

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SÍLICAS HÍBRIDAS: POTENCIALIDADES DE AJUSTE DA  
ATIVIDADE DE MOLÉCULAS ENCAPSULADAS POR MEIO DA  
NATUREZA DO ORGANOSILANO**

LARISSA BRENTANO CAPELETTI

Porto Alegre  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LARISSA BRENTANO CAPELETTI

**SÍLICAS HÍBRIDAS: POTENCIALIDADES DE AJUSTE DA  
ATIVIDADE DE MOLÉCULAS ENCAPSULADAS POR MEIO DA  
NATUREZA DO ORGANOSILANO**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos  
Santos  
Orientador

Dr. Mateus Borba Cardoso  
Co-orientador

Porto Alegre, novembro de 2014. A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 10/2010 e 11/2014, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor João Henrique Zimnoch dos Santos e Co-orientação do Doutor Mateus Borba Cardoso. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenuti  
Ribeiro  
(PPGQ/UFRGS)

Prof. Dr. Sidney José Lima  
  
(UNESP)

Prof. Dr. Márcia Silva Lacerda Miranda  
(Braskem)

Prof. Dr. Nara Regina Basso  
(PUC-RS)

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos  
Orientador

Prof. Dr. Mateus Borba Cardoso  
Co-orientador

Larissa Brentano Capeletti

*“O êxito consiste em alcançar  
o que se deseja; a felicidade,  
em desejar o que se alcança.”*

*(Henry Kissinger)*

*À João, Marisa,  
Lucas e Miguel*

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos pela orientação desde a concepção desse trabalho. Agradeço também por esses dez anos de parceria e de um aprendizado amplo e multidisciplinar, durante o qual pude aproveitar uma série de oportunidades que com certeza me fizeram crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Dr. Mateus Borba Cardoso pela co-orientação e por toda a confiança e empenho em mim depositados. A oportunidade de realizar o trabalho dos antimicrobianos e o contato para realização do estágio sanduíche com certeza fizeram grande diferencial nesse trabalho e no meu desabrochar como pesquisadora. Em especial, agradeço de coração pela grande amizade, tua e da Jana, que tanto me incentivou a seguir em frente confiante.

À prof. Dra. Wei He pela acolhida e paciência durante o período de estágio sanduíche na Universidade do Tennessee, onde tive a oportunidade de expandir enormemente meus conhecimentos e realizar um trabalho diferenciado.

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas durante o período de doutorado e de estágio sanduíche no exterior. Ao Centro Brasileiro-Argentino de Nanotecnologia pela oportunidade de participar da Escola de Sol-gel na Universidade de Buenos Aires. Ao LNLS pelo experimentos nas linhas de espalhamento e absorção de raios X e XPS e também pela participação na 1ª e 2ª Escolas de SAXS. Ao prof. Dr. Ian Butler e a prof. Dra. Ione Maluf Baibich pelas análises de RMN no estado sólido e Raman realizadas na McGill. À Dra. Zenis Novais da Rocha pelas análises de voltametria realizadas na UFBA. Ao prof. Dr. Nei Fronza e prof. Dra. Fabiana Bortolini do Instituto Federal de Concórdia pela confiança e colaboração. Aos professores que compuseram a banca de qualificação prof. Dr. Edilson Valmir Benvenuto, prof. Dra. Ione Maluf Baibich e prof. Dra. Nara Basso. Aos professores e pesquisadores que dispuseram seu valioso tempo para compor a banca examinadora desse trabalho.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Catálise Ziegler-Natta da UFRGS, vulgo K-106, pela convivência e amizade durante uma significativa parte da minha vida. Aos queridos amigos do LNLS, pela ajuda, pela amizade e por fazerem o morar no campus nem tão solitário assim. Aos colegas da Universidade do Tennessee por todo auxílio científico e aqueles não tão científicos assim, pela agradável convivência e por terem ajudado a tornar o período que passei com vocês tão maravilhoso.

A todos os meus amigos, os velhos, os novos, os de longe, os de perto, os que compreendem e os que não compreendem. O fato é que mesmo o tempo passando, mesmo a agenda estando lotada, vocês sempre fazem a diferença ao longo do caminho.

Aos meus avós, que tanto torcem e rezam por mim durante minhas “andanças” mundo e Brasil afora. Aos familiares do Miguel por todo carinho, amizade e compreensão.

Ao Miguel por todo amor, carinho, compreensão, amizade e cumplicidade durante todos esses anos. Por muitas e muitas horas no Skype, pelo colo e abraço apertado sempre que precisei.

Ao Lucas, pela amizade verdadeira, acima de tudo.

Aos meus pais, João e Marisa, por serem a base de tudo. Por me incentivarem a correr atrás daquilo que sonho e acredito sempre com muita vontade, fé e coragem.

Enfim, agradeço mais uma vez a Deus por iluminar e olhar por mim e pelos que me cercam. Agradeço por tantas oportunidades, coisas e pessoas boas que sempre cruzam o meu caminho...

## RESUMO

Diferentes sílicas híbridas foram utilizadas na investigação do ajuste da atividade de materiais sintetizados por encapsulamento de moléculas pelo método sol-gel. Quatro diferentes aplicações obtidas por diferentes rotas sol-gel foram exploradas: sensores colorimétricos (rota hidrolítica ácida), antimicrobianos (rota hidrolítica básica), catalisadores (rota não hidrolítica) e filmes para crescimento celular (rota ácida). Onze organosilanos com diferentes grupos orgânicos, diferentes efeitos estéricos e indutivos foram empregados: metil, octil, octadecil, vinil, fenil, aminopropil, mercaptopropil, isocianatopropil, cloropropil, iodopropil e glicidoxipropil. As características estruturais, texturais, morfológicas e atividade foram avaliadas e os resultados foram correlacionados com as diferentes rotas e organosilanos empregados.

A performance dos sensores colorimétricos foi avaliada em função do tempo de resposta de detecção do gás amônia e mudança de cor por colorimetria. Os antimicrobianos foram avaliados na presença das bactérias gram negativa *Escherichia coli* e gram positiva *Staphylococcus aureus*. Os catalisadores foram avaliados na polimerização de etileno e os polímeros formados foram analisados por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e cromatografia de permeação em gel (GPC). Os filmes híbridos foram testados no crescimento e regeneração de células neuronais utilizando microscopia de fluorescência.

Esse estudo mostrou que juntamente com a rota escolhida para preparo, os organosilanos afetam diversas propriedades dos materiais. Algumas características são bastante dependentes do organosilano como o teor encapsulado, área específica e estrutura de rede. Outras características como microestrutura e morfologia foram mais influenciadas pela rota escolhida. Entretanto, analisando o conjunto de dados gerado do ponto de vista da performance de atividade dos diferentes materiais notou-se também a influência dos organosilanos. Seu uso implicou em mudanças na estrutura e textura das matrizes, o que influencia na compatibilidade do material com o meio de aplicação e também no controle do acesso ao composto imobilizado ou de sua liberação. Também pode haver uma interação direta com o organosilano influenciando no controle do balanço entre retenção/liberação dos compostos imobilizados ou mesmo alterando sua identidade. Essa combinação de efeitos demonstrou o potencial de ajuste da atividade de moléculas alvo empregando organosilanos.

## ABSTRACT

Different hybrid silicas were employed in the activity tuning investigation of different materials synthesized by sol-gel process encapsulation. Four different applications prepared by different sol-gel routes were explored: Colorimetric sensors (hydrolytic acid route), antimicrobial materials (hydrolytic basic route), catalysts (non-hydrolytic route) and films for cell growth (hydrolytic acid route with a second catalyst). Eleven organosilanes with organic groups bearing different steric and inductive effects were employed: methyl, octyl, octadecyl, vinyl, phenyl, aminopropyl, mercaptopropyl, isocyanatopropyl, chloropropyl, iodopropyl and glycidoxypropyl. Structural, textural and morphological characteristics and activity were evaluated. The results were correlated among each other and with different routes and organosilanes.

The colorimetric sensors performance was evaluated by response time and color change to ammonia gas presence. Antimicrobial materials were tested in the presence of gram-negative *Escherichia coli* and gram-positive *Staphylococcus aureus* bacteria. The catalysts were evaluated in ethylene polymerization and the resulting polymers were characterized using differential calorimetric scanning (DSC) and gel permeation chromatography (GPC). The hybrid films were tested in neuronal cells growth and regeneration investigated by fluorescence microscopy.

This study showed that the organosilanes and the synthetic route could affect several materials properties. Some characteristics were highly dependent on the organosilane as encapsulated content, specific area and network structure. Other features like microstructure and morphology were more influenced by the sol-gel route itself. However, influences of the organosilanes could be found by analyzing the generated data set from the point of view of the different materials activity performance. The matrix structure and texture were dependent of the organosilane regulating compatibility with application medium and access to the immobilized compound. Also, organic groups interaction with encapsulated compound regulates immobilization/delivery balance and compound identity maintenance. This combination of effects has demonstrated the potential activity tuning of target molecules using organosilanes.

# ÍNDICE

Resumo .....	iv
Abstract.....	v
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xv
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>5</b>
2.1 Contexto.....	6
2.2 Rotas sol-gel .....	6
2.3. Tipos de materiais.....	8
2.4. Aplicações .....	10
2.4.1. Sensores .....	12
2.4.2. Antimicrobianos .....	15
2.4.3. Catalisadores.....	17
2.4.4. Recobrimentos .....	20
<b>3. Objetivos e metas .....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
3.3 Metas específicas.....	25
<b>4. Procedimento Experimental .....</b>	<b>26</b>
4.1. Materiais utilizados.....	27
4.2. Escolha dos diferentes silanos .....	28
4.3. Escolha da Rota .....	28
4.4. Nomenclatura.....	29
4.5. Síntese dos materiais pelo processo sol-gel.....	29
4.5.1. Sensores colorimétricos (SG) .....	29
4.5.2. Antimicrobianos (AM) .....	30
4.5.3. Catalisadores de Polimerização (CP) .....	30
4.5.4. Filmes para crescimento celular (FC).....	31
4.6. Testes de performance .....	31
4.6.1. Detecção de gás amônia pelos sensores colorimétricos .....	32

4.6.2. Efeito antimicrobiano contra bactérias Gram + e Gram - .....	33
4.6.3. Polimerização de etileno.....	33
4.6.4. Crescimento de regeneração de células .....	34
4.7. Caracterização dos materiais .....	35
4.7.1. Quantificação por espectrometria no ultravioleta visível (UV-vis).....	35
4.7.2. Quantificação de cor.....	36
4.7.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ....	36
4.7.4. Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (ATR) .....	36
4.7.5. Espectroscopia Raman.....	37
4.7.6. Ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>29</sup> Si e <sup>13</sup> C no estado sólido .....	37
4.7.7. Voltametria cíclica e de pulso diferencial .....	38
4.7.8. Porosimetria de nitrogênio.....	38
4.7.9. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).....	39
4.7.10. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	40
4.7.11. Microscopia de força atômica (AFM) .....	40
4.7.12. Ângulo de contato (WCA).....	40
4.7.13. Potencial Zeta .....	41
4.7.14. Espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).....	41
4.7.15. Espectroscopia de emissão de fóton induzido por Raios X (XPS).....	42
4.7.16. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....	42
4.7.17. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	42
4.7.18. Análises estatísticas .....	43
<b>5. Resultados e Discussões.....</b>	<b>44</b>
5.1. Sensores .....	45
5.1.1. Efeito do organosilano no teor de indicador encapsulado.....	45
5.1.2. Efeito do organosilano no indicador encapsulado .....	46
5.1.3. Efeito do organosilano nas propriedades estruturais e texturais.....	51
5.1.3.1. Relações do espectro vibracional com a estrutura de rede de sílica.....	58
5.1.3.2. Evolução da formação da rede de sílica .....	62
5.1.3.3. Microestrutura da rede de sílica.....	66
5.1.4. Características Morfológicas .....	70
5.1.5. Efeito do organosilano na resposta dos sensores.....	72
5.2. Antimicrobianos .....	74

5.2.1. Efeitos do organosilano no teor de antibiótico encapsulado .....	75
5.2.2. Efeito do organosilano nas características estruturais e texturais dos antimicrobianos .....	77
5.2.2.1. Relações do espectro vibracional com a estrutura de rede das sílicas utilizadas como antimicrobiano.....	80
5.2.2.2. Efeitos do organosilano na microestrutura dos antimicrobianos.....	81
5.2.3. Efeito do organosilano nas propriedades morfológicas dos materiais antimicrobianos .....	86
5.2.4. Efeito do organosilano na atividade antimicrobiana .....	88
5.3. Catalisadores de polimerização .....	92
5.3.1. Efeitos do organosilano no percentual de Zr presente.....	93
5.3.2. Efeito do organosilano na estrutura do catalisador encapsulado.....	94
5.3.3. Efeito do organosilano nas propriedades estruturais e texturais dos catalisadores.....	96
5.3.3.2 Efeitos do organosilano na microestrutura dos catalisadores.....	98
5.3.4. Características Morfológicas .....	102
5.3.5. Efeito do organosilano na atividade de polimerização e propriedades dos polímeros .....	104
5.4. Crescimento e regeneração de células neuronais .....	108
5.4.1. Caracterização dos filmes de sílica.....	108
5.4.2. Comportamento de células neuronais sob os filmes de sílica .....	112
5.4.2.1. Adesão e viabilidade de células PC12.....	112
5.4.2.2. Diferenciação e morfologia de células PC12 .....	115
5.4.2.3. Adesão de viabilidade de células corticais primárias .....	118
5.4.2.4. Diferenciação e morfologia de células corticais.....	119
5.4.3. Comportamento de células astrócitos .....	123
5.5. Transversalização dos Resultados .....	126
5.5.1. Encapsulamento e retenção de compostos.....	126
5.5.2. Efeito do organosilano sobre a molécula alvo.....	127
5.5.3. Estrutura e textura dos materiais .....	128
5.5.4. Atividade .....	129
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>131</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>133</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Potenciais interações do vermelho de alizarina com uma série de organosilanos presentes em sílicas híbridas sintetizadas pelo processo sol-gel.....	4
<b>Figura 2.1:</b> Desenvolvimento estrutural de uma sílica-gel em função das condições do meio. Adaptado de [7]. .....	7
<b>Figura 2.2:</b> Exemplos de produção de diferentes materiais no processamento sol-gel. Adaptado de [8]. .....	9
<b>Figura 2.3:</b> Preparação do adsorvente híbrido com impressão de Pb(II) [19].....	10
<b>Figura 2.4:</b> Representação esquemática do biosensor de citocromo-c e a transferência direta de elétrons que ocorre apenas na sílica funcionalizada com o grupo metil [25].....	11
<b>Figura 2.5:</b> Resposta dos sensores preparados pelo encapsulamento de (a) vermelho de alizarina, (b) amarelo brilhante e (c) acridina a soluções aquosas com pH variando de 1 a 14 [46]. .....	15
<b>Figura 2.6:</b> Representação esquemática da interação do fármaco ibuprofeno com a rede de sílica. (a) interações fracas pelas pontes de hidrogênio com os grupos silanol da sílica não funcionalizada. (b) ligação iônica forte do fármaco com os grupos amino da sílica funcionalizada. Adaptado da referência [49]. .....	17
<b>Figura 2.7:</b> Representação esquemática do processo de extrusão durante a próprio reação de polimerização adaptado da referência [62]. .....	19
<b>Figura 2.8:</b> Representação esquemática do efeito da estrutura nanoporosa de sílica na adsorção de proteínas e comportamento de adesão celular adaptado da referência [64]. (A) Membrana de plasma, (B) integrinas, (C) proteínas ECM e (D) canais nanoporosos. ....	20
<b>Figura 4.1:</b> Vidraria desenvolvida para a coleta do tempo de resposta ao gás amônia dos sensores. ....	32
<b>Figura 5.2:</b> Processo de eletrodo para vermelho de alizarina.....	49
<b>Figura 5.3:</b> Voltamogramas de pulso do eletrodo modificado com (A) SG-Ph e (B) SG-NCOp em solução aquosa de tampão BR pH 1, 2, 3 e 4. Varredura anódica em $v=100 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	50
<b>Figura 5.4:</b> Espectros de infravermelho e Raman para a sílica não híbrida (SG-C <sub>0</sub> )....	52

<b>Figura 5.5:</b> Espectros de Raman para as sílicas híbridas obtidas pelo método sol-gel hidrolítico utilizando catalise ácida. ....	57
<b>Figura 5.6:</b> Representação dos tipos mais comuns de arranjos cíclicos primários das unidades estruturais SiO <sub>4</sub> em xerogeis: (A) anel siloxano de 4 membros (SiO) <sub>4</sub> e (B) anel siloxano de 6 membros (SiO) <sub>6</sub> . Adaptado da referência [101]. ....	59
<b>Figura 5.7:</b> Relação entre o percentual de anéis siloxano de seis membros ((SiO) <sub>6</sub> ) e o volume dos grupos funcionais dos organosilanos empregados. ....	61
<b>Figura 5.8:</b> Espectros de RMN de <sup>29</sup> Si no estado sólido, obtidos com a técnicas de ângulo mágico e polarização cruzada (CP-MAS). ....	62
<b>Figura 5.9:</b> Espectros de NMR de <sup>13</sup> C no estado sólido obtidos utilizado as técnicas de ângulo mágico e polarização cruzada (CP-MAS). ....	66
<b>Figura 5.10:</b> Seis diferentes grupos de microestrutura representados pelas curvas de SAXS e seus respectivos ajustes unificados. ....	68
<b>Figura 5.11:</b> Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. A: SG-C <sub>0</sub> , B: SG-C <sub>1</sub> , C: SG-C <sub>8</sub> , D: SG-C <sub>18</sub> , E: SG-Vy, F: SG-Ph, G: SG-NH <sub>2</sub> p, H: SG-SHp, I: SG-NCOp, J: SG-Clp, L: SG-Ip e M: SG-Gp. ....	71
<b>Figura 5.12:</b> Formação de nanopartículas observada para as amostras (A) SG-Vy, (B) SG-Ph, (C) SG-NCOp e (D) SG-Ip. ....	72
<b>Figura 5.13:</b> Resultados de performance dos diferentes sensores em termos de (A) mudança de cor ( $\Delta E_{ab}^*$ ) e tempo de resposta ( $p < 0,05$ ). ....	73
<b>Figura 5.14:</b> Estrutura da tetraciclina. ....	77
<b>Figura 5.15:</b> Espectros de infravermelho obtidos via FTIR para as sílicas híbridas utilizadas como antimicrobiano contendo tetraciclina encapsulada (—) e seu respectivo branco (- - -). ....	78
<b>Figura 5.16:</b> Curvas representativas dos dois diferentes perfis de SAXS encontrados para os antimicrobianos. (A) Nanopartículas de sílica em AM-C <sub>0</sub> com (vermelho) e sem tetraciclina (azul). (B) Gel de sílica em AM-Vy com ( $\Delta$ ) e sem tetraciclina ( $\circ$ ). ....	84
<b>Figura 5.17:</b> Microscopia eletrônica de transmissão dos antimicrobianos sintetizados com os diferentes organosilanos. Barra de escala de 200 nm. ....	87
<b>Figura 5.18:</b> Exemplo das placas utilizadas para contagem de unidades formadoras de colônia nos testes de atividade antimicrobiana. (A) Controle da bactéria <i>E. coli</i> , (B) na presença de AM-C <sub>0</sub> sem TC (branco) e (C) AM-C <sub>0</sub> contendo TC encapsulada. ....	89

<b>Figura 5.19:</b> Atividade antimicrobiana das diferentes sílicas híbridas contra a bactéria <i>E. coli</i> . As barras representam a eficiência dos materiais como $\log(N/N_0)$ onde N é o número de colônias sobreviventes normalizado para $N_0$ que representa o número de bactérias do controle. (A) Concentração de tetraciclina de $17,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e (B) concentração de tetraciclina de $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	90
<b>Figura 5.20:</b> Atividade antimicrobiana das diferentes sílicas híbridas contra a bactéria <i>S. aureus</i> . As barras representam a eficiência dos materiais como $\log(N/N_0)$ onde N é o número de colônias sobreviventes normalizado para $N_0$ que representa o número de bactérias do controle. (A) Concentração de tetraciclina de $17,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e (B) concentração de tetraciclina de $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	91
<b>Figura 5.21:</b> Espectro de fotoelétrons de raios X de alta resolução (XPS) na região de Zr $3d^{5/2}$ e $3d^{3/2}$ para os catalisadores de polimerização e as respectivas energias de ligação para cada espécie.....	95
<b>Figura 5.22:</b> Espectros de FTIR-ATR para os catalisadores contendo $\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2$ encapsulado nas diferentes sílicas híbridas. ....	97
<b>Figura 5.23:</b> Exemplos de curvas de SAXS para os catalisadores CP- $\text{C}_0$ e CP- $\text{I}_p$ com (O) e sem ( $\Delta$ ) $\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2$ encapsulado. ....	100
<b>Figura 5.24:</b> Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para os catalisadores de polimerização. Barra de escala de 100 nm. ....	103
<b>Figura 5.25:</b> Resultados de performance dos catalisadores de polimerização. (A) Atividade catalítica, (B) cristalinidade e temperatura de amolecimento ( $T_m$ ), (C) polidispersão e (E) massas molares $M_n$ e $M_w$ . ....	106
<b>Figura 5.26:</b> Deconvolução das curvas obtidas pela cromatografia de permeação em gel (GPC) mostrando os detalhes da distribuição de massas molares.....	107
<b>Figura 5.27:</b> Imagens de AFM para os filmes de sílica. Dimensão lateral x e y de $5 \mu\text{m}$ para todos os casos e dimensão z indicada para cada imagem.....	109
<b>Figura 5.28:</b> Valores de rugosidade RMS em nm obtidos pelas imagens de AFM mostrando a influência da natureza do organosilano nas características topográficas dos filmes.....	110
<b>Figura 5.29:</b> Medidas de ângulo de contato com água. (A) Resultados para os diferentes filmes de sílica. Exemplos da imagem obtida para (B) FC-C8 com ângulo $102^\circ$ , (C) FC-Vy com ângulo $80^\circ$ e (D) FC-C0 com ângulo $58^\circ$ .....	111
<b>Figura 5.30:</b> Ensaio de adesão e viabilidade celular PC12 com marcação Live/Dead <sup>®</sup> 24h após inoculação na presença dos diferentes filmes de sílica. Imagens de	

contraste de fase antes da marcação acima e fluorescência nos canais azul, verde e vermelho abaixo. Barra de escala correspondente a 200 $\mu\text{m}$ .....	113
<b>Figura 5.31:</b> Contagem de células PC12 aderidas 24h após a inoculação sobre as sílicas híbridas em comparação ao vidro e ao controle PLL (poli-L-lisina). .....	114
<b>Figura 5.32:</b> Células PC12 diferenciadas após 48h da adição de fator de crescimento neural marcadas para filamentos actina (Alexa Fluor-488 faloidina) e núcleo (Hoechst <sup>®</sup> 33342) em (A) controle PLL, (B) FC-NH <sub>2</sub> p e (C) FC-SHp. Imagens de fluorescência com as cores correspondentes acima e invertidas para melhor visualização abaixo.....	116
<b>Figura 5.33:</b> Quantificação da evolução de crescimento dos neuritos para FC-NH <sub>2</sub> p. (A) tamanho médio de neurito, (B) número médio de neuritos por célula, (C) percentual de células expressando neuritos e (D) análise das ramificações indicada como número de ramificações por extensão (mm) de neurito desenvolvido. ....	117
<b>Figura 5.34:</b> Ensaio de adesão e viabilidade de células corticais com marcação Live/Dead <sup>®</sup> 24h após inoculação para (A) controle PLL e (B) FC-NH <sub>2</sub> p. (C) Contagem de células aderidas em cada recobrimento 24h após inoculação. Barra de escala correspondente a 200 $\mu\text{m}$ . .....	119
<b>Figura 5.35:</b> Imagens de fluorescência para células corticais após 72h de cultura mostrando filamentos actina (vermelho), microtúbulos (verde), núcleo (azul), além da soma de todos os canais (coluna da direita). (A, B, C, D) Controle PLL e (E, F, G, H) amostra FC-NH <sub>2</sub> p. Barra de escala de 100 $\mu\text{m}$ .....	120
<b>Figura 5.36:</b> Morfologia celular investigada por microscopia eletrônica de varredura das células corticais após 72h de cultura em (A,B) PLL e (C,D) FC-NH <sub>2</sub> p. Barra de escala de 1 $\mu\text{m}$ .....	121
<b>Figura 5.37:</b> Percentual de células corticais em cada estágio de maturidade após 72h de cultura para o controle PLL e FC-NH <sub>2</sub> p. ....	122
<b>Figura 5.38:</b> Contagem de células astrócitos para adesão após 4h de cultura (barras pretas) e para proliferação após 48h (barras vermelhas) (*p<0.05). .....	124
<b>Figura 5.39:</b> Imagens de fluorescência para investigação da morfologia de astrócitos mostrando citoesqueleto (verde), filamentos actina (vermelho) e núcleo (azul) para (A) controle PLL, (B) vidro puro, (C) FC-C <sub>0</sub> e (D) FC-NH <sub>2</sub> p. ....	124

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Exemplo de sensores preparados pela imobilização ou encapsulamento de elementos receptores em matrizes de sílica obtida pelo método sol-gel. ....	13
<b>Tabela 4.1:</b> Reagentes utilizados no preparo dos materiais.....	27
<b>Tabela 5.1:</b> Teor do indicador vermelho de alizarina encapsulado em função do organosilano utilizado.....	46
<b>Tabela 5.2:</b> Comprimentos de onda para os máximos de banda para o vermelho de alizarina encapsulado nas diferentes sílicas híbridas.....	48
<b>Tabela 5.3:</b> Bandas referentes à sílica para os materiais híbridos obtidos a partir dos diferentes organosilanos. ....	55
<b>Tabela 5.4:</b> Percentual de anéis com seis membros siloxano calculados via deconvolução dos espectros de Infravermelho via ATR e transmitância usando pastilha.....	60
<b>Tabela 5.5:</b> Percentual das espécies de Si obtidas pela deconvolução dos espectros de <sup>29</sup> Si NMR.....	64
<b>Tabela 5.6:</b> Resultados de área específica (S <sub>BET</sub> ) para os sensores. ....	67
<b>Tabela 5.7:</b> Resultados para os parâmetros obtidos por SAXS para os sensores. ....	70
<b>Tabela 5.8:</b> Coloração dos sensores antes e após contato com gás amônia. ....	73
<b>Tabela 5.9:</b> Percentual de tetraciclina encapsulada nos materiais preparados com os diferentes organosilanos. ....	76
<b>Tabela 5.10:</b> Percentual de anéis com seis membros siloxano (SiO) <sub>6</sub> para os antimicrobianos calculado a partir da deconvolução dos espectros de FTIR obtidos por ATR.....	80
<b>Tabela 5.11:</b> Áreas específicas dos materiais antimicrobianos e seu respectivos controles medidas por porosimetria de nitrogênio. ....	82
<b>Tabela 5.12:</b> Potencial zeta dos materiais antimicrobianos calculado pelo modelo de Smoluchowski a partir da mobilidade eletroforética. ....	83
<b>Tabela 5.13:</b> Raio das nanopartículas e raio de giro das partículas primárias dos géis formados com os diferentes organosilanos e tetraciclina. ....	86
<b>Tabela 5.14:</b> Percentual de zircônio presente em cada catalisador preparado com os diferentes organosilanos. ....	93

<b>Tabela 5.15:</b> Percentual de anéis com seis membros siloxano (SiO) <sub>6</sub> para os catalisadores de Zr calculado a partir da deconvolução dos espectros de FTIR obtidos por ATR. ....	98
<b>Tabela 5.16:</b> Áreas específicas (BET) dos catalisadores e controles medidas por porosimetria de nitrogênio. ....	99
<b>Tabela 5.17:</b> Resultados de SAXS para raio de giro (Rg <sub>1</sub> ), distância de correlação e número de vizinhos das partículas primarias no primeiro nível de organização..	101
<b>Tabela 5.18:</b> Resultados para lei das potências dos segundo (P <sub>2</sub> ) e terceiro (P <sub>3</sub> ) níveis de organização e raio e giro para o segundo nível (Rg <sub>2</sub> ). ....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

- SG** – Sensor para gases
- AM** – Antimicrobianos
- CP** – Catalisadores de Polimerização
- FC** – Filmes para crescimento de células
- TEOS** – tetraetoxisilano
- UV-vis** – Espectroscopia molecular no ultravioleta-visível
- FTIR** – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
- ATR** - Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada
- VC** – Voltametria Cíclica
- VPD** – Voltametria de pulso diferencial
- RMN** – Ressonância magnética nuclear
- SAXS** – Espalhamento de raios X em baixo ângulo
- TEM** – Microscopia eletrônica de transmissão
- AFM** – Microscopia de força atômica
- WCA** – Ângulo de contato com água
- ICP-OES** – Espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
- XPS** – Espectroscopia de fótons induzidos por raios X
- GPC** – Cromatografia de permeação em gel
- DSC** – Calorimetria diferencial de varredura

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Sílicas sintéticas amorfas (SAS – *synthetic amorphous silica*), cujo termo abrange sílicas arco, pirogênicas, precipitadas e gel, possuem aplicações nos mais diversos campos. Propriedades abrasivas, de reforço, de adsorção, de isolamento, entre outros, permitem-lhe aplicações em áreas tão distintas como indústria de tintas, de polímeros, de alimentos ou farmacêutica [1-4]. Mais recentemente, sílicas de dimensões nanométricas (nanosílicas) vêm sendo aplicadas, por exemplo, na formação de compósitos poliméricos com novas propriedades, tais como melhor resistência à abrasão ou na liberação de fármacos em organismos vivos [3, 5].

A heterogeneização de moléculas, das mais diversas classes, seja por encapsulamento, seja por imobilização em sua superfície por processos de *grafting* (enxerto) ou impregnação, visam conferir ao material final: (i) possibilidade de reutilização (por simples separação via filtração), (ii) estabilidade térmica, (iii) espaçamento intermolecular, (iv) facilidade de adsorção, entre outras. Inúmeros são os exemplos de abordagens de imobilização, de moléculas heterogeneizadas e aplicações avaliadas [6].

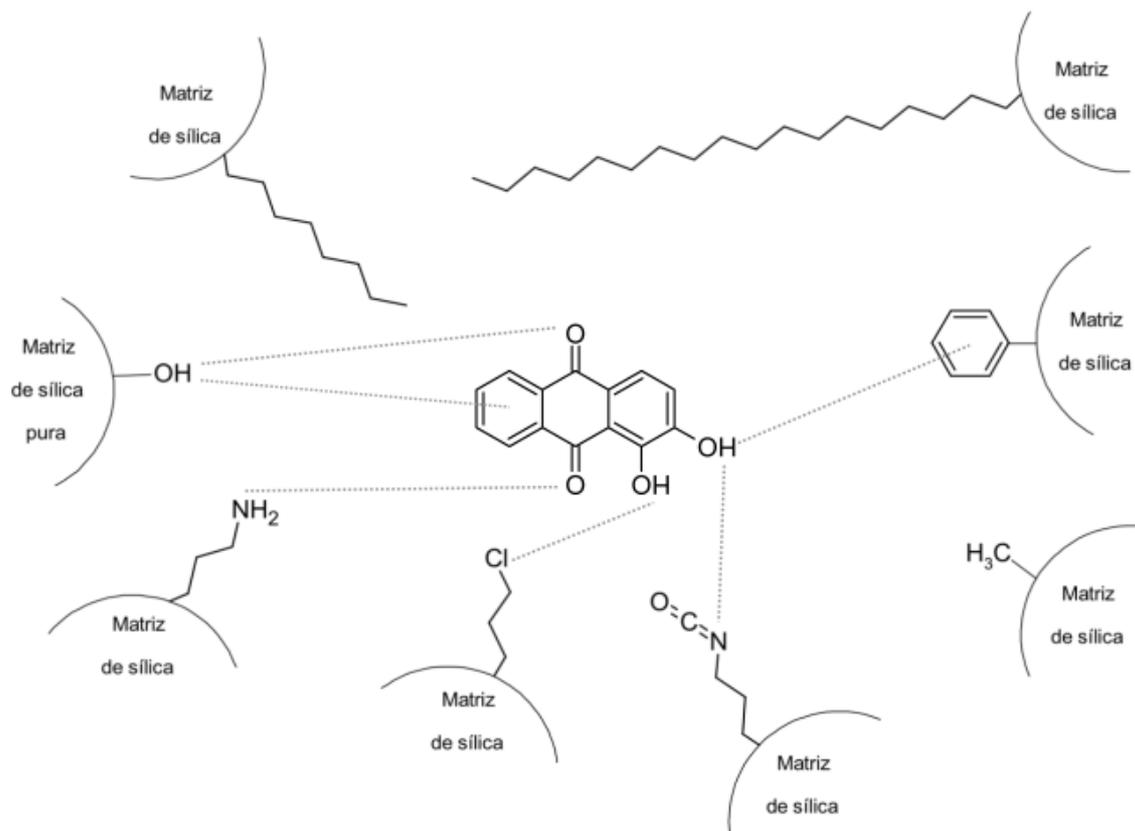
O processo sol-gel representa uma ferramenta-chave na elaboração de materiais híbridos. Esse processo consiste no crescimento e agregação de partículas coloidais para formar um gel, sendo que essas partículas coloidais são formadas a partir de precursores metálicos cercados de ligantes que não contém o átomo metálico como os alcóxidos que são amplamente utilizados. O termo sol é empregado para definir uma suspensão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 1000 nm) estável em um fluido, enquanto um sistema gel pode ser visto como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) [7].

O termo material híbrido é usado para diversos sistemas, varrendo uma ampla área de materiais, tais como polímeros de coordenação cristalinos altamente ordenados, compostos amorfos produzidos pelo método sol-gel, e materiais com ou sem interação química entre as unidades orgânicas e inorgânicas. Kichelbick define material híbrido como aquele que inclui dois materiais misturados em escala molecular [8]. Comumente, um desses compostos é de natureza inorgânica, e o outro, orgânica. O avanço no desenvolvimento de materiais híbridos é atribuído ao desenvolvimento do processo sol-gel por volta de 1930. Condições brandas de reações, muito próximas às condições

ambientes, controle e variedade de condições reacionais e estabilidade da ligação Si-C nos compostos formados são algumas das vantagens apresentadas pelo processo sol-gel que garantiram, por sua vez, o avanço na produção de materiais híbridos. Os materiais híbridos orgânico-inorgânicos produzidos pelo processo sol-gel foram denominados ORMOSILs (*organically modified silicates*), ORMOCERs (*organically modified ceramics*), CERAMER (*ceramic polymers*) ou POLYCERAMs (*polymeric ceramics*). Esses materiais visam combinar propriedades de grupos orgânicos e de polímeros (funcionalização, facilidade de processamento a baixas temperaturas, durabilidade) com propriedades de materiais vítreos ou de materiais cerâmicos (dureza, estabilidade térmica e química), a fim de gerar materiais com propriedades novas e sinérgicas, inacessíveis de outra forma [6].

Estudos anteriores mostraram que a taxa relativa entre as reações de hidrólise dos grupos alcóxidos e condensação entre os grupos hidróxidos (silanóis) desempenha um papel fundamental nas propriedades texturais resultantes. Essas, por sua vez, têm relevância ao permitir ou não o acesso de um determinado substrato à molécula-alvo incorporada ou encapsulado, por exemplo. Contudo, as propriedades do material híbrido não dependem apenas de características texturais como tamanho de poro e área específica. Aspectos estruturais referentes à natureza química de sítios ácidos ou básicos (seja de natureza atômica ou molecular) afetam também a atividade da molécula incorporada. Entenda-se aqui atividade tanto do ponto de vista atividade catalítica (catalisador de polimerização), como atividade em responder à mudança de pH (sensor colorimétrico) ou de desempenhar atividade antimicrobiana.

Independente da natureza da molécula encapsulada, seja ela catalisador de polimerização, sensor de pH ou fármaco, grupos presentes na matriz de sílica devem afetar as interações decorrentes entre os diversos componentes do sistema. O Figura 1.1 ilustra algumas potenciais interações entre a matriz híbrida da sílica e o indicador de pH (corante) vermelho de alizarina. Portanto, a presença de ligantes polares ou apolares, hidrofílicos ou hidrofóbicos, de cadeia de hidrocarbonetos longa ou curta deve influenciar o acesso, a polaridade e a conformação da molécula encapsulada. Com base em estudos anteriores [9-11] e no esquema abaixo, levanta-se a hipótese de que o controle no entorno da molécula-alvo, de interesse, possa ajustar as propriedades almeçadas de forma a garantir a atividade do composto de interesse.



**Figura 1.1:** Potenciais interações do vermelho de alizarina com uma série de organosilanos presentes em sílicas híbridas sintetizadas pelo processo sol-gel.

A presente tese encontra-se organizada da seguinte maneira. O capítulo de revisão bibliográfica discutirá aspectos e o estado-da-arte relacionados ao processo sol-gel em termos de rotas existentes, diferentes materiais passíveis de preparo utilizando esse método e as aplicações mais relevantes publicadas no último ano. Após a apresentação dos objetivos, o capítulo seguinte demonstra os materiais e procedimentos utilizados. A apresentação e discussão dos resultados está estruturada em um capítulo com cinco partes. Cada uma das quatro aplicações estudadas: sensores, materiais antimicrobianos, catalisadores de polimerização e filmes para crescimento e regeneração de neurônios foi discutida em uma das partes. Por fim, uma última seção discutindo a transversalização dos resultados auxilia na comparação entre os dados obtidos ao longo das diferentes aplicações, promovendo a discussão que sustenta a presente tese.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CONTEXTO**

O processo sol-gel é extremamente flexível, tanto quanto a sílica que pode ser produzida com seu emprego. O grande interesse nessa tecnologia também é fruto de sua simplicidade e baixo custo. É possível produzir redes inorgânicas a partir da hidrólise e condensação de alcóxidos metálicos ou não, como os de silício e titânio com propriedades ajustadas a baixas temperaturas. Além disso, é possível obter materiais com redes inorgânicas e orgânicas interconectadas, formando materiais híbridos que são de grande interesse atualmente [12].

Os primeiros estudos no método sol-gel datam da metade dos anos 1800 [13], entretanto despertam grande interesse até os dias atuais. Uma rápida prova disso pode ser obtida utilizando plataformas de busca bibliografia científica como a Web of Science. Uma busca simples cruzando os temas sol-gel e sílica no tópico dos trabalhos publicados resultam no surpreendente número de 1025 trabalhos publicados apenas para os nove primeiros meses de 2014<sup>1</sup>. Dentre essas atuais pesquisas pode-se observar tanto trabalhos focados em aplicação, como trabalhos voltados à síntese e seus parâmetros para obtenção de materiais com características específicas. Dentre as diversas áreas estudadas, observa-se os mais diferentes tipos de sílicas e híbridos contendo sílica empregados para impressão molecular, cargas de reforço, liberação controlada de fármacos, catálise, recobrimentos, entre inúmeras outras.

### **2.2 ROTAS SOL-GEL**

Essas sílicas e materiais híbridos preparados pelo processo sol-gel podem ser obtidos utilizando diferentes processos. De uma forma geral, a escolha do procedimento a ser utilizado varia de acordo com as características e propriedades do material e/ou aplicação de interesse. Dentre os principais métodos utilizados pode-se citar as rotas: (i) hidrolítica de catálise ácida ou básica a partir de alcóxidos ou silicatos e (ii) rota não hidrolítica. Essas rotas e seus mecanismos de reação de hidrólise e condensação são

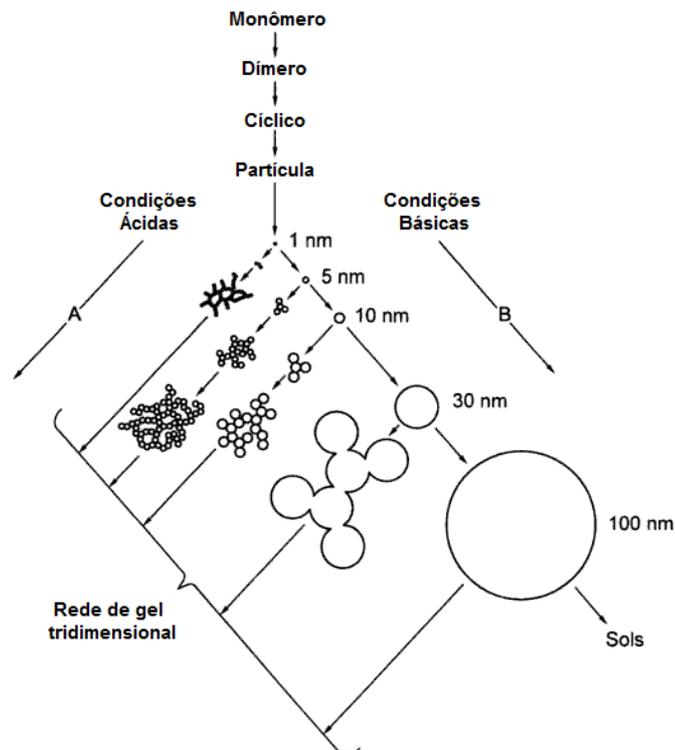
---

<sup>1</sup> Pesquisa realizada em 6 de outubro de 2014 em <http://apps.webofknowledge.com>.

amplamente discutidos na literatura [7, 12] e, portanto, não serão aprofundados neste trabalho.

As rotas hidrolíticas são baseadas na hidrólise e condensação de alcóxidos de silício. Essas são as rotas sol-gel mais populares nas quais a sequência de reações conduz à formação de espécies com a funcionalidade silanol (Si-OH). A posterior polimerização desses grupos via condensação leva então à formação de um gel tridimensional [14]. As condições e parâmetros utilizados durante a síntese influenciam fortemente o produto final. Dessa forma, materiais com diferentes características e propriedades podem ser obtidas [2].

Esses alcóxidos de silício possuem uma baixa reatividade de forma geral. Portanto, adicionam-se ao meio reacional catalisadores ácidos (rota hidrolítica ácida) ou básicos (rota hidrolítica básica) a fim de aumentar a velocidade das reações que levam à formação de sílica [6, 15]. Uma ilustração da formação de diferentes estruturas de sílica em função do catalisador utilizado é encontrada na Figura 2.1.



**Figura 2.1:** Desenvolvimento estrutural de uma sílica-gel em função das condições do meio. Adaptado de [7].

Quando o catalisador ácido é empregado, valores baixos de pHs estimulam principalmente as reações de hidrólise dos grupos alcóxido. Dessa forma, partículas muito pequenas são formadas e uma rede tridimensional reticulada que pode ocupar todo volume reacional, formando um gel que por envelhecimento se tornará um monolito. Já quando um catalisador básico é empregado, o pH elevado promoverá principalmente as reações de condensação. Esse processo leva à rápida formação de partículas esféricas que são então precipitadas no meio reacional. Por fim, o emprego de soluções de silicato podem prevenir a formação de álcool residual que pode ser importante para aplicações biológicas [16].

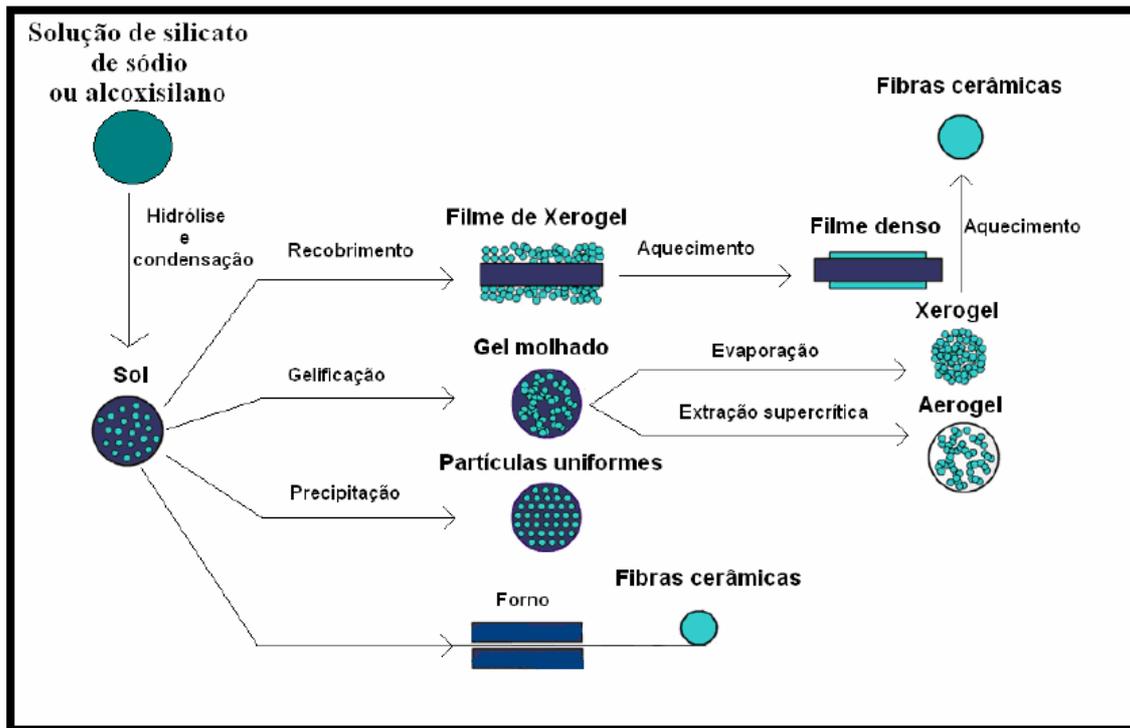
Já a rota não hidrolítica utiliza sais como precursores para a reação sol-gel juntamente com o alcóxido. A utilização de água nesse caso não se faz necessária e ela pode ser executada em atmosfera livre de ar. Essa característica é chave para a heterogeneização de compostos sensíveis à oxigênio e umidade. O processo consiste na condensação entre o cloreto metálico e o alcóxido com a eliminação de haleto alquílico. A reação envolve a clivagem nucleofílica das ligações O-R que é influenciada pelos efeitos eletrônicos no átomo de carbono. No caso de metais de transição, a condensação ocorre em torno de 100 °C, implicando energias de ativação maiores do que aquelas envolvidas nos processos hidrolíticos. Entretanto, como o silício é menos reativo, ácidos de Lewis ( $MCl_3$ ) como cloretos de ferro ou alumínio, são necessários para catalisar a condensação [17].

### **2.3. TIPOS DE MATERIAIS**

Devido à versatilidade já citada do processo sol-gel pode-se obter uma ampla gama de diferentes materiais, derivados tanto do sol, como do gel. Entre eles pode-se citar: fibras cerâmicas, filmes finos densos, filmes de xerogel, xerogel e aerogel, como mostra a Figura 2.2. Esses materiais podem ser empregados na manufatura de diversos produtos como filmes finos para recobrimentos, particulados (pó derivado do xerogel), nanopartículas, etc.

Xerogéis são o tipo de material mais simples de ser obtido. São sílicas amorfas que podem ser preparadas a partir da rota hidrolítica ácida. São obtidos em geral na forma de um monolito que pode ser reduzido a outras formas como pó. Usando condições reacionais brandas é possível a incorporação de moléculas sensíveis, como

aquelas com baixa estabilidade térmica ou mesmo biomoléculas com a retenção da atividade enzimática, por exemplo [18]. Também é possível depositar uma fina camada do gel sobre um substrato formando um filme fino, variando ainda mais a gama de aplicações desses materiais.



**Figura 2.2:** Exemplos de produção de diferentes materiais no processamento sol-gel. Adaptado de [8].

Partículas uniformes podem ser obtidas utilizando a rota hidrolítica básica e também é conhecido como processo de Stöber e utiliza o hidróxido de amônio como catalisador [15]. O tamanho e polidispersão podem variar de acordo com os parâmetros utilizados, sendo possível a formação desde nano- até micropartículas. Devido às suas características peculiares de esfericidade, porosidade ajustável e possibilidade de controle de tamanho, esse material se torna bastante atraente para aplicações variando da área biológica à catálise.

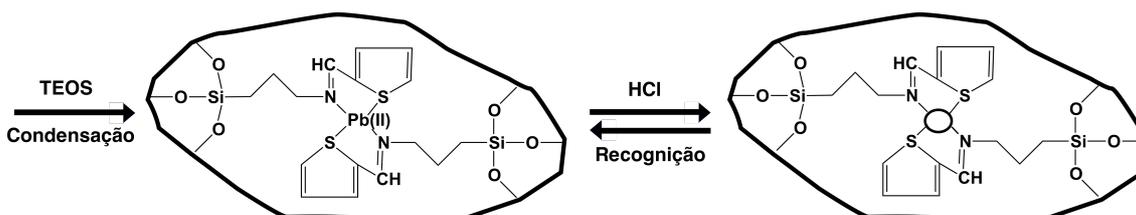
Já os aerogéis são materiais de baixíssima densidade e propriedades muito especiais. Eles podem ser obtidos pela secagem em condições supercríticas de um gel tridimensional obtido em geral por rota ácida. O gel ainda molhado é submetido a altas pressões de forma que o solvente nos seus poros é substituído geralmente por dióxido

de carbono líquido. Empregando um processo controlado, o CO<sub>2</sub> é evaporado sem colapsar os poros formados durante o processo de reticulação da rede. O resultado é um material de elevada porosidade, extremamente leve e de propriedades isolantes bastante diferenciadas.

## 2.4. APLICAÇÕES

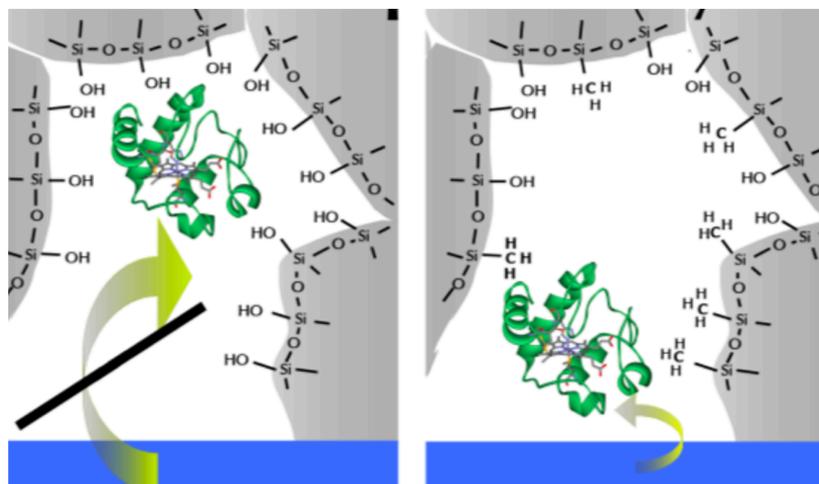
Se a flexibilidade do processo sol-gel é ampla, maior ainda será sua gama de aplicações e a possibilidade de criação de materiais específicos. A atualidade do tema pode ser evidenciada por uma série de artigos recém publicados (em 2014) nas mais diversas áreas. As principais aplicações envolvem o desenvolvimento de novos recobrimentos e filmes finos, proteção contra corrosão, impressão molecular e adsorção, biomateriais, antimicrobianos e liberação controlada de fármacos, catálise, geração de energia, materiais luminescentes, entre outros.

A impressão molecular consiste em fazer um molde de um determinado composto na rede de sílica usando o processo sol-gel. Devido a sua flexibilidade é possível gerar matrizes com alta especificidade. Fan e colaboradores desenvolveram uma matriz híbrida com a impressão do íons Pb(II) como mostra a Figura 2.3. Além do íon, a seletividade do material foi melhorada pela funcionalização com base de Schiff. Com essa técnica de acoplamento utilizando o método sol-gel, foi possível aumentar a seletividade de 3 a 5 vezes sob condições de adsorção competitiva se comparado a materiais sem impressão [19]. Um outro tipo de aplicação da impressão molecular foi estudada por Li e colaboradores. Eles utilizaram uma sílica híbrida para criar um material com impressão molecular para o ácido salicílico usado em cosméticos. Dessa forma, foi possível obter um sistema compatível com o meio de aplicação aquoso para liberação controlada da droga em aplicações tópicas[20].



**Figura 2.3:** Preparação do adsorvente híbrido com impressão de Pb(II) [19].

A utilização do processo sol-gel para o desenvolvimento de biomateriais também vem crescendo muito devido às suas condições brandas. Novas modificações nos processos vem gerando rotas compatíveis com sistemas biológicos. Wang e colaboradores, por exemplo, conseguiram desenvolver uma rota para encapsulamento da enzima papaína baseada na utilização de TEOS modificado com glicol e goma guar. Sua imobilização resultou em maior estabilidade térmica, de armazenamento e reusabilidade, além de atividade enzimática mais pronunciada [21]. Outra aplicação interessante mostra a formação de *scaffold* desenvolvido por Perumal e colaboradores [22]. Eles utilizaram microesferas de sílica dentro de uma estrutura de colágeno para liberação de uma droga antimicrobiana (mupirocina), resultando num biocompósito sinérgico para tratamento de feridas. Como pode-se perceber, as aplicações nesse campo são muitas e amplas e uma área de grande potencial é o desenvolvimento de biosensores. Alguns exemplos para o desenvolvimento desses dispositivos incluem encapsulamento de microalgas[23], DNAs com estrutura de comutação tipo *on/off* [24] e proteínas como citocromo-c [25]. Para este último, foi mostrado que o processo de transferência de elétrons direta entre proteína e matriz somente ocorre para sílicas híbridas contendo o grupamento metil (Figura 2.4).



**Figura 2.4:** Representação esquemática do biosensor de citocromo-c e a transferência direta de elétrons que ocorre apenas na sílica funcionalizada com o grupo metil [25].

O volume de trabalhos publicados na área de recobrimentos utilizando o método sol-gel mostra que essa também é uma aplicação de destaque desse processo. Pode-se encontrar recobrimentos para melhorar resistência à abrasão[26], propriedades

antireflexivas com baixo índice de refração [27], proteção contra corrosão [28, 29], entre outros. Existem ainda outros tipos de aplicações interessantes como a dopagem de matrizes de sílica com elementos com propriedades de luminescência com elementos da família das terras raras. Gao e colaboradores sintetizaram nanotubos [30], enquanto o grupo de Lin [31] preparou *nanorods* de sílica dopados com  $\text{Eu}^{3+}$ . Esses materiais são de grande interesse atualmente pela aplicação na área médica (diagnósticos e tratamentos), biosensores e dispositivos eletrônicos. Ainda, é reportado que a dopagem em xerogéis de sílica forma materiais que mantêm a transferência de energia entre elementos como o Gd e Eu, possibilitando seu uso na fabricação de lâmpadas especiais que convertem radiação ultravioleta em luz visível [32].

Por fim, o processo sol-gel também encontra-se nas áreas de pesquisa visando os “processos verdes”, auxiliando na criação de materiais especiais para geração e armazenamento de energia de forma sustentável. Membreno e colaboradores apresentam uma recente revisão do progresso dessa área [33]. Eles ainda destacam que esses avanços são possíveis devido principalmente a grande flexibilidade método sol-gel que permite a criação de características especificamente moldadas a cada aplicação.

Como mostrado por essa literatura recente, muitos são os campos de interesse no estudo e utilização de sílica e materiais híbridos utilizando o processo sol-gel. Uma infinidade de diferentes materiais pode ser criado e adaptado. Devido justamente a essa característica, escolheu-se esse método para investigar e ajustar a atividade de quatro diferentes aplicações, utilizando diferentes rotas de síntese com os mesmos precursores. São elas: sensores colorimétricos para gás amônia (ou pH); materiais com propriedades antimicrobianas; catalisadores para polimerização de etileno; e filmes finos para interfaces biológicas, nesse caso aplicados na regeneração seletiva de neurônios. Uma revisão mais específica da literatura para sensores, antimicrobianos, catalisadores e filmes finos é encontrada a seguir.

#### **2.4.1. SENSORES**

Sensores químicos são dispositivos compostos de um elemento receptor e um transdutor capaz de traduzir o sinal gerado por uma reação química em uma informação mensurável/detectável [34]. Esses dispositivos, quando preparados pelo método sol-gel, baseiam-se geralmente no encapsulamento de um elemento receptor na matriz sílica que

é capaz de mudar de cor em contato com o analito. Quando se prepara um novo material para utilização como sensor, um fator-chave é a resistência à lixiviação. Principalmente em casos de monitoramento contínuo, é preciso um ajuste fino do material para evitar esse tipo de problema. Um protocolo padrão é bastante difícil de ser criado em se tratando de um processo tão flexível e sensível às condições de síntese como o sol-gel. Entretanto, deve sempre se manter um compromisso entre a baixa lixiviação e a manutenção da atividade da molécula encapsulada [35].

Os estudos recentes mostram uma série de matrizes de sílica híbridas ou não sendo utilizadas para esse fim. A Tabela 2.1, a seguir, mostra um resumo de alguns sensores desenvolvidos recentemente.

**Tabela 2.1:** Exemplo de sensores preparados pela imobilização ou encapsulamento de elementos receptores em matrizes de sílica obtida pelo método sol-gel.

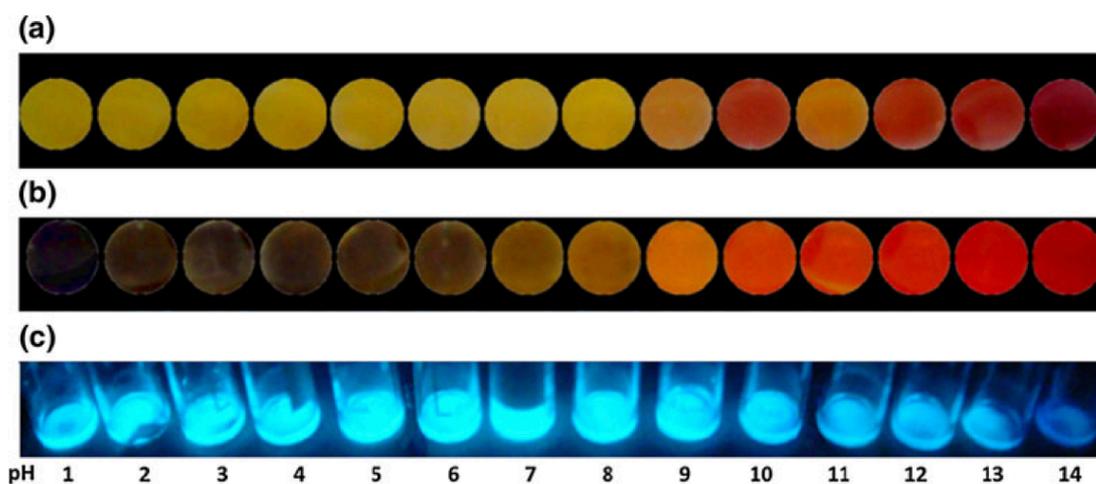
<b>Matriz</b>	<b>Elemento receptor</b>	<b>Analito</b>	<b>Referência</b>
Nanopartículas de sílica e aminopropil e urease	Corante ETH 5294	Uréia	[36]
Sílica mesoporosa obtida com o surfactante Gemini 2-12-2	Azul de bromotimol	H <sup>+</sup>	[37]
Sílica híbrida com grupos metil, fenil e octil	36 diferentes indicadores	NH <sub>3</sub> e SO <sub>2</sub>	[38]
Sílica obtida via rota ácida e básica	1,5-difenilcarbazona	Traços de zinco	[39]
Sílica core/shell obtida por método Stöber	Texas red e fluoresceína isocianato	H <sup>+</sup> intracelular	[40]
Sílica em eletrodo de pasta de carbono	Peroxidase de raiz forte	2-aminofenol	[41]
Sílica contendo grupo orgânico funcionalizado com Ru <sup>2+</sup>	Ru <sup>2+</sup>	Oxigênio	[42]
Sílica sol-gel e hidrogel de álcool polivinílico	Azul da prússia	Glucose	[43]
Sílica modificada com líquidos iônicos	Líquido iônico 1-propil-3-metilimidazol	NADH, Dopamina e ácido úrico	[44]
Híbrido sílica e polieletrólito com Eu <sup>3+</sup>	Eu <sup>3+</sup>	Tetraciclina	[45]

Observando a Tabela 2.1, pode-se notar a variedade de sensores e diferentes analitos que podem ser detectados. Há aplicações em pH, gases, análise de traços de metais e também em fluídos corporais ou até mesmo intracelulares. Já as matrizes variam desde o uso de sílica simples a híbridos contendo grupamentos orgânico ou mesmo polímeros reticulados. Os elementos receptores utilizados também variam bastante, mas é notável a grande importância do uso de indicadores como os de pH para esse fim. Essa tendência é destacada pelo aparecimento desses compostos em quatro dos trabalhos citados na Tabela 2.1. O conceito a ser explorado para os indicadores é também a incorporação à matriz de uma molécula capaz de alterar sua coloração em função do pH. O sucesso dessa estratégia baseia-se em duas propriedades dos materiais sol-gel: a transparência óptica e permeabilidade a íons e gases. O item-chave aqui é o preparo de um material que possibilite a entrada do analito sem permitir a saída (ou lixiviação) do indicador de pH encapsulado [35].

Durante o processo de otimização desse tipo de material, deve-se levar em conta sua performance em termos de tempo de resposta e sensibilidade, estabilidade e durabilidade, além da escolha de uma faixa de detecção adequada. Com isso, pode-se planejar um sensor realmente adequado para a aplicação desejada. Para tal otimização, pode-se lançar mão de diferentes estratégias como: rotas de síntese, alteração de pH, uso de diferentes precursores, temperatura, quantidade de solvente, tempo de envelhecimento, entre inúmeras outras.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa [46, 47], observou-se o efeito da rota de síntese sobre o desempenho de sensores preparados utilizando diferentes indicadores de pH encapsulados em sílica. Foram avaliados indicadores com diferentes faixas de viragem e também um fluorescente, além de diferentes rotas: uma rota hidrolítica ácida, uma rota hidrolítica básica e uma rota não hidrolítica. A utilização de diferentes técnicas de caracterização e de avaliação de performance como tempo de resposta e colorimetria, foi possível identificar um melhor desempenho para a rota ácida. Com a análise detalhada dos dados coletados da observação de mudança de coloração por 50 pessoas, foi possível identificar menores tempos de resposta para tal material. Também foi possível observar que, quanto maior a mudança de cor do material de uma condição para outra, mais rápida a mudança também é detectada. Além disso, menores tempos de resposta puderam ser associados a maiores quantidades de indicador encapsulado e também a maiores valores de área

específica. A Figura 2.5 mostra o comportamento dos sensores preparados por rota ácida no estudo anterior, em soluções aquosas com pH variando de 1 a 14.



**Figura 2.5:** Resposta dos sensores preparados pelo encapsulamento de (a) vermelho de alizarina, (b) amarelo brilhante e (c) acridina a soluções aquosas com pH variando de 1 a 14 [46].

Esse conhecimento prévio nos mostrou que é possível ajustar a rota para obtenção de um material de melhor performance. Com essa investigação concluída e conhecimento de melhor rota a ser empregada e da influência de algumas das principais características do material, é possível dar um passo a frente para obtenção de um sistema ainda melhor. A literatura mostra que a utilização de grupos orgânicos ligados à rede pode melhorar a compatibilização de moléculas orgânicas encapsuladas. Kowada e colaboradores mostraram a diminuição do problema de lixiviação de indicadores de pH pela adição de grupos metil na rede de sílica [48].

#### 2.4.2. ANTIMICROBIANOS

A liberação controlada de fármacos é atualmente uma das aplicações mais promissoras da ciência de materiais para biomedicina em termos de cuidados de saúde. Assim sendo, uma série de diferentes materiais com propriedades antimicrobianas tem sido criados com auxílio do processo sol-gel. Isso decorre da possibilidade da retenção de compostos na matriz durante a síntese e que podem ser liberados posteriormente de

forma controlada em alvos específicos [49]. É descrito na literatura que um material com bom potencial para carreamento de fármacos deve:

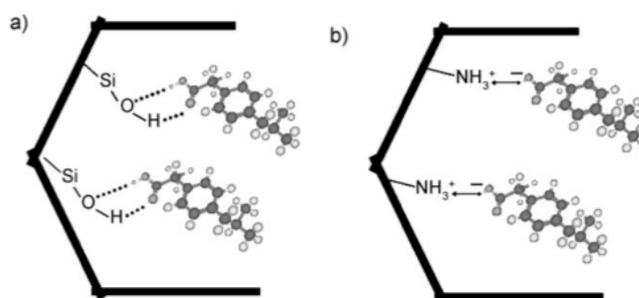
- Possuir uma rede de poros organizada com tamanhos homogêneos a fim de possibilitar um controle fino da cinética de carga e liberação do fármaco;
- Grande volume de poros para armazenar a quantidade necessária da droga;
- Alta área específica que implica em alto potencial para adsorção da droga;
- Presença de grupos silanol na superfície que podem ser funcionalizados para permitir melhor controle sobre a liberação do fármaco.

Tendo isso em vista, a literatura também mostra diferentes tipos de materiais sendo utilizados para fins antimicrobianos. Bhattacharrya e colaboradores relatam a utilização de filmes de sílica para liberação controlada de vancomicina. Nesse filme ainda foi adicionado o farnesol, que é insolúvel em água e, portanto, de difícil administração. Com a combinação otimizada desses dois componentes num filme os autores relatam eficiência contra bactérias resistentes a antibióticos [50]. Correa e colaboradores relatam o uso do antibiótico gentamicina encapsulado em sílica obtida por diferentes rotas sintéticas que foram testadas contra bactérias gram positivas e gram negativas. Esse estudo demonstrou um maior desempenho para os materiais preparados por rota básica, no qual são precipitadas partículas com domínios aproximadamente esféricos. A concentração de gentamicina elevada na superfície do material e também o alto potencial zeta positivo pareceram exercer papel importante em se tratando da alta eficácia como antimicrobiano [51].

Entretanto, a maior parte dos trabalhos relatando materiais antimicrobianos e sílica, trata de partículas esféricas e de tamanho e porosidade controlados. O sucesso desses materiais vem justamente não só do controle sob o material formado, como também da liberação do fármaco encapsulado. Materiais bastante sofisticados têm sido relatados em uma série de revisões disponíveis na literatura, com possibilidade inclusive de ação do material apenas num determinado alvo específico [3, 49, 52, 53].

Como citado anteriormente, a liberação do fármaco pode ser controlada de diversas formas, mas uma das mais eficientes é pelo aumento da interação da droga com a superfície da partícula carreadora. Uma das estratégias bastante utilizadas e estudadas

para o fármaco ibuprofeno é a funcionalização da superfície com grupos amino. Esses grupos formarão uma ligação iônica com os grupos ácido carboxílico do ibuprofeno que permite sua liberação de forma controlada [54]. Uma representação esquemática desse processo é mostrado na Figura 2.6.



**Figura 2.6:** Representação esquemática da interação do fármaco ibuprofeno com a rede de sílica. (a) interações fracas pelas pontes de hidrogênio com os grupos silanol da sílica não funcionalizada. (b) ligação iônica forte do fármaco com os grupos amino da sílica funcionalizada. Adaptado da referência [49].

Outra estratégia que tem sido utilizada para o controle é a funcionalização da superfície com grupos hidrofóbicos. Nesse caso, a interação com o fármaco pode não ser aumentada, mas o transporte do fármaco para fora da matriz é dificultado uma vez que o meio aquoso não consegue penetrar facilmente seus poros [55]. Além disso, existem trabalhos mostrando o uso de matrizes modificadas com ácidos carboxílicos para controlar a liberação de medicamentos. Com tal estratégia, os autores relatam um fino controle do processo de liberação que é ativado com o pH do meio [56]. Mais recentemente, são reportadas as modificação da superfície utilizando enxerto de dendrímeros, fragmentos de DNA que funcionam como portões para liberação da droga e ainda o uso de anticorpos [53].

### 2.4.3. CATALISADORES

Catalisadores do tipo metalocênico estão entre os mais estudados no processo de polimerização de etileno atualmente. Esse é um catalisador de alta atividade, sítio ativo único e portanto, produtor de polímeros de estreita distribuição de massas molares e pode ser ativado pelo uso do cocatalisador metilaluminoxano (MAO) [57]. A

heterogeneização desses compostos é bastante interessante do ponto de vista industrial, visando sua adequação a processos e plantas de fabricação de polímeros já existentes. Uma das maneiras clássicas de heterogeneização de catalisadores é a imobilização desses compostos em matrizes como a sílica.

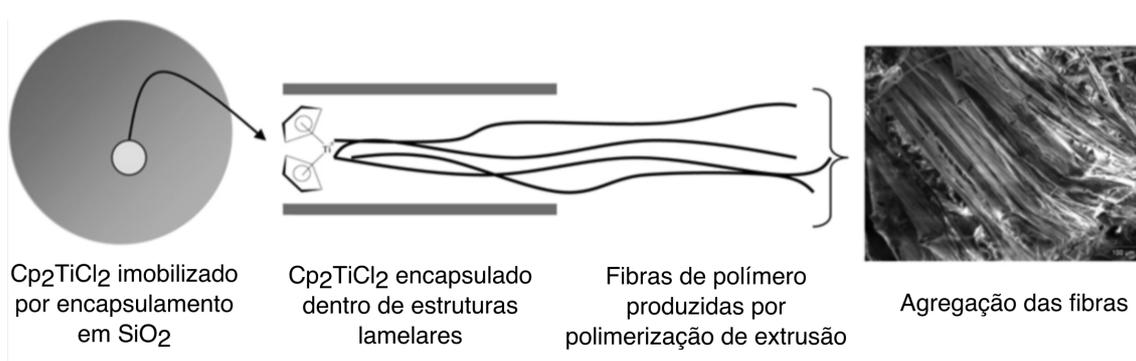
A utilização de sílicas obtidas por processo sol-gel na área de catálise para polimerização de etileno restringia-se apenas à imobilização de catalisador por *grafting* em sílicas previamente obtidas e tratadas. Isso decorre da sensibilidade à umidade e ao ar dos catalisadores empregados para esse fim. Entretanto, com a expansão do uso de rotas não hidrolíticas, passíveis de condução sob atmosfera inerte livre de oxigênio, esse quadro vem sendo alterado. Utilizando esse tipo de estratégia, é possível realmente ter a molécula de catalisador encapsulada, uma vez que ela está presente desde o começo da formação da rede de sílica.

Nosso grupo de pesquisa tem relatado, desde então, o encapsulamento e desempenho de diferentes catalisadores do tipo metalocênico encapsulados em sílicas. Estudos iniciais avaliaram o composto metalocênico mais estudado, o cloreto de bis(ciclopentadienil) zircônio(IV) ( $Cp_2ZrCl_2$ ) sendo encapsulados em sílica obtidas por processo não hidrolíticos variando as proporções dos precursores tetraetoxisilano (TEOS) e  $SiCl_4$ . Essa investigação mostrou a manutenção da atividade dos catalisadores durante o processo de síntese atingindo quantidades de polímero intermediárias entre o catalisador na forma homogênea e imobilizado por *grafting*. Além disso, foram observados pesos moleculares mais elevados quando comparados ao catalisador em sua forma homogênea [58]. Estudos subsequentes mostraram a eficácia do método também para uma série de outros diferentes catalisadores metalocênicos. A microestrutura desses materiais também foi investigada sugerindo dependência da produtividade de polímero com o processo de fragmentação dos grãos de sílica durante o crescimento das cadeias [59].

Com o sucesso da rota não hidrolítica, a investigação de outros aspectos e adição de outros tipos de óxidos a rede foi estudada. Uma mistura de sílica e titânia foi utilizada tendo como resultado materiais que podem produzir polímeros de alto peso molecular e também serem ativados com menores teores de cocatalisador [9]. Esse último efeito também foi pronunciado para o uso de óxido de tungstênio. Nesse caso observou-se uma alteração na densidade eletrônica do átomo de Zr, mostrando que possivelmente o catalisador foi parcialmente ativado pelo suporte [60]. A busca pelo uso de menores quantidades de cocatalisador ocorre devido ao elevado custo

especificamente do MAO e também dos resíduos de alumínio que afetam as propriedades dos polímeros formados. Novas investigações vem sendo realizadas na adição de outros óxidos à sílica como os de cromo e molibdênio [61].

Por fim, estudos mostraram que é possível a obtenção de polímeros de ultra alto peso molecular com estrutura cristalina orientada pelo encapsulamento de catalisadores metalocênicos à base de titânio. Os resultados mostram polímeros de microestrutura fibrosa sendo obtidos diretamente do processo de polimerização, como mostra a Figura 2.7. Esse fenômeno parece ser oriundo da organização da sílica empregada como matriz para o catalisador. Uma série de placas empilhadas foram observadas, e essas podem estar facilitando esse processo. A microestrutura fibrosa dos polímeros obtidos pode melhorar propriedades mecânicas do material se comparado àquele de morfologia regular.



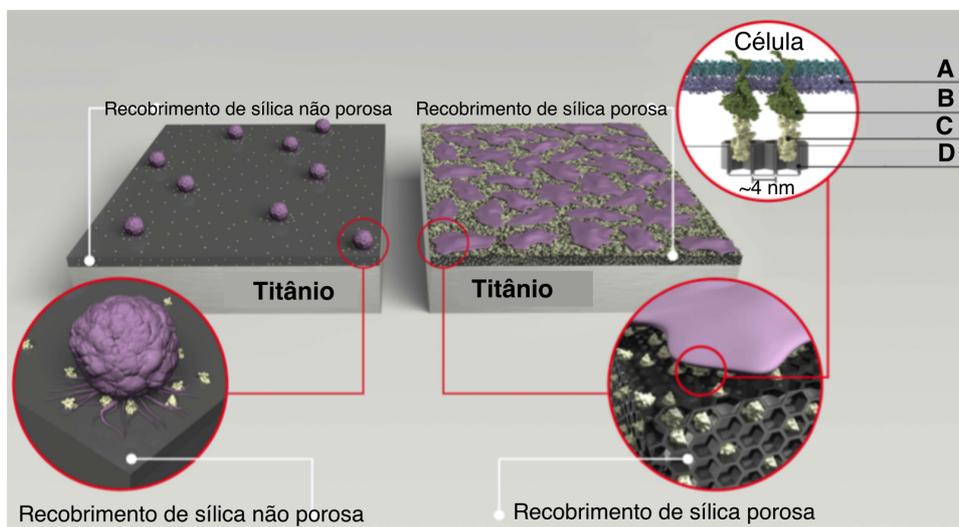
**Figura 2.7:** Representação esquemática do processo de extrusão durante a própria reação de polimerização adaptado da referência [62].

O grande sucesso da rota não hidrolítica para o encapsulamento de catalisadores de polimerização deixa também o questionamento sobre outros aspectos interessantes em termos de aplicação industrial. Nos dias atuais, ainda é buscada a obtenção de polímeros produzidos por catalisadores metalocênicos com distribuição de peso molecular mais alargada, por exemplo. Além disso, um sistema que possa ser adaptado para gerar características específicas em função da aplicação desejada também é de grande interesse.

#### 2.4.4. RECOBRIMENTOS

Filmes de sílica podem ser empregados numa série de diferentes aplicações, conforme citado anteriormente. Melhora da resistência à abrasão, ajuste de propriedades reflexivas, proteção contra corrosão e sensores figuram entre as aplicações mais estudadas. Neste trabalho, especificamente, a utilização dos filmes de sílica será revisada do ponto de vista da utilização para compatibilização de materiais com interfaces biológicas. A maior parte dos trabalhos reportados na literatura mostram sua utilização para integração de implantes ósseos.

Inzunza e colaboradores utilizaram filmes finos de sílica para compatibilização de implantes dentários de titânio [63]. Em função da organização nanoporosa do filme, a adsorção de proteínas foi favorecida auxiliando na adesão de osteoblastos<sup>2</sup> como mostra a Figura 2.8. Quando dopada com cálcio e fosfato, essa superfície ainda induziu a diferenciação de células tronco de medula óssea humana. Estudo similar foi realizado por Laranjeira e colaboradores. Nesse estudo, a impressão litográfica de padrões de sílica mostrou auxiliar no crescimento guiado de células presentes na gengiva e também aumentou a resistência contra adesão de bactérias ao implante [64].



**Figura 2.8:** Representação esquemática do efeito da estrutura nanoporosa de sílica na adsorção de proteínas e comportamento de adesão celular adaptado da referência [64]. (A) Membrana de plasma, (B) integrinas, (C) proteínas ECM e (D) canais nanoporosos.

<sup>2</sup> Osteoblastos são células do tecido conjuntivo ósseo que são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea.

Donesz-Sikorska estudou o uso de recobrimentos de sílica contendo grupos aminopropil para auxiliar na imobilização de um fármaco que é liberado diretamente no local do implante. O recobrimento mostrou melhora das características de hidrofiliabilidade da superfície do implante e a presença da droga também auxiliou na proliferação e ativação das células [65]. A imobilização de compostos para liberação controlada diretamente no local do implante é um dos grandes diferenciais dos recobrimentos obtidos por sol-gel. Essa possibilidade também foi explorada por Marycz e colaboradores em substratos de aço austenítico e titânio. Eles utilizaram um recobrimento dopado com ácido ascórbico e obtiveram resultados positivos nas taxa de proliferação padrão de crescimento das culturas.

Devido ao grande potencial demonstrado pelos recobrimentos de sílica na biocompatibilização de implantes, questionou-se sobre a possibilidade de seu uso na regeneração e crescimento de células neuronais. Sensores neurais implantáveis são dispositivos muito promissores que podem auxiliar no entendimento do sistema nervoso e também melhorar a qualidade de vida de pacientes com problemas sensoriais e motores [66]. Por exemplo, as terapias de estímulo cerebral profundo têm se mostrado como uma alternativa para distúrbios neurológicos e psiquiátricos como mal de Parkinson e depressão profunda [67-69]. Já próteses neuromotoras têm sido utilizadas para restabelecer a perda de funções motoras via interfaces máquina-cérebro [70, 71]. Esses dispositivos necessitam apresentar características singulares na interface com os sistemas nervoso central e periférico a um nível celular, devido à necessidade transdução de sinais iônico-biológicos para sinais eletrônicos [66]. Entretanto, a produção de interfaces de longa duração no cérebro dos pacientes permanece um desafio, em termos de sobrevivência das células aderidas e manutenção do sinal do eletrodo com confiabilidade [72, 73]. Microeletrodos neurais costumam perder performance com o tempo e podem inclusive se tornar inaptos a gravar sinais enviados pelos neurônios devido a impedância criada por tecidos cerebrais ao redor do eletrodo.

Embora a biocompatibilidade e a reação dos tecidos continuem um desafio, muitas estratégias podem surgir para superar o problema de confiabilidade a longo prazo [74, 75]. Uma das estratégias bastante importantes é a aplicação de recobrimentos biocompatíveis sobre os eletrodos. Nesse ponto, pode-se pensar na utilização de filmes de sílica obtido por sol-gel, os quais podem ser adaptados para melhorar a resposta na biointerface. Materiais à base de sílica têm sido empregados com sucesso como

substratos para cultura celular e recobrimentos de microeletrodos neurais [76, 77]. Foi mostrado que recobrimentos com espessura de 100 nm foram aderidos com sucesso a eletrodos neurais sem efeitos adversos nas propriedades elétricas em condições da frequência neurológica (1 kHz) [77]. Entretanto, materiais até então estudados basearam-se no recobrimento das sílicas com polímeros comumente utilizados para cultura celular como a poli-L-lisina [78].

A abordagem sol-gel pode ser bastante interessante como substrato celular uma vez que possui muitas vantagens e características importantes como: condições brandas de reação [16], possibilidade de ajuste de grupos funcionais [79], molhabilidade [80, 81], topografia [82] e porosidade [83]. Isso pode ser atingido pela simples mudança de parâmetros da reação e os materiais obtidos costumam ser mecânica e termicamente estáveis [84]. Além disso, a flexibilidade do processo e fácil aplicação do recobrimento evitam os complexos processos de microfabricação para esses dispositivos.

Considerando a aplicação de sensores implantáveis ou microeletrodos neurais, não somente a biocompatibilidade se torna importante, mas também a reação inflamatória do tecido e a resposta das células gliais<sup>3</sup> devem ser consideradas [85, 86]. É sugerido que as células gliais (microglia e astrócitos) são recrutados e ativados durante o processo de lesão do cérebro. Eletrodos podem ser até mesmo isolados elétrica- e mecanicamente do sistema nervoso se uma resposta exagerada ocorre [87, 88]. A resposta muito acentuada dessas células podem levar à perda de sinal do eletrodo devido à formação de um tecido cerebral ao seu redor conhecido como gliose [85]. Essa gliose nada mais é do que uma cicatriz formada ao redor do eletrodo encapsulando-o com o intuito de isolar um corpo estranho presente naquele tecido.

Dessa forma, uma abordagem mais eficiente deve considerar tanto as características de biocompatibilidade, quanto de mínima reação dos tecidos. Ambos devem ser combinados para alcançar uma boa qualidade de transdução e confiabilidade para sistemas neurais implantados. Uma estratégia para evitar a formação de gliose é o uso de materiais não adesivos em termos de células para recobrimento dos eletrodos. Por exemplo, o ácido conjugado pirrol-hialurônico, que é biocompatível, foi utilizado como recobrimento sem alterar características de impedância, porém diminuindo a

---

<sup>3</sup> As chamadas células gliais são oligodendrócitos, astrócitos e as microglias que compõem a maior parte das células que formam o cérebro. Os astrócitos chegam a compor de 30 a 65% da massa e possuem uma série de funções como suporte mecânico, direcionamento do crescimento de neurônios, controle do ambiente químico e aporte de nutrientes e até mesmo modular atividade neuronal [85].

adesão das células e potencial resposta inflamatória dos tecidos [89]. Uma outra abordagem mostra o uso de superfícies com padrões impressos pela técnica de litografia para depositar hidrogéis de polietilenoglicol em uma superfície recoberta com laminina. Com esse método foi possível obter adesão específica usando padrões de restrição de tamanho criado por regiões aderentes/não aderentes [90].

*Refletindo-se sobre a literatura atual sobre essas diferentes aplicações é possível notar algumas estratégias como: (i) modificação da rede de sílica com grupos metil para sanar o problema de lixiviação em sensores colorimétricos; (ii) modificação superfície para regular lixiviação de fármacos; (iii) uso de metodologia flexível para fabricação de óxidos mistos sob atmosfera inerte para ajuste de atividade e propriedade de polímeros; e (iv) biocompatibilidade da sílica e uso de diferentes grupos químicos para estimular adesão e desenvolvimento de células.*

*Com todas essas estratégias em mente, surge o questionamento sobre a utilização de sílicas híbridas, preparadas por um método simples usando co-hidrólise de organosilanos. Ao nosso conhecimento, não são encontrados estudos na literatura que analisem esses diferentes tipos de aplicações do ponto de vista da natureza do organosilano. Dessa forma, a hipótese da presente tese é que é possível ajustar a atividade de um determinado componente encapsulado/imobilizado modificando a rede de sílica com diferentes organosilanos dotados de diferentes efeitos estéricos, indutivos e diferentes grupos funcionais. utilizou-se a modificação da rede de sílica com diferentes organosilanos.*

*Para os sensores colorimétricos, utilizou-se o conhecimento adquirido previamente para seleção da rota ácida hidrolítica no seu preparo. Os antimicrobianos foram obtidos por rota básica, conhecida pela precipitação de partículas, utilizando modificação da rede na sua formação ao invés de apenas na superfície. Nos catalisadores empregou-se o uso de grupos orgânicos ao invés de diferentes óxidos e o método não hidrolítico para preservar a integridade do composto encapsulado. Por fim, no caso dos filmes para crescimento celular não foi utilizado um composto encapsulado em si, e sim a adesão celular foi avaliada em função dos diferentes grupos orgânicos.*

### **3. OBJETIVOS E METAS**

### **3. OBJETIVOS E METAS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar a potencialidade de ajuste da atividade de moléculas encapsuladas em sílicas híbridas sintetizadas pelo processo sol-gel por meio da natureza diferenciada de organosilano co-hidrolisado.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar a rota adequada no método sol-gel (via catálise ácida, básica ou via processo não hidrolítico) dependendo do tipo/fim de molécula encapsulada.
- Correlacionar as condições de síntese sol-gel com as propriedades texturais dos xerogeis resultantes.
- Correlacionar a natureza do organosilano com a atividade da molécula encapsulada, segundo cada caso.

#### **3.3 METAS ESPECÍFICAS**

- Delinear um catalisador metalocênico suportado ativo para polimerização de olefinas capaz de controlar seletivamente a polidispersão dos polímeros resultantes;
- Delinear um sensor óptico de pH robusto e sensível para determinação em gases;
- Delinear materiais antimicrobianos efetivos contra bactérias gram positivas e gram negativas;
- Delinear filmes finos de sílica híbrida para compatibilização de matérias em interfaces biológicas.

## **4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. MATERIAIS UTILIZADOS

A Tabela 4.1 descreve os materiais utilizados para confecção dos sensores, antimicrobianos, catalisadores e filmes. Todos os materiais descritos foram utilizados conforme recebidos, salvo algumas exceções descritas.

**Tabela 4.1:** Reagentes utilizados no preparo dos materiais.

Reagente	Fornecedor
Etanol, HPLC	Merck
Etanol, P.A.	Synth
Tolueno <sup>1</sup> , 98,5%	Nuclear
Ácido Clorídrico, 38%	Nuclear
Ácido Nítrico, 65%	Synth
Cloreto de Bis(ciclopentadienil) Zircônio IV, Cp <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Cloreto de Férrico anidro, FeCl <sub>3</sub> 98%	Neon
Hidróxido de Amônio, NH <sub>4</sub> OH 29%	Nuclear
Tetraciclina, 98%	Sigma Aldrich
Vermelho de Alizarina, 97%	Sigma Aldrich
Tetracloroeto de sílcio, SiCl <sub>4</sub> 99%	Sigma Aldrich
Tetraetoxissilano, Si(OEt) <sub>4</sub> 98%	Merck
Metiltriethoxissilano, 99%	Sigma Aldrich
Octiltriethoxissilano, 90%	Dow Corning
Octadeciltrimetoxissilano, 90%	Sigma Aldrich
Viniltrimetoxissilano, 90%	Dow Corning
Feniltrimetoxissilano, 90%	Dow Corning
Aminopropiltriethoxissilano, 98%	Sigma Aldrich
Mercaptopropiltrimetoxissilano, 95%	Sigma Aldrich
Isocianatopropiltriethoxissilano, 95%	Sigma Aldrich
Cloropropiltrimetoxissilano, 99%	Wacker Silicones
Iodopropiltrimetoxissilano, 95%	Sigma Aldrich
Glicidoxipropiltrimetoxissilano, 98%	Sigma Aldrich
Argônio, N50 ultra-puro 99,99%	White Martins
Nitrogênio, N50 ultra-puro 99,99%	White Martins

<sup>1</sup> Purificado por refluxo na presença de sódio metálico e benzofenona.

## 4.2. ESCOLHA DOS DIFERENTES SILANOS

Foram utilizados neste estudo, 11 diferentes silanos funcionalizados. Para fins de comparação, sínteses utilizando apenas tetraetoxisilano ( $C_0$ ), ou seja em ausência de algum organosilano, foram também realizadas. O grupo de silanos funcionalizados foi escolhido em função de suas diferentes características como: diferentes volumes, tamanho da cadeia de carbonos, presença de diferentes grupos funcionais e hidrofobicidade/hidrofilicidade podendo hipoteticamente influenciar o acesso, a polaridade e a conformação da molécula encapsulada. São eles:  $C_1$  (metiltrietoxisilano),  $C_8$  (octiltrietoxisilano),  $C_{18}$  (octadeciltrimetoxisilano), Vy (viniltrietoxisilano), Ph (feniltrietoxisilano),  $NH_2p$  (aminopropiltrietoxisilano), SHp (mercaptopropiltrietoxisilano), NCOp (isocianatopropiltrietoxisilano), Clp (cloropropiltrietoxisilano), Ip (iodopropiltrietoxisilano) e Gp (glicidoxipropiltrietoxisilano).

## 4.3. ESCOLHA DA ROTA

As diferentes rotas sol-gel foram escolhidas em função da aplicação almejada para o material. Todas empregaram a mesma razão molar organosilano:TEOS que foi de 1:5. Para o caso de sensores colorimétricos, um estudo prévio [47] indicou a rota hidrolítica ácida como rota ideal para sua confecção. Essa rota levou a maiores teores de encapsulamento e menores tempos de resposta frente ao gás amônia. Para os materiais antimicrobianos, foi escolhida uma rota hidrolítica básica, devido à possibilidade da formação de nanopartículas esféricas de sílica. Essas nanopartículas podem ser controladas em função da quantidade de catalisador e em geral são mais efetivas na ação antimicrobiana do que partículas disformes e de tamanho maiores e não controlados. Já para os catalisadores, foi escolhida a rota não hidrolítica em função do preparo em atmosfera inerte e na ausência de água a fim de não desativar o catalisador encapsulado. Finalmente, para os filmes utilizados em crescimento celular, a rota escolhida foi também a hidrolítica ácida, a qual forma um gel homogêneo passivo de deposição numa superfície formando um filme contínuo por evaporação solvente.

#### 4.4. NOMENCLATURA

Os materiais serão nomeados por uma sigla com iniciais correspondente à sua aplicação e posterior indicação do organosilano utilizado na síntese. Assim, os sensores serão nomeados inicialmente por SC, os antimicrobianos por AM, os catalisadores de polimerização por CP e os filmes como FC. Os organosilanos serão nomeados por: C<sub>0</sub> quando se trata da sílica não híbrida, C<sub>1</sub> para o caso do material contendo metil como parte orgânica, C<sub>8</sub> para o caso do octil, C<sub>18</sub> para octadecil, Vy para vinil, Ph para fenil, NH<sub>2p</sub> para aminopropil, SHp para mercaptopropil, NCOp para isocianatopropil, Clp para cloropropil, Ip para iodopropil e Gp para glicidoxipropil. Assim, um sensor que possui mercaptopropil como parte orgânica será chamado de SC-SHp, um antimicrobiano com grupo octadecil será AM-C<sub>18</sub>, um catalisador com o grupo glicidoxipropil será CP-Gp e um filmes com o grupo aminopropil será FC-NH<sub>2p</sub>.

#### 4.5. SÍNTESE DOS MATERIAIS PELO PROCESSO SOL-GEL

Todos os materiais foram preparados utilizando o processo sol-gel, a partir de TEOS e dos mesmos organosilanos na mesma proporção molar. Brancos foram sintetizados para todas as amostras utilizando exatamente o mesmo procedimento descrito a seguir, porém sem a adição do composto a ser encapsulado. Todos os materiais foram sintetizados no Instituto de Química da UFRGS (Porto Alegre, Brasil), com exceção dos filmes que foram sintetizados no Laboratório de Síntese Química do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e depositados por *spin coating* no Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia, ambos parte do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas, Brasil.

##### 4.5.1. SENSORES COLORIMÉTRICOS (SG)

Os sensores foram sintetizados utilizando rota hidrolítica ácida, catalisada por ácido clorídrico, em um processo adaptado da referência [47]. Numa preparação típica,  $9 \times 10^{-3}$  mol do organosilano e  $4,5 \times 10^{-2}$  mol de TEOS (1:5) foram adicionados a 6 mL de

uma solução aquosa do indicador vermelho de alizarina de concentração correspondente a 0,1 mol% do total de alcóxido utilizado. Após 5 min de hidrólise mediante agitação magnética, o catalisador HCl foi adicionado na proporção 0,2 M. A agitação magnética foi mantida, à temperatura ambiente, até gelificação do material, a qual variou de 24 a 168 horas dependendo do organosilano empregado. Após 24 h de envelhecimento, as amostras foram moídas manualmente e lavadas com uma mistura 1:1 de água/etanol (15 alíquotas de 2 mL) a fim de remover o excesso de indicador não encapsulado. O material foi então secado em estufa por 24 h a 110 °C e moído novamente, resultando em um sensor na forma de pó.

#### **4.5.2. ANTIMICROBIANOS (AM)**

Os antimicrobianos foram sintetizados pela rota hidrolítica básica baseado na referência [91], utilizando hidróxido de amônio como catalisador. Para tal, 0,380 mL de TEOS e 0,200 mL de organosilano e 0,460 mL de uma solução alcóolica 5 mg.mL<sup>-1</sup> de tetraciclina foram adicionados a 11 mL de etanol sob agitação magnética. Após 30 min de hidrólise, 0,74 mL do catalisador NH<sub>4</sub>OH foi adicionado. O frasco de reação foi então selado para manter a concentração do catalisador e mantido sob agitação constante por 24 h a temperatura ambiente. O material resultante foi precipitado por centrifugação e lavado duas vezes por ressuspensão em etanol.

#### **4.5.3. CATALISADORES DE POLIMERIZAÇÃO (CP)**

Diferentemente das demais, na rota não hidrolítica todos os procedimentos são realizados sob atmosfera inerte, utilizando a técnica de Schlenck. Neste caso, a síntese foi adaptada da referência [92]. Para a síntese, foram primeiramente pesados o catalisador Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> (75 mg) e o catalisador da reação sol-gel FeCl<sub>3</sub> (10 mg), aos quais foi adicionado um volume de 1 mL de tolueno a fim de solubilizar o Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>. A esta mistura foi então adicionado SiCl<sub>4</sub>, TEOS e o organosilano na razão 3,3:1,7:1. A reação prosseguiu então a 70 °C até gelificação completa. Após gelificação, o sólido foi seco a vácuo por 2 h, sendo que a etapa de lavagem com tolueno seco foi suprimida, e então

foi moído e peneirado (mesh # 270 correspondente a uma abertura de 53  $\mu\text{m}$ ) sob atmosfera inerte.

#### 4.5.4. FILMES PARA CRESCIMENTO CELULAR (FC)

Os filmes utilizados para crescimento e regeneração de células neuronais foram preparados também por rota hidrolítica ácida, mas nesse caso utilizando o ácido nítrico como catalisador baseado na referência [93]. Para a síntese do sol, TEOS, o organosilano e água foram adicionados ao solvente etanol, de forma que a proporção molar TEOS:organosilano:H<sub>2</sub>O:etanol foi equivalente a 1:0,2:2:4. O catalisador HNO<sub>3</sub> foi adicionado após 5 minutos na proporção de 0,1 molar. Após 12h de agitação à temperatura ambiente, os sóis resultantes foram depositados sobre lâminas de vidro usando a técnica de *spin coating*. As lâminas de vidro foram previamente tratadas com solução piranha<sup>4</sup> e então com solução de alcoolato de potássio imediatamente antes da deposição. Os sóis obtidos foram homogeneamente distribuídos na lâmina de vidro e os filmes foram então obtidos por *spin coating* a 1500 rpm por 27 s, seguido de 3000 rpm por 3 s. Os filmes foram então secados à 45 °C em placa quente por 4 h.

#### 4.6. TESTES DE PERFORMANCE

Os testes de performance utilizados variaram de acordo com aplicação de cada material desenvolvido sendo que todos foram realizados em triplicata. Os sensores colorimétricos e catalisadores de polimerização foram avaliados no Instituto de Química da UFRGS (Porto Alegre, Brasil). Os materiais antimicrobianos foram testados nos Laboratórios Nacionais de Luz Síncrotron (LNLS) e Biociências (LNBio) (CNPq, Campinas, Brasil). Os filmes para crescimento e regeneração de células neuronais foram avaliados no Departamento de Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade do Tennessee (MSE, The University of Tennessee in Knoxville, USA).

---

<sup>4</sup> Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na proporção 2:1 que aquece a 80°C quando os componentes são misturados. É utilizada para remoção de resíduos orgânicos.

#### 4.6.1. DETECÇÃO DE GÁS AMÔNIA PELOS SENSORES COLORIMÉTRICOS

A fim de avaliar a potencialidade dos sensores obtidos, eles foram testados na presença de gás  $\text{NH}_3$ . Esse teste foi efetuado num sistema fechado de volume  $23,5 \text{ cm}^3$  sob condições padrão para todos os sensores na forma de pó em uma vidraria específica (Figura 4.1). O teste consistiu do contato de uma massa fixa desses sensores (cerca de 30 mg) com o gás gerado por um volume fixo de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrada após a permanência por 5 minutos no volume de controle. O tempo de resposta foi então medido entre a abertura da válvula que permitia o contato do gás com o sensor e o momento em que a percepção da mudança de cor podia ser observada ao olho humano. A fim de obter uma análise mais precisa desse fenômeno foram gravados vídeos durante as reações e deles foram coletados os tempos de resposta em triplicata. Para tal, os vídeos foram analisados contra uma imagem padrão de como o sensor era inicialmente e o tempo registrado foi aquele em que o sensor iniciou sua mudança de coloração, ou seja, no momento da primeira mudança detectada.



**Figura 4.1:** Vidraria desenvolvida para a coleta do tempo de resposta ao gás amônia dos sensores.

#### 4.6.2. EFEITO ANTIMICROBIANO CONTRA BACTÉRIAS GRAM + E GRAM -

As bactérias *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (Gram -) e *Staphylococcus aureus* (Gram +) foram inicialmente obtidas de soluções estoque mantidas congeladas em meio tampão II (0,42 g de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico (MoPs), 2,2 g de cloreto de cálcio, 0,24 g de cloreto de rubídio e 30 mL de solução de glicerol 90 % de solução de glicerol e pH ajustado em 7,0). Para o preparo do inóculo, 30  $\mu$ L dessa solução de bactéria foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio Luria Betani (LB, contendo 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona e NaCl e 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura ambos da BioRab) e incubados por 30 min a 37 °C em agitador orbital. Posteriormente, 1  $\mu$ L dessa solução foi diluído em 50 mL de meio LB.

Para os testes de suscetibilidade bacteriana, 100  $\mu$ L de cada solução diluída de cada bactéria, 1 mL de meio de cultura LB, 1 mL de água e 100  $\mu$ L de uma solução alcóolica dos materiais de sílica híbrida/tetraciclina foram misturados em um tubo de ensaio e incubados a 37 °C. Após 5 h de incubação, 100  $\mu$ L da mistura foram diluídos em 900  $\mu$ L de água, espalhados em placas de cultura contendo meio LB com Agar e então incubados a 37 °C por 18 h. A concentração de tetraciclina no meio durante a incubação foi de 17,7  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de número de colônias formadas pelas bactérias *E. coli* e *S. aureus* nas placas de Agar. O mesmo procedimento foi executado em paralelo para os controles. Água esterilizada foi utilizada como branco, tetraciclina em solução e sílicas sem o antibiótico encapsulado foram usadas como comparação. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata simultaneamente e os valores reportados referem-se às suas médias.

#### 4.6.3. POLIMERIZAÇÃO DE ETILENO

As reações de polimerização de etileno foram executadas em reator de vidro, com pressão de etileno (grau ultra puro 99,99%, White Martins) de 1 bar. Inicialmente, 150 mL de solvente tolueno foram adicionados ao reator com capacidade para 300 mL e equipado com jaqueta para controle da temperatura. Uma vez atingida a temperatura de 60 °C, uma quantidade de co-catalisador metilaluminoxano (MAO, solução 10 % em tolueno Chemtura Europe) equivalente a uma razão Al/Zr de 1000 foi adicionada ao reator. Após saturação do meio com gás etileno, o catalisador numa concentração de 10<sup>-</sup>

<sup>5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de zircônio foi suspensa em 5 mL de tolueno e transferida ao reator. Todos os procedimentos foram executados em atmosfera inerte. Um fluxo de gás etileno (1 bar) foi mantido durante toda a reação. Após o tempo de reação de 30 min, etanol acidificado foi adicionado ao meio a fim de terminar a reação e o produtos foram então filtrados e secos.

#### **4.6.4. CRESCIMENTO DE REGENERAÇÃO DE CÉLULAS**

Para os testes de crescimento e regeneração de células neuronais foram empregadas células PC-12, uma linhagem celular derivada de um feocromocitoma<sup>5</sup> da medula supra-renal de ratos. As células foram cultivadas em meio F12-K (ATCC) suplementado com 15% de soro equino (HS, Invitrogen), 2,5% de soro fetal bovino (HyClone) e 1% de penicilina/streptomicina (P/S), sendo que o meio foi parcialmente substituído a cada 2 dias. Para avaliação dos materiais, as células foram removidas do frasco de cultura, precipitadas por centrifugação a 1500 rpm durante 3 min, ressuspendidas em 1 mL de meio, no qual foram dissociadas utilizando o processo de sucessivas passagens por agulha 22G e então contadas com auxílio de um hemacitômetro e do corante trypan. Os filmes de sílica híbrida foram esterilizados por incubação em etanol 70% por 30 minutos e enxaguados com água esterilizada 5 vezes por 5 minutos cada. Em todos os ensaios, 10.000 células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas sobre os filmes, em triplicata e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

No caso dos testes de adesão, as amostras foram gentilmente lavadas com tampão fosfato salino (PBS, 10x) contendo cálcio e magnésio para remover as células não aderidas após 24h de incubação. As células aderidas foram marcadas para viabilidade celular utilizando Calceína AM e EthD-1 (Invitrogen) e núcleo (Hoechst<sup>®</sup> 33342, Thermo Sci) por incubação a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 minutos. Após a marcação, as amostras foram lavadas novamente com PBS e as imagens foram coletadas em um microscópio de fluorescência invertido Zeiss Oxio Observer A1 (Zeiss, Alemanha) utilizando lentes de objetivas 10X. A adesão das células foi determinada por contagem celular de 12 imagens de cada replicata.

Para os testes de morfologia, após 24h horas de incubação, as amostras tiveram o

---

<sup>5</sup> Tumor formado pelas células cromafins que são células neuroendócrinas encontradas na medula das glândulas suprarrenais.

meio de cultura substituído por um meio suplementado especificamente para diferenciação (1% HS, 0,2 % FBS e 1 % P/S) e contendo  $50 \text{ ng.mL}^{-1}$  de fator de crescimento neural (NGF) a fim de induzir a diferenciação. As células foram então incubadas por mais 48h e então 12 imagens (contraste de fase) de cada replicata foram coletadas utilizando lentes objetivas 10X para análise do crescimento dos neuritos. A fim de avaliar a morfologia, as células foram fixadas em solução 4% de paraformaldeído e então marcadas para fluorescência. Para tal, as amostras foram primeiramente permeabilizadas com solução 0,1% de X-100 triton e então incubadas em solução de bloqueio (albumina de soro bovino 1%) por 30 minutos em temperatura ambiente. A marcação fluorescente foi realizada com os corantes Alexa Fluor 488 faloidina (verde, diluído 1:50) para marcação dos filamentos de actina<sup>6</sup> por 1h a temperatura ambiente, seguido de Hoechst<sup>®</sup> 33342 (azul, 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) para o núcleo por 20 minutos, também a temperatura ambiente. Após lavagem, as amostras foram montadas em lâmina de vidro com solução Fluoromont-G (Southern Biotech) para evitar degradação dos marcadores e as imagens obtidas no microscópio de fluorescência utilizando lentes objetivas 40X.

#### **4.7. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS**

Os materiais híbridos obtidos durante esse trabalho foram caracterizados por um conjunto de técnicas complementares como: espectroscópicas, volumétricas, microscópicas e de espalhamento. Grande parte das análises descritas foram realizadas em equipamentos disponíveis na própria UFRGS. Aquelas realizadas em outros centros de pesquisa têm seu local descrito no texto a seguir.

##### **4.7.1. QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS)**

A quantidade de indicador (para sensores) e de antibiótico (para antimicrobianos) encapsulados foi determinada por absorção no UV-vis de maneira

---

<sup>6</sup> Proteína que forma microfilamentos e é o principal componente do citoesqueleto de células de organismos eucariontes (aqueles formados por células contendo membrana celular).

indireta. No caso dos sensores, a quantificação foi realizada no resíduo de lavagem dos sensores após a síntese, utilizando o espectrômetro Varian Cary 100. No caso dos antimicrobianos, a quantificação ocorreu no sobrenadante da reação após precipitação por centrifugação. Os espectros de absorção foram adquiridos no Laboratório de Síntese Química do LNLS (Campinas, Brazil) utilizando um espectrômetro Agilent 8453 (Agilent Technologies).

#### **4.7.2. QUANTIFICAÇÃO DE COR**

As quantificações de cor foram obtidas pelo método de reflectância em um espectrômetro Varian Cary 100 UV-vis com acessório de reflectância difusa DRA-CA-30I Varian acoplado em célula de quartzo. O software empregado foi o Cary WinUV Color® no espaço de cor CIELAB com iluminante D65.

#### **4.7.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)**

Os espectros de FT-IR das diferentes amostras foram adquiridos utilizando o equipamento Varian 640-IR em modo de absorbância com 32 varreduras e  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolução na região de  $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ . Para a análise dos sólidos foram preparadas pastilhas de aproximadamente 1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro. A diluição a cerca de 10% de amostra foi efetuada em KBr seco.

#### **4.7.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)**

Os espectros de ATR das diferentes amostras foram adquiridos utilizando um espectrômetro de infravermelho Perkin Elmer (modelo Spectrum Two) com acessório para refletância total atenuada. Os espectros foram coletados em modo de absorbância com 32 varreduras e  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolução na região de  $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ . Essa análise foi realizada no Laboratório de Síntese Química do LNLS (Campinas, Brasil).

#### 4.7.5. ESPECTROSCOPIA RAMAN

As medidas foram realizadas a temperatura ambiente utilizando um espectrômetro de Raman inVia Renishaw equipado com laser de argônio (514,5 nm), detector CCD, grade de difração de 1200 linhas/mm e filtro de corte, localizado no Departamento de Química da Universidade McGill (Montreal, Canadá). As amostras foram montadas na plataforma manual de um microscópio Leica e laser foi focado na amostras utilizando uma lente objetiva 20X. O espectro foi adquirido utilizando potência de laser em torno de 15 mW e largura de fenda de 50  $\mu\text{m}$ . Diversas varreduras foram coletadas a fim de melhorar a razão sinal/ruído. O tempo de aquisição variou de acordo com a amostra na faixa de 10–20s. O espectrômetro foi calibrado previamente, utilizando um wafer de silício que foi disposto abaixo do microscópio para uma correção automática do alinhamento. A aquisição dos dados e análises foram realizadas o próprio software WiRE™. A precisão da posição dos picos é estimada em pelo menos  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.7.6. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE $^{29}\text{Si}$ E $^{13}\text{C}$ NO ESTADO SÓLIDO

As análises por ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^{29}\text{Si}$  no estado sólido foram realizadas no Departamento de Química da Universidade McGill (Montreal, Canadá). As amostras foram acondicionadas em um rotor de zircônia e analisadas no equipamento Varian 300 MHz. Polarização cruzada (CP) e rotação em ângulo mágico (MAS) foram empregados para a obtenção de espectros de melhor qualidade. As amostras foram analisadas com velocidade de rotação 4000 Hz no ângulo mágico de  $54^{\circ}44'$ . O intervalo entre pulsos foi de 2 s, com tempo do pulso de 2  $\mu\text{s}$  e tempo de aquisição de 17 ms. A frequência do  $^{13}\text{C}$  e do  $^{29}\text{Si}$  para polarização cruzada foi 75,38 e 59,56 MHz, respectivamente.

#### 4.7.7. VOLTAMETRIA CÍCLICA E DE PULSO DIFERENCIAL

As medidas eletroquímicas foram realizadas no Instituto de Química da UFBA (Salvador, Brasil), utilizando-se o potenciostato/galvanostato 273A da EG&G PAR. Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, provida de tampa de Teflon<sup>®</sup> com cinco orifícios, onde foram inseridos os eletrodos, sistema para borbulhamento de argônio para permitir a remoção de oxigênio do meio. Utilizou-se como eletrodo de trabalho o carbono vítreo (área de 0,082 cm<sup>2</sup>) e eletrodo modificado com os sensores de sílica híbrida (S=0,152 cm<sup>2</sup>). O eletrodo de trabalho modificado com material encapsulado foi preparado pela mistura de grafite com titânia na proporção 9:1 (em massa) com óleo mineral. Essa pasta foi aderida à superfície de um eletrodo de grafite. Foi empregado como eletrodo auxiliar um fio de platina e como eletrodo de referência utilizou-se eletrodo de Ag/AgCl em NaCl 3 mol L<sup>-1</sup>. Foram adicionados 5 mL da solução de eletrólito suporte em diferentes pH (s) à célula eletroquímica com fluxo constante de argônio durante 20 minutos. Posteriormente adicionou-se quantidade suficiente para uma concentração de aproximadamente 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> da espécie eletroativa no caso das medidas em solução.

Como eletrólito de suporte usou-se solução aquosa de NaBF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH=1, solução de HCl/KCl pH=0 e solução tampão. Para as soluções pH = 1,6 - 9,20, usou-se o tampão BR (Britton Robinson, preparada a partir da mistura de ácido acético (pKa=4,75), ácido fosfórico (pKa 2,14, 7,20 e 12,15) e ácido bórico (pKa=9,24, 12,74, 13,80), com concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O pH do tampão BR foi ajustado com adição de solução de NaOH e monitorado potenciometricamente.

#### 4.7.8. POROSIMETRIA DE NITROGÊNIO

As amostras foram previamente degasadas (10<sup>-2</sup> mbar) a 110 °C para os sensores e 70 °C para os catalisadores por 24h. As isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio (grau ultra puro 99,99%, White Martins) foram medidas a -196 °C em um equipamento Gemini 2375 Micromeritics. Os antimicrobianos foram analisados no Laboratório de Síntese Química do LNLS (Campinas, Brasil) utilizando o mesmo procedimento descrito, porém utilizando o equipamento Autosorb-1 Quantachrome. As

áreas específicas ( $S_{\text{BET}}$ ) foram determinadas pela equação de Brunauer-Emmett-Teller (método BET) na faixa de  $P/P_0 = 0,05$  a  $0,35$ . Os tamanhos de mesoporos foram calculados utilizando a equação de Barrrt-Joyner-Halenda (método BJH) usando padrões de Halsey.

#### 4.7.9. ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)

Os experimentos de SAXS foram realizados nas linhas D2A e D11A no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) usando um comprimento de onda  $\lambda = 1,488$  nm. O feixe de raios X foi selecionado por um monocromador de silício e colimado por um conjunto de fendas definindo uma geometria do tipo *pin-hole*. O feixe incidente foi detectado em duas diferentes distâncias amostra-detector (1549,8 mm and 2245,7 mm) com o intuito de aumentar a faixa do vetor  $q$  ( $q = (4\pi/\lambda) \sin\theta$ ;  $2\theta =$  ângulo de espalhamento) coletada. Amostras secas foram dispostas entre duas fitas kapton<sup>®</sup> e o feixe de raios x colimado foi passado através de uma câmara contendo o porta-amostras de aço inoxidável. Todas as medidas foram executadas à temperatura ambiente e um pó de behenato de prata (AgBe) foi utilizado como padrão de calibração para a distância detector-amostra, a inclinação e a posição do feixe direto. A transmissão e correções da radiação de fundo e para as fitas kapton foram realizadas na imagem 2D antes do processamento seguinte dos dados. A média dos padrões de espalhamento isotrópicos foi feita radialmente.

A análise dos dados de SAXS foi efetuada utilizando a rotina de avaliação Irena [19] implementada no software Igor Pro (WaveMetrics, Portland, USA) [20]. O ajuste unificado de múltiplos níveis foi utilizado para descrever um ou dois níveis de organização estrutural evidentes nos dados de espalhamento [21,22]. Neste método, o espalhamento resultante de cada nível estrutural é a soma de uma forma de Guinier exponencial uma cauda descrita pela Lei das Potências estruturalmente limitada. A equação geral, representando qualquer número de níveis pode ser escrita como [21,22]:

$$I(q) = \sum_{i=1}^n G_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{gi}^2}{3}\right) + B_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{g(i+1)}^2}{3}\right) \left[ \frac{(\text{erf}(qR_{gi}/\sqrt{6}))^3}{q} \right]^{\text{pi}} \quad (\text{Equação 4.1})$$

onde  $n$  é o número de níveis estruturais observados,  $G$  é o pré-fator de Guinier,  $R_g$  é o raio de giro e  $B$  é o pré-fator específico para o espalhamento correspondente à Lei das Potências, o qual é especificado como o decaimento exponencial  $P$ .

A análise dos dados das nanopartículas foi efetuada utilizando o software SASFit (Paul Scherrer Institut, Suíça) utilizando modelo esférico de distribuição Gaussiana.

#### **4.7.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)**

As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL, modelo JEM-1200 operando em 120 kV. As amostras foram finamente moídas e suspensas em etanol em um banho de ultrassom por 30 minutos e posteriormente depositadas em um *grid* de cobre.

#### **4.7.11. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)**

As imagens de AFM para avaliação da morfologia dos filmes de sílica foram adquiridas no LNNano (Campinas, Brasil). Foi utilizado o microscópio Nanoscope III (Digital Instruments) no modo *tapping*. As imagens obtidas foram tratadas utilizando o software WSxM 5.0 [94].

#### **4.7.12. ÂNGULO DE CONTATO (WCA)**

A análise da molhabilidade dos filmes híbridos foi avaliada por medida de ângulo de contato na Universidade do Tennessee (Knoxville, USA). As medidas foram realizadas em quintuplicata pelo método de ângulo de contato da gota-séssil com 5  $\mu$ L de água deionizada a temperatura ambiente num goniômetro de ângulo de contato CAM-Plus (Cheminstruments, USA).

#### **4.7.13. POTENCIAL ZETA**

O potencial zeta das partículas utilizadas como antimicrobianos foi avaliado no Laboratório de Síntese Química do LNLS (Campinas, Brasil). Para as análises, as partículas foram suspensas em etanol por sonicação durante 10 minutos, numa concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As análises foram realizadas em triplicata num equipamento Zetasizer Nano (ZEN 3600) equipado com Dip Cell (Malvern, Reino Unido), utilizando laser He-Ne de 4 mW e modelo Smoluchowski.

#### **4.7.14. ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP OES)**

Os teores de zircônio presentes nos catalisadores foram determinados utilizando um espectrômetro de emissão óptica induzida por plasma modelo Optima 2000 DV (Perkin Elmer, Massachusetts, USA). Argônio de alta pureza (99,996% White Martins) foi utilizado como gás do plasma ( $15 \text{ L min}^{-1}$ ), gás auxiliar ( $0,2 \text{ L min}^{-1}$ ) e gás nebulizador ( $0,6 \text{ L min}^{-1}$ ), nitrogênio (99,998% White Martins,  $2 \text{ L min}^{-1}$ ) foi usado para purga do sistema óptico. As soluções das amostras foram introduzidas usando um nebulizador GemCone (Perkin Elmer) e câmara de nebulização ciclônica. Vazão da amostra de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Potência de radiofrequência aplicada de 1300W. Processamento do sinal em área do pico usando 7 pontos por pico para integração. Modo de integração automático com 1-5 s de tempo de integração. Os padrões foram adquiridos da Merck em soluções estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  e diluídos sequencialmente para obtenção de 5 pontos da curva de calibração na faixa de  $0-2 \text{ mg L}^{-1}$  (0, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ ). Após a secagem do solvente, 1mL  $\text{HNO}_3$  concentrado foi adicionado ao sólido e em seguida o volume completado a 10 mL com água Milli-Q ultrapura. Esta última solução foi diluída em 100 vezes para leitura no equipamento. As determinações foram realizadas em triplicatas e as medidas foram controladas contra uma curva de calibração prévia. As amostras de catalisador (100mg) foram previamente digeridas em 2 mL de HF aquecido a  $160 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 h. Ao sólido restante foi adicionado 3 mL de  $\text{HNO}_3$  aquecendo novamente a  $160 \text{ }^\circ\text{C}$  por 6 h até solubilização total. O líquido resultante foi transferido para frascos e avolumado para 50 mL com água Milli-Q.

#### **4.7.15. ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FÓTON INDUZIDO POR RAIOS X (XPS)**

As análises de XPS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) em um espectrômetro SPECSLAB II (Phoibos-Hsa 3500 150, 9 channeltrons) SPECS com fonte de Al K $\alpha$  (E = 1486.6 eV) operando a 15 kV, Epass = 40 eV, passo de 0,6 eV e tempo de aquisição de 2 s por ponto. As amostras foram depositadas sobre fita de carbono em porta amostras de aço e transferidas sob atmosfera inerte para a pré-câmara. A pressão residual na câmara de análise foi de  $1 \times 10^{-9}$  Torr. As energias de ligação de C 1s, Cl 2p, Zr 3d e Si 2p foram calibradas de acordo com o pico do C 1s adventício em 285 eV com precisão de  $\pm 0.2$  eV. A análise dos dados foi realizada utilizando o software CasaXPS<sup>®</sup>.

#### **4.7.16. CROMATOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC)**

A massa molar média e a polidispersão dos polímeros foram determinadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) a alta temperatura usando um cromatógrafo 150 CV da Waters equipado com detector de índice de refração e três colunas (Styragel HT3, HT5 e HT6E). As corridas foram realizadas com aproximadamente 2 mg de amostra (em solução de 1,2,4-triclorobenzeno) a 140 °C com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> de 1,2,4-triclorobenzeno (TCB). As colunas foram calibradas com padrões de PS, PEBD e PP. A deconvolução dos dados foi obtida utilizando o modelo de distribuição de Flory.

#### **4.7.17. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)**

As análises foram feitas em um Calorímetro DSC-4 da Perkin-Elmer usando taxas de aquecimento e resfriamento de 10 °C min<sup>-1</sup> na faixa de temperatura de 30-160 °C. O ciclo de aquecimento foi efetuado duas vezes, mas somente a segunda varredura foi considerado, para evitar influência da história térmica e mecânica das amostras. O grau de cristalinidade dos polímeros foi calculado a partir da relação mostrada na Equação 4.2.

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^o} \times 100 \quad (\text{Equação 4.2})$$

onde  $X_c$  representa o grau de cristalinidade,  $\Delta H_f$  o calor de fusão da amostra (área de curva endotérmica) e  $\Delta H_f^\circ$  o calor de fusão do polietileno 100% cristalino ( $290 \text{ J.g}^{-1}$ ).

#### **4.7.18. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados de correlação apresentados ao longo desse estudo foram obtidos pelo método de correlação de Pearson utilizando o software SPSS<sup>®</sup>. A análise foi realizada pela comparação de todos os dados contra todos em triplicata dentro de cada aplicação em separado. Os resultados considerados mostraram as correlações (positivas ou negativas) significativas em nível  $**p < 0,01$  ou  $*p < 0,05$ . Foram consideradas relações fortes aquelas superiores a  $\pm 0,7$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1. SENSORES**

Os sensores foram confeccionados pelo encapsulamento do indicador de pH vermelho de alizarina por rota sol-gel hidrolítica ácida. Os sólidos foram caracterizados por um conjunto de técnicas complementares e tiveram sua performance avaliada na detecção de gás amônia. Além disso, os mesmos materiais sem a presença do indicador (amostra controle) foram também sintetizados para avaliação do efeito do organosilano e comparação.

#### **5.1.1. EFEITO DO ORGANOSILANO NO TEOR DE INDICADOR ENCAPSULADO**

A quantidade de indicador encapsulada nos sensores foi avaliada por espectroscopia molecular no ultravioleta-visível. A quantificação foi realizada por método indireto, utilizando medida da concentração do indicador liberado durante a lavagem de cada material. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 5.1.

Foi possível observar que a quantidade de indicador retida foi dependente do organosilano empregado, variando amplamente de 2,8 a 18  $\mu\text{mol.g}^{-1}$ . Os grupos aminopropil, seguido do isocianatopropil e cloropropil foram os que mais contribuíram para o aprisionamento do indicador da matriz. O menor teor foi reportado para SG-C<sub>0</sub>, mostrando que a presença dos grupos orgânicos pode auxiliar na retenção do composto, configurando-se como uma estratégia potencial em casos de necessidade de maiores teores encapsulados. Esse comportamento decorre da estabilização da molécula orgânica pelos grupos também hidrofóbicos introduzidos pelos organosilanos na rede de sílica [48].

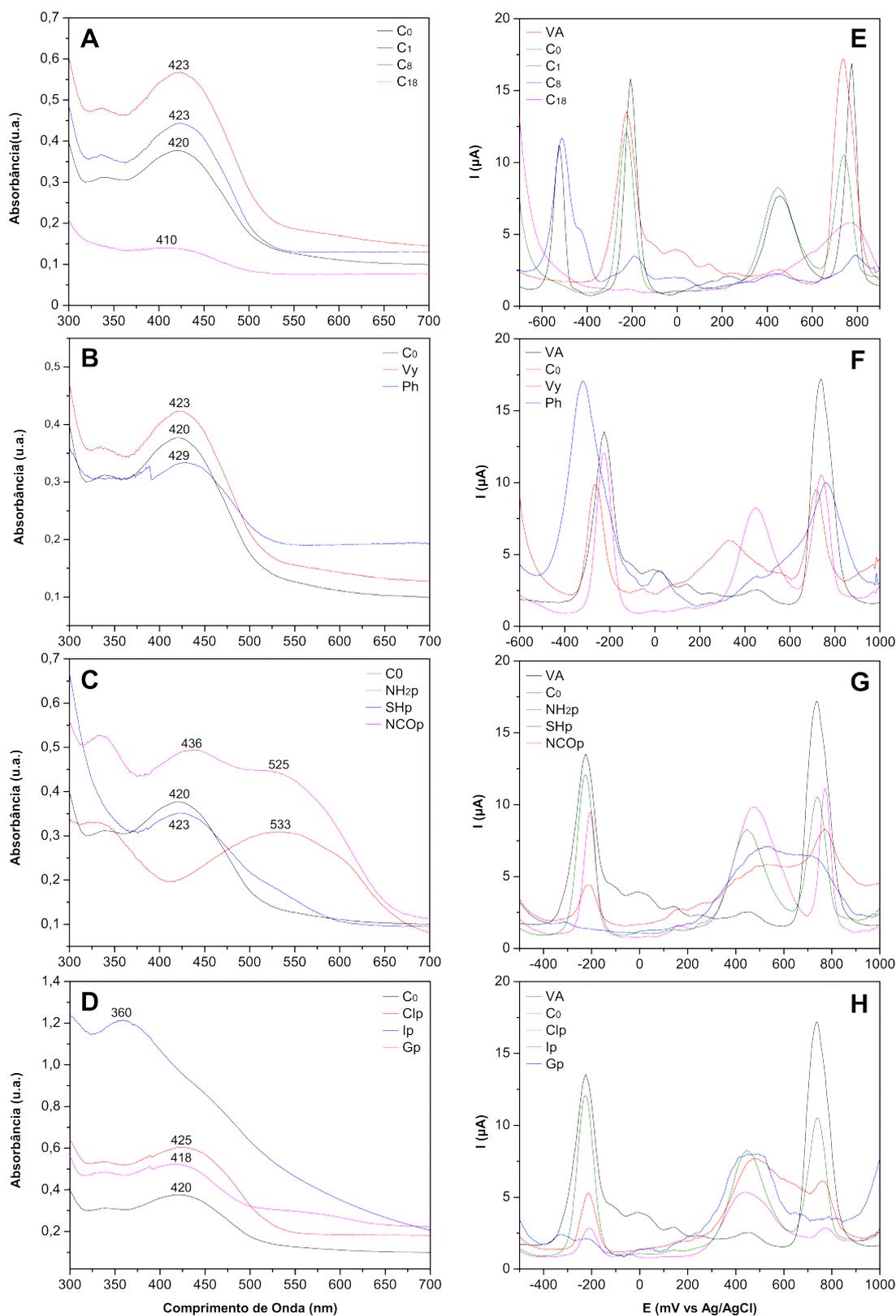
Além disso, observou-se o desempenho acentuado para silanos contendo átomos de nitrogênio como no caso do SG-NH<sub>2</sub>p e SG-NCOp, os quais resultaram nos maiores teores de indicador encapsulado. Esse resultado sugere que a presença do nitrogênio possa vir a contribuir quando um maior quantidade é necessária no encapsulado.

**Tabela 5.1:** Teor do indicador vermelho de alizarina encapsulado em função do organossilano utilizado.

<b>Sensor</b>	<b>Concentração [<math>\mu\text{mol/g}</math>]</b>
<b>SG-C<sub>0</sub></b>	2,83
<b>SG-C<sub>1</sub></b>	8,31
<b>SG-C<sub>8</sub></b>	10,55
<b>SG-C<sub>18</sub></b>	6,03
<b>SG-Vy</b>	8,39
<b>SG-Ph</b>	3,83
<b>SG-NH<sub>2</sub>p</b>	18,04
<b>SG-SHp</b>	3,61
<b>SG-NCOp</b>	17,58
<b>SG-Clp</b>	12,47
<b>SG-Ip</b>	8,81
<b>SG-Gp</b>	5,22

### **5.1.2. EFEITO DO ORGANOSILANO NO INDICADOR ENCAPSULADO**

O comportamento do corante vermelho de alizarina encapsulado nas diversas matrizes de sílica híbrida foi investigado utilizando as técnicas de espectrometria molecular no ultravioleta-visível por refletância difusa e voltametria cíclica e de pulso diferencial. A primeira técnica nos mostra mudanças nas transições eletrônicas sofridas pela molécula de indicador podendo revelar possíveis interações com a matriz de sílica. Já a segunda traz indícios da situação desse indicador pela análise do comportamento eletroquímico revelado pelos seus processos de oxidação/redução. Os espectros e voltamogramas resultantes para os diferentes materiais preparados encontram-se na Figura 5.1.



**Figura 5.1:** (A,B,C,D) Espectros de UV-Vis obtidos por refletância difusa para os diferentes sensores. (E,F,G,H) Voltamogramas de pulso do eletrodo modificado com os diferentes sensores em solução aquosa de tampão BR pH=1. Varredura anódica com  $v=100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

No caso de moléculas presentes na superfície de um sólido ou encapsulada, os máximos das bandas detectadas por espectrometria UV-vis pode ser deslocados devido a uma série de fatores. Dentre estes estão os efeitos estéricos, a polaridade do meio, formação de ligações de hidrogênio com a superfície e até mesmo sua própria acidez [95]. O indicador vermelho de alizarina possui uma banda intensa centrada em aproximadamente 452 nm em sua forma livre, a qual corresponde a uma transição do tipo  $n-\pi^*$  [47, 96]. Observando os espectros mostrados na Figura 5.1A a 5.1D pode-se observar que o máximo de banda referente ao VA varia em função dos diferentes organosilanos empregados em seu preparo. Os comprimentos de onda para os máximos de banda encontram-se resumidos na Tabela 5.2.

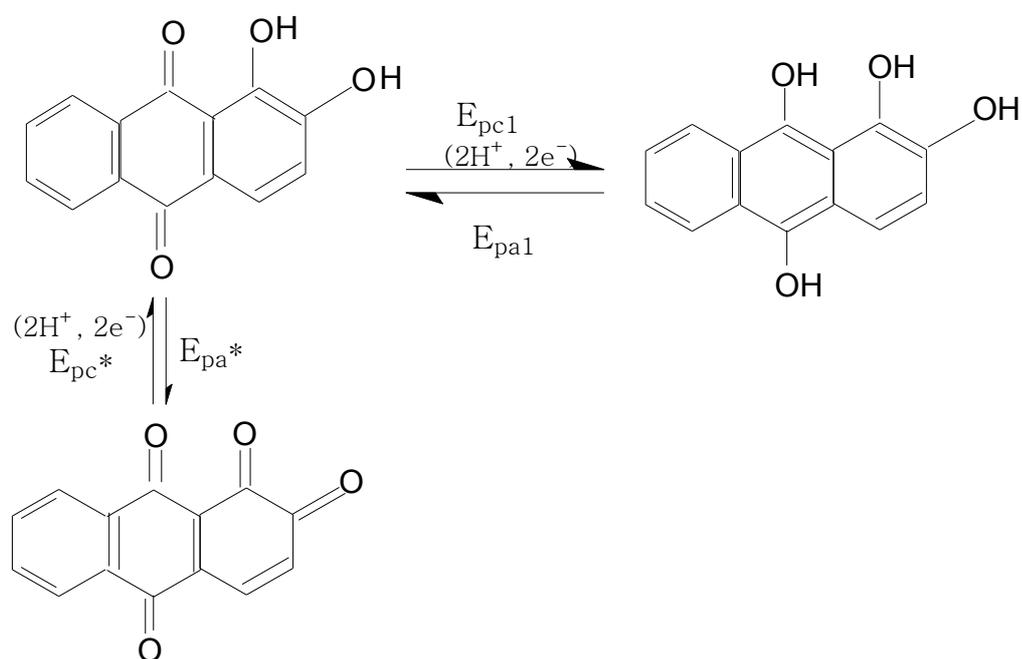
**Tabela 5.2:** Comprimentos de onda para os máximos de banda para o vermelho de alizarina encapsulado nas diferentes sílicas híbridas.

<b>Sensor</b>	<b>Comprimento de Onda [nm]</b>
<b>SG-C<sub>0</sub></b>	420
<b>SG-C<sub>1</sub></b>	423
<b>SG-C<sub>8</sub></b>	423
<b>SG-C<sub>18</sub></b>	410
<b>SG-Vy</b>	423
<b>SG-Ph</b>	429
<b>SG-NH<sub>2</sub>p</b>	533
<b>SG-SHp</b>	423
<b>SG-NCOp</b>	436 e 525
<b>SG-Clp</b>	425
<b>SG-Ip</b>	360
<b>SG-Gp</b>	418

De uma maneira geral, a maior parte dos materiais apresentou um deslocamento hipsocrômico (para o azul) em relação ao corante puro, com máximo de banda ao redor de 420 a 429 nm. Esse comportamento se deve ao aumento de polaridade do meio no qual a molécula se encontra. Nesse caso, provavelmente estejam sendo registradas interações com os grupos silanóis da rede de sílica uma vez que grande parte dos

materiais possui máximo em torno de 423 nm independentemente do grupo orgânico presente. As exceções foram os materiais: SG-C<sub>18</sub> que teve um deslocamento para o azul de maior intensidade com máximo em 410 nm; SG-NH<sub>2</sub> e SG-NCOp que mostraram deslocamento para o vermelho havendo também mudança de coloração do indicador devido ao ambiente básico; e SG-Ip que apresentou uma banda em 360 nm devido à presença do iodo, mascarando a banda referente ao VA.

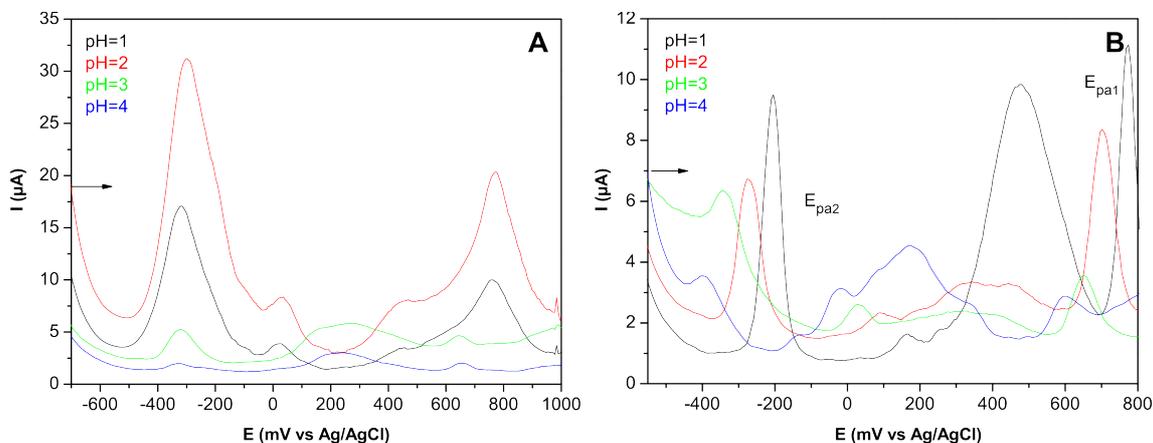
Os voltamogramas de pulso diferencial foram investigados a fim de observar os efeitos do organosilano sobre o comportamento eletroquímico do VA. Zittel e Florence verificaram que o potencial de redução do vermelho de alizarina-S que leva como produto o 1,2 didroxoantraceno-9,10 diol-3-sulfonato e o potencial de oxidação cujo processo redox resulta no 1,2 dioxoantraceno-9,10-dione-3-sulfonato, são dependentes do pH. De acordo com a literatura [97-99], o corante vermelho de alizarina apresenta uma redução reversível da forma 9,10-quinona à semiquinona, a qual resulta no produto contendo o grupo 1,2-dihidro (Figura 5.2).



**Figura 5.2:** Processo de eletrodo para vermelho de alizarina

Para fins de comparação, o comportamento do indicador vermelho de alizarina previamente verificado mostrando o deslocamento dos potenciais de oxidação/redução em função do pH [10, 100]. Assim sendo, as análises foram também realizadas em

diferentes pHs de modo a avaliar a alteração sistemática dos sinais a fim de verificar a possibilidade de uso do material encapsulado como sensor, como exemplifica a Figura 5.3 para os materiais SG-Ph e SG-NCOp.



**Figura 5.3:** Voltamogramas de pulso do eletrodo modificado com (A) SG-Ph e (B) SG-NCOp em solução aquosa de tampão BR pH 1, 2, 3 e 4. Varredura anódica em  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Os voltamogramas de pulso para cada um dos materiais estudados são mostrados na Figura 5.1E a 5.1H na forma de varredura anódica em pH 1 em comparação com o VA puro e também à sílica sem a presença de grupos orgânicos. Observando o perfil dos VPDs é possível verificar a presença do VA em todos os materiais, uma vez que todos mostram sinais referente a seus processos eletroquímicos. As diferenças foram observadas no perfil desses sinais indicando alteração no potencial de oxidação, intensidade do sinal e formato do pico. Esses resultados indicam que o corante foi alterado de sua forma livre durante o processo de encapsulamento na rede de sílica, conforme mostrado também por UV-Vis. Essas alterações podem ser resultado de interação do material com grupos silanóis da sílica ou ainda reação com os grupos funcionais presentes levando ao consumo de pelo menos uma parte do VA em sua forma original. Com frequência ocorre o aumento da intensidade dos sinais em torno de +470 mV e -450 mV, mostrando a provável formação de uma espécie oriunda da reação do VA com os grupos da sílica, independentemente do grupo orgânico.

No caso de SG-C<sub>1</sub> tem-se um perfil muito semelhante à VA pura e as medidas em diferentes pHs mostrou alteração dos sinais com comportamento também similar à VA livre. Para SG-C<sub>8</sub> e SG-C<sub>18</sub> é possível identificar a presença de VA. Entretanto, o

VPD indica que houve uma mudança de estrutura química durante a síntese. Em SG-C<sub>8</sub> ocorre destaque de um sinal em -510 mV e inexistência do sinal em +785 mV versus Ag/AgCl presente no VA livre. Já para SG-C<sub>18</sub> é possível observar a presença do sinal em +750 mV com um perfil diferente, além de outros sinais suprimidos. É possível verificar alteração sistemática dos sinais com linearidade em função do pH similar à VA livre para ambas amostras. Para SG-Vy e SG-Ph tem-se perfis de VPD bastante semelhantes à VA livre, porém suas pequenas alterações e destaque de um sinal em +331 mV para SG-Vy, demonstram que há alterações em relação ao corante livre. A alteração de sinais com o pH também foi similar no caso de SG-Vy e não significativa para SG-Ph, como mostra a Figura 5.3A. No caso de SG-NH<sub>2</sub>p verificou-se a presença de VA no material, porém não houve deslocamento dos sinais com o pH no caso da varredura anódica, indicando que as propriedades de elemento receptor foram prejudicadas pelo encapsulamento.

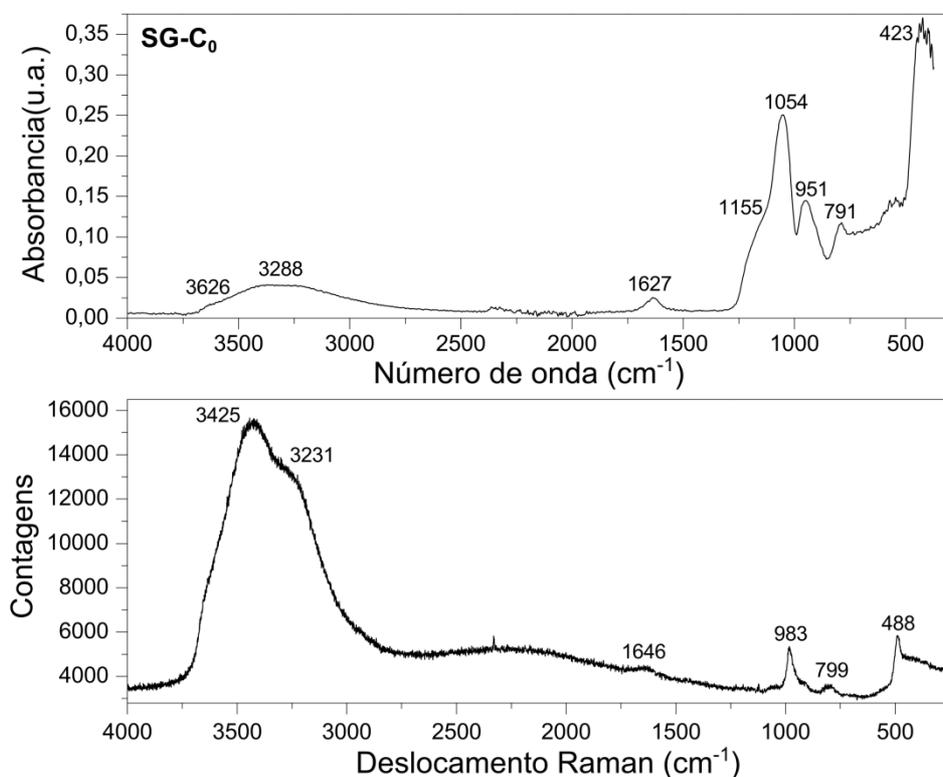
SG-SHp também mostra a presença de VA em sua estrutura, porém destacando uma onda anódica em +530 mV que é de baixa intensidade no corante livre. A alteração sistemática de sinais mostrou Epc\* e Epa\* não correspondentes e também linearidade em função do pH com inclinação diferente de VA não imobilizada. Em SG-NCOp e SG-Clp ocorre o destaque de um sinal em +470 mV mostrando também que ocorre mudança em VA. A alteração de sinais com o pH mostra resultados similares à VA para SG-NCOp como mostra a Figura 5.3B e inclinação diferenciada pra SG-Clp indicando numero diferente de prótons e elétrons envolvidos no processo de oxidação/redução. Finalmente, para SG-Ip e SG-Gp também é possível identificar a presença de VA, novamente com destaque de sinal em torno de +470 mV e +450 mV, respectivamente. SG-Ip mostrou alteração sistemática de sinais similar a VA no processo catódico e com diferente inclinação no caso do processo anódico. Já SG-Gp mostrou alteração dos sinais com o pH, porém não de forma sistemática.

### **5.1.3. EFEITO DO ORGANOSILANO NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E TEXTURAIS**

A fim de avaliar as mudanças das propriedades estruturais e texturais dos materiais híbridos preparados fez-se uso das técnicas de espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Raman, ressonância magnética

nuclear (NMR) de  $^{29}\text{Si}$  e  $^{13}\text{C}$  espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS) e porosimetria de nitrogênio.

Analisando os espectros de FTIR e Raman foi possível observar as bandas referentes à sílica e também aos ligantes orgânicos presentes na rede. Esse resultado indica a manutenção dos grupos híbridos após a reação de formação da rede de sílica a partir da hidrólise e condensação dos organoalcoxisilanos. Os ligantes orgânicos foram identificados principalmente pela técnica de Raman, sendo que foram avaliados inicialmente para as amostras sem o indicador VA encapsulado. A Figura 5.4 mostra os espectros de IR e Raman para amostra SG-C<sub>0</sub>.



**Figura 5.4:** Espectros de infravermelho e Raman para a sílica não híbrida (SG-C<sub>0</sub>).

Na região de 1250 a 700 cm<sup>-1</sup> são encontradas as vibrações de rede da sílica, sendo que essas bandas são chamadas de “impressão digital” da sílica. A banda mais intensa situada entre aproximadamente 1250 e 1000 cm<sup>-1</sup> corresponde às vibrações de rede que são os estiramentos sequenciais Si–O da rede Si–O–Si. O ombro em cerca de 1155 cm<sup>-1</sup> é atribuído ao modo longitudinal óptico (LO) dessa vibração e o máximo em

cerca de  $1054\text{ cm}^{-1}$  ao modo transversal óptico (TO)<sup>7</sup>. Os estiramentos da ligação Si–O quando o oxigênio está ligado a um hidrogênio (OH) são descritos ocorrendo em aproximadamente  $950\text{ cm}^{-1}$  para IR [101, 102] e em aproximadamente  $980\text{ cm}^{-1}$  para Raman [103]. No caso do sistema em estudo, essa banda foi observada em  $951\text{ cm}^{-1}$  por IR e  $983\text{ cm}^{-1}$  por Raman. A intensa banda dos estiramentos Si–O–Si também é detectada em seu modo simétrico em  $791\text{ cm}^{-1}$  no IR e  $799\text{ cm}^{-1}$  em Raman. Por fim, ainda foi possível detectar a vibração em modo *rocking* das ligações Si–O<sup>-</sup> em  $540\text{ cm}^{-1}$  por IR e o modo de respiração dos anéis siloxano contendo de 3 a 4 unidades (SiO) em  $488\text{ cm}^{-1}$  por Raman [104, 105]. Essas mesmas bandas foram identificadas em todas as demais amostras de sílicas híbridas, salvo pequenos deslocamentos de número de onda, como mostrado na Tabela 5.3.

Para a principal banda da sílica, o estiramento (Si–O)–Si, podem ser observados deslocamentos no modo LO entre as diferentes amostras. Já para o modo TO, o maior deslocamento ocorre entre a sílica que não possui grupos orgânicos em sua rede (não híbrida) em relação às sílicas híbridas. O deslocamento desses componentes para menores números de onda são geralmente relacionados a uma estrutura mais porosa, com anéis siloxano menores, maiores ângulos Si–O–Si e comprimentos de ligação Si–O. O aumento de porosidade pode ser ocasionado pela presença dos grupos orgânicos e o efeito dos deslocamentos de LO e TO ocorrem principalmente perto à superfície, a qual é detectada preferencialmente em modo ATR. Entretanto, essas regiões heterogêneas onde ocorrem os grupos orgânicos podem induzir uma deformação local na estrutura de rede, levando a um decréscimo no comprimento de ligação e ângulo do Si–O–Si. Outro fato que está ligado ao maior deslocamento de LO em relação ao modo TO, é a presença de grupos orgânicos na rede de sílica faz com que haja um decréscimo nas interações de Coulomb de longo alcance, as quais originam a separação LO/TO [101, 102, 106, 107].

Outro aspecto interessante ocorre com a banda dos estiramentos Si–O(H), na qual o oxigênio está ligado a um hidrogênio. Os deslocamentos de número de onda nessa banda ocorrem geralmente em função da presença de ligações de hidrogênio com esses grupos silanol. De acordo com a Tabela 5.3, tem-se um valor significativamente maior de número de onda para a amostra SG-C<sub>18</sub> e significativamente menor para SG-Clp e SG-Gp. A amostra SG-C<sub>18</sub> é aquela em que temos grupos octadecil presentes na

---

<sup>7</sup> Desdobramento de modos vibracionais de rede que ocorrem na forma da propagação de fônons, podendo ser longitudinal ou transversal, dando origem aos modos ópticos LO e TO citados.

rede. Essas cadeias por serem hidrofóbicas, podem prejudicar a formação dessas ligações de hidrogênio em relação às demais, acarretando um aumento no número de onda. Já as amostras SG-Clp e SG-Gp são as que possuem os grupos cloropropil e glicidoxipropil, respectivamente. Esses grupos podem favorecer a formação de ligações de hidrogênio, seja pela presença do cloro ou pela presença de oxigênios também no ligante orgânico. Assim sendo, foi possível então observar deslocamentos para menor número de onda [102]. As demais bandas, relativas aos grupos orgânicos presentes nas sílicas híbridas são mostrados separadamente, para cada material, na Figura 5.5, usando a técnica de Raman.

Para a amostra SG-C<sub>1</sub> que possui metil presente na rede de sílica ligada ao Si foi possível observar mais quatro bandas distintas, além das já descritas como pertencentes à rede de sílica. Foram detectadas duas bandas em 2979 cm<sup>-1</sup> e 2916 cm<sup>-1</sup>, correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação C–H do metil, respectivamente. O estiramento assimétrico nesse caso ocorre sempre em maior número de onda do que o simétrico, pois necessita de uma quantidade maior de energia para que essa vibração aconteça. Além dessas duas bandas, foi ainda identificada uma banda em 1412 cm<sup>-1</sup> designadas ao estiramento da ligação Si–C, mostrando a manutenção desta ligação associada à presença do organosilano na rede.

Já para o material contendo o grupo octil (SG-C<sub>8</sub>) como ligante orgânico ligado ao Si para formar o híbrido, foram identificadas mais seis bandas distintas, além daquelas da sílica. Nesse caso, pode-se observar uma banda bem mais intensa para os estiramentos C–H do que no caso anterior, devido ao maior número de carbonos da cadeia orgânica. Assim, nesse caso, essas bandas puderam ser identificadas também por IR e não só via espectroscopia Raman. Em 2984 cm<sup>-1</sup> observou-se o estiramento simétrico C–H do metil presentes no final da cadeia octil. Os estiramentos da ligação C–H dos CH<sub>2</sub> da cadeia carbônica ocorreram em 2932 cm<sup>-1</sup> para o modo assimétrico e 2861 cm<sup>-1</sup> no modo simétrico. Para esse mesmo grupo, ainda foi possível identificar o modo *bending* do estiramento C–H do grupo CH<sub>2</sub> em 1463 cm<sup>-1</sup> e para os grupos metil foram observadas em 1443 cm<sup>-1</sup>. Também, neste caso, ocorreram bandas para a ligação C–C em 1064 cm<sup>-1</sup> e o modo *rocking* para o grupo CH<sub>3</sub> em 895 cm<sup>-1</sup>.

**Tabela 5.3:** Bandas referentes à sílica para os materiais híbridos obtidos a partir dos diferentes organosilanos.

Atribuição	Téc.	SG-C0	SG-C <sub>1</sub>	SG-C <sub>8</sub>	SG-C <sub>18</sub>	SG-Vy	SG-Ph	SG-SHp	SG-NCOp	SG-Clp	SG-Gp
$\nu((\text{Si-})\text{O-H})_{\text{alc}}^8$	IR	3626	3616	3627	--	3613	3627	3630	--	3630	--
$\nu((\text{H-})\text{O-H})_{\text{assim}}^9$	Raman	3425	3431	3429	3457	3425	3432	3442	3433	3462	3409
$\nu((\text{Si-})\text{O-H})_{\text{LH}}$	IR	3388	3389	3379	3364	3385	3375	3366	3334	3359	--
$\nu((\text{H-})\text{O-H})_{\text{sim}}^{10}$	Raman	3231	3228	3236	3218	3230	--	3239	3226	--	--
	IR	3225	3224	3229	3226	3224	3228	3238	--	--	3253
$\delta\text{H}_2\text{O}$	IR	1627	1635	1635	1636	1635	1633	1635	1644	1646	1637
$\nu(\text{Si-O}(-\text{Si}))_{\text{LO}}$	IR	1155	1136	1131	1131	1135	1129	1125	1164	1129	1176
$\nu(\text{Si-O}(-\text{Si}))_{\text{TO}}$	IR	1054	1047	1047	1048	1048	1045	1041	1044	1041	1043
$\nu(\text{Si-O(H)})$	IR	951	948	948	960	953	949	950	951	942	936
	Raman	983	975	978	--	974	--	975	963	972	971
$\nu(\text{Si-O}(-\text{Si}))_{\text{sim}}$	IR	791	791	787	783	780	784	784	788	791	789
	Raman	799	799	782	--	787	--	--	789	--	--
$\text{Si-O}^-_{\text{rocking}}$	IR	542	544	561	547	522	562	545	549	557	556
$(\text{SiO})_{3-4}$ respiração dos anéis	Raman	488	484	489	489	484	493	503	486	487	487

<sup>8</sup>  $\nu((\text{Si-})\text{O-H})$  correspondente à álcoois.

<sup>9</sup> assimétrico

<sup>10</sup> simétrico

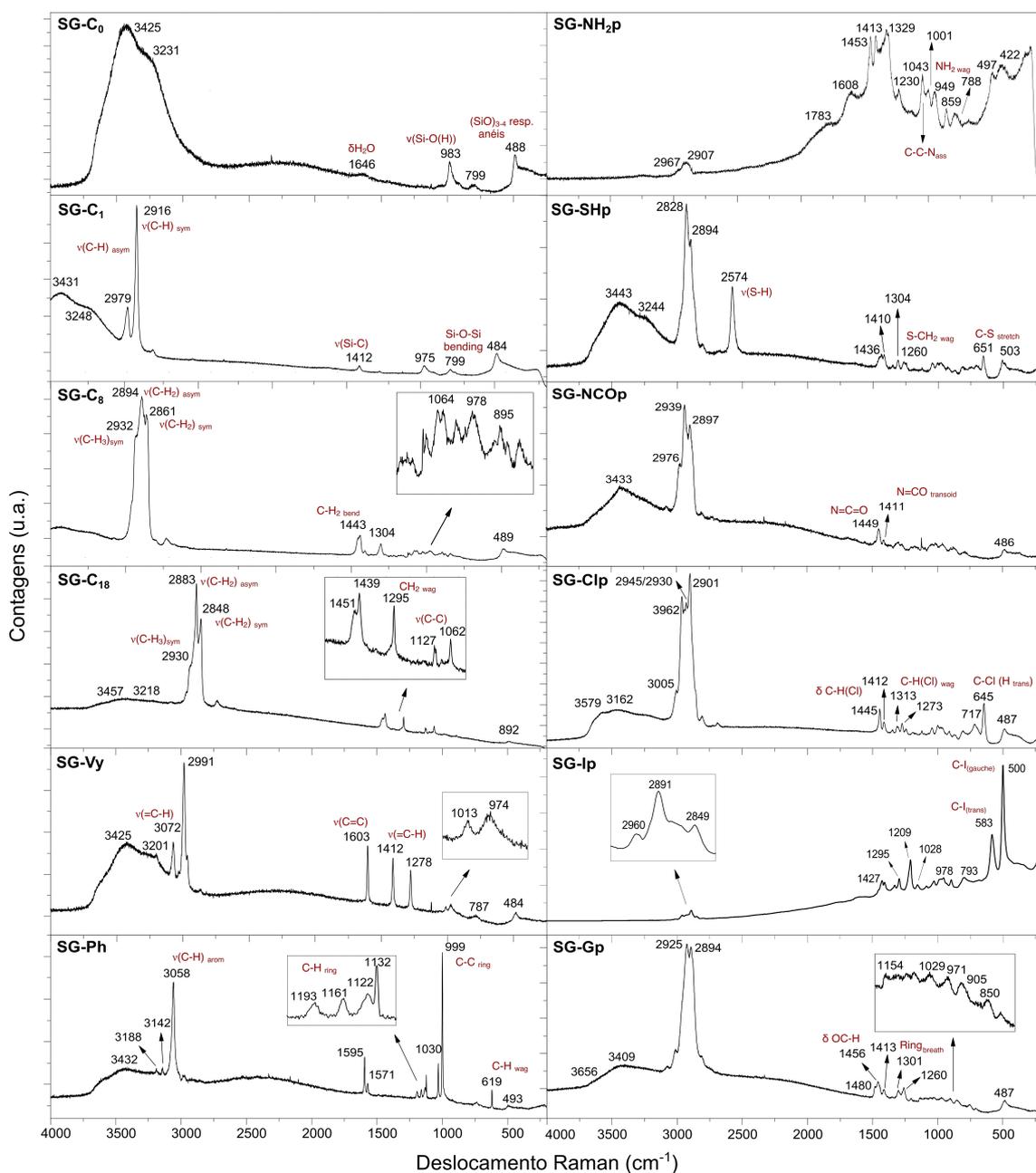
Para a sílica contendo o grupo octadecil (SG-C<sub>18</sub>) obtiveram-se espectros muito similares aos do material contendo o grupo octil, porém as bandas apareceram mais intensas e definidas em relação ao anterior. As vibrações C–H do grupo CH<sub>3</sub> apareceram em 2883 cm<sup>-1</sup> no seu modo simétrico detectado via Raman. Já para o grupo CH<sub>2</sub>, esse estiramento ocorreu no modo assimétrico em 2930 cm<sup>-1</sup> e, em 2850 cm<sup>-1</sup>, no modo simétrico. Ainda foi possível identificar a vibração *bending* do grupo CH<sub>2</sub> em 1460 cm<sup>-1</sup> e para o grupo CH<sub>3</sub> em 1439 cm<sup>-1</sup>. O grupo CH<sub>2</sub> apresentou também uma banda identificada como a vibração *wag* em 1295 cm<sup>-1</sup>. Além disso, as ligações C–C foram identificadas em 1127 cm<sup>-1</sup> e 1062 cm<sup>-1</sup>.

No caso do ligante vinil (SG-Vy), em 3072 cm<sup>-1</sup> foi possível verificar a vibração da ligação de C–H terminal, no qual o carbono está ligado ao outro por ligação dupla, a qual também foi identificada em 1412 cm<sup>-1</sup> e 1278 cm<sup>-1</sup>. Outras vibrações ocorridas foram: estiramento C–H do carbono ligado ao Si em 2991 cm<sup>-1</sup>, estiramento da ligação dupla C=C em 1603 cm<sup>-1</sup> e C–C em 1013 cm<sup>-1</sup>.

O espectro para a sílica híbrida contendo o grupo fenil (SG-Ph) como ligante mostrou uma banda bastante intensa devido às vibrações C–H em 3058 cm<sup>-1</sup>, caracterizando um composto aromático. Essas ligações puderam ainda ser identificadas em seus diversos modos em 1193 cm<sup>-1</sup>, 1161 cm<sup>-1</sup> e 1132 cm<sup>-1</sup>, 1030 cm<sup>-1</sup> e 619 cm<sup>-1</sup>. As deformações do anel ocorreram em 1595 cm<sup>-1</sup> e 1571 cm<sup>-1</sup>, as vibrações entre os carbonos das ligações C–C em 999 cm<sup>-1</sup> e a ligação ao silício (Si–C) em 1122 cm<sup>-1</sup>.

No caso da sílica contendo aminopropil (SG-NH<sub>2</sub>p) houve uma interferência do vidro utilizado na análise, de forma que foram também detectadas bandas atribuídas à sílica do capilar. Mesmo assim, foi possível identificar bandas referentes aos grupos aminopropil como a deformação assimétrica C–C–N em 1043 cm<sup>-1</sup> e a *wag* do NH<sub>2</sub> em 949 cm<sup>-1</sup>.

Para a amostra contendo o grupo mercaptopropil (SG-SHp), o estiramento assimétrico C–H do CH<sub>2</sub> ocorreu em 2928 cm<sup>-1</sup> e o simétrico em 2894 cm<sup>-1</sup>. Uma banda muito bem definida também foi detectada em 2574 cm<sup>-1</sup> e pode ser atribuída à ligação S–H. Além disso, em 1436 cm<sup>-1</sup> e 1410 cm<sup>-1</sup> tem-se a deformação dos CH<sub>2</sub>, em 1304 cm<sup>-1</sup> a deformação simétrica de C–H–S, em 1260 cm<sup>-1</sup> a vibração *wag* de S–CH<sub>2</sub> e em 651 cm<sup>-1</sup>, o estiramento da ligação C–S.



**Figura 5.5:** Espectros de Raman para as sílicas híbridas obtidas pelo método sol-gel hidrolítico utilizando catalise ácida.

Analisando os materiais com a funcionalização isocianatopropil (SG-NCOp), observamos o estiramento assimétrico dos grupos  $\text{CH}_2$  em  $2945 \text{ cm}^{-1}$  e o estiramento simétrico apareceu apenas por Raman em  $2897 \text{ cm}^{-1}$ . As vibrações correspondentes ao grupo isocianato ocorreram em  $1449 \text{ cm}^{-1}$  e  $1411 \text{ cm}^{-1}$ . O espectro para a sílica contendo o ligante cloropropil (SG-Clp) como grupo orgânico mostrou quatro diferentes máximos para os estiramentos C-H que ocorrem devido à diferença entre os carbonos próximos do átomo de cloro bastante eletronegativo. Esses estiramentos foram

identificados em  $2962\text{ cm}^{-1}$ ,  $2945\text{ cm}^{-1}$ ,  $2930\text{ cm}^{-1}$  e  $2901\text{ cm}^{-1}$ . Já as deformações de H–C–Cl ocorreram em  $1445\text{ cm}^{-1}$  e  $1412\text{ cm}^{-1}$ . As vibrações do tipo *wag* para esse mesmo grupo ocorreram em  $1313\text{ cm}^{-1}$  e  $1273\text{ cm}^{-1}$ . As demais bandas correspondem às ligações entre carbono e cloro: em  $717\text{ cm}^{-1}$  a C–Cl com o cloro em *trans* e em  $645\text{ cm}^{-1}$  a C–Cl com um hidrogênio em *trans*. No infravermelho identifica-se a ligação C–Cl em  $692\text{ cm}^{-1}$ .

Já analisando o material SG-Ip (iodopropil) foram identificadas bandas referentes aos estiramentos assimétrico ( $2960\text{ cm}^{-1}$ ) e simétrico dos grupos  $\text{CH}_2$ , além de sua deformação em  $1427\text{ cm}^{-1}$ , *wag* em  $1209$  e  $1295\text{ cm}^{-1}$  e *rocking* em  $793\text{ cm}^{-1}$ . O estiramento C–C ocorreu em  $1028\text{ cm}^{-1}$  e as bandas características referentes ao iodo apareceram em  $583\text{ cm}^{-1}$  para C–I *trans* e  $500\text{ cm}^{-1}$  para C–I *gauche*.

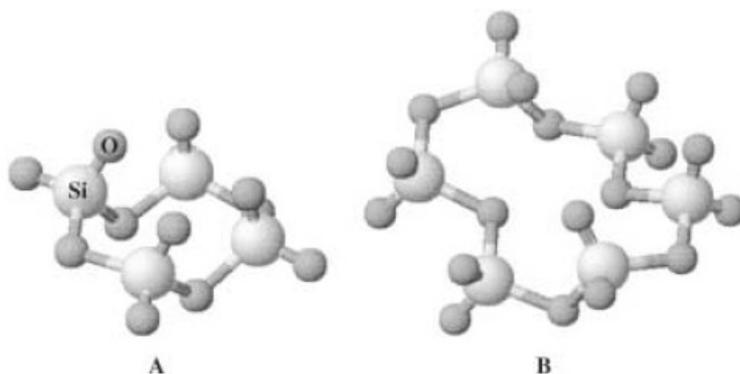
Por fim, a amostra contendo um grupo glicidoxipropil (SG-Gp) apresentou os estiramentos C–H dos grupos  $\text{CH}_2$  em  $2926\text{ cm}^{-1}$  e  $2894\text{ cm}^{-1}$ , nos modos assimétrico e simétrico respectivamente. Também foram identificadas deformações do fragmento O–C–H, ou seja, entre o carbono ligado a um oxigênio e a um hidrogênio, em  $1480\text{ cm}^{-1}$ ,  $1456\text{ cm}^{-1}$  e  $1413\text{ cm}^{-1}$ . Tem-se ainda uma pequena banda relativa à deformação C–O–C em  $1154\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C–C em  $1029\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C–O com o oxigênio do anel em  $905\text{ cm}^{-1}$  e o estiramento C–C entre os carbonos do grupo epóxi em  $850\text{ cm}^{-1}$  [108].

Os grupos referentes ao indicador de pH vermelho de alizarina não puderam ser identificados tanto por espectroscopia no infravermelho, quanto por Raman. Isso se deve à baixa concentração do composto na sílica (menos de 1 %).

### **5.1.3.1. RELAÇÕES DO ESPECTRO VIBRACIONAL COM A ESTRUTURA DE REDE DE SÍLICA**

É encontrado na literatura que as componentes LO e TO da banda correspondente aos estiramentos Si–O(–Si) têm seus máximos, bem como suas intensidades relativas alterados com a introdução de grupos e moléculas orgânicas na rede de sílica [101], conforme citado anteriormente. Sendo essa banda a “impressão digital” da sílica em termos estruturais, uma análise completa de suas componentes envolve também a deconvolução em seus modos LO e TO e suas contribuições relativas para as principais unidades anelares de siloxano: os anéis de quatro  $(\text{SiO})_4$  e seis  $(\text{SiO})_6$

membros, como mostra a Figura 5.6. Assim sendo, a banda será composta então por quatro componentes básicas: as componentes longitudinais para os anéis de seis membros ( $LO_6$ ) e quatro membros ( $LO_4$ ) e as componentes transversais para esses mesmos anéis de seis ( $TO_6$ ) e quatro ( $TO_4$ ).



**Figura 5.6:** Representação dos tipos mais comuns de arranjos cíclicos primários das unidades estruturais  $SiO_4$  em xerogeis: (A) anel siloxano de 4 membros ( $(SiO)_4$ ) e (B) anel siloxano de 6 membros ( $(SiO)_6$ ). Adaptado da referência [101].

Assim sendo, os espectros de infravermelho que apresentam essa banda foram deconvoluídos em quatro componentes. Esse procedimento foi realizado para os espectros adquiridos no modo de reflectância total atenuada (ATR) e também para aqueles obtidos em modo de transmitância (amostra diluída e pastilhada com KBr). Os percentuais foram calculados empregando a Equação 5.1 e os resultados obtidos pelos dois diferentes modos encontram-se descritos na Tabela 5.4.

$$\% (SiO)_6 = 100 \times \left[ \frac{A(LO_6) + A(TO_6)}{A(LO_6) + A(LO_4) + A(TO_4) + A(TO_6)} \right] \quad (\text{Equação 5.1})$$

De acordo com a Tabela 5.4, as sílicas híbridas encontram-se mais afetadas pela presença dos grupos orgânicos do que pela presença do indicador encapsulado em si, fato que pode ser decorrente da concentração do indicador ser inferior. Entretanto, pode-se observar uma maior formação de anéis de seis membros menos tensionados quando da adição desse indicador na síntese. Isso ocorre para acomodar, além dos grupos

orgânicos ligados à sílica, também as moléculas de indicador. A única exceção foi a amostra SG-C<sub>1</sub> que possui um metil ligada à sílica.

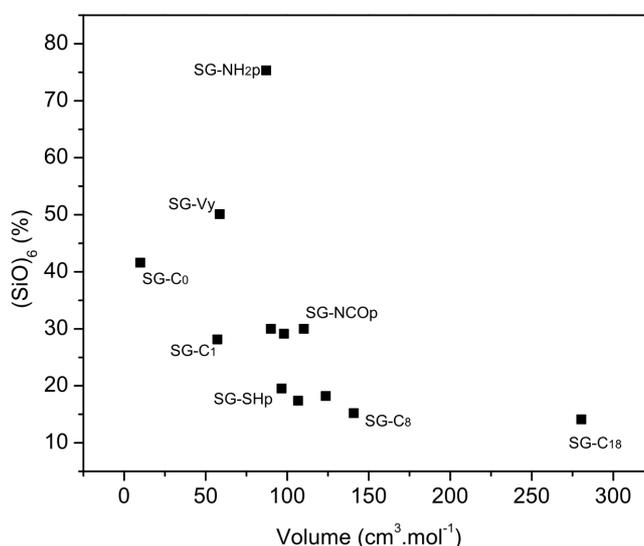
**Tabela 5.4:** Percentual de anéis com seis membros siloxano calculados via deconvolução dos espectros de Infravermelho via ATR e transmitância usando pastilha.

Amostra	Anéis de (SiO) <sub>6</sub> (%)		
	ATR		Transmitância
	Sensor	Controle	Controle
SG-C <sub>0</sub>	53,6	41,6	54,6
SG-C <sub>1</sub>	12,1	28,1	31,8
SG-C <sub>8</sub>	38,6	15,2	63,2
SG-C <sub>18</sub>	46,6	14,1	46,4
SG-Vy	50,4	50,1	-
SG-Ph	29,3	29,1	58,0
SG-NH <sub>2</sub> p	76,5	75,3	44,9
SG-SHp	21,6	19,5	62,9
SG-NCOp	63,9	30,0	43,0
SG-Clp	38,5	30,0	66,9
SG-lp	21,2	17,4	60,0
SG-Gp	22,9	18,2	56,8

Cabe ainda salientar que, observando a Tabela 5.4, é notável o maior percentual de anéis (SiO)<sub>6</sub> quando analisa-se o bulk da amostra em comparação ao modo ATR, o qual detecta principalmente o que está presente na superfície da amostra. Os anéis contendo quatro membros são formados nos primeiros estágios de hidrólise do TEOS e são retidos no gel, independentemente das condições de hidrólise e morfologia deste. Esses anéis de quatro membros são termodinamicamente mais estáveis. Entretanto, os com seis componentes são menos tensionados e portanto mais favoráveis cineticamente. Géis de sílica são muito similares aos vidros de sílica, sendo formados essencialmente por anéis contendo 6 membros SiO. Maior será esse percentual, quanto mais rápido for o processo de gelificação, pois ocorrerá previamente à formação das espécies mais estáveis em solução.

Assim sendo, tem-se uma maior formação de anéis de seis membros como mostrado analisando o bulk da amostra. Já para ATR, o que ocorre é a detecção da estrutura superficial da rede de sílica. Sílicas formadas por gelificação em geral apresentam grande porosidade e na superfície desses poros são formadas estruturas mais tensas. Isso pode ocorrer devido às restrições estéricas à formação dos anéis com seis membros muito próximo à superfície, uma vez que as reações de condensação são dificultadas [102].

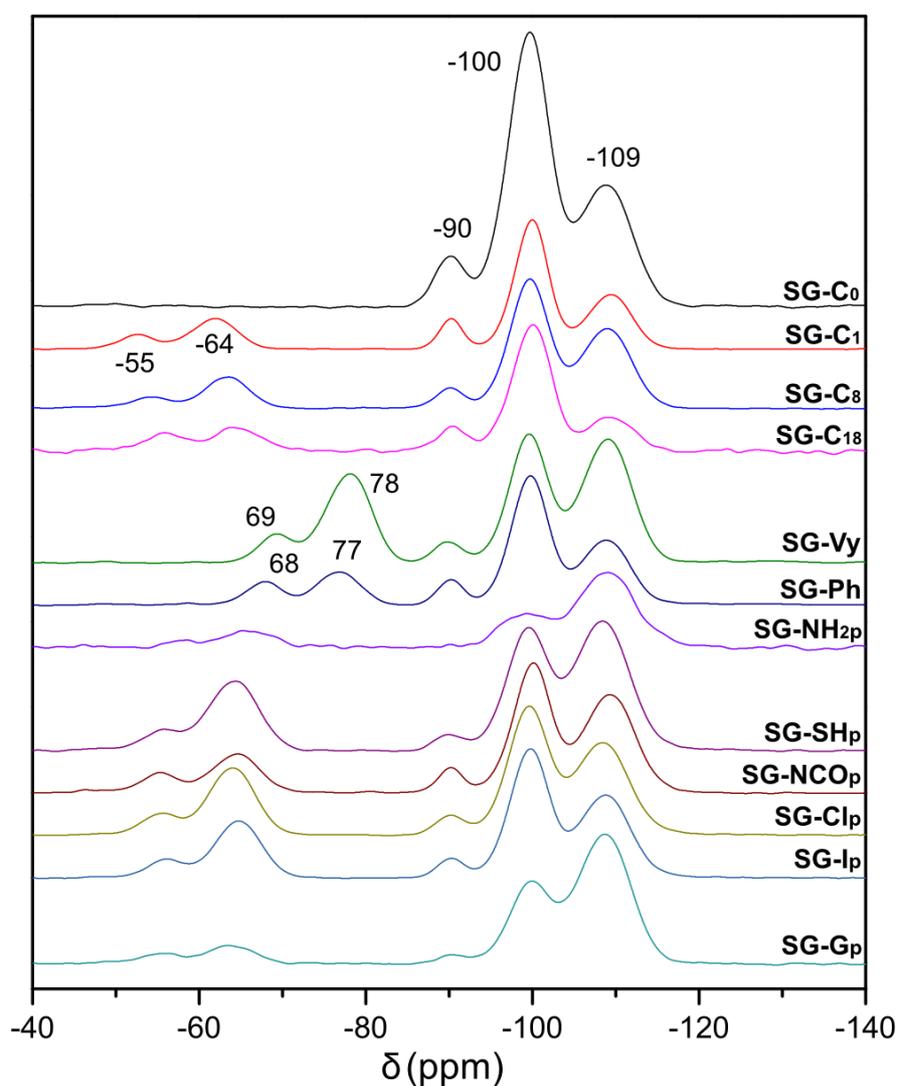
Uma tentativa de investigar o efeito estérico desempenhado pelo organosilano aponta por uma tendência de correlação inversa entre o volume do organosilano e o percentual de anéis de seis membros, como mostra a Figura 5.7. Esse resultado, considerando apenas uma razão TEOS:organosilano, aponta para um efeito de competição entre efeito causado pelo volume de cada silano, a velocidade em que a reação acontece e a porosidade do material formado. Por exemplo, grupos maiores apresentariam uma tendência a formar uma maior quantidade de anéis de seis membros a fim de acomodá-los na rede [101]. Entretanto, grupos maiores tendem a reações mais lentas de hidrólise e condensação [6], fato que contribui para formação de anéis de quatro membros.



**Figura 5.7:** Relação entre o percentual de anéis siloxano de seis membros ((SiO)<sub>6</sub>) e o volume dos grupos funcionais dos organosilanos empregados.

### 5.1.3.2. EVOLUÇÃO DA FORMAÇÃO DA REDE DE SÍLICA

Para investigar a evolução das reações de hidrólise e condensação dos materiais em estudo em função da presença dos organossilanos, utilizou-se a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) em estado sólido para núcleo  $^{29}\text{Si}$ . Além disso utilizou-se também o núcleo de  $^{13}\text{C}$  para avaliar os grupos orgânicos após a síntese. Os resultados encontram-se condensados nas Figuras 5.8 e 5.9 a seguir para cada um dos sistemas em estudo.



**Figura 5.8:** Espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  no estado sólido, obtidos com a técnicas de ângulo mágico e polarização cruzada (CP-MAS).

Os espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  da Figura 5.8 mostram a presença de 3 sinais com deslocamentos químicos em -90 ppm, -100 ppm e -109 ppm em todas as amostras estudadas. Essas bandas são atribuídas às espécies siloxano  $\text{Si-Q}^2$  ( $\text{Si}(\text{OX})_2(\text{OSi}\equiv)_2$ ),  $\text{Si-Q}^3$  ( $\text{Si}(\text{OSi}\equiv)_3(\text{OX})$ ) e  $\text{Si-Q}^4$  ( $\text{Si}(\text{OSi}\equiv)_4$ ), presentes na estrutura da rede de sílica, onde  $\text{X}=\text{H}$  ou  $\text{CH}_3$ . Nessa nomenclatura, Q representa o silício que é ligado a quatro átomos de oxigênio e o expoente de Q é o número desses átomos de oxigênio que fazem parte da rede de sílica, ou seja, ligados a outro átomo de silício [109].

Todos os materiais em estudo apresentaram sinais relativos a essas três espécies, com exceção daquele contendo o grupo aminopropil, no qual o sinal relativo à  $\text{Q}^2$  é muito pequeno. Isso mostra que a reação de condensação nesse caso foi mais extensa.

Com exceção do material SG-C<sub>0</sub>, no qual não foi utilizado organosilano, todos os materiais apresentaram mais dois sinais além dos três sinais relativos aos Qs. Essas bandas de menor intensidade são relativas às espécies de silício difuncionais  $\text{T}^2$  e  $\text{T}^3$ , os quais são ligados a apenas 3 átomos de oxigênio.

Foi possível identificar a presença dessas espécies na região de deslocamento químico de -55 ppm para  $\text{Si-T}^2$  ( $\text{Si}(\text{OSi}\equiv)_2(\text{OX})\text{R}$ ) e -64 ppm para  $\text{Si-T}^3$  ( $\text{Si}(\text{OSi}\equiv)_3\text{R}$ ), onde  $\text{X}=\text{H}$  ou  $\text{CH}_3$  e  $\text{R}=\text{grupo orgânico}$ . Isso mostra que houve a manutenção da ligação Si-C durante o processo sol-gel quando ocorreu a formação da rede de sílica híbridas por meio das reações de hidrólise e condensação dos silanos. Além disso, é possível observar que esse sinal sofre deslocamento para campo baixo, com  $\text{T}^2$  aparecendo em -69 ppm e  $\text{T}^3$  em -78 ppm para as amostras SG-Vy e SG-Ph. Isso ocorre devido à ligação do silício com carbonos que possuem ligações duplas [110], mostrando a manutenção dos grupos após a síntese.

A quantificação do espectro de  $^{29}\text{Si}$  obtido pela técnica de polarização cruzada pode fornecer indícios das diferentes espécies de Si dentro de um conjunto em estudo. Uma quantificação mais precisa pode ser obtida em um experimento sem polarização cruzada de próton, o que incorre em experimentos muito longos. Os resultados obtidos pela deconvolução dos espectros encontram-se resumidos na Tabela 5.5.

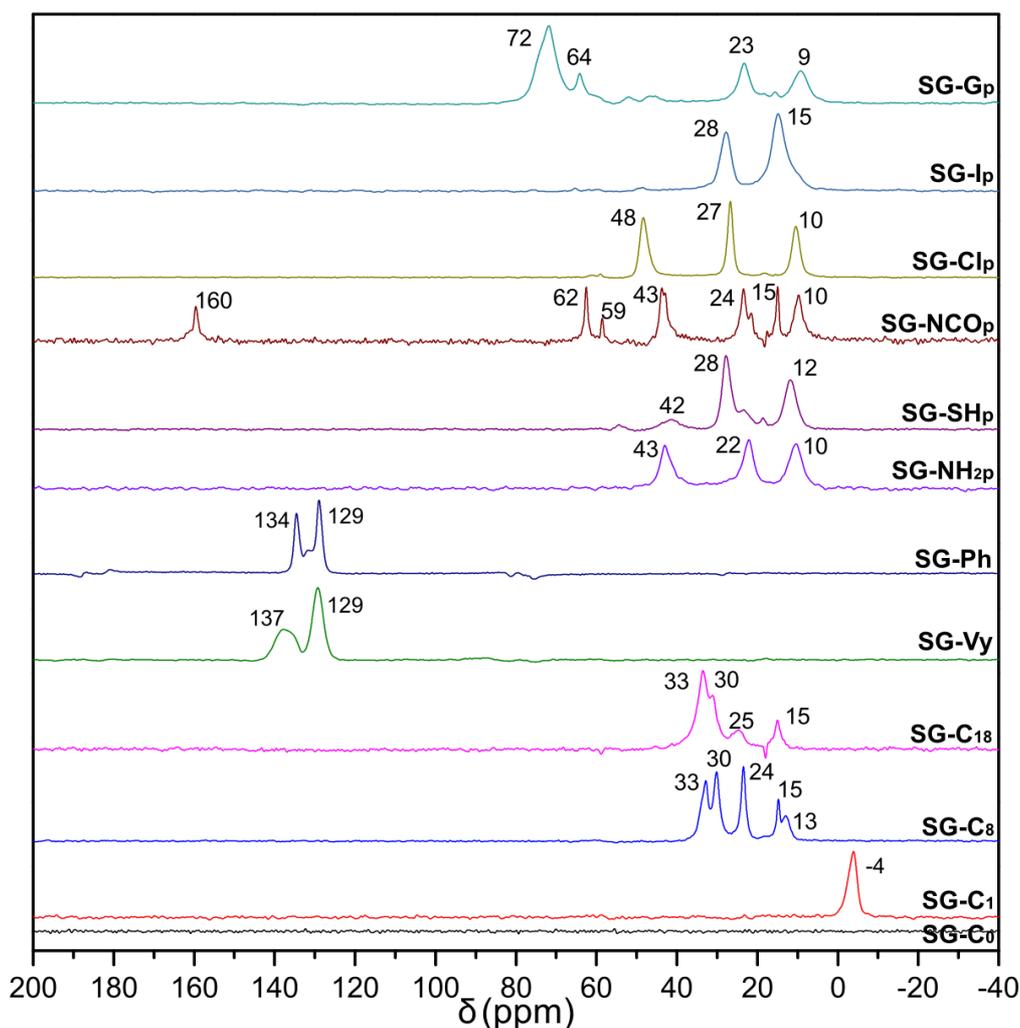
**Tabela 5.5:** Percentual das espécies de Si obtidas pela deconvolução dos espectros de  $^{29}\text{Si}$  NMR.

Amostra	Quantificação das espécies de $^{29}\text{Si}$ (%)					Reticulação
	Q <sup>2</sup>	Q <sup>3</sup>	Q <sup>4</sup>	T <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	
<b>SG-C<sub>0</sub></b>	33	59	9	0	0	67
<b>SG-C<sub>1</sub></b>	25	47	7	15	6	60
<b>SG-C<sub>8</sub></b>	34	45	5	12	4	54
<b>SG-C<sub>18</sub></b>	17	58	8	11	7	73
<b>SG-Vy</b>	36	29	4	24	7	40
<b>SG-Ph</b>	28	45	6	13	8	58
<b>SG-NH<sub>2</sub></b>	3	54	24	15	5	82
<b>SG-SH</b>	41	30	3	21	5	38
<b>SG-NCO</b>	38	38	5	14	6	48
<b>SG-Cl</b>	33	36	4	21	6	45
<b>SG-Ip</b>	32	39	4	20	5	48
<b>SG-Gp</b>	58	29	3	7	4	35

Essa análise mostra a maior parte das amostras com valores próximos para cada componente. As exceções foram as amostras SG-C<sub>18</sub> e SG-NH<sub>2</sub> que apresentaram valores maiores para Si-Q<sup>3</sup> e Si-Q<sup>4</sup>, com destaque para SG-NH<sub>2</sub>, mostrando maior extensão de reticulação da rede. Em sentido oposto, aparece a amostra SG-Gp com o mais alto percentual de Si-Q<sup>2</sup>. Esses resultados também são identificados pela última coluna da Tabela 5.5 que mostra o percentual de reticulação pela soma dos percentuais de Si-Q<sup>3</sup>+Si-Q<sup>4</sup>+Si-T<sup>3</sup>. Esse somatório representa o total de espécies com ligações tridimensionais e também apresenta SG-C<sub>18</sub> e SG-NH<sub>2</sub> com maior grau e SG-Gp com menor grau de reticulação. Análises de correlação de Pearson mostraram que existe uma correlação significativa entre os valores obtidos para percentual de Si-Q<sup>3</sup> (p<0,01) e grau de reticulação (p<0,05) com o volume do organosilano empregado. Esse resultado é provavelmente alavancado pelos resultados obtidos para SG-C<sub>18</sub> que mostrou alto grau de reticulação e grande volume. Além disso, foram identificadas correlações entre os percentuais de Si-Q<sup>3</sup>, Si-Q<sup>4</sup>, Si-T<sup>2</sup> e reticulação com o percentual de anéis de seis membros siloxano (SiO)<sub>6</sub> obtidos pelas análises de FTIR. Quanto maior o percentual de

(SiO)<sub>6</sub> menos tensionados, maior o grau de reticulação e também presença das espécies tridimensionais tipo Si-Q ( $p < 0,05$ ) e menor o percentual de espécies lineares em Si-T ( $p < 0,01$ ).

Para verificação dos grupos orgânicos após a síntese, fez-se uso da técnica de RMN em estado sólido também para o núcleo de <sup>13</sup>C. Os resultados encontram-se na Figura 5.9. Para a amostra SG-C<sub>0</sub>, como esperado, não foram identificados carbonos e para a SG-C<sub>1</sub> foi possível observar a presença de um carbono, correspondente ao metil. Para as amostras SG-C<sub>8</sub> e SG-C<sub>18</sub> foram obtidos espectros muito semelhantes, apenas com sinais mais alargados nesta última, devido à sobreposição de sinais dos carbonos ao longo da cadeia. Para as amostras com carbonos fazendo ligação dupla, o sinal destes foi deslocado para campo baixo, o contrario do caso do silício. Dentre as amostras contendo os grupos funcionais ligados ao propil são identificados apenas três sinais nas amostras SG-NH<sub>2</sub>p, SG-Clp e também SG-Ip que apresenta dois sinais e um ombro. Na amostra SG-SHp foi possível identificar outros pequenos sinais, além daqueles três principais relativos ao propil, mostrando que pode ter ocorrido alguma reação com a parte orgânica nesse material. No caso do SG-NCOp fica bastante claro que houve modificação do grupo isocianato, devido à grande alteração do espectro e presença clara de diferentes carbonos atribuídos ao propil. Por fim, no caso de SG-Gp é possível observar dois sinais mais intensos e um menos intensos em maiores frequências referentes ao propil e dois sinais majoritários, um deles com presença de um ombro, provavelmente referentes ao grupo glicidoxi.



**Figura 5.9:** Espectros de NMR de <sup>13</sup>C no estado sólido obtidos utilizando as técnicas de ângulo mágico e polarização cruzada (CP-MAS).

### 5.1.3.3. MICROESTRUTURA DA REDE DE SÍLICA

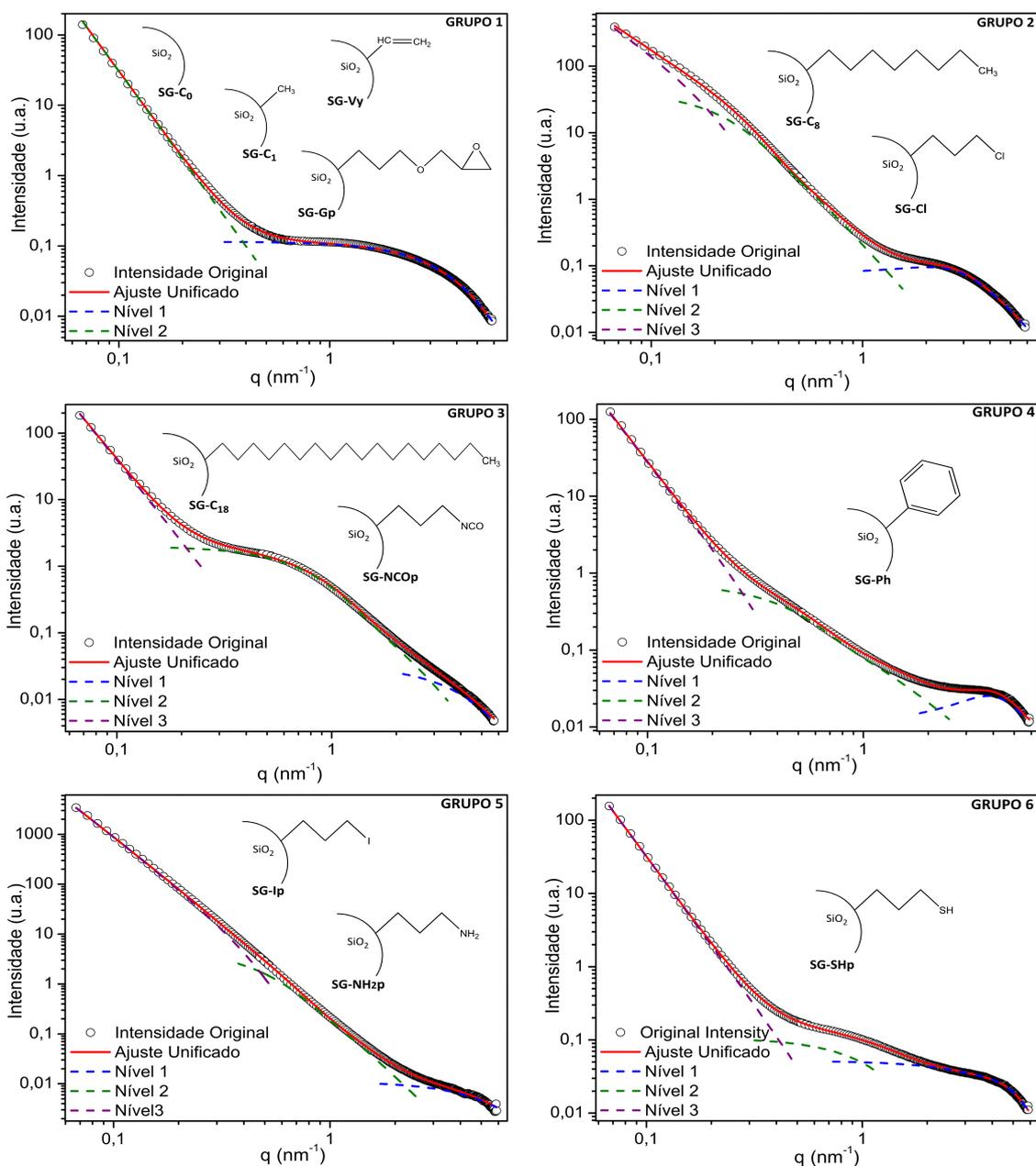
Para avaliar as propriedades texturais dos sensores utilizou-se das técnicas de porosimetria de nitrogênio para verificar a área específica usando método BET e também o espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS). Os resultados de área BET apresentados na Tabela 5.6 mostram, de modo geral, a obtenção de elevadas áreas específicas. Esse resultado é desejado uma vez que o analito precisa permear a matriz para acessar a molécula indicadora (elemento receptor). Ainda é possível perceber que a presença dos grupos orgânicos na rede leva a uma diminuição da área, em relação ao material não híbrido. Isso ocorre, pois esses grupos orgânicos podem estar dispostos também na superfície e sobre os poros. Com o fechamento dos poros a área diminui e o

acesso do analito pode ou não diminuir, dependendo da interação destes grupos com o analito. Além disso, se comparando os resultados entre as amostras controle e as quais continham o indicador encapsulado formando o sensor, pode-se observar menores áreas para este último. Inclusive, existe uma correlação significativa ( $p < 0,05$ ) mostrando que quanto maior o teor de VA encapsulado, menor a área específica do material. Isso mostra que o indicador encapsulado, se deposita nos poros desse material diminuindo sua área superficial.

**Tabela 5.6:** Resultados de área específica ( $S_{BET}$ ) para os sensores.

<b>Amostra</b>	<b><math>S_{BET}</math></b>	
	Controle ( $m^2/g$ )	Sensor ( $m^2/g$ )
<b>SG-C<sub>0</sub></b>	865	711
<b>SG-C<sub>1</sub></b>	691	558
<b>SG-C<sub>8</sub></b>	371	477
<b>SG-C<sub>18</sub></b>	557	430
<b>SG-V<sub>y</sub></b>	885	672
<b>SG-Ph</b>	678	568
<b>SG-NH<sub>2</sub>p</b>	23	12
<b>SG-SHp</b>	741	236
<b>SG-NCOp</b>	632	452
<b>SG-Clp</b>	206	121
<b>SG-Ip</b>	331	336
<b>SG-Gp</b>	0,13	0,9

Já na técnica de SAXS foi possível obter informações de tamanho, organização e forma das partículas e estruturas hierárquicas de materiais. Foram obtidos, dados de raio de giro da partícula primária ( $R_{g1}$ ), estrutura fractal ( $P_2$ ) e dados de correlação (distância e número de vizinhos) resumidos na Tabela 5.7. A Figura 5.10 traz uma série de curvas de SAXS representativas para esses materiais.



**Figura 5.10:** Seis diferentes grupos de microestrutura representados pelas curvas de SAXS e seus respectivos ajustes unificados.

As curvas de SAXS puderam ser agrupadas em seis diferentes padrões de acordo com o tipo de fractal presente em cada nível e a presença ou ausência de correlação entre as partículas primárias. Com isso, foi possível a representação esquemática das curvas mostradas na Figura 8. Em geral, quando o indicador foi adicionado ao material houveram apenas pequenas alterações de valores de  $R_g$  e  $P_2$ . Entretanto, algumas estruturas tiveram diferenças mais significativas. As amostras com os ligantes octil, vinil e mercaptopropil tiveram um nível de organização suprimido na escala de medida,

formando apenas dois níveis. Já as amostras contendo os ligantes cloropropil e isocianatopropil tiveram alterações em sua estrutura fractal. Para a primeira, houve a perda da correlação das partículas primárias e formação de um fractal de massa no segundo nível, o qual correspondia a um fractal de superfície e vice-versa para o terceiro nível. Já para o SG-NCOp, apenas no segundo nível o fractal, que era de massa, tornou-se de superfície na presença do indicador.

Os dados resultantes dos ajustes unificados para os materiais encontram-se resumidos na Tabela 7. A análise de correlação de Pearson mostra que o raio de giro das partículas primárias é relacionado ( $p < 0,01$ ) com a concentração de VA encapsulado. Esse resultado pode mostrar que a partícula primária tende a diminuir com o aumento de indicador encapsulado, o que pode mostrar que a presença do indicador pode diminuir o espaço para crescimento dessas estruturas, levando-as a menores tamanhos finais. Além disso, com nível de significância  $p < 0,05$  existe a correlação indicando que materiais com partículas primárias maiores possuem áreas específicas mais elevadas.

A inclinação da curva, regida pela Lei das Potências ( $P_2$ ), diz respeito à estrutura fractal na qual as partículas primárias estão se organizando, sendo que entre 1 e 3 temos fractais de massa e entre 3 e 4 temos fractais de superfície. De uma forma geral, quanto menor esse número, menos densa (no caso dos fractais de massa) e mais rugosa (no caso dos fractais de superfície) é essa estrutura. Analisando o conjunto de sistemas estudados, foi possível observar que essa organização possui correlação ( $p < 0,01$ ) com o percentual de anéis de seis membros siloxano ( $\text{SiO}_6$ ) e área específica. Quanto menor o valor de  $P_2$ , maior a área específica e maior o percentual de anéis ( $\text{SiO}_6$ ). Esse resultado relaciona dados obtidos por técnicas complementares, mostrando que uma estrutura mais porosa e formada por estruturas menos tensas também reflete fractais menos densos. Além disso, foi possível relacionar menores valores de  $P_2$  com menores valores de  $\text{Si-Q}^3$  ( $p < 0,01$ ) e maiores valores de  $\text{Si-T}^2$  ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5.7:** Resultados para os parâmetros obtidos por SAXS para os sensores.

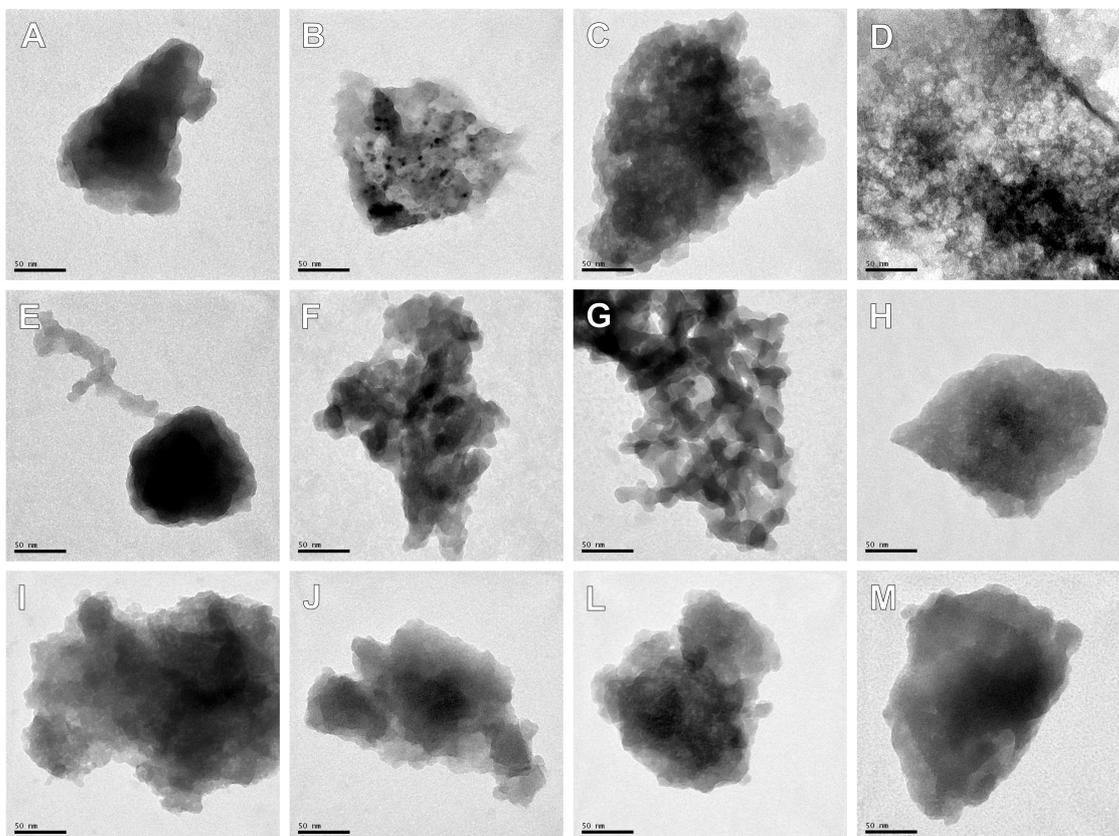
Sensor	R <sub>g1</sub> [nm]		P <sub>2</sub>		Distância Correlação [nm]		Número de Vizinhos	
	Controle	Sensor	Controle	Sensor	Controle	Sensor	Controle	Sensor
<b>SG-C<sub>0</sub></b>	0,493	0,832	1,56	3,86	-	1,183	-	0,8
<b>SG-C<sub>1</sub></b>	0,948	0,421	3,81	3,89	2,372	-	0,5	-
<b>SG-C<sub>8</sub></b>	0,556	0,529	3,08	3,03	-	2,121	-	1,2
<b>SG-C<sub>18</sub></b>	0,491	0,502	2,35	2,49	-	-	-	-
<b>SG-Vy</b>	0,394	0,341	3,28	1,40	-	-	-	-
<b>SG-Ph</b>	0,381	0,637	2,08	3,50	1,268	1,168	2	2,9
<b>SG-NH<sub>2p</sub></b>	0,438	0,387	3,70	3,70	1,165	1,254	1,6	2,1
<b>SG-SHp</b>	0,784	0,792	2,78	1,00	1,202	1,170	1,6	1,5
<b>SG-NCOp</b>	0,460	0,432	2,99	2,81	-	-	-	-
<b>SG-Clp</b>	0,399	0,461	3,24	3,06	1,205	1,114	2,5	2,8
<b>SG-Ip</b>	0,361	0,412	2,91	2,92	-	-	-	-
<b>SG-Gp</b>	0,355	0,610	3,84	3,87	1,667	-	2,3	-

As demais correlações identificadas pelo método de Pearson revelaram que foram identificados mais níveis de organização na escala medida quanto maior o volume dos ligantes orgânicos, maior a concentração de VA encapsulada e menor o percentual de Si-Q<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ). Já para as partículas que sofrem efeito de correlação (efeito da partícula vizinha) pode-se observar maiores distâncias centro-centro para os ligantes com maior volume. O número de vizinhos na primeira esfera é maior quando a rede possui um maior percentual de anéis mais tensionados com apenas quatro membros siloxano (SiO)<sub>4</sub> e menor área específica.

#### 5.1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Para investigar as alterações morfológicas causadas pela presença dos organosilanos em cada material utilizou-se da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As amostras foram dispersas em etanol com auxílio de um

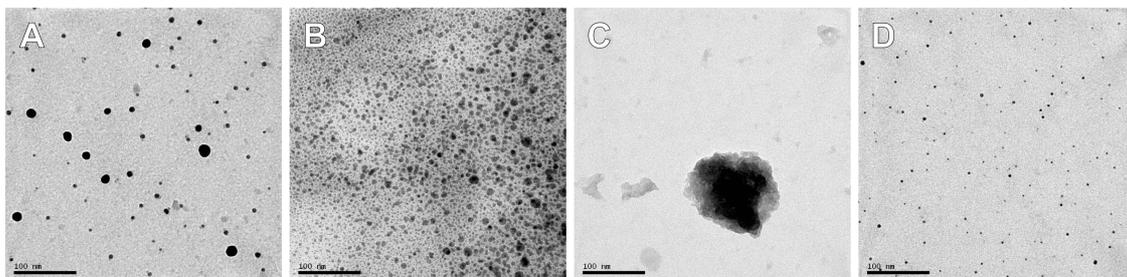
ultrassom e depositadas em *grid* de cobre para análise. As imagens obtidas encontram-se nas Figuras 5.11 e 5.12.



**Figura 5.11:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. A: SG-C<sub>0</sub>, B: SG-C<sub>1</sub>, C: SG-C<sub>8</sub>, D: SG-C<sub>18</sub>, E: SG-Vy, F: SG-Ph, G: SG-NH<sub>2</sub>p, H: SG-SHp, I: SG-NCOp, J: SG-Clp, L: SG-Ip e M: SG-Gp.

De acordo com as imagens de TEM (Figura 5.11), foi possível identificar que a morfologia dos materiais é alterada em função do tipo de organosilano utilizado. Para amostra SG-C<sub>0</sub> (Figura 9A) que não contém grupos orgânicos pôde-se observar pequenas partículas formadas por várias camadas de sílica de acentuada porosidade. Já no grupo dos alquilsilanos (C<sub>1</sub> (Figura 5.11B), C<sub>8</sub> (Figura 5.11C) e C<sub>18</sub> (Figura 5.11D)) pode-se ver a presença de uma grande quantidade de matéria orgânica, que ao ser degradada pelo feixe de elétrons, resultou em buracos na estrutura de sílica. Esse fenômeno foi menos observado para o caso da amostra SG-C<sub>8</sub> e mostra que podem estar ocorrendo domínios com maior concentração dos grupos orgânicos. No caso dos outros dois grupos contendo apenas carbonos como ligante, o vinil e o fenil, pode-se observar

que as pequenas partículas são formadas por nanopartículas ainda menores. Essas partículas puderam ser observadas também separadas da sua estrutura maior como mostra a Figura 5.12A para a amostra contendo vinil e Figura 5.12B para a amostra contendo fenil.



**Figura 5.12:** Formação de nanopartículas observada para as amostras (A) SG-Vy, (B) SG-Ph, (C) SG-NCOp e (D) SG-Ip.

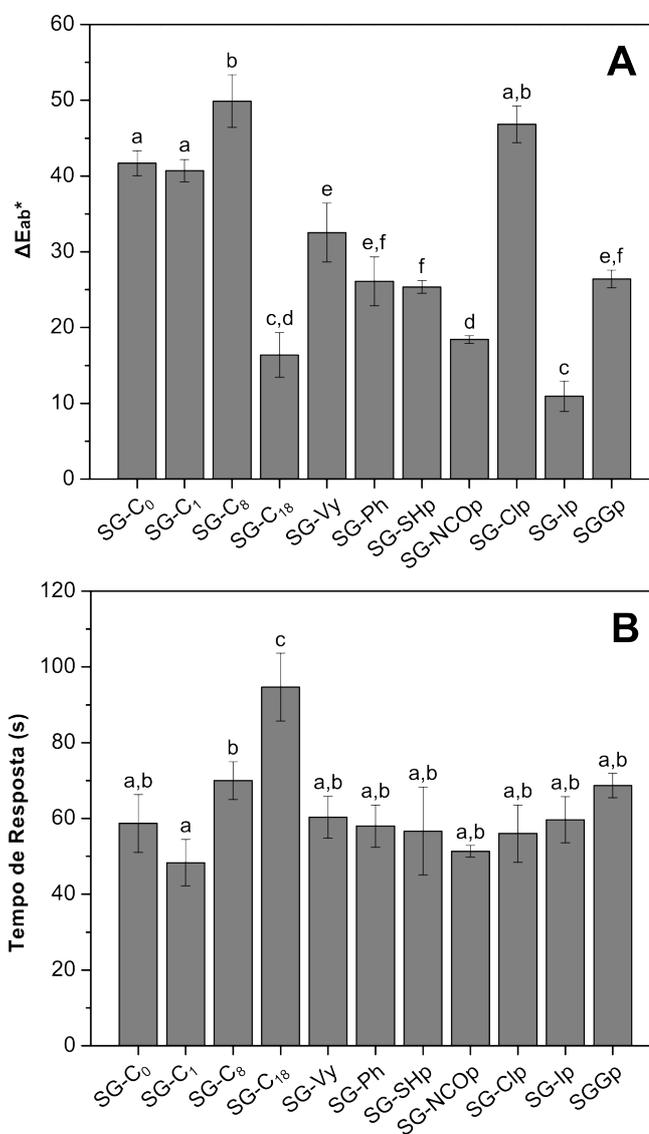
Para as demais amostras contendo diferentes grupos funcionais ligados a uma propila pode-se observar também a formação de partículas que parecem ser formadas por outras pequenas partículas de formato aproximadamente esférico. No caso dos materiais contendo os grupos NCOp e Ip também foi possível observar a liberação dessas pequenas nanopartículas de sua matriz de maior tamanho, como mostram as Figuras 5.12C e 5.12D, respectivamente. Além disso, é possível observar a menor porosidade dos materiais SG-NH<sub>2</sub>p e SG-Gp, confirmando os resultados obtidos usando porosimetria de nitrogênio.

### 5.1.5. EFEITO DO ORGANOSILANO NA RESPOSTA DOS SENSORES

Os sensores tiveram sua performance avaliada para resposta à presença de gás amônia. O teste foi executado em um frasco específico fechado e o tempo para mudança de coloração foi coletado por filmagem durante 5 minutos, conforme descrito no capítulo Materiais e Métodos. Antes e após a mudança de cor, as amostras foram submetidas a testes de quantificação de cor utilizando um sistema de medida cartesiano que traz como resposta a diferença de coloração antes e depois ( $\Delta E_{ab}^*$ ). Imagens do sensor antes e depois do contato com o gás amônia, bem como o valor de  $\Delta E_{ab}^*$  e tempo de resposta encontram-se na Tabela 5.8 e Figura 5.13A e 5.13B, respectivamente.

**Tabela 5.8:** Coloração dos sensores antes e após contato com gás amônia.

Sensor	Antes	Depois
SG-C <sub>0</sub>		
SG-C <sub>1</sub>		
SG-C <sub>8</sub>		
SG-C <sub>18</sub>		
SG-Vy		
SG-Ph		
SG-NH <sub>2</sub> p		-
SG-SHp		
SG-NCOp		
SG-Clp		
SG-Ip		
SG-Gp		



**Figura 5.13:** Resultados de performance dos diferentes sensores em termos de (A) mudança de cor ( $\Delta E_{ab}^*$ ) e tempo de resposta ( $p < 0,05$ ).

A amostra SG-NH<sub>2</sub>p não foi testada mediante a presença de gás amônia, uma vez que inicialmente já possuía a coloração lilás como mostra a Tabela 5.8.

A Figura 5.13A mostra que as amostras SG-C<sub>0</sub>, SG-C<sub>1</sub>, SG-C<sub>8</sub> e SG-Clp tiveram as maiores variações de coloração, sendo que SG-C<sub>1</sub> e SG-C<sub>8</sub> são estatisticamente diferentes. As menores variações ocorreram para SG-C<sub>18</sub>, SG-NCOp e SG-Ip, de forma que SG-C<sub>18</sub> e SG-Ip também são estatisticamente diferentes. Num grupo intermediário estão os demais materiais sintetizados, com exceção de SG-NH<sub>2</sub>p que não foi analisado. Além disso, os valores de  $\Delta E_{ab}^*$  mostram correlação significativa com o tempo de resposta ( $p < 0,01$ ). Foi possível identificar que quanto maior o  $\Delta E_{ab}^*$ , menor o tempo de resposta, ou seja, quanto maior a mudança, mais fácil e rápido também será de o olho reconhecer essa mudança.

A análise dos tempos de resposta (Figura 5.13B) mostra um grupo grande de amostras sem diferença significativa, denominado pelos índices a e b. O menor tempo de resposta encontrado, se destacando nesse grupo, foi para a amostra SG-C<sub>1</sub> e o maior para SG-C<sub>8</sub>. Além disso, o resultado menos satisfatório, com diferença significativa para esse grupo ocorreu para a amostra SG-C<sub>18</sub>, mostrando juntamente com o resultado do grupo anterior que as cadeias alifáticas longas apolares podem prejudicar a permeação do analito, nesse caso polar, na matriz. O tempo de resposta apresentou correlações ( $p < 0,01$ ) com o teor de indicador encapsulado e área específica, além do  $\Delta E_{ab}^*$  já mencionado. Em termos de teor de indicador, foi possível observar que quanto maior o teor de indicador encapsulado, mais rápida a mudança de cor foi detectada. Isso sugere que o analito atinge moléculas de indicador mais rapidamente, diminuindo o tempo de resposta de mudança de coloração, quando há maior quantidade delas na matriz. Já em relação à área específica, menores tempos foram obtidos para amostras de menor área, mostrando que as moléculas de corante podem estar mais acessíveis nesse caso. Áreas elevadas geralmente são geradas por materiais microporosos e o encapsulamento do elemento receptor (VA) nesses poros muito pequenos pode vir a dificultar o acesso do analito.

## 5.2. ANTIMICROBIANOS

Os compósitos com ação antibacteriana foram preparados pelo encapsulamento do antibiótico tetraciclina via rota sol-gel hidrolítica de catálise básica. Os materiais

resultantes também foram caracterizados por um conjunto de técnicas complementares descritas a seguir e a performance testada via incubação com bactérias: *Escherichia coli* (Gram -) e *Staphylococcus aureus* (Gram +). Amostras controle, sem a adição de tetraciclina, também foram avaliadas para fins de comparação.

### 5.2.1. EFEITOS DO ORGANOSILANO NO TEOR DE ANTIBIÓTICO ENCAPSULADO

O percentual de tetraciclina encapsulada foi avaliado indiretamente por espectroscopia no ultravioleta-visível do sobrenadante obtido a partir da precipitação das partículas. Os resultados encontram-se na Tabela 5.9. As amostras que indicam 100% de encapsulamento são aquelas que resultaram em um gel que não pôde ser precipitado para separação do sobrenadante. Para estes materiais optou-se pela secagem direta, ou seja, retendo totalmente o fármaco. Dessa forma, o valor não representa a habilidade de retenção do composto na rede sílica, apenas a quantidade presente. Para as demais amostras, as partículas foram precipitadas e lavadas com etanol.

De acordo com os resultados mostrados pela Tabela 5.9, o percentual do fármaco tetraciclina encapsulado teve uma ampla variação: de 20 % a 86 % do total de antibiótico adicionado. AM-C<sub>18</sub> e AM-NH<sub>2</sub>p foram as amostras com maior teor encapsulado entre aquelas que formaram partículas, com valores de 86,2 % e 80,1% respectivamente. O material produzido com o silano aminopropil também apresentou alto teor de encapsulamento no caso dos sensores. Isso mostra que, dependendo da aplicação, o uso desse precursor pode ser uma alternativa quando é necessário maiores teores da molécula encapsulada. Ainda dentre os materiais particulados, os menores valores de aprisionamento do antibiótico atingidos foram 28,2% para AM-C<sub>1</sub> e 20% para AM-SH. Como não foi possível avaliar o teor de encapsulamento em função do organosilano para todas as amostras, a observação de correlações fica prejudicada.

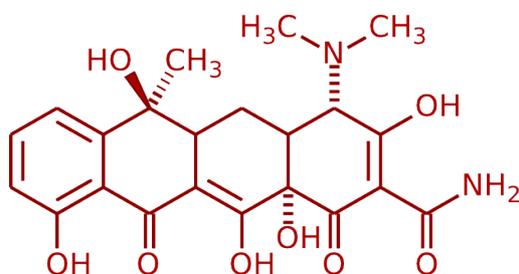
**Tabela 5.9:** Percentual de tetraciclina encapsulada nos materiais preparados com os diferentes organosilanos.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Encapsulado (%)</b>
<b>AM-C<sub>0</sub></b>	57,4
<b>AM-C<sub>1</sub></b>	28,2
<b>AM-C<sub>8</sub></b>	49,8
<b>AM-C<sub>18</sub></b>	86,2
<b>AM-V<sub>y</sub></b>	100*
<b>AM-Ph</b>	36,5
<b>AM-NH<sub>2</sub>p</b>	80,1
<b>AM-SHp</b>	20
<b>AM-NCOp</b>	44,9
<b>AM-Clp</b>	100*
<b>AM-Ip</b>	63,9
<b>AM-Gp</b>	100*

\* Materiais que formaram gel e conseqüentemente não foram lavados por centrifugação.

É discutido na literatura [48], e também observado como tendência para os sensores discutidos anteriormente, que a introdução de grupos orgânicos na rede de sílica auxilia na fixação de compostos orgânicos. Observa-se que grupos como o metil, por exemplo, podem vir a fazer uma espécie de compatibilização da molécula orgânica com a rede inorgânica de sílica. Esse comportamento tem como consequência o encapsulamento de um teor maior de indicador. Entretanto, é possível notar que diferentemente do caso dos sensores preparados por rota ácida, o encapsulamento não foi tão favorecido pela introdução dos grupos orgânicos. No caso da rota ácida, o material formado ocupa a totalidade do meio de reação formando um monolito. Isso faz com que a também praticamente a totalidade de composto a ser encapsulado tenha um contato mais íntimo com a matriz. Dessa forma, especula-se que no caso da formação das partículas na rota básica, isso seja uma influência da presença de uma grande quantidade de solvente. Ocorre que a TC está distribuída (solúvel) ao longo de todo o solvente, o qual corresponde à maior fração do meio reacional. Portanto, nem todo o composto adicionado tem uma interação tão significativa com a rede de sílica

favorecendo sua retenção. Além disso, quando comparado com o vermelho de alizarina, a molécula de tetraciclina é bem mais volumosa (Figura 5.14). Esse efeito estérico deve também influenciar o encapsulamento de forma a dificultá-lo, mesmo a TC apresentando um maior número de grupos funcionais para potenciais interações.



**Figura 5.14:** Estrutura da tetraciclina.

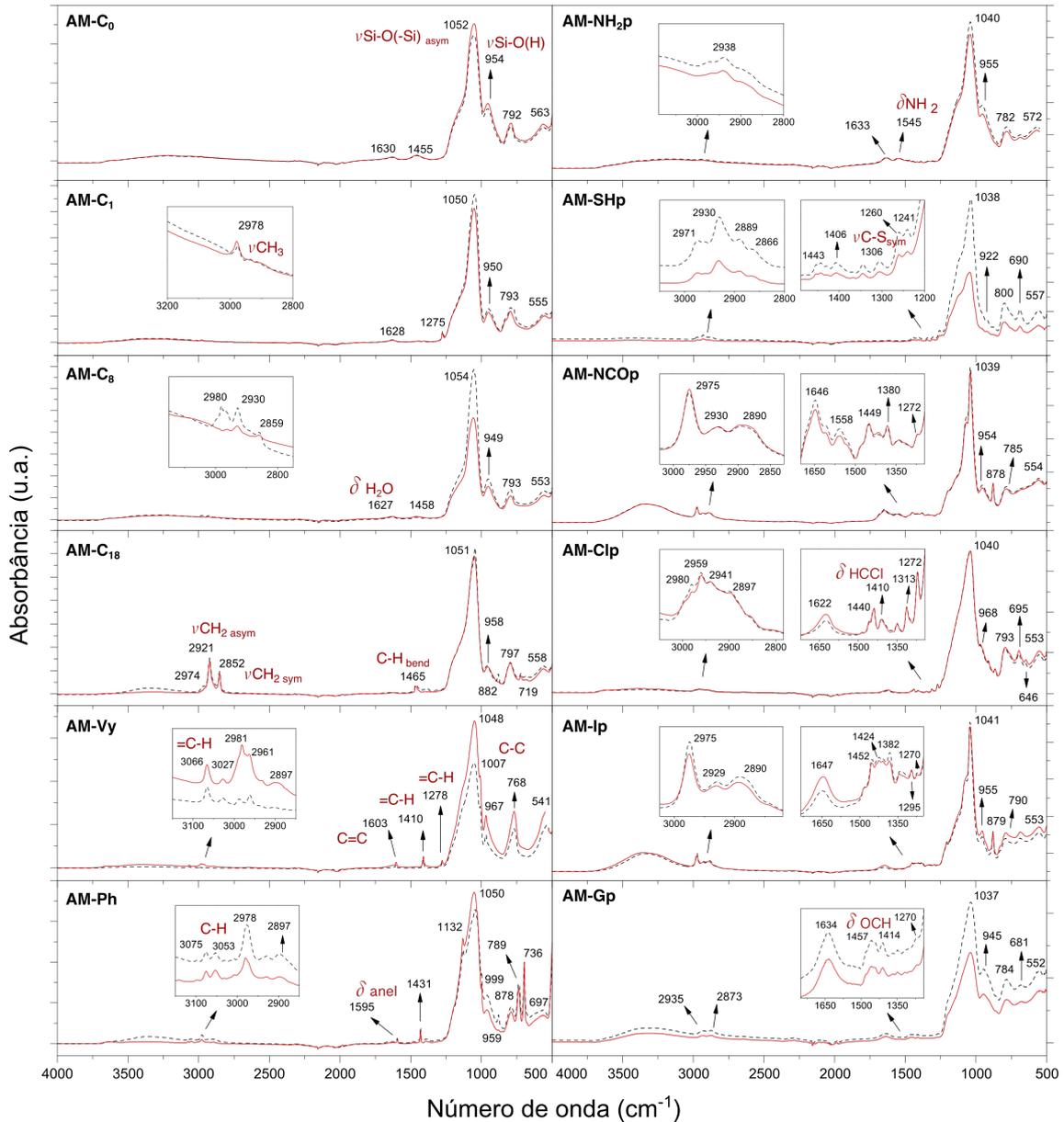
### 5.2.2. EFEITO DO ORGANOSILANO NAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E TEXTURAIS DOS ANTIMICROBIANOS

As propriedades estruturais e texturais das sílicas utilizadas como potencial material antimicrobiano foram investigadas empregando as técnicas de FTIR por reflectância total atenuada (ATR), porosimetria de nitrogênio (BET), potencial zeta e espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS).

O FTIR possibilitou a identificação de bandas referentes à própria sílica e também aos grupos orgânicos. O fármaco tetraciclina não foi identificado. Isso acontece devido à baixa concentração deste na sílica, à baixa sensibilidade da técnica (cujo limite de detecção gira em torno de 1 %) [111] e também ao fato de suas bandas mais intensas serem localizadas na região da banda de “impressão digital” da sílica, a qual é bastante intensa. Os espectros para os materiais contendo TC encapsulada e seus respectivos brancos encontram-se na Figura 5.15.

As principais bandas referentes à sílica ocorrem na região de 1250 a 700  $\text{cm}^{-1}$ . A banda principal com máximo em torno de 1050  $\text{cm}^{-1}$  é conhecida como “impressão digital” da sílica e é originada da vibração dos modos longitudinal e transversal do estiramento assimétrico da ligação Si-O(-Si) como já detalhado para os sensores. Os estiramentos Si-O(-H) em torno de 950  $\text{cm}^{-1}$ , o estiramento simétrico Si-O(-Si) em torno de 790  $\text{cm}^{-1}$  e a vibração *rock* de Si-O<sup>-</sup> em torno de 555  $\text{cm}^{-1}$  também foram observados.

As bandas largas referentes às vibrações O-H também apareceram no espectro, mas não foram assinaladas. Além disso, para a sílica não híbrida (AM-C<sub>0</sub>) foi possível identificar outras duas bandas, uma referente à água em  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1455\text{ cm}^{-1}$  que é geralmente atribuída à vibração do tipo *bending* de grupos C-H. Seu aparecimento pode ser decorrente de resíduos de etanol ainda presentes na amostra ou grupos etóxi não hidrolisados durante a síntese.



**Figura 5.15:** Espectros de infravermelho obtidos via FTIR para as sílicas híbridas utilizadas como antimicrobiano contendo tetraciclina encapsulada (—) e seu respectivo branco (- - -).

Para as sílicas AM-C<sub>1</sub>, AM-C<sub>8</sub> e AM-C<sub>18</sub> contendo os grupos alquila observou-se o estiramento das ligações C-H em torno de 2980 cm<sup>-1</sup> para o metil assimétrico, ~2930 cm<sup>-1</sup> para CH<sub>2</sub> também assimétrico e ~2855 cm<sup>-1</sup> para o modo simétrico de CH<sub>2</sub>. O modo *bending* das ligações C-H ocorreu em 1465 cm<sup>-1</sup> e modo *rock* em ~880 cm<sup>-1</sup> para CH<sub>3</sub> e ~720 cm<sup>-1</sup> para CH<sub>2</sub>. Para a amostra AM-Vy foram identificadas bandas para o ligante vinil para =C-H terminal em 3066 cm<sup>-1</sup>, 1410 cm<sup>-1</sup> e 1278 cm<sup>-1</sup>. A vibração característica de C=C ocorreu em 1603 cm<sup>-1</sup> e C-C em 1007 cm<sup>-1</sup>. Além disso, foram observadas bandas referentes à estiramentos C-H em CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> na região logo abaixo de 3000 cm<sup>-1</sup>. Isso indica que o grupo vinil pode ter reagido durante a síntese e/ou a presença de resíduos etanol/etóxi. Esse comportamento também foi observado para AM-Ph. Para tal amostra, a presença do anel fenílico foi observada em ~3050 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento C-H do anel, sua deformação em 1595 cm<sup>-1</sup> e demais modos vibracionais em 878 cm<sup>-1</sup> e 697 cm<sup>-1</sup>. O estiramento da ligação Si-C aparece em 1132 cm<sup>-1</sup> e C-C em 999 cm<sup>-1</sup>.

No caso dos materiais preparados com os organosilanos contendo o grupo propil e um grupo funcional observou-se os estiramentos referentes C-H na região logo abaixo de 3000 cm<sup>-1</sup> e também deformação do CH<sub>2</sub> em torno de 1440 cm<sup>-1</sup>. No caso das amostras AM-NCOp e AM-Gp foi observada uma banda referente ao estiramento C-H do metil bastante destacada, se comparada às demais. Isso indica que nesses casos ocorreu reação dos grupos isocianato e glicidoxi e novas espécies foram formadas. Para AM-NCOp foi possível identificar bandas em 1646 cm<sup>-1</sup> que pode indicar formação de C=O e 1558 cm<sup>-1</sup> que pode sugerir formação de CN-H. Para AM-Gp observou-se deformação O-C-H em 1457 cm<sup>-1</sup> e em 1414 cm<sup>-1</sup>, também descrita para os sensores. Para as demais amostras foi possível observar bandas referentes aos grupos adicionados. A deformação NH<sub>2</sub> foi observada em 1545 cm<sup>-1</sup> para AM-NH<sub>2</sub>p. O estiramento C-S ocorreu em 1306 cm<sup>-1</sup> e em 690 cm<sup>-1</sup> e o modo *wag* de S-CH<sub>2</sub> em 1241 cm<sup>-1</sup>. A amostra AM-Clp exibiu a deformação H-C-Cl em 1410 cm<sup>-1</sup> e o modo *wag* para o mesmo grupo em 1272 cm<sup>-1</sup>. Os estiramentos C-Cl apareceram em 695 cm<sup>-1</sup> para o átomo de cloro em *trans* e 646 cm<sup>-1</sup> para o átomo de hidrogênio em *trans* [108].

**5.2.2.1. RELAÇÕES DO ESPECTRO VIBRACIONAL COM A ESTRUTURA DE REDE DAS SÍLICAS UTILIZADAS COMO ANTIMICROBIANO**

Além da identificação da presença dos grupos funcionais, os espectros de infravermelho também foram usados para avaliação da estrutura da rede de sílica, de forma análoga àquela descrita para os sensores. Dessa forma, a banda relativa à impressão digital da sílica foi deconvoluída nos seus modos LO e TO para cada espectro. O percentual de anéis de seis membros siloxano (SiO)<sub>6</sub> foi calculado de acordo com a Equação 5.1 [101] levando em consideração a contribuição relativa de cada modo. Os resultados para as amostras de sílica híbrida contendo e não contendo (controle) o fármaco TC encapsulado são descritos na Tabela 5.10.

**Tabela 5.10:** Percentual de anéis com seis membros siloxano (SiO)<sub>6</sub> para os antimicrobianos calculado a partir da deconvolução dos espectros de FTIR obtidos por ATR.

Amostra	Anéis (SiO) <sub>6</sub> [%]	
	Controle	Antimicrobiano
AM-C <sub>0</sub>	40,2	39,8
AM-C <sub>1</sub>	12,5	10,8
AM-C <sub>8</sub>	12,8	70,1
AM-C <sub>18</sub>	13,7	12,4
AM-Vy	46,9	59,8
AM-Ph	9,7	7,3
AM-NH <sub>2</sub> p	15,8	19,3
AM-SHp	34,9	8,5
AM-NCOp	57,7	55,2
AM-Clp	11,0	78,7
AM-Ip	69,6	73,0
AM-Gp	25,2	46,2

Conforme citado anteriormente, as componentes LO e TO podem ter seus máximos e intensidades relativas alteradas com a adição de grupos orgânicos à rede [101]. Observando a Tabela 5.10 pode-se perceber uma ampla variação dos percentuais. Na maioria dos casos, houve um aumento ou pequena variação do percentual de anéis de seis membros com a adição da TC à síntese. Esse resultado também foi encontrado para o caso dos sensores. É possível também observar que as amostras preparadas com os grupos alquila (AM-C<sub>1</sub>, AM-C<sub>8</sub> e AM-C<sub>18</sub>) e também AM-Ph foram as que apresentaram os menores valores, com destaque para as amostras controle.

Outro resultado de acordo com aquele encontrado anteriormente para os sensores diz respeito ao volume do grupo orgânico empregado. Também, nesse caso, os grupos de maior volume apresentaram menores percentuais de (SiO)<sub>6</sub>. Esse resultado foi inclusive refletido pelo aparecimento de uma correlação significativa com  $p < 0,05$ . Entretanto, esse efeito é alavancado pelos resultados de AM-C<sub>18</sub>, que possui baixos percentuais e um volume bastante elevado em comparação aos demais grupos. Assim sendo, também para a rota hidrolítica utilizando catálise básica é observada a competição entre volume do silano, velocidade de reação e porosidade do material. É mostrado novamente que apesar do grande volume dos grupos e a necessidade de acomodação na rede, a velocidade mais lenta da reação favorece a formação dos anéis de quatro membros [6, 101].

#### **5.2.2.2. EFEITOS DO ORGANOSILANO NA MICROESTRUTURA DOS ANTIMICROBIANOS**

A microestrutura dos materiais antimicrobianos foi avaliada utilizando dados de área específica (BET), potencial zeta, tamanho e organização das nanopartículas (NPs). A área específica dos materiais foi medida pela técnica de porosimetria de nitrogênio. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 5.11 para as amostras contendo TC encapsulada e seus respectivos controles sem o fármaco.

Observando a Tabela 5.11 é possível notar que, de forma geral, ocorre uma diminuição da área específica quando a tetraciclina é adicionada. Esse comportamento também foi observado para o caso dos sensores. Como para esses materiais, a elevada área específica é decorrente da grande porosidade, esse resultado reflete a deposição do material encapsulado dentro dos poros do material. Exceções ocorreram para as

amostras AM-Vy, AM-Ph, AM-SHp, AM-Clp e AM-Gp. Para esses casos, o que provavelmente ocorre é uma diminuição do pH do meio em função do silano e mais, devido à adição da TC. Se essa alteração chega ao ponto de uma condição propícia tem-se a formação de rede gel porosa ao invés das partículas bem definidas.

**Tabela 5.11:** Áreas específicas dos materiais antimicrobianos e seu respectivos controles medidas por porosimetria de nitrogênio.

<b>Amostra</b>	<b>Área específica [m<sup>2</sup>/g]</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Antimicrobiano</b>
<b>AM-C<sub>0</sub></b>	215,9	185,2
<b>AM-C<sub>1</sub></b>	336,6	245,1
<b>AM-C<sub>8</sub></b>	223,1	137,4
<b>AM-C<sub>18</sub></b>	42,2	30,5
<b>AM-Vy</b>	519,3	613,9
<b>AM-Ph</b>	362,4	366,8
<b>AM-NH<sub>2</sub>p</b>	47,4	22,8
<b>AM-SHp</b>	66,5	94,0
<b>AM-NCOp</b>	98,2	70,9
<b>AM-Clp</b>	370,3	410,2
<b>AM-Ip</b>	435,9	370,9
<b>AM-Gp</b>	2,7	4,9

Comparando entre os diferentes grupos organosilano pode-se perceber claramente a diminuição da área específica com o aumento do volume do organosilano. Essa constatação é ratificada estatisticamente por uma correlação significativa com  $p < 0,01$ . Isso decorre de os grupos orgânicos também bloquearem os poros superficiais, seja por sua presença no interior destes ou mesmo na superfície devido ao grande volume. A amostra AM-Gp apresentou uma área excepcionalmente baixa e esse comportamento também foi observado para os sensores. Por fim, foi identificada uma correlação significativa ( $p < 0,05$ ) com o percentual de anéis (SiO)<sub>6</sub>. Para aquelas amostras com maior percentual de anéis mais abertos e menos tensionados também foram detectadas maiores áreas específicas.

O potencial zeta, que fornece uma indicação da carga superficial residual das partículas, foi estudado em função da possibilidade de interação eletrostática com a membrana superficial das bactérias. Esses organismos possuem carga residual negativa, de forma que materiais com carga oposta poderiam ser mais eficientes se atraídos para liberação do fármaco mais próximo à membrana [112]. Com essa técnica observaram-se mudanças de carga residual na partícula em função do ligante empregado e os resultados estão resumidos na Tabela 5.12.

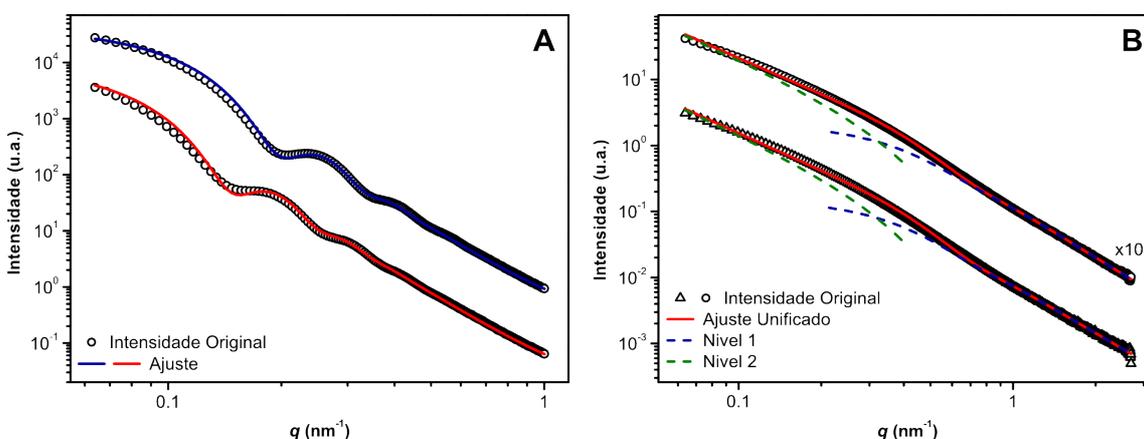
**Tabela 5.12:** Potencial zeta dos materiais antimicrobianos calculado pelo modelo de Smoluchowski a partir da mobilidade eletroforética.

<b>Amostra</b>	<b>Potencial Zeta [mV]</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Com TC</b>
<b>AM-C<sub>0</sub></b>	-30,9	-15,0
<b>AM-C<sub>1</sub></b>	-15,1	-19,2
<b>AM-C<sub>8</sub></b>	-18,3	-19,8
<b>AM-C<sub>18</sub></b>	-12,0	-9,5
<b>AM-Vy</b>	-13,8	-12,7
<b>AM-Ph</b>	-12,3	-12,3
<b>AM-NH<sub>2</sub>p</b>	20,6	23,7
<b>AM-SHp</b>	-33,4	-34,1
<b>AM-NCOp</b>	-14,7	-17,5
<b>AM-Clp</b>	-22,0	-19,4
<b>AM-Ip</b>	28,4	30,2
<b>AM-Gp</b>	33,8	22,8

A sílica pura AM-C<sub>0</sub> branco sem TC encapsulada possui um potencial bastante negativo de -30,9 mV, de forma que valores próximos também são reportados pela literatura [113]. Quando a TC é adicionada, o potencial é deslocado para -15 mV. Isso mostra que a presença da TC interagindo apenas com os grupos silanóis da sílica leva a um aumento do potencial. Quando os organosilanos foram adicionados à síntese houve também aumento no potencial, com exceção da amostra AM-SHp. Para AM-NH<sub>2</sub>p, AM-Ip e AM-Gp, o potencial foi deslocado para valores positivos atingindo 20,6 mV,

28,4 mV e 33,8 mV, respectivamente. Quando a TC foi adicionada às sílicas híbridas, houve tanto aumento, quanto diminuição do potencial. A análise estatística não revelou nenhuma correlação significativa, mostrando que os efeitos de mudança do potencial são dependentes do organosilano em si, e não de outra característica do material.

Além do potencial zeta, o tamanho e estrutura das partículas também podem ser importantes para a ação como antimicrobiano. Dependendo do tamanho e forma, uma nanopartícula pode ser mais ou menos efetiva e/ou tóxica, inclusive para seres humanos [114, 115]. Assim sendo, a técnica de SAXS foi empregada para investigação do tamanho e estrutura dos materiais. A rota de partida (AM-C0) foi preparada de forma a obter nanopartículas para esse sistema e o mesmo preparo foi mantido para todos os sistemas. Entretanto, dois tipos de estruturas foram encontradas: NPs esféricas bem definidas e géis formados por uma rede reticulada, como mostram os diferentes perfis das curvas de SAXS na Figura 5.16. Isso mostra o quanto o organosilano pode alterar as reações de hidrólise e condensação, podendo haver até mesmo a formação de gel em presença de catalisador básico.



**Figura 5.16:** Curvas representativas dos dois diferentes perfis de SAXS encontrados para os antimicrobianos. (A) Nanopartículas de sílica em AM-C<sub>0</sub> com (vermelho) e sem tetraciclina (azul). (B) Gel de sílica em AM-Vy com ( $\Delta$ ) e sem tetraciclina (O).

A Figura 5.16A mostra as curvas para AM-C<sub>0</sub> com e sem TC encapsulada e representa o perfil típico encontrado para NPs esféricas. As oscilações observadas são características de fator de forma de esfera e observa-se que no caso da amostra contendo TC (vermelha) tem-se oscilações mais achatadas e deslocadas para a menores valores de  $q$  (esquerda). Esse comportamento indica que a adição do fármaco aumentou o raio e a

polidispersão das partículas formadas em relação ao controle sem fármaco. Esse mesmo tipo de perfil foi encontrado também para as amostras AM-C<sub>1</sub>, AM-C<sub>8</sub>, AM-C<sub>18</sub>, AM-NH<sub>2</sub>p e AM-NCOp. Já a Figura 5.16B, que traz as curvas para a amostra AM-Vy com e sem TC encapsulada, representa o perfil de espalhamento para os géis de sílica. Esse perfil é semelhante ao encontrado para o caso dos sensores, de forma que a principal diferença ocorre na inclinação em baixo ângulo. No caso dos géis, a lei de potências mostra um valor menor, refletindo a estrutura menos densa da rede ainda contendo o solvente e a ausência de interface amostra/ar. Diferentemente das NPs, as curvas do gel com e sem o fármaco encapsulado são bastante semelhantes. As demais amostras que apresentaram esse tipo de curva foram: AM-Ph, AM-SHp, AM-Clp, AM-Ip e AM-Gp. Entretanto, as amostras AM-Ph, AM-SHp e AM-Ip não formaram um gel durante a síntese e sim partículas precipitadas. Isso pode ocorrer devido ao tamanho das partículas exceder a escala da medida, fazendo com que seu fator de forma não seja detectado.

Os resultados de ajuste das curvas de SAXS é mostrado na Tabela 5.13. No caso dos géis foi possível determinar também os valores da Leis de Potências que trazem informações sobre a estrutura fractal do material, como descrito anteriormente. Dentre as NPs, observa-se aumento do raio com a adição da TC para AM-C<sub>0</sub> e AM-C<sub>8</sub> e diminuição para das demais. Comparando os organosilanos com grupo alquila, pode-se perceber que o raio das partículas tende a aumentar com o aumento da cadeia carbônica. Para o caso dos géis, tem-se valores em torno de 3,3 nm a 4,3 nm entre as amostras sem TC e uma variação bem mais ampla de 1,2 nm a 4,5 nm quando o fármaco é adicionado.

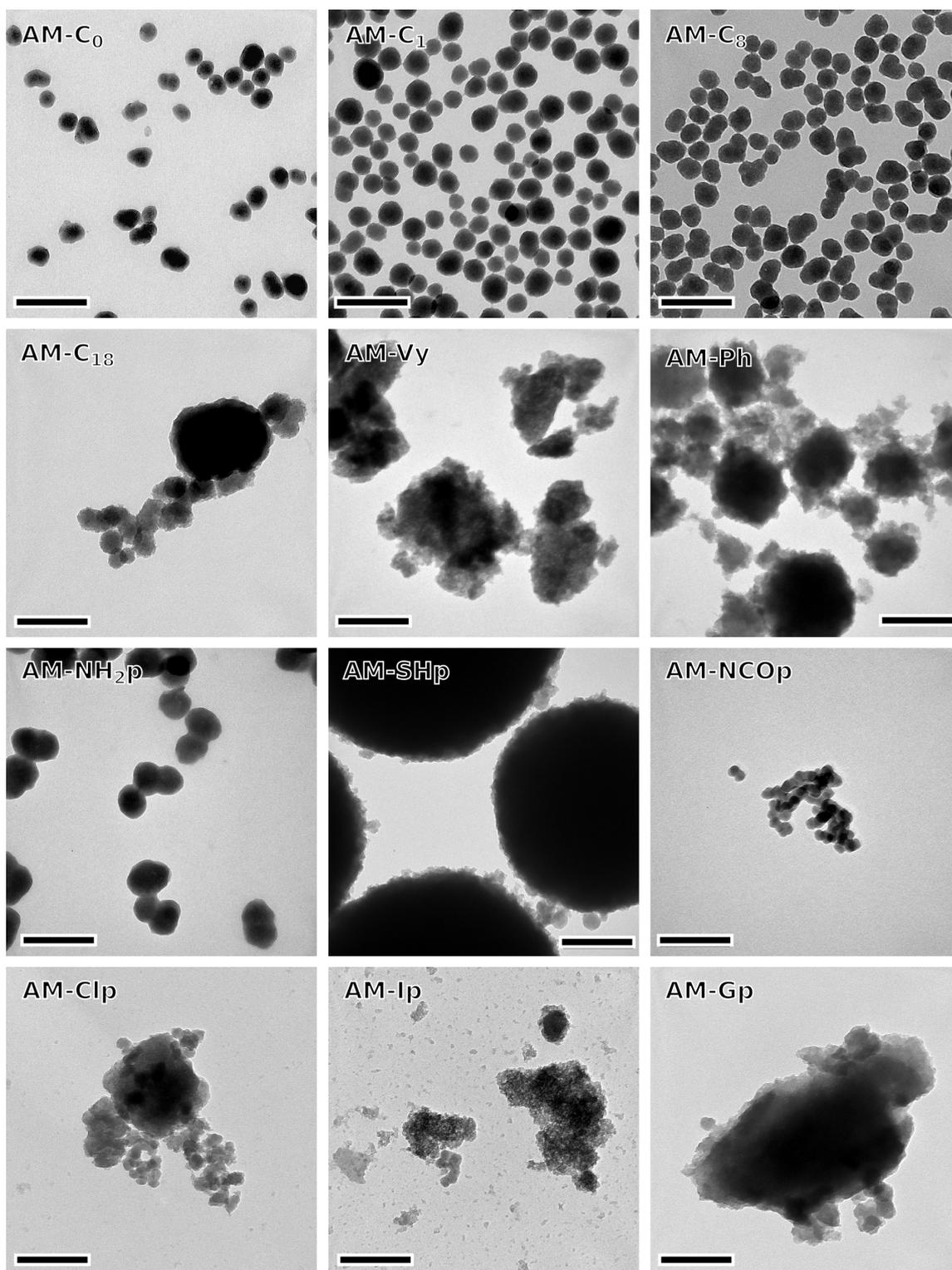
Já os valores de P<sub>2</sub> mostram que os géis formam estruturas do tipo fractal de massa, com exceção de AM-Gp. A adição da TC aumenta a inclinação da curva, indicando que uma estrutura mais densa é formada em sua presença. A análise estatística revela correlações significativas apontando que quando o valor de P<sub>2</sub> é menor, as áreas específicas e também o percentual de anéis de seis membros são maiores. Isso relaciona o resultado de estrutura com uma rede mais aberta com maior área específica e rede formada por anéis siloxano maiores.

**Tabela 5.13:** Raio das nanopartículas e raio de giro das partículas primárias dos géis formados com os diferentes organossilanos e tetraciclina.

<b>Amostra</b>	<b>Raio [nm]</b>		<b>Lei de Potências [P<sub>2</sub>]</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Com TC</b>	<b>Controle</b>	<b>Com TC</b>
<b>AM-C<sub>0</sub></b>	21,7	29,0	-	-
<b>AM-C<sub>1</sub></b>	19,4	16,9	-	-
<b>AM-C<sub>8</sub></b>	18,3	33,4	-	-
<b>AM-C<sub>18</sub></b>	76,8	41,8	-	-
<b>AM-Vy</b>	4,1	4,2	1,78	1,92
<b>AM-Ph</b>	3,3	1,2	2,32	3,21
<b>AM-NH<sub>2</sub>p</b>	58,7	41,6	-	-
<b>AM-SHp</b>	4,3	3,4	2,08	2,47
<b>AM-NCOp</b>	9,4	7,4	-	-
<b>AM-Clp</b>	3,7	4,5	2,18	1,74
<b>AM-Ip</b>	4,1	3,7	1,94	2,29
<b>AM-Gp</b>	3,8	1,5	3,34	3,46

### 5.2.3. EFEITO DO ORGANOSILANO NAS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS DOS MATERIAIS ANTIMICROBIANOS

A fim de investigar de forma complementar a morfologia dos materiais antimicrobianos preparados, fez-se uso da técnica de microscopia de transmissão eletrônica (TEM). As imagens para as 12 amostras contendo TC encapsulada são mostradas na Figura 5.17. Corroborando com as análises de SAXS, as imagens mostram as nanopartículas formadas para as amostras AM-C<sub>0</sub>, AM-C<sub>1</sub>, AM-C<sub>8</sub>, AM-C<sub>18</sub>, AM-NH<sub>2</sub>p e AM-NCOp e as partículas disformes provenientes dos fragmentos do monólito formado a partir dos géis para AM-Vy, AM-Clp, AM-Ip e AM-Gp. Além disso, observam-se partículas esféricas grandes rodeadas de pequenas e partículas envoltas de uma estrutura disforme semelhante aos géis para AM-Ph e AM-SHp, respectivamente.



**Figura 5.17:** Microscopia eletrônica de transmissão dos antimicrobianos sintetizados com os diferentes organossilanos. Barra de escala de 200 nm.

Observando imagens para AM-C<sub>0</sub>, AM-C<sub>1</sub> e AM-C<sub>8</sub> pode-se notar a existência de uma polidispersão no tamanho das partículas. O raio relatado anteriormente pela técnica de SAXS é o raio médio que retrata a maior parte da população. Para AM-C<sub>1</sub> é

possível notar um domínio de dois tamanhos de partículas, enquanto que para AM-C<sub>0</sub> e AM-C<sub>8</sub> há algumas partículas mais disformes. Para AM-C<sub>18</sub>, tem-se partículas aparentando bordas menos definidas e também grandes partículas. Em AM-NH<sub>2</sub>p também observam-se partículas bem definidas, porém de maior tamanho quando comparada àquelas de sílica pura e derivadas dos alquilsilanos. Já AM-NCO<sub>p</sub> apresenta partículas com formato aproximadamente esférico, aglomeradas e muito pequenas, resultado também observado por SAXS.

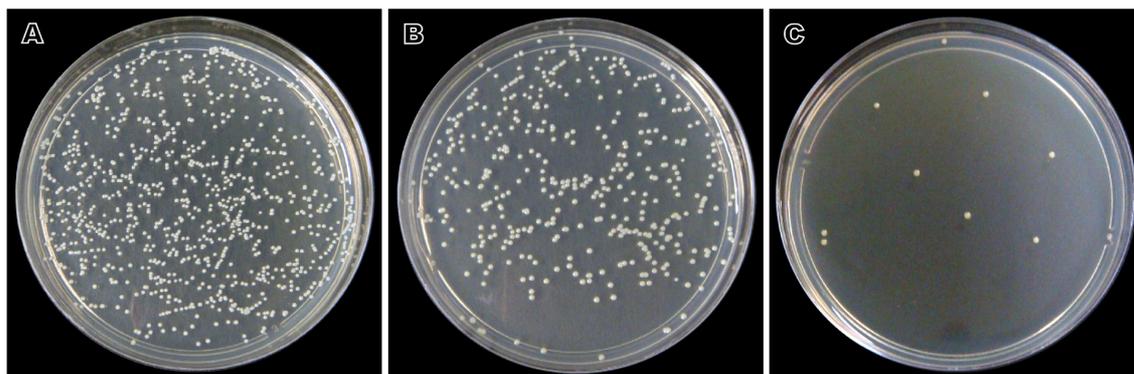
Para as amostras que formaram um gel ao invés das partículas precipitadas pode-se observar as partículas disformes. Elas têm esse formato pois foram secas formando um monolito que foi então moído a um pó fino. É possível observar partículas e seus pequenos fragmentos para esses materiais. Além disso, as imagens mostram que os materiais possuem uma grande porosidade, com exceção de AM-Gp. Por fim, as imagens de TEM revelaram as grandes diferenças de morfologia devido aos diferentes organosilanos. Utilizando exatamente o mesmo procedimento obtiveram-se nanopartículas, partículas grandes e géis que formaram monolitos porosos ou não.

#### **5.2.4. EFEITO DO ORGANOSILANO NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A vantagem da aplicação de fármacos encapsulados é a sua liberação controlada e ao longo tempo no organismo ao contrário do uso de antibióticos puros que tem sua concentração total agindo logo após administração. Essa liberação controlada faz com que uma concentração alvo do fármaco seja mantida por mais tempo, portanto a dose total administrada pode ser menor e menor quantidade será excretada para o ambiente. Dessa forma, o uso de menores doses de antibiótico auxiliam no problema da geração de bactérias resistentes [3, 116].

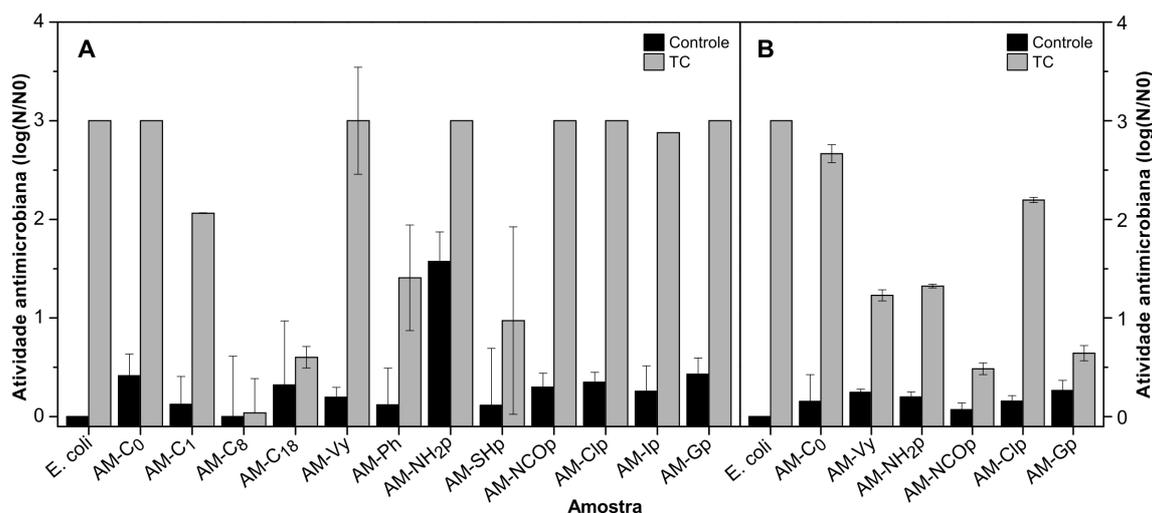
Assim sendo, os materiais antimicrobianos tiveram sua performance testada contra as bactérias Gram negativa *Escherichia coli* e Gram positiva *Staphylococcus aureus*. Os testes foram realizados por incubação do material com as bactérias conforme descrito anteriormente. Foram realizados sempre quatro testes em paralelo: um controle contendo somente a bactéria, um contendo TC livre, a sílica híbrida sem TC e a sílica híbrida com TC. Após a incubação, cada amostra foi diluída e espalhada em placas de ágar para crescimento e posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), como mostrado na Figura 5.18. O controle de crescimento da bactéria (Figura 5.18A)

apresenta sempre um número maior de colônias por se tratar da bactéria crescendo livre de qualquer interferência. Quando a sílica sem TC é adicionada, a proliferação é em geral um pouco menor como representa a Figura 5.18B. Quando a sílica com TC encapsulada é adicionada, poucas ou nenhuma colônia são formadas (Figura 5.18C). Já para TC livre ocorre morte completa das bactérias na concentração utilizada.



**Figura 5.18:** Exemplo das placas utilizadas para contagem de unidades formadoras de colônia nos testes de atividade antimicrobiana. (A) Controle da bactéria *E. coli*, (B) na presença de AM-C<sub>0</sub> sem TC (branco) e (C) AM-C<sub>0</sub> contendo TC encapsulada.

A incubação foi realizada para todas as amostras e a contagem foi representada de forma normalizada como  $\log (N/N_0)$ , onde  $N$  é o número de colônias da contagem para cada material normalizado para  $N_0$  igual a 1000 (controle). Os resultados encontram-se nas Figuras 5.19 para bactéria *E. coli* e Figura 5.20 para *S. aureus* e mostram boa efetividade do material desenvolvido. No caso dos materiais que ocasionaram morte completa das bactérias ( $\log (N/N_0) = 3$ ), um novo teste foi realizado em concentração inferior (3 vezes menor) a fim de melhor avaliar o comportamento bactericida dos materiais.

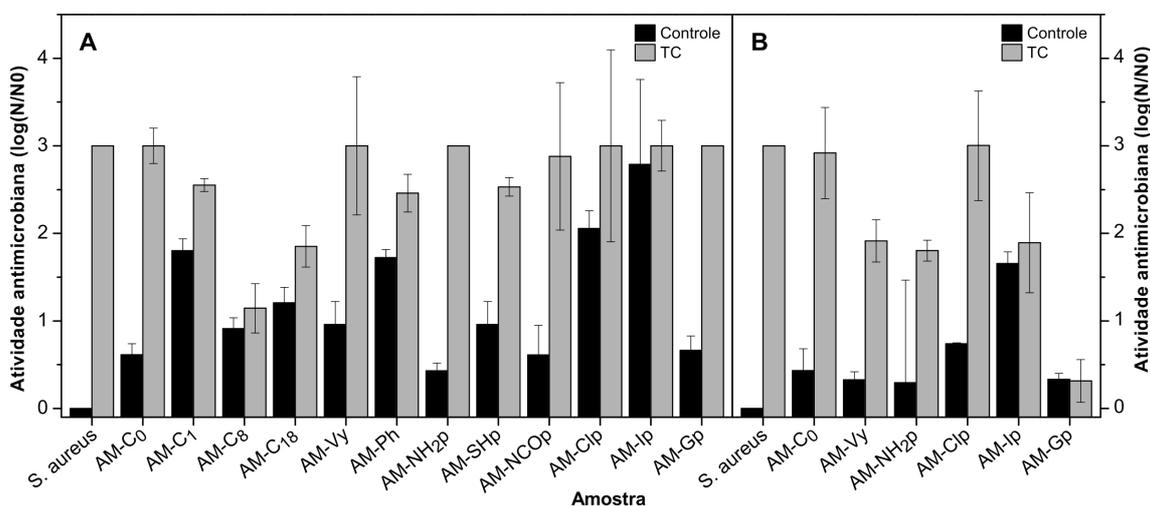


**Figura 5.19:** Atividade antimicrobiana das diferentes sílicas híbridas contra a bactéria *E. coli*. As barras representam a eficiência dos materiais como  $\log(N/N_0)$  onde  $N$  é o número de colônias sobreviventes normalizado para  $N_0$  que representa o número de bactérias do controle. (A) Concentração de tetraciclina de  $17,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e (B) concentração de tetraciclina de  $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A Figura 5.19, que traz os resultados para *E. coli*, mostra que a bactéria tem boa tolerância ao material sem TC (barras pretas), uma vez que um efeito antimicrobiano acentuado foi observado apenas para AM-NH<sub>2</sub>p. Para aquelas contendo TC (barras vermelhas), as amostras AM-C<sub>0</sub>, AM-Vy, AM-NH<sub>2</sub>p, AM-NCOp, AM-Clp e AM-Gp apresentaram o melhor desempenho, matando todas as bactérias. Um estudo empregando menor concentração de TC foi realizado para então avaliar as diferenças entre essas amostras (Figura 5.19B). Esse segundo ensaio revelou que os melhores desempenhos ocorreram para AM-C<sub>0</sub>, AM-Clp, AM-NH<sub>2</sub>p e AM-Vy. Além disso, observando a Figura 5.19A é possível notar que os grupos alifáticos de cadeia mais longa, AM-C<sub>8</sub> e AM-C<sub>18</sub>, exibiram uma performance bem abaixo dos demais materiais. Esse resultado está relacionado principalmente com a dificuldade de solubilidade dos materiais contendo as grandes cadeias alifáticas e também com a pior interação das partículas com a camada peptidoglicana<sup>11</sup> da membrana bacteriana. Essa camada da parede é não lipídica e, provavelmente, é o sítio de maior interação entre a bactéria e as partículas de sílica [117].

<sup>11</sup> Camada de heteropolissacarídeos ligado a peptídeos que está presente na membrana celular de seres procariontes.

A análise estatística de correlação entre as características dos materiais e os resultados de atividade antimicrobiana mostram que o volume dos grupos ( $p < 0,05$ ), a concentração de TC ( $p < 0,05$ ) e o percentual anéis (SiO)<sub>6</sub> obtido por FTIR ( $p < 0,01$ ) apresentaram correlações significativas com a atividade. O efeito de concentração mostrou que quanto maior o percentual de TC encapsulada, mais efetivo é o material, apesar da quantidade de NPs adicionada ter sido calculada mantendo a mesma concentração do antibiótico. Isso pode refletir em uma liberação do fármaco mais eficaz pelas partículas que contém mais tetraciclina encapsulada do que as que a retiveram menos. Já a correlação com os anéis siloxano mostra que quanto maior o percentual de (SiO)<sub>6</sub>, mais eficiente foi o material. Esse resultado também pode ser efeito de uma liberação da TC mais eficiente quando encapsulada em uma rede com anéis maiores.



**Figura 5.20:** Atividade antimicrobiana das diferentes sílicas híbridas contra a bactéria *S. aureus*. As barras representam a eficiência dos materiais como  $\log(N/N_0)$  onde  $N$  é o número de colônias sobreviventes normalizado para  $N_0$  que representa o número de bactérias do controle. (A) Concentração de tetraciclina de  $17,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e (B) concentração de tetraciclina de  $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A Figura 5.20 apresenta os resultados para a bactéria *S. aureus*, indicando que esta se mostrou mais sensível ao tratamento com os materiais estudados. Isso pode ser observado pelo comportamento da bactéria quando exposta tanto aos controles, quanto àqueles materiais contendo TC encapsulada. No caso da *S. aureus*, seis diferentes amostras tiveram efeito bactericida máximo na concentração usada: AM-C<sub>0</sub>, AM-Vy, AM-NH<sub>2</sub>p, AM-Clp, AM-Ip e AM-Gp. Novamente, elas foram então submetidas a um

teste em menor concentração, revelando o desempenho acentuado de AM-C<sub>0</sub> e AM-Clp (Figura 5.20B). Além disso, foi possível observar bom efeito antimicrobiano para as amostras controle AM-Ip e AM-Clp, mostrando que a presença dos halogenados pode vir a contribuir nessa função. As bactérias Gram positivas e Gram negativas diferem principalmente em sua membrana. No caso da bactéria Gram positiva existe uma camada mais espessa de peptidoglicanos, dando à célula maior rigidez e proteção [118]. Entretanto, especula-se que essa camada possa vir a facilitar a interação com as partículas de sílica também por seus grupos silanol. Dessa forma, a bactéria *S. aureus* poderia ser mais eficientemente eliminada pela liberação do fármaco diretamente mais próximo à sua parede, a qual facilita a interação/aproximação das partículas de sílica. Isso resultaria num aumento de concentração local do antibiótico, e portanto, na maior eficiência da função antimicrobiana. Novamente observou-se os piores desempenhos para AM-C<sub>8</sub> e AM-C<sub>18</sub>, reforçando a hipótese de perda de solubilidade e interação com a membrana da bactéria.

Por fim, dentre as correlações significativas que relacionam as características dos materiais e sua atividade antimicrobiana contra bactérias *S. aureus*, são destacadas novamente o volume dos grupos ( $p < 0,05$ ) e o percentual de anéis (SiO)<sub>6</sub> ( $p < 0,01$ ), similar à bactéria *E. coli*, além da área específica ( $p < 0,01$ ). Essa última mostra que quanto maior a área específica, maior a atividade. O que ocorre provavelmente é também uma facilitação da liberação do antibiótico, tornando o material mais eficiente. Além disso, apesar de não apresentar valor de correlação significativa, constatou-se que todas as partículas com potencial zeta positivo, figuraram entre os materiais com melhor desempenho. Isso mostra que a interação eletrostática também pode ser importante para esse processo.

### 5.3. CATALISADORES DE POLIMERIZAÇÃO

Os catalisadores de polimerização foram preparados pelo encapsulamento do composto metalocênico ativo cloreto de (bisciclopentadienil)zircônio (Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>) via rota sol-gel não hidrolítica em atmosfera inerte. Essa rota utiliza TEOS e SiCl<sub>4</sub> como precursores e FeCl<sub>3</sub> como catalisador e a reação ocorre sem presença de água. Os sólidos obtidos foram caracterizados por um conjunto de técnicas complementares e sua performance foi testada frente à polimerização de etileno em presença do co-catalisador

metilaluminoxano (MAO). Novamente, o mesmo procedimento foi utilizado para todas com os diferentes organosilanos. Entretanto, nesse caso, três amostras não sofreram processo de gelificação: os catalisadores empregando aminopropiltriétoxissilano (CP-NH<sub>2</sub>p), mercaptopropiltrimetoxissilano (CP-SHp) e isocianatopropiltriétoxissilano (CP-*Ip*). Eles foram mantidos em aquecimento durante um longo período (4 semanas) e a síntese também foi repetida sem sucesso. Portanto, apenas oito organosilanos e além da sílica não híbrida foram estudadas para essa aplicação. Amostras controle, sem a presença do metaloceno Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, também foram estudadas para efeitos de comparação.

### 5.3.1. EFEITOS DO ORGANOSILANO NO PERCENTUAL DE Zr PRESENTE

Para os catalisadores, o percentual de Zr reportado refere-se ao total adicionado na síntese. As diferenças encontradas são então reflexo da massa total de material formada e não da habilidade de retenção do composto, uma vez que não houve nenhum tipo de lavagem para retirada da fração não encapsulada. A Tabela 5.14 traz os percentuais medidos utilizando a técnica de ICP OES após digestão dos catalisadores.

**Tabela 5.14:** Percentual de zircônio presente em cada catalisador preparado com os diferentes organosilanos.

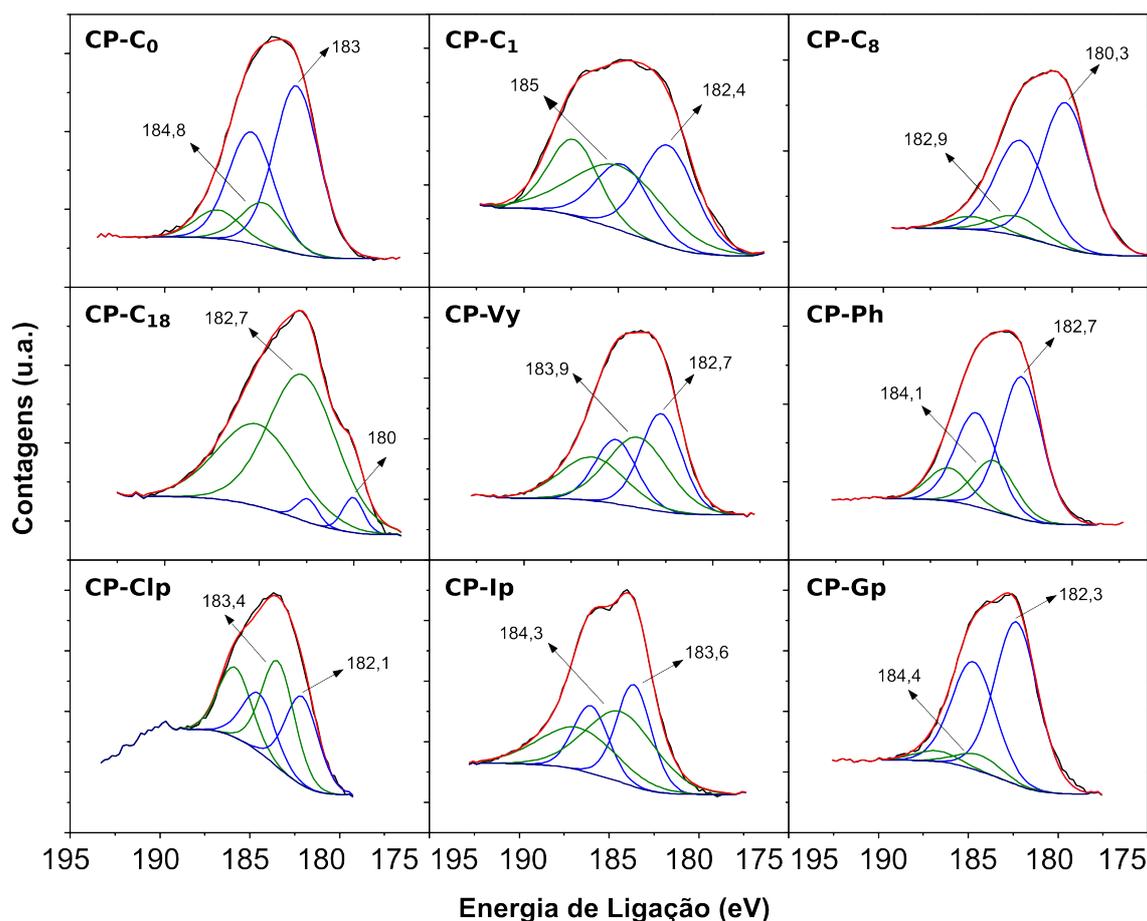
<b>Catalisador</b>	<b>Teor de Zr (%)</b>
<b>CP-C<sub>0</sub></b>	3,54
<b>CP-C<sub>1</sub></b>	2,47
<b>CP-C<sub>8</sub></b>	1,14
<b>CP-C<sub>18</sub></b>	2,53
<b>CP-Vy</b>	2,56
<b>CP-Ph</b>	2,12
<b>CP-Clp</b>	2,41
<b>CP-<i>Ip</i></b>	2,02
<b>CP-Gp</b>	3,07

Os resultados revelam valores variando entre 1,1 a 3,5 % do metal Zr em massa, com valor em torno de 2,5 % como média. O valor mais baixo mostra uma síntese com maior rendimento em massa, levando a uma menor concentração do catalisador e vice-versa para os valores maiores. Mesmo esse valor não refletindo uma habilidade do organosilano empregado, ele foi medido e é importante para avaliação da performance como catalisador em termos de atividade, bem como nas características dos polímeros obtidos.

### **5.3.2. EFEITO DO ORGANOSILANO NA ESTRUTURA DO CATALISADOR ENCAPSULADO**

O efeito do organosilano sobre a espécie catalítica zircônio foi explorado utilizando a técnica de espectroscopia fotoelétrica de raios X. Essa análise se torna importante pois pode auxiliar na investigação do comportamento e propriedade dos materiais gerados com cada catalisador. Dessa forma, o número de espécies e a energia de ligação de cada espécie de Zr presente foi determinada e poderá ser relacionada posteriormente com a atividade catalítica e com as características dos polímeros obtidos. A região entre 175 eV e 195 eV em que se observa Zr 3d<sup>5/2</sup> e Zr 3d<sup>3/2</sup> foi deconvoluída e os resultados são mostrados na Figura 5.21.

A Figura 5.21 mostra que os catalisadores apresentaram duas espécies diferentes de Zr, as quais possuem diferentes cargas eletrônicas sobre elas. Para a amostra não híbrida CP-C0 observou-se valores de 183 eV e 184,8 eV, enquanto que Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> em sua forma livre apresenta o sinal 182,4 eV para Zr 3d<sup>5/2</sup> e 184,8 eV para Zr 3d<sup>3/2</sup>. De uma forma geral, foi possível observar um deslocamento para menores valores de energia quando o organosilano foi adicionado, mostrando que eles possuem maior densidade eletrônica se comparado à sílica não híbrida. A única exceção encontrada foi para CP-1p na espécie com maior densidade eletrônica e CP-C1 para aquela mais catiônica.



**Figura 5.21:** Espectro de fotoelétrons de raios X de alta resolução (XPS) na região de Zr 3d<sup>5/2</sup> e 3d<sup>3/2</sup> para os catalisadores de polimerização e as respectivas energias de ligação para cada espécie.

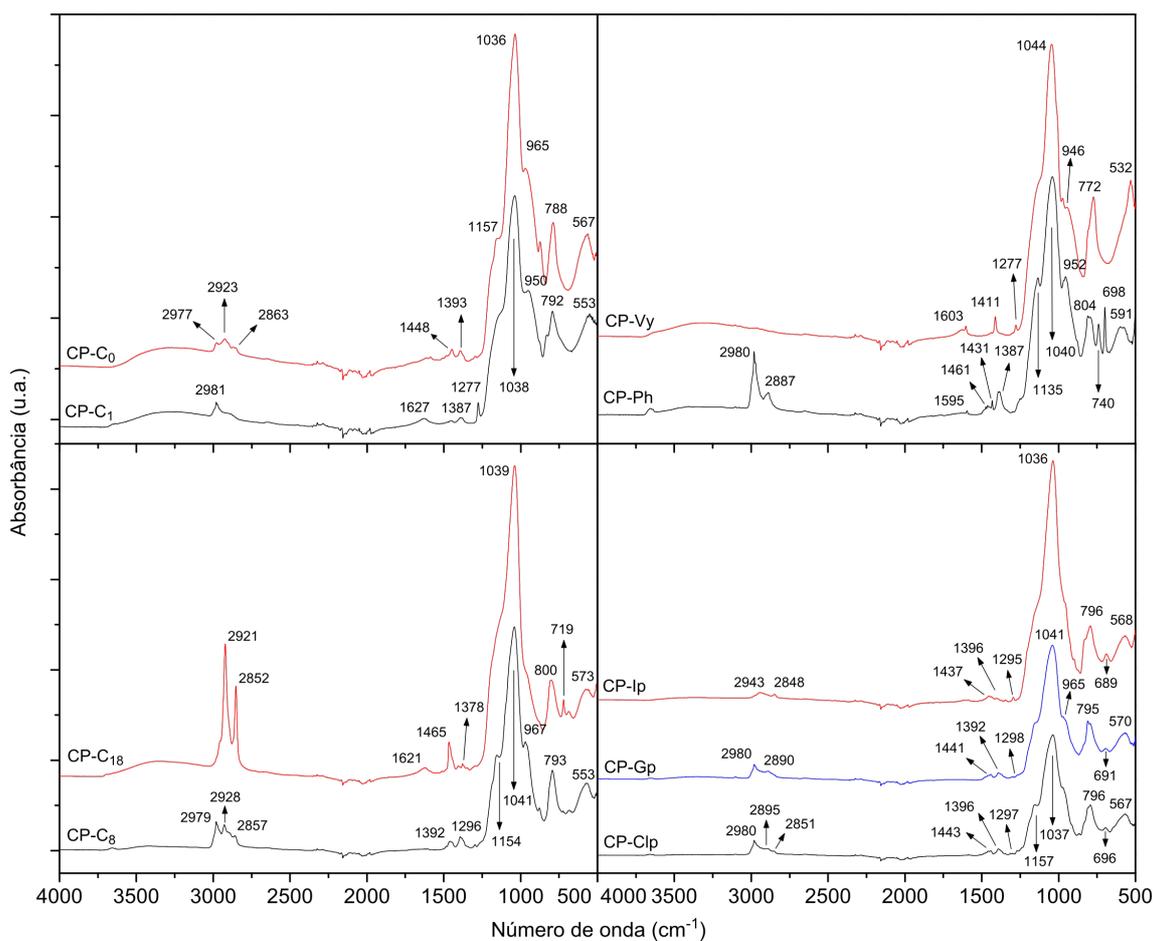
A energia de ligação para as espécies também teve variação em função do organossilano empregado. Os valores médios ocorreram em torno de 182 eV para a espécie com maior carga eletrônica e 182-185 eV para a mais catiônica. Além dos deslocamentos de energia, observou-se também mudanças no formato dos picos. CP-C<sub>18</sub> foi uma das amostras que apresentou formato de pico diferenciado e energia muito semelhantes a CP-C<sub>8</sub>. A amostra CP-C<sub>8</sub> também teve o pico inteiro deslocado para menores valores de energia, mostrando que nesse caso o Zr está com maior densidade eletrônica positiva. Esse resultado foi refletido nas análises estatísticas de correlação, mostrando que na presença dos grupos de grande volume, nesse caso, os grupos alquil: octil e ocatadecil, levaram a uma diminuição da energia de ligação do Zr. CP-C<sub>1</sub> apresentou a curva bem larga, mostrando uma diferença mais acentuada entre as duas espécies de Zr presentes.

### 5.3.3. EFEITO DO ORGANOSILANO NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E TEXTURAIS DOS CATALISADORES

Novamente, as características estruturais e texturais foram avaliadas com o emprego das técnicas de espectroscopia vibracional FTIR-ATR, porosimetria de nitrogênio e espalhamento SAXS. Os espectros de FTIR são mostrados na Figura 5.22 e auxiliaram na identificação dos grupos orgânicos. Além disso, foi possível observar bandas referentes ao anel ciclopentadienila do  $\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2$ . Isso ocorre pois a concentração adicionada do composto a ser encapsulado foi maior, chegando a valores em torno de 3%.

As bandas referentes aos estiramentos de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  apareceram na mesma região identificada para os sensores e antimicrobianos:  $\sim 2980\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu\text{CH}_3$  assimétrico,  $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu\text{CH}_2$  assimétrico e  $\sim 2860\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu\text{CH}_2$  simétrico. Essas bandas foram novamente destacadas para o caso do material preparado com octadecilsilano (CP- $\text{C}_{18}$ ). Além disso, a vibração tipo *bending* de C-H ocorreu na região de  $1440\text{-}1465\text{ cm}^{-1}$  conforme também observado anteriormente. As mesmas vibrações também foram identificadas para a rede de sílica:  $\nu\text{Si-O(Si)}$  assimétrico em  $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu\text{Si-O(Si)}$  simétrico em  $\sim 790\text{ cm}^{-1}$  e Si-O<sup>-</sup> rock na região de  $550\text{-}570\text{ cm}^{-1}$  [108].

A diferenciação para o FTIR dos catalisadores ficou por conta da identificação de bandas referente ao composto encapsulado  $\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2$ , o que não foi possível para os demais casos. O estiramento das ligações C-C do anel Cp puderam ser observados em torno de  $1390\text{ cm}^{-1}$  e também em alguns casos como uma pequena banda/ombro em torno de  $1150\text{ cm}^{-1}$  se sobrepondo à banda dominante Si-O(Si) da sílica. Já a deformação no plano das ligações C-H do anel Cp ocorre em torno de  $970\text{ cm}^{-1}$  e aparece confundida com o estiramento Si-O(H) que nesse caso é menos intensa em função de ser uma rota não hidrolítica. Os grupos hidroxila formados ocorrem provavelmente após a retirada do material da atmosfera inerte por reação com a umidade do ambiente. Por fim, em alguns casos, foi possível observar a deformação de C-H fora do plano em torno de  $700\text{ cm}^{-1}$  [108, 119].



**Figura 5.22:** Espectros de FTIR-ATR para os catalisadores contendo  $Cp_2ZrCl_2$  encapsulado nas diferentes sílicas híbridas.

### 5.3.3.1 RELAÇÕES DO ESPECTRO VIBRACIONAL COM A ESTRUTURA DE REDE DE SÍLICA

A estrutura de rede foi determinada de forma similar aos materiais estudados nas aplicações anteriores. O percentual de anéis contendo seis membros siloxano  $(SiO)_6$  foi obtido pela Equação 5.1. A Tabela 5.15 apresenta os resultados para os catalisadores e seus respectivos controles. Assim, como os demais materiais, os percentuais variaram amplamente na faixa de 11 a 76 %. Diferentemente das demais rotas empregadas para síntese dos materiais utilizando os organossilanos, a rota não hidrolítica apresentou, de modo geral, uma diminuição do percentual de  $(SiO)_6$  quando o composto a ser encapsulado foi adicionado. As exceções foram os materiais CP-Vy e as pequenas variações de CP-C<sub>8</sub> e CP-C<sub>18</sub>.

**Tabela 5.15:** Percentual de anéis com seis membros siloxano (SiO)<sub>6</sub> para os catalisadores de Zr calculado a partir da deconvolução dos espectros de FTIR obtidos por ATR.

Amostra	Teor de Anéis (SiO) <sub>6</sub> (%)	
	Controle	Catalisador
CP-C <sub>0</sub>	56,7	16,0
CP-C <sub>1</sub>	38,4	16,6
CP-C <sub>8</sub>	21,3	24,5
CP-C <sub>18</sub>	11,4	16,1
CP-Vy	34,2	65,4
CP-Ph	76,6	18,3
CP-Clp	52,4	6,9
CP-Ip	51,8	20,5
CP-Gp	70,1	76,6

Os menores valores foram observados para CP-C<sub>18</sub> e CP-Clp na presença do catalisador. Novamente, as amostras com grupos volumosos exibiram percentuais mais baixos, a qual foi também identificada por uma correlação significativa inversa ( $p < 0,01$ ) com o volume do precursor organosilano. Mais uma vez observa-se que o efeito de formação dos anéis mas estáveis termodinamicamente são formados para os precursores mais volumosos. Isso reforça que, nesse caso, as reações que levam à formação da rede de sílica são mais lentas, possibilitando a formação das espécies (SiO)<sub>4</sub>.

### 5.3.3.2 EFEITOS DO ORGANOSILANO NA MICROESTRUTURA DOS CATALISADORES

A microestrutura dos catalisadores foi investigada também utilizando as técnicas de porosimetria de nitrogênio e espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS). Os valores para área específica determinada pelo método BET estão resumidos na Tabela 5.16 para os diferentes catalisadores e seus controles. Observando-se essa tabela, é possível notar que, de forma geral, os teores estão mais abaixo daqueles encontrados

para os demais materiais preparados por outras rotas. Mesmo com os baixos valores, pode-se observar que esses decrescem com a adição do catalisador, confirmando a hipótese já proposta de encapsulamento do composto nos poros da rede de sílica.

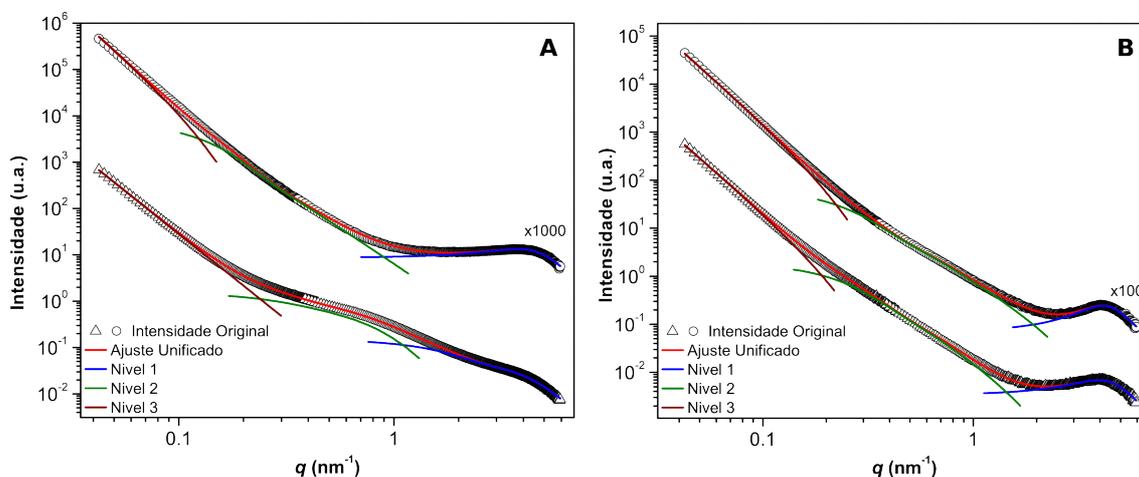
**Tabela 5.16:** Áreas específicas (BET) dos catalisadores e controles medidas por porosimetria de nitrogênio.

Amostra	Área específica [m <sup>2</sup> /g]	
	Controle	Catalisador
CP-C <sub>0</sub>	590	2,77
CP-C <sub>1</sub>	482	0,38
CP-C <sub>8</sub>	2,14	0,55
CP-C <sub>18</sub>	1,00	1,11
CP-Vy	0,74	0,75
CP-Ph	294	0,72
CP-Clp	52	0,72
CP-Ip	0,95	1,03
CP-Gp	1,00	0,53

Além disso, pode-se observar pelo comportamento de CP-C<sub>0</sub>, a grande influência da adição dos grupos orgânicos volumosos e/ou molécula a ser encapsulada sobre a área específica detectada. Em se tratando de catalisadores para polimerização de olefinas, a área específica é bastante importante. Uma das principais limitações impostas pela baixa área específica é uma potencial dificuldade de acesso da olefina aos sítios ativos metálicos durante o processo de polimerização. Isso tanto é uma realidade que sílicas comerciais de aplicação para esse tipo de catálise possuem valores de área específica bastante elevados, em torno de 230 a 250 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> [120].

Uma investigação mais aprofundada da microestrutura, avaliando a formação e agregação das partículas primárias dos catalisadores foi realizada utilizando a técnica de SAXS. Dessa forma, foi possível observar que quase todos os materiais sintetizados utilizando a rota não hidrolítica apresentaram forte correlação entre as partículas. Esse tipo de correlação identificada por SAXS significa que o espalhamento das partículas primárias sofre efeito da presença das partículas vizinhas. Dessa forma, é possível

determinar uma distância média e também um número médio de vizinhos para essas partículas. A Figura 5.23 traz o exemplo de curvas típicas para os catalisadores e seus controles.



**Figura 5.23:** Exemplos de curvas de SAXS para os catalisadores CP-C<sub>0</sub> e CP-IP com (○) e sem (△) Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> encapsulado.

Observando a Figura 5.23 é possível observar que, de modo geral, os catalisadores apresentaram uma estrutura hierárquica composta de 3 níveis de organização dentro da escala de medida. Esse comportamento de organização em estruturas hierárquicas já foi observado em estudos anteriores para óxidos mistos e auxiliou a explicar o desempenho de atividade dos catalisadores [59]. Além disso, nota-se que a presença do Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> na síntese pode influenciar fortemente essa estrutura como mostra a comparação entre as curvas de CP-C<sub>0</sub> e seu controle. Já para a amostra CP-IP esse fenômeno não foi observado. Os resultados da modelagem das curvas para todas as amostras utilizando o modelo unificado encontram-se nas Tabelas 5.17 e 5.18. Rg<sub>1</sub> representa o raio de giro das partículas primárias; P<sub>2</sub> representa a dimensão fractal do segundo nível de acordo com a classificação já descrita: 1 < P < 3 fractal de massa e 3 < P < 4 fractal de superfície; Rg<sub>2</sub> é raio de giro das partículas do segundo nível; P<sub>3</sub> é a dimensão fractal do terceiro nível.

**Tabela 5.17:** Resultados de SAXS para raio de giro ( $R_{g1}$ ), distância de correlação e número de vizinhos das partículas primárias no primeiro nível de organização.

Sensor	$R_{g1}$ [nm]		Distância de Correlação [nm]		Número de Vizinhos	
	Controle	Catalisador	Controle	Catalisador	Controle	Catalisador
<b>CP-C<sub>0</sub></b>	0,56	0,40	-	1,16	-	2,21
<b>CP-C<sub>1</sub></b>	0,38	0,22	1,13	1,31	2,60	1,82
<b>CP-C<sub>8</sub></b>	0,37	0,39	1,57	1,45	3,28	3,62
<b>CP-C<sub>18</sub></b>	0,42	0,44	-	-	-	-
<b>CP-Vy</b>	0,44	0,50	1,01	1,06	3,60	2,92
<b>CP-Ph</b>	0,25	0,22	1,30	1,45	2,22	2,62
<b>CP-Clp</b>	0,40	0,33	1,18	1,11	2,33	2,36
<b>CP-Ip</b>	0,33	0,32	1,27	1,30	3,15	3,85
<b>CP-Gp</b>	0,35	0,24	1,67	1,24	2,28	2,16

**Tabela 5.18:** Resultados para lei das potências dos segundo ( $P_2$ ) e terceiro ( $P_3$ ) níveis de organização e raio e giro para o segundo nível ( $R_{g2}$ ).

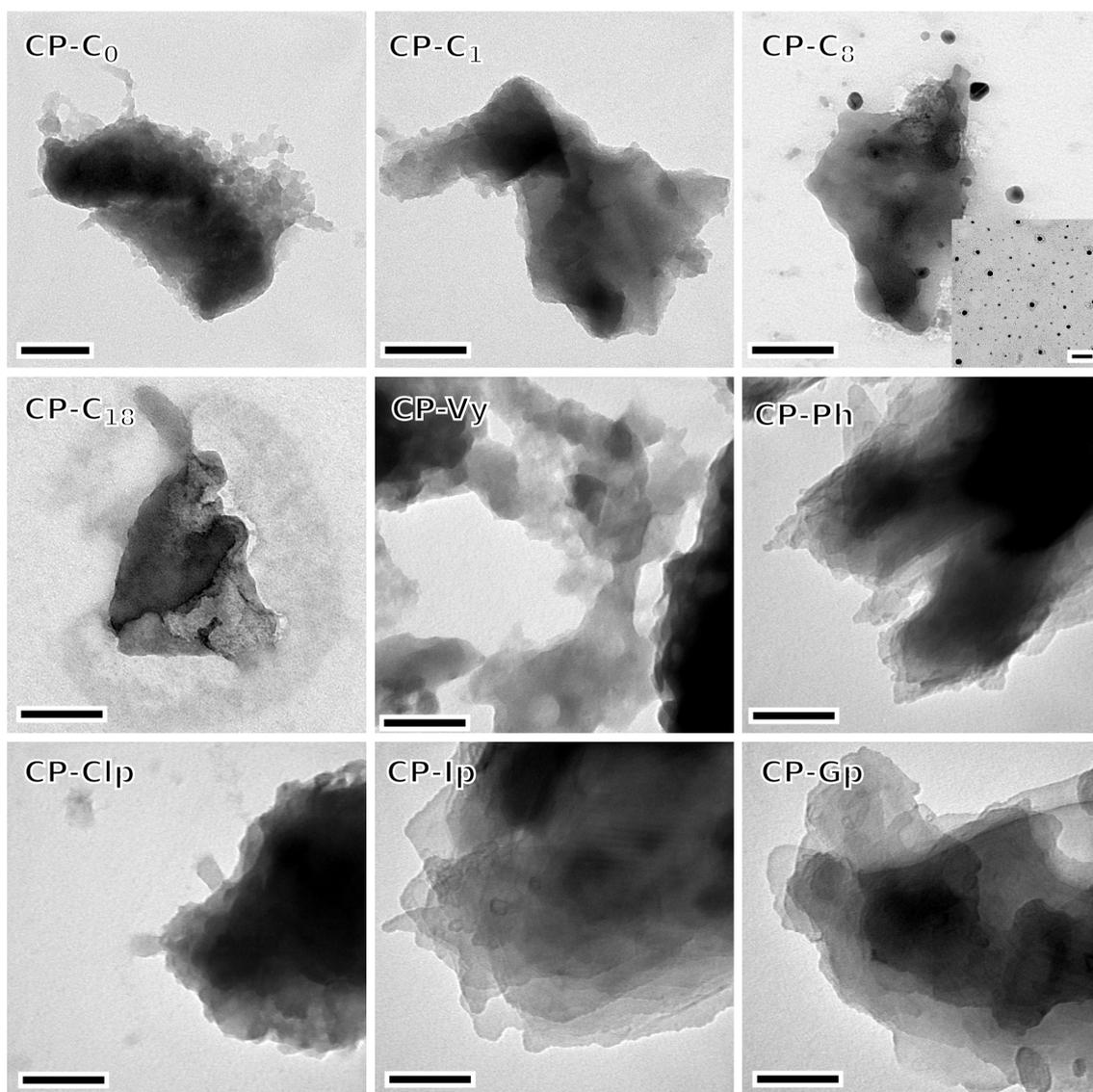
Sensor	$P_2$		$R_{g2}$ [nm]		$P_3$	
	Controle	Catalisador	Controle	Catalisador	Controle	Catalisador
<b>SG-C<sub>0</sub></b>	2,05	3,21	3,62	14,36	3,65	3,96
<b>SG-C<sub>1</sub></b>	3,40	3,60	9,33	7,25	3,71	3,80
<b>SG-C<sub>8</sub></b>	2,89	3,13	10,15	8,14	3,76	3,73
<b>SG-C<sub>18</sub></b>	2,46	3,44	7,68	12,33	3,74	3,83
<b>SG-Vy</b>	3,32	3,44	11,14	6,86	3,70	3,69
<b>SG-Ph</b>	3,73	3,80	-	7,17	-	3,75
<b>SG-Clp</b>	3,77	3,07	-	6,97	-	3,79
<b>SG-Ip</b>	3,15	2,62	8,89	7,64	3,78	3,85
<b>SG-Gp</b>	3,84	3,09	-	9,09	-	3,80

Uma vez que a análise de SAXS nos resulta uma série de diferentes parâmetros, novamente lançou-se mão do uso da análise de correlação de Pearson para avaliação das tendências entre os diferentes parâmetros e características analisados. Tanto a distância de correlação quanto o número de vizinhos das partículas primárias foram influenciados pelo volume e concentração de Zr nas amostras. Quanto maior o volume dos grupos orgânicos utilizados, maior foi a distância entre os centros de partículas vizinhas, mas também maior foi o número de vizinhos observados. A distância entre os centros é mais influenciada pelo volume dos grupos ( $p < 0,01$ ) do que pela concentração de catalisador ( $p < 0,05$ ). Já para o número de vizinhos, observa-se comportamento oposto ( $p < 0,05$  para o volume dos grupos e  $p < 0,01$  para concentração de Zr). Além disso, amostras com maiores raios de giro apresentam também maior número de vizinhos ( $p < 0,01$ ) e menor distância centro-centro entre as partículas ( $p < 0,05$ ). A análise do  $R_g$  também mostra ( $p < 0,01$ ) que partículas maiores se organizam em estruturas fractais ( $P_2$ ) menos densas no nível seguinte (mais rugosas para fractais de superfície e menos ramificadas para os de massa).

Os valores de  $R_{g2}$ , referentes ao raio de giro das partículas do segundo nível, mostraram uma correlação forte ( $p < 0,01$ ) com a concentração de Zr. A relação mostra que quanto maior o percentual de Zr na amostra, maior foi o  $R_{g2}$ . Isso pode indicar que o  $Cp_2ZrCl_2$  adicionado pode estar sendo aprisionado entre as partículas primárias, formando uma partícula secundária de maior tamanho. Por fim, valores mais altos de  $P_3$  exibem maiores teores de Zr, indicando que partículas mais densas e de superfície menos rugosa são então formadas no terceiro nível.

#### **5.3.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS**

As propriedades morfológicas dos catalisadores foram investigadas utilizando microscopia eletrônica de transmissão (TEM) similar aos sensores e antimicrobianos. As imagens resultantes para os catalisadores sintetizados com os diferentes organosilanos encontram-se na Figura 5.24 e mostram diferentes características entre si.



**Figura 5.24:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para os catalisadores de polimerização. Barra de escala de 100 nm.

A amostra Cp-C<sub>0</sub> apresenta partículas que aparentam ser compostas de outras partículas ainda menores que se aglomeram. Esses resultados são similares ao que se observa por SAXS. Com a adição dos organosilanos observa-se uma mudança no sentido de desaparecimento dessas pequenas partículas. Para CP-C<sub>1</sub> já é possível observar uma estrutura mais inteiriça com menor número de pequenas partículas agregadas. Para CP-C<sub>8</sub> foi possível observar uma grande quantidade de nanopartículas e também partículas disformes semelhantes a CP-C<sub>1</sub>. Para CP-C<sub>18</sub> observou-se apenas partículas disformes e que sofriam decomposição no feixe, provavelmente devido ao alto conteúdo de carbono. CP-Vy apresentou também partículas disformes com diferentes espessuras. CP-Ph, CP-Ip e CP-Gp apresentaram morfologia que aparenta

uma sobreposição de camadas, como uma série de placas empilhadas. Por fim, CP-Clp tem também as partículas disformes derivadas do monólito sendo composta de partículas muito pequenas. Entretanto, nesse caso elas aparentam serem mais disformes e não tão definidas se comparadas à CP-C0.

### **5.3.5. EFEITO DO ORGANOSILANO NA ATIVIDADE DE POLIMERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DOS POLÍMEROS**

A rota não hidrolítica tem sido empregada principalmente para o preparo de óxidos mistos utilizados na área de catálise de diversas reações [121, 122]. Em nosso grupo, esses óxidos mistos têm sido estudados na polimerização de olefinas [58, 60, 61]. Dessa forma, utilizou-se o conhecimento prévio para estudar a polimerização de olefinas utilizando os materiais híbridos à base de sílica preparados por essa mesma rota. As características analisadas para os catalisadores foram em grande parte comum com os sensores e antimicrobianos. Entretanto, a análise de performance é, nesse caso, qualificada pela atividade catalítica e pelas propriedades do polímero obtido. São elas a massa molar numérica média ( $M_n$ ), massa molar ponderal média ( $M_w$ ), polidispersão ( $PD = M_w/M_n$ ), medidas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). As curvas de GPC também foram deconvoluídas para avaliar as diferentes cadeias que compõem o polímero. Por fim, a cristalinidade e temperatura de amolecimento ( $T_m$ ), obtidas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), também foram avaliadas. Os resultados de atividade, cristalinidade,  $T_m$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  e PD são mostrados pelos gráficos da Figura 5.25.

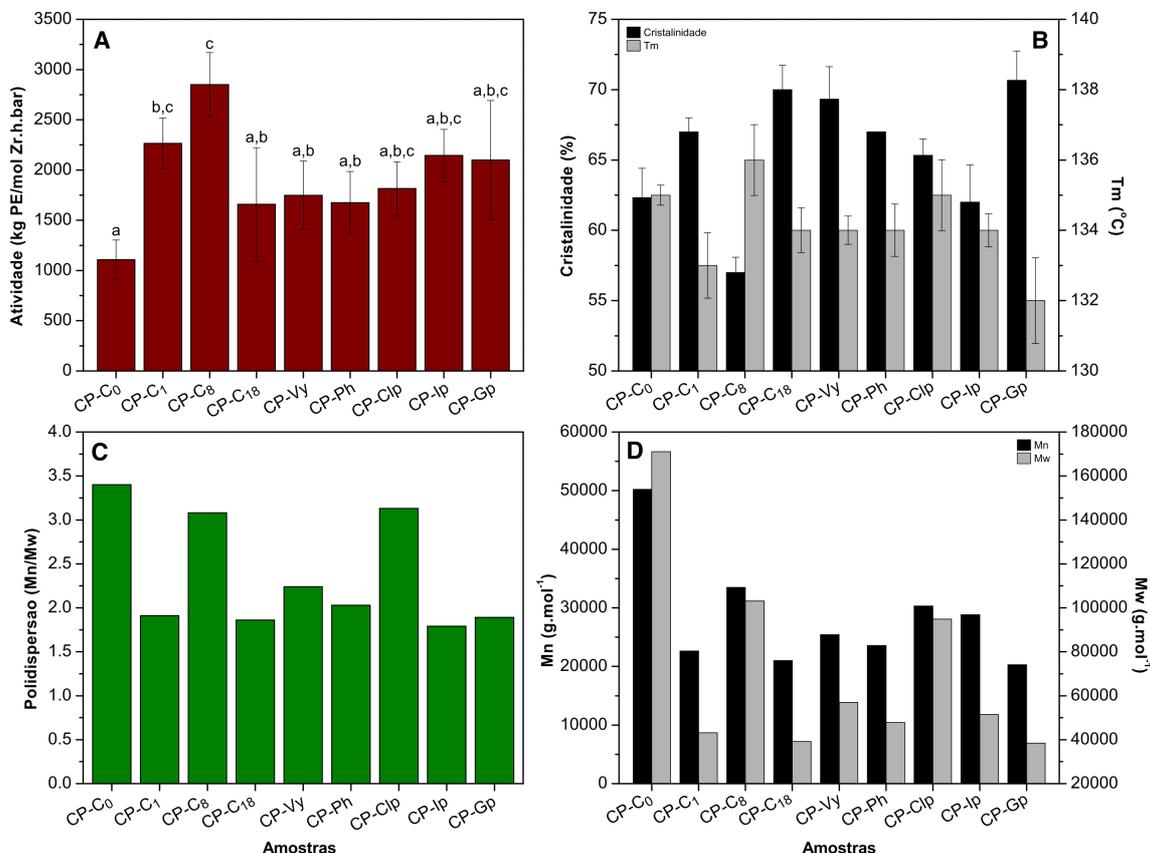
A Figura 5.25A traz os resultados de atividade de polimerização em termos de kg de polietileno formado por mols de Zr multiplicado pelo tempo e pressão. Os valores variaram numa faixa de 1100 a 2500 kgPE/molZr.p.h. Pode-se observar que os resultados podem ser agrupados em três diferentes grupos. CP-C<sub>0</sub> teve a menor atividade, mas estatisticamente se equivale aos demais catalisadores com exceção de CP-C<sub>1</sub> e CP-C<sub>8</sub>. Essas duas últimas apresentaram as melhores performances, sendo que a atividade mais elevada CP-C<sub>8</sub> ainda se equivale a CP-Clp, CP-Ip e CP-Gp. Esses resultados mostram que o uso de organosilanos pode auxiliar no aumento de atividade de catalisadores de polimerização. Especula-se que esses grupos orgânicos podem auxiliar na difusão do monômero na rede de sílica além de proteger os sítios ativos.

Dessa forma, o processo de catálise poderia se manter um tempo mais longo, aumentando a atividade do sistema em questão. A literatura que investiga o uso de híbridos como suporte para catalisadores metallocenos descreve que a atividade é aumentada quando o suporte possui sua acidez elevada devido às modificações da rede. Isso levaria a um aumento da estabilidade dos sítios catalíticos e portanto maior atividade [123, 124]. Resultados da literatura mostram que os valores de atividades para esses sistemas encontram-se em uma faixa intermediária entre o resultados para o metalloceno homogêneo ( $\sim 3000 \text{ kg}_{\text{pol.}} \cdot \text{mol}_{\text{Zr}}^{-1}$ ) e ele suportado ( $\sim 1300 \text{ kg}_{\text{pol.}} \cdot \text{mol}_{\text{Zr}}^{-1}$ ) [92].

A análise de correlação Pearson mostrou que a atividade tende a ser menor quando o raio giro das partículas secundárias ( $R_{g2}$ ) é menor. Anteriormente, observou-se também que o  $R_{g2}$  é maior para maior teores de Zr ( $p < 0,01$ ), indicando aprisionamento dentro dessas partículas do segundo nível. Dessa forma, a correlação encontrada para a atividade pode sugerir que esse aprisionamento possa vir a dificultar o acesso aos sítios ativos de Zr, diminuindo a atividade. Como resultado dessas correlações encontra-se também que maiores teores de Zr apresentam menores atividades. Isso também pode ser resultado de desativação bimolecular pela proximidade dos sítios ativos [125]. Além disso, a análise de correlações sugere que quanto mais rugosa a superfície da maior estrutura identificada por SAXS (nível 3), maior a atividade ( $p < 0,05$ ). Isso pode indicar que superfícies mais lisas podem vir a dificultar a difusão do monômero na matriz do catalisador, diminuindo sua performance.

A Figura 5.25B traz os resultados de cristalinidade e  $T_m$ , com valores na faixa de 62 a 70 % e 132 a 136 °C respectivamente. Pode-se perceber que o catalisador de maior atividade CP-C8 foi aquele que formou um polímero de menor cristalinidade. Os maiores valores foram encontrados para as amostras CP-Gp, CP-C<sub>18</sub> e CP-Vy. A análise de correlações para esse parâmetro indica que uma maior cristalinidade foi alcançada para catalisadores com maior teor Zr ( $p < 0,01$ ), maior percentual de anéis com seis membros siloxano ( $\text{SiO}_6$ ) ( $p < 0,05$ ) e menor o número de vizinhos ( $p < 0,01$ ). Esse comportamento pode indicar que cadeias mais organizadas e com maior probabilidade de empacotamento são facilitadas por catalisadores com redes mais abertas em níveis estruturais. Observando as barras para  $T_m$  na Figura 5.25B, é possível perceber que esta segue uma tendência oposta à cristalinidade. Isso ocorre porque cadeias mais organizadas e compactadas necessitarão mais energias para serem fundidas. Esse

comportamento oposto também foi verificado pela análise de correlações. Exatamente as mesmas correlações encontradas para cristalinidade foram observadas para  $T_m$ , porém em sentido inverso.

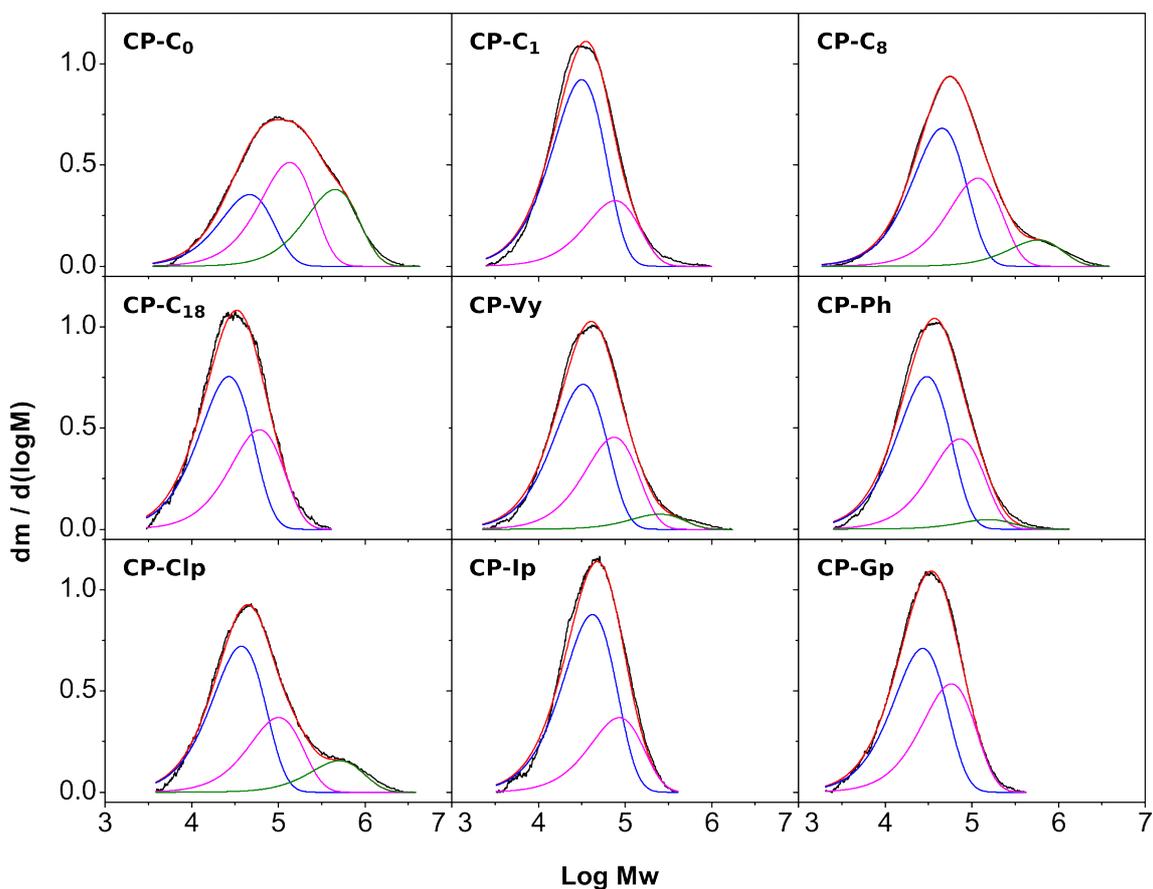


**Figura 5.25:** Resultados de performance dos catalisadores de polimerização. (A) Atividade catalítica, (B) cristalinidade e temperatura de amolecimento ( $T_m$ ), (C) polidispersão e (E) massas molares Mn e Mw.

Resultados da literatura para suportes híbridos utilizando grupo ácido sulfônico como modificação de sílicas mesoporosas mostram um interessante aumento da massa molar de polímeros preparados por metalocenos suportados [123]. Entretanto, as Figuras 5.25C e 5.25D trazem os resultados de GPC que mostram que a massa molar dos polímeros é diminuída pela adição dos organosilanos à rede de sílica, no caso estudado. Os valores de polidispersão também não foram aumentados em relação ao catalisador à base de sílica não híbrida. Os maiores resultados de PD entre os catalisadores híbridos foram observados para CP-C<sub>8</sub> e CP-Clp. A análise de correlação para esses parâmetros mostrou uma tendência oposta àquela observada para atividade:

observou-se maiores  $M_n$  e  $M_w$  para maiores valores de  $R_{g2}$  e  $P_3$  ( $p < 0,01$ ). Em função desse resultado, especula-se que um maior número de unidades de monômero é inserida numa mesma cadeia quando o número de sítios ativos disponíveis é menor. Essa hipótese baseia-se na observação anterior de que a atividade foi diminuída quando  $R_{g2}$  é maior, indicando oclusão das moléculas de catalisador em seu interior. Também ocorre a diminuição quando a difusão pode ter sido prejudicada por superfícies muito lisas. Ambos os fatos podem levar a uma limitação da quantidade de sítios disponíveis.

Por fim, para melhor avaliar a distribuição de massa molares, as curvas de GPC foram deconvoluídas e são mostradas na Figura 5.26. Os resultados mostram mais uma vez que a introdução dos grupos orgânicos à rede leva a uma modificação significativa do polímero formado.



**Figura 5.26:** Deconvolução das curvas obtidas pela cromatografia de permeação em gel (GPC) mostrando os detalhes da distribuição de massas molares.

Observando a posição dos máximos correspondentes à cada fração, percebe-se que a formação de cadeias de mais alta massa molar parece ser mais afetada (curva

verde). Pode-se perceber a diminuição ou até mesmo o desaparecimento dessa fração. Dentre os catalisadores híbridos, ela foi mais pronunciada para as amostras CP-C8 e CP-Clp. Essas também foram as amostras de catalisador à base de sílica híbrida com maiores valores de polidispersão.

Essas diferenças observadas mostram que os organosilanos podem ser de fato utilizados para alteração das propriedades do polímero formado. A partir desses resultados preliminares um estudo mais aprofundado pode ser então executado. A variação do teor de organosilano e até mesmo o emprego de uma combinação destes pode ser utilizada para um ajuste das propriedades produto final de acordo com as necessidades de sua aplicação.

#### **5.4. CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO DE CÉLULAS NEURONAIS**

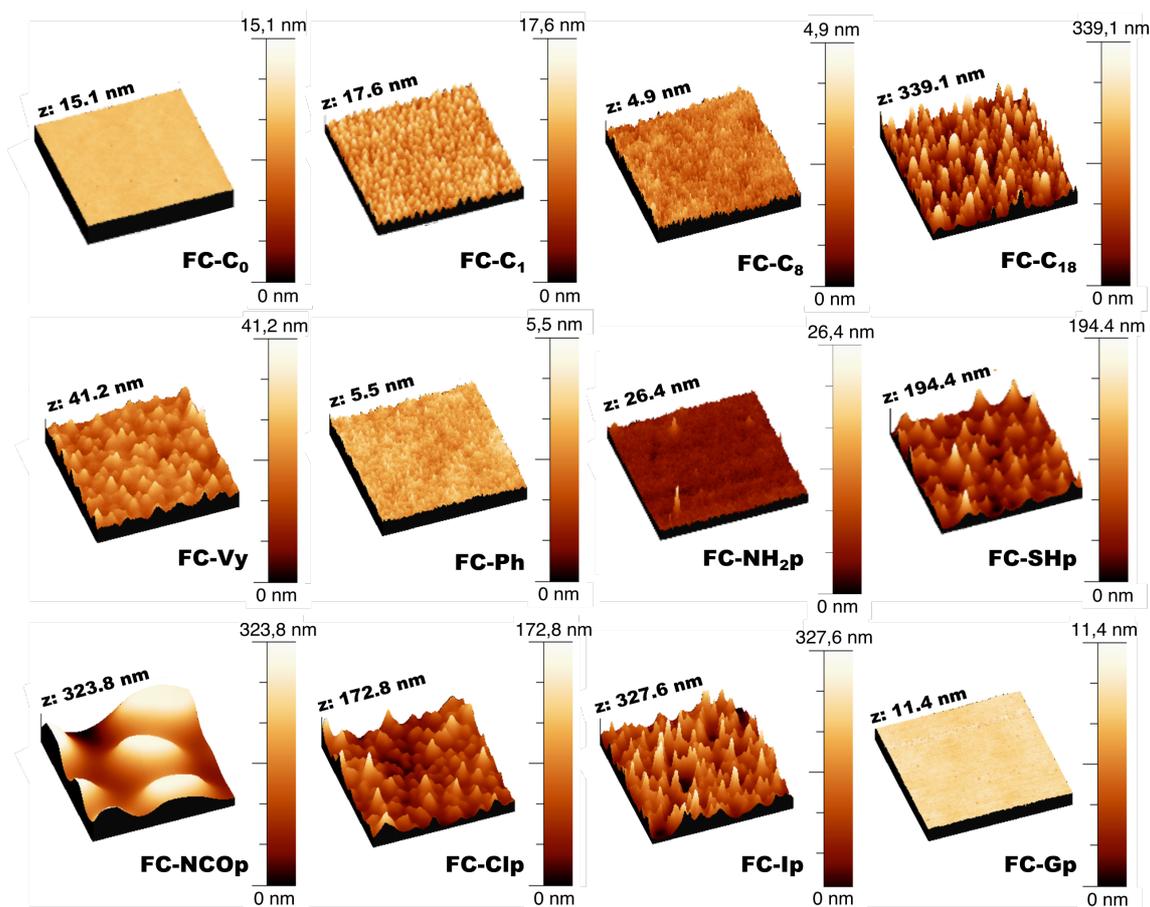
Os filmes utilizados para crescimento e regeneração de células foram preparados por rota hidrolítica ácida sem o encapsulamento de um composto em si e sim a adesão e morfologia celular foram investigados. Os sólidos foram caracterizados por um conjunto de técnicas complementares específicas para sua aplicação e a performance foi testada com células neuronais de linhagem, primárias e gliais.

##### **5.4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE SÍLICA**

Informações sobre a rugosidade da superfície, morfologia, composição química, a qual pode alterar propriedades de carga superficial e molhabilidade, são importantes parâmetros devido a sua influência no comportamento de adesão, proliferação e diferenciação celular. Os filmes híbridos obtidos pelo método sol-gel foram caracterizados utilizando microscopia de força atômica (AFM), ângulo de contato (WCA) e espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS). Como neste caso não foi encapsulado nenhum composto em si e o material é um filme, as caracterizações utilizadas são diferenciadas e voltadas a informações pertinentes ao comportamento celular.

Características topográficas podem influenciar tanto na adesão celular, como na subsequente migração e crescimento direcional. Além disso, células neuronais são

conhecidas pelo crescimento do axônio sendo guiado por essas características da superfície [126]. Assim sendo, a morfologia da superfície foi investigada por AFM e as imagens obtidas encontram-se na Figura 5.27. A rugosidade é calculada a partir da imagem de AFM como o valor da raiz quadrática média (RMS) e é apresentada na Figura 5.28.

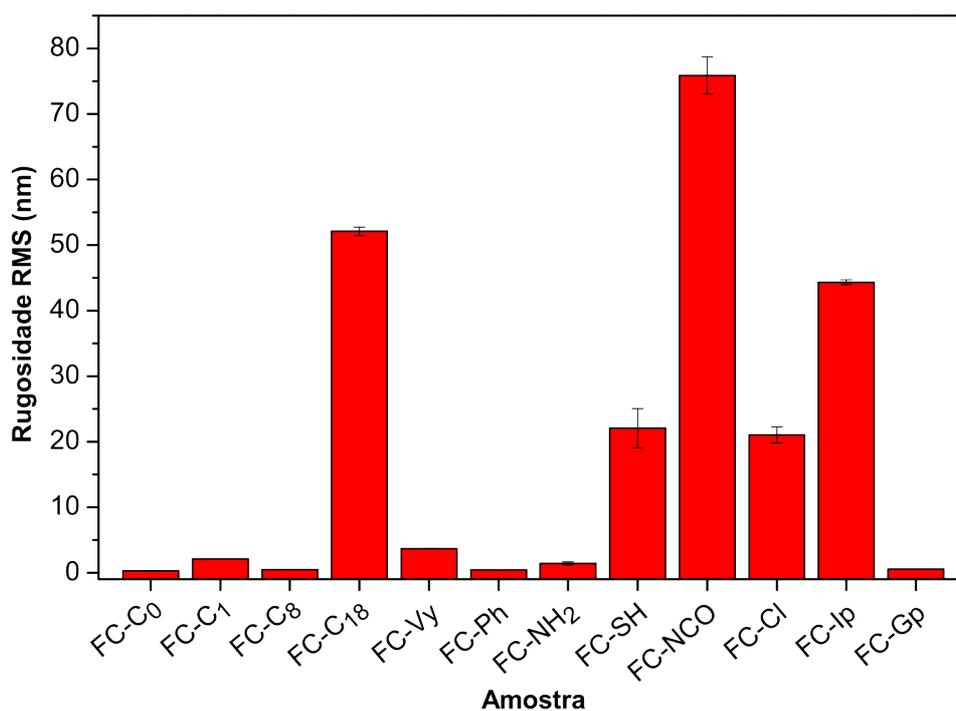


**Figura 5.27:** Imagens de AFM para os filmes de sílica. Dimensão lateral x e y de 5  $\mu\text{m}$  para todos os casos e dimensão z indicada para cada imagem.

As imagens e valores RMS mostram grandes diferenças em função do organosilano utilizado na síntese. Este comportamento pode ser explicado pelas diferentes taxas das reações de hidrólise e condensação durante o processo sol-gel. Uma vez que foi empregado exatamente o mesmo procedimento para todos os filmes e que cada organosilano tem uma diferente taxa de reação dependendo da sua estrutura [7], as estruturas e materiais formados também são diferentes como evidenciado pelas imagens de AFM. A rugosidade foi maior para os filmes que apresentaram estruturas esferoidais definidas na superfície, como no caso de FC-NCOp, FC-C<sub>18</sub>, FC-Ip, FC-SHp e FC-Clp.

Os demais filmes exibiram superfícies mais lisas com valores de RMS variando entre 0,3 a 3,7 nm.

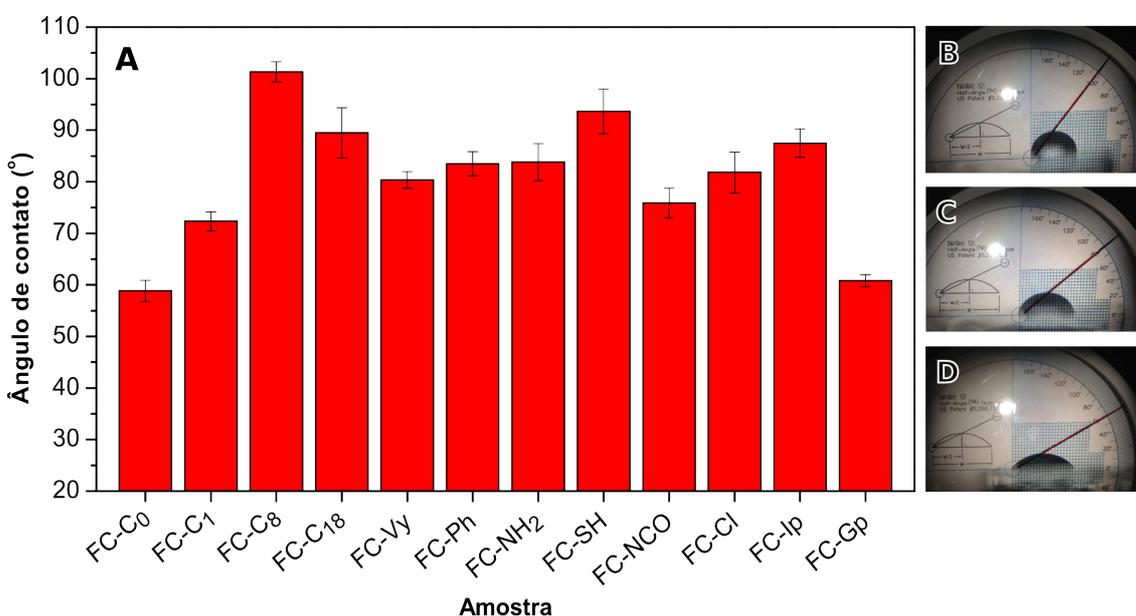
Durante o processo de deposição do filme, dois fenômenos principais acontecem. Primeiro, a estrutura é formada enquanto o gel se transforma numa camada sólida de sílica pela evaporação contínua do solvente. Após, um segundo estágio ocorre e os grupos hidroxila das partículas vizinhas podem sofrer reações de condensação. Assim, um menisco côncavo pode ser criado nos poros pela evaporação do solvente remanescente [80]. As diferentes etapas podem interferir na morfologia observada em cada filme. Isso ocorre principalmente no caso da substituição dos grupos hidroxila pelos grupos orgânicos, os quais podem dificultar reações de condensação com os vizinhos. Esse comportamento pode levar a um filme mais poroso e também influenciar a molhabilidade que também é importante em termos de cultura de células.



**Figura 5.28:** Valores de rugosidade RMS em nm obtidos pelas imagens de AFM mostrando a influência da natureza do organossilano nas características topográficas dos filmes.

Superfícies hidrofílicas levam a melhor adesão das células e subsequente proliferação se comparada a superfícies com menor molhabilidade [126, 127]. Assim sendo, a molhabilidade da superfície foi investigada utilizando o método do ângulo de

contato com água (WCA) e os resultados encontram-se na Figura 5.29. Os resultados variaram em torno de 80° para a maioria das amostras. Entretanto, as amostras FC-C<sub>0</sub>, FC-C<sub>1</sub> e FC-Gp apresentaram menores ângulos indicando maior hidroflicidade. Já FC-C<sub>8</sub>, FC-C<sub>18</sub>, FC-SH e FC-Ip revelaram maiores ângulos mostrando sua maior hidrofobicidade. Esses resultados podem ser uma combinação da própria hidrofobicidade dos grupos orgânicos e da formação do material como mencionado anteriormente. É sabido que a morfologia da superfície e a rugosidade podem influenciar as medidas de molhabilidade, de forma que superfícies mais lisas incorrem em menores ângulos de contato.



**Figura 5.29:** Medidas de ângulo de contato com água. (A) Resultados para os diferentes filmes de sílica. Exemplos da imagem obtida para (B) FC-C<sub>8</sub> com ângulo 102°, (C) FC-Vy com ângulo 80° e (D) FC-C<sub>0</sub> com ângulo 58°.

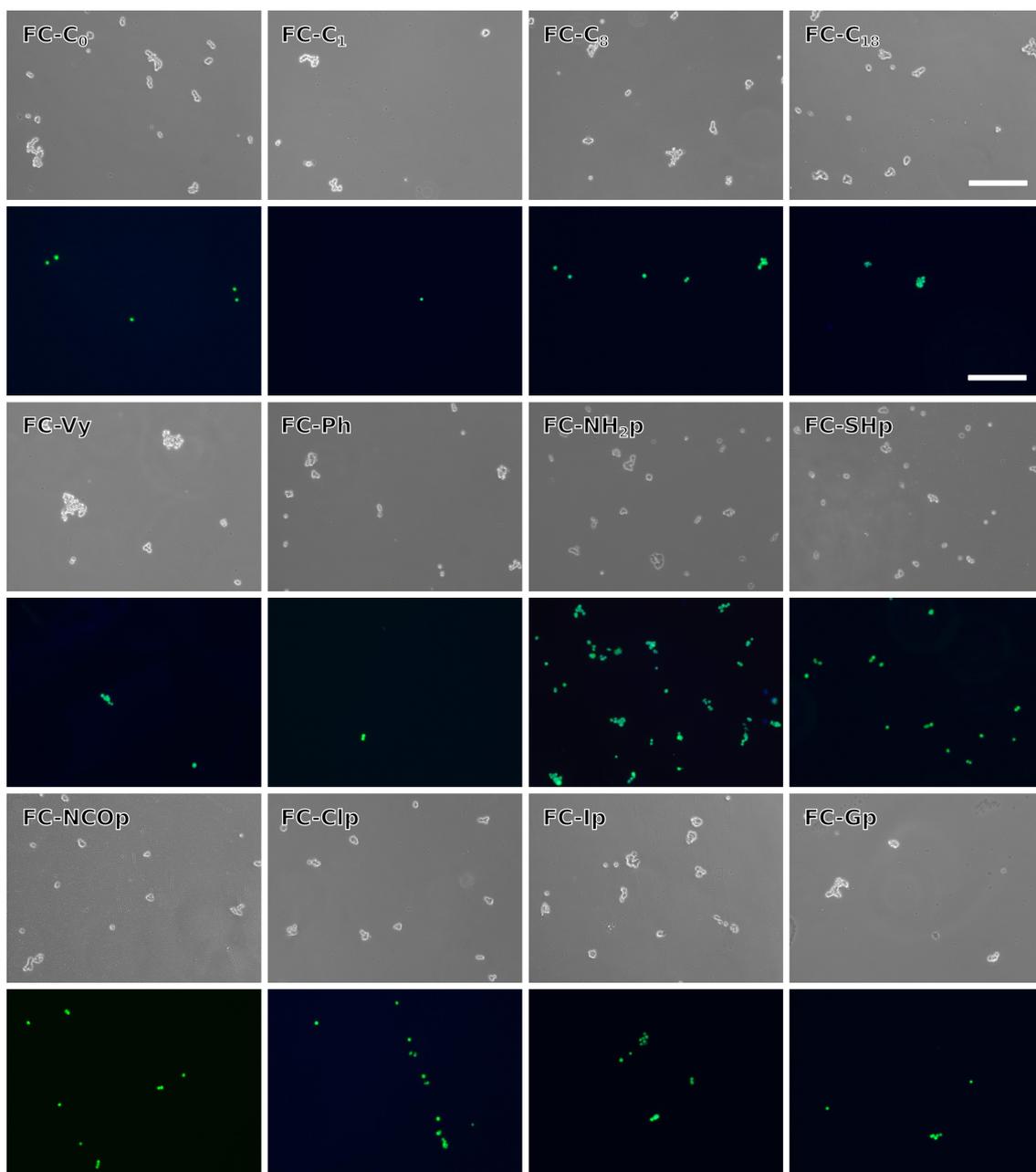
Devido à baixa espessura dos filmes outras análises foram prejudicadas. As análises de infravermelho em modo ATR não mostraram picos bem definidos. Já as análises de espalhamento de raios-X em baixo ângulo foram prejudicadas pela grande interface ar/amostra.

#### **5.4.2. COMPORTAMENTO DE CÉLULAS NEURONAIAS SOB OS FILMES DE SÍLICA**

O estudo de comportamento celular foi realizado utilizando inicialmente uma linhagem celular cultivada em laboratório chamada PC12. Essas células são derivadas de feocromocitoma da medula supra-renal de ratos e podem se diferenciar em neurônios quando induzidas pela presença de um fator de crescimento neural. O polímero poli-L-lisina (PLL) foi utilizado como superfície controle.

##### **5.4.2.1. ADESÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS PC12**

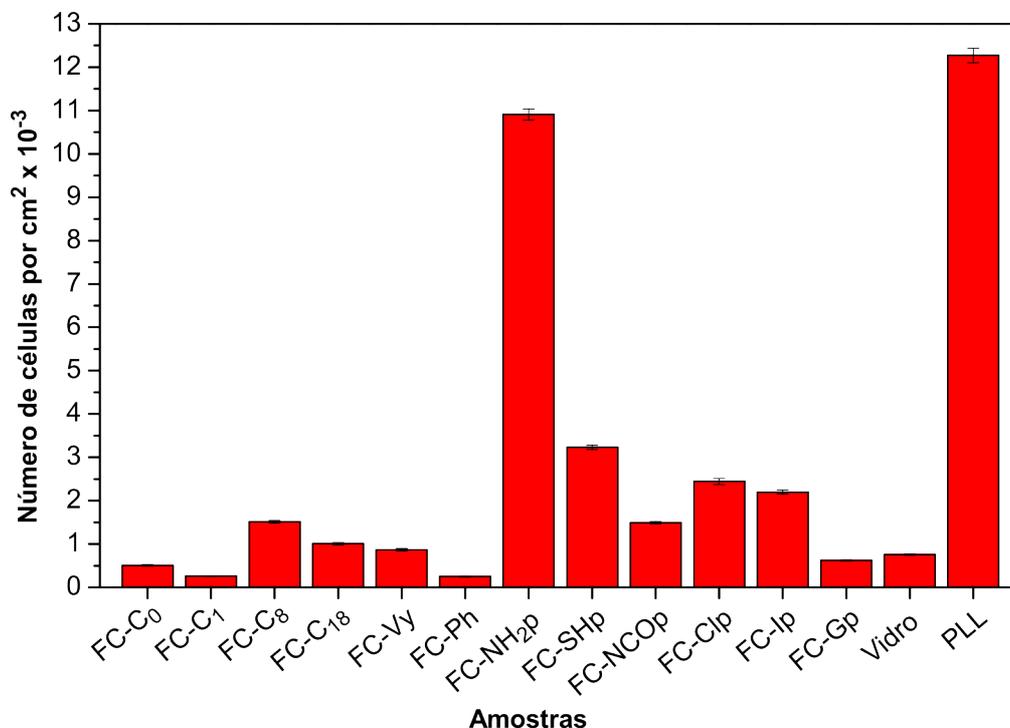
A adesão e viabilidade de células PC12 nos diferentes filmes de sílica híbrida foram investigados utilizando marcação Live/Dead<sup>®</sup>. Nesse ensaio, células vivas são marcadas por um corante fluorescente verde, enquanto as células mortas são marcadas de vermelho. O teste foi realizado 24h após inoculação com o material na concentração de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Os resultados são apresentados na Figura 5.30 que mostra imagens de contraste de fase coletadas antes da marcação Live/Dead<sup>®</sup>.



**Figura 5.30:** Ensaio de adesão e viabilidade celular PC12 com marcação Live/Dead<sup>®</sup> 24h após inoculação na presença dos diferentes filmes de sílica. Imagens de contraste de fase antes da marcação acima e fluorescência nos canais azul, verde e vermelho abaixo. Barra de escala correspondente a 200  $\mu\text{m}$ .

Das imagens acima, é possível observar que nem todas as células que aparecem nas imagens de contraste de fase estão aderidas à superfície. Quando o teste Live/Dead<sup>®</sup> é realizado, o meio é substituído pelo corante e após o tempo determinado a amostra é lavada gentilmente removendo as células não aderidas. A amostra FC-NH<sub>2</sub> foi a que apresentou maior concentração de células, seguida de FC-SHp. A contagem do número

de células foi realizada em 12 imagens de cada unidade da triplicata conforme descrito na seção de materiais e métodos. Os resultados encontram-se na Figura 5.31 em comparação ao controle PLL e ao vidro puro.



**Figura 5.31:** Contagem de células PC12 aderidas 24h após a inoculação sobre as sílicas híbridas em comparação ao vidro e ao controle PLL (poli-L-lisina).

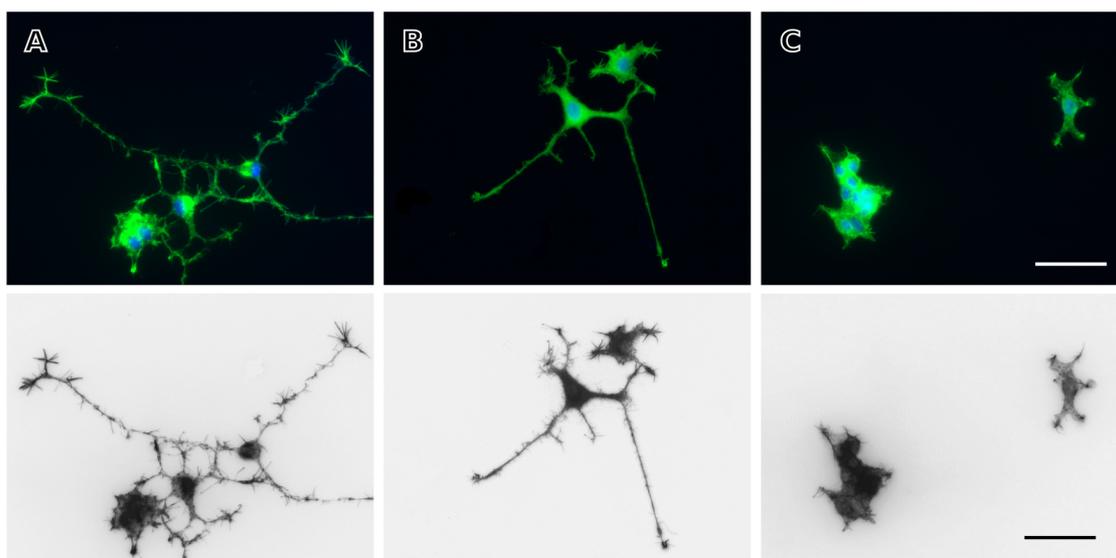
Os resultados de contagem mostram que, na maior parte dos casos, a adesão na presença dos organosilanos foi melhorada em relação ao vidro puro e a FC-C<sub>0</sub>. O FC-NH<sub>2</sub>p teve desempenho significativamente maior se comparado a qualquer outro filme, exibindo contagem de células próxima ao controle PLL. Recobrimentos contendo grupos amino são frequentemente utilizados para promover adesão celular, como o caso do PLL. Alguns estudos tem demonstrado que superfícies com a presença de grupos amino podem levar a maiores quantidades de proteína adsorvida, facilitando a adesão celular. Além disso, a carga positiva gerada pelos grupos amino parecem também promover adesão via interação eletrostática com as membranas dos neurônios que são carregadas negativamente [128, 129]. Analisando os demais materiais híbridos, FC-SHp teve a performance significativamente aumentada se comparado à sílica não híbrida (FC-C<sub>0</sub>), seguido de FC-Clp e FC-Ip. Já os demais filmes não demonstraram boas performances como os citados. Os efeitos das características químicas da superfície são

usualmente relacionados com a molhabilidade e carga. Uma combinação sinérgica dessas propriedades podem resultar em melhor adesão, proliferação e diferenciação das células, as quais estão por sua vez relacionadas à adesão de proteínas na superfície. Culturas de células são comumente realizadas em meio contendo soro (proteico) e após uma fração de segundo, uma camada de proteínas é adsorvida e sua concentração e conformação pode controlar a resposta celular [126, 127, 130].

Grupos mercapto mostraram-se também capazes de aderir células tronco neurais [131], as quais apresentaram corpo arredondado. Entretanto, de acordo com os resultados reportados para os filmes de sílica híbrida, os grupos amino tiveram melhor desempenho. Embora o comportamento observado seja consequência da soma de diferentes características de cada material, a literatura também mostra que a química da superfície e diferentes grupos funcionais podem ser mais influentes do que propriedades gerais como hidrofiliicidade [127, 131], como mostra também o presente estudo. Materiais mostrando resultados similares para as caracterizações como FC-Vy, FC-Ph e FC-NH<sub>2</sub>p, por exemplo, mostraram comportamento de adesão celular significativamente diferente. Já materiais com resultados de caracterização distintos como FC-C<sub>8</sub> e FC-NCO mostraram adesão similar.

#### **5.4.2.2. DIFERENCIAÇÃO E MORFOLOGIA DE CÉLULAS PC12**

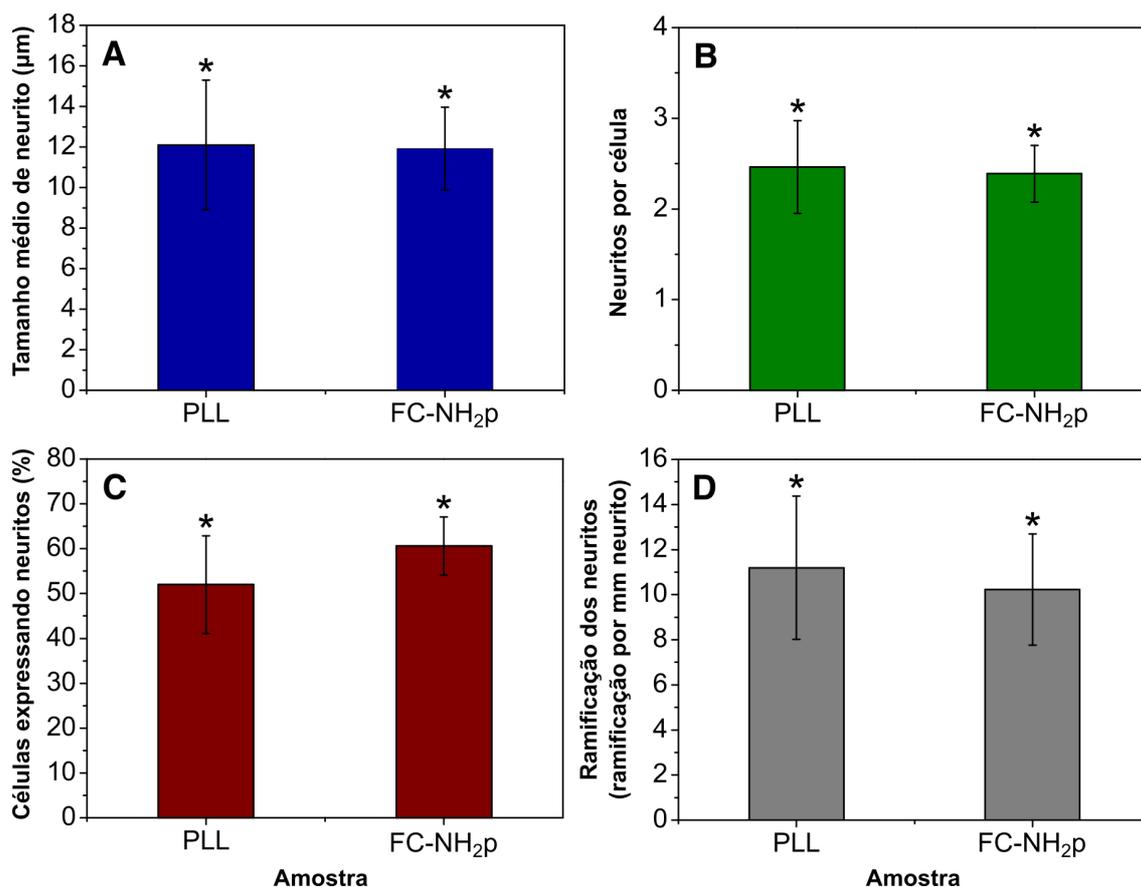
Sabe-se que não só a adesão, mas também a morfologia celular pode influenciar a posterior atividade das células. A primeira fase da interação célula/material irá impactar as habilidades de sobrevivência, proliferação e diferenciação [131]. Portanto, a diferenciação e morfologia foram investigadas apenas para as amostras FC-NH<sub>2</sub>p e FC-SHp que apresentaram os melhores resultados para adesão. Os estudos foram realizados após 72h de incubação, com o meio sendo substituído por meio fresco contendo fator de crescimento neural (NGF) após as primeiras 24h. A Figura 5.32 mostra as imagens das células após fixação com paraformaldeído e marcação com corantes fluorescentes conforme descrito na seção de materiais e métodos.



**Figura 5.32:** Células PC12 diferenciadas após 48h da adição de fator de crescimento neural marcadas para filamentos actina (Alexa Fluor-488 faloidina) e núcleo (Hoechst<sup>®</sup> 33342) em (A) controle PLL, (B) FC-NH<sub>2</sub>p e (C) FC-SHp. Imagens de fluorescência com as cores correspondentes acima e invertidas para melhor visualização abaixo.

As imagens de fluorescência revelaram morfologias diferentes para PLL, FC-NH<sub>2</sub>p e FC-SHp após 48h da adição do NGF. O controle PLL (Figura 5.32A) mostrou neuritos mais longos e com maior número de ramificações comparado às demais amostras. FC-NH<sub>2</sub>p (Figura 5.32B) também exibiu neuritos longos e bem definidos, entretanto aparentou possuir ramificação em menor grau. Já FC-SHp (Figura 5.32C) mostrou apenas pequenos neuritos. Além disso, foi observado que para esse filme houve um decréscimo de células aderidas no período de incubação, indicando um fraco suporte para diferenciação celular. Um comportamento similar foi reportado por Ren e colaboradores utilizando células tronco neurais [131]. Eles mostram que ambos grupos amino e mercapto suportaram adesão celular, mas apenas o grupo amino exibiu crescimento de estruturas neurais tipo cone.

Para melhor avaliar a resposta do filme FC-NH<sub>2</sub>p, foi realizada uma análise quantitativa do crescimento dos neuritos utilizando as imagens de contraste de fase e o software ImageJ. Os resultados para tamanho médio de neurito, número médio de neuritos por célula, percentual de células expressando neuritos e ramificações encontram-se na Figura 5.33.



**Figura 5.33:** Quantificação da evolução de crescimento dos neuritos para FC-NH<sub>2</sub>p. (A) tamanho médio de neurito, (B) número médio de neuritos por célula, (C) percentual de células expressando neuritos e (D) análise das ramificações indicada como número de ramificações por extensão (mm) de neurito desenvolvido.

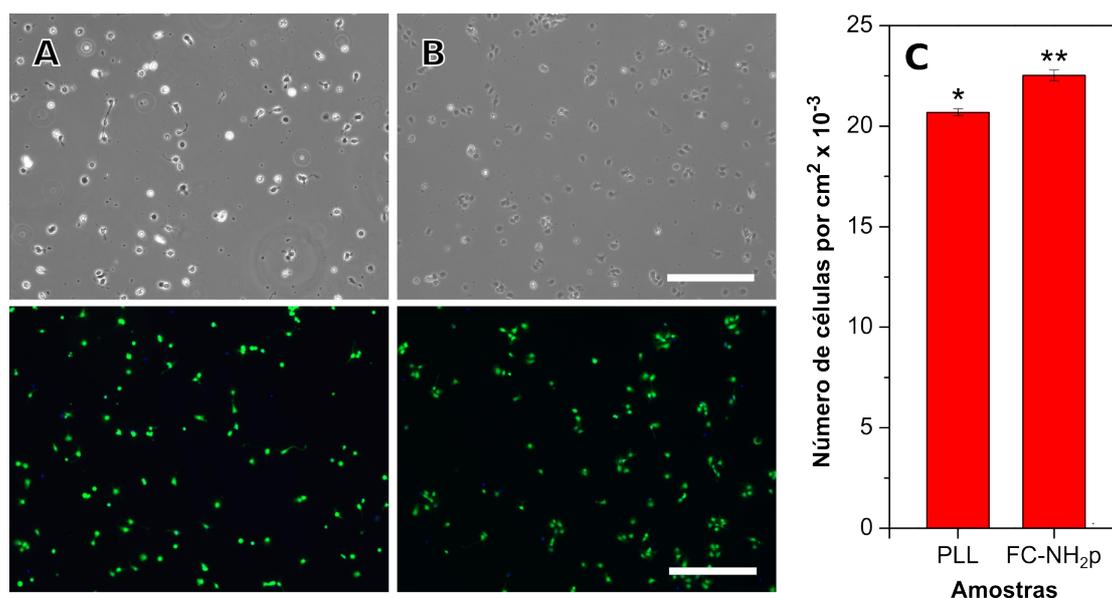
As medidas e contagem de neuritos e ramificações mostraram resultados bastante promissores para o filme FC-NH<sub>2</sub>p, evidenciando resultados comparáveis ao controle PLL, o qual é recobrimento comumente utilizado para esse fim. O comprimento médio dos neuritos (Figura 5.33A) foi em torno de 12 µm para FC-NH<sub>2</sub>p e PLL, assim como o número médio de neuritos por célula (Figura 5.33B) foi em torno de 2,4 para ambos também. Para a avaliação do percentual de células expressando pelo menos um neurito (Figura 5.33C) os resultados não foram significativamente diferentes, mas FC-NH<sub>2</sub>p apresentou valor em torno de 60% enquanto para PLL o valor foi de 52%. Por fim, os resultados para a ramificação (Figura 5.33D) também não foram estatisticamente diferentes. Entretanto, de acordo com os resultados do ensaio de imunofluorescência a ocorrência de ramificação aparenta ser mesmo um pouco maior

para PLL (~3,2 ramificações a cada mm de neurito) do que para FC-NH<sub>2</sub>p (~2,5 ramificações por mm de neurito).

#### **5.4.2.3. ADESÃO DE VIABILIDADE DE CÉLULAS CORTICAIS PRIMÁRIAS**

Células de linhagens criadas em laboratório, como a PC12, são comumente as primeiras a serem testadas em novos materiais devido a sua simplicidade se comparada às células primárias. Entretanto, as células primárias também foram utilizadas nesse estudo, uma vez que representa melhor as condições *in vivo* para um experimento [87, 126]. Essas células são aquelas derivadas diretamente do tecido de um animal vivo, sendo empregadas para o experimento logo após remoção e preparo adequado para cultura. Para o estudo em questão foram utilizadas células de embrião de galinha com 7 dias que foram obtidas conforme procedimento já descrito. Neste caso, apenas a amostra FC-NH<sub>2</sub>p foi avaliada, uma vez que quando um material não tem uma boa resposta para células de linhagem, em geral ela será ainda menos satisfatória para células primárias. O comportamento celular ao longo dos experimentos foi novamente acompanhado via imunofluorescência.

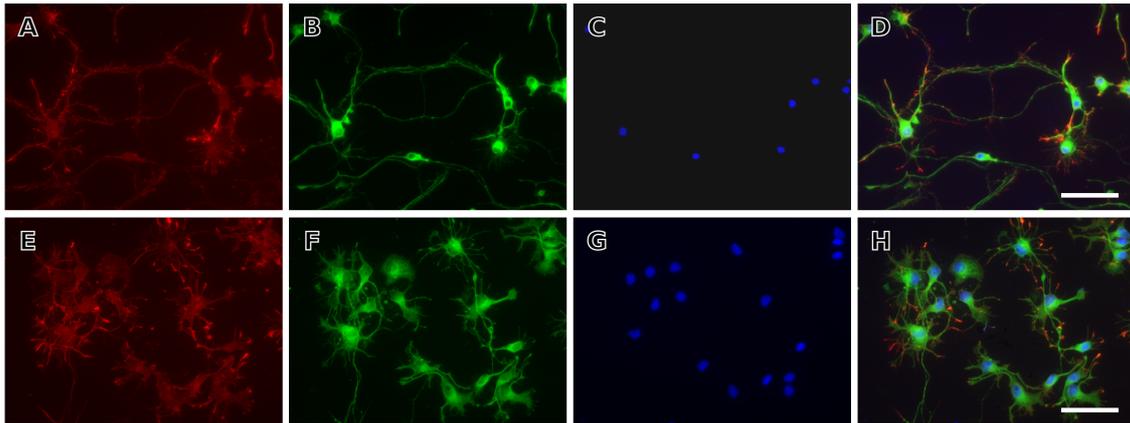
A adesão e viabilidade foram investigadas de forma similar às células PC12. As células foram inoculadas sobre os filmes na concentração de 50.000 células/cm<sup>2</sup>. Após 24h da inoculação, foram utilizadas a marcação Live/Dead® e contagem de células aderidas a partir de 12 imagens de cada replicata. Os resultados encontram-se na Figura 5.34 para o filme de sílica e o controle e indicam um número ligeiramente mais elevado de células aderidas no filme FC-NH<sub>2</sub>p, se comparado ao PLL. Esse resultado demonstra um excelente desempenho para a sílica híbrida também para as células primárias. A boa adesão mostra que o filme pode ser uma opção apropriada para aplicação como recobrimentos de implantes neurais [77, 87].



**Figura 5.34:** Ensaio de adesão e viabilidade de células corticais com marcação Live/Dead<sup>®</sup> 24h após inoculação para (A) controle PLL e (B) FC-NH<sub>2</sub>p. (C) Contagem de células aderidas em cada recobrimento 24h após inoculação. Barra de escala correspondente a 200 μm.

#### 5.4.2.4. DIFERENCIAÇÃO E MORFOLOGIA DE CÉLULAS CORTICAIS

Devido aos resultados promissores encontrados para adesão celular, a incubação foi também estendida para 72 h a fim de avaliar como as células se diferenciam e qual sua morfologia em função do substrato utilizado. A morfologia celular foi novamente investigada via ensaio de imunofluorescência com marcação de núcleo em azul (Hoechst<sup>®</sup> 33342), filamentos actina em vermelho (Alexa Fluor-594 faloidina) e microtúbulos em verde (anti-  $\alpha$ -tubulina). As imagens resultantes encontram-se na Figura 5.35 para o controle PLL e para FC-NH<sub>2</sub>p e mostram que ambos recobrimentos suportaram diferenciação dos neurônios. Entretanto, é possível observar diferenças morfológicas entre as células dos dois substratos.



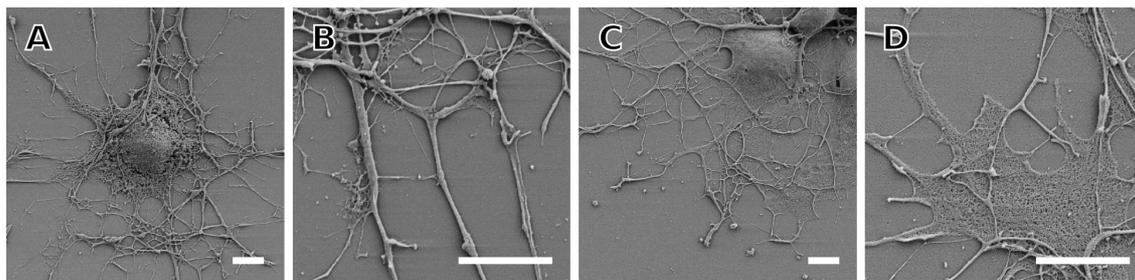
**Figura 5.35:** Imagens de fluorescência para células corticais após 72h de cultura mostrando filamentos actina (vermelho), microtúbulos (verde), núcleo (azul), além da soma de todos os canais (coluna da direita). (A, B, C, D) Controle PLL e (E, F, G, H) amostra FC-NH<sub>2</sub>p. Barra de escala de 100  $\mu$ m.

O controle PLL (Figura 5.35A a 5.35D) exibiu uma distribuição de células mais homogênea ao longo do substrato, além de apresentar neuritos mais longos e bem desenvolvidos. Esse comportamento é ressaltado pelos filamentos actina marcados em vermelho que demonstram neuritos com menor área, ou seja, mais alongados e bem definidos. No substrato FC-NH<sub>2</sub>p (Figura 5.35E a 5.35H), apesar da morfologia similar ao PLL, também é possível encontrar células com neuritos não tão longos e de base alargada se estendendo por uma área maior. Isso foi observado principalmente perto ao corpo da célula tanto na marcação de filamentos actina, quanto de microtúbulos. Essa região alargada é conhecida como lamellipodia<sup>12</sup>. Em geral, os neuritos finos e bem desenvolvidos parecem se originar dessas estruturas lamellipodia, a qual também está presente na ponta dos neuritos fazendo uma espécie de reconhecimento e direção de crescimento na superfície. Além disso, agregados de células foram formados em FC-NH<sub>2</sub>p, enquanto apenas alguns clusters de células foram observados para PLL.

A morfologia celular foi também investigada utilizando microscopia eletrônica de varredura (SEM). As imagens foram registradas de modo a mostrar especialmente os detalhes de desenvolvimento dos neuritos em maior magnificação. As imagens encontram-se na Figura 5.36 e corroboram com as características observadas por imunofluorescência. O controle PLL (Figura 5.36A e 5.36B) apresentou neuritos mas

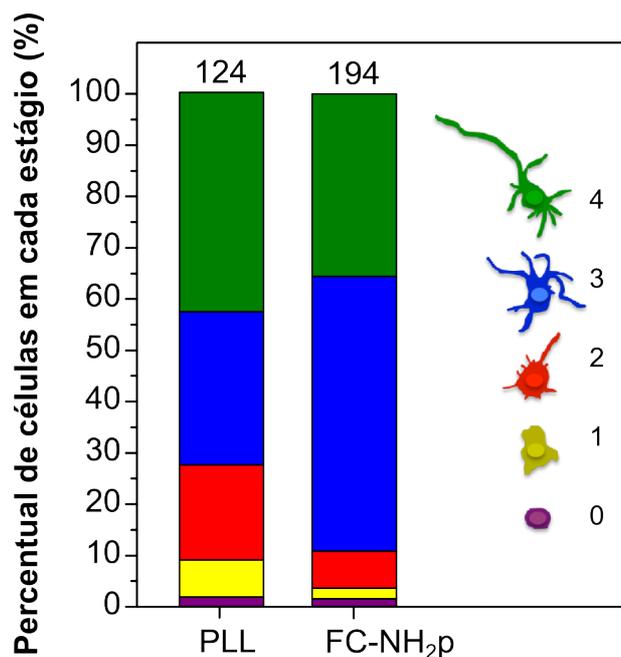
<sup>12</sup> Estrutura móvel presente nos cones de crescimento dos neurônios. Encontra-se na borda principal dos neuritos na forma de pés largos e finos e são importantes no crescimento desses neuritos e também no desenvolvimento de ramificações.

grossos e bem definidos, de forma que essas estruturas longas são estendidas diretamente do corpo da célula (Figura 5.36B). Já para FC-NH<sub>2</sub>p (Figura 5.36C e 5.36E) as imagens mostram os detalhes da lamellipodia e é possível observar essas estruturas se estendendo pela superfície ao contrário daquelas bem definidas observadas para o PLL. Os neuritos mais curtos se estendendo no final da lamellipodia também foram identificados, como detalha a Figura 5.36D.



**Figura 5.36:** Morfologia celular investigada por microscopia eletrônica de varredura das células corticais após 72h de cultura em (A,B) PLL e (C,D) FC-NH<sub>2</sub>p. Barra de escala de 1 µm.

A fim de melhor estimar as diferenças de morfologia entre os dois substratos, quantitativamente, uma caracterização de estágios foi realizada para avaliar a maturação das células neuronais após 72h de cultura. O critério de classificação utilizado foi o mesmo já descrito na literatura [132, 133]. O estágio 0 foi definido com uma célula completamente arredondada e sem formação de lamellipodia; o estágio 1 foi definido como presença de lamellipodia, porém sem formação de neuritos definidos; o estágio 2 foi definido como a formação de um único neurito ou pequenos neuritos com o comprimento em torno do tamanho do corpo da célula; o estágio 3 foi definido como presença de neuritos maiores com comprimento de pelo menos duas vezes o corpo da célula, porém ainda apresentando lamellipodia; o estágio 4 foi definido como presença de neuritos longos, maiores que duas vezes o tamanho do corpo da célula e totalmente desenvolvidos, não havendo mais presença de lamellipodia. A Figura 5.37 traz resultados da classificação e uma ilustração representando cada estágio.



**Figura 5.37:** Percentual de células corticais em cada estágio de maturidade após 72h de cultura para o controle PLL e FC-NH<sub>2</sub>p.

O estudo de maturação comprova as características já discutidas no ensaio de imunofluorescência. O PLL apresentou valores de 1,6% no estágio 0; 7,3% no estágio 1; 18,5% no estágio 2; 29,8% no estágio 3 e 42,7% no estágio 4. Já FC-NH<sub>2</sub>p teve 1,5% das células no estágio 0; 2% no estágio 1; 7,2% no estágio 2; 53,6% no estágio 3 e 35,5% no estágio 4. Isso mostra que o controle possui o percentual maior de células no estágio 4, indicando que nesse recobrimento as células se desenvolveram atingindo um grau maior de maturação no tempo de cultura estudado. Já a amostra de sílica híbrida exibiu mais da metade das células no estágio 3, o que reflete a ainda presença de lamellipodia. Entretanto também há uma boa quantidade de células que atingiram o estágio 4. Em termos dos estágios iniciais de desenvolvimento, é possível notar que um maior percentual de células atingiu pelo menos o estágio 3 para FC-NH<sub>2</sub>p do que para o controle PLL. Esse resultado indica que embora o desempenho para o estágio 4 seja menor, a evolução nos estágios iniciais foi promovida.

### 5.4.3. COMPORTAMENTO DE CÉLULAS ASTRÓCITOS

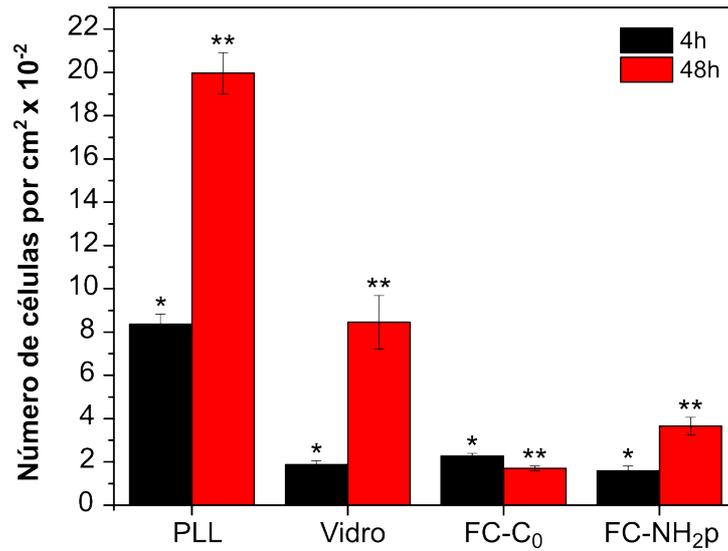
Astrócitos são células gliais<sup>13</sup> que podem exercer uma série de funções no cérebro [134, 135]. Entretanto, quando uma lesão acontece, os tecidos cerebrais são danificados resultando numa reação das células gliais que pode criar uma barreira para a regeneração. Um dos maiores obstáculos é a formação de uma cicatriz chamada gliose, a qual se origina de uma reação excessiva dos astrócitos e proteoglicanos<sup>14</sup>. Neurônios e seus axônios não conseguem se regenerar através da gliose e seu crescimento e comunicação são então estagnados [88, 136]. Consequentemente, os tratamentos empregados devem idealmente suportar e favorecer a regeneração de neurônios sem promover um ambiente favorável para crescimento excessivo de astrócitos. Em geral, essas células aderem e proliferam mais facilmente do que neurônios, podendo se desenvolver em superfícies menos complexas, como vidro puro. A gliose formada ao redor dos microeletrodos inseridos no cérebro faz com que sua vida útil seja reduzida, uma vez que a barreira criada por ela impede a comunicação elétrica com os neurônios. Assim, por mais que um revestimento seja favorável ao crescimento dos neurônios, ele pode não ser eficiente se possibilitar uma reação excessiva de astrócitos isolando o eletrodo do tecido cerebral.

Dessa forma, experimentos para investigar o comportamento de astrócitos também foram realizados de forma a complementar o estudo. A amostra FC-NH<sub>2</sub>p e o controle PLL foram testados para célula A-172 (astrócito) numa concentração de inoculação de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. O filme de sílica pura (FC-C<sub>0</sub>) e vidro puro também foram investigados para efeitos de comparação. Os resultados encontram-se na Figura 5.38. A adesão inicial foi investigada após 4h de inoculação e mostram maior adesão apenas para o controle PLL. O vidro puro, FC-C<sub>0</sub> e FC-NH<sub>2</sub>p exibiram número significativamente menor de células, porém similares entre estes. Já a proliferação foi investigada após 48h de cultura e mostrou diferenças entre todos os substratos. Esses efeitos também podem ser visualizados a partir das imagens de contraste de fase e fluorescência mostradas na Figura 5.39.

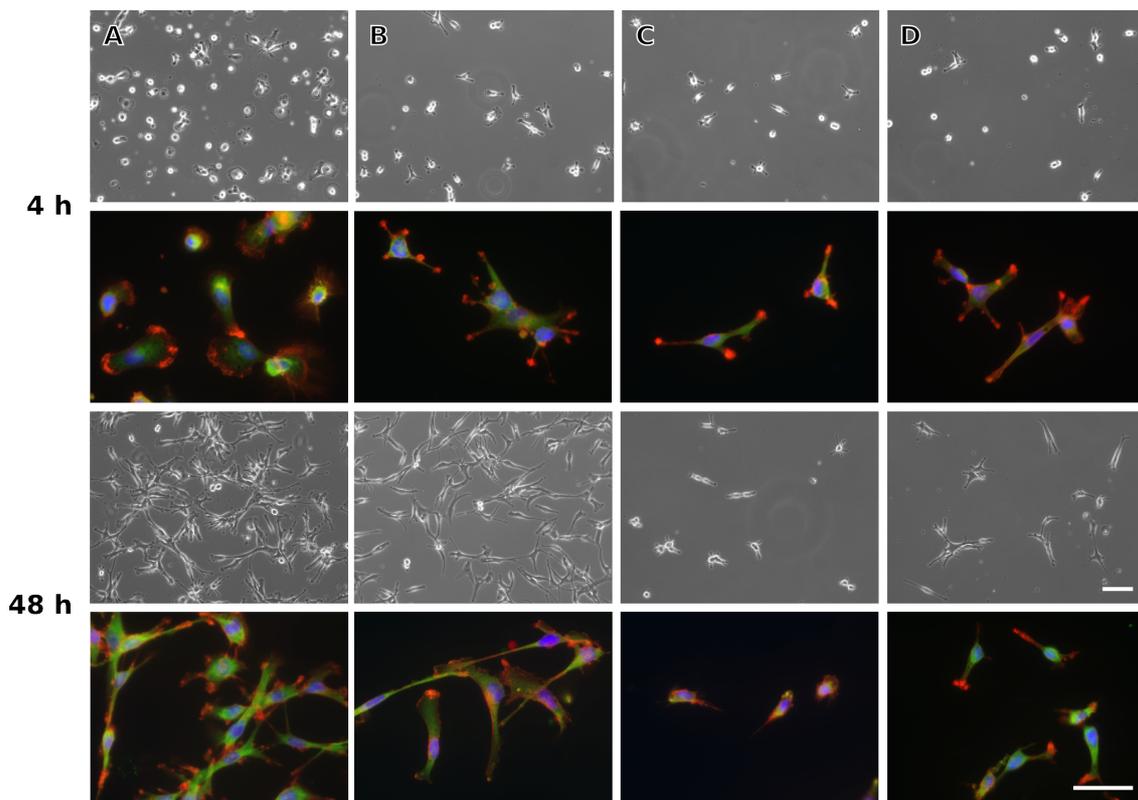
---

<sup>13</sup> As chamadas células gliais são oligodendrócitos, astrócitos e as microglias que compõem a maior parte das células que formam o cérebro. Os astrócitos chegam a compor de 30 a 65% da massa e possuem uma série de funções como suporte mecânico, direcionamento do crescimento de neurônios, controle do ambiente químico e aporte de nutrientes e até mesmo modular atividade neuronal [85].

<sup>14</sup> Proteínas intercelulares com função de atração de água para os tecidos, reforço estrutural e preenchimento de espaços.



**Figura 5.38:** Contagem de células astrócitos para adesão após 4h de cultura (barras pretas) e para proliferação após 48h (barras vermelhas) (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 5.39:** Imagens de fluorescência para investigação da morfologia de astrócitos mostrando citoesqueleto (verde), filamentos actina (vermelho) e núcleo (azul) para (A) controle PLL, (B) vidro puro, (C) FC-C<sub>0</sub> e (D) FC-NH<sub>2</sub>p.

O controle PLL apresentou o maior número de células, enquanto o vidro puro apresentou a maior proliferação comparada ao número de células aderidas inicialmente. Para FC-C<sub>0</sub> e FC-NH<sub>2</sub>p, um número significativamente menor de células foi encontrado. Além disso, é possível notar um menor número de astrócitos para FC-C<sub>0</sub> após 48h do que após 4h de cultura, indicando que eles não conseguem proliferar nesse substrato. Para FC-NH<sub>2</sub>p ocorreu alguma proliferação, mas foi expressivamente menor do que aquela no recobrimento comumente usado, o PLL. Esses resultados ressaltam que a inibição do crescimento de astrócitos ocorreu devido à fração de sílica sol-gel do recobrimento e não à presença dos grupos aminopropil. Isso demonstra que o uso de organosilanos pode levar a uma adesão e diferenciação bem sucedidas de células neuronais, sem promover crescimento excessivo de células gliais. Utilizando essa estratégia sinérgica e uma otimização desse tipo de material, talvez um tratamento efetivo pode ser alcançado, prevenindo a gliose a qual impede a regeneração dos neurônios.

## **5.5. TRANSVERSALIZAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os resultados dos diferentes materiais estudados foram amplamente discutidos ao longo desse trabalho dentro de cada aplicação. Em se tratando de ajustar a atividade tendo como ponto de vista o organossilano empregado, uma abordagem desses dados por um ângulo diferenciado também se torna interessante. É primordial que se tenha em mente que muitas das características do material são fortemente dependentes da rota de preparação. Entretanto, é possível observar algumas tendências entre as diferentes aplicações que são influenciadas pelo organossilano e suas características. Empregando uma abordagem transversal, espera-se definir algumas nuances em termos de propriedades beneficiadas ou prejudicadas pela presença desses grupos orgânicos. Dessa forma, os dados aqui expostos podem vir a auxiliar num ajuste mais consciente de novos materiais preparados por um processo tão rico e flexível, todavia também complexo como método sol-gel.

### **5.5.1. ENCAPSULAMENTO E RETENÇÃO DE COMPOSTOS**

Enfocando a quantidade encapsulada, pode-se notar que, de uma forma geral, o teor encapsulado é aumentado quando os grupos orgânicos são introduzidos ao meio. Essa tendência foi mais forte para o caso dos sensores. Como citado anteriormente, nesse caso todo o meio reacional é envolvido pela rede de sílica em função da rota empregada, o que resulta numa probabilidade maior de interação do composto com o material. Outro fator que pode vir a influenciar é o tamanho da molécula que será encapsulada.

Do ponto de vista da introdução do organossilano, a facilidade de retenção é proporcional à interação da molécula alvo a ser incorporada com o grupo orgânico. Para as aplicações avaliadas nesse aspecto, os sensores e antimicrobianos, observou-se um bom desempenho para o aminopropil em ambos materiais. Uma boa resposta para esse grupo orgânico também foi observada para as células neuronais. Nesse caso, não temos um composto encapsulado, mas a adesão é regulada pela adsorção de uma camada de proteínas na superfície do substrato (filme de sílica). Isso demonstra que a interação

com o átomo de nitrogênio com carga residual positiva pode ser uma estratégia a ser considerada para o aumento do teor incorporado. Assim, pode-se pensar na escolha de um precursor específico aumentar a capacidade de retenção dos compostos se essa for uma propriedade de interesse.

### **5.5.2. EFEITO DO ORGANOSILANO SOBRE A MOLÉCULA ALVO**

Em contraponto ao efeito de aumento da retenção do composto na rede pelo uso de grupos orgânicos, está o efeito causado por essa interação em sua atividade. Quando é necessário alguma ação da molécula encapsulada, como reagir a um analito, ser liberada para eliminar um patógeno ou ser um sítio catalítico, deve-se ser criterioso nesse aspecto. Deve existir um cuidado para não comprometer a eficácia do material. Isso pode ser alcançado por um balanço entre interação e lixiviação em função do grupo orgânico utilizado.

A necessidade da medida ideal entre esses dois pontos puderam ser observadas em duas situações entre os materiais estudados. No preparo dos sensores, obteve-se um alto teor do indicador vermelho de alizarina quando foi utilizado o grupo aminopropil. A quantidade observada foi maior do que qualquer outro organosilano empregado. Entretanto, quando o material foi submetido a diferentes pHs nos testes de voltametria cíclica, constatou-se que este não respondia mais a mudanças do meio em que se encontrava. Ou seja, aquele material, mesmo com uma grande quantidade de indicador encapsulado, não funcionava mais como sensor. Comportamento similar foi observado no uso do octadecilsilano no preparo dos antimicrobianos. Foi constatado um grande percentual de tetraciclina retida nas partículas. Entretanto, em termos de efeito antimicrobiano, o material configurou-se entre os piores desempenhos. Aqui, o efeito de não liberação do fármaco dá-se não só em função da interação, mas também da dificuldade de acesso aos poros pela hidrofobicidade do material.

Esses resultados demonstram a influência que a modificação da rede tem sobre o desempenho e aplicação desses materiais. Além disso, para uma otimização de atividade deve haver um balanço entre uma quantidade necessária da molécula alvo e sua acessibilidade. Ou seja, deve haver interação com a rede, porém com manutenção do poder de reação a estímulos/reagentes externos.

### 5.5.3. ESTRUTURA E TEXTURA DOS MATERIAIS

Dentre os parâmetros de estrutura e textura dos materiais também foi possível observar algumas tendências. A estrutura de rede foi avaliada principalmente em função dos anéis formados pelas unidades siloxano. Para todos os materiais, independente da rota de preparação, foram encontrados menores valores de anéis contendo seis membros siloxano para os grupos orgânicos mais volumosos como octadecil. Analisando esse comportamento é possível notar que a velocidade mais lenta da reação se sobrepõe à probabilidade de formação de anéis maiores e menos tensos para facilitar a acomodação dos grupos orgânicos. Esse parâmetro se mostrou influente no caso dos antimicrobianos, para o qual um maior percentual de anéis maiores com seis membros siloxano parece facilitar a liberação do fármaco.

A área específica é diminuída pela introdução dos organosilanos, uma vez que eles tendem a ocupar os poros da rede de sílica. Entretanto, observa-se que alguns grupos não influenciam de forma tão drástica a área como outros. Observou-se como uma tendência, mesmo para diferentes materiais preparados por distintas rotas, que as modificações com os grupos metil, vinil e fenil não fazem que a área seja tão diminuída com os demais. O uso do vinil inclusive levou a valores superiores de área em comparação à sílica não híbrida. Já grupos como os alquil de cadeia longa octil e octadecil, aminopropil e glicidoxipropil levam a uma redução da área, com destaque para o último grupo. Isso demonstra que também independente do preparo, certos organosilanos podem ser utilizados para ajustar a área específica dos materiais. Esse parâmetro, por sua vez, é influente na atividade como mostraram os resultados de performance dos sensores e antimicrobianos.

A microestrutura e morfologia são características que sofrem grande influência da rota empregada em seu preparo. Para as rotas ácida e não hidrolítica são formados géis que, ao microscópio, parecem partículas disformes, mas cada uma com peculiaridades diferentes. A rota básica forma partículas esféricas ou géis, dependendo do organosilano empregado. Isso tudo reflete também nos resultados observados para as curvas de SAXS, com a qual observou-se a microestrutura. Dessa forma, não foi possível observar tendências similares ao observar os diferentes tipos de materiais.

#### 5.5.4. ATIVIDADE

A atividade também foi influenciada pelos organosilanos em cada caso, como discutido anteriormente. Em algumas situações, o organosilano foi determinante tanto para o sucesso quanto para a falha do material, como no caso do aumento de interação com a matriz de sílica. Conforme citado, ele pode auxiliar na atividade pela retenção de uma maior quantidade do composto encapsulado, mas também pode interagir ao ponto de inviabilizar o uso em determinada aplicação.

Entretanto, parece notável que a atividade foi principalmente regulada ou ajustada pela adaptação do material ao meio em que foi utilizado. Por sua vez, essas características que afetaram o desempenho das sílicas híbridas em cada aplicação são o próprio resultado do emprego dos diferentes organosilanos. Todavia, como trata-se de diferentes aplicações em diferentes meios, também diferentes propriedades influenciaram as respostas. Da mesma forma, uma mesma propriedade influenciou a performance de forma diferente dependendo da utilização.

De uma forma geral, o volume dos grupos empregados influenciou a resposta da maior parte dos materiais estudados. Todavia, isso ocorreu principalmente para os casos em que a hidrofobicidade adicionada ao material pelos organosilanos volumosos foi determinante para o desempenho na função em questão. Para as aplicações em meios polares, como o caso dos sensores, antimicrobianos e filmes para cultura de células, essa característica foi prejudicial. Já para a reação de polimerização que ocorre em meio de solvente orgânico, esse comportamento nocivo não foi observado.

Dentre as características medidas pelo conjunto de técnicas complementares pode-se observar principalmente a influência do teor de composto encapsulado e área específica. Essas relações foram obtidas utilizando análises estatísticas e mostram diferentes sentidos da influência desses parâmetros na performance do material. Para os antimicrobianos e sensores, um maior teor facilitou a liberação do fármaco e diminuiu o tempo necessário para o analito atingir uma molécula receptora fazendo-a mudar de coloração, respectivamente. Já para os catalisadores, uma atividade maior foi relatada para menor concentração de zircônio na sílica. Em termos de área específica encontram-se resultados melhores para liberação do fármaco e piores tempos de resposta para os sensores quando se tem altas áreas específicas.

Além disso, outras características analisadas se mostraram importantes dependendo do uso que se fez do material preparado. Pode-se citar: a estrutura de rede medida pelo percentual de anéis com 6 membros siloxano; parâmetros da microestrutura medidos por SAXS como tamanho das partículas, distância de correlação entre elas e rugosidade; e potencial zeta.

O que se ressalta aqui, é que ambas características citadas mostraram variação em função do organossilano empregado. Esse comportamento foi observado mesmo utilizando diferentes rotas para preparo dos materiais utilizados nas diferentes aplicações. Isso mostra o potencial de ajuste da atividade de moléculas encapsuladas pode ser obtido não só de forma pela interação direta dos grupos presentes na sílica com as moléculas encapsuladas, mas também pelo ajuste das características da matriz do material à aplicação desejada.

## **6. CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

O processo sol-gel confirmou ser uma ferramenta com potencial diferenciado para elaboração de novos e diversificados materiais. Com seu uso, foi possível preparar sensores, materiais antimicrobianos, catalisadores de polimerização e filmes para crescimento e regeneração de neurônios a partir dos mesmos precursores. Todos os materiais mostraram sucesso em sua aplicação específica, o qual foi dependente dentro do grupo de organosilanos explorado, de diferentes propriedades e características avaliadas ao longo desse estudo.

Os resultados mostraram que a atividade é de fato influenciada pela introdução dos organosilanos. A interação dos grupos orgânicos diretamente com os compostos imobilizados pode afetar a atividade regulando o balanço entre sua retenção/liberação e/ou alterando sua identidade e propriedades. A presença dos organosilanos pode também afetar a atividade por modificações na matriz. Isso ocorre em termos de compatibilização da matriz com o meio, o que será benéfico para atividade e também em termos de regular acesso de reagentes/estímulos externos às moléculas encapsuladas. O estudo das diferentes aplicações também permitiu a avaliação de ajuste da atividade das moléculas encapsuladas também do ponto de vista de diferentes rotas sol-gel. Utilizou-se uma rota específica para cada aplicação em questão de modo a obter a melhor performance e/ou manter as propriedades da molécula encapsulada.

É importante ressaltar que o emprego de diferentes rotas implica em materiais com características bastante distintas. Entretanto, foi possível observar que algumas características parecem ser dependentes da rota escolhida, enquanto outras aparentam ser influenciadas de forma mais efetiva pelo próprio organosilano. Nesse caso, embora continue-se observando o efeito da rota, é possível identificar uma mesma tendência dependente do organosilano dentro de cada grupo estudado. Em termos de teor encapsulado, observou-se que a interação com o organosilano pode ser definitiva, independente da rota, e isso se reflete também na manutenção da estrutura e funcionalidade da molécula alvo. Já em se tratando da estrutura e textura dos materiais, nota-se que a estrutura de rede e área também parecem ser muito influenciados pelo organosilano empregado. Finalmente, para a microestrutura e morfologia, observa-se que a rota em si foi determinante para os resultados, não sendo possível observar uma tendência em relação aos híbridos.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernardos, A. and L. Kourimska, *Applications of Mesoporous Silica Materials in Food - a Review*. Czech Journal of Food Sciences, 2013. **31**(2): p. 99-107.
2. Horst, H.K., *Colloidal Silica. Fundamentals and Applications*, ed. W.O.R. H.C. Bergna. 2006, Boca Raton: Taylor & Francis.
3. Tang, F., L. Li, and D. Chen, *Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery*. Advanced Materials, 2012. **24**(12): p. 1504-1534.
4. Yang, L., et al., *Film-forming behavior and mechanical properties of colloidal silica/polymer latex blends with high silica load*. Journal of Applied Polymer Science, 2013. **129**(3): p. 1434-1445.
5. Keller, A.A., et al., *Global life cycle releases of engineered nanomaterials*. Journal of Nanoparticle Research, 2013. **15**(6).
6. Schubert, U., Hüsing, N., *Synthesis of inorganic materials*. 2005, Weinheim: Wiley.
7. Brinker, C.J., Scherer, G.W., *Sol-gel science - The physics and chemistry of sol-gel processing*. 1990, San Diego: Academic Press Inc.
8. Kickelbick, G., *Hybrid materials synthesis, characterization and applications. Introduction to hybrid materials*. 2007, Weinheim: Wiley.
9. Fisch, A.G., et al., *Immobilization of metallocene within silica-titania by a non-hydrolytic sol-gel method*. Applied Catalysis a-General, 2009. **354**(1-2): p. 88-101.
10. Capeletti, L.B., *Efeitos da rota sol-gel no encapsulamento de indicadores colorimétricos e fluorimétricos e em suas performances como sensores de pH e gás amônia*, in *PPGQ*. 2010, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.
11. Morais, E.C., *Sílicas sintetizadas por impressão molecular para adsorção/pré-concentração de fármacos* in *PGCIMAT*. 2011, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre.

12. Vioux, A., Mutin, P.H, *Handbook of sol-gel science and technology: processing, characterization and applications*. Vol. Volume I: Sol-gel Processing. 2004, New York: Kluwer Academic Publishers.
13. Hench, L.L. and J.K. West, *The sol-gel process*. Chemical Reviews, 1990. **90**(1): p. 33-72.
14. Vansant, E.F., Van der Voort, P. , Vrancken, K. , *Characterization and chemical modification of the silica surface*. Vol. 93. 1995, Amsterdam: Elsevier.
15. Stober, W., Fink, A., Bohn, E., *Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in Micron Size Range*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. **26**(1): p. 62-69.
16. Avnir, D., et al., *Recent bio-applications of sol-gel materials*. Journal of Materials Chemistry, 2006. **16**(11): p. 1013-1030.
17. Bourget, L., et al., *Non-hydrolytic sol-gel routes to silica*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1998. **242**(2-3): p. 81-91.
18. Eggins, B.R., *Chemical sensors and biosensors*. 2002, Chinchester: John Wiley & Sons.
19. Fan, H.T., X.T. Sun, and W.X. Li, *Sol-gel derived ion-imprinted silica-supported organic-inorganic hybrid sorbent for selective removal of lead(II) from aqueous solution*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. **72**(1): p. 144-155.
20. Li, B., et al., *Water-compatible silica sol-gel molecularly imprinted polymer as a potential delivery system for the controlled release of salicylic acid*. Journal of Molecular Recognition, 2014. **27**(9): p. 559-565.
21. Wang, G.H. and L.M. Zhang, *A biofriendly sol-gel route to new hybrid gels for enzyme encapsulation*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. **72**(1): p. 85-91.
22. Perumal, S., S.K. Ramadass, and B. Madhan, *Sol-gel processed mupirocin silica microspheres loaded collagen scaffold: A synergistic bio-composite for wound healing*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **52**: p. 26-33.
23. Perullini, M., et al., *Sol gel silica platforms for microalgae-based optical biosensors*. Journal of Biotechnology, 2014. **179**: p. 65-70.

24. Hui, C.Y., Y.F. Li, and J.D. Brennan, *Fluorescence Analysis of the Properties of Structure-Switching DNA Aptamers Entrapped in Sol-Gel-Derived Silica Materials*. Chemistry of Materials, 2014. **26**(5): p. 1896-1904.
25. Gamero-Quijano, A., et al., *Modulation of the Silica Sol-Gel Composition for the Promotion of Direct Electron Transfer to Encapsulated Cytochrome c*. Langmuir, 2014. **30**(34): p. 10531-10538.
26. Zou, L.P., et al., *An Abrasion-Resistant and Broadband Antireflective Silica Coating by Block Copolymer Assisted Sol-Gel Method*. Langmuir, 2014. **30**(34): p. 10481-10486.
27. Cai, S., et al., *Sol-Gel Preparation of Hydrophobic Silica Antireflective Coatings with Low Refractive Index by Base/Acid Two-Step Catalysis*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014. **6**(14): p. 11470-11475.
28. Adelkhani, H., S. Nasoodi, and A.H. Jafari, *Corrosion protection properties of silica coatings formed by sol-gel method on Al: The effects of acidity, withdrawal speed, and annealing temperature*. Progress in Organic Coatings, 2014. **77**(1): p. 142-145.
29. Peng, S.S., et al., *Performance evaluation of mercapto functional hybrid silica sol-gel coating on copper surface*. Surface & Coatings Technology, 2014. **251**: p. 135-142.
30. Gao, F., et al., *Facile synthesis and luminescence properties of europium(III)-doped silica nanotubes*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. **71**(2): p. 313-323.
31. Lin, C.M., et al., *Synthesis and luminescence properties of Eu(III)-doped silica nanorods based on the sol-gel process*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. **69**(3): p. 536-543.
32. Szpikowska-Sroka, B., et al., *Energy transfer from Gd<sup>3+</sup> to Eu<sup>3+</sup> in silica xerogels*. Journal of Luminescence, 2014. **154**(0): p. 290-293.
33. Membreno, D., L. Smith, and B. Dunn, *Silica sol-gel chemistry: creating materials and architectures for energy generation and storage*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. **70**(2): p. 203-215.
34. Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., *Chemical Sensors Definitions and Classification*. Pure & Applied Chemistry, 1991. **63**(9): p. 1247-1250.

35. Wolfbeis, O.S., Reisfeld, R. , Oehme, I. , *Sol-Gels and Chemical Sensors. Structure and Bonding*. Vol. 85. 1996, Berlin: Springer-Verlag.
36. Alqasameh, M., et al., *A Large Response Range Reflectometric Urea Biosensor Made from Silica-Gel Nanoparticles*. *Sensors*, 2014. **14**(7): p. 13186-13209.
37. El-Nahhal, I.M., et al., *Sol-gel encapsulation of bromothymol blue pH indicator in presence of Gemini 12-2-12 surfactant*. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2014. **71**(1): p. 16-23.
38. LaGasse, M.K., et al., *Colorimetric sensor arrays: Interplay of geometry, substrate and immobilization*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014. **197**: p. 116-122.
39. Samadi-Maybodi, A. and V. Rezaei, *A new sol-gel optical sensor with nonporous structure for determination of trace zinc*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014. **199**: p. 418-423.
40. Korzeniowska, B., et al., *Intracellular pH-Sensing Using Core/Shell Silica Nanoparticles*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2014. **10**(7): p. 1336-1345.
41. Reddaiah, K. and T.M. Reddy, *Electrochemical biosensor based on silica sol-gel entrapment of horseradish peroxidase onto the carbon paste electrode toward the determination of 2-aminophenol in non-aqueous solvents: A voltammetric study*. *Journal of Molecular Liquids*, 2014. **196**: p. 77-85.
42. Zhang, H.R., et al., *Sol-Gel-Derived Highly Sensitive Optical Oxygen Sensing Materials Using Ru(II) Complex via Covalent Grafting Strategy*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014. **14**(6): p. 4615-4621.
43. Albanese, D., et al., *Optimisation of Glucose Biosensors Based on Sol-Gel Entrapment and Prussian Blue-Modified Screen-Printed Electrodes for Real Food Analysis*. *Food Analytical Methods*, 2014. **7**(5): p. 1002-1008.
44. Maroneze, C.M., et al., *Electroactive Properties of 1-propyl-3-methylimidazolium Ionic Liquid Covalently Bonded on Mesoporous Silica Surface: Development of an Electrochemical Sensor Probed for NADH, Dopamine and Uric Acid Detection*. *Electrochimica Acta*, 2014. **123**: p. 435-440.

45. Motorina, A., et al., *Hybrid silica-polyelectrolyte films as optical sensing materials for tetracycline antibiotics*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2014. **200**: p. 198-205.
46. Capeletti, L., J. Dos Santos, and E. Moncada, *Dual-target sensors: the effect of the encapsulation route on pH measurements and ammonia monitoring*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2012: p. 1-10.
47. Capeletti, L.B., et al., *The effect of the sol-gel route on the characteristics of acid-base sensors*. Sens Actuators B, 2010. **151**(1): p. 169-176.
48. Kowada, Y., Ozeki, T., Minami, T., *Preparation of silica-gel film with pH indicators by the sol-gel method*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2005. **33**(2): p. 175-185.
49. Vallet-Regí, M., F. Balas, and D. Arcos, *Mesoporous Materials for Drug Delivery*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(40): p. 7548-7558.
50. Bhattacharyya, S., et al., *Sol-gel silica controlled release thin films for the inhibition of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Biomaterials, 2014. **35**(1): p. 509-517.
51. Correa, G.G., et al., *Effects of the sol-gel route on the structural characteristics and antibacterial activity of silica-encapsulated gentamicin*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2014. **116**: p. 510-517.
52. Yang, P.P., S.L. Gai, and J. Lin, *Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(9): p. 3679-3698.
53. Natarajan, S.K. and S. Selvaraj, *Mesoporous silica nanoparticles: importance of surface modifications and its role in drug delivery*. Rsc Advances, 2014. **4**(28): p. 14328-14334.
54. Santamaria, E., et al., *Controlled release of ibuprofen by meso-macroporous silica*. Journal of Solid State Chemistry, 2014. **210**(1): p. 242-250.
55. Doadrio, J.C., et al., *Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern*. Journal of Materials Chemistry, 2006. **16**(5): p. 462-466.

56. Yang, Q., et al., *pH-Responsive Carrier System Based on Carboxylic Acid Modified Mesoporous Silica and Polyelectrolyte for Drug Delivery*. Chemistry of Materials, 2005. **17**(24): p. 5999-6003.
57. Kaminsky, W., *Polymerization catalysis*. Catalysis Today, 2000. **62**(1): p. 23-34.
58. Fisch, A., et al., *Immobilization of zirconocene into silica prepared by non-hydrolytic sol-gel method*. Macromolecular Symposia, 2006. **245**: p. 77-86.
59. Fisch, A.G., et al., *Investigation of silica particle structure containing metallocene immobilized by a sol-gel method*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2008. **354**(33): p. 3973-3979.
60. Fisch, A.G., et al., *Immobilization of zirconocene within silica-tungsten by entrapment: Tuning electronic effects of the support on the supported complex*. Applied Catalysis a-General, 2009. **370**(1-2): p. 114-122.
61. Bernardes, A.A., et al., *Synthesis and characterization of SiO<sub>2</sub>-CrO<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub>-MoO<sub>3</sub>, and SiO<sub>2</sub>-WO<sub>3</sub> mixed oxides produced using the non-hydrolytic sol-gel process*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. **69**(1): p. 72-84.
62. Fisch, A.G., et al., *Direct production of ultra-high molecular weight polyethylene with oriented crystalline microstructures*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2013. **366**(0): p. 74-83.
63. Inzunza, D., et al., *Synthesis of nanostructured porous silica coatings on titanium and their cell adhesive and osteogenic differentiation properties*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014. **102**(1): p. 37-48.
64. Laranjeira, M.S., et al., *Modulation of human dermal microvascular endothelial cell and human gingival fibroblast behavior by micropatterned silica coating surfaces for zirconia dental implant applications*. Science and Technology of Advanced Materials, 2014. **15**(2): p. 11.
65. Donesz-Sikorska, A., et al., *The influence of sol-gel-derived silica coatings functionalized with betamethasone on adipose-derived stem cells (ASCs)*. Journal of Biomaterials Applications, 2014. **29**(3): p. 465-476.
66. Abidian, M.R. and D.C. Martin, *Multifunctional Nanobiomaterials for Neural Interfaces*. Advanced Functional Materials, 2009. **19**(4): p. 573-585.

67. Aman, J.E., et al., *Subthalamic nucleus deep brain stimulation improves somatosensory function in Parkinson's disease*. *Movement Disorders*, 2014. **29**(2): p. 221-228.
68. Gradinaru, V., et al., *Optical Deconstruction of Parkinsonian Neural Circuitry*. *Science*, 2009. **324**(5925): p. 354-359.
69. Stefani, A., et al., *Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease*. *Brain*, 2007. **130**(6): p. 1596-1607.
70. Hochberg, L.R., et al., *Neuronal ensemble control of prosthetic devices by a human with tetraplegia*. *Nature*, 2006. **442**(7099): p. 164-171.
71. Millán, J.d.R., et al., *Combining Brain–Computer Interfaces and Assistive Technologies: State-of-the-Art and Challenges*. *Frontiers in Neuroscience*, 2010. **4**(161): p. 1-15.
72. Tang-Schomer, M.D., et al., *Film-Based Implants for Supporting Neuron–Electrode Integrated Interfaces for The Brain*. *Advanced Functional Materials*, 2014. **24**(13): p. 1938-1948.
73. Marin, C. and E. Fernandez, B. F, 2010. **3**(8): p. 1-6.
74. Seymour, J.P. and D.R. Kipke, *Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS*. *Biomaterials*, 2007. **28**(25): p. 3594-3607.
75. Tien, L.W., et al., *Silk as a Multifunctional Biomaterial Substrate for Reduced Glial Scarring around Brain-Penetrating Electrodes*. *Advanced Functional Materials*, 2013. **23**(25): p. 3185-3193.
76. Hickman, G.J., et al., *Fabrication, characterisation and performance of hydrophilic and super-hydrophilic silica as cell culture surfaces*. *Journal of Materials Chemistry*, 2012. **22**(24): p. 12141-12148.
77. Pierce, A.L., et al., *Thin-film silica sol–gel coatings for neural microelectrodes*. *Journal of Neuroscience Methods*, 2009. **180**(1): p. 106-110.
78. Jedlicka, S.S., et al., *Sol-gel derived materials as substrates for neuronal differentiation: effects of surface features and protein conformation*. *Journal of Materials Chemistry*, 2006. **16**(31): p. 3221-3230.

79. Schubert, U., N. Huesing, and A. Lorenz, *Hybrid Inorganic-Organic Materials by Sol-Gel Processing of Organofunctional Metal Alkoxides*. Chemistry of Materials, 1995. **7**(11): p. 2010-2027.
80. Zhang, X.-X., et al., *Template-Free Sol-Gel Preparation of Superhydrophobic ORMOSIL Films for Double-Wavelength Broadband Antireflective Coatings*. Advanced Functional Materials, 2013. **23**(35): p. 4361-4365.
81. Wu, L.-K., J.-M. Hu, and J.-Q. Zhang, *One step sol-gel electrochemistry for the fabrication of superhydrophobic surfaces*. Journal of Materials Chemistry A, 2013. **1**(46): p. 14471-14475.
82. Detty, M.R., et al., *Environmentally Benign Sol-Gel Antifouling and Foul-Releasing Coatings*. Accounts of Chemical Research, 2014. **47**(2): p. 678-687.
83. Eder, F. and N. Hüsing, *Mesoporous silica layers with controllable porosity and pore size*. Applied Surface Science, 2009. **256**(3, Supplement): p. S18-S21.
84. Ehlert, N., et al., *Mesoporous silica films as a novel biomaterial: applications in the middle ear*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(9): p. 3847-3861.
85. Polikov, V.S., P.A. Tresco, and W.M. Reichert, *Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes*. Journal of Neuroscience Methods, 2005. **148**(1): p. 1-18.
86. Grill, W.M., S.E. Norman, and R.V. Bellamkonda, *Implanted Neural Interfaces: Biochallenges and Engineered Solutions*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2009. **11**(1): p. 1-24.
87. He, W. and R.V. Bellamkonda, *Nanoscale neuro-integrative coatings for neural implants*. Biomaterials, 2005. **26**(16): p. 2983-2990.
88. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-156.
89. Lee, J.Y. and C.E. Schmidt, *Pyrrrole-hyaluronic acid conjugates for decreasing cell binding to metals and conducting polymers*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(11): p. 4396-4404.
90. Krsko, P., et al., *Length-scale mediated adhesion and directed growth of neural cells by surface-patterned poly(ethylene glycol) hydrogels*. Biomaterials, 2009. **30**(5): p. 721-729.

91. Leirose, G.D.S. and M.B. Cardoso, *Silica-Maltose Composites: Obtaining Drug Carrier Systems Through Tailored Ultrastructural Nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **100**(7): p. 2826-2834.
92. Fisch, A., et al., *Immobilization of Zirconocene into Silica Prepared by Non-Hydrolytic Sol-Gel Method*. Macromolecular Symposia, 2006. **245-246**(1): p. 77-86.
93. Lacatusu, I., et al., *Vegetal nanoclusters in hybrid silica films prepared by sol-gel spin coating technique*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2011. **357**(7): p. 1716-1723.
94. Horcas, I., et al., *WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*. Review of Scientific Instruments, 2007. **78**(1): p. -.
95. Rao, C.N.R., *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*. 1975, London: Butter-worth.
96. Zaggout, F.R., Qarraman, A., Zourab, S. M., *Behavior of immobilized Alizarin Red S into sol-gel matrix as pH sensor*. Materials Letters, 2007. **61**(19-20): p. 4192-4195.
97. Ohsaka, T., et al., *Charge-transport rates in polyelectrolyte films on electrodes: Disparate diffusion coefficients for alizarin red S with two separate electroactive centers*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1988. **247**(1-2): p. 339-343.
98. Revenga, J., Rodriguez, F., Tijero, J., *Study of the Redox Behavior of Anthraquinone in Aqueous-Medium*. Journal of the Electrochemical Society, 1994. **141**(2): p. 330-333.
99. Zittel, H.E., Florence, T. M. , *Voltammetric and spectrophotometric study of the zirconium-Alizarine Red S complex*. Analytical Chemistry, 1967. **39**(3): p. 320-326.
100. Capeletti, L.B., et al., *Encapsulated alizarin red species: The role of the sol-gel route on the interaction with silica matrix*. Powder Technology, 2013. **237**(0): p. 117-124.
101. Fidalgo, A., et al., *Role of the alkyl-alkoxide precursor on the structure and catalytic properties of hybrid sol-gel catalysts*. Chemistry of Materials, 2005. **17**(26): p. 6686-6694.

102. Fidalgo, A. and L.M. Ilharco, *The defect structure of sol-gel-derived silica/polytetrahydrofuran hybrid films by FTIR*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2001. **283**(1-3): p. 144-154.
103. Lee, E.L. and I.E. Wachs, *In situ spectroscopic investigation of the molecular and electronic Structures of SiO<sub>2</sub> supported surface metal oxides*. Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(39): p. 14410-14425.
104. Almeida, R.M., *Handbook of sol-gel science and technology: processing, characterization and applications*. Vol. Volume II: characterization of sol-gel materials and products. 2004, New York: Kluwer Academic Press.
105. Morrow, B.A. and D.T. Molapo, *Infrared Studies of Chemically Modified Silica*, in *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications* H.E. Bergna and W.O. Roberts, Editors. 2005, CRC Press: Boca Raton. p. 287-310.
106. Almeida, R.M., Guiton, T. A., Pantano, C. G., *Detection of LO Mode in V-SiO<sub>2</sub> by Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1990. **119**(2): p. 238-241.
107. Fidalgo, A., Ilharco, L. M., *Chemical tailoring of porous silica xerogels: Local structure by vibrational spectroscopy*. Chemistry-a European Journal, 2004. **10**(2): p. 392-398.
108. Colthup, N.B., L.h. Daly, and S.E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Third ed. 1990, San Diego: Academic Press.
109. G.E. Maciel, I.-S.C., *Multinuclear NMR Studies of Silica Surfaces*, in *Colloidal Silica - Fundamentals and Applications*, W.O.R. H.E. Bergna, Editor. 2006, CRC Press: Boca Raton.
110. Wei, L.M., et al., *Functionalized self-assembled monolayers on mesoporous silica nanoparticles with high surface coverage*. Nanoscale Research Letters, 2012. **7**.
111. Settle, F.A., *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Infrared Spectroscopy, ed. C.-P.S. Hsu. 1997, Upper Saddle River: Prentice Hall.
112. Frohlich, E., *The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, 2012. **7**: p. 5577-5591.

113. Jesionowski, T., F. Ciesielczyk, and A. Krysztafkiewicz, *Influence of selected alkoxy silanes on dispersive properties and surface chemistry of spherical silica precipitated in emulsion media*. *Materials Chemistry and Physics*, 2010. **119**(1-2): p. 65-74.
114. Hussain, S.M., et al., *Toxicity Evaluation for Safe Use of Nanomaterials: Recent Achievements and Technical Challenges*. *Advanced Materials*, 2009. **21**(16): p. 1549-1559.
115. Soenen, S.J., et al., *Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation*. *Nano Today*, 2011. **6**(5): p. 446-465.
116. Capeletti, L.B., et al., *Tailored Silica–Antibiotic Nanoparticles: Overcoming Bacterial Resistance with Low Cytotoxicity*. *Langmuir*, 2014. **30**(25): p. 7456-7464.
117. Mager, M.D., V. LaPointe, and M.M. Stevens, *Exploring and exploiting chemistry at the cell surface*. *Nat Chem*, 2011. **3**(8): p. 582-589.
118. Jeff Errington, M.C., Scott J. Hultgren, Michael Caparon, *Cells*. 2007, Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.
119. Turunen, J.P.J. and T.T. Pakkanen, *Characterization of stepwise prepared, silica supported zirconocene catalysts designed for olefin polymerization*. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2007. **263**(1–2): p. 1-8.
120. Silveira, F., et al., *Effect of the silica texture on grafting metallocene catalysts*. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2007. **265**(1–2): p. 167-176.
121. Debecker, D.P. and P.H. Mutin, *Non-hydrolytic sol-gel routes to heterogeneous catalysts*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(9): p. 3624-3650.
122. Debecker, D.P., V. Hulea, and P.H. Mutin, *Mesoporous mixed oxide catalysts via non-hydrolytic sol-gel: A review*. *Applied Catalysis A: General*, 2013. **451**(0): p. 192-206.
123. Casas, E., R. van Grieken, and J.M. Escola, *Polymerization of ethylene with (nBuCp)<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub> supported over mesoporous SBA-15 functionalized with sulfonic acid groups*. *Applied Catalysis A: General*, 2012. **437–438**(0): p. 44-52.

124. Carrero, A., R. van Grieken, and B. Paredes, *Hybrid zeolitic-mesostructured materials as supports of metallocene polymerization catalysts*. *Catalysis Today*, 2012. **179**(1): p. 115-122.
125. dos Santos, J.H.Z., et al., *Organosilicon-modified silicas as support for zirconocene catalyst*. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2000. **154**(1–2): p. 103-113.
126. Roach, P., et al., *Surface strategies for control of neuronal cell adhesion: A review*. *Surface Science Reports*, 2010. **65**(6): p. 145-173.
127. Faucheux, N., et al., *Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies*. *Biomaterials*, 2004. **25**(14): p. 2721-2730.
128. Wang, J.-H., et al., *Change in neuron aggregation and neurite fasciculation on EVAL membranes modified with different diamines*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010. **94A**(2): p. 489-498.
129. Young, T.-H. and W.-W. Hu, *Covalent bonding of lysine to EVAL membrane surface to improve survival of cultured cerebellar granule neurons*. *Biomaterials*, 2003. **24**(8): p. 1477-1486.
130. Xu, L.C. and C.A. Siedlecki, *Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces*. *Biomaterials*, 2007. **28**(22): p. 3273-3283.
131. Ren, Y.-J., et al., *In vitro behavior of neural stem cells in response to different chemical functional groups*. *Biomaterials*, 2009. **30**(6): p. 1036-1044.
132. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker, *THE ESTABLISHMENT OF POLARITY BY HIPPOCAMPAL-NEURONS IN CULTURE*. *Journal of Neuroscience*, 1988. **8**(4): p. 1454-1468.
133. Gertz, C.C., et al., *Accelerated neuritogenesis and maturation of primary spinal motor neurons in response to nanofibers*. *Developmental Neurobiology*, 2010. **70**(8): p. 589-603.
134. Kidambi, S., I. Lee, and C. Chan, *Primary Neuron/Astrocyte Co-Culture on Polyelectrolyte Multilayer Films: A Template for Studying Astrocyte-Mediated Oxidative Stress in Neurons*. *Advanced Functional Materials*, 2008. **18**(2): p. 294-301.

135. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends in Neurosciences, 2009. **32**(12): p. 638-647.

136. Fawcett, J.W. and R.A. Asher, *The glial scar and central nervous system repair*. Brain Research Bulletin, 1999. **49**(6): p. 377-391.