

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica

# Biomateriais bio-inspirados à base de sílica para aplicações biomédicas em tecidos duros



Orientador: Hermínio José Cipriano de Sousa, PhD

Co-orientadora: Mara Elga Medeiros Braga, PhD

Aluno: André Manuel da Costa Patrão Miraldo



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.



Dedicado à memória de Manuel Cipriano Miraldo

1936-2009



あの頃ボクらが夢見てた 未来へ託した地図を  
描き換える影が在ることも 識らなかつたボクらを超えて  
疾って往こう...予言にない<ハジマリ>へと...

*Revo, Chronicle 2nd*

Back then, we were dreaming of a map to the future.  
Let us go beyond the version of ourselves  
who had no awareness of the shadow redrawing that map,  
And dash forth to an unfortold {beginning}

*Revo in Chronicle 2nd*



# Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria deixar um grande obrigado a todos o que me motivaram, ajudaram e foram imprescindíveis para a conclusão desta etapa na minha vida.

Aos meus orientadores, Professor Hermínio e Professora Mara, muito obrigado pela paciência, pelo apoio, motivação, disponibilidade e, claro, reprimendas que me fizeram ao longo deste percurso. Obrigado também pela dedicação ao meu trabalho e pelo interesse em que eu fizesse o melhor possível.

Aos meus restantes colegas e professores que partilharam o laboratório comigo, muito obrigado. Aos mais experientes pelas recomendações, conselhos, apoio e correções, e aos que estiveram e estão no mesmo patamar pelas gargalhadas, amizade e constante bem-estar que me proporcionaram no laboratório. Sem a vossa ajuda, este trabalho não tinha sido possível.

Queria também agradecer aos meus amigos, de Coimbra, da faculdade e do mundo pelo imensurável apoio, fieldade e carinho com que me deparo diariamente. Sabem perfeitamente que são uma grande parte da minha vida e que sem vocês, nada na vida seria tão fácil.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, me ajudaram a crescer como pessoa e que me inspiraram ao longo destes anos, agradeço igualmente.

Por fim, resta-me agradecer à minha família. A todos os meus avós, Manuel, Maria Helena, Rosa Maria e Rui, pelo amor incondicional, por acreditarem sempre em mim e por me darem os valores que tenho, não tenho palavras para expressar o meu agradecimento, são únicos. Aos meus tios Henrique, Licína e Rui Pedro e restante família, pelos exemplos e pelo carinho e conselhos que sempre me deram. À minha irmã por me apoiar sempre e por me irritar quando tem de ser preciso.

E, como os últimos são os primeiros, às duas pessoas que fizeram todos os esforços possíveis para me dar tudo o que precisava desde que nasci até ao presente, obrigado. Obrigado por acreditarem em mim, mesmo sendo preguiçoso e ter havido alturas em que não dei o meu melhor, espero deixar-vos orgulhosos e poder um dia dar à minha família pelo menos metade do que recebi de vocês, Pais.



# Resumo

A síntese de sílica para aplicações biológicas apresenta vários desafios, nomeadamente a incorporação de fármacos ou outros compostos de interesse devido às altas temperaturas e pressões a que ocorre a síntese. O biomimetismo é uma técnica que consiste na imitação de modelos, sistemas ou reações que ocorrem na Natureza. Para a síntese de sílica, esta técnica inspira-se em organismos como as diatomáceas.

Recorrendo a catalisadores biomiméticos é possível sintetizar sílica a temperaturas e pressões baixas. Como tal, o objetivo deste trabalho é a síntese de sílica em meio aquoso, utilizando o TEOS como precursor e, a hexametilendiamina, a espermina, a espermidina, a norespermidina, a taurina, a poli(etilenoimina) linear e a poli(etilenoimina) ramificada como catalisadores biomiméticos. Após a síntese, as várias amostras de sílica foram tratadas e sujeitas a caracterização química, física e morfológica. As propriedades das partículas de sílica foram analisadas de acordo com as propriedades químicas dos catalisadores e diferenças de pH do meio de reação.

Todos os catalisadores foram capazes de sintetizar sílica a temperaturas e pressões baixas. Nas amostras que utilizaram poliaminas ou poli(etilenoiminas) foi observada uma redução da massa sintetizada a partir das 24h, devendo-se à rápida condensação e posterior despolimerização da sílica, característica de síntese a valores de pH altos. A amostra de sílica sintetizada com hexometilendiamina como catalisador revelou o maior rendimento mássico, dentro das poliaminas, assim como menor diâmetro de partículas de sílica ( $313 \pm 99$  nm). No entanto, apresenta a menor área de superfície ( $3,2$  m<sup>2</sup>/g) e maior diâmetro médio de poros (19 nm). As sílicas obtidas usando a taurina e a poli(etilenoimina) ramificada como catalisadores apresentam a maior área de superfície ( $399$  m<sup>2</sup>/g e  $274$  m<sup>2</sup>/g) e menor diâmetro de poros (3,4 nm e 4,8 nm) segundo a análise de adsorção de azoto. Os catalisadores que demonstraram maior rendimento mássico foram também a taurina e a poli(etilenoimina) ramificada.

Como tal, o uso de poliaminas como catalisadores biomiméticos induz a formação de partículas esféricas de sílica mesoporosa a temperaturas e pressões ambiente. A utilização de outros catalisadores não permitiu a obtenção de partículas esféricas, mas sim de monólitos com mesoporosidade. Deste modo, a abordagem selecionada demonstrou capacidade de ser vantajosa para aplicações biomédicas.



# Abstract

Silica synthesis for biological applications presents an array of challenges, namely the incorporation of drugs or other biological compounds due to the high temperatures and pressures at which the synthesis occurs. Biomimeticism is a technique that imitates natural systems, models, or reactions. In silica synthesis, this technique draws inspirations from various organisms such as the diatoms.

By using biomimetic catalysts, silica can be synthesized at low temperatures and pressures. With that being, the purpose of this work was synthesizing silica in an aqueous media, using TEOS as a precursor and, hexamethylenediamine, spermine, spermidine, norspermidine, taurine and both branched and linear poly(ethyleneimines) as biomimetic catalysts. Post-synthesis, the various silica samples were treated and subjected to physical, chemical and morphologic characterization. The obtained silica particles' properties were analyzed according to the catalysts' chemical proprieties and reaction media pH results.

All catalysts were able to synthesize silica. The samples synthesized by polyamines or poly(ethyleneimines) presented a reduction on mass yield after 24h of synthesis. Which can be driven by the fast condensation and silica depolymerization, given the high pH at which the synthesis occurred. The silica sample yielded by hexamethylenediamine presented the bigger mass yield out of the polyamines, as well as the smallest particle diameter ( $313 \pm 99$  nm), even though it had the lowest surface area ( $3.2$  m<sup>2</sup>/g) and biggest pore diameter (19 nm). Silicas obtained by taurine and branched poly(ethyleneimine) presented the biggest surface area (3.4 nm and 4.8 nm) and smallest pore diameter ( $399$  m<sup>2</sup>/g e  $274$  m<sup>2</sup>/g), according to the N<sub>2</sub> adsorption. The catalysts which demonstrated the highest silica mass yield were the branched poly(ethyleneimine) and taurine.

As such, the use of polyamines as biomimetic catalysts induces the formation of spherical mesoporous silica particles at low temperature and pressures. Other catalysts were not able to obtain spherical particles but rather mesoporous monoliths of amorphous silica. Therefore, this approach demonstrated its applicability in biomedical science.



# Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Motivação e Objectivos	1
1 Introdução	3
1.1 Sílica biomimética: Propriedades e aplicações	3
1.2 Métodos Sol-gel para a síntese de sílica amorfa	5
1.3 Métodos e catalisadores biomiméticos da síntese de sílica	9
1.3.1 Nanopartículas de sílica	13
1.3.2 Materiais monolíticos	14
1.4 Métodos de caracterização físico-química de materiais à base de sílica	14
1.5 Aplicações farmacêuticas e biomédicas	15
2 Métodos e Materiais	19
2.1 Reagentes Químicos	19
2.2 Síntese e processamento de sílica	19
2.3 Caracterização físico-química e morfológica	21
2.3.1 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	21
2.3.2 Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)	21
2.3.3 Difusão dinâmica de luz (DLS)	22
2.3.4 Potencial Zeta	22
2.3.5 Picnometria de hélio	22
2.3.6 Adsorção de N <sub>2</sub>	23
2.3.7 Porosimetria por intrusão de mercúrio	23
3 Resultados e Discussão	25
3.1 Poliaminas Lineares e Taurina	25
3.2 Poli(etilenoiminas)	41

4 Conclusão	47
5 Trabalho Futuro	49
Referências	51
Dados Suplementares	59

# Índice de Abreviaturas

FTIR – Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

HDA – Hexametilenodiamina

LCPA – Poliaminas de cadeia longa (Long-chain Polyamines)

MSN – Nanopartículas de sílica mesoporsas (Mesoporous Silica Nanoparticles)

$M_w$  – Peso molecular

NSP – Norespermidina

PEI – Poli(etilenoimina)

SDV – Vesículas de deposição de sílica (Silica Deposition Vesicles)

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento (Scanning Electron Microscopy)

SPD – Espermidina

SPN – Espermina

TAU – Taurina

TEOS – Tetraetilortosilicato



# Índice de Figuras

Figura 1 – Estruturas porosas organizadas de partículas mesoporosas de sílica (esquerda – escala 100 nm) e de sílica constituinte das conchas das diatomáceas (direita – escala 1 $\mu\text{m}$ ), Coradin et al. 2006.....	4
Figura 2 – Reações de hidrólise (1) e condensação (2) no processo Sol-Gel em condições ácidas.....	6
Figura 3 – Reações de hidrólise (1) e condensação (2) no processo Sol-Gel em condições básicas.....	6
Figura 4 – Efeito do pH na velocidade de condensação da sílica, propriedades de carga e densidade de carga na superfície, Wu et al. 2013.....	8
Figura 5 – Mecanismo de reação do TEOS com silicateína $\alpha$ , Cha et al. 1999.....	10
Figura 6 – Formação de sílica sob a forma de gel, sólido ou precipitado dependendo das condições de reação, Lechner et al. 2015.....	11
Figura 7 – Estrutura Química das Poliaminas e da Taurina.....	25
Figura 8 – Resumo das curvas de pH obtidas a partir da diluição de catalisadores em solução aquosa.....	27
Figura 9 – Análises de SEM a amostras de sílica não calcinada sintetizadas pelas poliaminas.....	29
Figura 10 – Micrografias de SEM a amostras de sílica não calcinada sintetizadas pelas poliaminas.....	30
Figura 11 – Micrografias de SEM a amostras de sílica calcinada sintetizadas pelas poliaminas.....	31
Figura 12 – Micrografias obtidas através de SEM para a taurina não calcinada (50000 vezes) e calcinada (202200 vezes).....	32
Figura 13 – Gráficos da cinética da massa resultante da síntese com poliaminas e taurina.....	33
Figura 14 – Gráfico da massa produzida de sílica em função do número de grupos amina de cada poliamina.....	34

Figura 15 – Resultados do FTIR realizado a duas amostras de sílica calcinada sintetizadas usando a Taurina como catalisador, a partir da mesma solução original.....	35
Figura 16 – Resultados do FTIR realizado à amostra de sílica sintetizada através de Taurina, não calcinada.....	35
Figura 17 – Diluição e medição do pH da poli(etilemoimina) ramificada em solução aquosa.....	41
Figura 18 – Estrutura química da unidade de repetição das poli(etilenoiminas) ramificada e linear.....	41
Figura 19 – Cinética da síntese de sílica usando as poli(etilenoimina) ramificada e poli(etilenoimina) linear.....	42
Figura 20 - Imagens obtidas através do SEM de sílica sintetizada com a PEIR não calcinada a (A) e calcinada (B) e PEIL não calcinada (C) e calcinada (D).....	43

# Índice de Tabelas

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos dois métodos de síntese principais de sílica estruturada, Jin <i>et al.</i> 2014.....	5
Tabela 2 – Modelos propostos de crescimento de partículas e definição de nucleação. Neville <i>et al.</i> 2013.....	9
Tabela 3 – Resumo das principais aplicações de compósitos cerâmicos em tecidos duros, Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering (2016).....	16
Tabela 4 – Massa total de sílica obtida e diâmetro médio das partículas para cada poliamina estudada. L – Comprimento da molécula; $L_i$ – Distância entre aminas na posição i e i+1, * Valor teórico.....	26
Tabela 5 – Rendimento de número de silícios da sílica sintetizada com poliaminas e taurina.....	31
Tabela 6 – Picos característicos da sílica com TEOS como precursor, Al-Oweini <i>et al.</i> 2009.....	34
Tabela 7 – Resumo da síntese e caracterização morfológica das poliaminas e taurina.....	37
Tabela 8 – Rendimento de número de silícios da sílica sintetizada com poli(etilenoiminas).....	43
Tabela 9 - Resumo da síntese e caracterização morfológica das poli(etilenoiminas).....	44



# Índice de Dados Suplementares

Apêndice I	59
Apêndice II	61
Apêndice III	65
Apêndice IV	69
Apêndice V	71
Apêndice VI	75



# Motivação e Objetivos

Os materiais à base de sílica mesoporosa possuem uma vasta gama de aplicações na indústria biomédica, tais como preenchimento ósseo, imobilização de enzimas ou células e libertação de fármacos. Estes materiais apresentam áreas de superfície e porosidades adequadas ao meio fisiológico e podem ser funcionalizados com vários tipos de moléculas. Habitualmente, a síntese destes materiais é feita a temperaturas e pressões elevadas.

Um dos problemas do uso de materiais à base de sílica no meio fisiológico é a incapacidade de encapsular fatores de crescimento, fármacos ou outros compostos biológicos aquando da sua síntese. Devido às altas temperaturas e pressões a que esta decorre, os compostos podem ser destruídos, inviabilizando a sua aplicação.

Como tal, este trabalho surge da necessidade de desenvolver partículas de sílica em condições de pressão e temperatura baixas adequadas à inclusão de compostos biológicos, com propriedades apropriadas ao uso na indústria farmacêutica e biomédica.

Para ultrapassar estes desafios, é objectivo do presente trabalho sintetizar partículas de sílica mesoporosa ordenadas, a valores de temperatura e pressão baixas recorrendo à utilização de solventes verdes, catalisadores biomiméticos e de um precursor de sílica.

Através do estudo do pH dos catalisadores, procura-se avaliar a sua influência na morfologia das partículas resultantes e nos rendimentos de síntese de sílica. Recorrendo a várias técnicas de caracterização química, física e morfológica, é também pretendido avaliar as propriedades das partículas, relacionando-as com as propriedades dos catalisadores.



# 1. Introdução

## 1.1 Sílica Biomimética: Propriedades e aplicações

Os materiais à base de sílica existentes nos esqueletos de seres vivos demonstram uma organização complexa e possuem um papel essencial na expressão de funções biológicas (Jin *et al.* 2014). Como tal, há uma grande procura de métodos verdes de síntese de materiais à base de sílica (Patwardhan *et al.* 2011) com morfologia, quiralidade e porosidade controláveis para variadas aplicações, tais como: matrizes à base de sílica para imobilização de enzimas e células, partículas mesoporosas de sílica para detecção eletroquímica, nanocarregadores à base de nanopartículas mesoporosas de sílica para bioimagem e libertação de fármacos e vidros bioativos com fatores de crescimento osteoindutores e osteogénicos (Owens *et al.* 2016). A imobilização de células e encapsulamento em sílica permite também a manutenção da biocompatibilidade e pode servir como suporte de culturas de bactérias (Livage *et al.* 2001). O controlo preciso do tamanho, porosidade e cristalinidade das partículas de sílica potencia ainda mais o seu uso nestas áreas (Jackson *et al.* 2015). A produção em larga escala de sílica tem dificuldades em manter a reprodutibilidade das características físico-químicas entre lotes, devido ao uso de precursores simples e de temperaturas e pressões extremas na síntese. A biomineralização possui uma maior reprodutibilidade em condições ambientais, algo comprovado pelas estruturas de sílica existentes nos exoesqueletos de inúmeras espécies ao longo de milhares de anos (Vrieling *et al.* 2005).

Os exemplos mais significativos de síntese de sílica na Natureza são as esponjas marinhas e as diatomáceas, cujas paredes celulares são compostas por sílica e moléculas orgânicas ou macromoléculas. A biossílica presente nestas estruturas possui uma grande variedade de padrões e diâmetros, que vão desde poucos nanómetros a vários micrómetros, dependendo da espécie (Kröger *et al.* 2000). No entanto, a formação de sílica ocorre de maneira diferente nos dois tipos de organismos. Nas diatomáceas, a deposição de sílica ocorre devido a interações electrostáticas enquanto nas esponjas é mediada por um processo enzimático. A sílica proveniente das últimas apresenta melhores propriedades, nomeadamente melhor força mecânica e comporta-se melhor como guias de ondas óticas (Andre *et al.* 2012). Esta ocorrência natural da biomineralização da sílica desde os primórdios

da vida na Terra serve como fonte de inspiração para o design e síntese de materiais à base de sílica (Green *et al.* 2002).

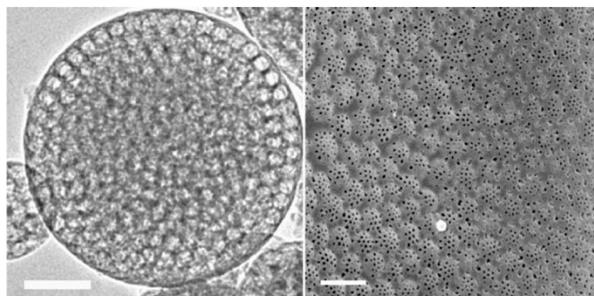


Figura 1 – Estruturas porosas organizadas de partículas mesoporosas de sílica (esquerda – escala 100 nm) e de sílica constituinte das conchas das diatomáceas (direita – escala 1  $\mu\text{m}$ ), Coradin *et al.* 2006.

A biomimética surge como uma abordagem que pretende aproximar-se das reações que ocorrem na Natureza. Considera-se que a mineralização biomimética se divide em três áreas principais. A primeira consiste no estudo das biomoléculas e das suas propriedades, a segunda baseia-se no uso de organismos vivos como culturas de bactérias para a produção de materiais compósitos e, por fim, a última foca-se no uso de conceitos biológicos como inspiração para novos métodos de síntese de materiais inorgânicos com propriedades altamente específicas (Mann *et al.* 1995). A síntese de materiais biomiméticos à base de sílica ocorre com valores de temperatura, pressão e pH muito inferiores aos utilizados na síntese industrial de sílica, tais como os 60-170 °C utilizados na síntese de sílica precipitada ou os 1000°C característicos da sílica pirogênica (Hyde *et al.* 2016). Surge então a necessidade de investigar novos modelos de síntese mais baratos e com menor impacto ambiental, mantendo a reprodutibilidade e a biocompatibilidade destes materiais (Jackson *et al.* 2015).

A silicificação biomimética inspirada em sistemas orgânicos permite a síntese de materiais adequados ao uso no meio fisiológico, possuindo as características comuns a biomateriais, como a baixa densidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas adequadas ao tecido de destino (Vallet-Regi *et al.* 2007, Park *et al.* 2007). Um dos exemplos das ocorrências naturais de sílica biocompatível é o dos exoesqueletos porosos de corais, que possuem dimensões de poros otimizadas para a regeneração de tecido ósseo e angiogénese, sendo aplicáveis em terapias de substituição óssea (Green *et al.* 2002).

O uso de temperaturas e pressões ambiente na silicificação biomimética é uma vantagem, pois permite a incorporação ou encapsulamento de compostos orgânicos

como biomoléculas, fosfolípidos, anticorpos, ADN, entre outros. Na síntese tradicional, estes compostos seriam destruídos ou veriam a sua atividade inibida pelas altas pressões e temperaturas de síntese (Braun *et al.* 1990, Reetz *et al.* 1995, Liang *et al.* 2005, Besanger *et al.* 2002). Para além da retenção das propriedades destes compostos, o próprio encapsulamento em sílica pode impedir a desnaturação dos mesmos (Coradin *et al.* 2006).

## 1.2 Métodos Sol-Gel de síntese de sílica

A síntese biomimética possui algumas vantagens relativamente aos métodos sol-gel de síntese de sílica amorfa, que podem ser consultadas na Tabela 1. Para entender os mecanismos de silicificação biomimética, é necessário compreender as reações de hidrólise e condensação dos precursores da sílica a nível molecular.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos dois métodos de síntese principais de sílica estruturada, Jin et al. 2014

Estratégias de Síntese	Vantagens	Desvantagens
<b>Silificação Biomimética</b>	Modelos agem como catalisadores biomiméticos que controlam a silicificação espacial e temporalmente Uso de temperatura e pressão próximas das ambiente Estruturas variadas e controladas	Desenho e formação de modelos com composições químicas específicas
<b>Síntese sol-gel convencional</b>	A versatilidade dos catalisadores permite um controlo da estrutura final com base nos modelos Materiais mesoporos precisos	Requer ácido ou base adicional como catalisador Uso de pressões e temperaturas superiores a 100°C e pressões altas Requer vários passos de preparação

O mecanismo da reação sol-gel de sílica baseia-se na transformação de precursores que contenham os radicais Si-OR e Si-OH em compostos com ligações siloxano (Si-O-Si), através das reações de condensação. Para obter um gel estável é necessário maximizar o número de ligações siloxano e, conseqüentemente, minimizar o número de grupos Si-OH e Si-OR. Na presença de água pode ocorrer hidrólise dos grupos Si-OR, libertando moléculas do tipo ROH, permitindo a condensação entre grupos silanol, formando ligações do tipo Si-O-Si. O uso de precursores alcóxidos de sílica advém da possibilidade de se controlar a reatividade do mesmo nas reações de condensação e hidrólise, permitindo porosidades diferentes de acordo com o pH do meio onde ocorre a reação, propriedades dos catalisadores e proporções de reagentes (Coradin *et al.*, 2006). Com efeito, a catálise dos monómeros de sílica obtidos pode ser ácida ou básica, agindo os iões H<sup>+</sup> ou HO<sup>-</sup>, respetivamente, como catalisadores (Livage *et al.*, 2010).

Em meios ácidos, o átomo de oxigénio de um grupo  $Si - OH$ ,  $Si - O^-$  ou  $Si - OR$  é protonado num processo rápido, criando um grupo lábil de água ou álcool. Isto diminui a densidade de eletrões no átomo central de silício, tornando-o mais eletrofílico e deixando-o mais suscetível ao ataque pela água em reações de hidrólise e pelos grupos silanol na condensação (Brinker, 1988).

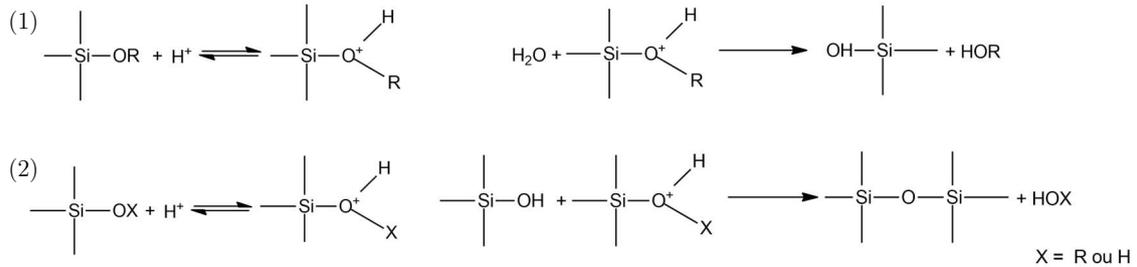


Figura 2 – Reações de hidrólise (1) e condensação (2) no processo Sol-Gel em condições ácidas

Já no meio básico, a reação processa-se através de um ataque nucleofílico pelo  $OH^-$  (na reação de hidrólise) ou  $Si - O^-$  (na reação de condensação) ao átomo de silício segundo um mecanismo do tipo  $S_N2$ . Estes grupos responsáveis pelo ataque são formados pela desprotonação da água ou do grupo  $Si - OH$ , respetivamente. Em condições de pH superior a 12, pode ocorrer despolimerização, sendo as ligações Si-O-Si clivadas pelo  $OH^-$  (Brinker, 1988).

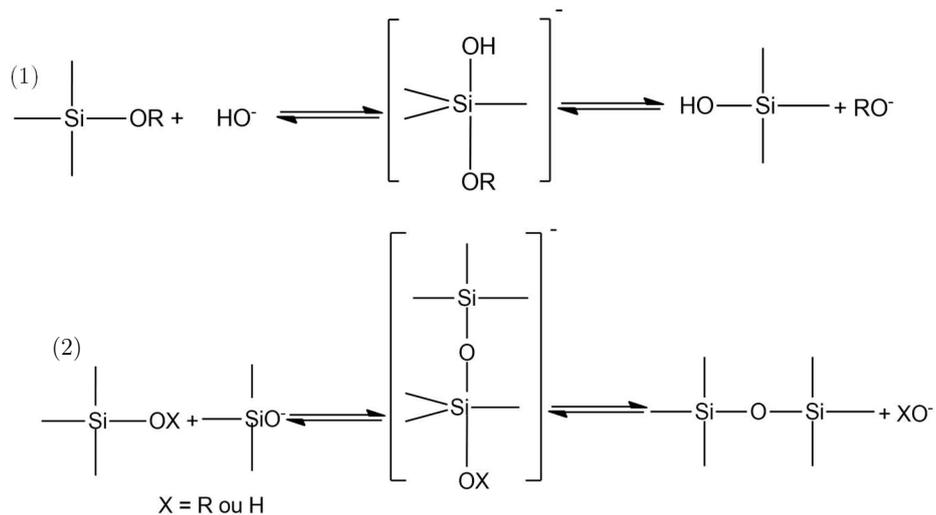


Figura 3 – Reações de hidrólise (1) e condensação (2) no processo Sol-Gel em condições básicas

A maior ou menor densidade eletrónica do átomo de silicone tem influência direta na cinética das reações, promovendo ou inibindo a hidrólise ou condensação, consoante o pH a que decorre a síntese sol-gel. No meio ácido, o estado de transição positivo é estabilizado, como é visível na Figura 2, logo a densidade eletrónica no

átomo de silício deve ser alta. Sendo assim, as taxas de reação aumentam de acordo com a maior densidade de elétrons. Contrariamente, em condições básicas é necessário estabilizar o estado de transição com carga negativa (Figura 3), aumentando as taxas de hidrólise e condensação com a diminuição da densidade de elétrons. As consequências deste facto estendem-se a vários níveis de síntese. Em meios ácidos, as redes obtidas têm a forma de cadeias, pois são favorecidas as reações dos átomos centrais de silício (átomos com 2 ou 3 ligações siloxano), enquanto, em condições básicas, os átomos de silício terminais são favorecidos, dando origem a redes mais ramificadas (Brinker, 1988).

Um dos fatores mais importantes da química dos alcóxidos de silício é a competição entre a hidrólise e condensação durante todo o processo sol-gel. Sendo um sistema muito complexo, a predominância de cada uma das reações é gerida por vários fatores, podendo sintetizar sílica com propriedades muito distintas. Os fatores mais predominantes são o tipo de precursor, o pH do meio, o rácio entre o grupo alcóxido e a água, o tipo de solvente, temperatura e a concentração dos compostos presentes (Brinker, 1988).

Antes da reação de condensação, os grupos Si-OR dos precursores têm de ser hidrolisados e, quanto maiores forem as ramificações dos grupos alcóxido ou o tamanho da cadeia dos precursores, mais baixa será a taxa de hidrólise ou condensação. Os precursores mais utilizados são o Tetraetilortosilicato e o Tetrametilortosilicato. Ambos são imiscíveis em água, sendo o último muito mais ativo no que diz respeito à condensação hidrolítica (Yuan *et al.* 2006), chegando a ter velocidades de hidrólise seis vezes superiores, devido à maior dimensão dos ligandos (Voronkov *et. al* 1978).

O pH da solução é um dos fatores mais determinantes para o tamanho final das partículas de sílica e dos respetivos poros, mais do que a quantidade de precursor ou o tempo de reação. O valor de pH que permite as partículas de tamanho mais reduzido é de 9-10 (Chiang *et al.*, 2011).

pH baixo permite a síntese de redes microporosas densas (tamanho dos poros < 2nm), enquanto que em condições alcalinas, o tamanho dos poros varia entre os 2 e 50 nm.

De modo geral, a reação de síntese sol-gel com tetralcoxisilanos como precursores necessita de dois equivalentes de água ( $R = 2:1$ ) para que o  $Si(OR)_4$  seja convertido em  $SiO_2$ . O mecanismo de condensação liberta, no entanto, 2 mol de água,

perfazendo o rácio estequiométrico de 4:1. A hidrólise completa do precursor necessita de um aumento da quantidade de água para um rácio de 1:1. A tendência das reações de hidrólise catalisadas em meio ácido com rácios baixos de  $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$  é produzir redes “poliméricas” com pouca ramificação. Para uma reação em meio básico com rácios altos de  $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$ , o produto habitualmente apresenta partículas “coloidais” altamente ramificadas. O aumento da proporção de água para valores mais altos (baixando o valor de R) favorece a formação de grupos silanol em vez Si-O-Si. O aumento do rácio molar  $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$  promove igualmente a hidrólise, embora para rácios inferiores ao estequiométrico ( $R \ll 4$ ) o mecanismo de condensação produtor de álcool seja favorecido, enquanto que para valores de  $R \gg 4$ , se verifica a promoção da condensação, que produz água (Brinker *et al.* 1988).

Para valores de pH inferiores a 7, as partículas tendem a agregar de uma forma fibrilar, formando um gel, pois as superfícies não carregadas das partículas coloidais originam uma fraca repulsão electrostática entre as mesmas. Para valores de pH superiores a 7, as superfícies carregadas negativamente predominam, induzindo uma repulsão electrostática forte. Isto resulta na formação de um sólido estável, crescendo as partículas segundo o efeito de maturação de Ostwald (Lechner *et al.* 2015, Ostwald 1897). A Figura 4 representa, graficamente, o efeito do pH na velocidade de condensação da sílica. Para valores de pH inferiores a 7,5 verifica-se uma proporcionalidade entre a densidade de carga e a velocidade de condensação. No entanto, a partir desse valor, verifica-se um decréscimo da velocidade de condensação, dado o aumento gradual da instabilidade dos silicatos a valores de pH mais altos (Wu *et al.* 2013). A prevalência de espécies aniónicas em solução para valores de pH muito altos, no entanto, pode provocar a clivagem de ligações Si-O-Si e redissolução de partículas. Por estes motivos, é normal o uso de buffers de pH durante a síntese, de modo a obter um controlo maior das reações de condensação e hidrólise.

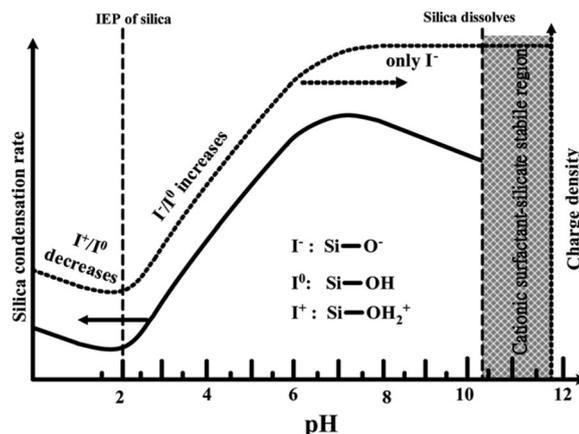


Figura 4 – Efeito do pH na velocidade de condensação da sílica, propriedades de carga e densidade de carga na superfície, Wu et al. 2013.

A presença de catalisadores aumenta a velocidade da reação. A prevalência da condensação aumenta de acordo com o número de grupos silanol presentes, e é também inversamente proporcional ao comprimento e ramificação da cadeia do catalisador (Voronkov *et al.* 1978).

O conceito de nucleação e de formação das partículas de sílica a partir de alcosiloxanos foi evoluindo ao longo de várias décadas, estando as principais teorias representadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Modelos propostos de crescimento de partículas e definição de nucleação. Neville et al. 2013

Modelo	Definição de Nucleação	Proposto por
<b>Modelo de adição de monómeros</b>		
Todos os núcleos formam partículas através da adição de monómeros. Núcleos pequenos e partículas maiores e estáveis não estão presentes simultaneamente.	Duas moléculas de alcosiloxano condensam, formando um núcleo (dimerização) (diâmetro de ~1 nm)	Lamer <i>et al.</i> 1950 Matsoukas e Goulari 1988
<b>Modelo de densificação</b>		
O núcleo das partículas forma-se devido ao colapso da rede de gel. Os núcleos das partículas crescem através da adição de um polímero que colapsa de modo a formar uma partícula maior.	Ponto no qual o monómero polimerizou o suficiente para haver separação de fases e formação de uma partícula distinta (diâmetro de 20 nm)	Flory 1936 Stockmeyer 1943 Bailey e Mecartney 1992
<b>Modelo de Agregação</b>		
Pequenos núcleos de partículas agregam-se, formando partículas coloidais estáveis. As partículas crescem através da agregação dos núcleos de partículas pequenas e instáveis com as maiores. Ambos os tipos de partículas estão presentes no período de crescimento	Ponto no qual o monómero polimerizou o suficiente para haver separação de fases e formação de uma partícula distinta (diâmetro de 4 nm)	Bogoush e Zukoski 1991, 1991

### 1.3 Métodos e catalisadores biomiméticos da síntese de sílica

As técnicas baseadas no biomimetismo surgem de casos como os das diatomáceas, plantas superiores e esponjas marinhas *Demospongiae* (Schröder *et al.* 2007, Morse D. 1999). Estes organismos absorvem precursores de sílica do ambiente sob a forma de ácido silícico ( $\text{Si(OH)}_4$ ), de modo a produzir a sílica presente nas espículas das esponjas e paredes celulares das diatomáceas. Nas plantas superiores, os resultados de ressonância magnética nuclear de sílica revelam uma semelhança muito grande com géis de sílica sintéticos. As estruturas presentes nas espículas das esponjas consistem em nanopartículas com cerca de 100 nm que formam camadas em torno de um filamento central. Análises de espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) revelam proximidade das partículas das esponjas com gel de sílica hidratado.

As diatomáceas são organismos unicelulares, cujo estudo foi de grande importância para a biossílica. A estrutura destes organismos possui várias biomoléculas que intervêm no processo de síntese de sílica altamente estruturada. Nomeadamente, foi registada a existência de várias poliaminas de cadeia longa (LCPA) associadas à mineralização da sílica na diatomácea *C. fusiformis* e, posteriormente, noutras espécies de diatomáceas (Sumper *et al.* 2004, Kröger *et al.* 1997, Bridoux *et al.* 2010). Ficou também comprovado que apenas a silafina e estas LCPAs intervêm na mineralização da sílica.

Através da desmineralização da sílica presente nas diatomáceas, foi possível isolar os filamentos de proteínas incluídos nas estruturas, sendo estes constituídos principalmente por uma enzima relacionada com a L-Catepsina e pela Silicateína- $\alpha$ . A capacidade destas enzimas permitirem a hidrólise catalítica controlada dos precursores moleculares, assim como a policondensação com base em moldes fundamenta a pesquisa de novos modelos biomiméticos, assim como o uso de copolímeros sintéticos que mimetizem a ação destas proteínas naturais na síntese de sílica (Adamson *et al.* 2007). O mecanismo de reação da Silicateína- $\alpha$  com os precursores da sílica está ilustrado na Figura 5.

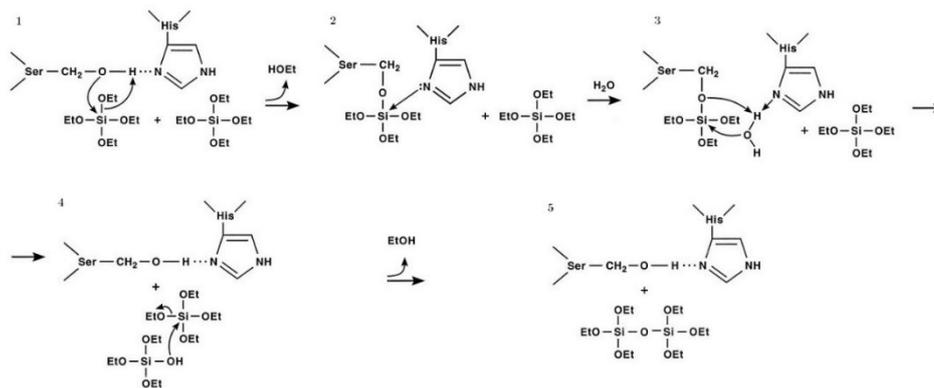


Figura 5 – Mecanismo de reação do TEOS com silicateína  $\alpha$ , Cha *et al.* 1999.

A presença de aminoácidos nas sequências destas enzimas influencia a velocidade de hidrólise, condensação e a agregação das partículas de sílica produzidas. A presença dos aminoácidos Serina (Ser) e Histidina (His) possui um papel fulcral na silicificação. As pontes de Hidrogénio formadas entre os grupos Hidroxil e Imidazol, respetivamente, destes aminoácidos funcionam como centro ativo para a condensação hidrolítica do alcoxissilano (Shimizu *et al.* 1998, Cha *et al.* 1999). Também a Lisina (Lys) promove uma aceleração dos mecanismos de condensação, embora aumente a agregação de partículas, sendo esta um fator essencial na formação de biosílica (Belton *et al.* 2004). Estes mecanismos facilitam o ataque nucleofílico feito ao precursor, permitindo a ocorrência de hidrólise do mesmo a pH neutro. A influência do pH não se limita só à estrutura final da sílica, mas todo o processo de reação. A síntese mediada por Silafinas e LCPAs nas diatomáceas apresenta tipos de reação diferentes para pH acima ou abaixo de 7, como se pode verificar na Figura 6.

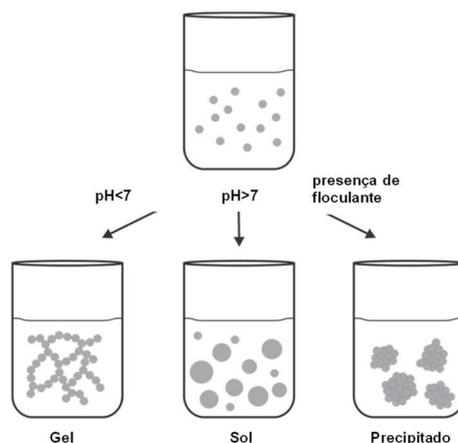


Figura 6 – Formação de sílica sob a forma de gel, sólido ou precipitado dependendo das condições de reação, Lechner *et al.* 2015.

A experimentação com os catalisadores mencionados anteriormente revelou a importância do grupo amina na síntese da sílica. Este funciona como catalisador ácido-base, facilitando a reação de condensação através da diminuição de energia de ativação da reação (Muller *et al.* 2013, Menzel *et al.* 2003, Mizutani *et al.* 1998, Belton *et al.* 2005). Com efeito a cisteamina e etanolamina, análogos da silicateína  $\alpha$  presente nas esponjas da espécie *Tethya aurantia* (Cha *et al.* 1999), demonstraram a capacidade de sintetizar sílica estruturada a pH neutro e temperatura ambiente. Esta síntese é possível na presença ou não de surfactantes, analogamente ao método conhecido como a síntese de Stöber (Corma *et al.* 2006). Como tal, o uso destes catalisadores biomiméticos demonstra uma grande importância do posicionamento dos grupos funcionais, para que as interações eletrostáticas e as pontes de hidrogénio possam catalisar a formação de sílica estruturada.

O estudo das silicateínas e das silafinas despertou a procura de métodos análogos de síntese, assim como a procura de novos catalisadores capazes de precipitar sílica. Inicialmente, esta começou por proteínas e enzimas análogas à silicateína como é o caso da lisozima (Coradin *et al.* 2003) e das protaminas (Zhang *et al.* 2008). As últimas promovem a formação de sílica a temperaturas ambiente e pH neutro, através das interações eletrostáticas e pontes de hidrogénio formadas entre o Si-O<sup>-</sup> e o =NH<sub>2</sub><sup>+</sup>.

Foram também sintetizados polipeptídeos com base nos resíduos presentes na silicateína, nomeadamente homopolímeros da lisina, histidina, prolina e arginina. O carácter catiónico dos aminoácidos gera forças eletrostáticas localizadas, que atraem os precursores reativos, promovendo a sua condensação. Também polipeptídeos de bloco, nomeadamente contendo lisina, demonstraram capacidade de sintetizar sílica *in vitro* (Patwardhan *et al.* 2011).

Numa tentativa de entender os mecanismos moleculares da silicificação biomimética, foram testados aminoácidos individuais, assim como pequenas moléculas bifuncionais (Belton *et al.* 2004, Roth *et al.* 2005). Relativamente aos aminoácidos, os que geraram as maiores partículas são os que contêm o átomo de azoto, como é o caso da lisina. As pequenas moléculas estudadas foram escolhidas de acordo a presença de grupos funcionais característicos do centro ativo da silicateína. Os grupos mais importantes são os que apresentam propriedades nucleofílicas (-SH ou -OH) e estabelecimento de pontes de hidrogénio (-NH<sub>2</sub> ou -NH-). A cisteamina e a

etanolamina apresentam ambos os tipos de grupos funcionais, sendo os mais ativos na precipitação da sílica. Pode concluir-se que o desenho de moléculas bi-funcionais pode mimetizar a atividade catalítica da silicateína.

A partir das silafinas, foi possível identificar poliaminas que mimetizam a síntese de sílica relacionadas com as LCPAs. Moléculas como a putrescina ou a propilendiamina são capazes de precipitar sílica mediada pelas atrações eletrostáticas entre as moléculas de poliamina e os iões fosfato (ou outros polianiões) em solução, formando uma rede de gel bem definida (Sumper *et al.* 2004). Através do estudo destas poliaminas, foi provado que, para uma distância inter-amina maior, (distância entre N-N, para um número de átomos constantes) as partículas de sílica resultantes serão maiores. Esta distância inter-amina aplica-se também a aminas de cadeia pequena, como é o caso da espermina, espermidina e outras poliaminas. Para além das interações eletrostáticas entre os grupos amina terminais e os oligómeros de sílica, a hidrofobia criada pelos carbonos das cadeias também influencia a reação, alterando a estrutura da água em volta do precursor, facilitando a agregação de sílica (Belton *et al.* 2005).

A espermina, espermidina e outras moléculas análogas foram descritas como catalisadores da reação da sílica estruturada, estando o tamanho das cadeias correlacionado com a reação de condensação, assim como a agregação e crescimento das partículas (Belton *et al.* 2005). A arquitetura das poliaminas está também diretamente relacionada com a aceleração da condensação, sendo que os catalisadores com cadeias lineares demonstram um grande aumento da mesma, enquanto moléculas ramificadas com pesos moleculares muito elevados não apresentam este efeito (Menzel *et al.* 2003). A norespermidina também demonstra a capacidade de sintetizar sílica (Abacilar *et al.* 2015).

As poli(etilenoiminas) são um tipo de poliaminas único, com vários grupos amina na cadeia macromolecular (Yao *et al.* 2015). Estas demonstraram a capacidade de sintetizar sílica estruturada em meio aquoso (Jin *et al.* 2005c). Através da variação da sua concentração é possível obter esferas (Jin *et al.* 2007), superfícies lisas sem fibras ou feixes expandidos, entre outras morfologias (Jin *et al.* 2011, Jin *et al.* 2014). O meio de síntese pode ser água, dimetilsulfóxido ou etanol, embora muitas PEIs não sejam solúveis em água à temperatura ambiente e pH neutro. No entanto, as PEIs lineares são solúveis em água quente (80°C) ou em água à temperatura ambiente com pH igual a 2, visto que a PEI é protonada. O uso de metanol como solvente permite uma reação lenta à temperatura ambiente, sendo benéfica para a

construção e desenvolvimento de padrões de sílica biomimética (Jin *et al.* 2005b). Para percentagens maiores de etanol (acima dos 75%), a sílica obtida assume o aspeto de um monólito, mas amorfo. Uma concentração de etanol situada entre os 25% e 50% permite a obtenção de estruturas ordenadas de sílica. Já foi estabelecida uma relação linear entre o peso molecular da PEI e o diâmetro das partículas de sílica obtidas a uma concentração de 0.1 mM (Neville *et al.* 2011). As PEIs dendríticas ou ramificadas são solúveis em água a concentrações muito baixas.

### **1.3.1 Nanopartículas de sílica**

A síntese de nanopartículas de sílica revelou-se importante para as áreas de biomédica e eletrónica, devido à possibilidade de controlo do tamanho e morfologia das partículas. A presença de poros com diâmetros entre os 2 e 30 nm, assim como áreas de superfície desde os 300 aos 1600 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> são ideais para a área dos biomateriais (Kurdyukov *et al.* 2015). Devido à sua dimensão, estas apresentam propriedades significativamente diferentes, nomeadamente a elevada relação entre área de superfície e volume e a mudança de propriedades elétricas. A síntese das mesmas pode ser feita através do método sol-gel a baixas temperaturas, que permite a formação de nanopartículas de sílica com elevado grau de controlo e facilmente funcionalizáveis devido à presença de grupos silanol à superfície.

O método que ficou conhecido como a síntese de Stöber (Stöber *et al.* 1968) consiste na síntese de nanopartículas de sílica esféricas monodispersas usando amoníaco como catalisador em soluções alcoólicas, permitindo a obtenção de esferas com dimensões entre os 5 e os 1000 nm com um bom controlo de tamanho de partículas. A presença do grupo amónia vai de encontro aos princípios biomiméticos já mencionados.

### **1.3.2 Materiais monolíticos**

O método sol-gel permite também a formação de materiais monolíticos. A síntese de sílica em meio ácido é favorável à formação de monólitos, dado formar estruturas lineares ou amorfas (devido à hidrólise mais rápida), mais densas e com volume de poros menor (devido à condensação mais lenta). É possível também obter monólitos formados em condições básicas, mas estes seriam maiores e haveria uma maior variação no volume e distribuição dos poros (Brinker *et al.* 1990). O rácio molar entre H<sub>2</sub>O e Si também influencia a estrutura final do monólito, sendo o necessário

para a ocorrência do processo sol-gel uma razão de 2:1. Como já foi dito anteriormente, os precursores não são solúveis em água, e no caso dos monólitos pretende-se uma estrutura homogênea logo, seria necessária a adição de um álcool. No entanto, é possível a ocorrência da reação sem a adição do solvente alcoólico, pois durante a reação de hidrólise, o álcool é produzido (Avnir, Kaufman, 1987).

A secagem do monólito é de extrema importância, pois pode ocorrer o colapso das paredes dos poros. Este fenômeno é causado pelo aumento da pressão capilar, aquando da saída da parte líquida do gel pelos poros.

## **1.4 Métodos de caracterização físico-química de materiais à base de sílica**

Para avaliar o resultado da síntese e as propriedades do mesmo são usados vários métodos de caracterização para as várias propriedades químicas, físicas, mecânicas e estruturais. Para a caracterização estrutural, alguns dos métodos mais utilizados são porosimetria de mercúrio, adsorção de azoto e picnometria de hélio.

A porosimetria por intrusão de mercúrio (Hg) é usada para medir a densidade, porosidade e diâmetro médio dos poros da sílica. Baseia-se na injeção de um líquido não molhante na amostra através de um aumento de pressão, forçando a entrada nos poros.

A técnica de adsorção de azoto fornece dados sobre a área de superfície da amostra, sendo possível calcular também porosidade e volume da mesma. Consiste no uso da teoria BET (Brunauer, Emmet e Teller) para o cálculo da área de superfície da amostra, através da determinação da quantidade de gás necessária para a formação de multicamadas moleculares sobre a superfície, a uma temperatura constante.

A picnometria de hélio é o método mais utilizado para medir a densidade aparente e volume de uma amostra, com base na lei de Boyle.

Os métodos microscópicos óticos e AFM não são adequados para medições de partículas de sílica, sendo os mais utilizados o SEM e o TEM. A resolução do SEM pode não ser a mais adequada para partículas mais pequenas, sendo nesses casos usado o TEM.

Para a caracterização química, existem vários métodos como a ressonância magnética nuclear, análise termogravimétrica, FTIR e potencial zeta. A análise

termogravimétrica permite saber o ponto de combustão dos catalisadores, de modo a saber se, aquando da calcinação, estes foram totalmente removidos, permitindo igualmente ter a noção da estabilidade da sílica obtida. O FTIR permite determinar o tipo de ligações do material obtido, para garantir que o espectro do mesmo é o típico da sílica. Já o potencial zeta permite medir a repulsão eletrostática à superfície das partículas, indicando a estabilidade da dispersão.

## 1.5 Aplicações farmacêuticas e biomédicas

Ao longo dos últimos anos, a investigação em materiais mesoporosos à base de sílica para a aplicação em tecidos tem sido alvo de grande atenção devido à sua excelente bioatividade e capacidade de gerar tecido ósseo em contacto com fluídos fisiológicos (Shadjou *et al.* 2015). Naturalmente, estes materiais não contêm apenas sílica mas também outros compostos osteogénicos como a hidroxiapatite.

Para a formação de apatite na sua superfície, este tipo de materiais bioativos depende muito da microestrutura e da área de superfície do mesmo. A literatura já estabeleceu relações entre a área de superfície dos materiais e a sua capacidade de indução da formação de apatite, sendo maior para uma maior área, atuando os microporos como o local de nucleação da apatite. Os mesoporos e macroporos também possuem uma elevada importância, pelas funções que desempenham como reservatório de nutrientes localizado e promotores da infiltração de células, respetivamente. Outros materiais, como nanotubos de carbono, usados em tecidos duros possuem forças de Van der Waals que não permitem uma dispersão adequada, algo que não acontece nas MSNs, devido à sua esfericidade.

A capacidade destas partículas agirem como nanocarriers já se encontra documentada na literatura, pois para além de terem propriedades semelhantes aos nanocarriers orgânicos, dada a baixa citotoxicidade, possuem também a durabilidade e versatilidade dos materiais inorgânicos.

Tabela 3 – Resumo das principais aplicações de compósitos cerâmicos em tecidos duros, Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering, pg. 366 (2016)

<b>Implante</b>	<b>Tipo de material biocerâmico</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Anca total, joelho, cotovelo, punho</b>	Revestimento de biovidro e metal	Reconstrução de articulações fraturadas
<b>Placas ósseas</b>	Compósito de biovidro e fibra metálica	Reparação de fraturas

<b>Unhas intramedulares</b>	Compósito de biovidro e fibra metálica, compósito de polissulfona e fibra de carbono	Alinhamento de fraturas
<b>Implante de Harrington</b>	Compósito de biovidro e fibra metálica, compósito de polissulfona e fibra de carbono	Reparação de curvatura crónica da coluna
<b>Membros implantados permanentemente</b>	Bioglass, compósito de polissulfona e fibra de carbono	Substituição das extremidades em falta
<b>Fusão espinhal</b>	Bioglass	Imobilização de vértebras para proteção da medula
<b>Substituição de osso alveolar e reconstrução mandibular</b>	Compósito de politetrafluoroetileno (PTFE) e carbono, biovidro, apatite densa	Reparação do cume alveolar e melhoramento do encaixe dentário

O Bioglass® 45S5 é um dos materiais à base de sílica mais utilizados no campo da medicina. Possui uma composição bem estabelecida de 45 wt% SiO<sub>2</sub>, 24,5 wt% CaO, 24,5 wt% Na<sub>2</sub>O e 6,0 wt% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, que permite a sua integração no tecido ósseo. Como tal, é muito utilizado em regeneração óssea, implantes dentários e auditivos (Rahaman *et al.* 2011). Na Tabela 3 podem encontrar-se as principais aplicações do biovidro e outros materiais compósitos em tecidos duros.

Também se encontra documentada a possibilidade de materiais à base de sílica agirem como sistemas de libertação de fármacos devido às propriedades bioativas destes compósitos em contacto com fluídos biológicos. Um dos maiores desafios dos implantes são as infeções nos locais afetados e com o uso de compostos à base de sílica, é possível incluir o fármaco adequado no próprio implante, minimizando os riscos de infeção e melhorando a formação de apatite (Vallet-Regi, 2006).



## 2. Métodos e Materiais

### 2.1 Reagentes, solventes e catalisadores

A Taurina (TAU,  $\geq 99\%$  e  $M_w = 120,15$  g/mol), Espermidina (SPD,  $\geq 99,0\%$  e  $M_w = 145,25$  g/mol), Espermina (SPN,  $\geq 99\%$  e  $M_w = 202,34$  g/mol), Norespermidina (NSP,  $98\%$  e  $M_w = 131,22$  g/mol), Hexametilenodiamina (HDA,  $98\%$  e  $M_w = 116,20$  g/mol), Poli(etilenoimina) Ramificada (PEIR,  $\geq 99\%$  e  $M_w = 25000$ ), Poli(etilenoimina) Linear (PEIL,  $\geq 99\%$  e  $M_n = 5000$ ) e o Tetraetilortosilicato (TEOS,  $\geq 98\%$  e  $M_w = 208,33$  g/mol) utilizados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich.

### 2.2 Síntese e processamento de sílica

Antes da síntese de sílica, foi feita a medição do pH de cada um dos catalisadores em solução no medidor de pH PHM210 da MeterLab®, variando a concentração através do método de diluição. Partindo de uma solução inicial com concentração de  $0,15$  mol L<sup>-1</sup>, foi adicionada água milli-Q® desgaseificada até uma concentração final de  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, sendo o pH medido periodicamente. Todas as medições foram feitas em duplicata, partindo da mesma solução inicial, tendo sido feita uma média dos dois valores de pH obtidos para a mesma concentração. Este passo advém da necessidade de relacionar o pH da solução aquosa na qual vai ocorrer a reação com a estrutura final da sílica sintetizada e também da relação entre a molaridade e o pH da solução.

Para a medição do pH da PEI Ramificada em solução, o método utilizado foi o mesmo, embora a solução inicial tivesse uma composição de  $1\%$  wt de PEIR, dado o elevado peso molecular da molécula tornar a dissolução de uma concentração alta impossível. A medição do pH da PEI Linear não foi efetuada pois foi impossível dissolver a mesma em água, não permitindo a medição análoga à dos outros catalisadores. Foi apenas registrado o pH da solução usada para a síntese de sílica.

A sílica foi sintetizada usando o catalisador dissolvido em solução aquosa com concentrações de  $0,02$  mol L<sup>-1</sup> para SPN, SPD, HDA e NSP, e de  $0,05$  mol L<sup>-1</sup> para a TAU. Foram realizadas soluções de catalisador e TEOS (4:1) para volumes de  $5$  mL e  $15$  mL. Os tempos de reação foram de  $100$ h para as soluções de  $15$  mL (triplicatas) e  $24$ h,  $48$ h,  $72$ h ou  $100$ h para as de  $5$  mL (duplicatas), de modo a permitir o estudo da cinética.

A preparação da solução aquosa foi feita através da dissolução dos catalisadores puros em água milli-Q® desgasificada, de modo a reduzir o dióxido de carbono presente, evitando alterações no pH através da formação de ácido carbónico. As soluções foram colocadas em agitação magnética em placa durante 30 minutos, à temperatura ambiente, revestida de papel de alumínio, de modo a não haver degradação por parte da luz.

A concentração usada para a PEIR foi determinada através da curva de pH. O pH da solução aquosa do catalisador usado situa-se entre os 11,30 e 11,50 para a concentração usada na síntese. Logo, foi estimado que para uma solução aquosa de PEIR com 5 % wt o pH estivesse nesse intervalo. Com efeito, para uma solução aquosa de PEI ramificada com 5 % wt de catalisador, o pH encontrado foi de 11,33.

Os copos onde decorreu a reação foram impregnados com azoto, de modo a criar uma atmosfera inerte.

As amostras foram então colocadas sob agitação magnética de 600 rpm à temperatura constante de 25°C, durante o período predefinido de reação.

Para a síntese de sílica usando a PEI linear, o método de preparação foi diferente, pois esta não é solúvel em água. Foi feita uma solução de etanol e água numa proporção de 9:1, determinada através de experimentação, com uma concentração de 1,4 % wt. Mantendo o meio a uma temperatura de 45°C foi possível dissolver o catalisador. A proporção de TEOS:H<sub>2</sub>O foi mantida a 1:4, tal como para os outros catalisadores, assim como a temperatura de reação e agitação magnética.

Após a síntese, as amostras foram transferidas para tubos falcon, sujeitas a uma centrifugação durante 10 minutos a 6000 rpm numa centrifugadora HERMLE Z366, sendo de seguida retirado o sobrenadante de TEOS, que fica à superfície, dada a sua baixa densidade. Este processo foi repetido duas vezes adicionais, antes de se proceder ao congelamento a -18° C. As amostras que usaram a taurina ou a PEIR como catalisador não foram sujeitas a lavagem, pois formam um monólito, não se justificando a centrifugação. Estas foram então transferidas para um tubo falcon e congeladas a -18 °C.

Para remover a água restante nos falcons e aumentar a porosidade da sílica sintetizada, as amostras foram liofilizadas no equipamento da Snijders Scientific. A temperatura da liofilização foi de aproximadamente - 46°C, com pressão média de 3 mbar. Procedeu-se à pesagem de todas as amostras.

Para obtenção de sílica, foi retirada uma alíquota de cada amostra e calcinada a uma temperatura de 600 °C com uma taxa de aquecimento de 8 °C (cerca de 1h15). As alíquotas foram mantidas a esta temperatura durante 1h30, até serem retiradas e colocadas num exsiccador com sílica gel, para arrefecimento. A temperatura de 600°C foi escolhida pois apenas acima dos 550°C é possível remover a maioria dos grupos amina presentes nos catalisadores, assim como o grupo sulfónico da Taurina. No entanto, a Norespermidina foi o único catalisador cuja amostra não sofreu combustão completa a 600°C, apresentando-se cinzenta escura após a calcinação. Foi, então, definida uma temperatura de 850°C para a calcinação da sílica produzida pela Norespermidina.

As amostras calcinadas foram pesadas e foi feita a proporção para a massa total de sílica produzida por cada amostra.

## **2.3 Caracterização físico-química e morfológica**

### **2.3.1 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)**

A caracterização feita através de SEM para as poliaminas, TAU e PEIR foi efetuada no equipamento da Zeiss Gemini Compact / VPCompact, field emission scanning electronic microscope FESEM, Alemanha. As amostras foram revestidas com uma camada de ouro inferior a 5 nm e foi usada uma voltagem de análise de 2 kV. As amostras pré e pós calcinação foram analisadas a várias ampliações. Para a PEIL, o equipamento utilizado VEGA3 da TESCAN com uma voltagem de 5 kV. Os diâmetros estimados das partículas a partir das micrografias de SEM foram analisados através do software ImageJ ®.

### **2.3.2 Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)**

A analisada foi efetuada no equipamento o FT/IR-4200 da Jasco Inc. (Japão). O espectro infravermelho foi obtido a partir de 256 scans com uma resolução de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ , em modo de transmissão, com pastilhas de KBr, numa proporção de 1:100.

### **2.3.3 Difusão dinâmica de luz (DLS)**

Inicialmente, foram feitos vários ensaios com meios diferentes (Etanol e água milli-Q®) e concentrações sucessivamente menores de sílica, sendo a maior de 1 mg mL<sup>-1</sup>. O DLS foi realizado no equipamento Zetasizer da Malvern, usando água milli-Q®.

Para a ressuspensão das partículas de sílica foi usado o sonicador durante 10 min antes de cada medição. Não foi feita a adição de surfactante e as concentrações de sílica calcinada testadas variaram entre os 0,01 e os 0,5 mg/mL, sendo os ensaios discutidos realizados a 0,02 mg/mL. Foram feitas 2 leituras sucessivas, o ângulo usado foi o “non-invasive backscatter” de 173°. Os índices de refração usados foram de 1,330 para a água e 1,459 para a sílica, a uma temperatura de 20° C. Foram realizadas 2 corridas consecutivas, em triplicadas, para cada amostra, com 10 segundos de estabilização. As cuvettes utilizadas foram as de plástico de volume reduzido (40 µL). Por fim, o método de tratamento de dados escolhido foi o General Purpose.

### **2.3.4 Potencial Zeta**

O potencial Zeta foi medido no equipamento Zetasizer da Malvern usando água milli-Q® como dispersante a uma concentração de 0,02 mg/mL. As restantes especificações usadas foram idênticas às descritas no DLS. O modelo usado foi o de Smoluchowski com 10 s de tempo de equilíbrio. As cuvetes usadas foram as DTS1060.

### **2.3.5 Picnometria de Hélio**

A análise de picnometria de hélio foi feito no equipamento Accupyc 1330 Model (Estados Unidos) da Micromeritics. Através da comparação da pressão de hélio na câmara de amostra com a da câmara de volume calibrado é possível medir a densidade e volume real dos materiais. As amostras escolhidas foram de sílica calcinada.

### **2.3.6 Adsorção de N<sub>2</sub>**

A adsorção de azoto foi usada para determinar a área de superfície. Este método permite, a uma temperatura constante, a medição do volume de azoto necessário para formar multicamadas sobre a superfície do material, através da teoria de BET. As amostras analisadas foram de sílica calcinada. O equipamento utilizado foi o ASAP 2000 V2.04 da Micrometrics (Estados Unidos).

### **2.3.7 Porosimetria por intrusão de mercúrio**

Esta técnica permite obter informação sobre a dimensão de poros da amostra. A porosimetria de mercúrio foi efetuada no equipamento Autopore IV 9500 Micrometrics (Estados Unidos). Os parâmetros usados foram pressões de 0,5 a 33000 psia.



## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Poliaminas e Taurina

No presente estudo, os catalisadores biomiméticos de cadeia pequena utilizados foram a espermidina, espermina, hexometilenodiamina, norespermidina e a taurina, sendo os quatro primeiros pertencentes ao grupo das poliaminas. A eleição da taurina como catalisador deve-se às semelhanças da sua estrutura química com a da cisteamina, cuja capacidade de atuação como catalisador de sílica já se encontra comprovada (Roth *et al.* 2004). A principal semelhança entre as duas moléculas deve-se à presença dos grupos amina, mas também do enxofre, que se encontra na taurina sob a forma do grupo sulfônico, ao invés do tiol na cisteamina. A estrutura química destes catalisadores encontra-se representada na Figura 7.

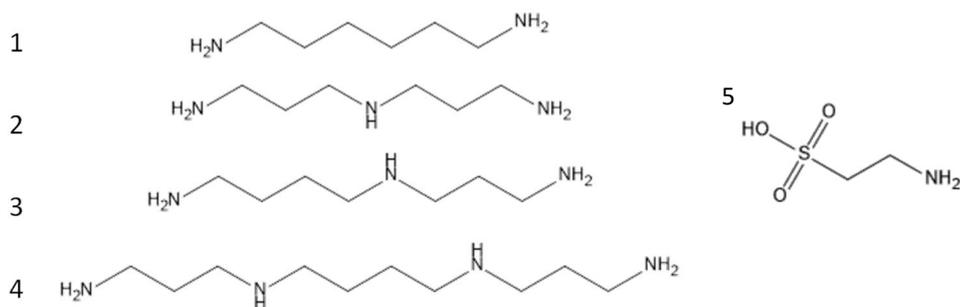


Figura 7 – Estrutura Química das Poliaminas (1 - HDA, 2 - NSP, 3 - SPD, 4 - SPN) e da Taurina (5)

A Tabela 5 é referente à massa média de sílica sintetizada para 100h e respectivos diâmetros médios para cada uma das poliaminas estudadas, assim como outras propriedades dos catalisadores. As distâncias inter-amina das moléculas foram obtidas a partir da literatura existente (Belton *et al.* 2005, PubChem Compound Database 2017, Zuluaga-Hernández *et al.* 2014). Os diâmetros foram calculados através de dois métodos diferentes, média normal e média ponderada segundo a equação 1 (Rawle A., *The Basic Principles of Particle Size Analysis*), que nos permite uma avaliação melhor da distribuição de tamanhos.

$$D[4,3] = \frac{\sum_1^n D_i^4 v_i}{\sum_1^n D_i^3 v_i}$$

Equação 1 – Fórmula de cálculo do diâmetro estimado a partir das micrografias de SEM

Tabela 4 – Massa total de sílica obtida e diâmetro médio das partículas para cada poliamina estudada. *L* – Comprimento da molécula; *L<sub>i</sub>* – Distância entre aminas na posição *i* e *i+1*, \* Valor teórico

Poliamina	Fórmula Química	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )*	Nº de grupos amina	Nº de aminas primárias	Nº de aminas secundárias	<i>L</i> (Å)*	<i>L<sub>1</sub></i> (Å)*	<i>L<sub>2</sub></i> (Å)*	<i>L<sub>3</sub></i> (Å)*	Diâmetro ponderado D[4,3] SEM (nm)	Sílica obtida a 100h (mg)
Espermidina	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	145,25	3	2	1	11,7	5	6,23	-	731±248	162±18
Espermina	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub>	202,35	4	2	2	16,1	5	6,35	4,96	697±226	186±35
HDA	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	116,21	2	2	0	8,9	8,9	-	-	313±99	220±22
Norespermidina	C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub>	131,22	3	2	1	-	6,02	6,02	-	1427±543	248±10

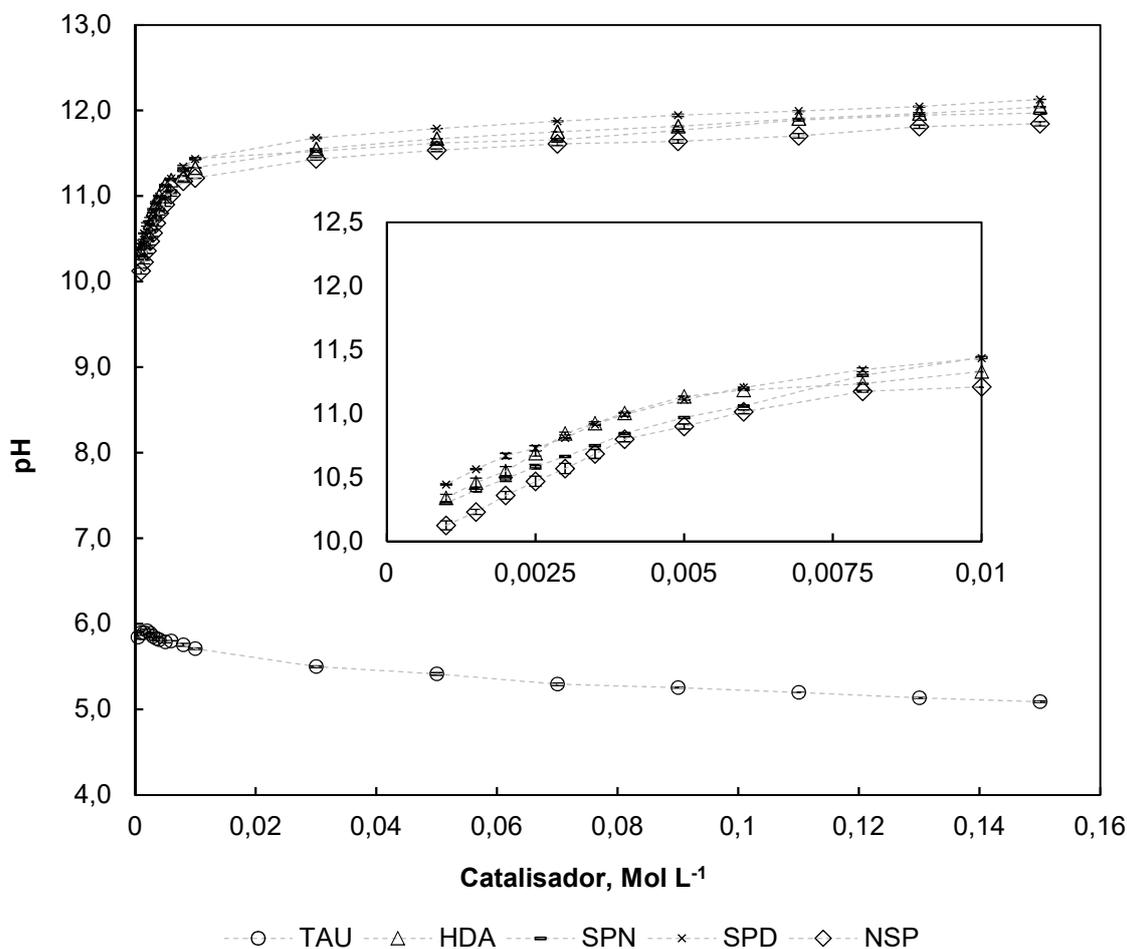


Figura 8 – Resumo das curvas de pH obtidas a partir da diluição dos catalisadores de cadeia pequena em solução aquosa

A partir da Tabela 5, pode concluir-se que o diâmetro das partículas obtidas, e posteriormente analisadas através de SEM, varia de acordo com o tamanho e propriedades das poliaminas usadas. A HDA foi o catalisador, dentro do grupo das poliaminas, que demonstrou maior rendimento mássico e produziu também as partículas com menor diâmetro. Este resultado vai ao encontro do que já se encontra na literatura verificando-se que poliaminas menores têm a capacidade de sintetizar partículas de tamanho mais reduzido (Bernecker *et al.* 2010). A Figura 8 diz respeito ao resumo dos resultados das medições de pH. Os gráficos individualizados podem ser encontrados no Apêndice I. Como seria de esperar, as soluções aquosas de poliaminas possuem um pH básico, entre 10,85 e 11,55,

enquanto a de taurina apresenta um pH de 5,92, próximo do neutro. Das poliaminas, a que apresentou um pH mais baixo foi a norespermidina, estando, no entanto, muito próximo dos valores das outras. Já a espermidina apresentou os valores de pH mais altos.

A norespermidina foi a poliamina cujas partículas resultantes apresentaram o maior tamanho, com uma média de 1427,7 nm. Apesar de ter o mesmo número de aminas primárias e secundárias que a espermidina, a norespermidina é uma molécula simétrica, pelo que a posição dos grupos amina pode estar relacionada com a diferença de resultados. Também é verificável a tendência de que poliaminas com maior peso molecular produzem partículas com maior diâmetro, de acordo com o que já foi feito com outros catalisadores (Bernecker *et al.* 2010).

Relacionando o desvio padrão pequeno relativo ao tamanho das partículas sintetizadas a partir de HDA com a distância inter-amina deste catalisador, podemos concluir que, para maiores distâncias entre os grupos amina, mais uniforme é a distribuição de partículas de sílica obtidas, algo que também já se encontra na literatura (Hernandez *et al.* 2014).

Relativamente ao número e tipo de aminas, verificamos que os resultados que aparentam ser mais consistentes são os da HDA, que não possui aminas secundárias. É provável que a ausência de aminas secundárias influencie a síntese das esferas de sílica, visto que o catalisador não possui grupos funcionais secundários. Nas Figuras 8 e 9 estão dispostas as imagens de SEM obtidas, a uma ampliação de 10000 e 30000 vezes da sílica não calcinada produzida pelas várias poliaminas. A Figura 10 apresenta as imagens da sílica calcinada sintetizada a partir das mesmas.

A NSP e SPN produziram partículas esféricas com uma rugosidade maior, o que vai ao encontro da literatura, pois a estrutura resultante possui maior rugosidade quanto mais longa for a molécula do catalisador (Belton *et al.* 2005). Também a menor esfericidade das partículas produzidas pela SPN é explicada pelo maior comprimento da molécula, visto que este induz uma maior agregação de partículas.

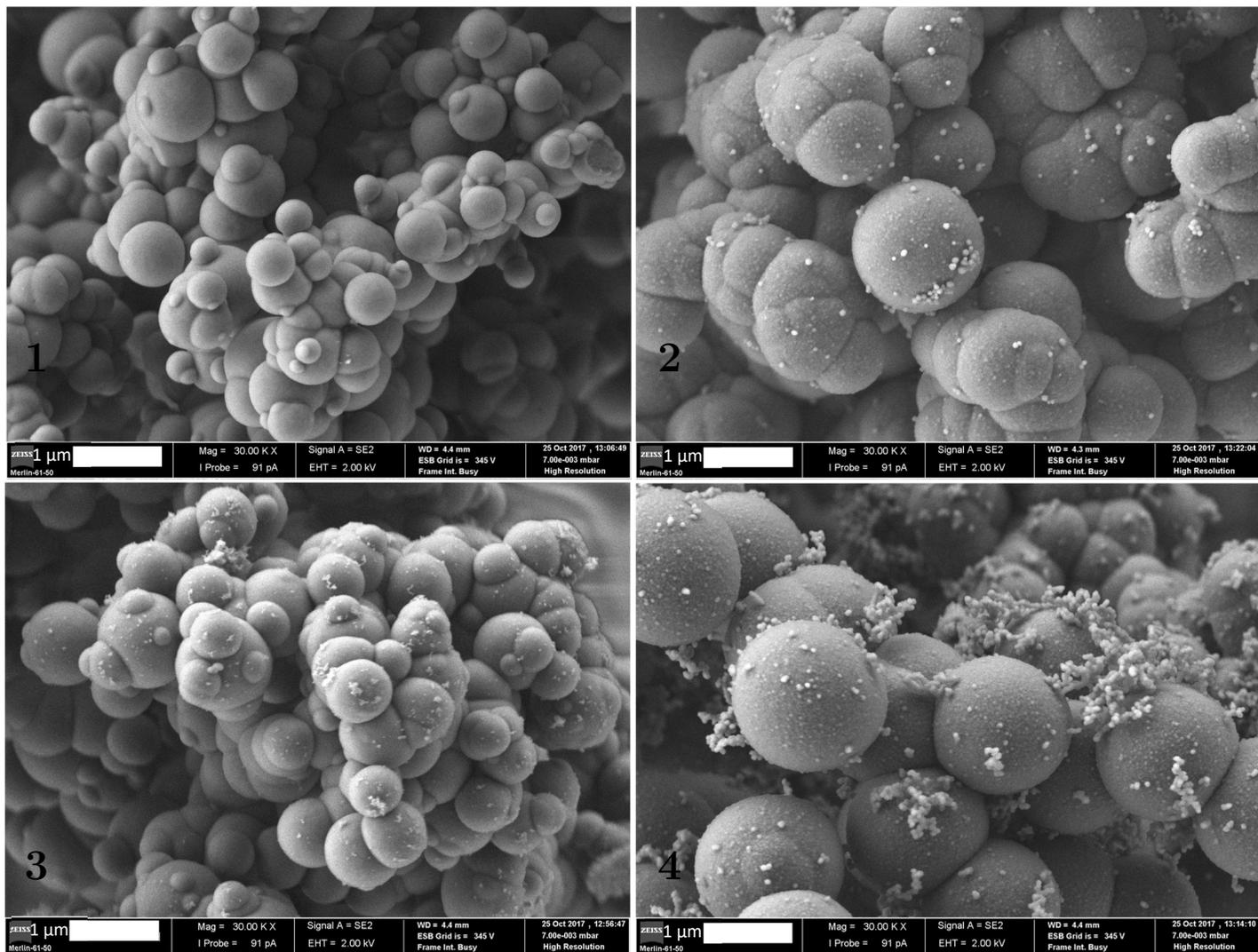


Figura 9 – Micrografias de SEM a amostras de sílica não calcinada sintetizadas pelas poliaminas (1 - HDA, 2- SPN, 3 -SPD, 4 - NSP)

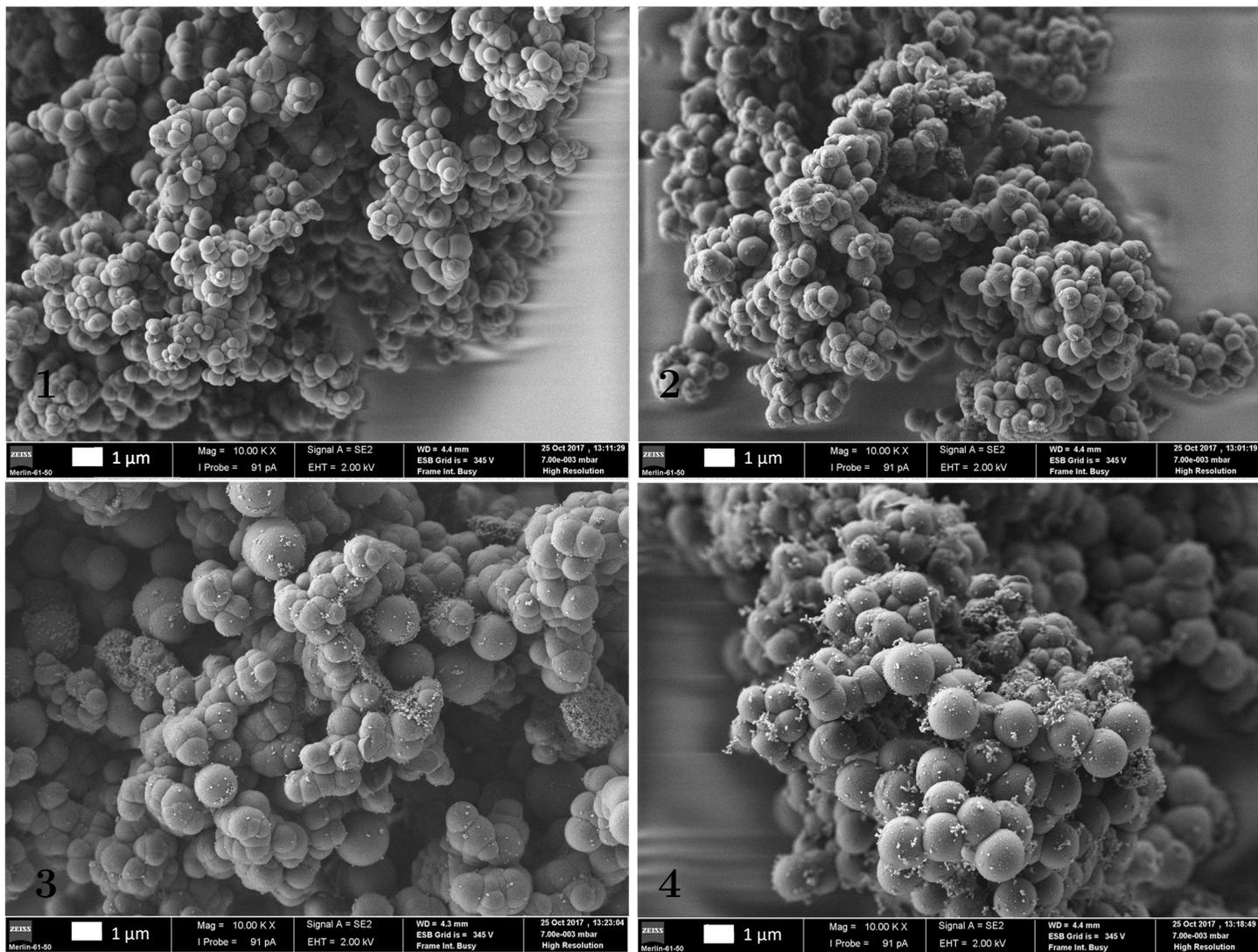


Figura 10 – Micrografias de SEM a amostras de sílica não calcinada sintetizadas pelas poliaminas (1 - HDA, 2- SPN, 3 -SPD, 4 – NSP)

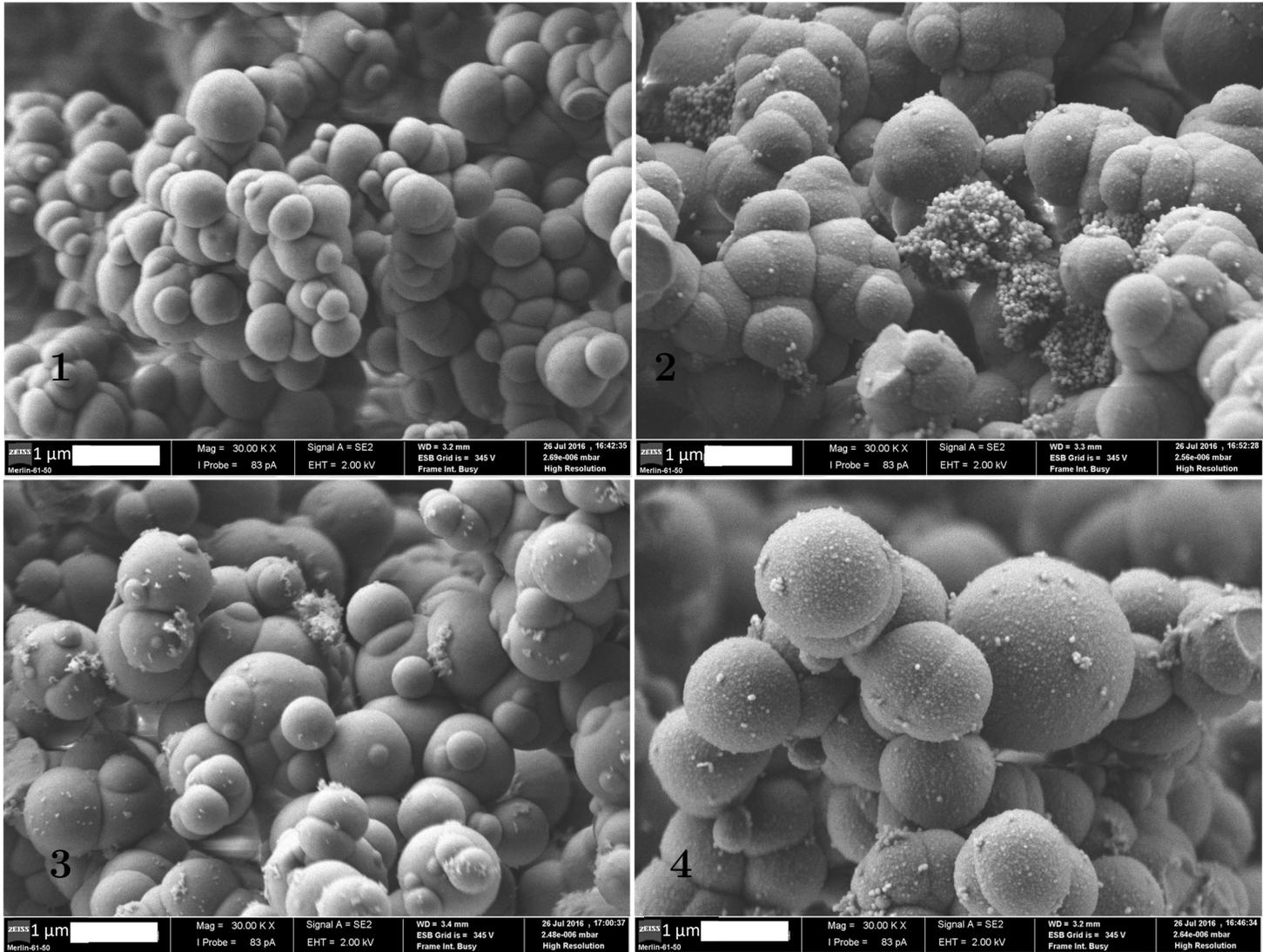


Figura 11 – Micrografias de SEM a amostras de sílica calcinada sintetizadas pelas poliaminas (1 - HDA, 2- SPN, 3 -SPD, 4 - NSP)

As imagens obtidas através do SEM para a Taurina não permitiram a estimativa do tamanho das partículas. No entanto, de acordo com a síntese sol-gel em meios de pH inferior a 7, supõe-se que a formação de nanopartículas de sílica tenha sido promovida apesar da formação de um monólito de sílica amorfa, como é visível nas imagens abaixo.

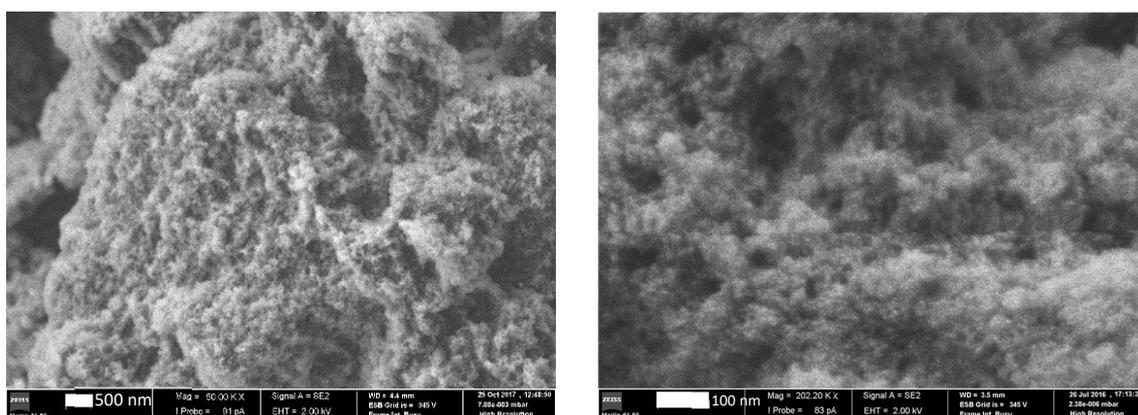


Figura 12 – Micrografias obtidas através de SEM para a sílica sintetizada pela taurina, não calcinada e calcinada

Tabela 5 – Rendimento de número de silícios da sílica sintetizada com poliaminas e taurina

Catalisador	Número de moles de silício obtidos	Número de silícios obtidos	Rendimento de silícios
HDA	$1,21\text{E}^{-03}$	$7,32\text{E}^{+20}$	9%
Norespermidina	$5,08\text{E}^{-04}$	$3,06\text{E}^{+20}$	4%
Espermidina	$7,16\text{E}^{-04}$	$4,31\text{E}^{+20}$	5%
Espermina	$8,32\text{E}^{-04}$	$5,01\text{E}^{+20}$	6%
Taurina	$3,83\text{E}^{-03}$	$2,31\text{E}^{+21}$	28%

A Tabela 6 representa o rendimento do número de silícios em função do catalisador utilizado. Os cálculos foram realizados assumindo que a sílica resultante é composta apenas por  $\text{SiO}_2$  e a quantidade inicial de silícios de  $8,09\text{E}^{+21}$ , correspondente aos 3 mL de TEOS usados na síntese. A taurina apresenta um rendimento muito maior que as poliaminas. Algo que se pode dever à prevalência da condensação em sistemas com um pH inferior a 7.

Foi também feito o estudo da cinética da síntese de sílica para as 24h, 48h, 72h e 100h, em cada um dos catalisadores estudados. Como é visível pelos gráficos apresentados na Figura 13, todas as poliaminas tiveram uma evolução semelhante, produzindo a partir das 24h uma massa considerável que aumenta até às 72h, mantendo-se estável até às 100h. Ou seja, pode concluir-se que a hidrólise ocorre muito rapidamente e que há logo condensação do precursor, visto que poucas horas após o início da síntese já se encontram partículas de sílica suspensas na solução.

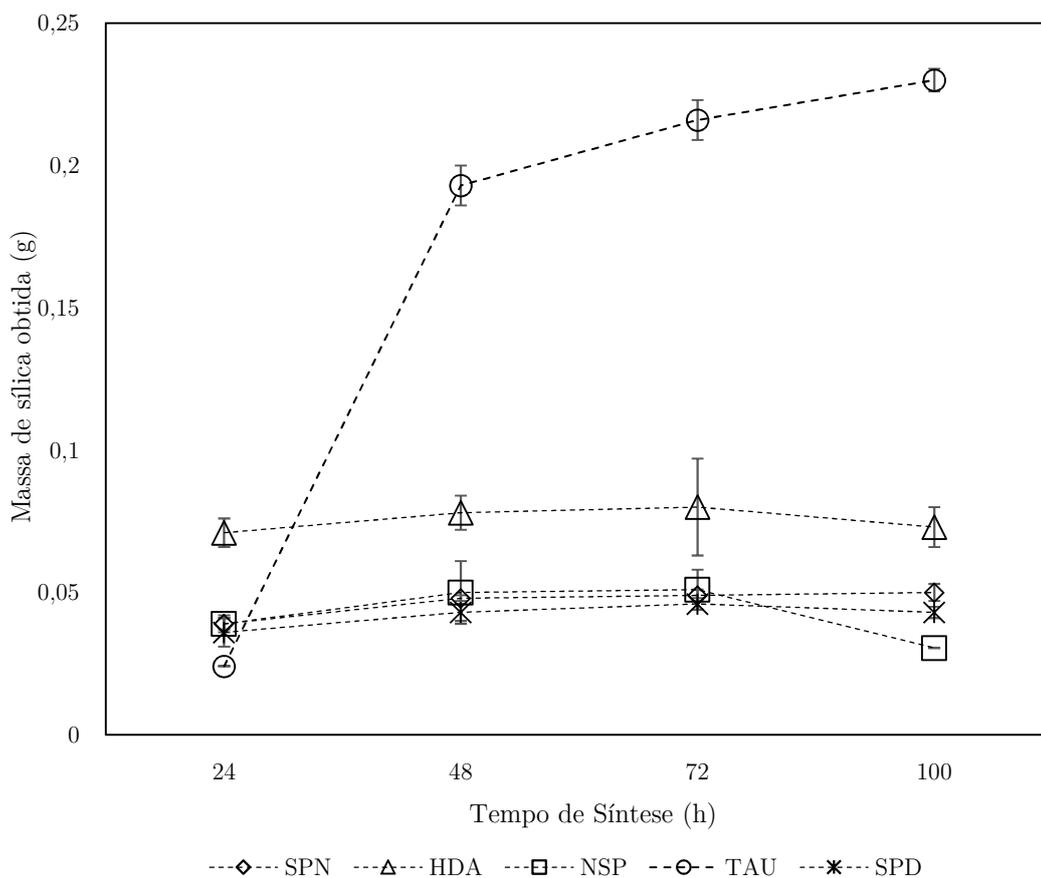


Figura 13 – Gráfico de cinética da massa resultante (g) da síntese com poliaminas e taurina

Por oposição, a Taurina apresenta uma massa de sílica muito baixa (0,024 g) para as 24 h, havendo um crescimento muito significativo para as 48 h. A partir desse momento, o aumento da massa é menor, mas continua a verificar-se uma massa obtida muito maior do que a verificada nas poliaminas. Esta variação entre as 24 h e as 48h pode ocorrer devido à menor velocidade da condensação da sílica em meios com um valor pH inferior a 7.

De acordo com o número de grupos amina (Figura 14), é também possível prever que, para moléculas que contenham 2 grupos com uma distância inter-aminar maior, o rendimento de sílica seja maior. Usando um catalisador com menor número de grupos amina, as partículas de sílica obtidas tendem a apresentar um menor diâmetro.

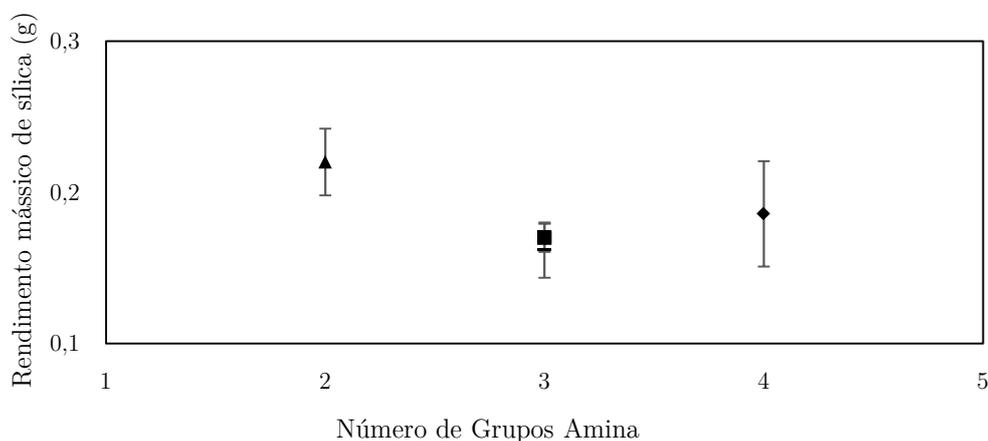


Figura 14 – Gráfico da massa produzida de sílica em função do número de grupos amina de cada poliamina: ▲ – HDA (2 grupos amina), ■ – Norespermidina (3 grupos amina), ○ – Espermidina (3 grupos amina), ◆ – Espermina (4 grupos amina)

Tabela 6 – Bandas características da sílica com TEOS como precursor, Al-Oweini et al. 2009

E1	Unidade Estrutural
3472	H-O-H...H <sub>2</sub> O; SiO-H...H <sub>2</sub> O
1653	H-O-H
1200	Si-O-Si
1089	Si-O-Si
965	Si-OH
800	Si-O-Si
467	-O-Si-O-

Os resultados do FTIR para as poliaminas encontram-se no Apêndice II. Os espectros obtidos pré e pós calcinação foram muito semelhantes. As bandas identificadas correspondem também às esperadas para amostras de sílica. Através da análise do FTIR realizado à sílica produzida pela Taurina, foi possível comprovar a existência da mesma. As bandas mais representativas da sílica sintetizada com o uso de TEOS como precursor situam-se entre os 1080 e 1200 cm<sup>-1</sup>, de acordo com a Tabela 7, adaptada de Al-Oweini et al. 2009.

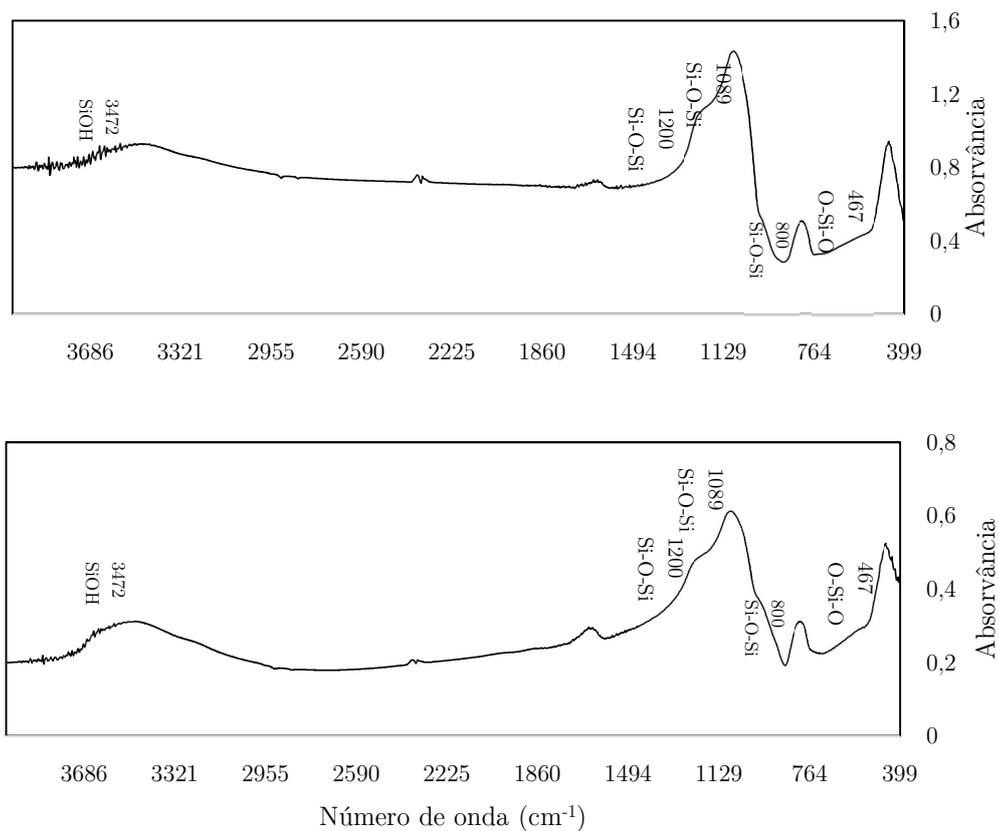


Figura 15 – Resultados do FTIR realizado a duas amostras de sílica calcinada sintetizadas usando a Taurina como catalisador, a partir da mesma solução original.

Os gráficos obtidos demonstram os mesmos picos para as duas amostras, tratando-se do espectro típico da sílica. Os picos mais representativos situam-se, então, entre os 1080 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  (ligações Si-O-Si), 3472  $\text{cm}^{-1}$  (SiO-H e O-H) e também nos 800  $\text{cm}^{-1}$  (Si-O-Si).

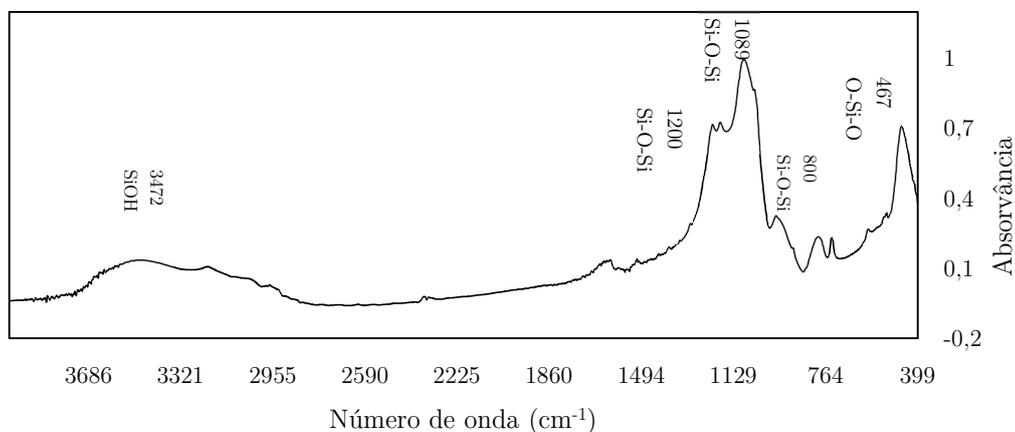


Figura 16 – Resultados do FTIR realizado à amostra de sílica sintetizada através de Taurina, não calcinada.

Através da análise dos dados obtidos e da Tabela 7, pode concluir-se que usando a taurina como catalisador, houve formação de sílica. A informação da Tabela 7 está em concordância com o manual do equipamento utilizado, fundamentando as conclusões tiradas. Pode considerar-se também que a lavagem foi feita com sucesso, pois os picos característicos da Taurina, sendo eles correspondentes aos valores de 1200 (O=S=O), 2950 (CH<sub>2</sub>), não são visíveis no espectro obtido.

Foram também efetuadas medições de potencial zeta e de tamanho de partículas através do DLS às amostras de sílica sintetizadas. O resumo da síntese e caracterização morfológica feitas encontram-se na Tabela 8. Os valores absolutos de potencial zeta obtidos para todas as amostras foram muito próximos do 0. Os valores de potencial zeta indicam que as partículas de sílica obtidas tendem a agregar em solução, formando aglomerados. No entanto, os desvios são muito grandes, o que significa que há partículas carregadas com 3 mV positiva ou negativamente. Dado que a literatura descreve o valor de potencial zeta para partículas de sílica como próximo de -40, este resultado não confere uma grande viabilidade da análise de potencial zeta, algo que pode ser justificado por uma grande dispersividade das amostras de sílica.

Estes dados vão de encontro ao que foi visualizado nas medidas de DLS, cujos resultados revelam a presença de partículas com diâmetros de algumas centenas de nanômetros, mas também de partículas com vários micrómetros. O Z-Average obtido no DLS ronda os 1000 nm, mas sendo que o range do Zetasizer Nano da Malvern compreende valores entre 10 e 1000 nm e o equipamento é tendencioso para partículas maiores, não é possível assegurar a viabilidade destes resultados. Como se pode visualizar nas imagens de SEM, as partículas obtidas têm diâmetros muitos inferiores aos descritos pelo DLS. Os gráficos obtidos a partir do DLS podem ser encontrados no Apêndice III, para o potencial zeta, encontram-se no Apêndice IV. A própria sonicação das amostras de modo a induzir a ressuspensão pode estar a ter o efeito adverso, promovendo a aglomeração ao invés da suspensão das partículas.

Como tal, apesar de haver alguns picos que vão de encontro ao encontrado no SEM, principalmente no caso da sílica sintetizada a partir da HDA, os resultados de DLS não são fiáveis pois não representam o que foi visualizado e não é o método indicado para determinar diâmetros deste tipo de partículas.

Tabela 7 – Resumo da síntese e caracterização morfológica das poliaminas e taurina

Catalisador	Síntese	pH de Síntese	Massa (100h) (mg)		Cinética	Massa 24h (mg)	Massa 48h (mg)	Massa 72h (mg)	Massa 100h (mg)
HDA		11,55	220±22			71±5	78±6	80±17	73±7
Norespermidina		10,85	248±10			39±3	50±11	51±7	305±1
Espermidina		10,90	162±18			36±5	43±3	46±2	43±2
Espermina		11,10	186±35			39±2	48±1	49±2	50±3
Taurina		5,95	676±73			24,1±0,1	193±7	216±7	230±4
Catalisador	Tamanho de Partículas (DLS)	Z-Average (nm)		Mean Peak (nm)	Potencial Zeta	Potencial Zeta (mV)			
HDA		1155±47		196,6±120,7		-0,183±3,66			
Norespermidina		1038±255		244,3±125,0		-0,118±3,55			
Espermidina		1376±435		197,2±82,4		-0,063±3,76			
Espermina		1522±199		285,1±88,2		-0,0553±4,63			
Taurina		-		-		-0,0146±3,81			
Catalisador	Diâmetro Estimado (SEM)	Não Calcinada (nm)		Calcinada (nm)	Área de superfície (Adsorção de Azoto)	Área de Superfície (m <sup>2</sup> /g)	Diâmetro de poros (nm)	Volume (cm <sup>3</sup> /g)	
HDA		409±135		313±99		3,205	19,40	0,016	
Norespermidina		2404±774		1427±543		17,083	18,72	0,080	
Espermidina		610±193		731±248		8,489	17,44	0,037	
Espermina		1736±533		697±226		6,627	3,83	0,006	
Taurina		-		-		399,088	3,37	0,336	
Catalisador	Porosidade (Porosimetria de Mercúrio)	Densidade Aparente (g/mL)	Densidade Real (g/mL)	Porosidade (%)	Área total Porosa (m <sup>2</sup> /g)	Pícnometria de Hélio	Volume (cm <sup>3</sup> )	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	
HDA		0,3281	1,0981	70	2,358		0,157±0,106	2,483±0,157	
Norespermidina		0,3016	0,749	60	2,763		0,141±0,007	2,587±0,135	
Espermidina		0,2552	1,0372	75	6,171		0,133±0,011	2,451±0,223	
Espermina		0,2095	0,8038	74	2,652		0,110±0,011	2,535±0,261	
Taurina		0,4801	1,251	62	0,473		0,328±0,015	2,087±0,093	

A partir da Tabela 7 e dos gráficos da adsorção de N<sub>2</sub> e da porosimetria por intrusão de mercúrio (Apêndices V e VI), podem tirar-se várias conclusões relativamente à porosidade e densidade das amostras de sílica obtidas. Os valores apresentados na tabela são valores médios. A sílica proveniente das poliaminas possui gráficos característicos de materiais do tipo II, com sílica macro ou mesoporosa e adsorção do gás em multicamadas. São visíveis histereses do tipo H1 nas curvas isotérmicas de adsorção e dessorção da sílica sintetizada pelas poliaminas, indicadoras de poros cilíndricos abertos nas duas extremidades. Relativamente ao diâmetro dos poros, a HDA sintetizou sílica com poros maiores que todas as outras, com volumes de poros entre os 10 e os 50 nm. Este dado reflete-se na alta densidade da sílica sintetizada por este catalisador, sendo o valor mais alto das poliaminas, e na pequena área de superfície, que corrobora a ausência de microporosidade.

Já a norespermidina apresentou uma gama de poros entre os 2 e os 50 nm, com um maior volume de poros entre os 10 e os 20 nm de diâmetro. Possui a maior área de superfície e a mais baixa densidade real entre as poliaminas, embora aparente ter as partículas de maior dimensão. A espermidina apresenta meso e macroporosidade, com o maior volume de poros entre os 3 e 50 nm de diâmetro e um tamanho de partículas entre os 500 e 900 nm. Também a espermina contém partículas de tamanho semelhante ao da espermidina, embora os seus poros apresentem mesoporosidade. Das poliaminas, foi a que obteve menor diâmetro de poros, com o maior volume entre 2 e 5 nm de diâmetro.

A partir destes dados, pode relacionar-se o número de grupos amina do catalisador com a porosidade das partículas de sílica resultantes. Verifica-se que para catalisadores com maior número de grupos amina, os poros da sílica resultante são menores. Também se verifica uma ligeira diminuição do tamanho de partículas de sílica com o aumento do pH de síntese, apesar do pH de síntese da norespermidina e da espermidina ser bastante próxima.

A sílica proveniente da taurina apresenta micro e mesoporosidade, apresentando maioritariamente poros entre 1 e 5 nm de diâmetro. As isotérmicas de adsorção e dessorção descrevem um material do tipo IV, característico de sílicas mesoporosas, com histereses do tipo H2, indicando poros do tipo tinteiro. Apresenta uma área de superfície muito superior à das poliaminas, assim como volume, de acordo também com os resultados da picnometria de hélio. É a sílica menos densa da obtida por moléculas pequenas e demonstrou também o maior rendimento mássico.

A porosimetria por intrusão de mercúrio não pode analisar convenientemente as amostras de sílica sintetizadas com confiança, pois os poros de muitas amostras estão abaixo da gama de funcionamento do equipamento. A compressibilidade da amostra pode ter influenciado os resultados, sendo analisados os espaços vazios entre as partículas de sílica ao invés dos poros existentes.



## 3.2 Poli(etilenoiminas)

A poli(etilenoimina) ramificada (PEIR) utilizada possui um peso molecular muito elevado ( $M_w=25000$ ), o que não permite a dissolução do catalisador em água a concentrações tão altas como as poliaminas. Como tal, foi feita uma diluição de uma concentração inicial de 1% wt até 0,01% wt. A Figura 17 representa a medição feita.

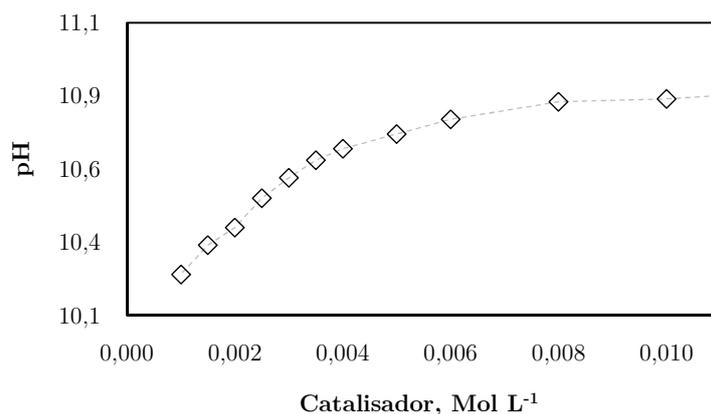


Figura 17 – Diluição e medição do pH da poli(etilenoimina) ramificada em solução aquosa.

Estes resultados permitiram estimar a concentração necessária para atingir um pH semelhante ao utilizado pelas poliaminas, ficando estabelecida a 5% wt. O pH de síntese foi de 11,33.

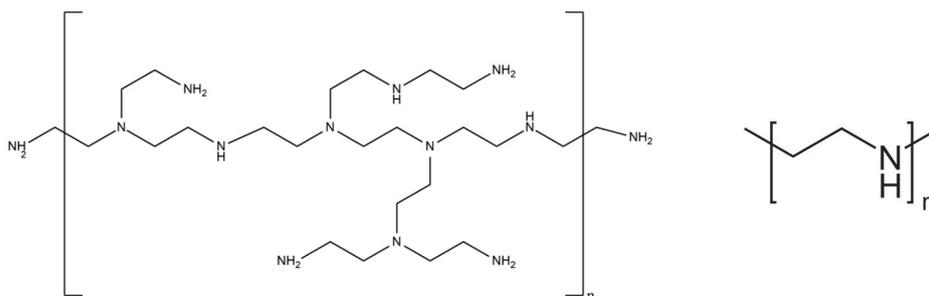


Figura 18 – Estrutura química do monómero das poli(etilenoiminas) ramificada e linear, respetivamente

Não foi possível fazer a medição do pH e respetiva diluição da poli(etilenoimina) linear (PEIL) em solução, pois dada a sua estrutura, não é possível dissolvê-la em água. Como tal, foram feitos estudos preliminares que demonstraram a sua capacidade de dissolução numa mistura de água e etanol numa proporção de 1:9 (v/v) a uma temperatura de 40°C, com uma concentração final de 0,14 Mol L<sup>-1</sup>. A solução registou um pH de 9,35.

A síntese realizada usando a poli(etilenoimina) ramificada como catalisador sintetizou  $0,75 \pm 0,007$  g de sílica por copo. Apesar de antes da calcinação as massas variarem, podemos dizer que essa etapa teve excelente sucesso, pois as proporções de catalisador, água e precursor removidas normalizaram as massas obtidas. Pode assumir-se que, de todos os catalisadores usados, foi o que demonstrou maior rendimento.

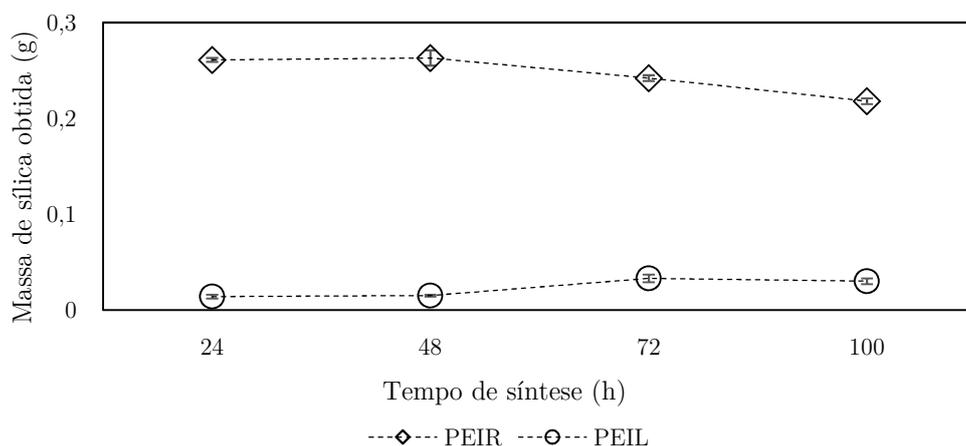


Figura 19 – Cinética da síntese de sílica usando a poli(etilenoimina) ramificada e polie(etilenoimina) linear.

Pela observação do gráfico anterior, conclui-se que as massas sintetizadas de sílica pela PEIR se mantêm constantes nas primeiras 48 h, podendo assim assumir que a reação de hidrólise é rápida. No entanto, após as 48 h há um decréscimo linear das massas obtidas. Este efeito pode dever-se ao elevado pH da poli(etilenoimina) que promove a despolimerização da sílica, clivando as ligações Si-O-Si através do grupo OH (Brinker, 1988). A PEIL apresenta uma hidrólise mais lenta, provavelmente pela presença do álcool no meio da reação, dificultando a reação da água com o TEOS. Entre as 48 e 72h verifica-se uma condensação mais rápida através do aumento da massa. A partir das 72h há um decréscimo da massa, pelas razões mencionadas anteriormente. O uso do álcool para dissolver a PEIL pode ter influenciado negativamente o tempo de reação, pois a área de interação onde esta decorre estava reduzida (devido ao tamanho do recipiente) e a proporção de álcool era alta.

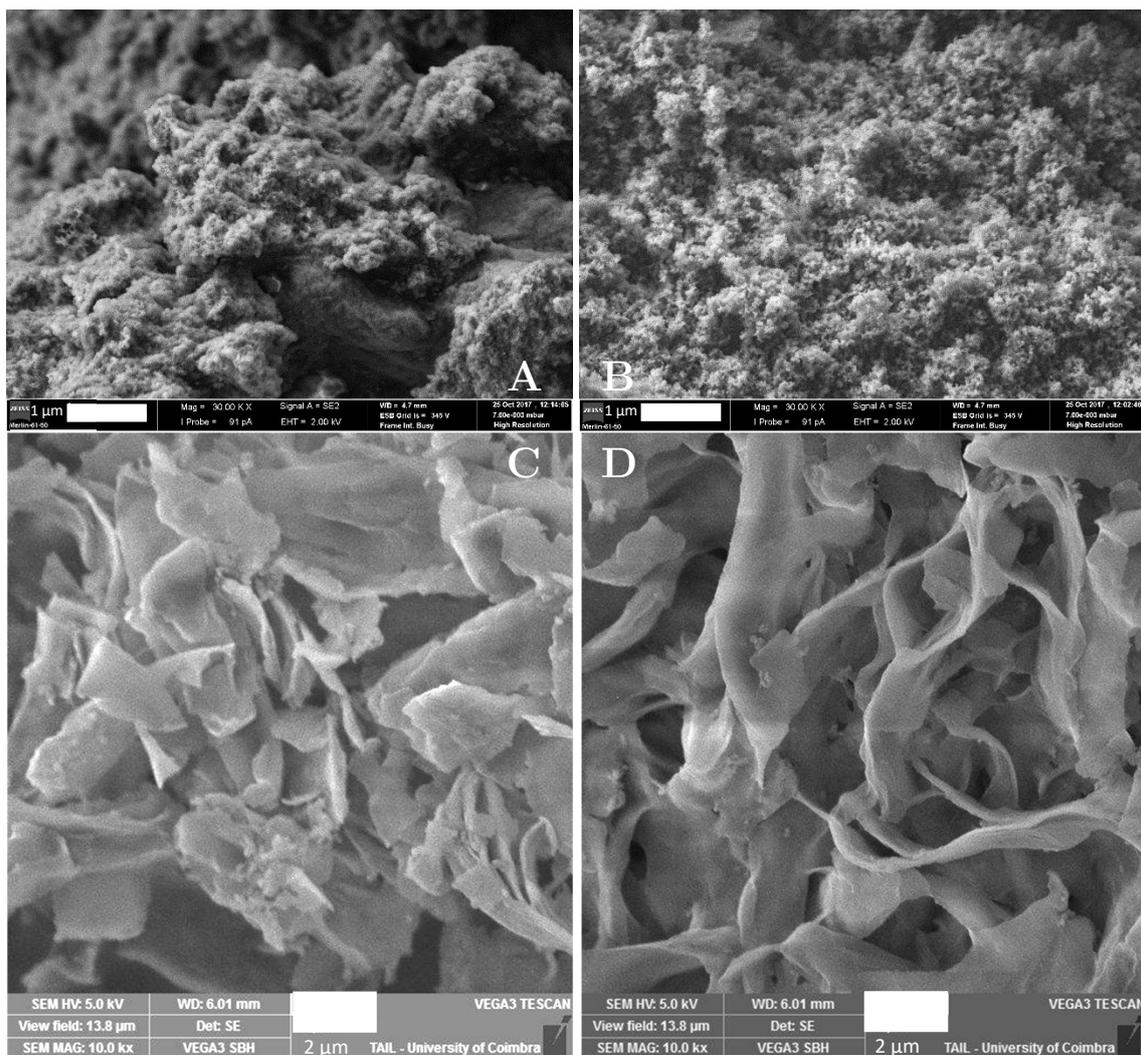


Figura 20 – Imagens obtidas através do SEM de sílica sintetizada com a PEIR não calcinada (A) e calcinada (B) e PEIL não calcinada (C) e calcinada (D)

Através das imagens de SEM, é observável que para a PEIR ocorreu a formação de um monólito de sílica amorfa, semelhante à Taurina, pelo que é impossível estimar o diâmetro das partículas através das técnicas habituais. Já a PEIL deu origem a estruturas fibrilares, a sua origem pode estar na presença de etanol no meio de síntese, pois já foi descrita a síntese de estruturas fibrilares em meios semelhantes (Jin *et al.* 2005).

Tabela 8 – Rendimento de número de sílios da sílica sintetizada com poli(etilenoiminas)

Catalisador	Número de moles de sílio obtidos	Número de sílios obtidos	Rendimento de sílios
PEI R	$4,03E^{-03}$	$2,43E^{+21}$	30%
PEI L	$4,99E^{-04}$	$3,01E^{+20}$	4%

A Tabela 8 indica-nos a diferença entre o rendimento das duas poli(etilenoiminas), a PEIR obteve um rendimento superior a todos os outros catalisadores enquanto a PEIL obteve o menor. Este último, mais uma vez, pode justificar-se pelo meio não otimizado de síntese, que não permitiu que a reação ocorresse de maneira semelhante aos ensaios com outros catalisadores. Os resultados da restante caracterização dos materiais encontram-se na Tabela 9 e nos Apêndices V e VI.

*Tabela 9 - Resumo da síntese e caracterização morfológica das poli(etilenoiminas)*

Catalisador	Síntese	pH de Síntese	Massa (100h) (mg)			
PEI Ramificada			11,33	754±8		
PEI Linear		9,78	85±10			

Catalisador	Cinética	Massa 24h (g)	Massa 48h (g)	Massa 72h (g)	Massa 100h (g)
PEI Ramificada			261±2	263±8	242±3
PEI Linear		14±2	15±1	33±4	30±3

Catalisador	Picnometria de Hélio	Volume (cm <sup>3</sup> )	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
PEI Ramificada			0,267±0,007
PEI Linear		0,042±0,003	2,184±0,145

Catalisador	Porosidade (Adsorção de Azoto)	Área de Superfície (m <sup>2</sup> /g)	Diâmetro de poros (nm)	Volume (cm <sup>3</sup> /g)
PEI Ramificada			274	4,8
PEI Linear		200	6,2	0,310

Catalisador	Porosidade (Porosimetria de Mercúrio)	Densidade Aparente (g/mL)	Densidade Real (g/mL)	Porosidade	Diâmetro médio dos poros (nm)	Área total Porosa (m <sup>2</sup> /g)
PEI Ramificada			0,4595	1,272	64%	-
PEI Linear		0,1176	0,578	80%	5-8	19,06

Através desta Tabela e dos anexos, é possível verificar que a sílica obtida pela PEIR possui maior volume, densidade, área de superfície e rendimento que a sílica proveniente da PEIL. Apesar de serem ambas mesoporosas, a sílica da PEIR possui também menor tamanho de poros, entre os 2 e 5 nm. Já na sílica proveniente da PEIL, o maior volume de poros situa-se entre os 2 e 10 nm. Esta dimensão de poros

não garante a viabilidade dos resultados da porosimetria por intrusão de mercúrio para ambas as amostras pois possuem poros com diâmetros inferiores à gama de funcionamento do aparelho. No entanto, é verificável no gráfico relativo à PEIR a presença de poros da ordem dos 5 a 8 nm.

As áreas de superfície das amostras aproximam-se da área de superfície da sílica sintetizada com Taurina, e os gráficos de adsorção e dessorção são igualmente do tipo H2, revelando poros do tipo tinteiro. A partir deste gráfico podem também identificar-se os materiais como do tipo IV para a PEIR e tipo II para a PEIL.

Após a análise da caracterização, percebe-se que estas moléculas longas têm a capacidade de sintetizar sílica micro e mesoporosa num meio biomimético, a temperaturas e pressões ambiente. Sendo que, a presença de um maior número de grupos amina secundários na PEIR, pode estar na origem de uma maior porosidade menor tamanho de poros.

Relacionando o encontrado nas poli(etilenoiminas) com as poliaminas e taurina, verifica-se uma tendência de aumento da porosidade e diminuição do tamanho dos poros com a presença de grupos funcionais secundários nas moléculas que compõem os catalisadores.

A presença do grupo amina é essencial para síntese de partículas mesoporosas de sílica. Com a presença de aminas secundárias, ou outros grupos funcionais, é possível que se possa obter um maior controlo de porosidade das partículas de sílica. Existe a possibilidade de estes grupos funcionais ocuparem espaços durante as reações de condensação que, após a lavagem e tratamento térmico, podem tornar-se em poros.



## 4 Conclusão

A partir do trabalho realizado é possível concluir que utilizando vários catalisadores biomiméticos com grupo amina, foi possível sintetizar diferentes tipos de sílica a partir de TEOS. As poliaminas originaram partículas esféricas, enquanto a taurina e a poli(etilenoimina) ramificada originaram um monólito de sílica. A poli(etilenoimina) linear originou sílica de forma fibrilar, por ter usado um meio diferente de síntese.

À exceção da poli(etilenoimina)ramificada, todas as sínteses que ocorreram a valores de pH entre os 10 e 11,6 demonstraram a capacidade de sintetizar partículas esféricas de sílica sem a adição de surfactantes e com reprodutibilidade, notando-se uma tendência de diminuição de tamanho das partículas com o aumento de pH.

Em termos de rendimento, dado que a hidrólise é mais rápida nas poliaminas, estas dão origem em poucas horas a uma maior massa de sílica. A taurina apresenta um maior rendimento para períodos maiores de reação, dado que ocorre a um pH próximo do neutro. No entanto, foram a taurina e a poli(etilenoimina) ramificada que sintetizaram a maior massa de sílica.

A caracterização confirmou a existência de partículas com diâmetros situados entre os 310 e 1400 nm para as poliaminas, visíveis através do SEM. Foi possível observar também a correlação já demonstrada entre o tamanho da molécula de catalisador e a dimensão das partículas obtidas, dado que a molécula de HDA produziu as partículas mais pequenas e mais uniformes que a espermidina, espermina e norespermidina, que são moléculas maiores.

No entanto, a presença de grupos secundários na molécula do catalisador parece provocar uma diminuição do tamanho dos poros da sílica resultante, algo que se verificou quer nas poliaminas, quer nos outros catalisadores. As sílicas provenientes das poli(etilenoiminas) e taurina possuem áreas de superfície da ordem dos 200-300 m<sup>2</sup>/g, pelo que podem ser usadas em aplicações biomédicas para tecidos duros.

Em suma, o objetivo deste trabalho de sintetizar partículas de sílica usando solventes naturais e catalisadores baseados em mecanismos biomiméticos foi atingido, sendo as poliaminas capazes de produzir partículas esféricas a pH próximo de 11, a taurina e a poli(etilenoimina) ramificada capazes de sintetizar um monólito de sílica a um pH de 5,85 e 11,33 e a poli(etilenoimina) linear sílica em forma fibrilar a um pH de 9,78.



## 5 Trabalho Futuro

Para aferir o comportamento do material no tecido biológico, seria necessário realizar os testes de hemocompatibilidade. Estes ensaios avaliariam o comportamento hemolítico do material.

Outros métodos de caracterização como o TEM seriam interessantes para avaliar mais aprofundadamente as características das partículas obtidas, nomeadamente no caso das poli(etilenoiminas) e da taurina pois não apresenta partículas esféricas, mas sim um monólito.

Seria também de interesse estudar a combinação de catalisadores para a síntese de sílica, de modo a averiguar as estruturas resultantes. Nomeadamente, a combinação da taurina com uma das poliaminas seria de especial interesse pois aproximaria o pH da reação do neutro.

O efeito do catalisador em meio biológico também tem interesse, pois é importante saber se há biocompatibilidade.

Após os testes relativos a biocompatibilidade, propõe-se estudar a incorporação de fármacos ou fatores de crescimento durante a síntese de sílica em solução aquosa, permitindo avaliar a sua degradabilidade durante a mesma.



# Referências

Abacilar M., Daus F. and Geyer A. Chemoselective silicification of synthetic peptides and polyamines. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2015, 6, 103-110

Adamson D., Dabbs D., *et al.* Non-Peptide Polymeric Silicatein  $\alpha$  Mimic for Neutral Ph Catalysis in the Formation of Silica. *Macromolecules*, 2007, 40, 5710-5717

Al-Oweini R., El-Rassy H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several  $\text{Si}(\text{OR})_4$  and  $\text{R}'\text{Si}(\text{OR}')_3$  precursors. *Journal of Molecular Structure*, 2009, 919, 140–145

Andre R., Tahir M., Natalio F. and Tremel W. Bioinspired synthesis of multifunctional inorganic and bio-organic hybrid materials. *The Federation of European Biochemical Society Journal*, 2012, 279, 1737-1749

Avnir D. and Kaufman, V. R. Alcohol is an unnecessary additive in the silicon alkoxide sol-gel process. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1987, 192,180-182

Bailey J., Mecartney M. Formation of colloidal silica particles from alkoxides. *Colloid Surfaces*, 1992, 63, 151-161

Belton D. J., V. Siddharth, Patwardhan V., Perry C. Spermine, spermidine and their analogues generate tailored silicas. *Journal of Materials Chemistry*, 2005, 15, 4629-4638

Belton D., Paine G., Patwardhan V. and Perry C. Towards an understanding of (bio)silification: the role of amino acids and lysine oligomers in silification. *Journal of Materials Chemistry*, 2014, 14, 2231-2241

Bernecker A. *et al.*, Tailored Synthetic Polyamines for Controlled Biomimetic Silica Formation. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132

Besanger T, Zhang Y, Brennan JD. Characterization of fluorescent phospholipid liposomes entrapped in sol-gel derived silica. *The journal of Physical Chemistry B*, 2002

Bogush G., Zukoski C. IV Studies of the kinetics of the precipitation of uniform silica particles through the hydrolysis and condensation of silicon alkoxides. *Journal of Colloid Interface Science* 1991, 142, 1-18

Bogush G., Zukoski C. IV Uniform silica particle precipitation: An aggregative growth model. *Journal of Colloid Interface Science*, 142, 19-33

Braun S., Rappoport S., Zusman R., Avnir D., Ottolenghi M. Biochemically active sol-gel glasses – the trapping of enzymes, *Mater Lett* 1990, 10, 1–5

Bridoux M., Ingalls A., Structural identification of long-chain polyamines associated with diatom biosilica in a Southern Ocean sediment core, *Geochimica et Cosmochimica*, 2010, 74, 4044-4057

Brinker C. J. Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1998, 100, 31-50

Brinker C. J. and Scherer G. W. *Sol-Gel Science: The Physics of Sol-Gel Processing*. Academic Press, Inc. 1990, 1<sup>st</sup> Edition

Cha N. J., Shimizu K., Morse D. et al., Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones *in vitro*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96, 361-365

Che M., Mori K., Yamashita H., Elaboration, characterization and properties of silica-based single-site heterogeneous photocatalysts, *Proceedings of The Royal Society A*, 2012, 468, 2113-

Ciang Y., Lian H., Leo S., Wang S., Yamauchi Y., Wu K., Controlling particle size and structural properties of mesoporous silica nanoparticles using the Taguchi method. *The journal of Physical Chemistry C*, 2011, 115

Coradin T., Coupe A., Livage J. Interactions of bovine serum albumin and lysozyme with sodium silicate solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 29, 189-196

Coradin T., Boissiere M., Livage J., *Sol-gel Chemistry in Medical Science*, *Current Medicinal Chemistry*, 2006

Corma A., Cabañas M., Moliner M. and Rodríguez G. Synthesis of micro- and mesoporous molecular sieves at room temperature and neutral pH catalyzed by functional analogues of silicatein. *Chemical Communications*, 2006, 3137-3139

C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli and J. S. Beck. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism, *Nature*, 1992, 359, 710-712

Flory P. J. Molecular size distribution in linear condensation polymers. *Journal of American Chemical Society*, 1936, 58, 1877-1885

Graham T. *On the Properties of Silicic Acid and other Analogous Colloidal Substances*, 1864

Green D., Walsh D., Mann S. and Oreffo R. The Potential of Biomimesis in Bone Tissue Engineering: Lessons From the Design and Synthesis of Invertebrate Skeletons, 2002, 30, 810-815

Grumezescu A. M. *et al.* Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials. Elsevier Inc., 2016

Jackson E., et al. Protein-Templated Biomimetic Silica Nanoparticles, American Chemical Society Publications, 2015

Jin R., Yuan J. Fibrous Crystalline Hydrogels Formed from Polymers Possessing A Linear Poly(ethyleneimine) Backbone. Langmuir 2005a, 21, 3136-3145

Jin R., Yuan J. Synthesis of poly(ethyleneimine)s-silica hybrid particles with complex shapes and hierarchical structures. The Royal Society of Chemistry, 2005b, 1399-1401

Jin R., Yuan J. Simple Synthesis of Hierarchically Structured Silicas by Poly(ethyleneimine) Aggregates Pre-Organized by Media Modulation. Macromolecular Chemistry and Physics, 2005c, 206, 2160-2170

Jin R., Yuan J. One-Pot and Rapid Synthesis of Uniformed Silica Spheres via Mediation of Linear Poly(ethyleneimine)s and Dyes. Polymer Journal, 2007, 39, 822-827

Jin R., Yuan J. Learning from Biosilica: Nanostructured Silicas and Their Coatings on Substrates by Programmable Approaches, Advances in Biomimetics, Prof. Marko Cavrak (Ed.), InTech, 2011

Jin Ren-Hua, Yao Dong-Dong and Levi Rumi. Biomimetic Synthesis of Shaped and Chiral Silica Entities Templated by Organic Objective Materials. Chemistry A European Journal, 2014, 20, 7196-7214

Kröger N. *et al.* Characterization of a 200-kDa Diatom Protein that is Specifically Associated with a Silica-Based Substructure of the Cell Wall, European Journal of Biochemistry, 1997, 250, 99-105

Kröger N. *et al.* Species-specific Polyamines from Diatoms Control Silica Morphology, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 92, 14133-14138

LaMer V. K., Dinegar R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodisperse hydrosols. Journal of American Chemical Society, 1950, 72, 4847-4854

Lechner C., Becker C., Sillafins in Silica Biomineralization and Biomimetic Silica Precipitation. Marine Drugs, 2015, 13, 5297-5333

Li Z. *et al.* Mesoporous silica narticles in biomedical applications. Chemical Society Reviews, 2012, 41, 2590-2605

Liang RP, Qiu HD, Cai PX. A novel amperometric immunosensor based on three-dimensional sol-gel network and nanoparticle self-assemble technique. Analytica Chimica Acta 2005

Livage J., Coradin T. and Roux C. Encapsulation of biomolecules in silica gels. Journal of Physics: Condensed Matter, 2001, 13, 673-691

- Livage J. and Nassif N., From diatoms to silica-based biohybrids. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 849-859
- Mann Stephen, Biom mineralization and Biomimetic Materials Chemistry, *Journal of Materials Chemistry*, 1995, 5, 935-946
- Matsoukas T., Gulari E. Dynamics of growth of silica particles from ammonia-catalyzed hydrolysis of tetra-ethyl-orthosilicate. *Journal of Colloid Interface Science*, 1988, 124, 252-261
- Menzel H. et al., Chemical properties of polyamines with relevance to the biom mineralization of silica. *Chemical Communication*, 2003, 2994-2995
- Mizutani T., Nagase H., Fujiwara N., Ogoshi H., Silicid acid polymerization catalyzed by amines and polyamines. *The Chemical Society of Japan Journal*, 1998, 71, 2017-2022
- Morse D., Silicon biotechnology: harness biological silica production to construct new materials. *Tibtech*, 1999, 17, 230-232
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=16402 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16402> (accessed Mar. 3, 2017).
- Neville F. *et al.* Fabrication and Activity of Silicate Nanoparticles and Nanosilicate-Entrapped Enzymes Using Polyethyleneimine As a Biomimetic Polymer. *Langmuir*, 2011, 27, 279-285
- Neville F., Seyfaee A. Real-Time Monitoring of *in situ* Polyethyleneimine-Silica Particle Formation. *American Chemical Society Publications, Langmuir*, 2013, 29, 14681-14690
- Ostwald, W. Studien über die Bildung und Umwandlung fester Körper. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 1897, 22, 289-330
- Owens G. J., Singh R. K., Foroutan F. *et al.* Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 2016, 77, 1-19
- Park J., Lakes R. S., *Introduction in Biomaterials – An Introduction*, Springer, 3rd Edition, New York, 2007
- Patwardhan Siddharth, Biomimetic and bioinspired silica: recent developments and applications, *Chemical Communication*, 2011, 47, 7567-7582
- Rahaman Mohamed *et al.* Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7 2355-2373

- Rawle F. Alan, The Basic Principles of Particle Size Analysis, Webinar, Malvern Instruments Inc.
- Reetz MT, Zonta A, Simpelkamp J. Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials. *Angewandte Chemie International Edition* 1995
- Roth K. M. *et al.* Bifunctional small molecules are biomimetic catalysts for silica synthesis at neutral pH. *Journal of American Chemical Society*, 2005, 127, 325-330
- Schröder. H. C. *et al.*, Silicateins, silicase and spicule-associated proteins: synthesis of demosponge silica skeleton and nanobiotechnological applications. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*, 2007, 581-592.
- Schröder. H. C. *et al.*, Biofabrication of biosilica-glass by living organisms, *Natural Product Reports*, 2008, 25, 455-474
- Severn J. R., Chadwick J.C., *Tailor-made Polymers: Via Immobilization of Alpha-Olefin Polymerization Catalysts*, 1<sup>st</sup> Edition, February 2008.
- Shadjou N., Hsanzadeh M. Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials: Recent progress. *Materials Science and Engineering*, 2015, 55, 401-409
- Stöber W. *et al.* Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of colloid and interface science*, 1968 26, 62-69
- Stockmayer W. H. Theory of molecular size distributions and gel formation in branched-chain polymers. *Journal of Chemical Physics*, 1943, 11, 45-55
- Sumper M., Kröger N. Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14, 2059-2065
- Vallet-Regí M., Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering. *Chemistry, A European Journal*, 2006, 12, 5934-5943
- Vallet-Regí M., Balas F., Arcos D., Mesoporous materials for drug delivery, *Angewandte. Chemie International Edition*, 2007, 46, 7548 – 7558.
- Vrieling E., Sun Q., Hazelaar S., Sommerdijk N. *et al.* Controlled Silica Synthesis Inspired by Diatom Silicon Biomineralization. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2005, 5, 68-78
- Voronkov M. G., *et al.* The siloxane bond. Consultants Bureau, New York, 1978
- Wang X., Schröder H.C., *et al.* Genetic, biological and structural hierarchies during sponge spicule formation: from soft sol-gels to solid 3D silica composite structures. *Soft Matter*, 2012, 8, 9501
- Wu S., Lin H., Mou C., Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42, 3862-3875

Yao D., Kubosawa H., Souma D., Jin R. Shaped crystalline aggregates of comb-like polyethyleneimine for biomimetic synthesis of inorganic silica materials. *Polymer*, 2016, 86, 120-128

Yuan J., Zhu P., Fukazawa N. and Jin R. Synthesis of Nanofiber-Based Silica Networks Mediated by Organized Poly(ethylene imine): Structure, Properties, and Mechanism. *Advanced Functional Materials*, 2006, 16, 2205-2212

Zhang Y., *et al.* Protamine-templated Biomimetic Hybrid Capsules: Efficient and Stable Carrier for Enzyme Encapsulation. *Chemistry of Materials*, 2008, 20, 1041-1048

Zuluaga-Hernández E., B. Hoyos. Effect of cationic polyelectrolytes addition in cement cohesion. *DYNA*, 2014, 81, 222-228





# Dados Suplementares

## Apêndice I

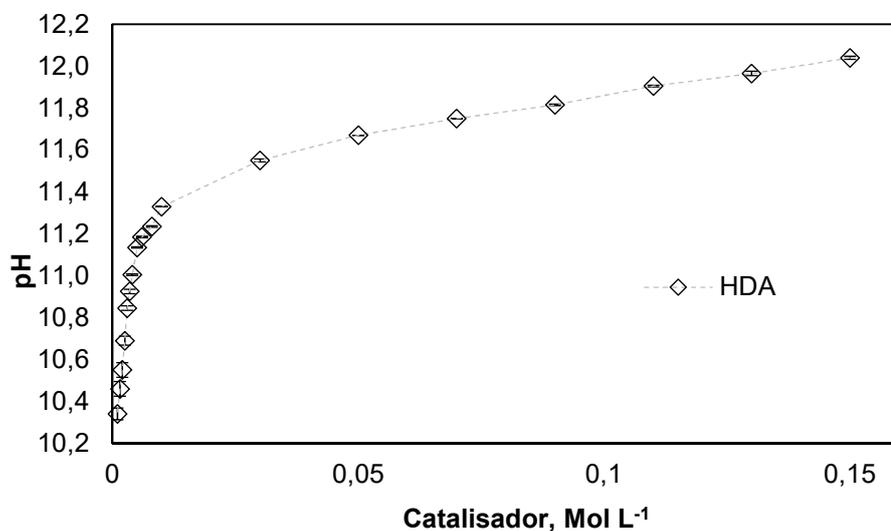


Gráfico A1 - Curva de Titulação da HDA em Solução Aquosa

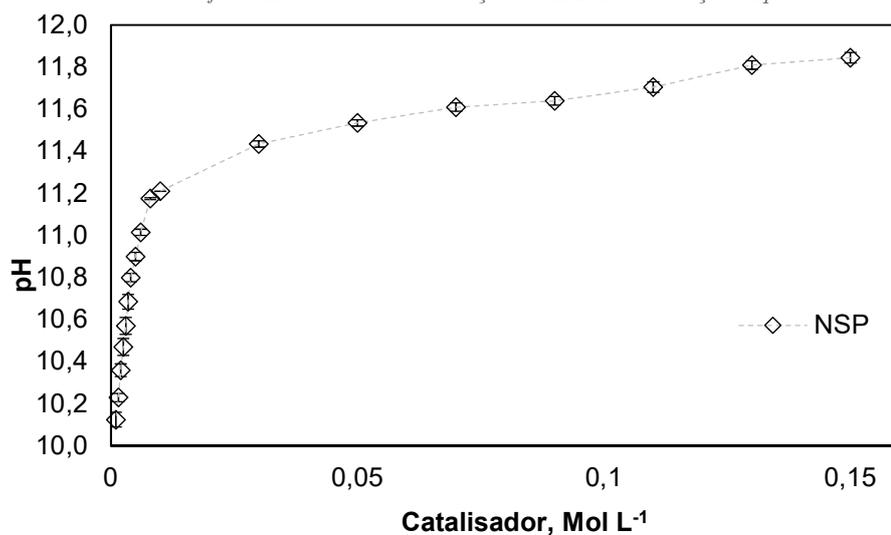


Gráfico A2 - Curva de Titulação da NSP em Solução Aquosa

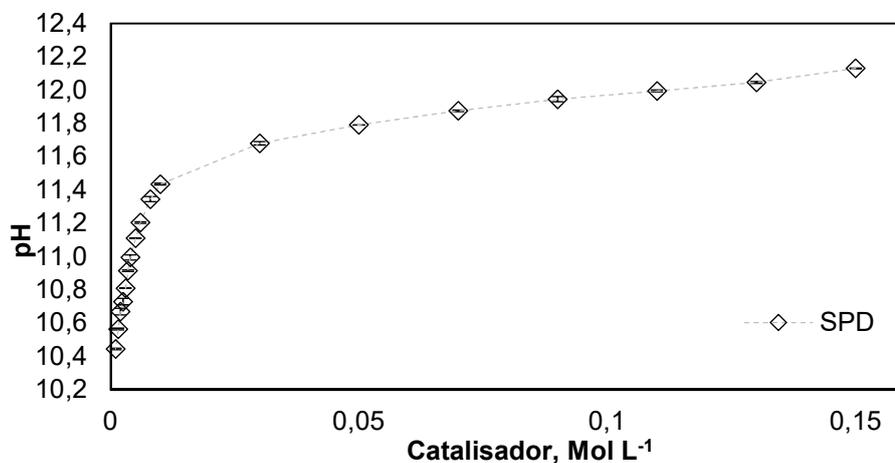


Gráfico A3 - Curva de Titulação da SPD em Solução Aquosa

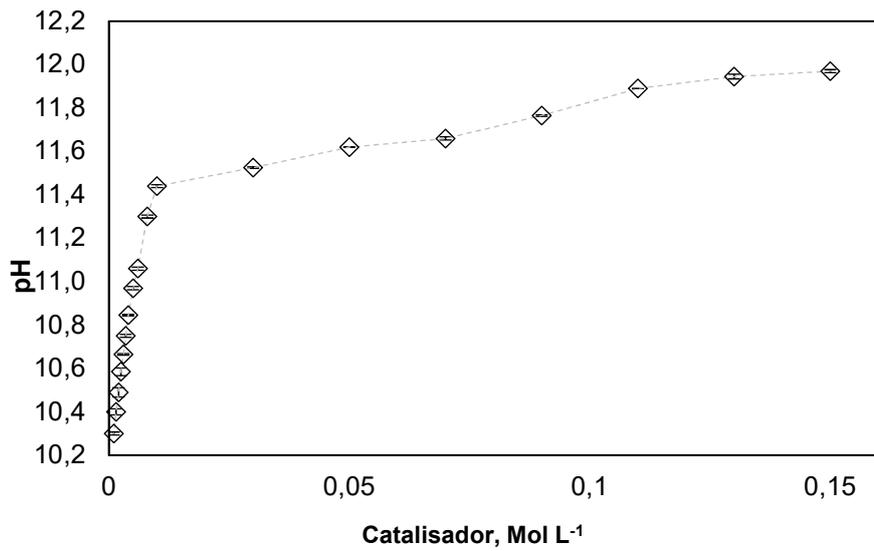


Gráfico A4- Curva de Titulação da SPN em Solução Aquosa

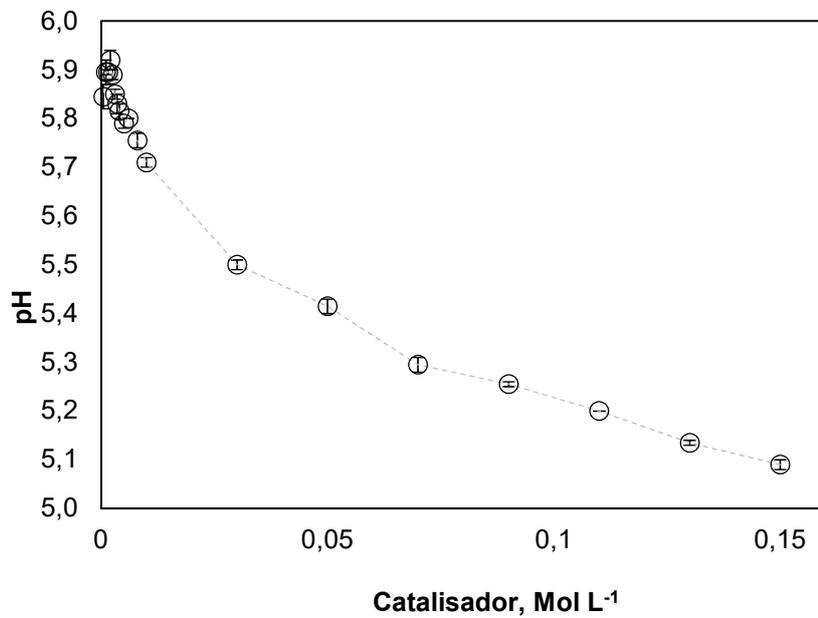


Gráfico A5- Curva de Titulação da TAU em Solução Aquosa

## Apêndice II

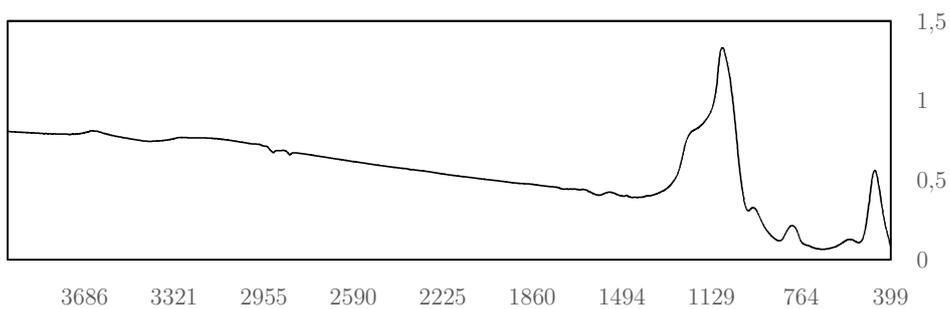


Gráfico B1 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de HDA, não calcinada

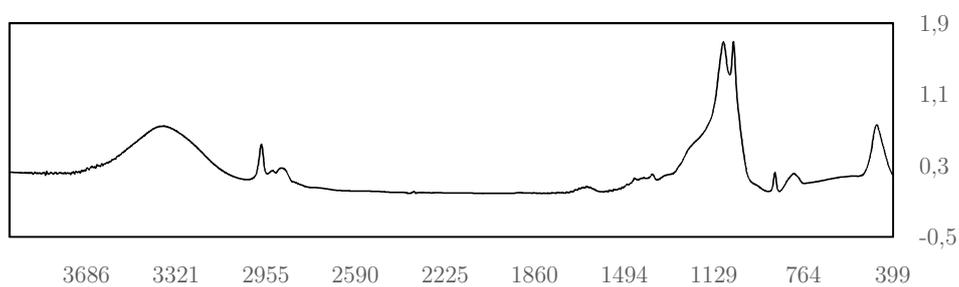


Gráfico B2 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de HDA, calcinada

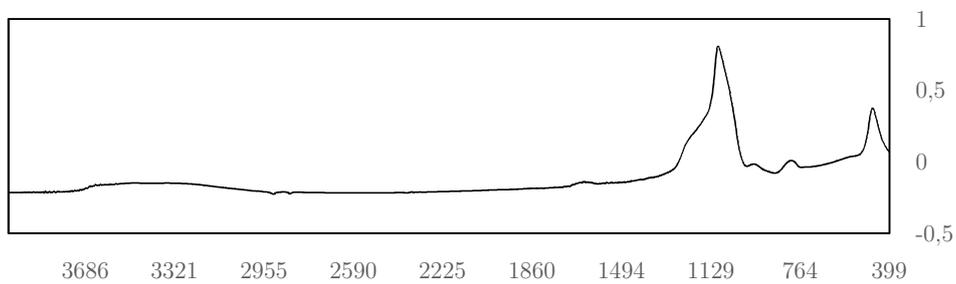


Gráfico B3 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de NSP, não calcinada

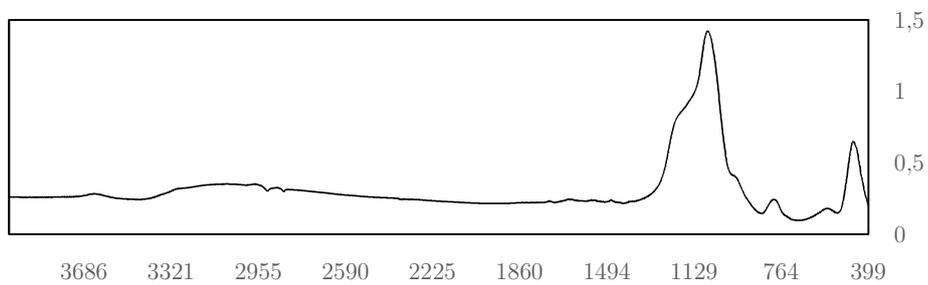


Gráfico B4 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de NSP, calcinada

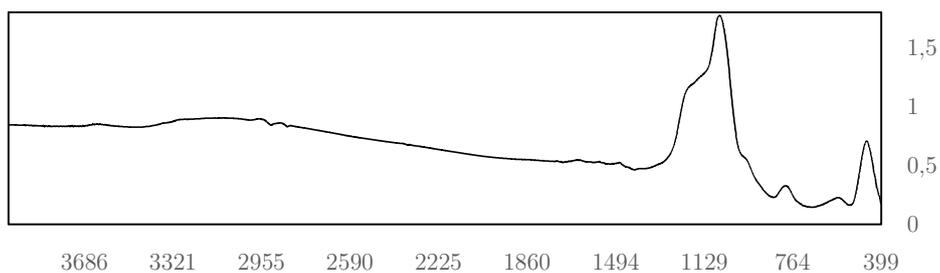


Gráfico B5 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de SPN, não calcinada

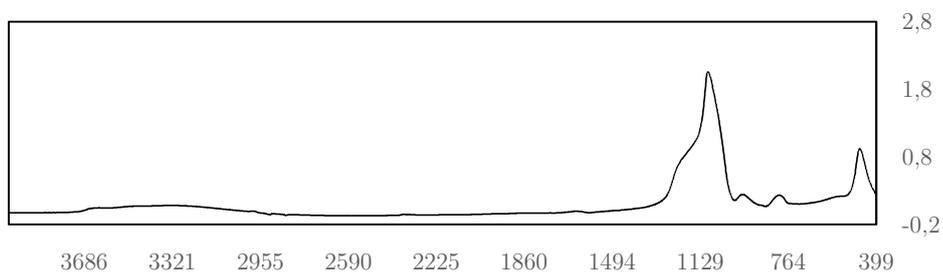


Gráfico B6 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de SPN, calcinada

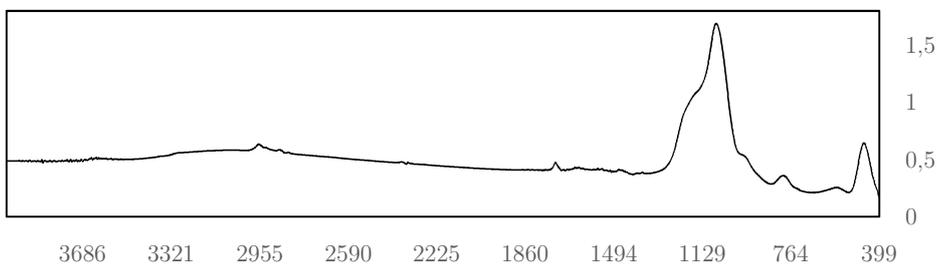


Gráfico B7 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de SPD, não calcinada

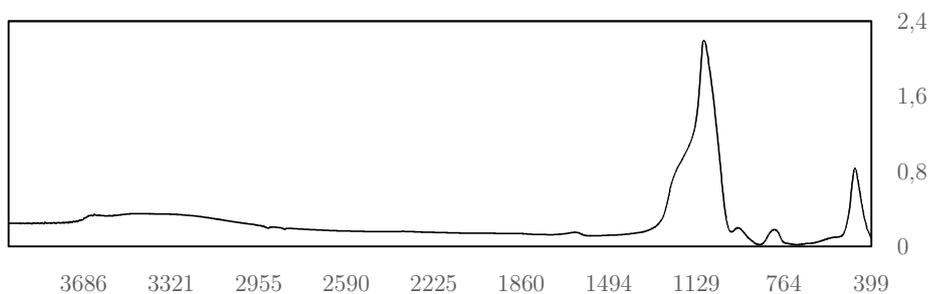


Gráfico B8 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de SPD, calcinada

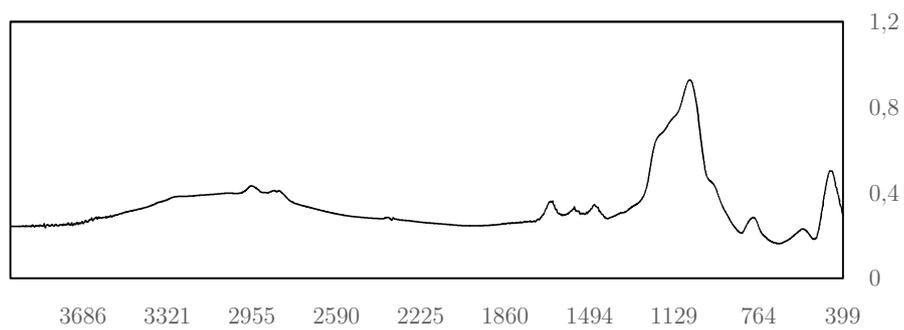


Gráfico B9 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de PEI branched, não calcinada

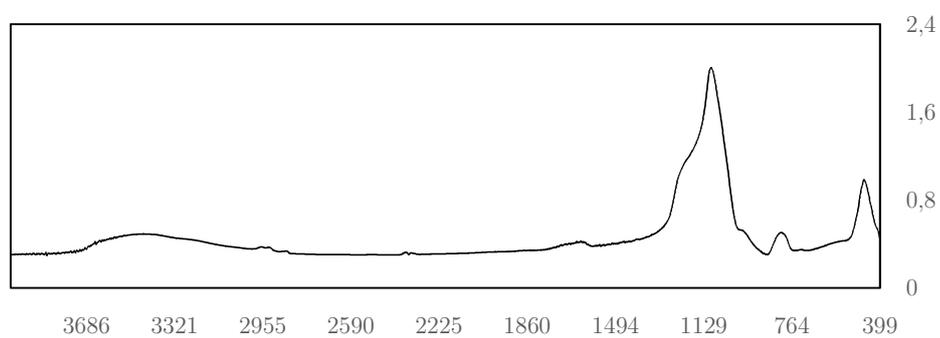
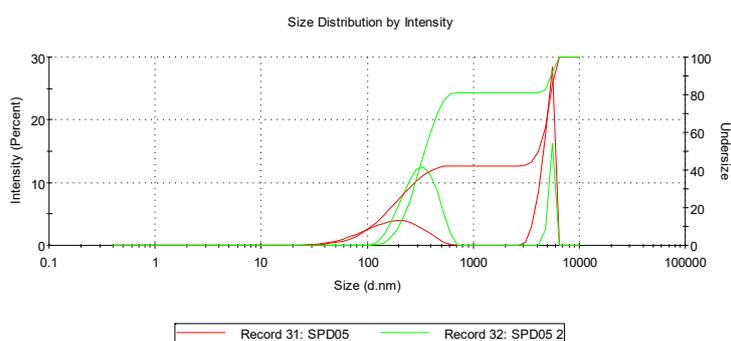
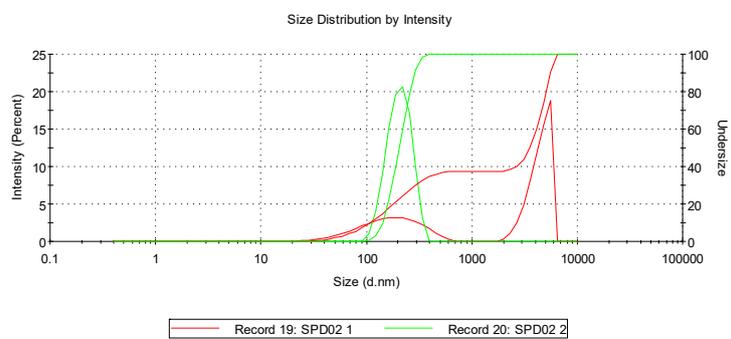
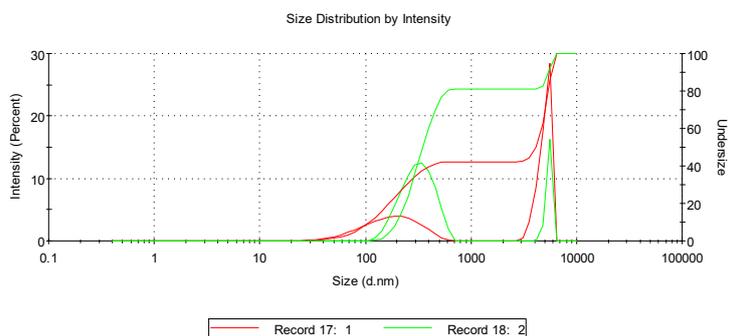


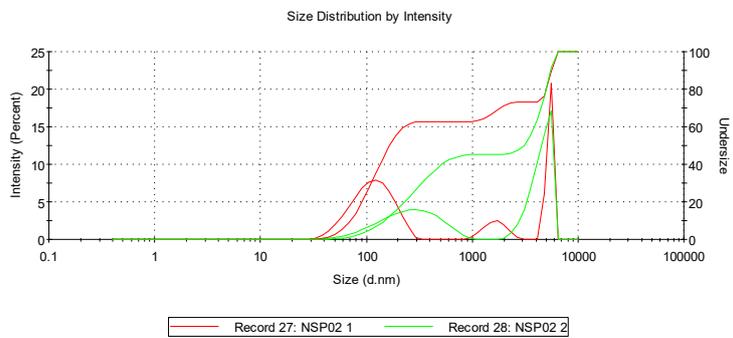
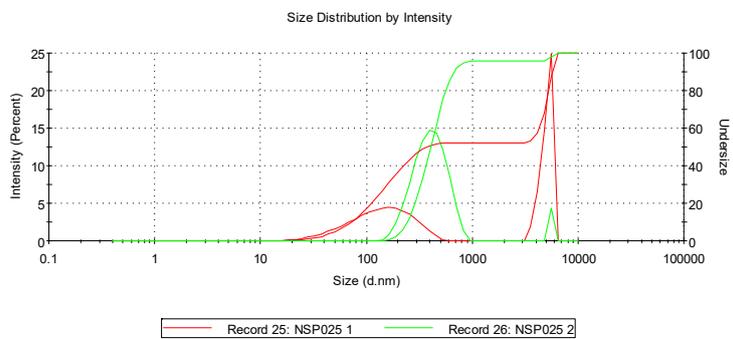
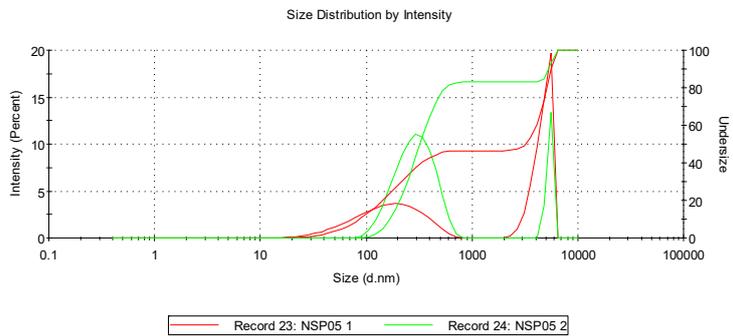
Gráfico B10 – Espectro de FTIR da sílica sintetizada a partir de PEI branched, calcinada



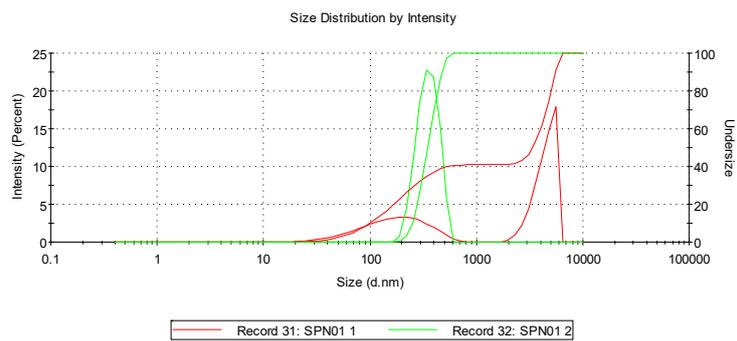
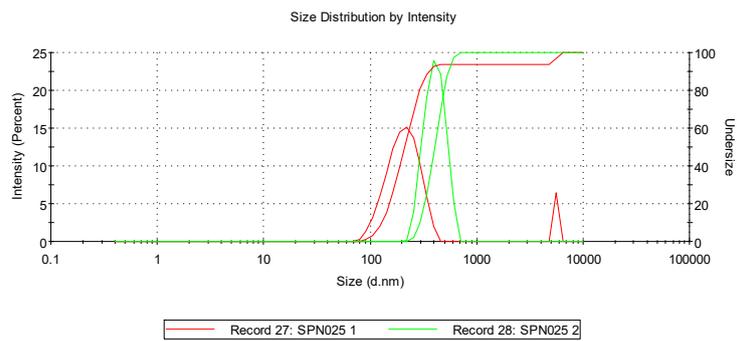
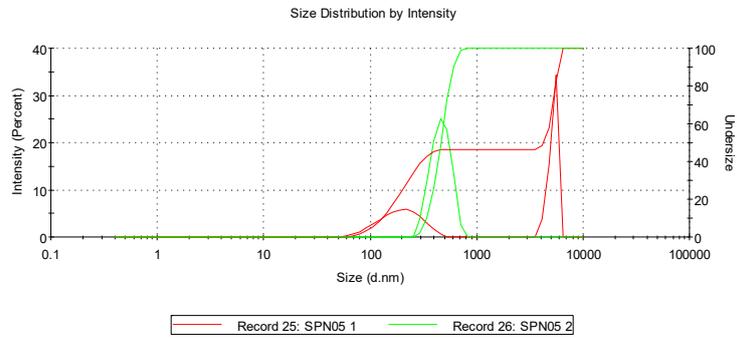
## Apêndice III



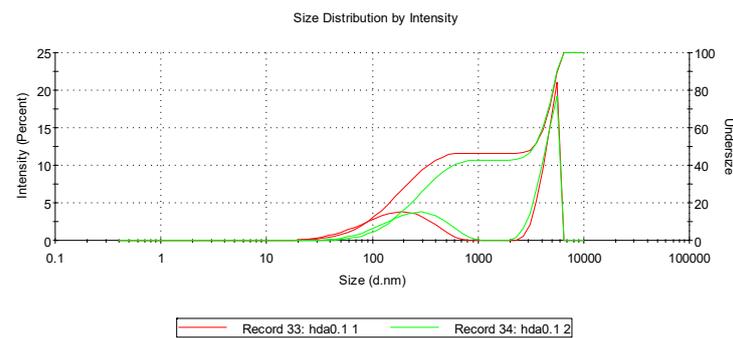
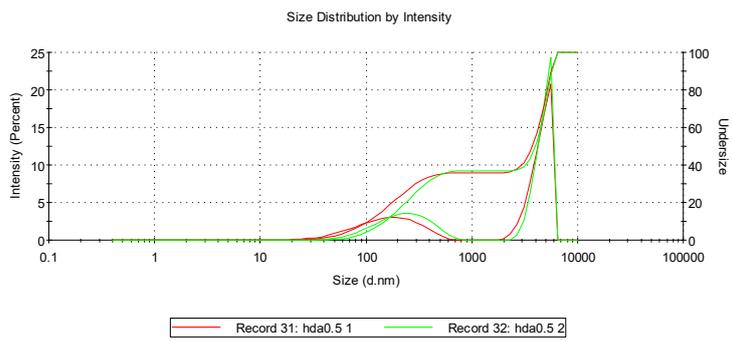
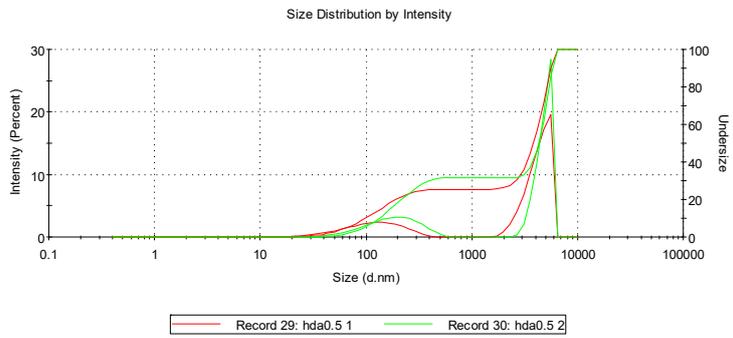
Gráficos C1 – C3 – Gráficos do DLS a amostras de sílica sintetizada a partir da SPD, calcinada



Gráficos C4 – C6 – Gráficos do DLS a amostras de sílica sintetizada a partir da NSP, calcinada



Gráficos C7 – C9 – Gráficos do DLS a amostras de sílica sintetizada a partir da SPN, calcinada



Gráficos C10 – C13 – Gráficos do DLS a amostras de sílica sintetizada a partir da HDA, calcinada

## Apêndice IV

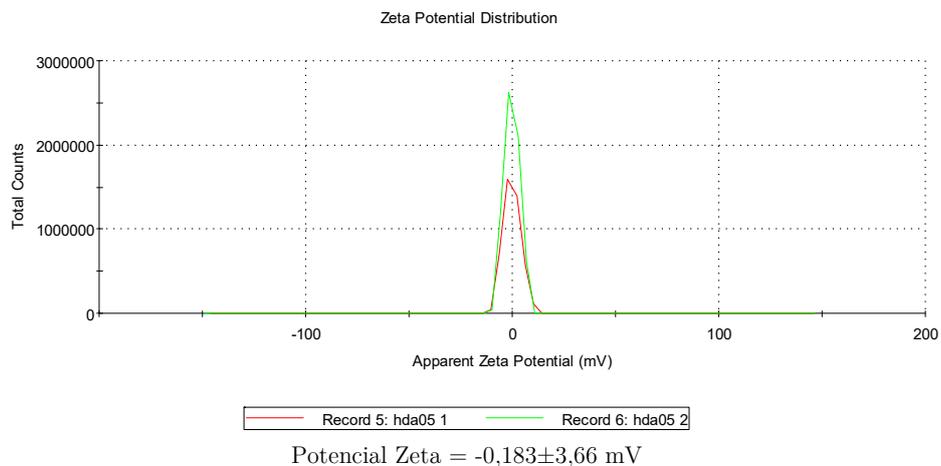


Gráfico D1 – Gráfico do resultado de potencial zeta realizado a sílica calcinada a partir da HDA

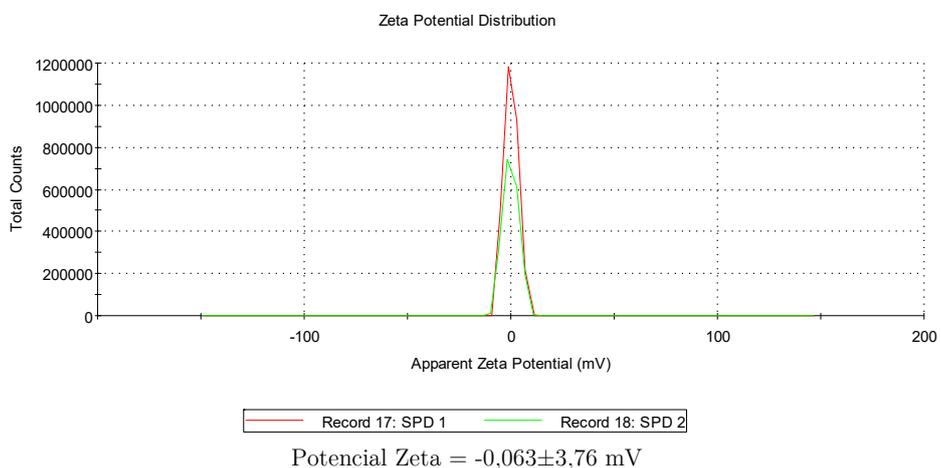


Gráfico D2 – Gráfico do resultado de potencial zeta realizado a sílica calcinada a partir da espermidina

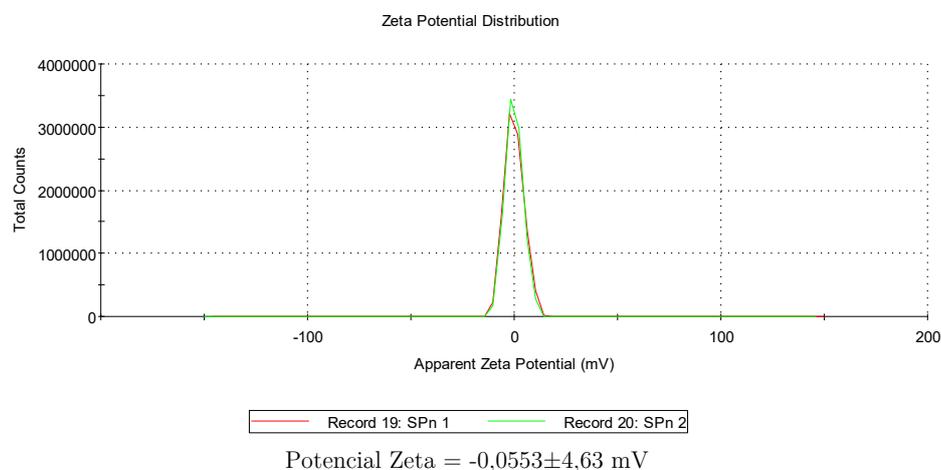
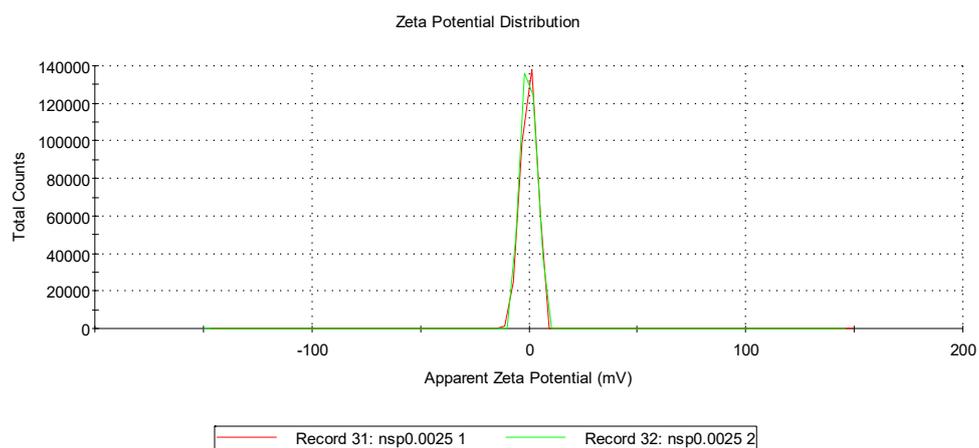
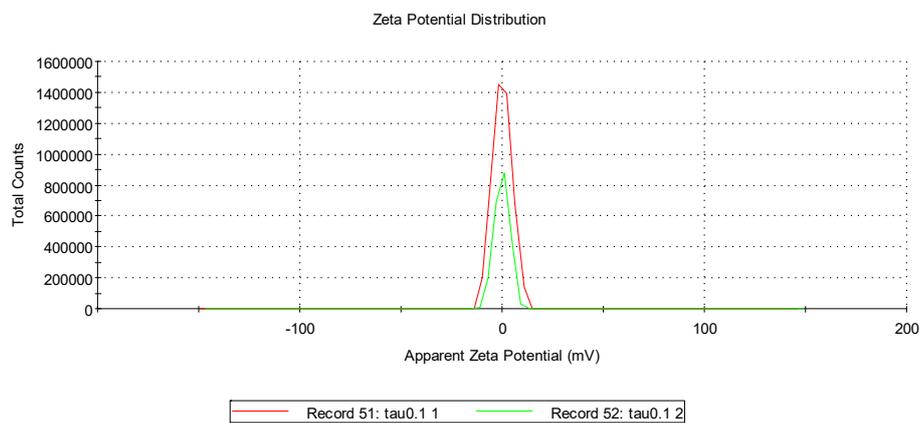


Gráfico D3 – Gráfico do resultado de potencial zeta realizado a sílica calcinada a partir da espermina



Potencial Zeta =  $-0,118 \pm 3,55$  mV

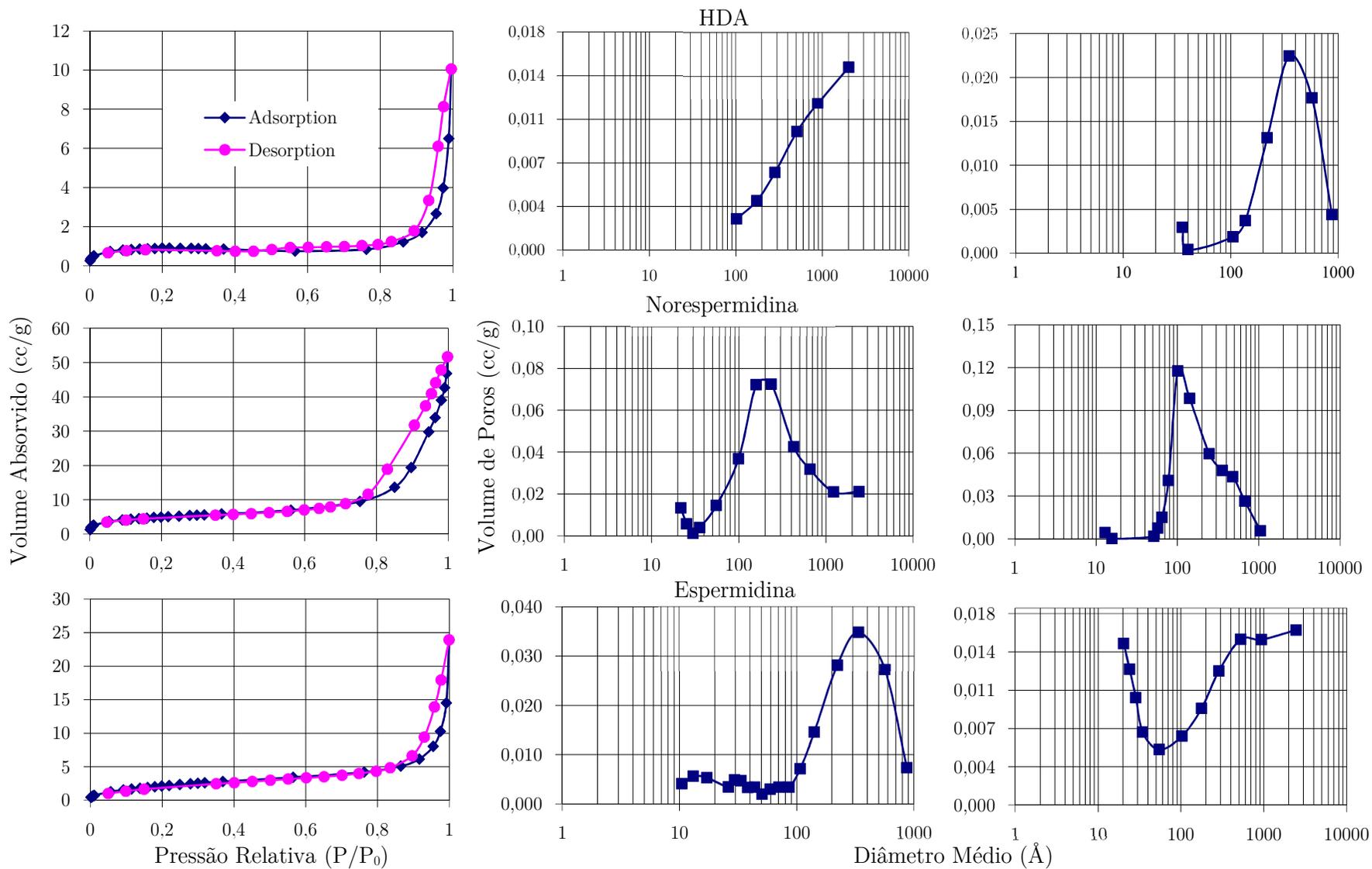
*Gráfico D4 – Gráfico do resultado de potencial zeta realizado a sílica calcinada a partir da norespermidina*

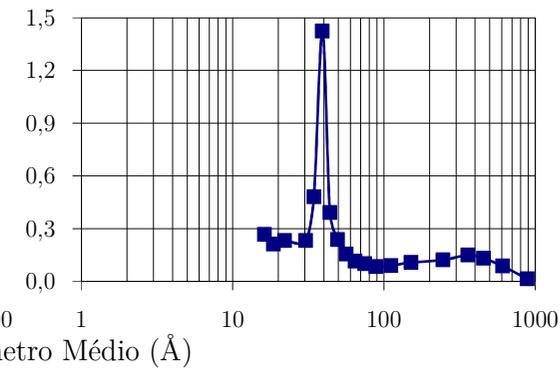
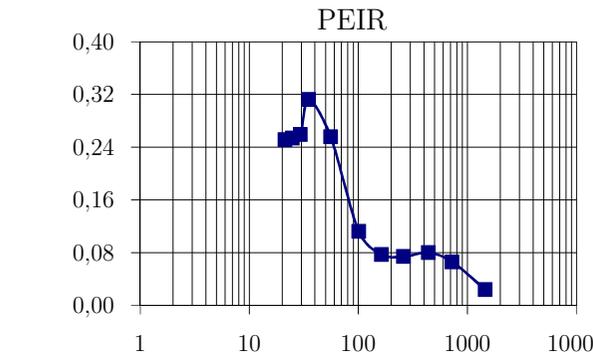
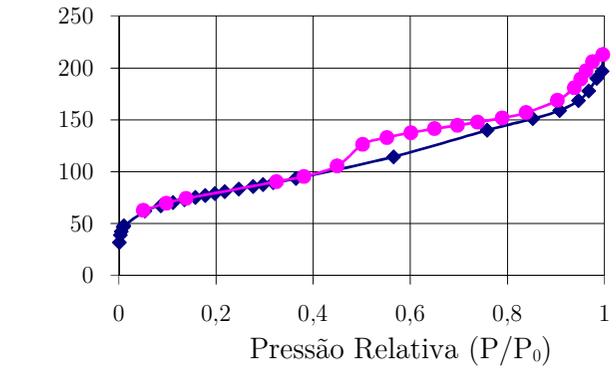
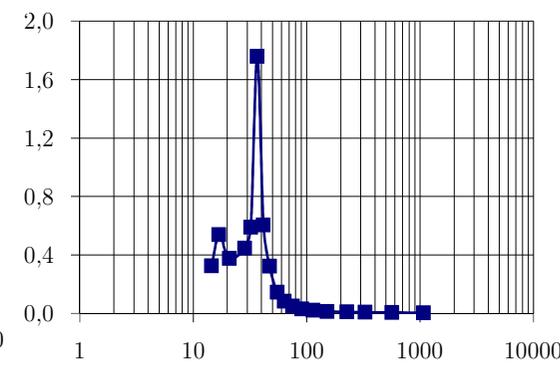
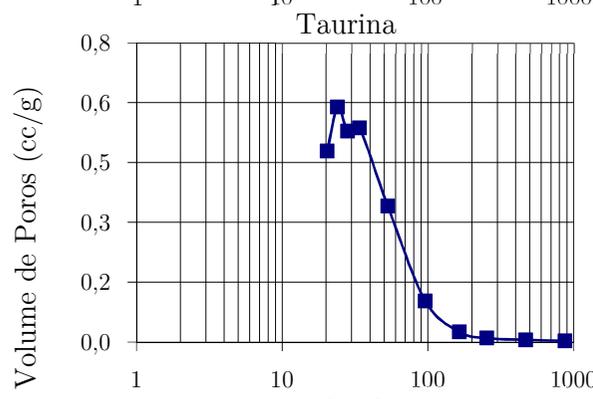
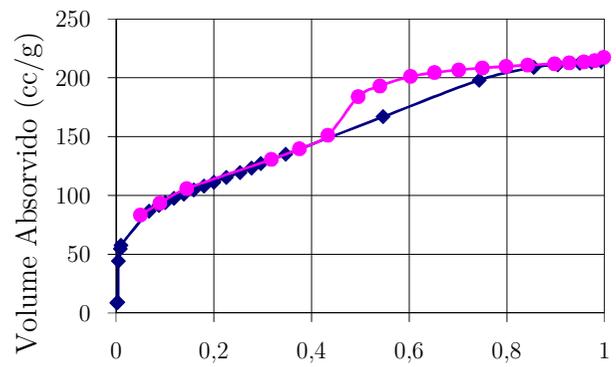
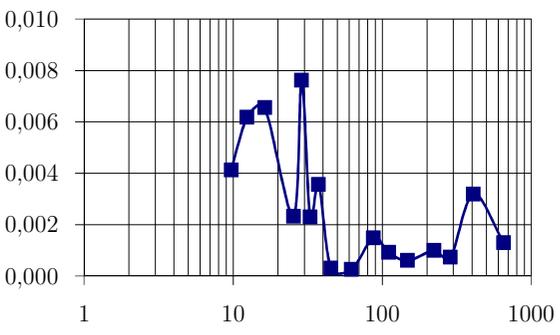
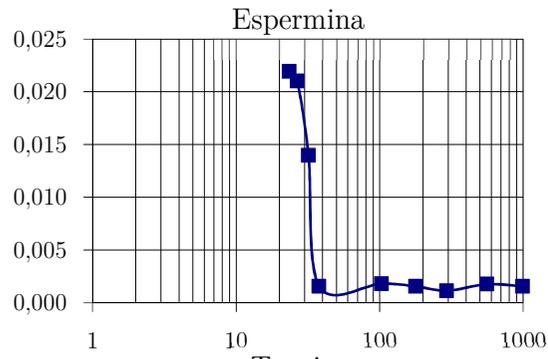
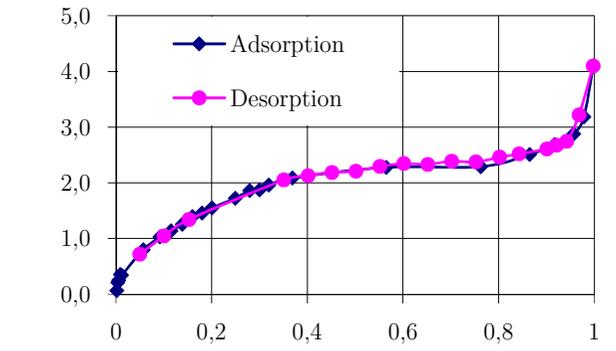


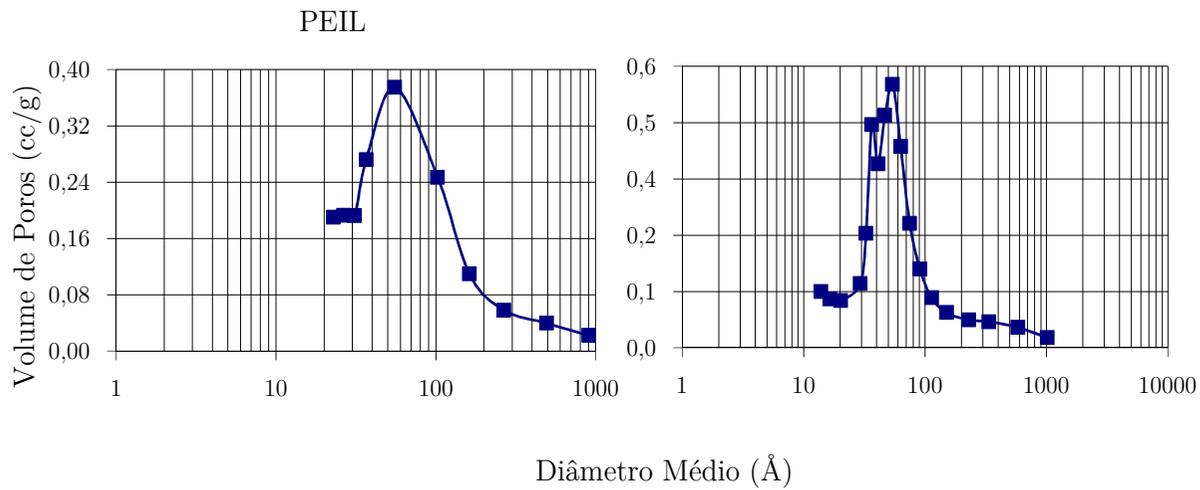
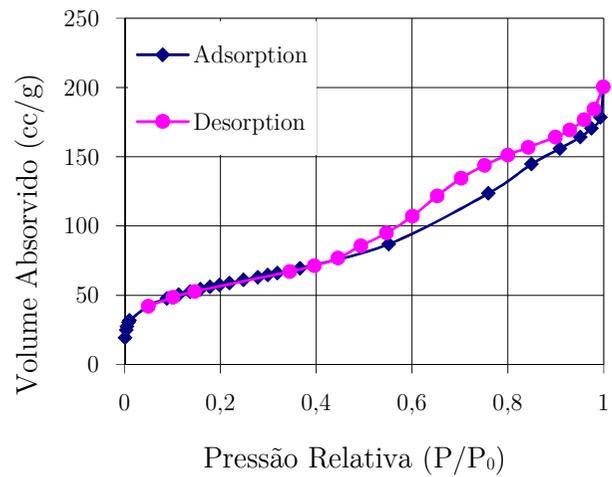
Potencial Zeta =  $-0,0146 \pm 3,81$  mV

*Gráfico D5 – Gráfico do resultado de potencial zeta realizado a sílica calcinada a partir da taurina*

Apêndice V – Gráficos obtidos através da adsorção de Azoto para as várias amostras de sílica calcinada



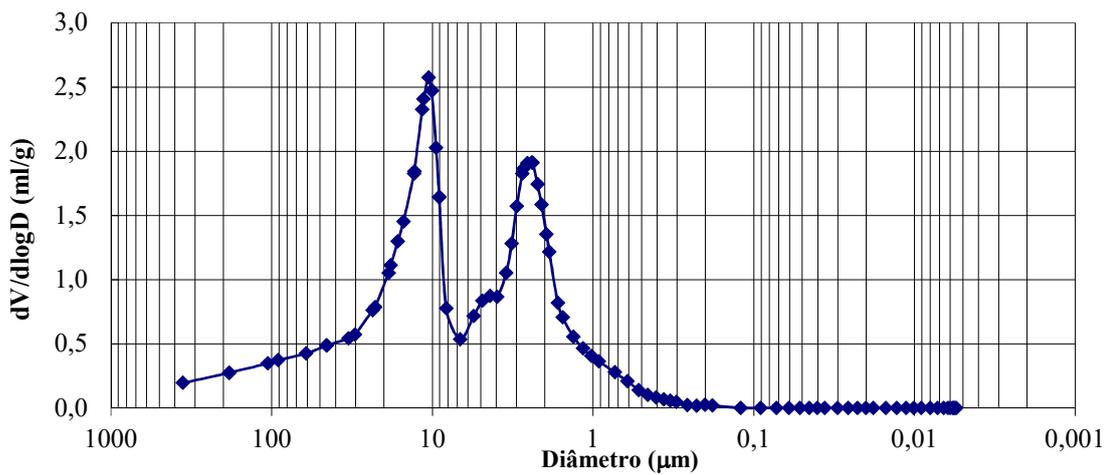
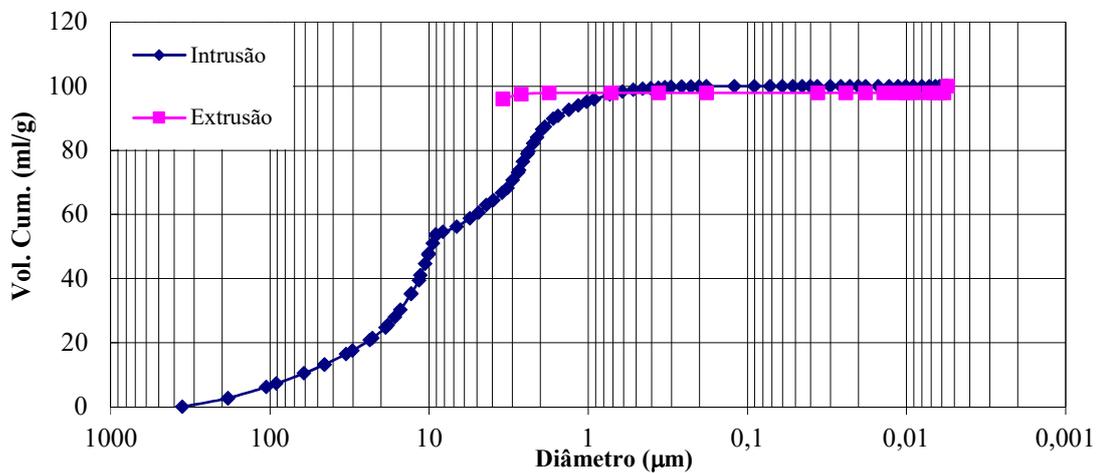




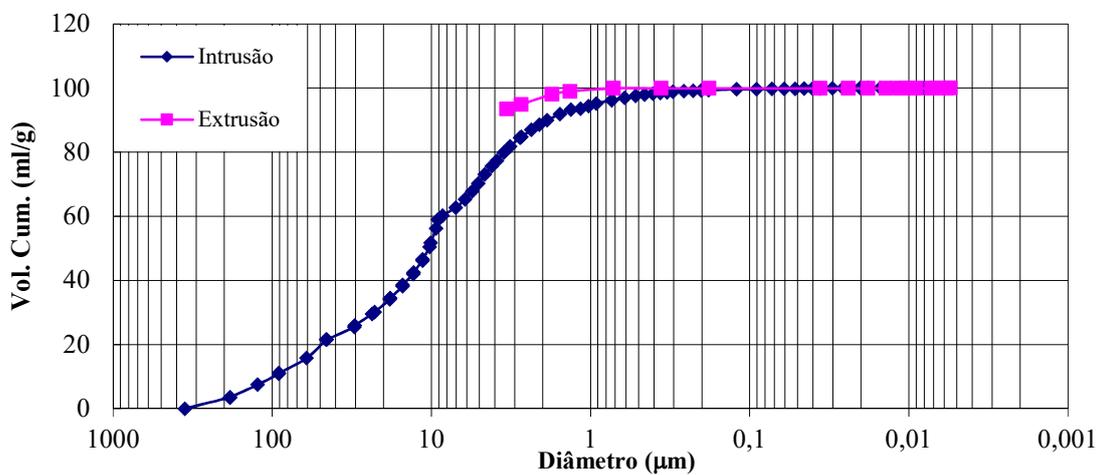


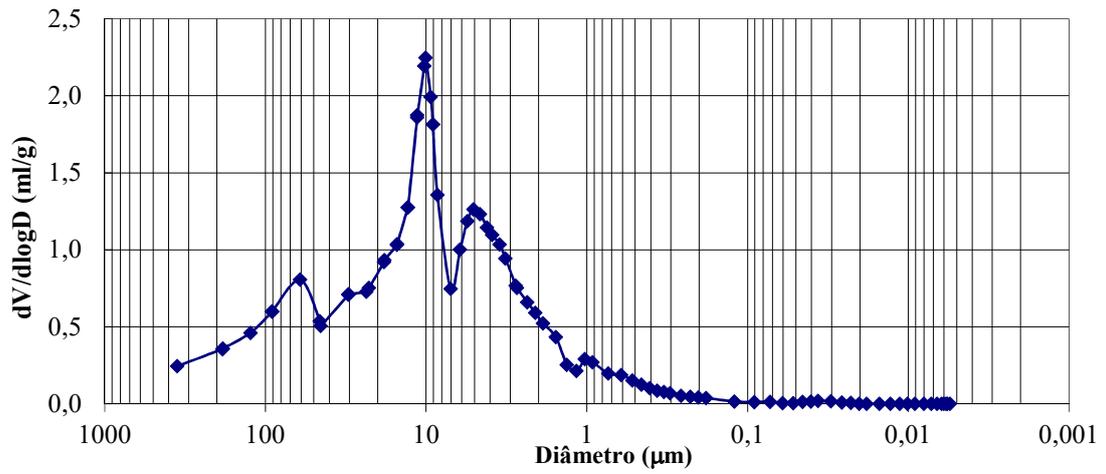
# Apêndice VI – Gráficos obtidos através da porosimetria por intrusão de mercúrio

HDA

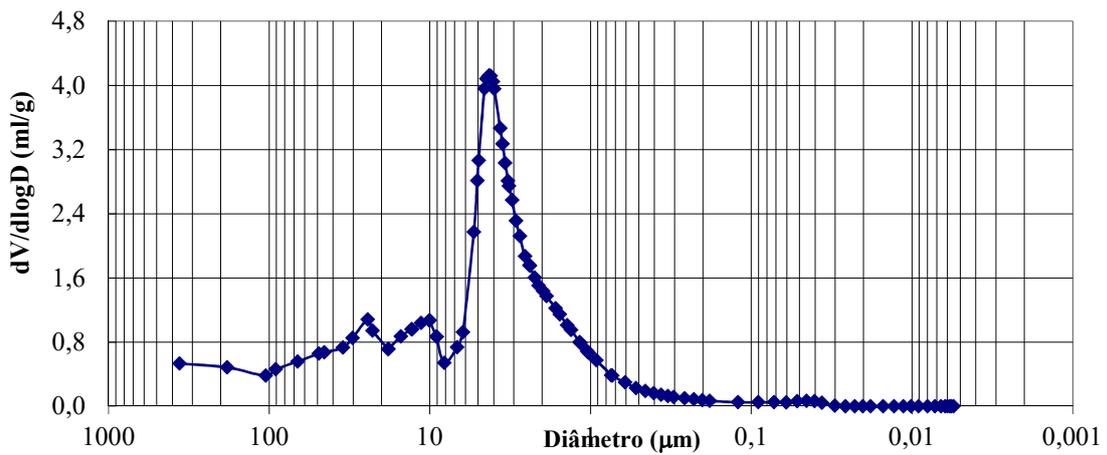
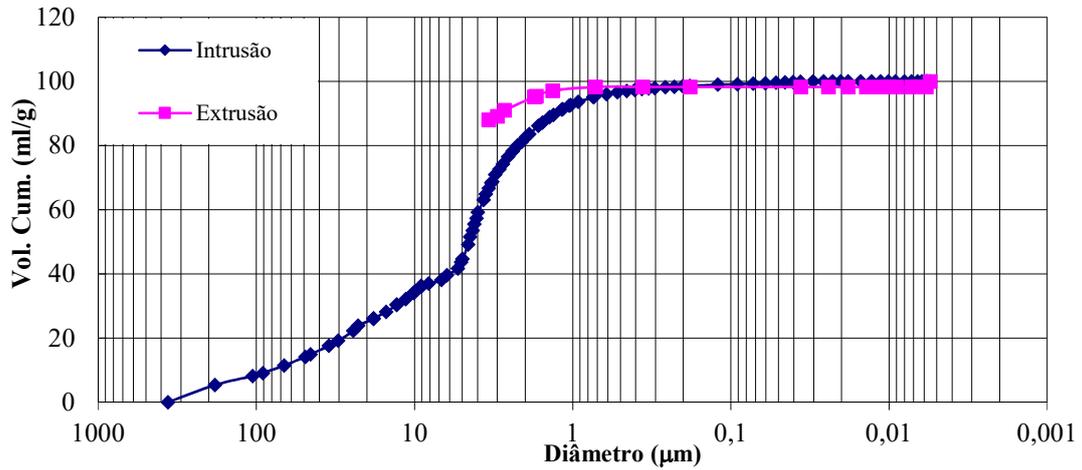


Norespermidina

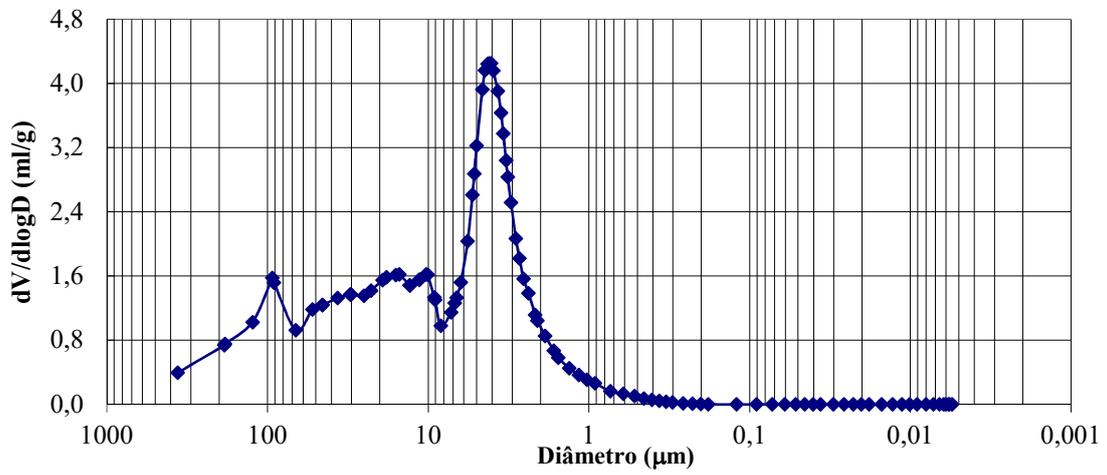
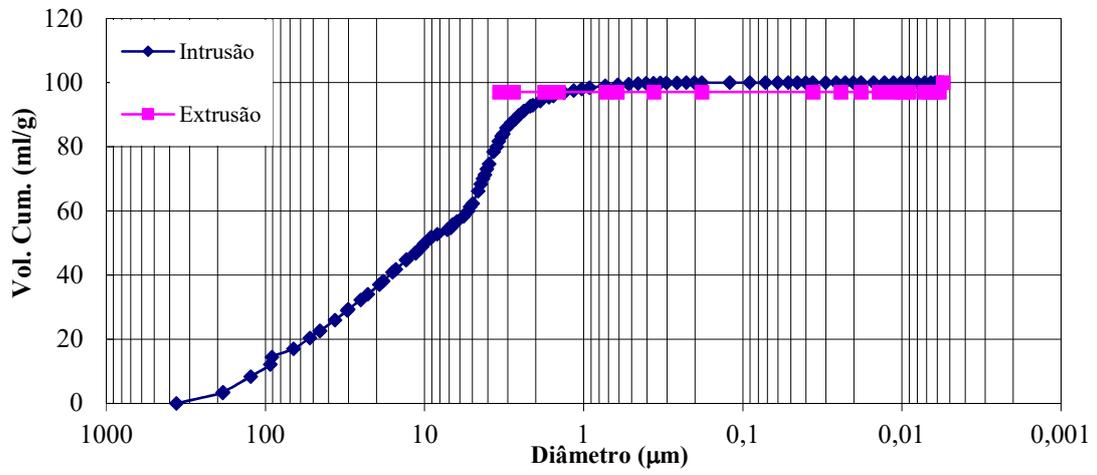




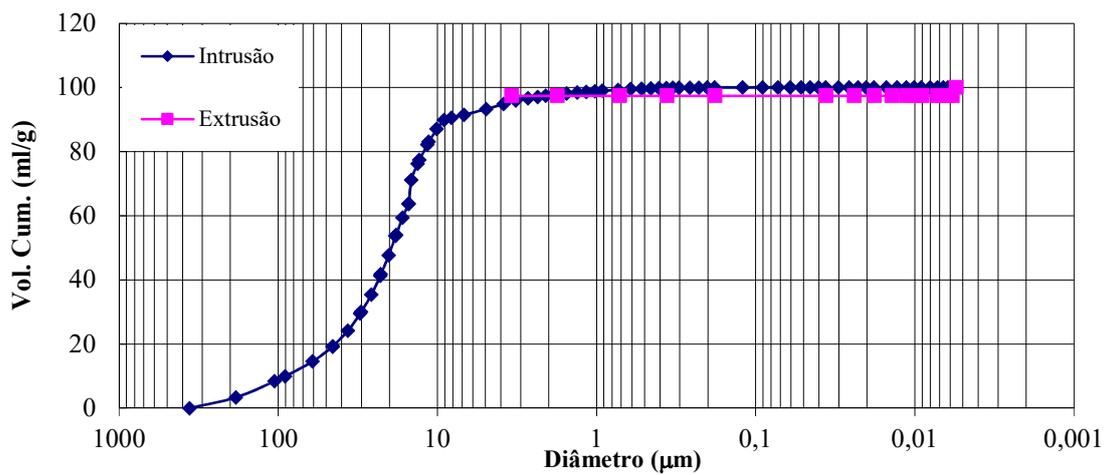
Espermidina

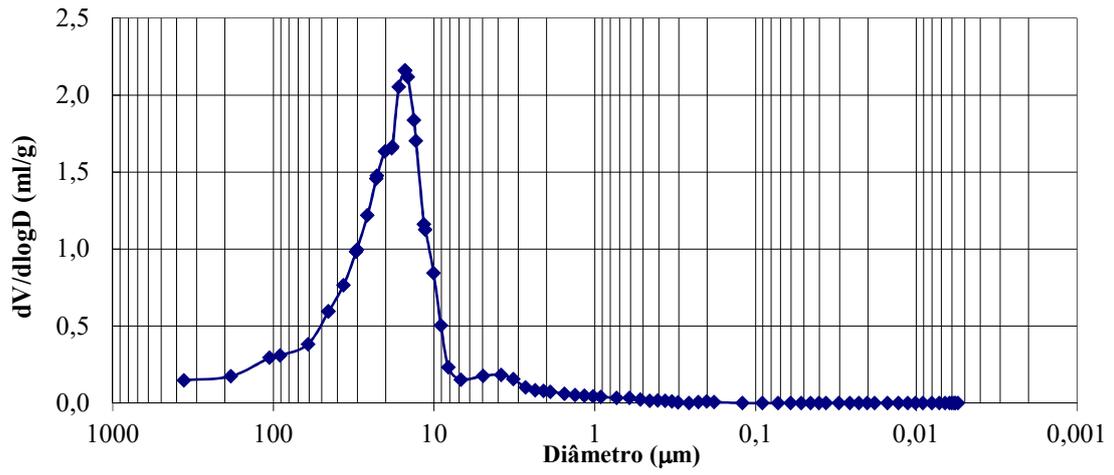


### Espermina

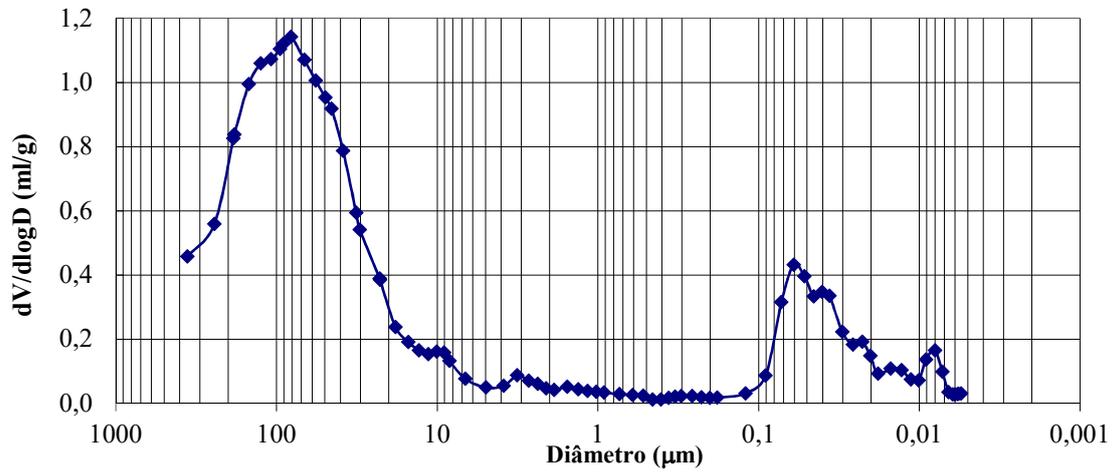
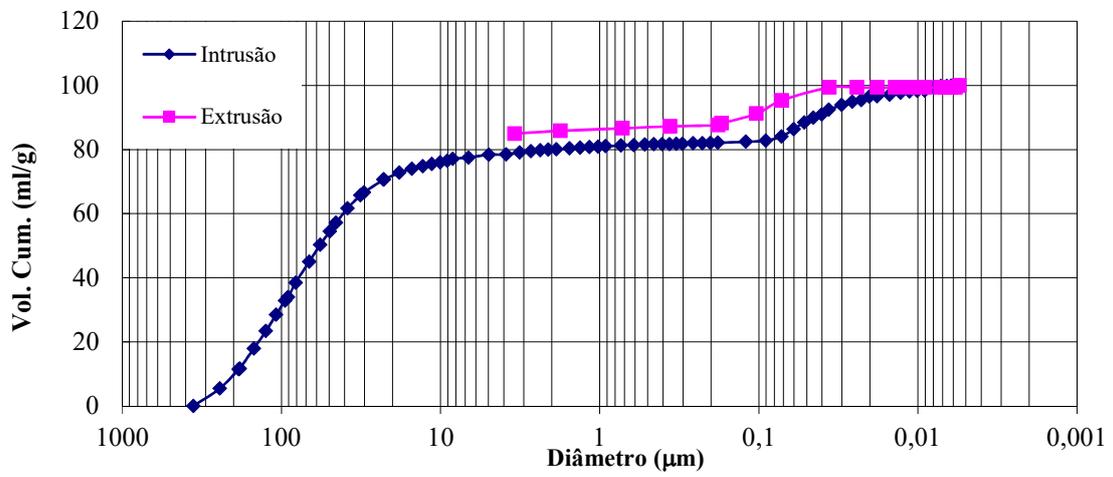


### Taurina





PEIR



PE

