Universidade de São Paulo

Instituto de Física

**Aplicabilidade de Sílica Mesoporosa Ordenada como
Adjuvante Imunológico**

Francisco Mariano Neto

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Carvalho de Abreu Fantini

Dissertação de mestrado apresentada
ao Instituto de Física da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia Carvalho de Abreu Fantini (IF-USP)

Prof. Dr. Amando Siuti Ito (FFCLRP-USP)

Prof^a. Dr^a. Márcia de Almeida Rizzuto (IF-USP)

São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Mariano Neto, Francisco

Aplicabilidade de sílica mesoporosa ordenada
como adjuvante imunológico
São Paulo, 2008.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física - Depto. de Física Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Carvalho de Abreu Fantini

Área de Concentração: Física

Unitermos:

1. Física da Matéria Condensada;
2. Física do Estado Sólido;
3. Estrutura dos Sólidos;
4. Espectroscopia Atômica.

USP/IF/SBI-072/2008

Dedicatória

A gratidão é essa alegria da memória, esse amor do passado - não o sofrimento do que não é mais, nem o pesar do que foi. É o tempo reencontrado, se quisermos. Compreendemos que esse tempo torna a idéia da morte indiferente, como dirá Proust, pois aquilo que vivemos, a própria morte, que nos levará, não poderia tomar de nós: são bens imortais, diz Epicuro, não porque não morremos, mas porque a morte não poderia anular o que vivemos, o que fugidia e definitivamente vivemos. A morte só nos privará do futuro, que não é. A gratidão liberta-nos dele, pelo saber alegre do que foi. O reconhecimento é um conhecimento (ao passo que a esperança nada mais é que uma imaginação); é por aí que ela alcança a verdade, que é eterna, e a habita. Gratidão: desfrutar eternidade.

Isso não nos restituirá o passado, objetar-se-á Epicuro, nem o que perdemos... Sem dúvida, mas quem pode fazê-lo? A gratidão não anula o luto, consuma-o: “É necessário curar os infortúnios com a lembrança reconhecida do que perdemos, e pelo saber de que não é possível tornar não-consumado o que aconteceu.” Pode haver formulação mais bela do trabalho do luto? Trata-se de aceitar o que é, portanto, também o que não é mais, e de amá-lo como tal, em sua verdade, em sua eternidade: trata-se de passar da dor atroz da perda à doçura da lembrança, do luto a consumir ao luto consumado, da amputação à aceitação, do sofrimento à alegria, do amor dilacerado ao amor apaziguado. “Doce é a lembrança do amigo desaparecido”, dizia Epicuro - a gratidão é essa própria doçura, quando se torna alegre. No entanto, no sofrimento é mais forte primeiro: “Que terrível ele ter morrido!” Como poderíamos aceitar? Por isso o luto é necessário, por isso é difícil, por isso é doloroso. Mas a alegria retorna, apesar dos pesares: “Que bom ele ter vivido!” Trabalho do luto: trabalho da gratidão.

André Comte-Sponville

Para meu pai

“Você nunca mediu esforços para me apoiar. O que há de melhor em mim é fruto da sua fé inabalável.”

Agradecimentos

De todas as pessoas que tornaram este trabalho possível, eu gostaria de expressar minha especial gratidão:

à Prof^a. Márcia Fantini, acima de tudo pela sua confiança em mim e pela inestimável contribuição ao meu crescimento profissional

ao pessoal do LCr, em especial ao Antônio Carlos e ao Sérgio

às secretárias do Departamento de Física Aplicada, Lia e Inês

ao Prof. Osvaldo Sant’Anna e à Luciana, do Instituto Butantan, e à Cristália pela oportunidade

ao pessoal do LATIG, em especial os Profs. Jivaldo Matos e Lucildes Mercuri, ao Luís Cides e à Magali

ao pessoal do LAMFI, em especial ao Prof. Manfredo Tabacniks, ao Marcel e ao Marquinhos

ao pessoal do Laboratório de Alvos do Pelletron, Wanda e Jorge

ao pessoal do Laboratório de Materiais Magnéticos, em particular ao Sérgio

ao pessoal do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do IPEN, em especial à Ivana, pelas medidas de adsorção

ao Prof. Flávio Vichi e ao Eiwalt, do IQ-USP

à Teresa Martins e à Silvana Maranhão, pela paciência e pelas inúmeras dúvidas esclarecidas

ao pessoal do fórum e do canal de chat do PhD Comics

a todos os Tensores, em particular Dudu, Elton, Gabi, Léo Matheus, Pivo, Quel, Rebeca, Timpa e Uêba, pela amizade e pela convivência

a um Tensor em especial, o Daniel, e a seus pais, Fioravante e Lana, sem quem os últimos 3 anos e meio teriam sido muito mais difíceis

aos amigos Cláudia, Claudio e Roberto, por todas as longas noites de RPG e papo furado

ao Luciano, que mesmo com toda a distância e o pouco contato, é meu irmão

à Samara, cuja mera presença na minha vida faz de mim uma pessoa melhor

à minha família, especialmente a meus pais Antônia e Osvalindo e meus irmãos Ana Rosa e Leonardo

por último, mas não menos importante, aos camundongos cujas vidas foram sacrificadas em prol da ciência

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1 Introdução	3
2 Métodos Experimentais	10
2.1 Introdução	10
2.2 Emissão de Raios-X Induzidos por Prótons (PIXE)	11
2.2.1 Análise Quantitativa em PIXE	13
2.3 Espalhamento e Difração de Raios X a Baixo Ângulo (SAXRD)	17
2.3.1 Espalhamento de Raios X (SAXS)	18
2.3.2 Difração de Raios X (XRD)	18
2.4 Técnicas Complementares	22
2.4.1 Isotermas de Adsorção de Nitrogênio (NAI)	22
2.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)	23
2.4.3 Espectroscopia de Infra-vermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	23
3 Resultados e Discussão	25
3.1 Síntese da Sílica SBA-15	25
3.2 Caracterização por SAXRD	26
3.3 Reprodutibilidade da Síntese	29
3.3.1 Amostras	29
3.3.2 Caracterização	30
3.4 Distribuição de Tamanho de Partículas na SBA-15	35
3.5 Efeitos da Funcionalização com APTES e ClSi	40
3.5.1 Amostras	40
3.5.2 Caracterização	40
3.6 Calcinação em Vácuo da SBA-15	43
3.7 Incorporação de Albumina Bovina na SBA-15	51

3.7.1	Preparação de amostras	51
3.7.2	Caracterização	52
3.8	Incorporação de Vacina contra Hepatite A na SBA-15	59
3.9	Estudos de Localização Temporal da Sílica em Órgãos de Camundongos	68
3.9.1	Administração da Sílica a Camundongos	68
3.9.2	Preparação das Amostras	69
3.9.3	Órgãos Desidratados	69
3.9.4	Órgãos Calcinados	71
3.10	Estudos Biológicos Envolvendo a SBA-15	77
3.10.1	Efeito Adjuvante e Toxicidade	77
3.10.2	Efeito da SBA-15 sobre Macrófagos $M\Phi$	79
3.10.3	Resposta Inflamatória	79
4	Conclusões	81
A	Notações e Convenções	84

Resumo

Este trabalho consistiu numa avaliação, sob um ponto de vista físico, da aplicabilidade da sílica mesoporosa ordenada tipo SBA-15 como adjuvante imunológico. Inicialmente foi estudado o método de preparação e reprodutibilidade das propriedades do material, condição necessária para a síntese de grandes quantidades ($\approx 100\text{g}$). Mostrou-se que a calcinação em vácuo, comparada com o processo em N_2 e ar, resulta em material com estrutura mesoporosa mais bem ordenada.

Para aplicações biológicas foi analisado o potencial de encapsulação de antígenos no material, através de estudos de incorporação de Albumina Bovina (BSA) e vacina contra Hepatite A. Foi observada uma incorporação bem-sucedida de BSA na sílica, com essa proteína alojando-se dentro da estrutura de poros. Resultado semelhante foi observado para a vacina contra hepatite A. O processo mais eficiente de incorporação foi determinado para uma mistura em repouso e seca através de evaporação.

A aplicabilidade da sílica como adjuvante para uso animal foi avaliada através de análises, pelo método PIXE, da acumulação do material no organismo de camundongos. A sílica foi administrada a camundongos *Swiss* por via oral e intra-muscular, e o teor de silício em diferentes órgãos foi comparado aos teores em um grupo controle. Foi detectada a presença de sílica em determinados órgãos dos camundongos, cuja eliminação total se processa num período de 70 dias.

Além disso, em testes toxicológicos realizados no Instituto Butantan, a sílica mostrou-se eficaz na indução de resposta humoral e atóxica.

Abstract

This work consisted of an evaluation, from a physical standpoint, of the applicability of SBA-15 type ordered mesoporous silica as an immunological adjuvant. The method of preparation and reproducibility of the material properties were initially studied. Those conditions are necessary to synthesize large quantities of the material ($\approx 100\text{g}$). Vacuum calcination, when compared to the process executed in N_2 and air, results in a better ordered mesoporous structure.

For biological applications, the potential to encapsulate antigens in the material was analyzed through studies of incorporation of Bovine Serum Albumin (BSA) and vaccine for Hepatitis A. A successful incorporation of BSA in the silica was observed, with that protein being lodged inside the porous structure. A similar result was obtained for the vaccine for Hepatitis A. The most efficient incorporation process was determined by keeping the solution at rest and drying it through evaporation.

The applicability of silica as an immunological adjuvant for animal use was evaluated through PIXE analyses of the silicon accumulation in mice's organs. Silica was administrated to *Swiss* mice through oral and intramuscular ways and the silicon content of different organs was compared to the figures of the control group. The silica's presence was detected on certain organs, and it was completely eliminated after 70 days.

Besides that, toxicological studies accomplished at the Butantan Institute showed that the silica is efficient for induction of humoral response and it is non-toxic.

Capítulo 1

Introdução

A descoberta dos materiais da família M41S[1] em 1992 com estrutura de poros ordenados, classificados segundo a IUPAC[2] como mesoporosos (poros na região entre 2nm e 50nm), veio expandir a família dos materiais porosos ordenados, restritos à região dos microporos (2nm) como zeólitas e semelhantes.

O MCM (*Mobil Composition of Matter*) 41[1, 3] foi o primeiro material a apresentar um arranjo regular de poros, acima de 2nm bem como uma distribuição de tamanho de poro bem estreita.

O mecanismo de formação desses materiais, chamado de “Modelagem por Cristal Líquido” (LCT), proposto por Beck et al.[3] é basicamente um processo de auto-agregação de moléculas complexas que funcionam como direcionadores de estrutura, conforme ilustrado na figura 1.1. Nesse processo uma fonte de sílica, um surfactante e um solvente (usualmente água) são misturados em quantidades apropriadas. A partir de uma determinada concentração micelar crítica (CMC) o surfactante forma uma fase micelar que pode ser hexagonal (MCM-41), cúbica (MCM-48) ou lamelar (MCM-50). Outras condições da solução também podem influenciar esse comportamento, como

Figura 1.1: Representação do mecanismo de auto-agregação na síntese com troca iônica[4].

pH, temperatura, etc.

Com os avanços na pesquisa em torno do processo de síntese, novas abordagens foram sendo investigadas. Moldes poliméricos passaram a ser utilizados, dando origem a uma nova classe de sílicas mesoporosas altamente ordenadas com poros superiores a 2nm, entre as quais podemos citar a SBA-11 (cúbica), SBA-12 (hexagonal 3D), SBA-15 (hexagonal 2D) e cúbica em forma de gaiola (SBA-16)[5, 6], com tamanho de poros superior aos da família MCM. No caso da SBA-15 o molde não é iônico e, por isso, a aglomeração de grupos silicato na estrutura micelar é ocasionada pela formação de

pontes de hidrogênio. A figura 1.2 apresenta os primeiros passos na formação da SBA-15. Inicialmente as cadeias poliméricas se aglomeram formando micelas. As moléculas da fonte de sílica, ao serem adicionadas à solução, migram para dentro das micelas por serem hidrofóbicas (a). Essas moléculas são rapidamente hidrolizadas e monômeros passam para a região intermediária (coroa), onde a polimerização da sílica tem início, esgotando a água nessa região, ocorrendo a migração da sílica em formação para fora da micela. Esse fenômeno acontece inicialmente na interface entre a região intermediária e o núcleo da micela (b) e, depois de 1 hora, somente na região intermediária (c).

Figura 1.2: Fases da polimerização da sílica durante a síntese da SBA-15[7].

As figuras 1.3 e 1.4 apresentam micrografias da sílica. Na primeira os feixes de poros podem ser observados aglomerados na estrutura da partícula de sílica, enquanto que na segunda, com maior ampliação, vê-se o detalhe de um desses feixes, bem como a ordenação hexagonal dos poros.

Figura 1.3: Microscopia de varredura da sílica SBA-15.

Figura 1.4: Microscopia de transmissão da sílica SBA-15.

O interesse primário no desenvolvimento do MCM-41 era a aplicação na indústria do petróleo[8], em especial no processamento de resíduos pesados. A incorporação de diversos metais na estrutura das paredes da sílica foi testada numa tentativa de aumentar o potencial catalítico. Parte considerável do esforço de pesquisa tem sido no sentido de se obter uma distribuição homogênea de átomos metálicos na estrutura da sílica, de modo a se obter o maior número possível de sítios ativos.

Outras aplicações também têm sido investigadas para esses materiais. Feng et al.[9] utilizou uma rota diferenciada para a modificação da superfície da sílica. Grupos funcionais podem ser introduzidos na superfície dos poros como grupos terminais de uma monocamada orgânica. Esse material, chamado de “monocamadas funcionalizadas em suportes mesoporosos” (FMMS), pode remover com eficiência mercúrio ou outros metais pesados presentes em soluções contaminadas.

A sílica também tem sido utilizada como molde na preparação de filamentos condutores de polianilina[10] e de fios de carbono condutores[11]. Esses materiais também são interessantes devido às suas aplicações em dispositivos eletrônicos microscópicos. Fios semicondutores de germânio foram obtidos para aplicação em microeletrônica [12].

Finalmente, o MCM-41 foi utilizado para imobilizar pequenas enzimas na estrutura mesoporosa[13]. A quantidade de enzima carregada pelo material mostrou clara dependência com o tamanho dos poros, indicando que essa característica tem influência direta sobre o processo de imobilização.

Em particular, as aplicações biológicas de sílicas mesoporosas têm sido largamente investigadas. Lin et al.[14] investigaram a utilização de partículas de sílica como marcadores celulares. Um composto formado de hemoglobina incorporada à SBA-15 foi utilizado na fabricação de um sensor de peróxido de hidrogênio[15]. Esses materiais também têm sido investigados em purificação de moléculas biológicas como aminoácidos[16].

Um grande número de estudos tem focado as vantagens da utilização de materiais mesoporosos ordenados em sistemas de *drug delivery*. Esse tipo de aplicação em potencial varia desde a administração de Ibuprofeno[17], uma droga anti-inflamatória, até a incorporação de drogas anti-câncer hidrofóbicas[18], proteínas impermeáveis à membrana celular[19] e complexos híbridos de sílica e colágeno[20].

Em particular, a SBA-15 tem se mostrado especialmente efetivo como adjuvante* no que se refere à resposta imunológica. Mercuri et al.[21] mostraram que, para camundongos bons e maus respondedores à formação de anticorpos, essa sílica induz resposta imunológica similar ou superior à resposta do adjuvante tradicionalmente utilizado em inoculação de animais, conhecido como Adjuvante de Freund Incompleto (IFA). Esse estudo indica que, ao inibir a ação enzimática dos macrófagos $M\Phi$, a sílica permite uma maior eficiência na produção de anticorpos.

Este trabalho tem por objetivo investigar, de um ponto de vista físico, as possibilidades de utilização da sílica mesoporosa ordenada SBA-15 como adjuvante para uso animal, de acordo com patente registrada em 2007[22]. Isso foi feito através de duas abordagens. A primeira delas foi a investigação das possibilidades de incorporação de antígenos na estrutura porosa das partículas da sílica, utilizando como sondas a albumina bovina (BSA) e a vacina contra hepatite A. A sílica foi caracterizada e a incorporação dessas substâncias foi estudada através de Espalhamento e Difração de Raios X a Baixo Ângulo (SAXRD), com análises complementares feitas com Isotermas de Adsorção de Nitrogênio (NAI), Análise Termogravimétrica (TGA) e Espectroscopia de Infra-Vermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

A segunda abordagem foi a possível acumulação da sílica nos órgãos de camundon-

*Um adjuvante é uma substância que, em conjunto com um antígeno, é capaz de melhorar a resposta imunológica a ele.

gos aos quais ela foi administrada. Baços, fígados, rins e pulmões de camundongos submetidos a administração oral e via intra-muscular foram analisados, juntamente com órgãos de um grupo controle, através da técnica de Emissão de Raios-X por Feixe de Prótons (PIXE).

A eficácia da sílica como indutor de resposta imunológica e a toxicidade do material foram analisadas paralelamente no Instituto Butantan. Este trabalho é uma colaboração entre o IFUSP, o IQUSP (através do Prof. Jivaldo R. Matos), a UNIFESP (através da Profa. Lucildes P. Mercuri) e o Instituto Butantan (através do Dr. Osvaldo A. B. E. Sant'Anna).

Capítulo 2

Métodos Experimentais

2.1 Introdução

As amostras analisadas neste trabalho foram sintetizadas na forma de pó segundo o procedimento conhecido para se obter a sílica mesoporosa ordenada tipo SBA-15[23]. Para a caracterização do material como preparado e após incorporação com moléculas de interesse biológico foram utilizados diferentes métodos experimentais.

O método PIXE (Proton Induced X-ray Emission) foi utilizado para determinação da presença de sílica em órgãos de camundongos inoculados. Os métodos de raios X foram utilizados para analisar a estrutura e eventual presença do material biológico na sílica. A adsorção de N_2 foi também empregada para determinar a presença de material biológico através da medida da área superficial, tamanho e volume de poros das amostras. A análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a massa de amostras submetidas a tratamento térmico. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para determinar a presença dos compostos biológicos e polímero nas amostras.

A seguir será feita uma breve introdução de cada um desses métodos.

2.2 Emissão de Raios-X Induzidos por Prótons (PIXE)

Proposto em 1970[24], o método PIXE consiste na espectroscopia de fluorescência das camadas mais internas dos átomos presentes numa amostra através da utilização de um feixe de partículas para excitação de elétrons dessas camadas.

Como indicado na figura 2.1*, o feixe proveniente de um acelerador (tipicamente composto de prótons) atinge a amostra, causando uma ionização nos átomos ali presentes. O decaimento de elétrons de níveis superiores para os níveis mais internos do átomo causa a emissão de um fóton cuja energia é dada pela diferença entre os níveis inicial e final da transição do elétron ([25], Cap. 2). Para cada elemento as energias de transição entre as diferentes camadas do átomo são bem definidas e o conjunto das energias dos fótons assim emitidos por um átomo o identificam biunivocamente com um elemento.

A camada final de uma transição dá origem ao prefixo do nome dessa transição. A camada inicial de uma transição dá origem ao sufixo do nome dessa transição. Assim, a transição em que um elétron decai da camada L para a camada K é chamada K_α , enquanto que uma transição da camada M para a camada K é chamada de K_β e uma transição da camada M para a camada L é L_α . A figura 2.2 ilustra as transições entre as camadas mais interiores do átomo.[†]

*Cortesia: Prof. Dr. Manfredo H. Tabacniks

[†]Essa é uma representação simplificada das transições eletrônicas, visto que há outros efeitos, como a existência do spin do elétron, cuja alteração na energia do fóton emitido é muito pequena para ser detectada pelos detectores utilizados em PIXE.

Figura 2.1: Ilustração da técnica PIXE. D1 e D2 - detectores Si(Li), C - colimador, T - porta-alvos, F - copo de Faraday

Figura 2.2: Transições entre as camadas K, L e M (fora de escala).

2.2.1 Análise Quantitativa em PIXE

Um espectro PIXE é composto por dois tipos de radiação:

- Radiação característica, originária das transições causadas pela troca energética entre os prótons do feixe e os elétrons nos átomos da amostra.
- *Background* originário de outros processos sofridos pelo feixe dentro da amostra.

O *background* pode ter na sua origem vários processos diferentes. O mais importante deles é o *brehmstrahlung*, a radiação emitida na desaceleração de uma partícula carregada. Esse processo possui duas componentes[24]. A componente primária é originada pela desaceleração dos prótons do próprio feixe dentro da amostra, o que causa um *background* relativamente baixo na região de baixas energias, mas que é predominante na região de altas energias. A segunda componente é atribuída ao *brehmstrahlung* secundário, originado pela desaceleração de elétrons ejetados dos átomos presentes na amostra pelos prótons do feixe.

A origem do *brehmstrahlung* secundário deixa claro que o *background* na região de baixas energias está diretamente relacionado à intensidade dos picos de fluorescência do espectro característico, já que em ambos os casos o processo primário é o surgimento de vacâncias nas camadas mais internas do átomo pelas partículas incidentes.

A determinação do total de contagens em cada pico é feita com o auxílio de um programa de computador, com o qual é ajustada uma curva Gaussiana com extremidades exponenciais a cada pico e um polinômio ao *background*. Com cada pico identificado pode-se então determinar o número de fótons detectados que foi emitido por cada elemento na amostra. A análise quantitativa é feita com auxílio de padrões para calibração em energia.

Uma das grandes vantagens do método PIXE é que trata-se de uma medida absoluta, ou seja, o número de fótons emitidos por um determinado elemento na amostra está relacionado com a sua concentração por uma série de fatores que são conhecidos ou determinados experimentalmente. Isso significa que não é necessária a utilização de amostras calibradas ou padrões de comparação, especialmente para alvos finos. No caso de alvos grossos os cálculos envolvidos em alguns desses parâmetros podem se tornar extremamente complexos e outras abordagens são necessárias.

Alvos Finos

Considerando um feixe com distribuição de intensidade uniforme em toda a sua área transversal S atingindo perpendicularmente uma massa $M(Z)$ de um filme elemental fino e uniforme, a quantidade de fótons K_α ou L_α do elemento Z devida à passagem de uma corrente de N_p prótons é dada por[25]

$$Y_0(Z) = \frac{N_p M(Z)}{S} \frac{\sigma_Z(E_0) \omega_Z b_Z^\alpha \varepsilon_Z N_{av}}{A_Z} \quad (2.1)$$

onde Z e A_Z são o número e massa atômicos do elemento, $\sigma_Z(E_0)$ a seção de choque de ionização para a energia do próton E_0 , ω_Z a taxa de fluorescência K ou L, b_Z^α a fração de raios X K ou L que aparecem na linha K_α ou L_α , ε_Z a eficiência absoluta de detecção e N_{av} o número de Avogadro. O subscrito zero indica que o filme é fino o suficiente para que a perda de energia do feixe na amostra seja desprezível.

Usualmente, no entanto, é costumeiro utilizar a massa específica por unidade de área nessa formulação, visto que dessa forma contempla-se as duas situações possíveis para a relação entre a seção transversal do feixe e a área da amostra:

$$M_a(Z) = \frac{M(Z)}{S} \quad (2.2)$$

Por conveniência o conjunto de parâmetros conhecidos e experimentais é aglomerado em um só termo, conhecido como sensibilidade de alvo fino:

$$k(Z) = \frac{\sigma_Z(E_0)\omega_Z b_Z^\alpha \varepsilon_Z N_{av}}{A_Z} \quad (2.3)$$

onde $k(Z)$ é dado em fótons por próton por $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dessa forma a equação 2.4 torna-se

$$Y_0(Z) = k(Z)N_p M_a(Z) \quad (2.4)$$

Alvos Grossos

Para alvos grossos, no entanto, fatores considerados na análise de alvos finos não podem ser utilizados. Em particular, para alvos finos pode-se supor que a perda de energia do feixe e a auto-absorção de radiação são desprezíveis. Em alvos grossos os íons do feixe percorrem uma trajetória dentro do alvo, perdendo energia e interagindo. Dessa maneira, a suposição inicial da análise de amostras finas, de que a variação da seção de choque de produção de raios X é desprezível, deixa de ser válida. Além disso, por se tratar de uma amostra grossa, o feixe não a atravessa, o que dificulta a determinação da carga total acumulada na amostra pelo método tradicional.

A análise PIXE de alvos grossos utilizada neste trabalho foi proposta por Aburaya em 2005[26]. O rendimento de produção de raios-X para alvos grossos $K(Z)$ é escrito em função do rendimento para alvos finos, $k(Z)$, acrescido de uma correção $F(Z)$. Tal fator é a razão entre os rendimentos para alvos grossos e alvos finos, e é calculado nu-

mericamente com auxílio de um pacote computacional[27]. Esse fator entra na equação PIXE (2.4):

$$Y_0(Z) = k(Z)N_pM_a(Z)F(Z) \quad (2.5)$$

2.3 Espalhamento e Difração de Raios X a Baixo Ângulo (SAXRD)

Um experimento de espalhamento e difração de raios X a baixos ângulos (SAXRD) envolve a detecção de raios X provenientes de uma amostra posicionada entre uma fonte de raios X e um detector, usualmente utilizando a geometria de transmissão, conforme apresentado na figura 2.3. Os raios X provenientes de uma fonte atravessam a amostra e atingem um detector posicionado a uma distância D . Um *beam-stopper* é posicionado entre a amostra e o detector para atenuar o feixe direto, ou seja, o feixe formado pelos fótons que não são espalhados na amostra, cuja intensidade pode danificar o detector.

As fontes de raios X mais comuns são tubos, que geram a radiação através da excitação dos átomos de um alvo por um feixe de elétrons emitido de um filamento e acelerados por um campo elétrico. Os elementos mais comumente utilizados na construção de alvos são o Cobre (Cu), Molibdênio (Mo) e Tungstênio (W).

Medidas envolvendo raios X também podem ser executadas em aceleradores tipo síncrotron, onde a deflexão de um feixe de íons por um dipolo magnético causa a emissão de radiação. Há apenas duas instalações desse tipo no hemisfério sul: o Australian Synchrotron, em operação em Melbourne, Austrália desde 2007, e o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em operação em Campinas desde 1997.

O gráfico tipicamente obtido é composto pelo espalhamento de raios X a baixo ângulo proveniente de inomogeneidades eletrônicas não correlacionadas (fator de forma) e por um padrão de interferência entre objetos de diferentes densidades eletrônicas (fator de estrutura)[28].

Figura 2.3: Geometria experimental de um experimento de SAXS/SAXRD.

2.3.1 Espalhamento de Raios X (SAXS)

O espalhamento de raios X a baixo ângulo sonda inomogeneidades esparsas estruturais da densidade eletrônica da amostra na região de nanômetros a frações de micrometros em ângulos próximos a 0° .

O modelo mais comum utilizado na descrição e análise desse fenômeno, descrito, entre outros, por Guinier[29], Glatter[30] e Svergun[31], parte do princípio de que a amostra é diluída.

Um modelo para a descrição do espalhamento de raios X a baixo ângulo numa amostra como a SBA-15, explorada neste trabalho, requer uma análise mais cuidadosa, pois, por não se tratar de uma amostra diluída, o resultado observado no detector será uma convolução do espalhamento de cada partícula presente na amostra e do espalhamento da sua estrutura porosa, seja ela ordenada ou não.

2.3.2 Difração de Raios X (XRD)

Neste trabalho o principal aspecto a ser considerado na interação de raios X com a sílica SBA-15 é a formação de picos de difração a baixos ângulos devida à ordenação dos poros presentes no material. Denomina-se as caracterizações por raios X deste trabalho como SAXRD. Esses picos surgem da interferência construtiva entre os feixes

espalhados. Essa interferência ocorre quando a diferença de fase entre diversas ondas atingindo o mesmo ponto é nula ou um múltiplo de 2π [28]. Esse é o conceito básico por trás da Lei de Bragg[32], que prevê em que ângulos com relação à direção do feixe incidente devem ser observados picos de difração.

Figura 2.4: Ilustração da Lei de Bragg.

Sejam dois feixes paralelos e provenientes da mesma fonte (e, portanto, em fase) incidentes sobre um conjunto de centros espalhadores (Fig. 2.4), separados por uma distância d , que corresponde à separação interplanar entre XX' e YY' . A diferença de caminho óptico entre eles será dada pela distância $\overline{ABC}$ e o ângulo de espalhamento, ou seja, o ângulo entre o feixe incidente e o feixe espalhado, é $\widehat{ABC} = 2\theta$. Através da simetria da figura temos

$$\overline{AB} = \overline{BC} = d \sin(\theta) \quad (2.6)$$

A condição para o surgimento de um pico é que a diferença de fase entre as duas ondas seja nula ou um múltiplo de 2π . Para isso, a diferença de caminho óptico entre as duas ondas deve ser um múltiplo inteiro do comprimento de onda, e portanto:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad (2.7)$$

Alternativamente um padrão de difração também pode ser descrito em termos do *vetor de onda* ou *vetor troca de momento*, que representa a diferença entre a direção do raio incidente e a direção do raio emergente da amostra, representadas por vetores unitários. Esse vetor está relacionado com o ângulo de espalhamento através da relação

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad (2.8)$$

de maneira que o vetor de onda e a distância interplanar de cada pico estão relacionados por

$$d = \frac{2\pi n}{q} \quad (2.9)$$

A partir dos dados de um experimento de difração é então possível determinar, para cada um dos picos presentes, qual o plano que dá origem a eles e, a partir desse conjunto de planos, determinar qual a estrutura que o material em questão apresenta. Em particular, os valores de interesse são os parâmetros de rede, que representam a menor distância entre dois pontos equivalentes dentro da estrutura ordenada, denominados a , b e c , além de três ângulos, α , β e γ , entre as três direções x , y , e z . Esse procedimento, conhecido como indexação, consiste em identificar as diversas direções possíveis compatíveis com os picos ou pontos de difração de um difratograma ou fotografia.

A sílica SBA-15 apresenta estrutura hexagonal bidimensional, e a relação entre as distâncias interplanares d_{hkl} e os parâmetros de rede para tal ordenação é dada por

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (2.10)$$

Numa estrutura hexagonal bidimensional para a qual o parâmetro l é considerado nulo temos, para as cinco primeiras reflexões observadas para essa rede, as relações entre a distância interplanar e o parâmetro de rede apresentadas na tabela 2.1.

h	k	a/d_{hk}
1	0	$2/\sqrt{3}$
1	1	2
2	0	$4/\sqrt{3}$
2	1	$\sqrt{28/3}$
3	0	$6/\sqrt{3}$

Tabela 2.1: Relação entre distância interplanar e o parâmetro de rede a para as primeiras reflexões de uma rede hexagonal plana ($l = 0$).

Neste trabalho avaliamos também as intensidades das reflexões através do cálculo da área integrada sob o pico, estimando o erro apenas a partir do cálculo das áreas.

2.4 Técnicas Complementares

2.4.1 Isotermas de Adsorção de Nitrogênio (NAI)

A técnica de isotermas de adsorção permite uma medida indireta de propriedades físicas do material tais como área superficial e distribuição do tamanho de poros. Em particular neste trabalho foram utilizadas isotermas de adsorção de N_2 a 77K.

Num experimento de adsorção, uma determinada pressão é aplicada a uma câmara onde o material se encontra, e essa pressão é mantida externamente até que a pressão dentro da câmara se estabilize e não haja mais fluxo de gás em nenhuma direção. Em seguida, procede-se a uma pressão maior, até um valor de pressão relativa pré-estabelecido. Em seguida, o caminho oposto é seguido, despressurizando-se gradualmente a câmara, sempre esperando pelo equilíbrio antes da execução de um novo passo. Um sensor mede a quantidade de gás que entra ou sai da câmara, de maneira que a quantidade de gás adsorvido na amostra é conhecida.

Dois métodos são utilizados para a caracterização de materiais por isotermas de adsorção.

O primeiro deles, conhecido como isoterma BET[33], fornece um valor para a área superficial específica do material, fornecendo um modelo para a formação de camadas de material adsorvido na superfície da amostra, calculando-se as condições de equilíbrio de cada camada. A área superficial é obtida através de um ajuste da equação

$$\frac{v}{v_m} = \frac{cx}{(1-x)[1+(c-1)x]} \quad (2.11)$$

aos primeiros pontos da isoterma, onde v é a quantidade adsorvida total, v_m é a quantidade adsorvida por grama em uma monocamada, c é o coeficiente angular e x é

a pressão relativa.

A distribuição de tamanho de poros é obtida através do método BJH[34, 35, 36], que leva em conta o efeito de capilaridade do gás dentro dos poros. Esse método fornece um modelo para a histerese encontrada entre a adsorção e a dessorção do gás na amostra e calcula a distribuição de tamanho de poros através de uma comparação com uma isoterma conhecida, procedimento conhecido como α_s -plot.

2.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) consiste na monitoração da massa de uma amostra durante um determinado tratamento térmico. Esse procedimento permite, a partir da variação de massa, identificar transições dos materiais presentes na amostra, como por exemplo a evaporação de água, decomposição de espécies orgânicas e mudanças de fase.

A curva obtida nessa medida pode ser diferenciada, obtendo-se assim a derivada da variação de massa. Essa curva contém informações sobre a velocidade das diferentes transições que ocorrem durante o procedimento.

2.4.3 Espectroscopia de Infra-vermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que consiste na determinação do coeficiente de absorção de radiação na faixa de 4000cm^{-1} a 400cm^{-1} . Essa região contém energias que excitam diversos modos normais de vibração moleculares, de maneira que determinadas moléculas absorvem fótons em determinadas regiões dentro dessa faixa de energias. O resultado é um

gráfico de intensidade transmitida que é capaz de identificar as ligações moleculares presentes na amostra. Esse processo é capaz de identificar os compostos presentes no material, auxiliando na compreensão da sua estrutura atômica e molecular.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Síntese da Sílica SBA-15

Para a preparação das amostras de SBA-15[23] foram utilizadas as proporções em massa apresentadas na tabela 3.1.

TEOS	8,6g
HCl 2M	122g
P123	4g
H_2O	28g

Tabela 3.1: Proporções em massa empregadas na síntese da sílica SBA-15.

O polímero Pluronic P123 ($PEO_{20}PPO_{70}PEO_{20}$), fornecido pela BASF, foi solubilizado juntamente com a solução aquosa de HCl e submetido a agitação magnética e mecânica por aproximadamente 1 hora. Em seguida foi adicionado o TEOS (Tetra-Etil Orto-Silicato), fornecido pela Fluka, e a mistura foi mantida sob agitação por 24h.

Após o processo de agitação a mistura é colocada em um auto-clave e submetida a tratamento hidrotérmico a $100^{\circ}C$ por 2 dias, lavada abundantemente com água de-

ionizada e seca ao ar livre à temperatura ambiente. Finalmente, o pó resultante foi submetido a calcinação para remoção do polímero sob atmosfera de N_2 por 2 horas e ar por 4 horas.

3.2 Caracterização por SAXRD

O pó resultante do processo de síntese foi caracterizado por SAXRD num equipamento disponível no Laboratório de Cristalografia (LCr) do IFUSP com anodo rotatório e feixe linha proveniente de um tubo de Cu com radiação monocromatizada ($\lambda = 0,15418\text{nm}$) e detector tipo *Image Plate*. Foi utilizada no tubo de raios X uma potência de 12,5kW (50kV e 250 μ A). A amostra foi acondicionada em capilar de vidro de 2mm de diâmetro. Nas figuras 3.1 e 3.2 estão apresentados os resultados obtidos para a amostra de SBA-15 como sintetizada e passada em peneira grossa (malha de seda). Após moagem mecânica em almofariz de ágata a amostra não apresentou alterações em suas propriedades estruturais.

A amostra é submetida a 2 horas de exposição ao feixe. Do arquivo resultante da leitura do Image Plate é extraído o padrão obtido para a amostra, do qual é subtraído o espalhamento obtido para o capilar vazio. Todas as medidas são normalizadas pela transmitância, que é determinada pela razão entre a média do número de fótons detectados por um detector de cintilação com porta-amostra vazio e a média do número de fótons detectados com um capilar ou uma amostra posicionados na câmara.

Os gráficos apresentados nas figuras 3.1 e 3.2 também ilustram o processo de redução dos dados. Do dado original é subtraído o padrão do capilar, e o resultado final, corrigido (sufixo “_cor”), é obtido. A amostra peneirada possui o mesmo padrão de espalhamento da amostra original.

Figura 3.1: SAXRD preliminar de SBA-15 como sintetizada (sufixo “v”), capilar e dado corrigido.

Esses mesmos pós foram também foram peneirados em malhas de 20 μm , 10 μm e 5 μm . No entanto, as partículas são grandes demais e nenhuma porção significativa do material passou pelas malhas.

Figura 3.2: SAXRD preliminar de SBA-15 passada em peneira grossa (sufixo “m”), capilar e dado corrigido.

3.3 Reprodutibilidade da Síntese

3.3.1 Amostras

Quatro sínteses independentes da sílica mesoporosa ordenada SBA-15 foram realizadas com o objetivo de verificar a possibilidade de síntese de grandes quantidades desse material, necessárias para outras análises biológicas, através de sínteses em série. Essa análise foi feita por SAXRD (v. 3.2, pág. 26).

Além disso, para garantir a confiabilidade da correção de transmitância, para essas amostras foram realizadas, além das medidas de transmissão com cintilador, medidas de transmissão com uma placa de carvão vítreo colocada na frente da amostra. Em seguida, era calculada uma curva contendo a razão entre as intensidades das medidas feitas utilizando carvão vítreo com e sem amostra. O coeficiente linear de uma reta

Figura 3.3: Exemplo de determinação do coeficiente de transmitância com uso de carvão vítreo, determinado pelo coeficiente linear da reta vermelha apresentada na subfigura.

ajustada ao fim dessas curvas foi utilizado no cálculo da correção de transmitância. Um exemplo desse procedimento é apresentado na figura 3.3.

3.3.2 Caracterização

Todas as amostras apresentam, após a calcinação (ou seja, remoção do molde polimérico), aumento no espalhamento e na intensidade dos picos de difração (v. figs. 3.4 a 3.7) e o efeito de encolhimento característico da remoção do polímero, ou seja, parâmetros de rede menores que os do material como sintetizado. Além disso, diferenças entre as duas metodologias de correção por transmissão não são significativas, e por esse motivo as análises posteriores a essa incluem apenas as medidas corrigidas com o uso do detector de cintilação, por se tratar de um método mais rápido e prático.

Figura 3.4: SAXRD obtidos para a síntese 1, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)

Figura 3.5: SAXRD obtidos para a síntese 2, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)

Figura 3.6: SAXRD obtidos para a síntese 3, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)

Figura 3.7: SAXRD obtidos para a síntese 4, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)

Figura 3.8: Picos de difração das amostras de quatro sínteses independentes antes da calcinação.

As diferenças observadas nas curvas de espalhamento das amostras antes da calcinação (v. fig. 3.8) devem-se a diferenças no processo de lavagem, que provoca variação na absorção e espalhamento dos raios X.

A figura 3.9 apresenta os picos de difração das amostras calcinadas, isolados do *background* de espalhamento através da subtração de uma reta entre os limites dos picos. Devido à baixa intensidade os picos (110) e (200) foram analisados em conjunto.

Figura 3.9: Picos de difração das amostras de quatro sínteses independentes depois da calcinação.

A partir dos dados das amostras calcinadas, foram calculados os parâmetros de rede associados a cada pico e o valor médio, além da área integrada dos picos. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 3.2. Após a calcinação o parâmetro de rede apresenta variação inferior a 2%, tanto no seu valor médio (a_{avg}) quanto nos valores individuais de cada pico. No entanto, a área total integrada dos três picos ((100), (110) e (200)) apresenta variação de até 28% entre o menor valor e o maior valor, donde conclui-se que o processo de lavagem das amostras durante a síntese deve

ser sistematizado.

	$d_{(100)}$ (nm)	a (nm)	$d_{(110)}$ (nm)	a (nm)	$d_{(200)}$ (nm)	a (nm)	a_{avg} (nm)	A (u.arb.)
Sínt. 1	10,9	12,6	6,1	12,3	5,3	12,3	12,4(2)	14(2)
Sínt. 2	11,1	12,8	6,2	12,5	5,4	12,4	12,6(2)	16(2)
Sínt. 3	11,0	12,7	6,2	12,4	5,3	12,3	12,5(2)	12(2)
Sínt. 4	11,1	12,8	6,2	12,5	5,4	12,4	12,6(2)	11(2)

Tabela 3.2: Distâncias interplanares e parâmetros de rede obtidos para os picos das amostras calcinadas. a_{avg} é o parâmetro de rede médio entre os três picos e A é a área integrada total dos picos.

3.4 Distribuição de Tamanho de Partículas na SBA-15

Investigações anteriores realizadas pelo Dr. Jivaldo R. Matos (IQ-USP) em equipamento do Departamento de Minas da POLI-USP indicavam que a distribuição do tamanho de partícula da sílica SBA-15 tem um máximo em $35\mu\text{m}$, resultado compatível com o fato do pó de sílica não passar em peneira de $20\mu\text{m}$. Tentativas de moagem do pó em almofariz de ágata não tiveram sucesso em reduzir o tamanho de partícula, bem como as tentativas de passar o pó na peneira com utilização de solução aquosa de diversas concentrações.

Dada a importância do controle do tamanho de partícula é para aplicações biológicas uma nova tentativa de micronização foi executada por técnicos da Cristália Indústria Farmacêutica, e os pós resultantes foram submetidos a avaliação do tamanho médio de partícula. Essas medidas foram realizadas no Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica-USP. Os resultados estão apresentados na figura 3.10. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.3* e na figura 3.10.

* $D(v, p)$: valor abaixo do qual está o diâmetro de uma fração p das partículas
 $D[4, 3]$: média em massa - metade da massa da amostra está em partículas com diâmetro inferior a esse
 $D[3, 2]$: média em área - metade da área superficial da amostra está em partículas com diâmetro inferior a esse (não leva em conta a porosidade da sílica)

	$D(v, 0.5)$	$D(v, 0.9)$	$D[4, 3]$	$D[3, 2]$
Não-micronizada	18,50	33,98	19,84	11,55
Micronizada	16,23	28,85	17,15	10,15
Variação	$\Delta = 12,3\%$	$\Delta = 15,5\%$	$\Delta = 13,6\%$	$\Delta = 12,2\%$

Tabela 3.3: Diâmetros de partícula das amostras de sílica SBA-15 não micronizada e micronizada. Valores em μm .

(a) Não micronizada

(b) Micronizada

Figura 3.10: Distribuições de tamanho de partícula para sílica SBA-15 não micronizada e micronizada.

Todos os parâmetros apresentados na tabela 3.3 tiveram variação abaixo de 15%, o que indica que o processo de micronização teve o efeito de homogeneizar o pó, tornando-o mais finamente dividido, sem entretanto alterar sensivelmente a distribuição de tamanho de partículas. Em outras palavras, o processo reduziu o grau de aglomeração da sílica. Além disso, o diâmetro de partículas maiores foi mais afetado que o diâmetro de partículas menores (v. $D(v, 0.9)$ e $D(v, 0.5)$).

A comparação entre as duas amostras foi concluída com medidas de difração de raios X a baixo ângulo, apresentadas na figura 3.11.

Figura 3.11: SAXRD de amostras de SBA-15 não-micronizada (SBA15) e micronizada (SBA15m).

A pequena diferença apresentada no espalhamento a ângulos superiores a $\approx 1,75^\circ$ é atribuída à presença de mais espaços vazios entre as partículas após a micronização. O parâmetro de rede para as duas amostras é de 12,4(3)nm e 12,6(2)nm para SBA15 e

SBA15m, respectivamente, o que evidencia que não há alteração estrutural apreciável.

O valor integrado dos picos de difração para as duas amostras é de 15,0 u.arb. para a amostra SBA15 e de 15,4 u.arb. para a amostra SBA15m, o que representa uma diferença inferior a 3%, dentro da precisão experimental e coerentes com os dados de espalhamento de luz (v. tab. 3.3).

Medidas de adsorção de N_2 dessas amostras foram realizadas no Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais, no IPEN, em um equipamento Micromeritics (Norcross, GA), modelo ASAP 2010. As amostras foram submetidas a degaseificação por 2h, seguida do processo de medida, realizado a 77K, num intervalo de pressão relativa de 10^{-6} a 0,995. As áreas superficiais foram avaliadas segundo o método BET[2] e a distribuição de tamanho de poro foi obtida através do método BJH[34].

Não há variação significativa no diâmetro de poro entre a sílica micronizada e a não-micronizada (v. tabela 3.4 e figs. 3.12 e 3.13). A área superficial e o volume de poros são ligeiramente maiores na sílica micronizada. Isso evidencia pouca ou nenhuma mudança na estrutura porosa da sílica devida ao processo de micronização. No entanto, se existente, essa alteração ocorre na direção de um material mais eficiente, visto que, com maior área superficial e volume de poros, maior é a capacidade de adsorção da sílica.

Amostra	Área BET m ² /g	Vol. de poro (cm ³ /g)	Tam. de poros (nm)
SBA-15	624	0,9	11,0
SBA-15m	668	1,0	11,0

Tabela 3.4: Área superficial, diâmetro e volume de poros e das amostras de SBA-15 virgem e micronizada.

Figura 3.12: Isotherma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15.

Figura 3.13: Isotherma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 micronizada.

3.5 Efeitos da Funcionalização com APTES e ClSi

3.5.1 Amostras

Determinadas aplicações de sílicas mesoporosas, como, por exemplo, transporte de antibióticos[37], requerem que esse material seja capaz de adsorver seletivamente moléculas de um determinado tipo. Esse tipo de característica pode ser obtida através do processo de funcionalização[38], que consiste na substituição dos radicais -OH das ligações Si-OH presentes na superfície da sílica por radicais que apresentem as propriedades desejadas, como, por exemplo, hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade.

Foi investigado o efeito da funcionalização da sílica SBA-15 com dois materiais: APTES (3-aminopropil trietoxissilano)[39] e ClSi (clorosililidina). O material funcionalizado foi obtido através de aquecimento da sílica em solução com etanol e o composto em questão. Depois de seco, o pó resultante foi caracterizado através de SAXRD. Também foi efetuada a medida de uma amostra de SBA-15 pura, sem funcionalização, para comparação.

3.5.2 Caracterização

As amostras funcionalizadas apresentam efeitos distintos (fig. 3.14 e tab. 3.5). A amostra funcionalizada com ClSi apresenta intensidades dos picos semelhantes às da amostra de SBA-15 original, apresentando contudo um desvio na posição dos picos, indicando uma ligeira alteração ($\approx 2\%$) no parâmetro de rede, embora essa variação seja pouco significativa. A amostra funcionalizada com APTES, por outro lado, não apresenta desvio na posição do pico, mas a curva de intensidade é bem alterada. Não somente as intensidades dos picos diminuem drasticamente, sendo possível discernir

Figura 3.14: Medidas de SAXRD de SBA-15 funcionalizada com APTES e ClSi.

apenas o pico (100), mas também o padrão de espalhamento a baixo ângulo, que compõe o *background* sobre o qual os picos estão, é bastante alterado. Isso pode indicar que, na sílica funcionalizada, o radical proveniente do APTES passa a ocupar um espaço que antes estava vazio. Isso causa uma alteração no contraste de densidade eletrônica e, conseqüentemente, a diminuição na intensidade difratada. Também é possível argumentar que, uma vez que se trata de picos de difração, a diminuição da

	$d_{(100)}$ (nm)	a (nm)	$d_{(110)}$ (nm)	a (nm)	$d_{(200)}$ (nm)	a (nm)	a_{avg} (nm)	A (u.arb.)
SBA-15	11,2	12,9	6,3	12,5	5,4	12,5	12,6(2)	16(2)
APTES	11,2	13,0					13,0(3)	5(1)
ClSi	11,4	13,2	6,4	12,7	5,5	12,6	12,8(3)	16(3)

Tabela 3.5: Distâncias interplanares e parâmetros de rede obtidos para os picos das amostras de sílica funcionalizada com APTES e ClSi. a_{avg} é o parâmetro de rede médio entre os três picos e A é a área integrada total dos picos. A incerteza no valor médio para o APTES foi estimada.

intensidade difratada reflete o preenchimento dos poros pelo APTES. Esses resultados são consistentes com os encontrados para a sílica funcionalizada com APTES durante a síntese na literatura[39]. Não foram encontrados resultados acerca dos efeitos do ClSi sobre a estrutura da sílica SBA-15.

3.6 Calcinação em Vácuo da SBA-15

O processo de calcinação da sílica mesoporosa ordenada SBA-15 é alvo de interesse, pois ele pode representar um fator importante na otimização de suas propriedades físicas, como a ordenação dos poros e a sua estabilidade estrutural, térmica e mecânica[40, 41].

Para investigar a influência da presença de atmosfera no ambiente de tratamento térmico, o comportamento da estrutura de poros da sílica SBA-15 durante o processo de calcinação *in-situ* e em vácuo foi estudado em experimento no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As medidas foram realizadas na linha SAXS2.[†]

Foi executada uma medida preliminar de uma amostra previamente calcinada sob condições usuais (atmosfera de N_2 e ar), sendo então trocada por uma amostra não-calcinada. Foram executadas, então, medidas de SAXRD *in-situ* dessa amostra conforme a programação de temperatura, constituída de uma rampa de aquecimento partindo da temperatura ambiente até $540^\circ C$ a uma razão de $2^\circ C/min$. Entre 191 e 254 minutos, ($334^\circ C < T < 473^\circ C$) os resultados não puderam ser coletados devido ao período de reinjeção no anel de armazenamento do LNLS. A amostra foi mantida a $540^\circ C$ por 6 horas, o forno foi desligado e, em seguida, a amostra foi deixada para resfriar até a temperatura ambiente.

A figura 3.15 apresenta espectros selecionados do conjunto total obtido durante o processo. A figura 3.16 apresenta a evolução do parâmetro de rede calculado a partir de cada um dos picos observados no padrão de difração (v. tab. 2.1).

[†]Projeto D11A-SAXS1-5820.

Figura 3.15: Resultados selecionados do conjunto de dados obtido das medidas *in-situ* do processo de calcinação em vácuo da sílica SBA-15.

Figura 3.16: Evolução do parâmetro de rede durante o processo de calcinação. A linha tracejada representa a evolução da temperatura da amostra (escala à direita).

Figura 3.17: Evolução da intensidade integrada dos picos durante o processo de calcinação. A linha tracejada representa a evolução da temperatura da amostra (escala à direita).

O valor inicial do parâmetro de rede, para a amostra não-calcinada, é de $a = 12,8\text{nm}$. Com o aumento da temperatura esse valor começa a decrescer, até atingir um patamar em $a = 12,4\text{nm}$ e chegando ao final do processo em $a = 12,3\text{nm}$ (v. figura 3.16). Esse valor é sensivelmente superior ao valor obtido para a amostra previamente calcinada, de $a = 11,8\text{nm}$. A ausência de atmosfera durante o tratamento térmico deve promover a remoção do polímero de forma mais suave devido à diferença de pressão, provocando um menor encolhimento da rede. O abrupto crescimento da área integrada dos picos entre 200°C e 300°C indica um aumento do contraste de densidade eletrônica entre as paredes da sílica e os poros. Esse aumento evidencia a decomposição do polímero, que se transforma em fases carbonáceas menos densas, como será mostrado a seguir.

A figura 3.17 apresenta as intensidades integradas dos picos de difração, evidenci-

ando o abrupto aumento do contraste de densidade eletrônica que ocorre em torno de 300°C. A diminuição de intensidade à medida que a isoterma progride evidencia uma desestruturação parcial da amostra. O processo de resfriamento não afeta a estrutura.

A brusca modificação do contraste de densidade eletrônica e do parâmetro de rede observados nas medidas *in-situ* do processo de calcinação à temperatura em torno de 300°C suscitaram nova investigação da calcinação da sílica SBA-15 em vácuo para melhor compreender as mudanças no material a essa temperatura.

Amostras foram preparadas a partir de duas sínteses distintas de SBA-15. A diferença entre essas sínteses está na duração do tratamento hidrotérmico, que é de 24h em uma e de 48h em outra.

Os pós resultantes desses dois processos de síntese foram separados em partes iguais e submetidos a tratamento térmico em equipamento do Laboratório de Materiais Magnéticos do IFUSP. Foram preparadas amostras com tratamento térmico a 300°C, 400°C e 540°C em vácuo. As amostras foram submetidas a uma rampa de aquecimento de 5°C/min até atingirem a temperatura de tratamento e mantidas a essa temperatura por 2 horas, sendo resfriadas em seguida.

As medidas de SAXRD foram realizadas no equipamento de anodo rotatório do LCr, mas com detector a gás sensível à posição. A potência utilizada foi de 600W ($V = 50\text{kV}$ e $I = 12\text{mA}$).

O encoimento da estrutura é maior para as amostras submetidas a tratamento hidrotérmico mais longo (v. figs. 3.18 e 3.19 e tabs. 3.6 e 3.7). Em algumas das amostras foi possível discernir os picos (210) e (300), fato raro em medidas feitas com anodo rotatório, dada a baixa intensidade desse tipo de equipamento quando comparado às intensidades disponíveis em uma fonte síncrotron. Esse resultado é uma indicação de que a calcinação em vácuo resulta em um maior grau de ordenação.

Figura 3.18: SAXRD das amostras com tratamento hidrotérmico de 24h após tratamento térmico em vácuo.

Figura 3.19: SAXRD das amostras com tratamento hidrotérmico de 48h após tratamento térmico em vácuo.

	$a_{(100)}$ (nm)	$a_{(110)}$ (nm)	$a_{(200)}$ (nm)	$a_{(210)}$ (nm)	$a_{(300)}$ (nm)	a_{avg} (nm)	A (u.arb.)
as-sint.	13,0	13,0	12,9			13,0(1)	50(7)
300°C	12,8	12,8	12,8			12,8(0)	277(41)
400°C	12,8	12,8	12,7			12,8(1)	325(49)
540°C	12,5	12,4	12,4	12,6	12,7	12,5(1)	299(45)

Tabela 3.6: Parâmetros de rede e áreas integradas para as amostras de SBA-15 com tratamento hidrotérmico de 24h tratadas em vácuo.

	$a_{(100)}$ (nm)	$a_{(110)}$ (nm)	$a_{(200)}$ (nm)	$a_{(210)}$ (nm)	$a_{(300)}$ (nm)	a_{avg} (nm)	A (u.arb.)
as-sint.	13,0	13,0	12,9			13,0(1)	48(7)
300°C	12,8	12,7	12,8			12,8(1)	92(14)
400°C	12,8	12,7	12,7	12,7	12,8	12,8(1)	228(34)
540°C	12,3	12,3	12,3	12,4	12,4	12,3(1)	236(35)

Tabela 3.7: Parâmetros de rede e áreas integradas para as amostras de SBA-15 com tratamento hidrotérmico de 48h tratadas em vácuo.

Análise FTIR efetuada pela Central Analítica do IQ-USP (fig. 3.20) nas amostras preparadas com tratamento hidrotérmico de 48h indica que o polímero direcionador de estrutura está presente até, pelo menos, 400°C. As bandas em $2850 - 3000\text{cm}^{-1}$ e $1350 - 1500\text{cm}^{-1}$ são devidas ao molde polimérico. Isso indica que a calcinação completa do material, com total liberação do polímero, só ocorre a $T > 400^\circ\text{C}$. A 540°C as bandas do polímero desaparecem totalmente. As demais bandas estão identificadas na figura 3.20[42, 43, 44].

Embora haja um grande aumento do contraste de densidade eletrônica a partir de 300°C, a eliminação do polímero não é completa, sendo necessário elevar a temperatura de tratamento térmico até 540°C para se atingir a eliminação completa dos resíduos carbonáceos.

Figura 3.20: Espectros FTIR de amostras com tratamento hidrotérmico de 48h e submetidas a tratamento térmico a vácuo.

3.7 Incorporação de Albumina Bovina na SBA-15

Uma das questões mais importantes na utilização de sílica mesoporosa como adjuvante imunológico diz respeito à maneira pela qual as moléculas de um determinado antígeno se agregam à partícula de sílica.

Com o objetivo de avaliar a incorporação de um antígeno na estrutura da sílica, foi realizado um estudo envolvendo a mistura de SBA-15 com albumina bovina (BSA), utilizada como antígeno experimental.

3.7.1 Preparação de amostras

Quatro amostras foram preparadas segundo diferentes métodos de mistura (agitação e repouso) e secagem (evaporação e filtração). A especificação de cada amostra está apresentada na tabela 3.8. Em todas as amostras foi utilizada a mesma proporção de SBA-15 e BSA, de 0,390g de BSA para 1g de SBA-15.

Amostra	Mistura	Secagem
CAF	Agitação	Filtração
CAE	Agitação	Evaporação
SAF	Repouso	Filtração
SAE	Repouso	Evaporação

Tabela 3.8: Especificação das amostras de SBA-15 misturadas com BSA.

O BSA foi pesado e solubilizado em 100mL de solução PBS (Phosphate Buffer Saline), de $pH = 7,4$, com adição da sílica em seguida. A mistura permaneceu em contato por 48h, sendo separada em seguida em partes iguais. Uma parte foi filtrada sem lavagem e então deixada em dessecador com sílica gel e outra foi levada a estufa a 45°C para evaporação do líquido.

3.7.2 Caracterização

Uma diminuição de intensidade dos picos de difração indica maior incorporação do material na sílica.

As medidas de SAXRD foram efetuadas segundo o mesmo procedimento apresentado anteriormente (v. 3.2, pág. 26). Os resultados, apresentados na figura 3.21, mostram menor espalhamento pelas amostras submetidas a evaporação, devido à presença de compostos que não foram eliminados durante a secagem, mas que provavelmente foram eliminados, pelo menos parcialmente, durante o processo de filtragem. A menor intensidade integrada dos picos das amostras submetidas a evaporação, comparada às amostras submetidas a filtragem, pode indicar a presença de BSA com PBS dentro dos poros, o que altera o contraste de densidade eletrônica.

Figura 3.21: Medidas de SAXRD de SBA-15 misturada com BSA.

Não há modificação significativa nos parâmetros de rede, que se mantêm similares dentro de um intervalo inferior a 1%, resultado esperado dada a estabilidade estrutural,

	$d_{(100)}$ (nm)	a (nm)	$d_{(110)}$ (nm)	a (nm)	$d_{(200)}$ (nm)	a (nm)	a_{avg} (nm)	A (u.arb.)
SBA-15	11,0	12,7	6,2	12,4	5,3	12,2	12,4(3)	11(2)
CAE	11,1	12,8	6,2	12,4	5,3	12,2	12,5(3)	3,0(4)
CAF	11,2	12,9	6,2	12,4	5,3	12,2	12,5(4)	7(1)
SAE	11,2	12,9	6,2	12,4	5,3	12,2	12,5(4)	3,0(4)
SAF	11,0	12,7	6,2	12,4	5,3	12,2	12,4(3)	7(1)

Tabela 3.9: Distâncias interplanares, parâmetros de rede e área integrada para as amostras de SBA-15 com BSA (valores em nm).

térmica e mecânica da SBA-15. Todas as intensidades das amostras com BSA, no entanto, são menores que as intensidades dos picos de difração da amostra de SBA-15 pura, o que também indica a presença de BSA e PBS nos poros. Os processos de mistura com ou sem agitação produzem resultados similares.

As análises de SAXRD são qualitativas e necessitam ser complementadas por medidas de adsorção de N_2 .

As amostras de SBA-15 com BSA foram caracterizadas por adsorção de N_2 (v. figs. 3.22 a 3.26) juntamente com a amostra de SBA-15 original micronizada (v. 3.4, pág. 35). A amostra CAE foi inadvertidamente superaquecida e se degradou. Não foi possível refazer a medida pois não havia mais material, e a técnica de adsorção requer uma grande quantidade de amostra ($\approx 0,5g$). Todos os resultados apontam para a presença de BSA incorporado nas amostras, pois os valores de área superficial e volume de poros obtidos para as amostras com BSA são inferiores aos valores das amostras de SBA-15 original micronizada. Em particular, o menor volume de poros obtido nas amostras com BSA indica um preenchimento dos poros, uma vez que a presença do BSA deixa menos espaço livre para ser ocupado pelo N_2 .

Figura 3.22: Isotherma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 micronizada.

Figura 3.23: Isotherma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, agitada e evaporada.

Figura 3.24: Isotherma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, agitada e filtrada.

Figura 3.25: Isotherma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, em repouso e evaporada.

Figura 3.26: Isotherma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, em repouso e filtrada.

As áreas superficiais e o volume de poros das amostras secas através de evaporação é menor que o das amostras filtradas (v. tab. 3.10), evidenciando a presença de maior quantidade de material nessas amostras, em acordo com os dados de SAXRD. Isso indica que o processo de filtragem remove mais material (tanto BSA quanto PBS) da estrutura da sílica que o processo de evaporação. A degradação da amostra CAE dificulta a interpretação dos dados, mas os resultados da amostra SAE indicam que o melhor método de incorporação consiste em manter a solução em repouso e em seguida secá-la através de evaporação. Esses resultados são coerentes com os encontrados na literatura[45] para adsorção de BSA na sílica SBA-15 com distribuição de tamanho de poros centrada em torno de 10nm.

Medidas de termogravimetria das amostras com BSA e PBS foram realizadas para avaliar a estabilidade térmica das mesmas. As medidas foram feitas no LATIG-IQ, em

Amostra	Área BET m ² /g	Vol. de poro (cm ³ /g)	Tam. de poros (nm)
SBA-15m	668	1,0	11,0
CAE	135	0,3	10,6
CAF	148	0,3	10,6
SAE	72	0,2	10,0
SAF	186	0,4	11,0

Tabela 3.10: Área superficial (A_{BET}), Volume de poros (V_p) e diâmetro dos poros das amostras de SBA-15 com BSA.

uma termobalança Shimadzu, modelo TGA-51, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50mL/min) e ar, a uma razão de aquecimento de 5°C/min até 1200°C. Foi adicionada ao conjunto uma amostra de SBA-15 misturada em solução PBS e seca à temperatura ambiente.

Todas as curvas apresentam uma primeira transição ocasionada pela perda de água a aproximadamente 100°C. Acima dessa temperatura, a amostra de SBA-15 pura não apresenta maiores modificações a não ser um leve descréscimo na massa da amostra. As amostras preparadas apresentam uma transição entre 270°C e 365°C e outra transição, mais leve, entre 365°C e 600°C, relacionadas à decomposição do BSA, que ocorre em dois estágios, correspondendo à formação de material carbonáceo e a liberação desse material, respectivamente. A amostra que contém PBS apresenta um decréscimo monotônico de massa. Acima de 900°C o PBS é eliminado.

Figura 3.27: Curvas de análise termogravimétrica das amostras de SBA-15 com BSA e PBS.

3.8 Incorporação de Vacina contra Hepatite A na SBA-15

Com o objetivo de avaliar o transporte de antígenos reais pela sílica mesoporosa ordenada SBA-15, foram preparadas amostras de sílica misturada com vacina contra Hepatite A.

O método de preparação das amostras foi semelhante ao utilizado para as amostras com BSA (v. 3.7, pág. 51). Para cada amostra com vacina, foi preparada também uma amostra em iguais condições contendo apenas PBS. Além disso, foram utilizados três tempos de mistura entre a sílica e a vacina: 2h, 12h e 48h.

As soluções foram preparadas colocando-se 1g de sílica em 50mL de solução PBS. Em seguida foram adicionadas duas doses de vacina. Amostras foram submetidas a agitação magnética por 2h, 12h e 48h e simultaneamente outras foram deixadas em repouso. Ou seja, as amostras de vacina com SBA-15 com agitação e com repouso que tinham o mesmo tempo de mistura foram preparadas simultaneamente, assim como as amostras sem vacina.

As amostras submetidas a agitação foram secas em estufa a $\approx 45^{\circ}\text{C}$ e as amostras deixadas em repouso foram filtradas sem lavagem e mantidas à temperatura ambiente para secagem completa. Os pós resultantes foram então analisados (v. figs. 3.28, 3.29, 3.30 e 3.31).

Figura 3.28: SAXRD das amostras com vacina agitadas e evaporadas.

Figura 3.29: SAXRD das amostras com PBS agitadas e evaporadas.

Figura 3.30: SAXRD das amostras com vacina repoussadas e filtradas.

Figura 3.31: SAXRD das amostras com PBS repoussadas e filtradas.

O processo de agitação tem pouca influência na intensidade difratada das amostras com PBS, fato evidenciado pela baixa variação de intensidade com o tempo de agitação. A amostra agitada com vacina, por outro lado, apresenta intensidade de espalhamento bem maior na amostra agitada por 48h que nas outras duas (2h e 12h). Esse resultado foi atribuído à eliminação por evaporação da solução contendo a vacina durante o processo de agitação.

Tempo	Amostra	$a_{(100)}$ (nm)	$a_{(110)}$ (nm)	$a_{(200)}$ (nm)	a_{avg} (nm)	A (u.arb.)
2h	Vacina PBS	12,9	12,4		12,7(4)	36(5)
		12,8	12,3	12,2	12,4(3)	527(79)
12h	Vacina PBS	12,8	12,3	12,3	12,5(3)	39(6)
		12,7	12,3	12,2	12,4(3)	423(63)
48h	Vacina PBS	12,8	12,3	12,3	12,5(3)	472(71)
		12,6	12,3	12,2	12,4(2)	331(50)

Tabela 3.11: Parâmetros de rede e intensidades integradas para as amostras de SBA-15 com vacina agitadas e secas em estufa.

Tempo	Amostra	$a_{(100)}$ (nm)	$a_{(110)}$ (nm)	$a_{(200)}$ (nm)	a_{avg} (nm)	A (u.arb.)
2h	Vacina PBS	12,6	12,3	12,1	12,3(3)	354(53)
		12,8	12,5	12,2	12,5(3)	329(49)
12h	Vacina PBS	12,5	12,2	12,1	12,3(2)	75(11)
		12,8	12,5	12,3	12,5(3)	192(29)
48h	Vacina PBS	12,6	12,3	12,1	12,3(3)	64(10)
		12,2	12,0	11,8	12,0(2)	76(11)

Tabela 3.12: Parâmetros de rede e intensidades integradas para as amostras de SBA-15 com vacina repousadas e secas com filtragem.

As amostras deixadas em repouso apresentam um decréscimo da intensidade com o aumento do tempo de contato com a sílica, indicando uma maior absorção. Esse

resultado indica a presença de material incorporado à sílica e está de acordo com os resultados anteriores, obtidos para o BSA (v. 3.7, pág. 51).

Não foram observadas mudanças significativas no parâmetro de rede com o tempo de incorporação da vacina, como era de se esperar para esse material. Os menores valores do parâmetro de rede das amostras agitadas e evaporadas são atribuídos à secagem em estufa a 45°C.

O espectro de FTIR (fig. 3.32) mostra uma variação no perfil da banda de absorção em torno de 1250cm^{-1} . A modificação desse perfil é mais evidente para a amostra preparada em repouso e filtrada, indicando uma maior concentração de vacina detectável por FTIR e SAXRD nessa amostra.

Entretanto, esses métodos não permitem diferenciar a presença de vacina dentro dos poros ou na superfície da amostra.

Figura 3.32: Medida de FTIR das amostras de SBA-15 com vacina com tempo de contato de 48h.

Portanto, medidas de isotermas de adsorção em nitrogênio foram também executa-

das para analisar as amostras preparadas com tempo de contato de 48 horas (figs. 3.33 a 3.37). Elas apresentam redução na área superficial de todas as amostras em relação à SBA-15 pura (v. tabela 3.13). O tamanho de poro flutua em torno de 8nm.

O volume de poros e a área BET são menores para as amostras agitadas e evaporadas, diferentemente dos resultados obtidos por SAXRD e FTIR, que indicaram uma provável maior incorporação de vacina na amostra preparada em repouso e filtrada. Em resumo, os resultados mostraram a incorporação de vacina contra Hepatite A na sílica, sendo que o processo de evaporação conduz a um maior preenchimento dos poros, resultado similar ao obtido para o BSA.

Amostra	Área BET m ² /g	Vol. de poros (cm ³ /g)	Tam. de poro (nm)
SBA-15	294,0	0,819	8,6
Vacina, agit. evap.	177,5	0,562	7,3
PBS, agit. evap.	136,1	0,795	8,6
Vacina, rep. filt.	244,7	0,873	8,6
PBS, rep. filt.	273,5	0,852	7,7

Tabela 3.13: Resultados de medidas de adsorção de N_2 .

Figura 3.33: NAI da amostra de SBA-15 pura.

Figura 3.34: NAI das amostras com vacina agitadas e evaporadas.

Figura 3.35: NAI das amostras com PBS agitadas e evaporadas.

Figura 3.36: NAI das amostras com vacina repousadas e filtradas.

Figura 3.37: NAI das amostras com PBS repousadas e filtradas.

3.9 Estudos de Localização Temporal da Sílica em Órgãos de Camundongos

A utilização de sílica mesoporosa ordenada como adjuvante imunológico é promissora, mas as possíveis reações adversas à administração desse material ainda não são bem conhecidas.

Uma preocupação é a aglomeração de silicato no organismo, o que pode levar a condições sérias como doenças auto-imunes, carcinomas, bronquite e silicose[46, 47, 48, 49, 50].

A análise PIXE de órgãos de camundongos aos quais a sílica foi administrada tem por objetivo determinar se o silício proveniente da SBA-15 se aglomera em alguns dos principais órgãos de um camundongo: baço, fígado, pulmões e rins.

3.9.1 Administração da Sílica a Camundongos

Para o estudo de aglomeração de silício nos órgãos de camundongos, a sílica SBA-15 foi administrada a camundongos de uma mesma linhagem, através de via oral e via intra-muscular no Instituto Butantan, em trabalho coordenado pelo Dr. Osvaldo A. B. E. Sant'Anna. Depois de um determinado período os órgãos foram coletados e desidratados. Foi monitorado também um grupo controle, ao qual a sílica não foi administrada. Os grupos experimentais disponíveis, compostos de órgãos provenientes de 4 camundongos cada um, estão apresentados na tabela 3.14.

As medidas de PIXE foram realizadas no LAMFI-IFUSP, utilizando a configuração padrão utilizada nesse laboratório em Julho de 2007. O roteiro experimental seguido foi o proposto em [26].

Tempo de administração	Controle	Via Oral	Via Intra-Muscular
6 horas		vo6	
1 dia	c1	vo1	im1
35 dias	c35	vo35	im35
70 dias		vo70	

Tabela 3.14: Grupos experimentais disponíveis para medidas de PIXE e respectivas designações.

3.9.2 Preparação das Amostras

As medidas foram feitas com as amostras na forma de pastilha, tanto para órgãos desidratados quanto para órgãos calcinados. As pastilhas foram preparadas no Laboratório de Alvos do Laboratório Pelletron, do IF-USP, utilizando um pastilhador com diâmetro de 15mm. Os órgãos tinham massas flutuando em torno de alguns décimos de gramas, no caso das amostras desidratadas, e alguns miligramas, no caso das amostras calcinadas.

As amostras foram maceradas em almofariz de ágata e colocadas sobre uma base de ácido bórico previamente preparada no pastilhador. Em seguida, foi aplicada uma pressão de aproximadamente $4,3 \cdot 10^7 \text{Pa}$ (equivalente a uma massa de 3 toneladas sobre a área da pastilha) por trinta segundos.

3.9.3 Órgãos Desidratados

As medidas de PIXE de órgãos desidratados não foram capazes de indicar a presença de Si em quase nenhuma amostra. Foi possível observar apenas uma banda de Si nos pulmões do grupo “Via Oral” (6 horas e 35 dias) e do grupo “Intra-muscular” (1 dia). No grupo “Intra-muscular” o Si foi detectado apenas no pulmão esquerdo. Si também foi encontrado nos baços do grupo “Via Oral” e do grupo “Controle”.

Figura 3.38: Comparação das curvas PIXE de uma mesma amostra desidratada (vo1b) e depois de calcinada (vo1bc).

A amostra calcinada a 900°C do baço do grupo “Via Oral” após 1 dia de administração é apresentada para comparação. Na medida da amostra desidratada não há pico discernível, enquanto que na amostra calcinada o pico é visível, devido à eliminação da parte orgânica da amostra.

Esse fato torna os dados obtidos a partir das medidas de órgãos desidratados inconclusivos, pois o limite de detecção do Si foi comprometido pela excessiva quantidade de material biológico na amostra, que atenuou a radiação característica dos átomos de Si impedindo a sua detecção. Ainda assim, foi possível determinar que há silício nas amostras do grupo controle, já que algumas delas apresentaram um pico discernível na região de $1,74\text{keV}$.

3.9.4 Órgãos Calcinados

Por causa da diferença entre os espectros PIXE de amostras desidratada e calcinada, novas medidas foram realizadas nas mesmas amostras, depois de submetidas a um processo de calcinação a 900°C.

Novas pastilhas foram preparadas, segundo o mesmo procedimento utilizado para os órgãos desidratados (v. 3.9.3). Também foi preparada uma pastilha a partir da ração administrada aos camundongos, calcinada, pois o silício presente no grupo controle poderia ser proveniente da ração.

Os espectros foram processados com o software WinQXAS[51], utilizado para ajuste de uma curva gaussiana e um *background* polinomial ao pico do silício. Em seguida, o número de contagens obtido a partir desse ajuste foi utilizado para a determinação preliminar da concentração de Si na amostra, através da equação 2.5. O fator de resposta de alvo fino, $k(Z = 14) = 1,212 \cdot 10^4 \text{cm}^2/(\mu\text{g} \cdot \mu\text{C})$, foi obtido em tabela publicada no *web-site* do LAMFI.

Elemento	Proporção pré-calcinada	Proporção pós-calcinada
C	0,26g	0,0g
H	0,1g	0,0g
O	0,6g	0,12g
N	0,02g	0,06g

Tabela 3.15: Composição estimada para camundongos.

Para o cálculo da correção de alvo grosso através do *software* CLARA[27] é necessária uma composição da matriz onde estão os átomos de Si. Depois de extensa pesquisa em literatura não foi possível encontrar uma composição elementar precisa dos órgãos de camundongos. No entanto, foi encontrada uma composição para o corpo do ser

humano[52]. Dada a similaridade entre os dois organismos e a baixa sensibilidade do valor da correção à variação da composição da matriz, foi utilizada essa composição, em termos de C, H, O e N, elementos mais abundantes em amostras biológicas, apresentada na tabela 3.15.

A composição estimada levou em conta a proporção em massa de cada elemento, incluindo a proporção de água no organismo. A proporção para uma amostra calcinada foi calculada a partir dos valores estimados, removendo-se 80% da massa em água[53] e todo o material carbonáceo, representado pelo carbono. Essa composição também foi utilizada para o cálculo da correção para a amostra de ração. O valor obtido para essa correção foi de $F(Z = 14) = 1,4207 \cdot 10^{-3} \text{g/cm}^2$. As incertezas dos valores obtidos, calculadas a partir do desvio padrão do ajuste do pico, giram em torno de 2%.

Os limites apresentados nas figuras correspondem à concentração encontrada no grupo controle. Nessas figuras o limiar do grupo controle correspondente está apresentado em vermelho, com incertezas representadas ponto a ponto.

Figura 3.39: Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Baço.

Figura 3.40: Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Pulmão Esquerdo.

Figura 3.41: Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Pulmão Direito.

Figura 3.42: Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Rim Esquerdo.

Figura 3.43: Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Rim Direito.

Para a amostra de ração foi encontrada uma concentração de 354 ppm. Por isso, é natural que seja encontrada uma concentração de Si mesmo nos órgãos do grupo controle. Com base nisso, o critério para determinação do acúmulo de Si proveniente da sílica SBA-15 foi uma concentração significativamente maior que o valor médio da concentração de Si nas amostras do grupo controle para cada órgão (v. tabela 3.16).

Via Oral			Via Intra-muscular		
Amostra	Concentração (ppm)	Limiar (ppm)	Amostra	Concentração (ppm)	Limiar (ppm)
Baço					
35 dias	2564	783			
Pulmão Direito					
6 horas	1393	1029			
35 dias	1426		35 dias	2471	1029
Rim Esquerdo					
1 dia	2019	351	1 dia	728	351
			35 dias	1143	
Rim Direito					
6 horas	844	448			
1 dia	2305		1 dia	763	448

Tabela 3.16: Concentrações de Si proveniente da SBA-15 administrada por via oral e via intra-muscular em órgãos calcinados de camundongos.

Nos fígados não foi encontrada nenhuma concentração de Si. No pulmão esquerdo o teor detectado foi inferior à concentração encontrada no respectivo grupo controle. Esses dados indicam a deposição de SBA-15 no baço, pulmão direito e rins aproximadamente 35 dias após administração. O teor de Si volta a um patamar abaixo do valor do grupo controle após 70 dias da administração para todas as amostras, o que indica a eliminação total do material em excesso pelo organismo.[‡]

[‡]Dentro dos limites detecção do método PIXE, de algumas centenas de ppm.

3.10 Estudos Biológicos Envolvendo a SBA-15

Paralelamente a este trabalho uma série de estudos sobre os efeitos biológicos da administração de SBA-15 foram realizados no Instituto Butantan, envolvendo efeito adjuvante, toxicidade, efeitos sobre a atividade dos macrófagos e resposta inflamatória.

3.10.1 Efeito Adjuvante e Toxicidade

O efeito adjuvante e a toxicidade da sílica mesoporosa ordenada tipo SBA-15 foram avaliados através de estudo comparativo com relação a adjuvantes tradicionais, como Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Albumina Bovina foi administrada a camundongos maus respondedores (linhagens L_{III} e L_{IVA}) e bons respondedores (linhagens H_{III} e H_{IVA}) em AIF, $\text{Al}(\text{OH})_3$ e SBA-15.

Os dados das respostas primárias, aos 15-20 dias, e das respostas secundárias, aos 10-15 dias (v. fig. 3.44), indicam a modulação efetiva das respostas dos animais maus respondedores quando das imunizações com SBA-15; essa mudança nos perfis é mais evidente quando feita a comparação com o $\text{Al}(\text{OH})_3$. Ou seja, a SBA-15 é um melhor adjuvante, no sentido que induz à produção de uma maior quantidade de anticorpos.

Comparação com o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) apresentou resultados semelhantes para esse adjuvante, certificado para uso animal, e para a SBA-15. Isso indica que a SBA-15 tem, nesse sentido, desempenho semelhante a um adjuvante largamente utilizado em imunizações animais.

Estudo de resposta à vacina contra Hepatite A mostrou maior resposta ao antígeno quando ele foi administrado junto à sílica SBA-15 (v. figura 3.45).

Figura 3.44: Resposta imunológica à BSA em SBA-15 (a) e Al(OH)₃ (b).

Figura 3.45: Resposta imunológica à vacina contra Hepatite A em SBA-15.

3.10.2 Efeito da SBA-15 sobre Macrófagos MΦ

Para análise do efeito da sílica sobre os macrófagos e sua atividade fagocítica, ela foi adicionada a macrófagos retirados de camundongos maus respondedores e de camundongos geneticamente heterogêneos *Swiss* em diferentes concentrações (20µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL, 500µg/mL e 1000µg/mL). Observações através de microscopia ótica não detectaram alteração morfológica indicativa de morte celular.

A atividade fagocítica dos macrófagos foi avaliada através da adição de *Saccharomyces cerevisiae* e determinação, depois de determinados intervalos de tempo (1h, 24h, 48h, 72h e 96h), do número de macrófagos contendo esse levedo. A sílica nas concentrações de 20 e 50µg/mL potencializa a atividade fagocítica dos macrófagos das diferentes linhagens, sendo a porcentagem de macrófagos infectados após 1 hora de incubação cerca de 1,5 - 8,7% superior ao grupo controle (apenas com levedo) e, de 20 - 27% após 24 horas de incubação.

Para doses muito altas de sílica (acima de 2500µg/mL) as células mantêm seu potencial fagocítico, mas após 24h apresentam diminuição de 50% em sua viabilidade.

3.10.3 Resposta Inflamatória

A resposta inflamatória[§] foi avaliada por um estudo do efeito decorrente da administração de SBA-15 *in vivo*. Foram utilizadas duas linhagens de camundongos, AIR_{max} e AIR_{min}, de alta e baixa reatividade inflamatória, respectivamente.

Foram administradas diferentes doses de SBA-15 em solução PBS aos animais (250µg/mL, 500µg/mL e 2500µg/mL). Também foram feitos grupos controle, aos quais foi administrada somente a solução PBS. Essas administrações foram feitas em

[§]Ou seja, a atividade defensiva no organismo em reação a uma presença considerada danosa.

bolsa de ar produzida subcutaneamente no dorso. Amostras foram retiradas depois de diferentes períodos (24h, 48h, 72h e 96h).

Figura 3.46: Resposta inflamatória à SBA-15.

Após 24 horas observou-se predominância de neutrófilos na região inflamada. Após 72 horas os macrófagos passam a ser predominantes, tanto nas linhagens de alta quanto nas de baixa resposta inflamatória (v. fig. 3.46). É importante ressaltar que o acúmulo de macrófagos na região afetada tem grande importância na resposta imune.

Capítulo 4

Conclusões

A caracterização inicial da sílica mesoporosa ordenada tipo SBA-15 demonstrou o alto grau de ordenação dos poros desse material, através da presença dos picos de difração (100), (110) e (200), correspondentes à estrutura hexagonal bidimensional. Também foi demonstrada a estabilidade mecânica da SBA-15, que resistiu sem alterações estruturais ao processo de moagem. A distribuição de tamanho de partícula, obtida em experimento de espalhamento de luz, permaneceu praticamente inalterada depois da micronização do pó. Esse processo serviu para diminuir a aglomeração do pó, deixando-o mais fino, e afetou mais diretamente as partículas maiores. O maior espalhamento a baixo ângulo no material micronizado é atribuído à presença de mais espaços vazios entre as partículas. Medidas de adsorção de N_2 não mostraram alteração no diâmetro e volume dos poros, com ligeiro aumento na área superficial, devido à separação das partículas do pó, o que disponibilizou uma área maior para a adsorção de N_2 .

A reprodutibilidade da síntese foi avaliada por SAXRD. Os parâmetros de rede de amostras provenientes de quatro processos de síntese distintos mostraram valores com

uma diferença inferior a 2%, de maneira que, sob o ponto de vista da rede hexagonal bidimensional formada pelos poros, a síntese é reproduzível. A intensidade dos picos, no entanto, apresenta variação de até 28% entre o menor e o maior valor. Essa discrepância nas áreas totais pode ser atribuída a diferenças no processo de lavagem que segue a síntese e precede a calcinação.

A amostra de SBA-15 funcionalizada com APTES apresentou drástica variação no espalhamento a baixo ângulo, com grande diminuição da área integrada dos picos de difração. Isso indica um alto grau de preenchimento dos poros pelo APTES, o que leva a um menor contraste de densidade eletrônica e, com isso, a diminuição da intensidade difratada. A amostra funcionalizada com ClSi não apresentou grandes alterações de intensidade, tanto de difração quanto de espalhamento, e somente apresentou um ligeiro desvio na posição do pico ($\approx 2\%$), pouco significativo. Estudos futuros sobre o processo de funcionalização são necessários e o uso do material funcionalizado em aplicações biológicas é uma área em desenvolvimento.

O estudo *in-situ* da calcinação em vácuo da SBA-15 mostrou que existe uma brusca alteração no contraste de densidade eletrônica entre 200°C e 300°C, devida à decomposição do polímero surfactante. Acima dessa temperatura há uma diminuição das intensidades integradas dos picos, o que sugere uma desestruturação da rede de poros do material. Estudos *ex-situ* de amostras tratadas a 300°C, 400°C e 540°C em vácuo mostram que a eliminação total do polímero só ocorre acima de 400°C, de acordo com dados de FTIR.

A incorporação de albumina bovina não afetou a estrutura de poros, com uma variação no parâmetro de rede inferior a 1%, resultado esperado, dada a alta estabilidade estrutural da SBA-15. Além disso, a menor intensidade integrada das amostras submetidas a evaporação, em particular a que foi mantida em repouso, indica um maior

preenchimento dos poros, conclusão confirmada por análise por adsorção N_2 , que resultou em menor área superficial e volume de poro para as amostras submetidas a evaporação.

Resultados similares foram encontrados para amostras de SBA-15 misturadas com vacina contra Hepatite A. Novamente o processo de evaporação pode ser indicado como mais eficiente para incorporação de antígeno.

A localização tecidual de sílica em órgãos de camundongos indicou que, nos fígados, não há acumulação de material. Para as demais amostras foi encontrado silício no baço, pulmão direito e rins 35 dias após a administração, com retorno do teor de Si para um patamar abaixo do valor do grupo controle após 10 semanas da administração, o que indica total eliminação do material pelo organismo após esse tempo.

Estudos biológicos executados em paralelo no Instituto Butantan mostraram que a SBA-15 tem maior poder adjuvante que substâncias tradicionais como AIF ou $Al(OH)_3$, não apresentando efeitos tóxicos ao organismo e incentivando a resposta imunológica ao aumentar tanto a atividade fagocítica dos macrófagos $M\Phi$ e a resposta inflamatória. A quantidade de anticorpos produzidos contra Hepatite A após administração de vacina com SBA-15 foi bem superior à quantidade produzida para administração sem a sílica.

Apêndice A

Notações e Convenções

- As abreviações utilizadas são em inglês, exceto no caso de instituições brasileiras, quando elas estão em português.
- Termos em língua estrangeiras estão em *itálico*

Lista de Figuras

1.1	Representação do mecanismo de auto-agregação na síntese com troca iônica[4].	4
1.2	Fases da polimerização da sílica durante a síntese da SBA-15[7].	5
1.3	Microscopia de varredura da sílica SBA-15.	6
1.4	Microscopia de transmissão da sílica SBA-15.	6
2.1	Ilustração da técnica PIXE. D1 e D2 - detectores Si(Li), C - colimador, T - porta-alvos, F - copo de Faraday	12
2.2	Transições entre as camadas K, L e M (fora de escala).	12
2.3	Geometria experimental de um experimento de SAXS/SAXRD.	18
2.4	Ilustração da Lei de Bragg.	19
3.1	SAXRD preliminar de SBA-15 como sintetizada (sufixo “v”), capilar e dado corrigido.	27
3.2	SAXRD preliminar de SBA-15 passada em peneira grossa (sufixo “m”), capilar e dado corrigido.	28
3.3	Exemplo de determinação do coeficiente de transmitância com uso de carvão vítreo, determinado pelo coeficiente linear da reta vermelha apresentada na subfigura.	29
3.4	SAXRD obtidos para a síntese 1, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)	30
3.5	SAXRD obtidos para a síntese 2, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)	31
3.6	SAXRD obtidos para a síntese 3, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)	31
3.7	SAXRD obtidos para a síntese 4, com correção de transmitância obtida através de cintilador (cint) e carvão vítreo (CV)	32
3.8	Picos de difração das amostras de quatro sínteses independentes antes da calcinação.	32
3.9	Picos de difração das amostras de quatro sínteses independentes depois da calcinação.	33

3.10	Distribuições de tamanho de partícula para sílica SBA-15 não micronizada e micronizada.	36
3.11	SAXRD de amostras de SBA-15 não-micronizada (SBA15) e micronizada (SBA15m).	37
3.12	Isoterma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15.	39
3.13	Isoterma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 micronizada.	39
3.14	Medidas de SAXRD de SBA-15 funcionalizada com APTES e ClSi. . .	41
3.15	Resultados selecionados do conjunto de dados obtido das medidas <i>in-situ</i> do processo de calcinação em vácuo da sílica SBA-15.	44
3.16	Evolução do parâmetro de rede durante o processo de calcinação. A linha tracejada representa a evolução da temperatura da amostra (escala à direita).	45
3.17	Evolução da intensidade integrada dos picos durante o processo de calcinação. A linha tracejada representa a evolução da temperatura da amostra (escala à direita).	46
3.18	SAXRD das amostras com tratamento hidrotérmico de 24h após tratamento térmico em vácuo.	48
3.19	SAXRD das amostras com tratamento hidrotérmico de 48h após tratamento térmico em vácuo.	48
3.20	Espectros FTIR de amostras com tratamento hidrotérmico de 48h e submetidas a tratamento térmico a vácuo.	50
3.21	Medidas de SAXRD de SBA-15 misturada com BSA.	52
3.22	Isoterma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 micronizada.	54
3.23	Isoterma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, agitada e evaporada.	54
3.24	Isoterma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, agitada e filtrada.	55
3.25	Isoterma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, em repouso e evaporada.	55
3.26	Isoterma de adsorção de N_2 e distribuição de tamanho de poro (PSD) da SBA-15 com BSA, em repouso e filtrada.	56
3.27	Curvas de análise termogravimétrica das amostras de SBA-15 com BSA e PBS.	58
3.28	SAXRD das amostras com vacina agitadas e evaporadas.	60
3.29	SAXRD das amostras com PBS agitadas e evaporadas.	60
3.30	SAXRD das amostras com vacina repousadas e filtradas.	61
3.31	SAXRD das amostras com PBS repousadas e filtradas.	61

3.32	Medida de FTIR das amostras de SBA-15 com vacina com tempo de contato de 48h.	63
3.33	NAI da amostra de SBA-15 pura.	65
3.34	NAI das amostras com vacina agitadas e evaporadas.	65
3.35	NAI das amostras com PBS agitadas e evaporadas.	66
3.36	NAI das amostras com vacina repousadas e filtradas.	66
3.37	NAI das amostras com PBS repousadas e filtradas.	67
3.38	Comparação das curvas PIXE de uma mesma amostra desidratada (vo1b) e depois de calcinada (vo1bc).	70
3.39	Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Baço.	73
3.40	Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Pulmão Esquerdo.	73
3.41	Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Pulmão Direito.	74
3.42	Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Rim Esquerdo.	74
3.43	Concentrações de Si para as amostras calcinadas de Rim Direito.	75
3.44	Resposta imunológica à BSA em SBA-15 (a) e Al(OH)_3 (b).	78
3.45	Resposta imunológica à vacina contra Hepatite A em SBA-15.	78
3.46	Resposta inflamatória à SBA-15.	80

Lista de Tabelas

2.1	Relação entre distância interplanar e o parâmetro de rede a para as primeiras reflexões de uma rede hexagonal plana ($l = 0$).	21
3.1	Proporções em massa empregadas na síntese da sílica SBA-15.	25
3.2	Distâncias interplanares e parâmetros de rede obtidos para os picos das amostras calcinadas. a_{avg} é o parâmetro de rede médio entre os três picos e A é a área integrada total dos picos.	34
3.3	Diâmetros de partícula das amostras de sílica SBA-15 não micronizada e micronizada. Valores em μm	36
3.4	Área superficial, diâmetro e volume de poros e das amostras de SBA-15 virgem e micronizada.	38
3.5	Distâncias interplanares e parâmetros de rede obtidos para os picos das amostras de sílica funcionalizada com APTES e ClSi. a_{avg} é o parâmetro de rede médio entre os três picos e A é a área integrada total dos picos. A incerteza no valor médio para o APTES foi estimada.	41
3.6	Parâmetros de rede e áreas integradas para as amostras de SBA-15 com tratamento hidrotérmico de 24h tratadas em vácuo.	49
3.7	Parâmetros de rede e áreas integradas para as amostras de SBA-15 com tratamento hidrotérmico de 48h tratadas em vácuo.	49
3.8	Especificação das amostras de SBA-15 misturadas com BSA.	51
3.9	Distâncias interplanares, parâmetros de rede e área integrada para as amostras de SBA-15 com BSA (valores em nm).	53
3.10	Área superficial (A_{BET}), Volume de poros (V_p) e diâmetro dos poros das amostras de SBA-15 com BSA.	57
3.11	Parâmetros de rede e intensidades integradas para as amostras de SBA-15 com vacina agitadas e secas em estufa.	62
3.12	Parâmetros de rede e intensidades integradas para as amostras de SBA-15 com vacina repousadas e secas com filtragem.	62
3.13	Resultados de medidas de adsorção de N_2	64
3.14	Grupos experimentais disponíveis para medidas de PIXE e respectivas designações.	69

3.15 Composição estimada para camundongos.	71
3.16 Concentrações de Si proveniente da SBA-15 administrada por via oral e via intra-muscular em órgãos calcinados de camundongos.	76

Referências Bibliográficas

- [1] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, e J.S. Beck. Ordered mesoporous molecular-sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, 359(6397):710–712, 22 Oct 1992.
- [2] K.S.W. Singo, D.H. Everett, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Perotti, J. Rouquerol, e 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(4):603–619, 1985.
- [3] J.S. Beck, 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, e JL Schlenker. A new family of mesoporous molecular-sieves prepared with liquid-crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27):10834–10843, 30 Dec 1992.
- [4] A. Sayari e P. Liu. Non-silica Periodic Mesostructured Materials: Recent Progress. *Microporous Materials*, 12:149–177, 1997.
- [5] D.Y. Zhao, J.L. Feng, Q.S. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, e G.D. Stucky. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science*, 279(5350):548–552, 23 Jan 1998.

-
- [6] D.Y. Zhao, Q.S. Huo, J.L. Feng, B.F. Chmelka, e 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(24):6024–6036, 24 Jun 1998.
- [7] S. Ruthstein, V. Frydman, e D. Goldfarb. Study of the Initial Formation Stages of the Mesoporous Material SBA-15 Using Spin-labeled Block Co-polymer Templates. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:9016–9022, 2004.
- [8] U. Ciesla e F. Schuth. Ordered mesoporous materials (review). *Microporous and Mesoporous Materials*, 27(2-3):131–149, Fev 1999.
- [9] X. Feng, G.E. Fryxell, L.Q. Wang, A.Y. Kim, J. Liu, e K.M. Kemner. Functionalized monolayers on ordered mesoporous supports. *Science*, 276(5314):923–926, 9 MAY 1997.
- [10] C.G. Wu e T. Bein. Conducting carbon wires in ordered, nanometer-sized channels. *Science*, 266(5187):1013–1015, 11 NOV 1994.
- [11] C.G. Wu e T. Bein. Conducting polyaniline filaments in a mesoporous channel host. *Science*, 264(5166):1757–1759, 17 JUN 1994.
- [12] R. Leon, D. Margolese, G. Stucky, e P.M. Petroff. Nanocrystalline ge filaments in the pores of a mesosilicate. *Physical Review B*, 52(4):R2285–R2288, 15 JUL 1995.
- [13] J.F. Diaz e K.J. Balkus. Enzyme immobilization in mcm-41 molecular sieve. *Journal of Molecular Catalysis B - Enzymatic*, 2(2-3):115–126, 4 DEC 1996.

-
- [14] Y.S. Lin, C.P. Tsai, H.Y. Huang, C.T. Kuo, Y. Hung, D.M. Huang, Y.C. Chen, e C.Y. Mou. Well-ordered mesoporous silica nanoparticles as cell markers. *Chemistry of Materials*, 17(18):4570–4573, Sep 6 2005.
- [15] Y. Liu, Q. Xu, X. Feng, J. Zhu, e W. Hou. Immobilization of hemoglobin on sba-15 applied to the electrocatalytic reduction of h₂o₂. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4):1553–1559, Feb 2007.
- [16] A.J. O'Connor, A. Hokura, J.M. Kisler, S. Shimazu, G.W. Stevens, e Y. Komatsu. Amino acid adsorption onto mesoporous silica molecular sieves. *Separation and Purification Technology*, 48(2, Sp. Iss. SI):197–201, Mar 2006.
- [17] C. Charnay, S. Begu, C. Tourne-Peteilh, L. Nicole, D.A. Lerner, e J.M. Devoisselle. Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: Drug loading and release property. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(3):533–540, May 2004.
- [18] J. Lu, M. Liong, J.I. Zink, e F. Tamanoi. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small*, 3(8):1341–1346, Aug 2007.
- [19] I.I. Slowing, B.G. Trewyn, S. Giri, e V. S. Lin. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Advanced Functional Materials*, 17(8):1225–1236, 21 May 2007.
- [20] L. B. Fagundes, T. G. F. Sousa, A. Sousa, V. V. Silva, e E. M. B. Sousa. Sba-15-collagen hybrid material for drug delivery applications. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352(32-35):3496–3501, Sep 15 2006.

-
- [21] L.P. Mercuri, L.V. Carvalho, F.A. Lima, C. Quayle, M.C.A. Fantini, G.S. Tanaka, W.H. Cabrera, M.F.D. Furtado, D.V. Tambourgi, J.R. Matos, M. Jaroniec, e O.A. Sant'Anna. Ordered mesoporous silica SBA-15: A new effective adjuvant to induce antibody response. *Small*, 2:254–256, 2006.
- [22] O. Pacheco, O. A. B. E. Sant'Anna, L. P. Mercuri, J. R. Matos, e M. C. A. Fantini. Immunogenic Complex Formed by Vaccinal Antigens Encapsulated by Nanostructured Mesoporous Silica, 2007.
- [23] J.R. Matos, L.P. Mercuri, M. Kruk, e M. Jaroniec. Toward the Synthesis of Extra-Large-Pore MCM-41 Analogues. *Chemistry of Materials*, 13:1726–1731, 2001.
- [24] T. Johansson. X-ray Analysis: Elemental Trace Analysis at the 10^{-12} g Level. *Nuclear Instruments and Methods*, 84:141–143, Julho 1970.
- [25] S.A.E. Johansson e J.L. Campbell. *PIXE - A Novel Technique for Elemental Analysis*. John Wiley & Sons, London, UK, 1988.
- [26] J.H. Aburaya. *Padronização de Análises PIXE de Amostras Sólidas em Alvos Espessos*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Física - USP, São Paulo, 2005.
- [27] J.H. Aburaya, N. Added, M.H. Tabacniks, M.A. Rizzutto, e M.D.L. Barbosa. X-ray Production Yield in Standardized Thick Target PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 249:792–795, 2006.
- [28] A. Guinier. *X-Ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies*. Dover, New York, 1994.
- [29] A. Guinier e G. Fournet. *Small-Angle Scattering of X-Rays*. John Wiley and Sons, New York, 1955.

-
- [30] O. Glatter e O. Kratky. *Small Angle X-Ray Scattering*. Academic Press, London, 1982.
- [31] L.A. Feigin e D.I. Svergun. *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. Plenum Press, New York, 1987.
- [32] W.L. Bragg. The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 17:43–57, 1914.
- [33] S. Brunauer, P.H. Emmett, e E. Teller. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60:309–319, 1938.
- [34] E.P. Barrett, L.G. Joyner, e P.P. Halenda. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, 73:373–380, Jan 1951.
- [35] M. Kruk, M. Jaroniec, e A. Sayari. Application of Large Pore MCM-41 Molecular Sieves To Improve Pore Size Analysis Using Nitrogen Adsorption Measurements. *Langmuir*, 13:6267–6273, 1997.
- [36] M. Jaroniec e L.A. Solovyov. Improvement of the Kruk-Jaroniec-Sayari Method for Pore Size Analysis of Ordered Silicas with Cylindrical Mesopores. *Langmuir*, 22:6757–6760, 2006.
- [37] A.S. Maria Chong e X.S. Zhao. Functionalized Nanoporous Silicas for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Applied Surface Science*, 237:398–404, 2004.
- [38] X.S. Zhao e G.Q. Lu. Modification of MCM-41 by Surface Silylation with Trimethylchlorosilane and Adsorption Study. *Journal of Physical Chemistry B*, 102:1556–1561, 1998.

-
- [39] A.S. Maria Chong e X.S. Zhao. Functionalization of SBA-15 with APTES and Characterization of Functionalized Materials. *Journal of Physical Chemistry B*, 107:12650–12657, 2003.
- [40] F. Kleitz, W. Schmidt, e F. Schüth. Evolution of Mesoporous Materials During the Calcination Process: Structural and Chemical Behavior. *Microporous and Mesoporous Materials*, 44:95–109, 2001.
- [41] F. Kleitz, W. Schmidt, e F. Schüth. Calcination Behavior of Different Surfactant-Templated Mesostructured Silica Materials. *Microporous and Mesoporous Materials*, 65:1–29, 2003.
- [42] M.S. Morey, S. O'Brien, S. Schwarz, e G.D. Stucky. Hydrothermal and Postsynthesis Surface Modification of Cubic, MCM-48, and Ultralarge Pore SBA-15 Mesoporous Silica with Titanium. *Chemical Materials*, 12:898–911, 2000.
- [43] R. van Grieken, G. Calleja, G.D. Stucky, J.A. Melero, R.A. García, e J Iglesias. Supercritical Fluid Extraction of a Nonionic Surfactant Template from SBA-15 Materials and Consequences on the Porous Structure. *Langmuir*, 19:3966–3973, 2003.
- [44] Z. Wang, F. Zhang, Y. Yang, B. Xue, J. Cui, e N. Guan. Facile Postsynthesis of Visible-Light-Sensitive Titanium Dioxide/Mesoporous SBA-15. *Chemical Materials*, 19:3286–3293, 2007.
- [45] T. P. B. Nguyen, J. W. Lee, W. G. Shim, e H. Moon. Synthesis of Functionalized SBA-15 with Ordered Large Pore Size and Its Adsorption Properties of BSA. *Microporous and Mesoporous Materials*, 110:560–569, 2008.

-
- [46] K. Steenland e D.F. Goldsmith. Silica Exposure and Autoimmune Diseases. *American Journal of Industrial Medicine*, 28:603–608, 1980.
- [47] K. Steenland, W. Sanderson, e G.M. Calvert. Kidney Disease and Arthritis in a Cohort Study of Workers Exposed to Silica. *Epidemiology*, 12:405–412, 2001.
- [48] C.A. Soutar, A. Robertson, B.G. Miller, A. Searl, e J. Bignon. Epidemiological Evidence on the Carcinogenicity of Silica: Factors in Scientific Judgement. *Annals of Occupational Hygiene*, 44:3–14, 2000.
- [49] G.M. Calvert, F.L. Rice, J.M. Boiano, J.W. Sheehy, e W.T. Sanderson. Occupational Silica Exposure and Risk of Various Diseases: An Analysis Using Death Certificates from 27 States of the United States. *Occupational and Environmental Medicine*, 60:122–129, 2003.
- [50] L.T. Costallat, E.M. De Capitani, e L. Zambon. Pulmonary Silicosis and Systemic Lupus Erythematosus in Men: A Report of Two Cases. *Joint Bone Spine*, 69:68–71, 2002.
- [51] IAEA Laboratories. WinQXAS. <http://www.iaea.org/OurWork/ST/NA/NAAL/pci/ins/xrf/pciXRfdown.php>, 2006.
- [52] John Emsley. *The Elements*. Oxford, New York, 1991.
- [53] H.P. Sheng e R.A. Huggins. A Review of Body Composition Studies With Emphasis on Total Body Water and Fat. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32:630–647, 1979.