no limits. **Nature Chemistry**, v. 4, p. 250–251, 2012. Doi: 10.1038/nchem.1310.

PHAN, A.; DOONAN, C. J.; URIBE-ROMO, F. J.; KNOBLER, C. B.; O'KEEFFE, M.; YAGHI, O. M. Synthesis, structure, and carbon dioxide capture properties of zeolitic imidazolate frameworks. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 1, p. 58–67, 2010. Doi: 10.1021/ar900116g.

PLATTEN, J. K.; COSTESÈQUE, P. Charles Soret. A short biography. **The European Physical Journal E**, v. 15, n. 3, p. 235-239, 2004. Doi: 10.1140/epje/i2004-10062-8.

RINCÓN, A. G.; PULGARIN, C. Photocatalytical inactivation of E. coli: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO₂ concentration. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 44, n. 3, p. 263-284, 2003. Doi: 10.1016/S0926-3373(03)00076-6.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006. Doi: 10.1590/S0100-40422006000300027.

RUIZ, A. Z.; BRÜHWILER, D.; BAN, T.; CALZAFERRI, G. Synthesis of zeolite L. Tuning size and morphology. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly**, v. 136, n. 1, p. 77-89, 2005. Doi: 10.1007/s00706-004-0253-z.

RUIZ, A. Z.; **Unidirectional photonic antenna systems**. 2006. 159 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Berna, Suíça, 2006.

RUIZ-SANCHEZ, A. J.; MONTANEZ, M. I.; MAYORGA, C.; TORRES, M. J.; KEHR, N. S.; VIDA, Y.; COLLADO, D.; NAJERA, F.; DE COLA, L.; PEREZ-INESTROSA, E. Dendrimer-modified solid supports: nanostructured materials with potential drug allergy diagnostic applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 29, p. 4942-4954, 2012. Doi: 10.2174/0929867311209024942.

SCELTA, D.; CEPPATELLI, M.; SANTORO, M.; BINI, R.; GORELLI, F. A.; PERUCCHI, A.; MEZOUAR, M.; VAN DER LEE, A.; HAINES, J. High pressure polymerization in a confined space: Conjugated chain/zeolite nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 7, p. 2249–2255, 2014. Doi: 10.1021/cm500061f.

SCHLIESSER, A.; PICQUÉ, N.; HÄNSCH, T. W. Mid-infrared frequency combs. **Nature Photonics**, v. 6, p. 440–449, 2012. Doi: 10.1038/nphoton.2012.142.

SCHOLES, G. D.; FLEMING, G. R.; OLAYA-CASTRO, A.; VAN GRONDELLE, R. Lessons from nature about solar light harvesting. **Nature Chemistry**, v. 3, p. 763–774, 2011. Doi: 10.1038/nchem.1145.

SHANNON, M. A.; BOHN, P. W.; ELIMELECH, M.; GEORGIADIS, J. G.; MARIÑAS, B. J.; MAYES, A. M. Science and technology for water purification in the coming decades. **Nature**, v. 452, p. 301–310, 2008. Doi: 10.1038/nature06599.

SHIMADZU CORPORATION. **ISR-2600/ISR-2600 plus integrating sphere attachment**. Diffuse reflectance measurement. Kyoto, 2015. Disponível em: <<http://www.shimadzu.com/an/spectro/uv/accessory/solid/sample/solid.html>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

SILVA, P. K. L. **Remoção de óleo da água de produção por flotação em coluna utilizando tensoativos de origem vegetal**. 104 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008. Disponível em: <<http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/123456789/15743/1/PaulaKLS.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SILVA, S.; CHIAVONE-FILHO, O.; BARROS NETO, E. L.; NASCIMENTO, C. A. O. Integration of processes induced air flotation and photo-fenton for treatment of residual waters contaminated with xylene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199–200, p. 151–157, 2012. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.10.070.

SINTON, L. W.; HALL, C. H.; LYNCH, P. A.; DAVIES-COLLEY, R. J. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1122–1131, 2002. Doi: 10.1128/AEM.68.3.1122-1131.2002.

SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M. **Fundamentos de química analítica**. Tradução de Marco Grassi. 8. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006. 1088 p.

SMIT, B.; MAESEN, T. L. M. Towards a molecular understanding of shape selectivity. **Nature**, v. 451, p. 671-678, 2008. Doi: 10.1038/nature06552.

SOUZA, C.L.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação redutiva de azo-corantes utilizando-se ferro metálico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 16-20, 2006. Doi: 10.1590/S1413-41522006000100003.

STRASSET, C. A.; OTTER, M.; ALBUQUERQUE, R. Q.; HÖNE, A.; VIDA, Y.; MAIER, B.; DE COLA, L. Photoactive hybrid nanomaterial for targeting, labeling, and killing antibiotic-resistant bacteria. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 42, p. 7928–7931, 2009. Doi: 10.1002/anie.200902837.

STUART, B. **Infrared spectroscopy**: fundamentals and applications. New York: John Wiley, 2004. 244 p.

STUCHINSKAYA, T.; MORENO, M.; COOK, M. J.; EDWARDS, D. R.; RUSSELL, D. A. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 822–831, 2011. Doi: 10.1039/c1pp05014a.

SUN, Q.; XU, Y. Sensitization of TiO₂ with aluminum phthalocyanine: factors influencing the efficiency for chlorophenol degradation in water under visible light. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 28, p. 12387–12394, 2009. Doi: 10.1021/jp9016882.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de engenharia de petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. 271 p.

TOMA, H. E.; BONIFACIO, L. S.; ANAISSI, F. J. From colors to inexistent colors: a reflection on electronic spectra and chromatic effects. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 897-900, 2005. Doi: 10.1590/S0100-40422005000500030.

TORRES, T. From Subphthalocyanines to subporphyrins. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 18, p. 2834–2837, 2006. Doi: 10.1002/anie.200504265.

UNESCO. **The United Nations World water development report 2015**: Water for a sustainable World. Paris, 2015. 126 p.

UPSTONE, S. L. Ultraviolet/visible light absorption spectrophotometry in clinical chemistry. MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of analytical chemistry**. New York: Ramtech, 2000. p. 1699–1771.

VANKAYALA, R.; KUO, C. L.; SAGADEVAN, A.; CHEN, P. H.; CHIANG, C. S.; HWANG, K. C. Morphology dependent photosensitization and formation of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) by gold and silver nanoparticles and its application in cancer treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 35, p. 4379-4387, 2013. Doi: 10.1039/C3TB20806K.

VERHEYEN, E.; SREE, S. P.; THOMAS, K.; DENDOOVEN, J.; DE PRINS, M.; VANBUTSELE, G.; BREYNAERT, E.; GILSON, J.-P.; KIRSCHHOCK, C. E. A.; DETAVERNIER, C.; MARTENS, J. A. Catalytic activation of OKO zeolite with intersecting pores of 10- and 12-membered rings using atomic layer deposition of aluminium. **Chemical Communications**, v. 50, p. 4610-4612, 2014. Doi: 10.1039/C3CC49028A.

WANG, S.; PENG, Y. Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 1, p. 11–, 2010. Doi: 10.1016/j.cej.2009.10.029.

WANG, Y.; LI, H.; GU, L.; GAN, Q.; LI, Y.; CALZAFERRI, G. Thermally stable luminescent lanthanide complexes in zeolite L. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 121, n. 1–3, p. 1–6, 2009. Doi: 10.1016/j.micromeso.2008.12.028.

WARDLE, B. **Principles and applications of photochemistry**. Chichester: Wiley, 2009. 264 p.

WILSON, S. M.; BACIC, A. Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes. **Nature Protocols**, v. 7, n. 9, p. 1716- 1727, 2012. Doi: 10.1038/nprot.2012.096.

WÖHRLE, D.; SCHNURPFEIL, G.; MAKAROV, S. G.; KAZARIN, A.; SUVOROVA, O. N. Practical applications of phthalocyanines – from dyes and pigments to materials for optical, electronic and photo-electronic devices. **Macroheterocycles**, v. 5, n. 3, p. 191-202, 2012. Doi: 10.6060/mhc2012.120990w.

YOUNAS, H.; QAZI, I. A.; HASHMI, I.; AWAN, M. A.; MAHMOOD, A.; QAYYUM, H. A. Visible light photocatalytic water disinfection and its kinetics using Ag-doped titania nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 740-752, 2014. Doi: 10.1007/s11356-013-1980-7.

XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801–809, 2013. Doi: 10.1016/j.apenergy.2012.12.019.

ZANJANCHI, M. A.; EBRAHIMIAN, A.; ARVAND, M. Sulphonated cobalt phthalocyanine-MCM-41: an active photocatalyst for degradation of 2,4-dichlorophenol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1-3, p. 992-1000, 2010. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.108.

ZARITSKY, A.; NATAN, S.; HOREV, J.; HECHT, I.; WOLF, L.; BEN-JACOB, E.; TSARFATY, I. Cell motility dynamics: a novel segmentation algorithm to quantify multi-cellular bright field microscopy images. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27593, 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0027593.

ZHANG, L.; WANG, W.; SUN, S.; SUN, Y.; GAO, E.; XU, J. Water splitting from dye wastewater: A case study of BiOCl/copper(II) phthalocyanine composite photocatalyst. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 132–133, p. 315–320, 2013. Doi: 10.1016/j.apcatb.2012.12.003.

ZHU, Y.; HUANG, J.; JIANG, X.; SUN, J. Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and in vitro photodynamic activity. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 9, n. 5, p. 473–477, 2006. Doi: 10.1016/j.inoche.2006.02.014.

ZUCKER, R. M.; MASSARO, E. J.; SANDERS, K. M.; DEGN, L. L.; BOYES, W. K. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 77A, n. 7, p. 677-685, 2010. Doi: 10.1002/cyto.a.20927.

Anexo A - Evolução histórica das zeólitas sintéticas

Tabela 6 - Evolução histórica das zeólitas sintéticas.

Época da descoberta	Composição	Número de estruturas descobertas
Final da década de 40 e início de 1950	Zeólitas com baixa relação Si/Al	38 tipos de estruturas (até 1978)
Metade dos anos 50 até início da década de 60	Zeólitas com baixa relação Si/Al	
Início da década de 70	Peneiras moleculares de SiO_2	64 tipos de estruturas (até 1987)
Final da década de 70	Peneiras moleculares de AlPO_4	
Final da década de 70 e início da década de 80	Peneiras moleculares de SAPO e MeAPO	85 tipos de estruturas (até 1992)
Final da década de 70	Metalossilicatos, aluminossilicatos	
Entre o início e a metade da década de 80	Peneiras moleculares de AlPO_4	176 tipos de estruturas (até 2007)
Entre início e a metade da década de 90	Metalofosfatos	
	Peneiras moleculares mesoporosas	201 tipos de estruturas (até 2012)
	Estruturas tetraédricas e octaédricas	
Final da década de 90	Estruturas metal-orgânicas	176 tipos de estruturas (até 2007)
De 2000 até o presente	Zeólita UZM, Si/Al = 2–30	
	Germanossilicatos	201 tipos de estruturas (até 2012)
	Peneiras moleculares de SiO_2 em meio de fluoreto	

Fonte: Adaptação de Johnson e Arshad (2014) a partir de FLANIGEN; ROBERT; STEPHEN, 2010.

Anexo B - Artigo submetido para periódico

On the use of porous nanomaterials to photoinactivate *E. coli* with natural sunlight irradiation

Renan C. F. Leitaó, Loren N. Trujillo, Andrei Leitaó*, Rodrigo Q. Albuquerque*

São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, 13560-970 São Carlos, Brazil

* Corresponding author

E-mail: rodrigo_albuquerque@iqsc.usp.br Phone: +55 (16) 3373-8779

E-mail: andleitaó@iqsc.usp.br Phone: +55 (16) 3373-9943

Abstract

An organic-inorganic hybrid material based on nanocrystals of zeolite L functionalized with silicon phthalocyanine can develop interesting properties when activated by natural sunlight. Cell viability tests show that this material is able to photoinactivate living organisms like *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria, opening up exciting possibilities for the development of new functional materials for a range of important sunlight-based applications.

Keywords: Zeolite L. Phtalocyanine. *Escherichia coli*. Phtotoinactivation. Natural sunlight

1. Introduction

Each day a huge quantity of solar energy reaches our planet, which vastly exceeds the human's yearly power consumption [1,2]. From the many uses sunlight may have, solving water disinfection problems may become one of the most noble applications. Large incidence of mortality can be seen worldwide caused by polluted water and children are the most affected with many deaths everyday [3]. Additionally, the presence of pathogens in irrigation water not only damages crops, but is also responsible for the widespread use of hazardous chemicals in crop fields [4]. The combination of sunlight and appropriate photoactive materials may be used to tackle this problem [5].

Some applications involving photoinactivation of pathogens using artificial light have been made using different materials, where the cytotoxic singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is often generated [6,7]. In these treatments, $^1\text{O}_2$ is produced via energy transfer from the triplet state of the excited photosensitizer to the ground triplet state of oxygen ($^3\text{O}_2$). Phthalocyanines (PCs) are

often used as photosensitizers, since they present high quantum yields for the generation of triplet state [8], efficiently generating $^1\text{O}_2$. Numerous studies have investigated the generation of $^1\text{O}_2$ by PC excitation not only in photodynamic treatments [9-13] but also in degradation of organic pollutants in water [14-16]. PCs have large planar conjugated π systems, which are responsible for the main drawback associated to this class of compounds: they easily aggregate strongly reducing its ability to generate $^1\text{O}_2$ upon irradiation [17]. One elegant solution to this problem is the functionalization of PC onto high-specific surface area materials like nanoparticles or nanocrystals, which leads to novel functional hybrid materials [18,19].

Zeolites can also be used to build PC-based hybrid materials for $^1\text{O}_2$ generation. This was the case of zeolite L functionalized with PC, which has been reported by one of the authors to generate $^1\text{O}_2$, as well as to photoinactivate pathogens upon irradiation of artificial light [20,21]. Zeolite L is composed of SiO_4 and AlO_4 tetrahedral units [22] and synthetic crystals with different shapes can be obtained in the size range of 30 to 40000 nm [23]. The symmetry of the crystals is hexagonal and the stoichiometry of each unit cell is $(\text{M}_9)[\text{Al}_9\text{Si}_{27}\text{O}_{72}]\cdot n\text{H}_2\text{O}$, where M correspond to monovalent cations, *e.g.* K^+ , and $n = 21$ for fully hydrated crystals [24]. The advantage of using zeolite L over other materials lies in its parallel one-dimensional nanochannels, where energy transfer between encapsulated dyes can be easily controlled [25], therefore offering interesting possibilities to add up new functionalities to the hybrid material.

In this work we have used a hybrid material composed of nanocrystals of zeolite L functionalized with Silicon 2,9,16,23-tetra-*tert*-butyl-29H,31H-phthalocyanine dihydroxide (SiPC) to promote the photoinactivation of different living organisms (mouse cells and *E. coli*) using natural sunlight.

2. Experimental section

2.1 Sample preparation

SiPC was functionalized onto the surface of zeolite L nanocrystals (nZeol) after refluxing a suspension of the crystals in chlorobenzene to produce nZeol-SiPC. The presence of bulky *tert*-butyl groups is important to reduce the SiPC aggregation, which increases its solubility in

chlorobenzene. The surface of the crystals was further functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) to improve the adherence of the nanomaterial to the negatively charged cell wall, as zeta potential measurements have already shown that these particles are positively charged at pH 7.4 [20]. The prepared nanomaterial is abbreviated as nZeol-SiPC/APTES. More details about the synthesis of the nanomaterial are available in the SI.

2.2 Viability assays for BALB/c.

The cell death was determined after exposition of cell suspensions to nZeol-SiPC/APTES and natural sunlight. All cell viability experiments were performed in closed quartz cuvettes (4.5 cm x 1 cm x 1 cm, 3.5 mL). For all experiments containing the nanomaterial, 1 mg nZeol-SiPC/APTES was suspended in 1.5 mL of PBS, and 0.5 mL of cell suspension was added. The negative control experiment was based on the same cell suspension as already described, but in the absence of the nanomaterial. All samples were exposed to natural sunlight irradiation, under continuous stirring. The sunlight irradiance (1000 Wm^{-2}) was measured using a solar power meter. Sampling was performed by collecting 0.1 mL of the reaction mixture in a 96-well plate in time intervals of 0, 30, 60 and 90 min of irradiation. The cells were analyzed on a Merck-Millipore guava easyCyte 8HT flow cytometer using the Guava ViaCount software module after sample incubation during at least 5 min with ViaCount® reagent in the dark according to the manufacturer. Control experiments were also used to detect cell death by the sunlight irradiation keeping the samples in the dark with and without nZeol-SiPC/APTES following the same procedures described above. In addition to this, experiments with artificial white light (ca 300 Wm^{-2} of irradiance) using a Tungsten lamp were carried out following the same procedure previously described.

2.3 Viability assays for *E. Coli* bacteria

Cell counting of *E. coli* was performed with the ViaCount® reagent following the procedure of the manufacturer. Due to the high number of cells, dilutions were performed to achieve 4×10^7 cells mL^{-1} . As in the procedure conducted for the BALB/c cells described above, the cell death was determined after exposition of cell suspensions to nZeol-SiPC/APTES and natural sunlight. First, 0.5 mL of the cell suspension in PBS were pipetted into quartz cuvettes

containing 1.5 mL of PBS with and without suspended nZeol-SiPC/APTES (1 mg) for an *E. coli* final concentration of 1×10^7 cells mL⁻¹. This system was then kept under sunlight exposure and samples of 0.1 mL were collected every 30 minutes. Control experiments with cells alone diluted in PBS and cells in PBS containing the nanomaterial in the dark were also evaluated. For the cell death quantification a dilution was made to reduce the cell concentration to 5×10^5 cells mL⁻¹, thereafter 50 μ L of cells were mixed with 200 μ L of ViaCount® reagent following at least 5 min of incubation. The viability profile and cell counting of *E. coli* in all systems tested were analyzed on a Merck-Millipore guava easyCyte 8HT flow cytometer using the guava InCyte 2.7 software. Two independent experiments were performed in triplicate. The cultivation procedures of both cells (BALB/c and *E. coli*) are available in the Support Information.

3. Results and discussion

Nanozeolite L crystals functionalized with SiPC were characterized by thermogravimetric analysis (Fig. 1 (a)), from which we have estimated 10^4 SiPC molecules per zeolite crystal, which indicates a high coverage of the crystals. It has been reported that the organic-inorganic interaction of such species occur by axial attachment between OH groups from the zeolite surface and the central ion of PC [17,20]. The ninhydrin test was used to confirm the presence of amino groups on the crystals (See SI). The presence of APTES on nZeol-SiPC/APTES is revealed by a strong purple color formed after the reaction of the amino groups with ninhydrin [26,27]. The characteristic absorption bands of the product formed (Ruhemann's purple) were observed at 400 and 570 nm (Fig. 1(b)). The excitation and emission spectra of nZeol-SiPC suspended in CH₂Cl₂ peaks at 679 nm and 684 nm, respectively (Fig. S1), which is characteristic of SiPC in the monomeric form (SiPC aggregates are not luminescent [20]). The diffuse reflectance spectrum of nZeol-SiPC in powder showed the characteristic Q-band of SiPC with maximum absorption at 682 nm. This band is broader and slightly red-shifted when compared with the one observed in the absorption spectrum of SiPC in CH₂Cl₂ (λ_{max} in 679 nm, Fig. S2). This result may be due to the strong interaction between SiPC and the zeolite crystals in the nanomaterial, as well as due to the stronger interactions usually observed in solid state systems.

Fig. 1. Derivative thermogravimetric analysis (DTG) of nZeol (black line) and nZeol-SiPC (blue line) (a). Colorimetric ninhydrin test of nZeol-SiPC/APTES and UV-vis absorption spectrum of the product formed (Ruhemann's purple) (b).

As a pilot test to evaluate the nanomaterial efficiency to photoinactivate biological systems using natural sunlight, cell viability tests were first conducted using mouse BALB/c 3T3 clone A31 cells (a mammalian cell widely used for cytotoxicity studies). The number of surviving cells (cell viability) after different periods of time was determined through flow cytometry experiments using a fluorophore that intercalates into the DNA of non-viable cells. The BALB/c assays (Fig. 2(a)) show a large quantity of photoinactivated cells in the presence of nZeol-SiPC/APTES after natural sunlight exposure (1000 Wm^{-2}). Less than 9 % of the cells were still viable within 30 minutes of irradiation in the presence of nZeol-SiPC (red bars). For the same period of time, the cell viability measured in control experiments was much higher: 95 % (cells and nanomaterial in the dark, orange bars), 97 % (only sunlight irradiation, blue bars), and 100 % (cells in the dark, grey bars). This clearly shows that cells are photoinactivated by the combination of sunlight and nZeol-SiPC/APTES. Microscopy images of BALB/c cells before

and after 30 min treatment are displayed in Figs. 2(b) and (c), revealing the damages caused by the nanomaterial in the cells upon sunlight irradiation.

Fig. 2. Cell viability assays using BALB/c cells suspended in PBS under different conditions (a). Microscopy images at 10X of BALB/c cells before irradiation (b) and after 30 min of irradiation in the presence of nZeol-SiPC/APTES (c). Experiments were done in triplicate in different days.

We carried out additional viability tests using a Xenon lamp (300 Wm^{-2}) as the light source. nZeol-SiPC/APTES has also damaged the BALB/c cells to a large extent, although, in contrast to the sunlight assays, more time was necessary to achieve the same percentage of non-viable cells (Fig. S3). This is consistent with the lower intensity of the artificial light when compared with sunlight. Differences in shape between the power spectrum of white light and sunlight may also have contributed to the different photoinactivation efficiencies, but this minor effect was not investigated here.

Cell viability assays using gram-negative *E. coli* bacteria were then carried out to further test the prepared nanomaterial. The same protocol as described for BALB/c cells was adopted. The combination of nZeol-SiPC/APTES and sunlight irradiation has also lead to photoinactivation of *E. coli* cells, as pointed out in Fig. 3(a). Again, the combination of nanomaterial and sunlight was responsible for the highest photoinactivation efficiency. Figs. 3

(b) and (c) show microscopy pictures of *E. coli* before and after 90 min of sunlight irradiation in the presence of nZeol-SiPC/APTES. The images clearly show a decrease in the number of intact bacteria after the treatment.

Fig. 3. Cell viability assays using *E. coli* cells suspended in PBS under different conditions (a). Microscopy images at 100X of *E. coli* cells before (b) and after (c) 90 min sunlight irradiation in the presence of nZeol-SiPC/APTES. Experiments were done in triplicate in different days.

Similarly to the pilot study carried out with BALB/c cells, cellular death was also observed when *E. coli* cells were exposed to sunlight in the absence of the nanomaterial. This is consistent with the fact that sunlight irradiation can inhibit DNA replication and also induce bacterial mutations. However, it is also known that cellular death induced only by sunlight can be slow in the first minutes of exposure due to self-defense mechanisms of these cells [28]. Fig. 4 shows a much faster photoinactivation of *E. coli* induced by nZeol-SiPC/APTES and natural sunlight within the first 30 min, when compared with the bacteria death after exposure to the same irradiation in the absence of nanomaterial.

Fig. 4. Influence of the nanomaterial on the viability of *E. coli* cells in the first minutes of sunlight irradiation (1000 Wm^{-2}). All assays were performed in triplicate using two independent experiments.

In addition, it was observed that the size of the nanozeolites was interfering with the *E. coli* readout. The fact that positively-charged zeolites can aggregate when in contact with the negatively-charged membrane of *E. coli* cells suggests flow cytometry may not be the most sensitive technique to determine cell viability in this case. However, this problem was dealt with by changing the sensitivity of the equipment and gating the samples based on cells without any treatment.

Conclusion

The present investigation has clearly proved that natural sunlight and nZeol-SiPC-APTES can be successfully combined to photoinactivate pathogens in water. Further optimization of the experiment may still be necessary to maximize the percentage of inactivated *E. coli* cells. Nevertheless, this opens up exciting possibilities for the development of new functional materials for a range of important applications, like sunlight-based water disinfection treatments. We are currently investigating how energy transfer inside the zeolite channels can enhance the efficiency of our photodynamic treatment.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (grants 2012/02955-5 and 2013/18009-4) and CNPq (grant 305082/2013-2). The authors acknowledge the Clariant GmbH for providing the nanocrystals of zeolite L and Thaisa Matos for the thermogravimetric analysis.

References

- [1] N. S. Lewis, *Science* 315 (2007) 798-801.
- [2] R. E. Blankenship, D. M. Tiede, J. Barber, G. W. Brudvig, G. Fleming, M. Ghirardi, M. R. Gunner, W. Junge, D. M. Kramer, A. Melis, T. A. Moore, C. C. Moser, D. G. Nocera, A. J. Nozik, D. R. Ort, W. W. Parson, R. C. Prince, R. T. Sayre, *Science* 332 (2011) 805-809.
- [3] J. Blanco, S. Malato, P. Fernández-Ibañez, D. Alarcón, W. Gernjak, M. I. Maldonado, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13 (2009) 1437-1445.
- [4] S. Rodriguez-Mozaz, M. Ricart, M. Köck-Schulmeyer, H. Guasch, C. Bonnineau, L. Proia, M. L. De Alda, S. Sabater, D. Barceló, J. Hazard. Mater. 282 (2015) 165-173.
- [5] B. Sun, Z. Qiao, K. Shang, H. Fan, S. Ai, *Mater. Lett.* 91 (2013) 142-145.
- [6] P. Chauhan, C. Hadad, A. Sartorelli, M. Zarattini, A. Herreros-López, M. Mba, M. Maggini, M. Prato, T. Carofiglio, *Chem. Commun.* 49 (2013) 8525-8527.
- [7] M. B. Ballatore, J. Durantini, N. S. Gsponer, M. B. Suarez, M. Gervaldo, L. Otero, M. B. Spesia, M. E. Milanesio, E. N. Durantini, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 7456-7463.
- [8] K. Ishii, *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 1556-1568
- [9] X. Zhou, Z. Chen, Y. Wang, Y. Guo, C.-H. Tung, F. Zhang, X. Liu, *Chem. Commun.* 49 (2013) 10614-10616.
- [10] X. Ding, B.-H. Han, *Chem. Commun.* 51 (2015) 12783-12786
- [11] R. Vankayala, C.-L. Kuo, A. Sagadevan, P.-H. Chen, C.-S. Chiang and K. C. Hwang, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 4379-4387.
- [12] R. Long, K. Mao, X. Ye, W. Yan, Y. Huang, J. Wang, Y. Fu, X. Wang, X. Wu, Y. Xie and Y. Xiong, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 3200-3207.
- [13] G. Pasparakis, *Small* 9 (2013) 4130-4134.
- [14] Z. Xiong, Y. Xu, L. Zhu, J. Zhao, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 651-657.
- [15] Q. Sun and Y. Xu, *J. Phys. Chem. C*, 113 (2009) 12387-12394.
- [16] M. A. Zanjanchi, A. Ebrahimian, M. Arvand, *J. Hazard Mater.* 175 (2010) 992-1000.
- [17] M. Grüner, V. Siozios, B. Hagenhoff, D. Breitenstein, C. A. Strassert, *Photochem. Photobiol.* 89 (2013) 1406-1412.
- [18] K.-H. Choi, H.-J. Lee, B. J. Park, K.-K. Wang, E. P. Shin, J.-C. Park, Y. K. Kim, M.-K. Oh, Y.-R. Kim, *Chem. Commun.* 48 (2012) 4591-4593.
- [19] T. Mthethwa and T. Nyokong, *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 (2015) 1346-1356

- [20] C. A. Strassert, M. Otter, R. Q. Albuquerque, A. Höne, Y. Vida, B. Maier, L. De Cola, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 7928-7931.
- [21] C. A. Strassert, R. Q. Albuquerque, Y. Vida, L. De Cola, Patent numbers GB 2464958, EP 2186862 and US 8193343 B2.
- [22] Z. Popović, M. Otter, G. Calzaferri, and L. De Cola, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 6188-6191.
- [23] N. S. Kehr, K. Riehemann, J. El-Gindi, A. Schäfer, H. Fuchs, H.-J. Galla, L. De Cola, *Adv. Funct. Mater.* 20 (2010) 2248-2254.
- [24] G. Calzaferri, S. Huber, H. Maas, C. Minkowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 3732-3758.
- [25] K. Lutkouskaya, G. Calzaferri, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 5633-5638.
- [26] D. Brühwiler, G. Calzaferri, *C. R. Chimie* 8 (2005) 391-398.
- [27] C. Pereira, J. F. Silva, A. M. Pereira, J. P. Araujo, G. Blanco, J. M. Pintado, C. Freire, *Catal. Sci. Technol.* 1 (2011) 784-793.
- [28] A. G. Rincón, C. Pulgarin, *Appl. Catal. B: Environ.* 44 (2003) 263-284.

Highlights

- Nanocrystals of nanozeolite L were successfully functionalized with silicon phthalocyanine and APTES
- Viability cell tests showed an efficient photoinactivation of mammalian cells (as a pilot test) and *E. coli* bacteria
- A large amount of *E. coli* bacteria was photoinactivated by combining our nanomaterial and natural sunlight.

Organic-inorganic hybrid material based on zeolite L and silicon phthalocyanine for the photoinactivation of *E. coli* under natural sunlight

Renan C. F. Leitaó, Loren N. Trujillo, Andrei Leitaó*, Rodrigo Q. Albuquerque*

São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, 13560-970 São Carlos, Brazil

*Corresponding author

E-mail: rodrigo_albuquerque@iqsc.usp.br Phone: +55 (16) 3373-8779

E-mail: andleita@iqsc.usp.br Phone: +55 (16) 3373-9943

Electronic Supplementary Information

Chemicals. Nano-sized zeolite L Lucidot® crystals were obtained from Clariant GmbH (primary particle size 30-60 nm). Silicon 2,9,16,23-tetra-tert-butyl-29H,31H-phthalocyanine dihydroxide (SiPC) - dye content 80 %, chlorobenzene (anhydrous, 99.8 %), chlorobenzene (ACS reagent, ≥99.5 %), dichloromethane (anhydrous, ≥ 99.8 %), toluene (ACS reagent), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES, ≥ 98 %), Genapol® X-080 and lysogeny broth (LB) culture medium were purchased from Sigma-Aldrich. Ninhydrin (p.a. ACS reagent, 99%) and triethylamine (99%) were purchased from Vetec, Brazil. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin/EDTA solution, Fetal Bovine Serum (FBS) and Phosphate Buffer Solution (PBS) were obtained from Cultilab, Brazil. Mouse fibroblast cells (BALB/c 3T3 clone A31) were acquired from the Brazilian Cell Bank (BCRJ code: 0047). *Escherichia coli* cells (CBMAI 0696) were purchased from the Multidisciplinary Chemical, Biological and Agricultural Research Center (CPQBA), Brazil. Penicillin/streptomycin solution was obtained from Vitrocell. Sodium bicarbonate and glucose were acquired from AMRESCO and Guava ViaCount® Reagent for flow cytometry from Merck-Millipore.

Functionalization reaction. Zeolite L nanocrystals (average size of 30-60 nm) were first dried for 24 h in a muffle furnace at 200°C. 300 mg of dry nanocrystals and 50 mL of anhydrous chlorobenzene were transferred to a Teflon vessel and sonicated for 30 min in order to reduce

the nanocrystal aggregation. Subsequently, 60 mg of Silicon 2,9,16,23-tetra-tert-butyl-29H,31H-phthalocyanine dihydroxide (SiPC) were added and N₂ was bubbled for 10 min to remove moisture from the system. After 30 min of ultrasonic bath the system was refluxed at 135°C in oil bath for 6 h under stirring. The functionalized zeolite nanomaterial (nZeol-SiPC) was collected by centrifugation (15 min at 14,000 rpm). The recovered material was washed sequentially with chlorobenzene, toluene, dichloromethane, 0.2% surfactant Genapol® solution and deionized water for removing non-covalently bonded SiPC. Finally, 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) was functionalized onto the zeolite surface (nZeol-SiPC/APTES) following a procedure reported in literature.¹

Ninhydrin test. The presence of APTES functionalized on the zeolite surface was confirmed qualitatively by the ninhydrin reaction. Initially, the ninhydrin test solution was prepared by dissolving 0.5 g of ninhydrin reagent in 40 mL of 1-butanol and 10 mL of deionized water.² Then, 10 mg of nZeol-SiPC/APTES were added in 3 mL of ninhydrin test solution and stirred for 30 min at room temperature. The suspension obtained was centrifuged and photographic images were obtained to observe the color change of the ninhydrin solution after the ninhydrin reaction. The same ninhydrin test was carried out with free APTES. Finally, UV-Vis absorption of both resulting solutions was performed and their absorbances compared (Figure S5).

Cell culture for BALB/c 3T3 clone A31. Cells were grown in an incubator with 5% CO₂ at 37°C and 90% humidity in DMEM supplemented with 3.5 g L⁻¹ glucose solution, 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin solution. Cell suspension was made using 0.25% trypsin/EDTA solution (incubated for 10 min), followed by the addition of 20% FBS in PBS, pH 7.4. The suspension was centrifuged (5 min at 1000 rpm) and the supernatant was removed. The cell concentration was determined using a Neubauer counting chamber re-suspending the supernatant in 1 mL of culture medium. The BALB/c cell concentration used for the experiments cited below was 10⁵ cells mL⁻¹.

Cell culture for *E. coli* bacteria. The *E. coli* cells were cultured at room temperature in LB medium. Passage of cells was performed the day before the analysis, following overnight incubation and the subsequent flow cytometry data processing.

Characterization

Fig. S1. Normalized emission and excitation spectra of nZeol-SiPC in dichloromethane (λ_{em} 730 nm and λ_{exc} 640 nm).

Fig. S2. UV-vis absorption spectrum of SiPC in dichloromethane (10^{-5} mol L $^{-1}$) (a). Diffuse reflectance of solid SiPC (blue) and solid nZeol-SiPC (red line) (b).

Fig. S3. Cell viability assays of BALB/c cells suspended in PBS under artificial light irradiation with and without nanomaterial (nZeol-SiPC/APTES) and the respective dark control assays (no light). Experiments were done in triplicate in different days.

References

- [1] K. M. R. Kallury, P. M. Macdonald and M. Thompson, *Langmuir* 10 (1994) 492-499.
- [2] S. Huber and G. Calzaferri, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 6738-6742.