



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**APRISIONAMENTO DE MALTOSE EM
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA:
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO**

Glauca Danielle Leirose da Silva

**Belo Horizonte-MG
2010**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO
TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**APRISIONAMENTO DE MALTOSE EM
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA:
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO**

Glauca Danielle Leirose da Silva

Monografia de graduação apresentada ao Departamento de Química do CEFET-MG como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II) para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia

Co-Orientador: Dr. Mateus Borba Cardoso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia

Dr. Mateus Borba Cardoso

Prof. Dr. Claudinei Rezende Calado

Monografia aprovada em

**Belo Horizonte-MG
2010**

AGRADECIMENTOS

A Deus, o primeiro que me amou, Aquele que me fez crer, enxergar e conquistar. Agradecer é pouco diante do que tenho recebido. Te honrarei com minha vida enquanto eu viver. Este trabalho é Teu, meu mestre, meu amigo, te amo.

Aos meus pais, agradeço a Deus por tê-los em minha vida. Conviver com vocês é uma dádiva, um contínuo e feliz aprendizado. Obrigada por estarem sempre comigo, vocês não sabem o quanto são essenciais na minha vida. Admiro muito vocês. Esta vitória é nossa, amo vocês.

Ao meu irmão, obrigada por estar sempre comigo. Melhor irmão não existe, amo você.

Aos meus avós, vocês fazem muita falta, espero que tenham se orgulhado de mim.

A todos meus tios, primos, cunhada, obrigada por estarem sempre perto.

A todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado. Ao amigos-irmão da igreja, obrigado por estarem comigo durante todo este trajeto.

Aos amigos e colegas da faculdade, foi muito bom esse convívio com vocês. Em especial ao Davidson, Bela, Thi, Camilinha, Fê, Jú, Cris, Bruno, Breno e Meri.

Ao Dr. Mateus por todo ensino, apoio e amizade.

Ao Prof^o. Dr. Cleverson por toda orientação e suporte.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton pela oportunidade e uso das instalações. Obrigada a todos os pesquisadores e funcionários que de alguma forma me ajudaram.

LISTA DE ABREVIATURAS

BET - Brunauer, Emmett e Teller

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MSM - Micropartículas mesoporosas de sílica

MSN - Nanopartículas mesoporosas de sílica

R_g - Raio de giro

SAXS - Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos

S_{BET} - área superficial

TEOS - Tetraetilortossilicato

TMOS - Tetrametilortossilicato

Uv-Vis - Ultravioleta - visível

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Figura 1. Esquema representativo da polimerização sol-gel do tipo "template".

Figura 2. Diagrama dos níveis de energia de orbitais moleculares e possíveis transições entre os orbitais.

Figura 3. Representação química da reação entre açúcares redutores e o DNS.

Figura 4. Representação esquemática do volume de nitrogênio adsorvido durante o ensaio de adsorção isotérmica.

Figura 5. Curva de calibração da maltose.

Figura 6. Representação em barras do rendimento do encapsulamento de maltose dos compósitos sintetizados.

Figura 7. Micrografias eletrônicas de varredura dos compósitos sintetizados com soluções de maltose de concentração (m/V) igual a: **(A)** 0 %; **(B)** 1 %; **(C)** 10 %; **(D)** 20 %; **(E)** 40 % e **(F)** 50 %.

Figura 8. **(A)** Representação em barras da distribuição do diâmetro das partículas e suas distribuições Gaussianas: barras vermelhas (1% de maltose), barras laranja (20% de maltose) e barras verdes (50% de maltose). **(B)** Relação entre a média (azul), o desvio padrão do diâmetro das partículas (verde) e a concentração inicial de maltose (% m/V).

Figura 9. Perfis de SAXS (círculos abertos) dos compósitos sintetizados com **(A)** 1 e **(B)** 50% (m/V) de solução de maltose. O ajuste unificado nas linhas vermelhas e os dois níveis ajustados são apresentados nas linhas verdes e nas linhas azuis.

Figura 10. Dependência do raio de giro (R_g) obtido pelo ajuste unificado com a concentração de maltose usada nas sínteses dos compósitos.

Figura 11. **(A)** Perfil da isoterma de nitrogênio do compósito sintetizado com 20% (m/V) de solução de maltose. **(B)** Área superficial, S_{BET} , para compósitos sintetizados com soluções de diferentes concentrações de maltose.

Figura 12. **(A)** Representação da esfera do compósito de sílica-maltose visto nas imagens de MEV. **(B)** Desenho esquemático da borda do compósito formado por esferas de sílica fundamentais.

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Lista de Abreviaturas	ii
Lista de Figuras	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Sistema de Liberação de Fármacos	2
2.2 Processo Sol-Gel	4
2.3 Métodos Instrumentais de Caracterização de Compósitos	6
<i>2.3.1 Espectroscopia UV-Vis</i>	<i>6</i>
<i>2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	<i>8</i>
<i>2.3.3 Adsorção-dessorção de Nitrogênio</i>	<i>9</i>
<i>2.3.4 Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos</i>	<i>11</i>
3. EXPERIMENTAL	13
3.1. Materiais	13
3.2. Síntese dos compósitos sílica-maltose	13
3.3. Espectroscopia UV-Vis	13
3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	14
3.5. Isotermas de N₂	15
3.6. Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos (SAXS)	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Eficiência do Encapsulamento	17
4.2. Morfologia e Estrutura do Compósito Sílica-Maltose	18
4.3 Avaliação do Processo de Síntese	24
5. CONCLUSÃO	27

1. INTRODUÇÃO

Materiais mesoporosos preparados com *templates* surfactantes foram reportados pela primeira vez em 1992. Tais materiais têm grande aplicabilidade em sistemas de liberação de fármacos devido a sua grande área superficial e poros nanométricos. O uso de *templates* durante sua síntese possibilita o controle do tamanho de sua estrutura e do tamanho dos poros. Entre os materiais mesoporosos, a sílica tem demonstrado altos valores de adsorção e utilidade como plataforma de liberação de proteínas.

A dificuldade no uso de surfactantes é a sua remoção para liberação dos poros, sendo os métodos mais usados a calcinação e a remoção por solventes. A calcinação pode alterar a estrutura do material e a remoção por solvente pode gerar resíduos indesejáveis, além de demandar longos períodos de tempo.

Pesquisas têm sido desenvolvidas buscando minimizar as limitações da remoção dos surfactantes, tal como sua substituição por carboidratos, facilmente removidos com água e isentos de resíduos após o processo.

Para a avaliação da aplicabilidade de nanopartículas mesoporosas de sílica, como sistema de liberação de drogas, é necessário conhecer sua organização e estrutura. A elucidação estrutural desses materiais oferece grandes oportunidades de obtenção de compostos biologicamente ativos com propriedades controláveis que podem ser eventualmente utilizados para fins de liberação de fármacos.

No presente trabalho procurou-se investigar o efeito da presença do carboidrato maltose sobre o material de síntese, a fim de compreender a organização ultra-estrutural do compósito para futura combinação deste método de preparação juntamente com drogas ativas. A espectroscopia UV-Visível foi utilizada para avaliar o rendimento do encapsulamento da maltose na síntese. Em seguida, as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, adsorção-dessorção de nitrogênio e o espalhamento de raios-X a baixos ângulos foram usadas para entender como a maltose presente afetou a estrutura do compósito, e para reconstruir a organização multi-nível das partículas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas de Liberação de Fármacos

Nanopartículas mesoporosas de sílica (MSN) tem se mostrado como alternativas promissoras para a liberação de drogas e genes (VALEET-REGI, 2010; SLOWING, 2008; VALLET-REGI, 2007). Essas MSN's são particularmente interessantes para finalidade médica baseado em suas características, como sua grande área superficial, volume de poros e biocompatibilidade com o corpo humano (BECK, 1992; ZHAO, 1988; YING, 1999; LIONG, 2009). Devido à sua superfície relativamente grande e ao tamanho de seus poros, MSN's estão aptos a absorver e transportar moléculas específicas como drogas, sondas e proteínas (BERNE, 2006; IZQUIERDO-BARBA, 2009; BALAS, 2006; HORCAJADA, 2004; GIRI, 2005; TREWYN, 2005; NAIK, 2004; LUCKARIFT, 2004; LUCKARIFT, 2006).

Segundo De Jong (2008), embora a definição indique que nanopartículas são estruturas que apresentam dimensões menores que 100 nm, na área de liberação de drogas estruturas de tamanhos maiores são necessárias a fim de aumentar a quantidade de substância transportada. Por esse motivo, enquanto micropartículas de sílica mesoporosas (MSM) podem ser usadas para diversas aplicações não biológicas, seu uso na biotecnologia e em processos biomédicos é dificultado devido seu grande tamanho. Por exemplo, células de mamíferos não engolfam eficientemente partículas micrométricas via endocitose, o que impede a utilização de MSM's como agente de liberação de drogas intracelular (SLOWING, 2008). Além disso, como o tamanho dos MSM's é comparável ao tamanho de bactérias, a utilização *in vivo* pode desencadear a resposta imune aguda (SLOWING, 2008). Desta forma, a abordagem da síntese MSN tem-se centrado na obtenção de materiais compósitos que podem ser ajustados (100-300 nm), devido a sua fácil endocitose por células animais e vegetais sem citotoxicidade significativa (MAYOR, 2007; REJMAN, 2004). A grande vantagem das MSN's quando comparadas a outras bases de polímeros carreadores é sua alta estabilidade à mudança de pH, *stress* mecânico e degradações por hidrólise induzida.

Modelos de direcionadores de estrutura e agentes dilatadores de poros vêm sendo usados para ajustar o diâmetro dos poros na faixa de nanômetros, a fim de sintetizar compósitos com elevado potencial no campo biomédico (VALLET-REGI, 2007; KRESGE, 1992; SLOWING, 2007; CHE, 2003).

Métodos de síntese que tenham utilizado meios básicos para catalisar a condensação da sílica, bem como tensoativos catiônicos ou não iônicos, como modelo para organização mesoestrutural, normalmente geram partículas com diâmetro de aproximadamente 150 nm e poros de diâmetro próximo a 2 nm (CAI, 2001; MURKHERJEE, 2009).

Além disso, dois ou mais componentes podem ser aprisionados tornando a partícula capaz de desempenhar várias funções ao mesmo tempo (LIONG, 2008, 2009). Por exemplo, MSN's tem sido utilizadas para o transporte e distribuição de drogas anticâncer em células cancerosas, enquanto um corante fluorescente covalentemente ligado é usado para localizar as partículas no interior das células (LU, 2007). No entanto, não se sabe exatamente os efeitos de cada componente na organização ultraestrutural quando dois ou mais estão aprisionados juntos.

Os métodos convencionais de preparação de MSN's produzem estruturas amorfas dentro de uma variedade de formas e tamanhos (SLOWING, 2008). Devido à natureza amorfa, controlar o tamanho e a polidispersão dos MSN's durante toda a síntese é o maior desafio para a obtenção de vetores apropriados para a liberação controlada de fármacos em sistemas biológicos. Como alternativa de controle de tamanho e poros, surfactantes, principalmente polímeros, têm sido amplamente utilizados como agentes direcionadores de estrutura (VALLET-REGI, 2007; SLOWING, 2006; TREBOSC, 2005; SIAOYING, 2002).

Portanto, a fim de incorporar drogas dentro das MSN's porosas, o surfactante deve ser removido da estrutura através da extração de solvente ou através da calcinação das MSN's. A extração por solvente é lenta, requer grande volume de solventes e, inevitavelmente, gera resíduos indesejáveis ao meio ambiente (HUANG, 2005; KUMAR, 2006). Por sua vez, o método de calcinação entre 500 a 900°C pode alterar as propriedades estruturais das MSN's e gerar impurezas tóxicas nos poros (GRUDZIEN, 2007; KLEITZ, 2003).

Como alternativa aos problemas citados, empregando carboidratos como agentes direcionadores de estrutura, torna-se desnecessária a remoção destes por solventes ou calcinações, já que estes podem ser removidos com água (MURKHERJEE, 2009). Além disso, apresenta-se a síntese sol-gel que permite um encapsulamento de alto rendimento onde o tamanho do compósito pode ser ajustado com a quantidade de componentes biocompatíveis presentes no meio reacional. A grande vantagem deste método é sua simplicidade através de um processo composto por uma única etapa, onde a síntese e o aprisionamento ocorrem concomitantemente.

2.2 Processo Sol-Gel

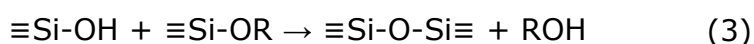
O processo sol-gel é um método de obtenção de materiais inorgânicos ou híbridos orgânico-inorgânicos no qual ocorrem as reações de hidrólise e condensação do precursor para a formação de partículas de tamanho coloidal (*sol*) na seqüência da rede tridimensional (*gel*) (SIMÊNCIO, 2009). O termo *sol* é empregado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100nm) estável em fluido, enquanto o termo *gel* pode ser visto como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios. A obtenção de materiais híbridos é possível devido ao processamento a baixas temperaturas, não havendo decomposição dos componentes orgânicos. O processo sol-gel pode ser dividido em duas classes, dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado: a dos sais e dos alcóxidos. Sendo a rota com precursores alcóxidos a mais utilizada (ALFAYA, 2002).

A reação global do processo sol-gel utilizando tetraalcóxido de silício está representada abaixo:



A reação (1) é dividida em duas etapas, hidrólise (2) e condensação (3, 4). A reação (2) evidencia a hidrólise do grupo alcóxido com a formação

de grupos reativos do tipo silanol. A condensação do grupo silanol (3, 4) leva inicialmente à formação da fase *sol* e, eventualmente, à formação da fase *gel*. Essas reações são complexas, pois hidrólises e condensações competem entre si, favorecendo mais de um tipo de produto.



Os tetraalcóxidosilanos mais utilizados são tetrametilortossilicato (TMOS) e tetraetilortossilicato (TEOS). Como alcóxidosilanos são imiscíveis em água, alcoóis são utilizados como solventes, além disso, atuam como reagentes devido a reversibilidade das reações. A mistura de tetraalcóxidosilanos em água e álcool pode reagir muito lentamente. Portanto, catalisadores ácidos ou básicos são necessários para a reação (SCHUBERT, 2005). Em geral, preparações com baixo valor de pH e baixo teor de água produzem materiais densos com tamanho médio de poros pequenos, enquanto o uso de valores altos de pH a altos teores de água produzem materiais mais porosos (ALFAYA, 2002).

A síntese de sílica pelo processo sol-gel leva a formação de esferas sólidas. É possível a dissolução de moléculas (*templates*) na solução precursora, assim a matriz do gel é formada ao redor dessas moléculas, como representado na Figura 1. A síntese do material e o aprisionamento do *template* ocorrem em uma etapa. Os materiais produzidos por essa técnica apresentam uniformidade na forma e no tamanho dos poros. Diversas moléculas são empregadas para este fim, tanto inorgânicas quanto orgânicas, como corantes, polímeros, compostos sensores, antibióticos e biomoléculas. Após a remoção da molécula hospedeira têm-se a produção de micro e meso poros regulares, disponíveis para serem ocupados por substâncias de interesse. Quando o processo sol-gel de alcóxidos é feito em solução de polímeros orgânicos, a rede inorgânica (formada pelo processo sol-gel) e a rede orgânica interpenetram, mas não se apresentam ligadas umas às outras (SCHUBERT, 2005; ALFAYA, 2002).

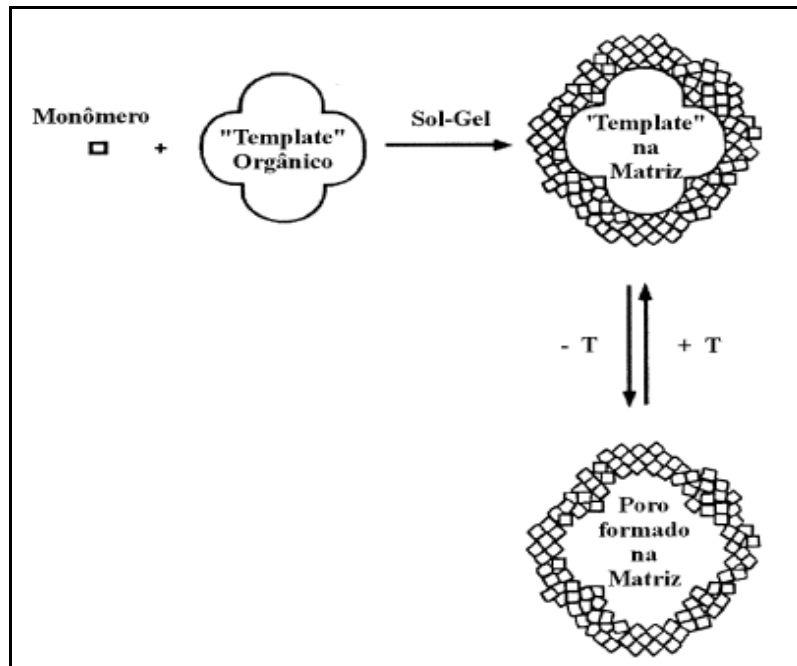


Figura 1. Esquema representativo da polimerização sol-gel do tipo "template" (ALFAYA, 2002).

2.3 Métodos Instrumentais de Caracterização de Compósitos

A utilização de materiais compósitos está crescendo em importância, quantidade e campos de aplicação. A sua caracterização requer o domínio de técnicas e critérios específicos. Os principais métodos utilizados para análise estrutural são: as microscopia eletrônica de varredura e transmissão, adsorção-dessorção de nitrogênio, espalhamento de raios-X a baixos ângulos. Para avaliação da encapsulação do carboidrato no compósito utiliza-se espectroscopia UV-Vis.

2.3.1 Espectroscopia UV-Vis

A região do espectro eletromagnético de comprimento de onda entre 200 a 400 nm é conhecida como ultravioleta próximo e a região entre 400 a 800nm como visível (GOMES, 2006).

A incidência de radiação eletromagnética provoca diversas transições eletrônicas, principalmente nos orbitais moleculares mais externos, denominados de camada de valência (banda de valência). As transições

eletrônicas entre esses orbitais moleculares dependerão de cada sistema e, principalmente, da energia necessária para levar o elétron do estado fundamental, para o estado excitado (Figura 2) (ORÉFICE, 2005).

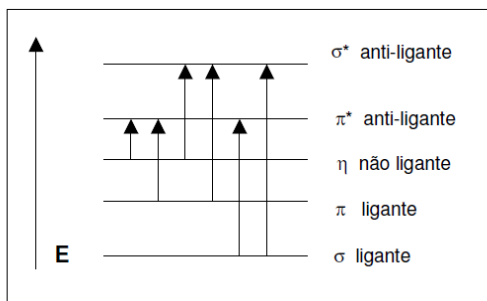


Figura 2. Representação de níveis de energia de orbitais moleculares e possíveis transições entre os orbitais (NARIMOTO, 2006).

Para compostos orgânicos, a absorção de radiação visível e de ultravioleta de maior comprimento de onda está restrita a um número limitado de grupos funcionais (chamados cromóforos) que contém elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas. A maioria das aplicações da espectroscopia de absorção está baseada em transições de elétrons n ou π para o estado excitado π^* , porque as energias necessárias para esses processos situam-se em uma região espectral experimentalmente conveniente (200 a 700nm). Ambas as transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π , os quais o termo cromóforo se aplica (SKOOG, 2002).

A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medida da transmitância ou absorvância de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho ótico. De forma comum, a concentração de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorvância (SKOOG, 2002). O método colorimétrico DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) é utilizado para quantificação de açúcares redutores em solução (SILVA, 2003), onde o DNS sofre redução de um de seus grupos nitro ao reagir com os açúcares redutores, que se oxidam (Figura 3).

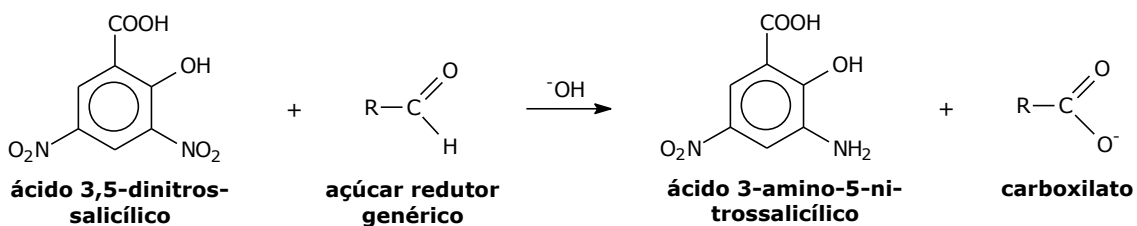


Figura 3. Representação química da reação entre açúcares redutores e o DNS (SILVA, 2003).

O composto formado apresenta forte absorção em 540 nm, possibilitando o uso da espectroscopia UV-Vis para medição de sua absorbância, sendo esta proporcional a concentração de açúcares redutores presentes na solução.

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

O desenvolvimento da microscopia eletrônica teve como principal desafio ultrapassar a barreira da resolução imposta pela luz visível. A substituição da radiação da luz por um fino feixe de elétrons possibilitou a obtenção de informações topográficas e morfológicas da amostra. Dessa forma, a microscopia eletrônica se tornou uma das principais ferramentas usadas na análise de materiais (SIMÊNCIO, 2009).

A grande vantagem da MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm, enquanto que no ótico é de 0,5 μm . Contudo, a MEV apresenta outros atributos que a torna tão utilizada na caracterização de materiais como a facilidade na preparação de amostras, obtenção de imagens de superfícies polidas ou rugosas, com profundidade de campo e alta resolução; fácil interpretação das imagens, com aparência tridimensional; aquisição de sinal digital, possibilitando processamento dos sinais, e manipulação e processamento das imagens; com o auxílio de acessórios e possibilidade de microanálises de elementos (MALISKA E MANNHEIMER, 2002).

A imagem obtida na microscopia eletrônica de varredura é denominada indireta, pois não existe um caminho ótico entre a amostra e a imagem, sendo os sistemas de geração e de visualização da imagem separados. Essa imagem é o mapeamento das interações que ocorrem

entre elétrons e a superfície da amostra. Para tal, a amostra é varrida por um feixe de elétrons primários gerado por efeito termoiônico, sendo o feixe acelerado através de uma diferença de potencial e colimado através de uma coluna óptico-eletrônica e conduzido à câmara que contém a amostra. Ao focalizar um ponto da amostra, o feixe de elétrons gera sinais que são captados e amplificados, fornecendo um sinal elétrico que gera a imagem final (ORÉFICE, 2005).

A versatilidade do microscópio eletrônico no estudo de materiais provém da ampla variedade de sinais gerados quando o feixe de elétrons interage com o sólido. Essas interações podem ser divididas em duas categorias: interações elásticas, que afetam a trajetória dos elétrons no feixe sem alterar significativamente as suas energias, e interações inelásticas, que resultam na transferência de parte ou de toda energia dos elétrons para o sólido. Na microscopia eletrônica de varredura para obtenção da imagem podem ser captados elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios-X característicos (MANNHEIMER, 2002; SKOOG, 2002; ORÉFICE, 2005).

A MEV tem sua maior aplicação no exame de superfícies rugosas (contraste topográfico), fornecendo informações morfológicas e topográficas necessárias para o estudo da estrutura fina e superfície de sólidos (MANNHEIMER, 2002). Além disso, por meio da observação das imagens, a técnica é freqüentemente utilizada para a medida do tamanho e polidispersão de partículas.

2.3.3 Adsorção-dessorção de Nitrogênio

As técnicas de adsorção gasosa envolvem, basicamente, a determinação da quantidade de gás necessária para formar uma camada monomolecular, devidamente ordenada, antes que tenha início a formação da segunda camada adsorvida na superfície analisada. Esta adsorção é denominada adsorção física ou fisissorção. Ela é reversível e sua energia liberada (calor de adsorção) é relativamente baixa, insuficiente para romper ligações químicas. Não é observada mudança estrutural ocorrendo na superfície durante as medidas (HOPPE FILHO, 2008).

Brunauer, Emmett e Teller, em 1938, adotaram esta hipótese para determinar a área superficial específica, considerando a formação da monocamada, antes da segunda camada ser formada (Figura 4). Este método ficou conhecido como BET (GOMES, 2006; HOPPE FILHO, 2008).

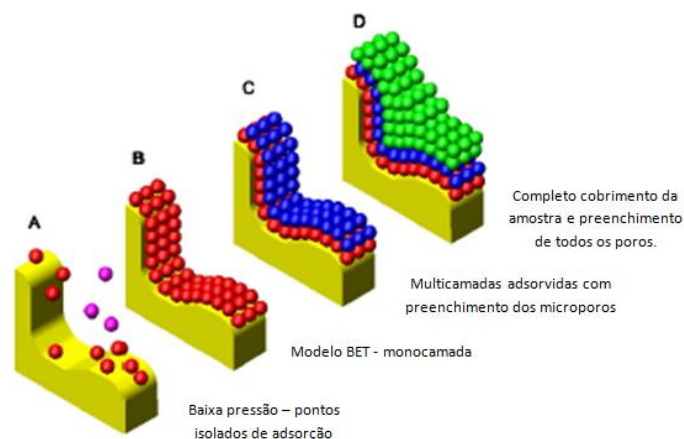


Figura 4. Representação esquemática do volume de nitrogênio adsorvido durante o ensaio de adsorção isotérmica (HOPPE FILHO, 2008).

A área superficial baseada no método de BET baseia-se na determinação do volume de nitrogênio adsorvido por meio de adsorções e dessorções a diversas pressões relativas P/P_0 na temperatura do nitrogênio líquido. Diferentes valores de P/P_0 são utilizados e os volumes adsorvidos são determinados. Através da equação de BET determina-se o valor do volume de N_2 da monocamada adsorvida (LIMA, 2006).

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{C \cdot V_m} + \frac{(C - 1)}{C \cdot V_m} \times \frac{P}{P_0} \quad (6)$$

Onde:

V = volume de N_2 adsorvido a pressão relativa P/P_0 ;

V_m = volume de N_2 para cobrir o adsorbato com uma monocamada;

P_0 = pressão de saturação do N_2 líquido;

C = constante do sistema gás-sólido.

Segundo Gomes (2006), a partir da quantidade de N₂ adsorvida constrói-se a isoterma de adsorção, ou seja, com $(1/V) \times [P/(P_0 - P)]$ em função de P/P_0 . Os coeficientes linear e angular da reta obtida são usados para determinar os valores de V_m e C . Assim, pela equação (7) pode-se calcular a superfície específica.

$$S = \frac{n \cdot \sigma \cdot V_m}{M a} \quad (7)$$

Onde:

$n = 6,023 \times 10^{23} / 22,414$ (moléculas/cm³);

σ = área de cobertura de uma molécula de N₂; adsorvido (16Å²);

$M a$ = massa da amostra (g).

A determinação da área superficial, do tamanho de partículas e poros, e da forma dos poros é de extrema importância para avaliar a aplicabilidade dos compósitos como sistemas de liberação de fármacos (MUKHERJEE, 2009).

2.3.4 Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos

Desde o início do século XX cientistas têm utilizado técnicas de raios-X para estudar, principalmente, a estrutura de diferentes materiais. A primeira técnica desenvolvida foi a cristalografia de raios-X que fornece informações detalhadas sobre a estrutura atômica das amostras estudadas. Mas, como sugere o nome, a técnica só é destinada para materiais sólidos cristalinos. Isso era um problema, pois, muitas substâncias de interesse, como proteínas e materiais poliméricos, apresentavam notável relutância à cristalização (OLIVEIRA NETO, 2008).

Para esses casos, a técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS – "Small Angle X-Ray Scattering") foi desenvolvida e se tornou mais apropriada por revelar importantes informações sobre amostras amorfas. Tal técnica permite estudar características estruturais (forma e tamanho) de partículas de dimensões coloidais (entre dezenas e centenas de Angstrom) dispersas numa matriz homogênea, além de indicar aspectos

da organização microestrutural e possíveis interações entre as partículas espalhadoras (BARBOSA, 2008; FARIA, 2008; DUARTE, 2005).

No caso de raios-X, quem espalha, não são as partículas ou poros, mas os elétrons que compõem a matéria. Da mesma forma que as ondas visíveis, os raios-X são espalhados em fase (na verdade há uma mudança de fase em π radianos) na direção paralela ao feixe incidente (espalhamento frontal) com a defasagem aumentando a medida que o ângulo cresce. A técnica de SAXS pode dar informação estrutural somente para partículas que se encontram dentro de certos limites. Se a dimensão máxima da partícula (D) é grande demais, o espalhamento fica limitado a ângulos muito pequenos muitas vezes inacessíveis experimentalmente e se D for pequeno demais, da ordem do comprimento de onda o espalhamento se produz a altos ângulos (FISHER, 2000).

Para análise de uma curva de SAXS, é conveniente distinguir duas regiões na curva de espalhamento, I (intensidade espalhada) por q (vetor de espalhamento, $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$). Na região dos ângulos próximos de zero pode-se determinar o raio de giro, R_g . A análise da região de mais alto ângulo de SAXS contém informações acerca dos aspectos finos da partícula (OLIVEIRA NETO, 2008).

Na análise de compósitos, o uso de espalhamento de raios-X a baixos ângulos pode fornecer informações sobre a organização, cristalinidade e arranjo dos componentes da amostra, auxiliando na proposição de modelos estruturais.

3. Experimental

3.1 Materiais

Tetraetilortossilicato (TEOS, 99.0%), ácido 3,5-dinitrosalicílico e D-(+)-maltose monohidratada (98.0%) foram obtidos da Aldrich. Hidróxido de amônio (28.0 – 30.0%), etanol anidro (99.6%) e maltose foram obtidos da Synth, da J. T. Baker e da Merck, respectivamente. Todos os produtos químicos e reagentes foram usados sem purificação adicional.

3.2 Síntese dos compósitos sílica-maltose

O preparo dos compósitos sílica-maltose foi realizado de acordo com a seguinte rotina: 2,08 g de TEOS foram misturados com 54 mL de etanol anidro sob agitação magnética. A mistura foi agitada por 5 minutos seguido da adição de 0,6 g de solução de maltose (sete diferentes soluções de maltose foram testadas: 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (m/V)). O béquer foi selado enquanto a mistura foi mantida sob agitação constante. Depois de 30 minutos, 1,8 mL de NH_4OH concentrado foi adicionado a mistura para atingir valores de pH entre 8 e 9. O béquer foi novamente selado e a mistura foi mantida sob constante agitação por aproximadamente 12 horas. A solução obtida foi centrifugada a 15000 rpm em uma centrífuga Sorvall RC26Plus (DJB Labcare, Buckinghamshire, UK) por 15 minutos. O sobrenadante foi usado para estimar o rendimento da encapsulamento e o precipitado foi seco a 50°C antes dos demais experimentos. Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente e os resultados foram duplicados para garantir a reprodutibilidade.

3.3 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis foi empregada para estimar a concentração de maltose no sobrenadante que corresponde à quantidade de carboidrato não aprisionado no compósito. O método colorimétrico DNS foi utilizado

para oxidar o grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico, desenvolvendo uma solução avermelhada na solução. A absorvância foi proporcional a concentração de açúcar redutor presente na solução.

Para o preparo do reagente DNS pesou-se com 4,0 g de hidróxido de sódio que foram dissolvidos em 50 mL de água destilada. A esta solução adicionou-se 2,5 g de DNS. Paralelamente 75,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos, sob agitação constante, em 125 mL de água destilada. Adicionou-se à solução de DNS a solução de tartarato, sob aquecimento, até completa dissolução. Após o resfriamento transferiu-se a solução para balão volumétrico de 250 mL, completou-se o volume com água destilada. A solução foi armazenada à temperatura ambiente (MILLER, 1959).

Em pipetadora automática, mediu-se 0,08 mL da amostra e 0,16 mL do reagente DNS, e transferiu-se um tubo de ensaio. Manteve-se o tubo em água fervente em banho-maria durante 5 minutos, sendo, em seguida, resfriado em água corrente. Ao final do preparo, adicionou-se 1,6 mL de água destilada à amostra, homogeneizando-a manualmente. O Espectrofotômetro Spectronic® 20 Genysis (Spectronic Analytical Instruments, Garforth, UK, foi usado para medir com precisão a absorvância das soluções de maltose usando comprimento de onda (λ) igual a 540 nm (Eduardo, 2003).

A curva padrão foi preparada empregando maltose P.A. como padrão, sendo a mesma submetida às mesmas etapas de análise da amostra. As concentrações de maltose P.A. empregadas na construção da curva padrão variaram de 0 a 0.006 g/g. Do gráfico da concentração versus absorvância, encontrou-se a equação da reta que foi usada para determinar a concentração do carboidrato no sobrenadante.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias foram registradas usando um microscópio JEOL JSM 6060 (JEOL, Tokyo, Japan) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As amostras em pó foram fixadas em *stubs* de cobre, usando fita dupla face, e receberam recobrimento com ouro. As observações no MEV foram

realizadas no modo operacional de elétrons secundários a 15.0 kV, tensão na qual foram obtidas as melhores imagens.

3.5 Isotermas de N₂

Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foram realizadas no Autosorb[®]-1 series instrument (Quantachrome, Boynton Beach, FL). As amostras foram degaseificadas durante toda a noite a 50°C antes da análise. A área superficial da isoterma de nitrogênio foi determinada usando o método BET enquanto o volume dos poros foi calculado usando algoritmos Barrett-Joyes-Halenda (BJH) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Espalhamento de Raios-X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas nas linhas de luz D2A e D11A no Laboratório Nacional de luz Síncrotron (LNLS). O feixe de raios-X monocromático incidente ($\lambda = 1.488 \text{ \AA}$) foi detectado à duas distâncias amostra-detector a fim de aumentar a faixa de espalhamento do vetor q ($q = (4\pi/\lambda) \sin\theta$; $2\theta =$ ângulo de espalhamento). Para a linha de luz D2A o detector foi colocado a 2088 mm de distância da amostra, enquanto que na linha de luz D11A a distância amostra-detector foi de 1000 mm.

As amostras secas foram colocadas entre duas folhas kapton e o porta amostra foi selado. O feixe de raios-X foi passado horizontalmente através da câmara contendo a amostra, as medidas foram realizadas em temperatura ambiente. Prata em pó behenato foi utilizada como padrão para calibrar a distância amostra-detector, a inclinação do detector e a posição do feixe direto. A correção de transmissão, da corrente escura do detector e da folha de kapton foram realizadas na imagem 2D antes do processamento dos dados. Os padrões de espalhamento isotrópico foram integrados radialmente.

A análise dos dados de SAXS foi realizada usando rotina de análise Irena (ILAVSKY, 2009) em Igor Pro Software (KLINE, 2006) (WaveMetrics, Portland, USA), comercialmente disponíveis. Um ajuste unificado multi-nível

foi usado para descrever os múltiplos níveis da organização estrutural evidente nos dados de espalhamento. Nesse método, o espalhamento proveniente de cada estrutura é a soma de uma forma exponencial Guinier e de uma estrutura limitada por uma lei de potência. Uma equação geral representando qualquer número de níveis é escrita como: (BEAUCAGE, 1995, 1996)

$$I(q) = \sum_{i=1}^n G_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{gi}^2}{3}\right) + B_i \exp\left(\frac{-q^2 R_{g(i+1)}^2}{3}\right) \left[\frac{(\text{erf}(qR_{gi}/\sqrt{6}))^3}{q}\right]^{P_i} \quad (5)$$

onde n é o número de níveis estruturais observados, G é o pré-fator Guinier, R_g é o raio de giro e B é o pré-fator específico para o tipo de lei de potência de espalhamento que é especificado pelo decaimento do expoente P.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eficiência de encapsulamento

O sobrenadante formado após a síntese do composto sílica-maltose foi analisado via Espectroscopia UV-Vis, através da técnica do DNS. Com os valores de absorbância medidos com soluções de concentrações conhecidas (0; 0.0005; 0.001; 0.002; 0.004; 0.006 g/g) construiu-se as curvas de calibração e determinou-se a equação da melhor reta.

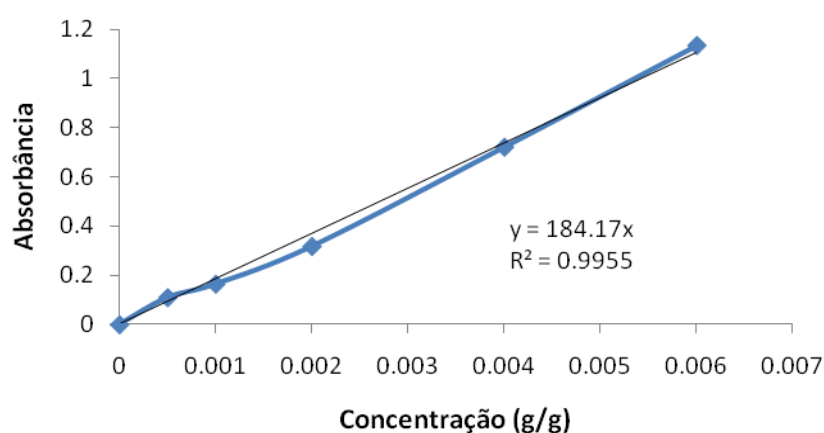


Figura 5. Curva de calibração da maltose.

A equação da reta obtida foi usada para determinar a concentração do carboidrato no sobrenadante. O valor de coeficiente de correlação (R^2) próximo da unidade garante a confiabilidade dos resultados. A taxa de encapsulamento de maltose (%) foi determinada, sem repetições, de acordo com diferentes concentrações iniciais de maltose (% m/V) (Figura 6).

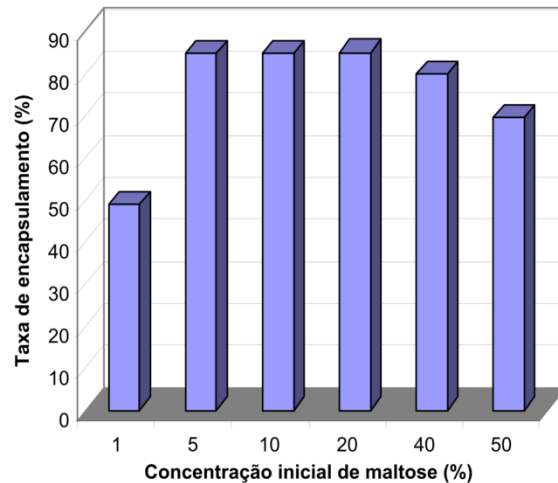


Figura 6. Representação em barras do rendimento do encapsulamento de maltose dos compósitos sintetizados.

O taxa de encapsulamento de maltose variou entre 49,86% (m/V) e 84,96% (m/V), relacionados às concentrações iniciais de maltose 1% (m/V) e 10% (m/V), respectivamente. Entretanto, atribuiu-se como potencialmente promissores apenas os compósitos elaborados com maltose de concentração inicial igual a 5, 10 e 20% (m/V), pois apresentaram maiores taxas de encapsulamento de maltose (MUKHERJEE, 2009).

Como não foi possível a realização de repetições, tornou-se inviável o conhecimento do coeficiente de variância entre diferentes amostras de mesma concentração inicial de maltose. Assim, todos os compósitos sintetizados foram estudados através das técnicas instrumentais a seguir.

4.2 Morfologia e Estrutura do Compósito Sílica-Maltose

Com relação aos estudos com MEV, a forma esférica foi observada para todos os compósitos, entretanto verificou-se diferenças entre os diâmetros das partículas (Figura 7).

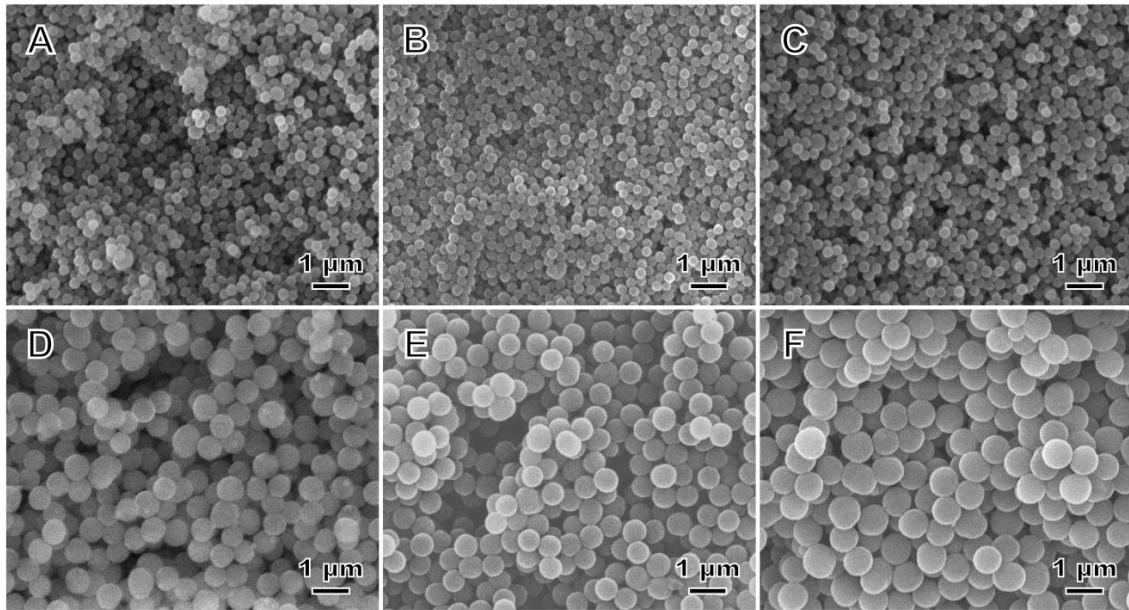


Figura 7. Micrografias eletrônicas de varredura dos compósitos sintetizados com soluções de maltose de concentração (m/V) igual a: **(A)** 0 %; **(B)** 1 %; **(C)** 10 %; **(D)** 20 %; **(E)** 40 % e **(F)** 50 %.

Com base nas características das micrografias eletrônicas de varredura da Figura 7, não foi possível observar uma diferença significativa de diâmetro entre as partículas sintetizadas com 0 %, 1% e com 10% (m/V) de maltose. Por outro lado, um aumento significativo no diâmetro das partículas é observado para os compósitos sintetizados com soluções de maltose de concentração igual ou maior que 20% (m/V).

Uma avaliação precisa do diâmetro das partículas foi realizada com mais de 400 compósitos sílica-maltose de cada amostra, resultando nas distribuições de diâmetro das partículas (Figura 8).

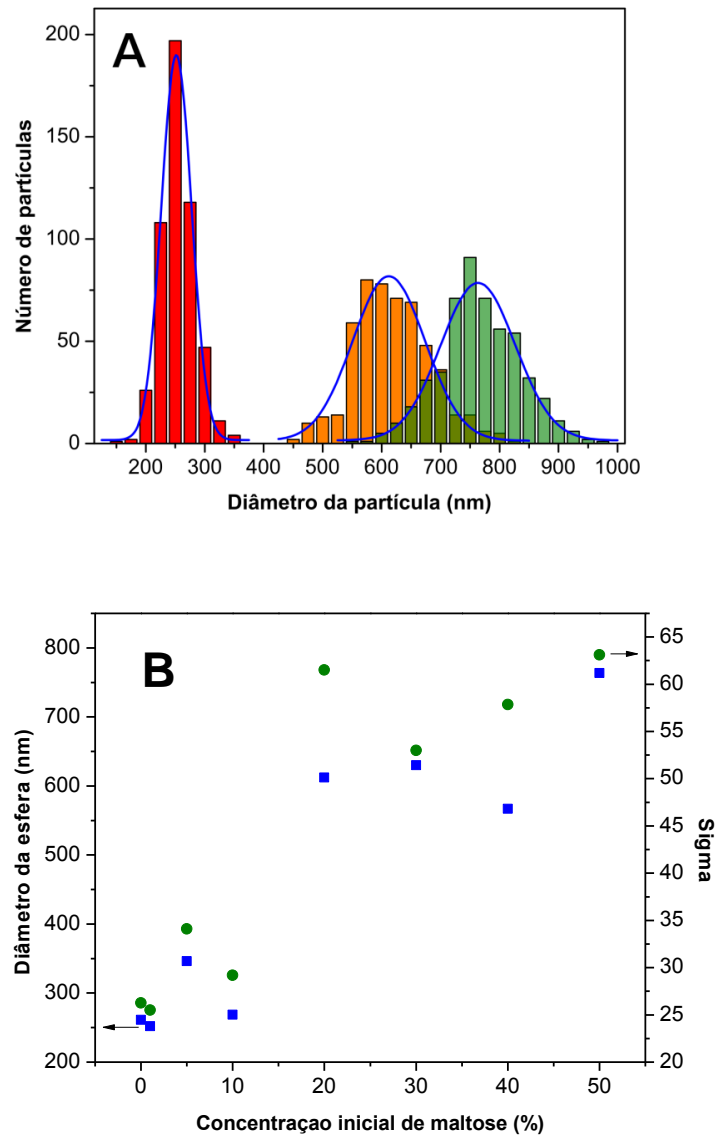


Figura 8. (A) Representação em barras da distribuição do diâmetro das partículas e suas distribuições Gaussianas: barras vermelhas (1% de maltose), barras laranja (20% de maltose) e barras verdes (50% de maltose). (B) Relação entre a média (azul), o desvio padrão do diâmetro das partículas (verde) e a concentração inicial de maltose (% m/V).

O estudo de distribuição do diâmetro das partículas, evidenciado na Figura 8, foi disponibilizado apenas para os compósitos formados a partir das soluções iniciais de maltose de 1, 20 e 50% (m/V), pois os dados dos demais compósitos tornariam a representação gráfica ilegível. Desta forma, representou-se na mesma figura a relação entre a média, o desvio padrão do diâmetro das partículas e a concentração inicial de maltose, disponibilizando-os de forma satisfatória para sua interpretação.

Todas as amostras apresentam uma distribuição monomodal que foi ajustada usando funções Gaussianas, a fim de obter a média do diâmetro dos compósitos bem como o desvio padrão.

Como também observado por Murjherjee (2009), de modo geral, a média dos diâmetros das partículas dos compósitos foi maior para as soluções mais concentradas de maltose: 1% (m/V), 250nm; 10% (m/V), 268nm; 20% (m/V), 620nm; 30% (m/V), 630nm; 40% (m/V), 566nm; 50% (m/V), 750nm. O compósito sintetizado com 40% (m/V) de maltose foi a única amostra cuja média dos diâmetros das partículas não acompanhou a tendência citada anteriormente. Como as amostras não puderam ser sintetizadas em replicata, tal divergência pode ser uma casualidade.

O desvio padrão dos diâmetros das partículas seguiu a mesma tendência observada para o diâmetro médio, ou seja, quanto maior a média, maior a variação dos diâmetros individuais.

A técnica de espalhamento de raios-X, por sua vez, foi utilizada para a obtenção de detalhes estruturais sobre os compósitos. Apesar da semelhança entre as formas dos compósitos sílica-maltose evidenciada pelo MEV, pode-se verificar características peculiares nos compósitos através da técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos.

A Figura 9 apresenta dados experimentais (círculos abertos) e seus ajustes correspondentes para os compósitos usando 1 e 50% (m/V) de solução de maltose.

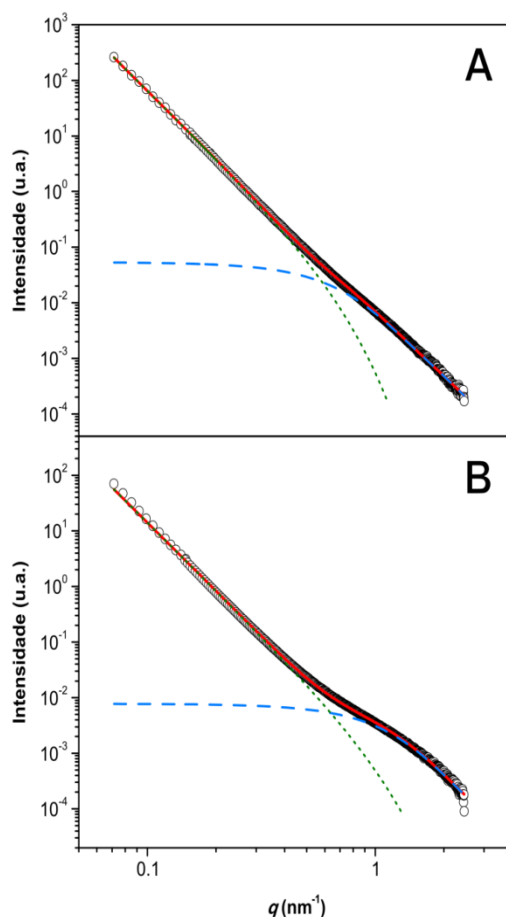


Figura 9. Perfis de SAXS (círculos abertos) dos compósitos sintetizados com (A) 1 e (B) 50% (m/V) de solução de maltose. O ajuste unificado nas linhas vermelhas e os dois níveis ajustados são apresentados nas linhas verdes e nas linhas azuis.

O ajuste unificado (linha vermelha) foi empregado e dois níveis distintos foram observados para todas as amostras. Cada nível é composto por duas contribuições: (1) um ombro na região de Guinier que permite estimar o raio de giro e/ou (2) uma lei de potência linear, região que fornece informação sobre a organização do sistema.

Na região do nível de baixo q (linha verde), que representa as maiores dimensões do sistema, nenhuma região de Guinier foi observada. Isto corrobora com os resultados de MEV já que a dimensão geral dos compósitos ≥ 250 nm não é observável no SAXS. O caimento a q^{-4} (linha verde) é uma forte evidência estrutural da superfície do compósito sílica-maltose. Segundo BEAUCAGE (1995), esse resultado indica que essas esferas têm uma superfície lisa com uma resolução de aproximadamente

20nm, já que a linearidade da lei de potência é mantida até q próximo de 0.3 nm^{-1} . No nível de alto q (linha azul) uma região de Guinier é observada seguida de decaimento por uma lei de potência. O ombro na região de Guinier permite a determinação do raio de giro deste nível que pode ser atribuído tanto a formação de partículas elementares de sílica quanto a presença de poros. Já o decaimento também indica uma superfície lisa (q^{-4}) para este nível estrutural em $q > 1.5 \text{ nm}^{-1}$.

Comparando as regiões de Guinier para 1% e 50% de maltose (m/V), verifica-se que ela é deslocada para maiores valores de q indicando que a dimensão deste nível estrutural tem sido progressivamente reduzido pelo aumento da concentração de maltose.

A Figura 10 mostra a evolução do R_g determinado na região de alto q com a variação da concentração de maltose.

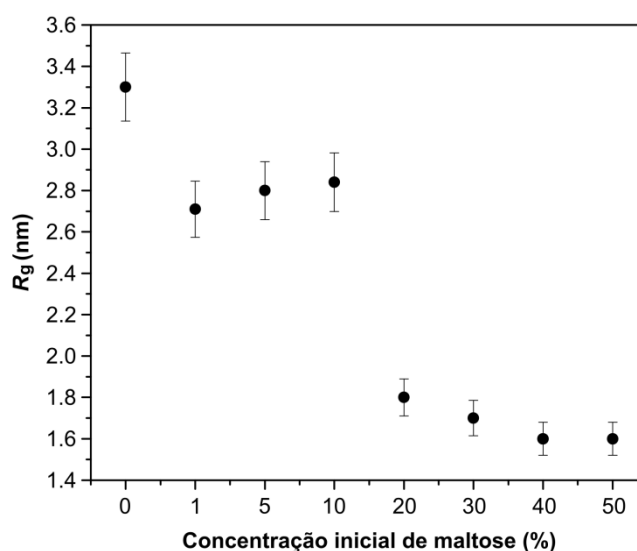


Figura 10. Dependência do raio de giro (R_g) obtido pelo ajuste unificado com a concentração de maltose usada nas sínteses dos compósitos.

Como tendência geral, o aumento da quantidade de maltose reduz o R_g na região de alto q .

A Figura 11 mostra a isoterma de adsorção-dessorção do compósito sintetizado com 20% (m/V) de solução de maltose. Todas as amostras apresentaram perfis semelhantes que correspondem à isoterma do tipo II e está relacionada a sólidos não porosos (SING, 1985; WU, 2006; KHALIL, 2002; ARKHIREEVA, 2003).

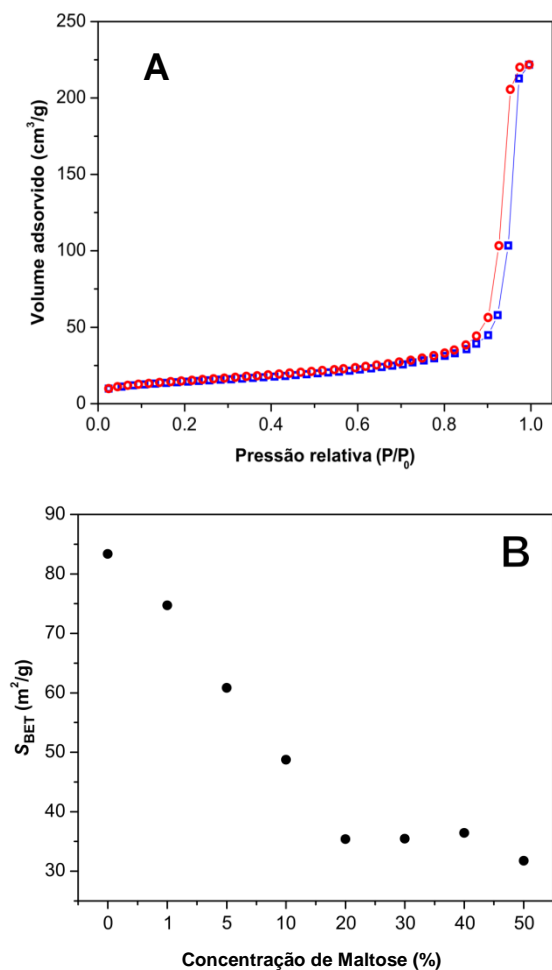


Figura 11. (A) Perfil da isoterma de nitrogênio do compósito sintetizado com 20% (m/V) de solução de maltose. **(B)** Área superficial, S_{BET} , para compósitos sintetizados com soluções de diferentes concentrações de maltose.

Além disso, foi observada histerese do tipo H1, correspondendo a materiais constituídos de aglomerados ou conjunto de esferas aproximadamente uniformes em matriz regular (SING, 1985; XIANG, 2006; KHALIL, 2006). Deste modo, assume-se que a histerese H1 na isoterma de adsorção-dessorção de nitrogênio surge devido a interstícios em vez de poros internos. Assim os interstícios entre essas esferas são de escala de mesoporos (SING, 1985). Com relação à área superficial (S_{BET}) calculada das isotermas, uma clara redução nos valores de S_{BET} é observada com o aumento da concentração de maltose utilizada na síntese do material. Contudo, uma variação não significativa é vista para concentrações de

maltose contendo mais de 20% (m/V) de carboidrato o que provavelmente indica que o limite de saturação é atingido. A área superficial dos compósitos observada neste trabalho indica que as moléculas de maltose estão situadas preferencialmente nos interstícios entre as esferas elementares permitindo a redução da área superficial (GREEN, 2003).

As técnicas de caracterização podem gerar a reconstrução da organização estrutural do material, que nos permite obter indícios de seu mecanismo de formação através de um caminho indireto.

Tendo em vista as tendências antagônicas do diâmetro dos compósitos obtidos por MEV e do R_g obtidos por SAXS, considera-se que os compósitos de sílica-maltose vistos nas imagens de MEV (Figura 7) são compostos de partículas elementares de sílica de pequena dimensão. Uma representação esquemática ultraestrutural deste compósito multi-nível é mostrada na Figura 12.

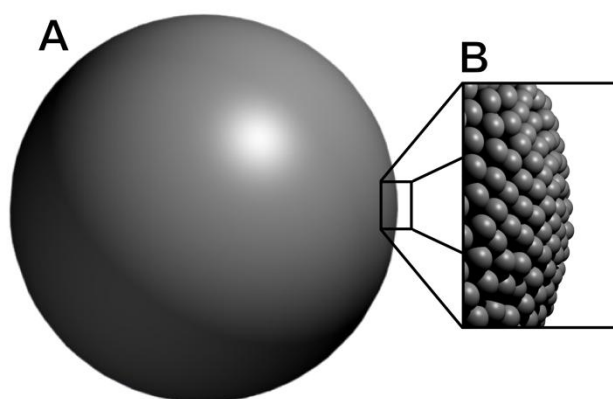


Figura 12. (A) Representação da esfera do compósito de sílica-maltose visto nas imagens de MEV. (B) Desenho esquemático da borda do compósito formado por esferas de sílica fundamentais.

Esse cenário é sustentado pela histerese H1 a qual sugere que esse material é composto de aglomerados ou grupos (SING, 1985; KHALIL, 2002; MUKHERJEE, 2009). Na região de baixo q , os perfis de SAXS são interpretados como o espalhamento da superfície dos compósitos de sílica-maltose (Figura 12) que são observados pelo MEV. Já na região de alto q , o sinal de espalhamento é interpretado como o tamanho das partículas elementares de sílica (Figura 12).

4.3 Avaliação do Processo de Síntese

Sabe-se que o processo de síntese utilizado ao longo deste trabalho é iniciado através da reação de hidrólise de TEOS na presença de água ou alcoóis de baixo peso molecular (BRINKER, 1990). Como um processo paralelo, monômeros de TEOS hidrolisados, que são um produto intermediário da reação, condensam para formar esferas de sílica elementares.

A síntese dos compósitos sílica maltose pode ser dividida em três etapas. Sugere-se que no primeiro passo da reação (primeiros 5 minutos, quando TEOS é misturado ao etanol) domínios iniciais de nucleação são gerados e começa a formação de partículas primarias. (GREEN, 2003) O segundo passo da reação é a partir de 5 minutos quando água ou solução de maltose é adicionada. Esta fase é governada pelo crescimento das partículas elementares fornecidas através da adição de monômeros hidrolisados (GREEN, 2003). A presença de maltose no sistema impede a formação de monômeros hidrolisados, já que pelo aumento da concentração de maltose uma clara tendência de redução do tamanho das partículas é observada. Assim, a quantidade livre de monômeros é reduzida na presença de carboidratos. Por fim, o terceiro passo começa depois de 30 minutos de reação, quando hidróxido de amônio é adicionado no sistema. Neste passo, partículas elementares de sílica formam compósitos de sílica-maltose até certo tamanho, dependendo das condições experimentais.

As moléculas de maltose facilitam a estabilização dos compósitos, pois sua dimensão aumenta quando mais maltose é adicionada durante o processo de síntese. Dessa forma, um limite de encapsulamento é atingido quando soluções de maltose de concentração igual ou maior que 20% (m/V) são usadas, pois a área superficial dos compósitos é mantida praticamente constante (Figura 8) enquanto o rendimento do encapsulamento reduz (Figura 6).

Os resultados discutidos mostram que a condição otimizada para encapsulamento é a solubilização de drogas ativas em soluções de maltose com concentrações entre 5 e 10% (m/V), tendo em conta a dimensão geral dos compósitos e evitando a possibilidade de saturação de moléculas aprisionadas dentro do compósito.

5. CONCLUSÃO

O trabalho em questão propôs um método adaptado para a síntese de nanocompósitos sílica-maltose com potenciais aplicações de liberação de drogas. Esta abordagem permite o ajuste do compósito que pode ser otimizado para aplicações biomédicas.

Os resultados demonstraram a eficiência desta forma de síntese de apenas uma etapa. Além de não se fazer necessária a eliminação por lavagem com solventes ou calcinação do compósito sílica-maltose.

Na composição das partículas tem-se estruturas de sílica elementares, de aproximadamente 5 nm, que agregam-se para formar estruturas esféricas, com faixa de tamanho entre 250 e 750 nm, dependendo da quantidade de maltose utilizada durante a síntese. As moléculas de maltose estão localizadas nos espaços intersticiais entre as partículas de sílica primária. É neste local onde sugere-se que fármacos sejam aprisionados, juntamente com carboidratos, para uso desses compósitos como vetorizadores de fármacos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAYA, A. A. S., KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**. 25, 5, 2002.

ARKHIREEVA, J. N. HAY. Synthesis of sub-200 nm silsesquioxane particles using a modified Stober sol-gel route. **Journal of Materials Chemistry**. 13, 3122, 2003.

BALAS, F., M. MANZANO, P. HORCAJADA, M. VALLET-REGI. Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials. **Journal of the American Chemical Society**. 128, 8116, 2006.

BARBOSA, L. R. S. *Estudo de sistema de relevância biológica por espalhamento de raios-X a baixos ângulos*. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 2008.

BEAUCAGE, G. Approximations leading to a unified exponential power-law approach to small-angle scattering. **Journal of Applied Crystallography**. 28, 717, 1995.

BEAUCAGE, G. Small-angle scattering from polymeric mass fractals of arbitrary mass-fractal dimension. **Journal of Applied Crystallography**. 29, 134, 1996.

BECK, J. S., J. C. VARTULI, W. J. ROTH, M. E. LEONOWICZ, C. T. KRESGE, K. D. SCHMITT, C. T. W. CHU, D. H. OLSON, E. W. SHEPPARD, S. B. McCULLEN, J. B. HIGGINS, J. L. SCHLENKER. A new family of mesoporous molecular-sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**. 114, 10834, 1992.

BERNE, C., L. BETANCOR, H. R. LUCKARIFT, J. C. Application of a microfluidic reactor for screening cancer prodrug activation using silica-immobilized nitrobenzene nitroreductase. **Biomacromolecules**. 7, 2631, 2006.

BRINKER, J., G. W. SCHERER, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, 1990.

CAI, Q., Z. S. LUO, W. Q. PANG, Y. W. FAN, X. H. CHEN, F. Z. CUI. Dilute solution routes to various controllable morphologies of MCM-41 silica with a basic medium. **Chemistry of Materials**. 13, 258, 2001.

CHE, S., A. E. GARCIA-BENNET, T. YOKOI, K. SAKAMOTO, H. KUNIEDA, O. TERASAKI, T. TATSUMI. A novel anionic surfactant templating route for synthesizing mesoporous silica with unique structure. **Nature Materials**. 2, 801, 2003.

DE JONG, W. H., P. J. A. BORM. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **Internacional Journal of Nanomedicine**. 3, 133, 2008.

DUARTE, E. L. Síntese e caracterização de nanopartículas baseadas em óxido de ferro. Doutorado (Doutor em Ciência) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 2005.

EDUARDO, M. P. Hidrólise enzimática de mandioca e pupa para a obtenção de xarope de maltose. Dissertação (Mestre em Ciência). Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, 2002.

FARIA G. C. Estudo da estrutura e dinâmica molecular em filmes de polifluorenos e correlações com a fotoluminescência. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

FISCHER, H. Estudos estruturais de xerogéis de óxido de níquel. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade de São Paulo, 2000.

GIRI, S., B. G. TREWYN, M. P. STELLMAKER, V. S. Y. LIN. Stimuli-responsive controlled-release delivery system based on mesoporous silica nanorods capped with magnetic nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**. 2005, 44, 5038.

GOMES, L. B. *Desenvolvimento de catalisadore de Rutênio suportado em*

CeO₂/Al₂O₃ para a reação de reforma a vapor e oxidativa do etanol. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

GREEN. L., J. S. LIN, Y. F. LAM, M. Z. C. HU, D. W. SCHAEFER, M. T. HARRIS. Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science.** 266, 346, 2003.

GRUDZIEN, R. M., B. E. GRABICKA, M. JARONIEC, **Applied Surface Science.** 253, 5660, 2007.

HOPPE FILHO, J. *Sistema cimento, cinza volante e cal hidratada: mecanismo de hidratação, microestrutura e carbonatação de concreto.* Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2008.

HORCAJADA, P., A. RAMILA, J. PEREZ-PARIENTE, M. VALLET-REGI. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Microporous and mesoporous Materials.* 68, 105, 2004.

HUANG, L., S. KAWI, C. POH, K. HIDAJAT, S. C. NG. Extraction of cationic surfactant templates from mesoporous materials by CH₃OH-modified CO₂ supercritical fluid. **Talanta.** 66, 943, 2005.

ILAVSKY, J., P. R. JEMIAN. *Irena: tool suite for modeling and analysis of small-angle scattering.* **Journal of Applied Crystallography.** 42, 347, 2009.

IZQUIERDO-BARBA, I., E. SOUSA, J. C. DOADRIO, A. L. DOADRIO, J. P. PARIENTE, A. MARTINEZ, F. BABONNEAU, M. VALLET-REGI. Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of ibuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. **Journal of Sol-Gel Science and Technology.** 50, 421, 2009.

KHALIL, K. M. S., A. A. ELSAMAHY, M. S. ELANANY. Formation and characterization of high surface area thermally stabilized titania/silica composite materials via hydrolysis of titanium(IV) tetra-isopropoxide in sols of spherical silica particles. **Journal of Colloid and Interface Science.**

249, 359, 2002.

KLEITZ, F., W. SCHMIDT, F. SCHUTH. Calcination behavior of different surfactant-templated mesostructured silica materials. **Microporous and Mesoporous Materials**. 65, 1,2003.

KLINKE, S. R. Reduction and analysis of SANS and USANS data using IGOR Pro. **Journal of Applied Crystallography**. 39, 895, 2006.

KRESGE, C. T., M. E. LEONOWICZ, W. J. ROTH, J. C. VARTULI, J. S. BECK. Ordered mesoporous molecular-sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. **Nature**. 359, 710, 1992.

KUMAR, R., H. T. CHEN, T. CHEN, J. L. V. ESCOTO, V. S. Y. LIN, M. PRUSKI. Template removal and thermal stability of organically functionalized mesoporous silica nanoparticles. **Chemistry of Materials**. 18, 4319, 2006.

LIMA, F. W. J. *Catalisadores de platina suportados em $ZrO_2/\gamma-Al_2O_3$ para a reação de reforma a vapor de etanol*. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

LIONG, M., J. LU, M. KOVOCHICH, T. XIA, S. G. RUEHM, A. E. NEL, F. TAMANOI, J. I. ZINK. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. **ACS Nano**. 2, 889, 2008.

LIONG, M., S. ANGELOS, E. CHOI, K. PATEL, J. F. STODDART, J. I. ZINK. Mesostructured multifunctional nanoparticles for imaging and drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**. 19, 6251, 2009.

LU, J., M. LIONG, J. I. ZINK, F. TAMANOI. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. **Small**. 3, 1341, 2007.

LUCKARIFT, H. R., J. C. SPAIN, R. R. NAIK, M. O. STONE. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. **Nature Biotechnology**. 22, 211, 2004.

LUCKARIFT, H. R., M. B. DICKERSON, K. H. SANDHAGE, J. C. SPAIN. Rapid, room-temperature synthesis of antibacterial bionanocomposites of lysozyme with amorphous silica or titania. **Small**. 2, 640, 2006.

MALISKA, A. M., *Microscopia Eletrônica de Varredura*. Florianópolis: e-paper.

MANNHEIMER, W.A., *Microscopia dos Materiais: Uma Introdução*. 2002, Rio de Janeiro: e-paper.

MAYOR, S., R. E. PAGANO. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 8, 603, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31, 3, 426, 1959.

MUKHERJEE, A. MYLONAKIS, Y. GUO, S. P. SAMUELI, S. X. LI, R. Y. WEI, A. KOJTARI, Y. WEI. Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous silica nanospheres. **Microporous Mesoporous Materials**. 122, 168, 2009.

NAIK, R. R., M. M. TOMCZAK, H. R. LUCKARIFT, J. C. SPAIN, M. O. STONE. Entrapment of enzymes and nanoparticles using biomimetically synthesized silica. **Chemical Communications**. 1684, 2004.

NARIMOTO, K. M. *Técnicas espectoscópicas aplicadas a análise da matéria orgânica do solo em pomares de citros sob adição de lodo de esgoto*. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade São Paulo, 2006.

OLIVEIRA NETO, M. *Espalhamento de raios-X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas*. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

OREFICE, R.L., M.M. PEREIRA, and H.S. MANSUR, *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. 1 ed. 2005, Rio de Janeiro: Cultura Médica. 538.

REJMAN, J., V. OBERLE, I. S. ZUHORN, D. HOEKSTRA. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. **Biochemical Journal**. 377, 159, 2004.

SCHUBERT, U., N. HUSING, *Synthesis of Inorganic Materials*. 2 ed. 2005, Weinheim: Wiley-VCH.

SILVA, Roberto do Nascimento et al . Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 23, 3, 2003.

SIMÊNCIO, E.C.A. *Preparação e caracterização de filmes finos sol-gel de Nb₂O₅:Zr*. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

SIMÊNCIO, E.C.A. *Preparação e caracterização de filmes finos sol-gel de Nb₂O₅:Zr*. 2009. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

SING, K. S. W., D. H. EVERETT, R. A. W. HAUL, L. MOSCOU, R. A. PIEROTTI, J. ROUQUEROL, T. SIEMIENIEWSKA. Reporting physisorption data for gas solid systems with special reference to the determination of surface-area and porosity (Recommendations 1984). **Pure and Applied Chemistry**. 57, 603, 1985.

SKOOG, D.A., F.J. HOLLER, and T.A. NIEMAN, *Princípios de Análise Instrumental*. 2002, Porto Alegre: Bookman.

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

SLOWING, I., B. G. TREWYN, V. S. Y. LIN. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. **Journal of the American Chemical Society**. 129, 8845, 2007.

SLOWING, I., J. L. VIVERO-ESCOTO, C. W. WU, V. S. Y. LIN. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 60, 1278, 2008.

TREBOSC, J., J. W. WIENCH, S. HUH, V. S. Y. LIN, M. PRUSKI. Solid-state NMR study of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**. 127, 3057, 2005.

TREWYN, B. G., C. M. WHITMAN, V. S. Y. LIN. Morphological control of room-temperature ionic liquid templated mesoporous silica nanoparticles for controlled release of antibacterial agents. **Nano Letters**. 4, 2139, 2004.

VALLEET-REGI, M., VALLET-REGI, F. BALAS, D. ARCOS. Mesoporous materials for drug delivery. **Angewandte Chemie International Edition**. 46, 7548, 2007.

VALLET-REGI, M. Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. **Journal of Internal Medicine**. 267, 22, 2010.

WU, Z. J., H. XIANG, T. KIM, M. S. CHUN, K. LEE. Surface properties of submicrometer silica spheres modified with aminopropyltriethoxysilane and phenyltriethoxysilane. **Journal of Colloid and Interface Science**. 304, 119, 2006.

XIAOYING, L., T. BOZHI, Y. CHENGZHONG, G. FENG, X. SONGHAI, T. BO, C. RENCHAO, P. LIAN-MIAO, Z. DONGYUAN. **Angewandte Chemie International Edition**. 41, 3876, 2002.

YING, J. Y., C. P. MEHNERT, M. S. WONG. UV resonance Raman spectroscopic identification of titanium atoms in the framework of TS-1 zeolite. **Angewandte Chemie International Edition**. 38, 56, 1999.

ZHAO, D. Y., Q. S. HUO, J. L. FENG, B. F. CHMELKA, G. D. STUCKY. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant

syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. **Journal of the American Chemical Society.** 120, 6024, 1998.