



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**ENGENHARIA DE MATERIAIS**



**DISSERTAÇÃO**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS A PARTIR DA**  
**SILANIZAÇÃO DA MAGNETITA VISANDO A IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE**  
**OXIDASE (GOX)**

Tatiana Clementino Pinto Toscano de França

CAMPINA GRANDE/ PB

2013

**Preparação e caracterização de híbridos a partir da silanização da magnetita visando a imobilização da glicose oxidase (GOX)**

**Tatiana Clementino Pinto Toscano de França**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa**

CAMPINA GRANDE/ PB

2013



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCEG

F814p

França, Tatiana Clementino Pinto Toscano de.

Preparação e caracterização de híbridos a partir da silanização da magnetita visando a imobilização da glicose oxidase (GOX) / Tatiana Clementino Pinto Toscano de França. – Campina Grande, 2013.

87 f. : il. Color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

"Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa".

Referências.

1. Nanopartículas Magnéticas. 2. Magnetita. 3. Glicose Oxidase. 4. Imobilização. 5. Diabetes. I. Costa, Ana Cristina Figueiredo de Melo. II. Título.

CDU 549.731.1(043)

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS A PARTIR DA  
SILANIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  $Fe_3O_4$  VISANDO A IMOBILIZAÇÃO  
DA GLICOSE OXIDASE (GOX).

**TATIANA CLEMENTINO PINTO TOSCANO DE FRANÇA**

Dissertação Aprovada em 30/10/2013 pela banca examinadora constituída dos  
seguintes membros:



---

Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa  
(Orientadora)  
UAEMa/UFCG



---

Dr<sup>a</sup>. Alana Abrantes Nogueira de Pontes  
(Examinadora Externa)  
UAM/CCBS/UFCG



---

Dr<sup>a</sup>. Libia de Sousa Conrado Oliveira  
(Examinadora Externa)  
UAEQ/CCT/UFCG

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo apoio incondicional, em especial aos meus pais José Cassildo e Neuda e meus filhos Sofia e Gabriel.

Ao meu esposo Sydney pela paciência infinita e companherismo.

À professora Ana Cristina pela orientação, apoio e confiança depositada neste trabalho.

À Dra. Sheyla M. C. Máximo Bicalho e Damiana Máximo do laboratório JHS Biomateriais pelos ensaios de citotoxicidade.

Ao professor José Geraldo Pacheco pelos ensaios de termogravimetria.

Aos meus colegas Bruno Brito, Izabelle Albuquerque e Kaline Viana pelo apoio nos momentos de dificuldades.

## RESUMO

Com o crescente aumento no número de casos de pessoas portadoras de diabetes nos últimos anos, e tendo em vista que a tecnologia de biossensores existentes ainda apresenta uma alta relação custo benefício, viu-se na última década uma corrida pelo desenvolvimento de biossensores de detecção de glicose baseados na imobilização da glicose-oxidase utilizando-se principalmente nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com agentes silanos. Desta forma, este trabalho de dissertação desenvolveu um material capaz de imobilizar a glicose oxidase. Para isto foi proposto a obtenção de um material híbrido a partir de nanopartículas magnéticas (NPMs) de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) modificada a superfície com agente silano, o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES). Para avaliar o produto obtido com relação ao efeito do agente silano na modificação das propriedades das NPMs foram realizadas análises de caracterização de difração de raios-X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria, microscopia eletrônica de varredura (MEV), medidas magnéticas e teste *in vitro* magnético de separação e sedimentação. Para avaliar a interação das NPMs sem e com o agente silano foi realizado teste de imobilização da glicose oxidase. Com base nos resultados obtidos verificou-se que a modificação da superfície da NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com o agente silano 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) foi conseguida com sucesso uma vez que o processo de silanização não modificou a característica estrutural, morfológica e magnética do produto. As amostras de magnetita antes e após a silanização mostraram-se não citotóxicas e com alta viabilidade celular. A imobilização da glicose oxidase foi obtida, sendo de 0,006 mg/g para a magnetita pura e 0,008 mg/g para o híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Verificou-se ainda que o tipo de interação química (adsorção física ou covalente) entre a glicose oxidase (GOX) e as NPMs antes e após a silanização influenciou na imobilização. Isto revela que a magnetita e o híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  são materiais imobilizadores de GOX e possuem grande potencial para o desenvolvimento de biossensores.

Palavras-chaves: nanopartículas magnéticas, magnetita, glicose oxidase, imobilização, diabetes.

## ABSTRACT

With the increasing number of cases of people with diabetes in recent years, and in view of the existing biosensor technology still has a high cost-benefit ratio, found himself in a race last decade the development of biosensors for detection of glucose based on the immobilization of glucose oxidase mainly using functionalized magnetic nanoparticles of magnetite agents silanes. Thus, this dissertation developed a material capable of immobilizing glucose oxidase. For this purpose it has been proposed to obtain a hybrid material from magnetic nanoparticles (NPMs) magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) surface modified with silane agent, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). To assess the product obtained regarding the effect of the silane agent in the modification of the properties of NPMs analyzes were performed characterization of X-ray diffraction (XRD), spectroscopy in the Fourier transform infrared (FTIR), thermogravimetric analysis, scanning electronic microscopy (SEM) and magnetic measurements in vitro test magnetic separation and sedimentation. To evaluate the interaction of NMPs with and without silane agent test was performed immobilization of glucose oxidase. The results obtained showed that the surface modification of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPMs silane agent APTES was successfully achieved since the silanization process did not alter the characteristic of the structural and morphological magnetic product. The magnetite samples before and after the silanization were non-cytotoxic and it has high cell viability. The immobilized glucose oxidase was obtained, with 0,006mg/g for pure magnetite and 0,008mg/g for the hybrid  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . The type of chemical interaction (physical adsorption or covalent) between the glucose oxidase (GOX) and NPMs, before and after the immobilization, were influenced by silanization. These reveals that magnetite and the hybrid  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  are carriers for GOX immobilization and the immobilized GOX has great potential application in developing glucose biosensors.

**Keywords:** magnetic nanoparticles, magnetite, glucose oxidase, immobilization, diabetes.

## PUBLICAÇÕES

FRANÇA T. C. P. T.; DANTAS B. B.; VIANA K. M. S.; CORNEJO D. R.; COSTA A. C. F. M. "Evaluation of magnetic properties of silanized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> aiming the obtaining of material for detention of glucose oxidase (GOX)". **Advanced Materials Research**. (*Aceito para publicação*)

FRANÇA, T. C. P. T.; B. B. Dantas; VIANA, K. M. S.; SANTOS, P. T. A.; COSTA A.C. F. M. "Preparation and characterization of hybrid Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/APTES for immobilization of GOX". **Journal Materials Science Forum**. (*Aceito para publicação*)

FRANÇA, T. C. P. T.; DANTAS, B. B.; VIANA, K. M. S.; COSTA, A. C. F. M. "Evaluation of magnetic properties of silanized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> aiming the obtaining of material for detention of glucose oxidase (GOX)". In: **6th International Conference on Electroceramics**, 2013, João Pessoa - PB. Anais do 6th International Conference on Electroceramics, 2013.

FRANCA, T. C. P.; DANTAS, B. B.; VIANA, K. M. S.; SANTOS, P. T. A.; COSTA, A C F M. "Síntese e caracterização de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/APTES para imobilização de GOX". In: **57º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, 2013, Natal - RN. Anais do 57º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2013.

## LISTA DE SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

- A1c – hemoglobina glicada
- AEAPS – N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilano
- APTES – 3-aminopropiltriethoxisilano
- BGMD – dispositivos comerciais de monitoramento de glicose no sangue
- BSA – albumina bovina
- CGMS – sistema de monitorização glicêmica contínua
- CN – controle negativo
- ConA – concanavalina A
- CP – controle positivo
- DM – diabetes mellitus
- DM1 – diabetes tipo 1
- DM2 – diabetes tipo 2
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- DPP-IV – inibidores da *dipeptidil peptidase IV*
- DRX – difração de raios-X
- EP – complexo enzima produto
- ES – complexo enzima substrato
- FAD – flavina adenina dinucleotídio
- FAD-GDH = glicose desidrogenase com flavina adenina dinucleotídeo
- FDA – Food and Drug Administration
- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – magnetita
- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> – magnetita silanizada
- FTIR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
- TG – análise termogravimétrica
- GA – glutaraldeído
- GLP-1 – *Glucagon-like peptide 1*
- GOX – glicose oxidase
- HbA1c – diagnóstico de diabetes a hemoglobina glicosilada
- HRP – enzima peroxidase
- LCE – Laboratório de Caracterização Estrutural
- LCM – Laboratório de Caracterização de Materiais

LDL – colesterol

Lp1 – *Pseudomonas fluorescens*

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MEV – microscopia eletrônica de varredura

Ms – magnetização de saturação

NAD-GDH = glicose desidrogenase com nicotinamida adenina dinucleotídeo

NGM – técnicas não-invasivas de detecção de glicose

NPMs – nanopartículas magnéticas

NPs – nanopartículas

OG - óxido de grafeno

OGTT – teste de tolerância oral a glicose

P – produto

PBS – *phosphate buffered saline*

PDDA – cloreto de polidialildimetilamônio

PEAD – polietileno de alta densidade

PQQ-GDH= glicose desidrogenase com pirrolquinolinoquinona

S – substrato

TEOS – tetraetilortosilicato

V.C. – viabilidade celular

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação proposta por Trinder para a oxidação da 4-aminofenazona.....	24
Figura 2 – Um esquema da detecção da glicose em biossensores .....	26
Figura 3 – Evolução no número de artigos publicados com técnicas não invasivas de detecção de glicose (NGM). .....	28
Figura 4 – GlucoTrack™, dispositivo NGM portátil. (a) Unidade de monitoramento e (b) Pinça auricular. ....	29
Figura 5 – C8 MediSensors, dispositivo NGM não portátil.(a) Unidade de monitoramento e (b) Haste de detecção. ....	29
Figura 6 – Modelo chave-fechadura para ação enzimática. ....	30
Figura 7 – Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase. ....	31
Figura 8 – Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.....	32
Figura 9 - Principais métodos desenvolvidos para a imobilização de enzimas.	33
Figura 10 – Esquema ilustrativo do procedimento de preparação das nanopartículas <i>core-shell</i> Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /Au.....	35
Figura 11 – Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do sensor de detecção de glicose.....	35
Figura 12 – Fórmula química estrutural do 3-aminopropiltriétoxissilano. ....	37
Figura 13 – Representação da estrutura cristalina da magnetita. ....	39
Figura 14 – Fluxograma da silanização das NPMs com o APTES.....	42
Figura 15 – Fluxograma do teste de imobilização da GOX .....	49
Figura 16 – Esquema ilustrativo da imobilização da GOX utilizando NPMs silanizadas.....	50
Figura 17 – Difractogramas de raios X das amostras Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> .....	51
Figura 18 – Espectro de infravermelho. (a) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> e (b) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> . ....	53
Figura 19 – Microscopia eletrônica de varredura. (a) e (b) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , (c) e (d) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> . ....	56

Figura 20 – Microscopia eletrônica de transmissão. (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (b) padrão de difração da $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , e (d) padrão de difração da $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . ...	58
Figura 21 – Curvas Termogravimétricas: (a) amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e (b) amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .	60
Figura 22 – Curvas de histerese da amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (a) laço de histerese completo e (b) ampliação.	62
Figura 23 – Curvas de histerese da amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . (a) laço de histerese completo e (b) ampliação.	62
Figura 24 – Citotoxicidade das amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .	64
Figura 25 – Teste <i>in vitro</i> magnético realizado na amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (a) sem ímã e (b) com ímã.	65
Figura 26 – Teste <i>in vitro</i> magnético realizado na amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . (a) sem ímã e (b) com ímã.	66
Figura 27 – Comportamento das amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ com a aproximação de um ímã. (a) solução de PBS, (b) solução de PBS, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e ímã e (c) solução de PBS, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ e ímã.	67
Figura 28 – Eficiência de separação da amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (a) solução de PBS e $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (b) solução de PBS e $\text{Fe}_3\text{O}_4$ em presença do ímã, (c) momento da separação da solução de PBS das $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e (d) béqueres contendo a solução de PBS separada das $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .	68
Figura 29 – Eficiência de separação da amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . (a) solução de PBS e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , (b) solução de PBS e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ em presença do ímã, (c) momento da separação da solução de PBS das $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ e (d) béqueres contendo a solução de PBS separada das $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de insulina e tempo de ação das preparações. ....	22
Tabela 2 - Recomendações de controle glicêmico, pressão arterial e lipídios em adultos com DM. ....	23
Tabela 3 - Cristalinidade tamanho de cristalito e percentual das fases para as amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . ....	52
Tabela 4 – Bandas de absorção na região do infravermelho verificadas para as amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . ....	55
Tabela 5 - Parâmetros de histerese para as amostras de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	63
Tabela 6 - Eficiência de separação das amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . ....	69
Tabela 7 - Quantidade e eficiência de GOX imobilizada .....	69
Tabela 8 – Absorbância medida no espectrofotômetro .....	87
Tabela 9 – Quantidade de GOX imobilizada .....	87

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Objetivo Geral.....	18
1.2 Objetivos Específicos.....	18
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	20
2.1 Diabetes Mellitus.....	20
2.2 Biossensores de Detecção de Glicose.....	24
2.3 Glicose Oxidase (GOX).....	30
2.4 Nanopartículas Magnéticas para imobilização da GOX.....	33
2.5 Agentes Silanos.....	36
2.6 Magnetita (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ).....	38
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	41
3.1 Materiais.....	41
3.2. Preparação das NPMs.....	41
3.3 Silanização das NPMs.....	42
3.4 Caracterização.....	43
3.4.1 Difração de Raios X – DRX.....	43
3.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	44
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	44
3.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET.....	45
3.4.5 Análise Termogravimétrica.....	45
3.4.6 Medidas Magnéticas.....	45
3.4.7 Citotoxicidade.....	45
<b>3.5 Teste <i>In Vitro</i> Magnético</b> .....	47
3.5.1 Preparação da Solução Tampão do PBS.....	47
3.5.2 Teste de Sedimentação.....	47

3.5.3 Teste de Separação .....	47
<b>3.6 Imobilização .....</b>	<b>48</b>
3.6.1. Método de Determinação de Proteína.....	48
3.6.2. Imobilização da GOX.....	48
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Difração de Raios X.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....</b>	<b>56</b>
<b>4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5 Análise Termogravimétrica .....</b>	<b>59</b>
<b>4.6 Medidas Magnéticas .....</b>	<b>61</b>
<b>4.7. Teste de Citotoxicidade .....</b>	<b>63</b>
<b>4.8 Teste <i>In Vitro</i> Magnético .....</b>	<b>64</b>
4.8.1 Teste de Sedimentação.....	64
4.8.2 Teste de Separação .....	66
<b>4.9 Testes de imobilização da GOX .....</b>	<b>69</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>83</b>
Anexo I – Fichas catalográficas.....	84
Anexo II – Curva de calibração do espectrofotômetro.....	85
Anexo III – Especificações técnicas do reagente de Bradford.....	86
Anexo IV – Absorbância medida no espectrofotômetro e quantidade de GOX imobilizada .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) constitui um dos mais sérios problemas de saúde na atualidade, devido ao grande número de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura e alto custo financeiro dos governos, devido às internações hospitalares prolongadas, aposentadorias precoces e gastos com medicações e insumos, estimando-se que em 2025 teremos cerca de 300 milhões, segundo a American Diabetes Association (2008). Por exemplo, até o ano de 2009, o diabetes mellitus afetou cerca de 24 milhões de pessoas só nos Estados Unidos e estima-se que em 2034 serão 44 milhões de norte americanos diabéticos (HUANG et. al., 2009).

De acordo com a IDF (International Diabetes Federation), existem 371 milhões de pessoas diabéticas no mundo, com prevalência mundial de diabetes de 8,3%. Metade das pessoas diabéticas não é diagnosticada e cerca de 4,8 milhões morrem em consequência ao diabetes. Mais de 470 milhões de dólares são gastos em tratamentos relacionados ao diabetes. No Brasil existem cerca de 13,4 milhões de pessoas diabéticas entre 20 e 79 anos (IDF, 2011).

A automonitorização glicêmica é realizada com os biossensores de glicose ou glicosímetros, como são mais conhecidos pela população. Infelizmente, a maioria das pessoas diabéticas não se automonitorizam devido, principalmente, a baixa adesão ao tratamento, às punções digitais dolorosas e ao alto custo financeiro (GOMES e LERARIO, 2009).

A automonitorização domiciliar das glicemias hoje se constitui um procedimento altamente eficaz no controle metabólico de pacientes diabéticos. No DM, a automonitorização é importante quando se visa o bom controle metabólico. Essa monitorização previne e ajuda a minimizar o risco de hipoglicemias; ajuda a tomar decisões sobre qual tipo e doses de insulinas usarem, possibilitando fazer os ajustes necessários a medicação ou insulina; auxilia no melhor entendimento do efeito dos diversos alimentos, do estresse e dos exercícios sobre a glicemia (VILAR, 2013).

A grande maioria dos biossensores produzidos no mundo é empregada para a detecção de glicose, totalizando cerca de 10 bilhões de ensaios sendo realizados em todo o mundo a cada ano. O mercado de detectores de glicose

no sangue é altamente lucrativo, uma vez que é responsável por 85% do mercado total dos biossensores (SHEU et. al., 2011; VASHIST, 2012).

Um biossensor para determinação da glicose é formado essencialmente por uma enzima (GOX) depositada (imobilizada) em um eletrodo. A imobilização de uma enzima pode ocorrer de quatro formas: encapsulamento, adsorção, ligação covalente e ligação covalente cruzada. A imobilização covalente de uma enzima a um suporte sintético envolve a ligação efetiva entre a enzima e o suporte através da ativação prévia de grupos reativos da matriz. Desta forma, os suportes devem: possuir grupos funcionais que possam ser ativados e ter boa estabilidade mecânica (ZHAO et al., 2013).

A ativação do suporte, na maioria das vezes consiste em silanização – reações com agentes compatibilizantes (silanos, carboiminas, carbonóimidas e glutaraldeído). As enzimas são ligadas na matriz através de grupos funcionais presentes em seus aminoácidos. Uma vez que a enzima não pode ser imobilizada diretamente sobre os eletrodos, pois esta poderia ser inativada, novos materiais são sintetizados para que possam desempenhar a função de suportes para o biocatalisador e ao mesmo tempo mediadores para o transporte de elétrons na interface (CHEN et al., 2011). Daí surge a necessidade de se obter um material que tenha ao mesmo tempo, compatibilidade com a enzima e com o eletrodo, ou seja, materiais híbridos.

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos, e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações, normalmente, apresentam propriedades complementares, dando origem a um único material com propriedades diferenciadas daquelas que lhe deram origem. Esses materiais são homogêneos, devido à mistura dos componentes em nível molecular, usualmente em escala de nanômetro a sub-micrômetro (JOSÉ e PRADO, 2005).

Em toda a literatura científica observa-se a constante utilização de materiais híbridos, principalmente aqueles compostos por nanopartículas magnéticas e agentes silanos, para a imobilização da enzima GOX. Alguns exemplos são: magnetita ( $Fe_3O_4$ )/tetraetilortossilicato (TEOS) (Feng et al., 2012), óxido de grafeno (OG)/concanavalina A (ConA) (Zhou et al., 2012), ferrita de cobalto ( $CoFe_2O_4$ )/ TEOS + 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) (Lee

et. al., 2012), ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ )/glutaraldeído (GA) (Wang et. al., 2011),  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  / APTES (Huang et al, 2010).

O agente silano APTES é amplamente utilizado para preparar substratos para aplicações que utilizam a imobilização de proteínas e/ou enzimas. As nanopartículas (NPMs) de óxido de ferro são muito utilizadas para fabricação de sensores de glicose por simplificar a atração da GOX com o eletrodo, uma vez que as partículas do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  possuem alta magnetização e são facilmente atraídas para a superfície do eletrodo usando um campo magnético. Desta forma, o sinal biológico (GOX) é facilmente convertido em sinal elétrico, podendo ser observada a sua quantificação no visor do biossensor (CASH and CLARK, 2010).

Desta forma o desafio deste trabalho foi a preparação e caracterização do híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  capaz de realizar a imobilização da glicose oxidase (GOX). Este novo material atuou como agente imobilizador da GOX por meio da geração de ligações covalentes entre o APTES e a enzima.

## 1.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar híbridos a partir de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) silanizada com o agente silano 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), visando a imobilização da glicose oxidase (GOX).

## 1.2 Objetivos Específicos

- Modificar a superfície das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (NPMs) com o agente silano 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) visando a obtenção de um material híbrido NPMs/APTES.
- Caracterizar as NPMs e o material híbrido obtido por difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TG).
- Realizar testes de citotoxicidade nas NPMs e no material híbrido.

- Caracterizar magneticamente as NPMs e o material híbrido por magnetometria de amostra vibrante para avaliar seu comportamento magnético e testes de magnético *in vitro* de sedimentação e separação.
- Realizar testes de imobilização da glicose oxidase (GOX).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Diabetes Mellitus

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença metabólica, que se caracteriza por hiperglicemia resultante da deficiência de secreção de insulina pelo pâncreas e/ou resistência periférica à ação da insulina (VILAR, 2013).

A classificação mais atual do DM é baseada na etiologia da doença, e engloba o diabetes tipo 1 e tipo 2. O diabetes tipo 1 (DM1) representa 10% dos casos de diabetes e predomina em crianças e adolescentes. Em torno de 80% dos casos de DM1 surge antes dos 18 anos. O DM1 caracteriza-se por deficiência absoluta na produção de insulina, decorrente da destruição autoimune das células beta do pâncreas, na maioria das vezes (KRONENBERG, 2010).

O DM2 corresponde a 80-90% dos casos de diabetes, surgindo geralmente acima dos 40 anos, e a maioria dos pacientes é obesa. A hiperglicemia do DM2 ocorre devido à resistência periférica à ação insulínica; deficiente secreção de insulina pelo pâncreas; e aumento da produção hepática de glicose (VILAR, 2013).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do DM2 encontram-se a idade acima de 45 anos, obesidade, sedentarismo, hipertensão arterial, dislipidemia e história familiar de DM. As manifestações clínicas mais frequentes são: poliúria, nictúria, polidipsia, boca seca, polifagia, emagrecimento rápido, fadiga, fraqueza, e tontura (BANDEIRA, 2009).

O diagnóstico do DM se baseia nos seguintes critérios: glicemia de jejum, glicemia pós-prandial e no valor de 2 horas no teste de tolerância oral a glicose de 75 gramas (OGTT). As diretrizes da Associação Americana de Diabetes (2013) também determinam como critério de diagnóstico de diabetes a hemoglobina glicosilada (HbA1C) acima de 6,5% em duas dosagens; glicemia de jejum > 126mg/dl em duas dosagens; glicemia de 2 horas no OGTT 75 gramas > 200mg/dl; ou glicemia > 200mg/dl em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia.

A maior sobrevivência de indivíduos diabéticos aumenta as chances de desenvolvimento das complicações crônicas da doença que estão associadas ao tempo de exposição à hiperglicemia. Tais complicações - macroangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatias - podem ser muito debilitantes ao indivíduo e são muito onerosas ao sistema de saúde. A doença cardiovascular é a primeira causa de mortalidade de indivíduos com DM tipo 2; a retinopatia representa a principal causa de cegueira adquirida e a nefropatia uma das maiores responsáveis pelo ingresso a programas de diálise e transplante; o pé diabético se constitui em importante causa de amputações de membros inferiores. Assim, procedimentos diagnósticos, terapêuticos (cateterismo, bypass coronariano, fotocoagulação retiniana, transplante renal e outros), hospitalizações, absenteísmo, invalidez e morte prematura elevam substancialmente os custos diretos e indiretos da assistência à saúde da população diabética (KRONENBERG, 2010).

O tratamento do DM engloba uma orientação dietética adequada, modificações no estilo de vida, isto é, perda de peso, atividade física e cessação do tabagismo e alcoolismo, além da terapia farmacológica. Os principais grupos de fármacos usados no tratamento do DM2 são: fármacos que aumentam a secreção pancreática de insulina (sulfoniluréias e meglitinidas); os que melhoram a ação periférica da insulina (biguanidas - metformina e tiazolidinedionas); os que alteram a absorção intestinal de carboidratos (inibidores da  $\alpha$ -glicosidase); insulinas; análogos do GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*); inibidores da *dipeptidil peptidase IV* (DPP-IV); e *pramlintida* (VILAR, 2013).

A insulino terapia é usada em todos os pacientes com DM1 e parte dos pacientes com DM2. Os pacientes com DM que necessitam do uso de insulina devem ser orientados quanto às diferentes apresentações, formas, vias e locais de aplicações e cuidados de armazenamento da insulina, assim como quanto às formas e à importância do monitoramento glicêmico. Várias preparações de insulina humana e de análogos de insulina encontram-se disponíveis, como mostra a Tabela 1 (BANDEIRA et al., 2009).

Tabela 1 - Tipos de insulina e tempo de ação das preparações.

<b>TERAPIA</b>	<b>Início de ação</b>	<b>Pico de ação</b>	<b>Duração (máxima)</b>
De ação ultra-rápida Lispro/Aspart/Glulisina	5-15 (min)	1-2 horas	4-6 horas
De ação rápida Regular	30 min à 1 hora	2-4 horas	6-10 horas
De ação intermediária	2-4 horas	6-10 horas	14-18 horas
NPH Lenta	3-4 horas	6-12 horas	16-20 horas
De ação longa	6-10 horas		
Ultralenta	30 min à 2 horas	10-16 horas	20-24 horas
Glargina	30 min à 2 horas	---	20-24 horas
Detemir	30 min à 2 horas	---	6-23 horas

Fonte: Bandeira et al., 2009

De acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2013), o monitoramento do DM é realizado com o objetivo de avaliar o controle glicêmico em tempo real (glicemias capilares) ou retrospectivamente (glicemias laboratoriais, hemoglobina glicada A1c, frutossamina e sistema de monitorização glicêmica contínua ou CGMS). Com os dados obtidos, fazem-se mudanças no tratamento (antidiabéticos orais, insulinas e dieta).

A automonitorização das glicemias capilares é efetuada com a inserção de uma gota de sangue capilar em uma fita biossensora descartável contendo glicose desidrogenase ou glicose oxidase acoplada a um dispositivo médico (glicosímetro). A maioria dos glicosímetros utilizados quantifica glicose plasmática. Após sofrer ação enzimática, há uma reação eletroquímica diretamente proporcional à concentração de glicose. A faixa de mensuração vai de 10 a 600mg/dl, dependendo da marca do monitor (SBD, 2013).

A Associação Americana de Diabetes (ADA) estabelece anualmente metas rigorosas em termos de valores de glicemia de jejum e pós-prandial, hemoglobina glicada, pressão arterial e lipoproteínas, como mostra a Tabela 2 (ADA, 2013).

Tabela 2 - Recomendações de controle glicêmico, pressão arterial e lipídios em adultos com DM.

A1C	< 7%
Glicemia de jejum	70-130 mg/dl
Glicemia pós-prandial	< 180 mg/dl
Pressão arterial	< 140/80 mmHg
Colesterol LDL	< 100 mg/dl

Fonte: ADA, 2013.

O controle glicêmico adequado deve sempre ser objetivado pelo paciente e pelos profissionais de saúde. O automonitoramento da glicemia, por meio das glicemias capilares, é uma ferramenta útil, permitindo ao paciente avaliar sua resposta individual à terapia, além de prevenir hipoglicemias graves e ajudar no ajuste das medicações, da dieta e da atividade física. Não há senso a respeito da frequência ideal para realização da glicemia capilar. De um modo geral, pacientes em uso de insulina devem proceder às glicemias capilares ao menos três vezes ao dia. Para pacientes em uso de terapia oral, a frequência deve ser aquela suficiente para facilitar o alcance das metas glicêmicas estabelecidas (BANDEIRA, 2009).

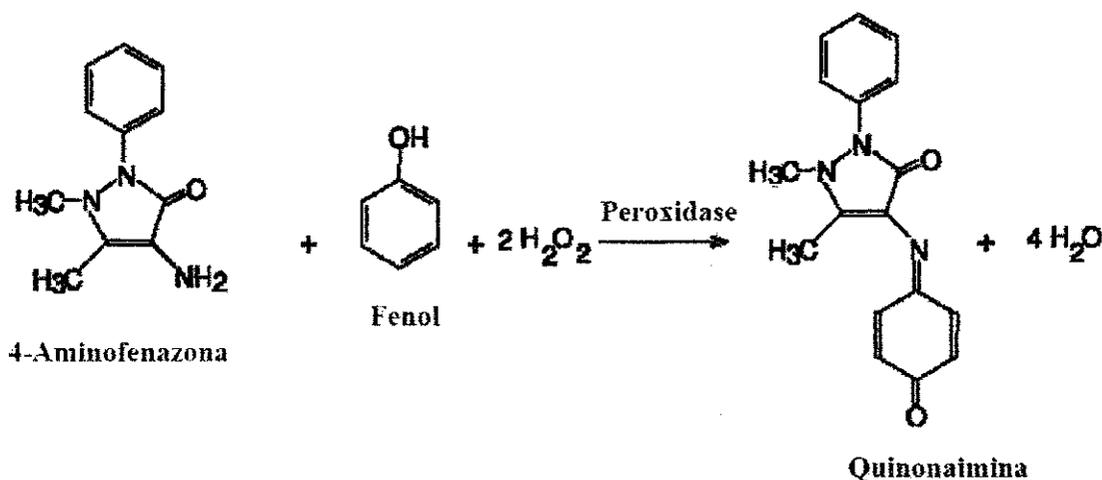
De acordo com Kuzuya et al. (2002) a análise clínica do DM é estabelecida pela medida da glicemia no soro ou plasma sanguíneo após um jejum de 8 a 12 horas. Tal análise envolve técnicas espectrofotométricas utilizando-se equipamentos de grande porte como espectrofotômetros automatizados (ou não) ou microanálise através de biossensores. O ensaio espectrofotométrico para determinação de glicose no sangue envolve várias etapas. Inicialmente faz-se a coleta do material e a separação do plasma sanguíneo.

Uma solução de glicose oxidase (GOX), peroxidase (HRP), 4-aminofenazona e fenol é preparada e a ela adiciona-se alguns microlitros de plasma. Há uma pausa de 10 minutos onde os reativos (plasma e solução) são incubados em banho-maria a 37°C, possibilitando então a determinação da concentração de glicose fotometricamente. Na presença da enzima peroxidase, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) resultante da oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase, oxida composto que não possuem absorção na região visível

em compostos coloridos. A intensidade da cor formada possui absorvância máxima em 500 - 520 nm e é diretamente proporcional à concentração do substrato (glicose) inicial (KUZUYA et al., 2002).

Esta metodologia para a determinação da concentração da glicose foi inicialmente descrito por Trinder em 1969. Tal método baseia-se na oxidação da 4-aminofenazona pelo  $H_2O_2$ , a qual se combina com um composto fenólico para formar uma quinonaimina colorida com alta absorvância em 500 - 520 nm. Na Figura 1 tem-se o mecanismo da reação de Trinder. O tempo de reação para a formação da quinonaimina é de 10 minutos à temperatura ambiente (15 - 30°C) ou 5 minutos à temperatura de 37°C (VIEIRA, 2006).

Figura 1 – Reação proposta por Trinder para a oxidação da 4-aminofenazona.



Fonte: Trinder, 1969.

Atualmente, testes de glicose mais rápidos e práticos podem ser efetuados através de biossensores (NEWMAN e TURNER, 2005).

## 2.2 Biossensores de Detecção de Glicose

Testes de glicose rápidos e práticos podem ser efetuados através de biossensores que se baseiam no sinal elétrico (corrente ou tensão) criado na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOX). A reação bioquímica de oxidação da GOX pode alterar o pH do meio devido à formação de ácido glucônico, criando uma diferença de potencial (biossensor potenciométrico). A

polarização do eletrodo pode gerar uma corrente devido à oxidação do peróxido de hidrogênio (biossensor amperométrico). O sinal amperométrico produzido é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra a ser analisada (VIEIRA, 2006).

Os biossensores são dispositivos analíticos que convertem uma resposta biológica em um sinal elétrico, com o objetivo de detectar substâncias ou condições específicas. Os biossensores têm sido desenvolvidos para detectar ou mensurar a temperatura corporal, pressão arterial, pH, glicose, enzimas, anticorpos, bactérias específicas, entre outros usos. Um biossensor é composto por um receptor, que entra em contato com um componente biológico ativo (por exemplo, sangue e urina); um transdutor físico-químico e um processador eletrônico do sinal (HE et al., 2012).

Biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais usados para análises clínicas. Os biossensores amperométricos têm a vantagem de usar uma técnica eletroquímica, onde substâncias químicas eletroativas são oxidadas ou reduzidas em eletrodos metálicos inertes. A maioria dos biossensores amperométricos usa enzimas como elemento reconhecedor do material biológico (CASH e CLARK, 2010).

O desenvolvimento dos biossensores de glicose se deu no início da década de 1920, com o cirurgião canadense Frederick Banting e seu assistente Charles Best, os quais desenvolveram métodos analíticos para a determinação de glicose no sangue e urina. Clark e Lyons em 1962 publicaram pela primeira vez um artigo descrevendo um biossensor de glicose, iniciando assim a busca pela tecnologia de monitoramento de glicose no Hospital Infantil de Cincinnati, Ohio, EUA (CASH e CLARK, 2010; SHEU et al., 2011).

Os dispositivos de monitoramento de glicose no sangue (BGMD) são uma parte integrante do dia-a-dia dos pacientes portadores de diabetes. Estes dispositivos evoluíram tremendamente nas últimas quatro décadas em termos de miniaturização, resposta rápida, maior especificidade, simplicidade, captação indolor de amostra e utilização de softwares de gerenciamento de dados mais sofisticados. A grande maioria dos biossensores produzidos no mundo é empregada para a detecção de glicose, totalizando cerca de 10 bilhões de ensaios sendo realizados em todo o mundo a cada ano. O mercado de detectores de glicose no sangue é altamente lucrativo, uma vez que é

responsável por 85% do mercado total dos biossensores (SHEU et al., 2011; VASHIST, 2012).

Nos EUA, a projeção foi de que o mercado dos biossensores para detecção de glicose tenha atingido a marca dos 6,1 bilhões dólares em 2012, sendo este dominado por um pequeno número de grandes empresas de diagnóstico, tais como: *Abbott, Roche Diagnostics, Bayer, Minimed e LifeScan*. Os pré-requisitos essenciais para um BGMD de sucesso são: facilidade de uso, apresentação simples, maior precisão e confiabilidade, baixo custo, memória aprimorada e sofisticada baseada em softwares de gerenciamento de dados (SHEU et al., 2011).

O biossensor clássico de glicose é um biossensor enzimático com um transdutor óptico ou amperométrico. A enzima catalisa a conversão de um analito em uma molécula que pode ser mensurada. As enzimas mais usadas nos biossensores de glicose são hexokinase, glicose oxidase (GOX) e epirrolquinolinas desidrogenase de glicose-quinona (PQQ-GDH) (URBAN, 2009).

A enzima glicose oxidase (GOX) oxida seus substratos e precisa de oxigênio como um co-substrato, re-oxidando a enzima ao estado inicial, de acordo com a equação 1 e na Figura 2:

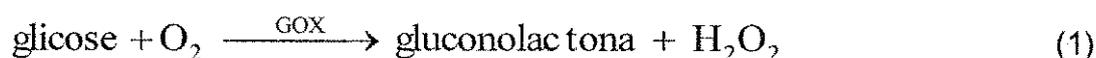
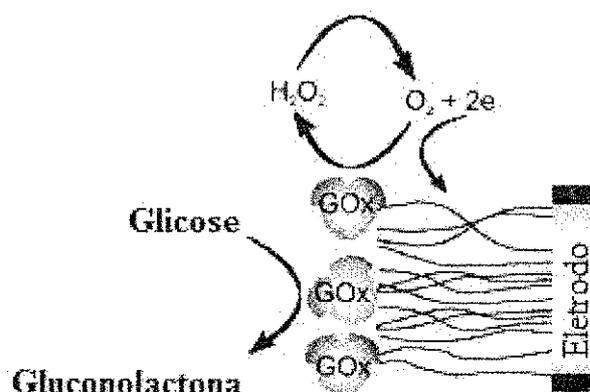


Figura 2 – Um esquema da detecção da glicose em biossensores



Fonte: Adaptado de Dolatabadi, 2013.

Para os sensores microeletrônicos, o consumo de oxigênio e a mudança de pH, devido a dissociação de gluconolactona (ácido glucônico) e mais proeminente de  $H_2O_2$ , são mensuradas por métodos ópticos ou microeletroquímicos. Um dos problemas desse método é a necessidade do oxigênio para a reação da GOX (equação 1), pois o sangue venoso utilizado para medição da glicose apresenta baixa concentração de oxigênio. Isso foi superado com o uso de mediadores eletroquímicos ativos (URBAN, 2009).

O substrato para sensores de glicose sanguínea descartável é de papel ou polímero, como o poliéster Melinex. As enzimas usadas são: PQQ-GDH, NAD-GDH, FAD-GDH ou GOX, que são misturadas a um mediador redox no eletrodo e depositadas na área do sensor. Os biossensores de glicose diferem no volume de sangue necessário, no design, material do eletrodo, no tipo de mediador redox e métodos de medição (amperométrico ou colorimétrico) (NEWMAN et al., 2005).

Existem várias gerações de biossensores eletroquímicos com base na GOX, que usavam uma camada de GOX para reconhecer a glicose e gerar um sinal eletroquímico. Este sinal é transferido da enzima através da redução do  $O_2$  à  $H_2O_2$  (1ª geração de sensores de glicose); ou redução de outro mediador químico (2ª geração) (CASH e CLARK, 2010).

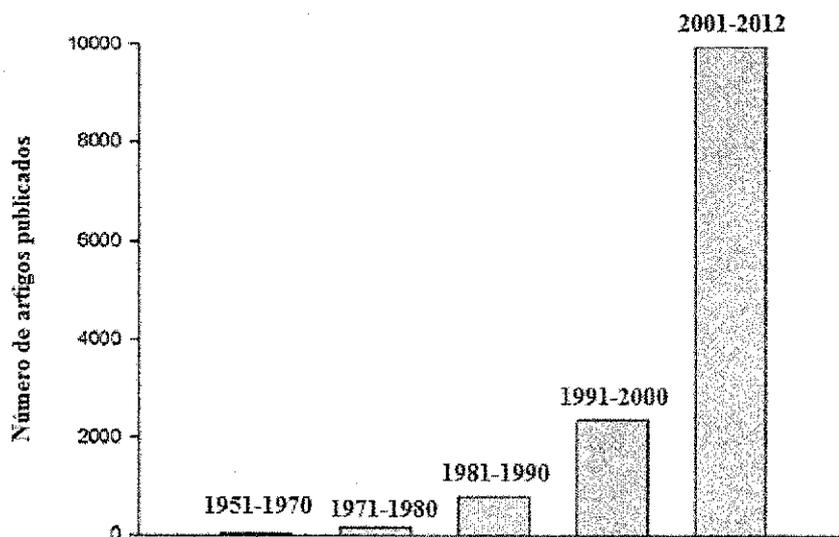
Quase todos os dispositivos comerciais de monitoramento de glicose no sangue (BGMD) utilizam um biossensor eletroquímico produzido em larga escala, de custo-benefício alto, porém aceitável, que é capaz de detectar rapidamente a glicose. Esses BGMD usam dispositivos automáticos (lanceta) para furar o dedo do diabético para retirar a amostra de sangue, o que é doloroso já que o indivíduo tem de medir glicose no sangue muito frequentemente, ou seja, mais de quatro vezes por dia. Assim, houve uma busca tremenda nas últimas décadas para se desenvolver um BGMD melhorado e com a necessidade de amostra de sangue reduzida, menos de  $1\mu L$ , e com os aspectos dolorosos minimizados pelo emprego de locais alternativos de amostragem (braço, mão, orelha), além de usar lancetas de menor calibre (VASHIST, 2012).

No entanto, mesmo com o desenvolvimento dos BGMD minimamente invasivos, os cientistas têm buscado a obtenção sensores subcutâneos para determinar a concentração de glicose no fluido intersticial da pele. Mas este

tipo de biossensor possui de limitações com relação ao desconforto causado aos pacientes, a exigência de calibração contínua e alta susceptibilidade a incrustação. Portanto, o desenvolvimento de técnicas não-invasivas de detecção de glicose (NGM) parece ser a única maneira de obter-se uma tecnologia de monitoramento de glicose para diabéticos sem dor. Este é o principal estimulante para as pesquisas contínuas no campo da NGM. Na última década, vários esforços têm se concentrado nessa área, o pode ser refletido pelo grande número de publicações de artigos de NGM, como mostra a Figura 3 (VASHIST, 2012).

Vários dispositivos NGM estão sendo comercializados, podendo-se citar alguns como o GlucoWatch<sup>®</sup> G2 e o Pendra<sup>®</sup>, dois dispositivos NGM na forma de um relógio de pulso, aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2001 e 2003, respectivamente, porém utilizados como auxiliares para medidores de glicose no sangue convencionais (invasivos) (VASHIST, 2012).

Figura 3 – Evolução no número de artigos publicados com técnicas não invasivas de detecção de glicose (NGM).

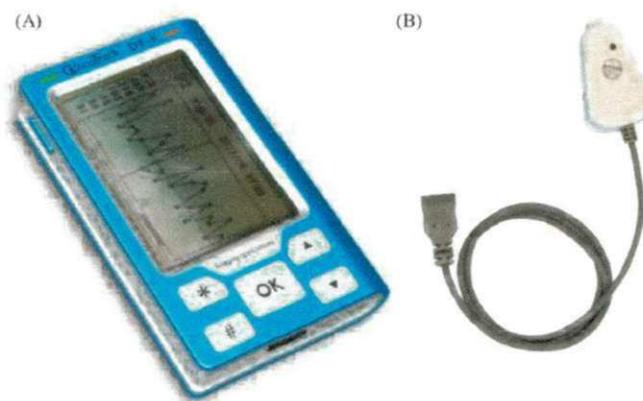


Fonte: Adaptado de Vashist, 2012.

O GlucoTrack<sup>™</sup>, dispositivo NGM portátil, de medição em tempo real e contínuo (Figura 4), que determina a concentração de glicose no sangue, utilizando três técnicas NGM, o eletromagnético, ultra-som e capacidade de

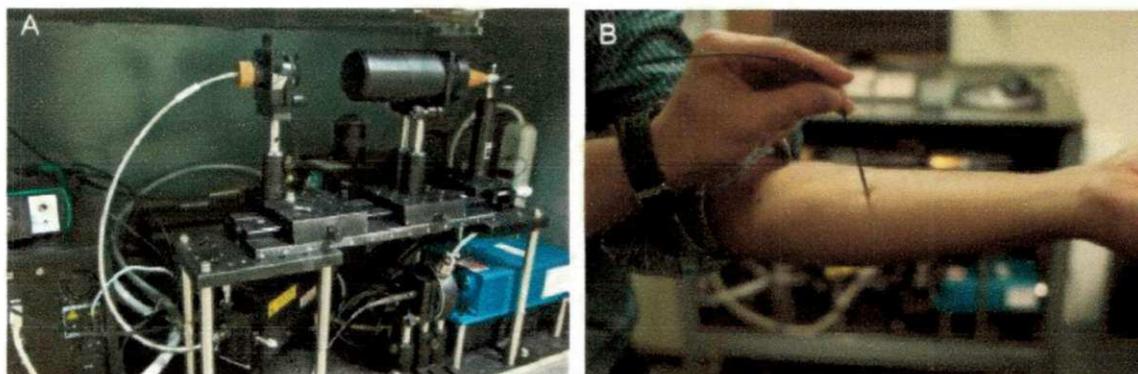
calor. E por fim, o C8 MediSensors (Figura 5), um NGM não portátil e de detecção contínua, baseado em espectroscopia de Raman, resistente à água, mas não à prova de água, que realiza uma medição de glicose simples em cerca de 3 minutos, com precisão comparáveis aos medidores de glicose no sangue convencionais (VASHIST, 2012).

Figura 4 – GlucoTrack™, dispositivo NGM portátil. (a) Unidade de monitoramento e (b) Pinça auricular.



Fonte: Vashist, 2012.

Figura 5 – C8 MediSensors, dispositivo NGM não portátil. (a) Unidade de monitoramento e (b) Haste de detecção.



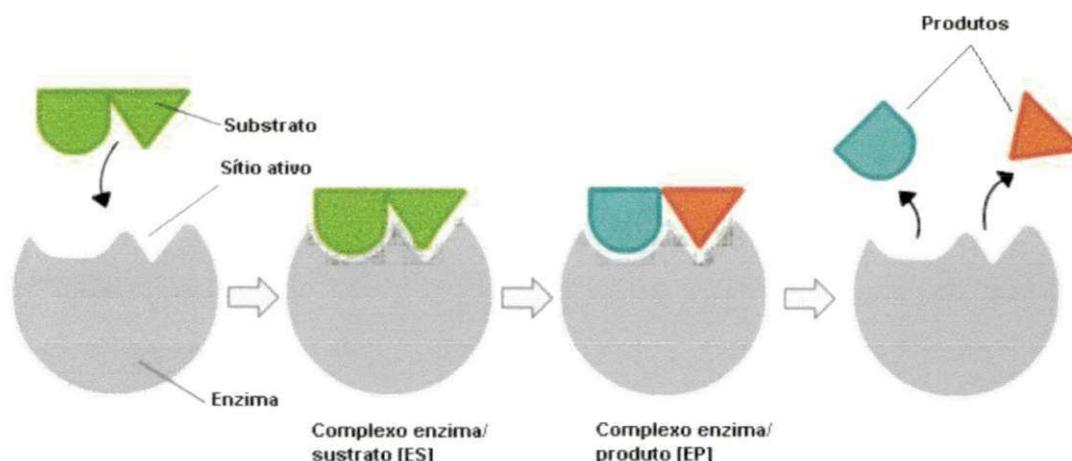
Fonte: Vashist, 2012.

### 2.3 Glicose Oxidase (GOX)

Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações químicas. As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico a nível fisiológico ou biotecnológico, apresentando uma extraordinária eficiência catalítica e um alto grau de especificidade por seus substratos quando comparadas aos catalisadores de origem sintética. Tais biocatalisadores aceleram as reações químicas de maneira formidável e atuam em meio aquoso e em condições relativamente suaves de pH e temperatura. Embora a enzima participe da sequência da reação, ela não sofre nenhuma transformação. Sendo assim, apenas poucas moléculas de enzimas são capazes de catalisar a conversão de milhares de moléculas de substrato (S) a produto (P) (KRAJEWSKA, 2004).

Emil Fischer, em 1894, estabeleceu que as interações entre uma enzima e seu substrato seriam complementares, propondo o modelo “chave-fechadura” para explicar a ação enzimática. De acordo com este modelo, o sítio ativo da enzima e o substrato possuem formas geométricas semelhantes. Dessa forma, o substrato (chave) se encaixa perfeitamente ao sítio ativo da enzima como se este fosse rígido analogamente a uma fechadura, conforme ilustrado na Figura 6. Estados intermediários (ES e EP) são formados antes do produto (VIEIRA, 2006).

Figura 6 – Modelo chave-fechadura para ação enzimática.

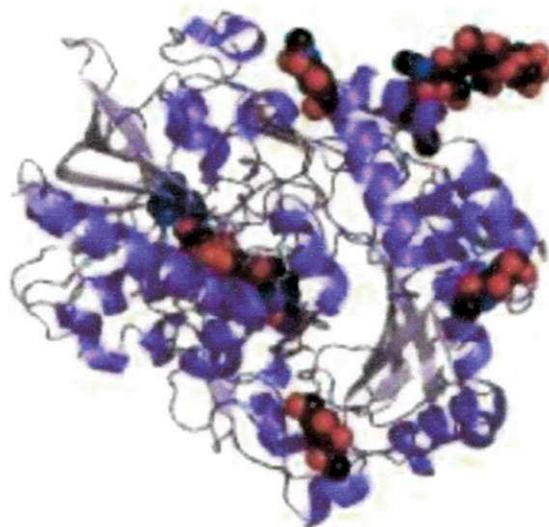


Fonte: Vieira, 2006.

Os testes de glicemia sanguínea necessitam de catalisadores envolvidos na reação de oxidação da molécula de glicose, visto que, o monitoramento do diabetes, se dá pela medida da taxa desse açúcar no sangue. Neste caso, as enzimas glicose oxidase e peroxidase são os biocatalisadores mais utilizados (VIEIRA, 2006).

Segundo Bankar et al. (2009) a glicose oxidase (GOX), cuja estrutura está representada na Figura 7, é uma enzima da classe das oxi-redutases que catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glicose pelo oxigênio molecular em glucono- $\delta$ -lactone, o qual subsequente e espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, gerando nessa hidrólise peróxido de hidrogênio. A atividade da glicose oxidase, extraída do *Aspergillus niger* foi primeiramente relatada por Müller em 1922. A partir de então, esta enzima tem sido extraída e purificada desse fungo.

Figura 7 – Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase.

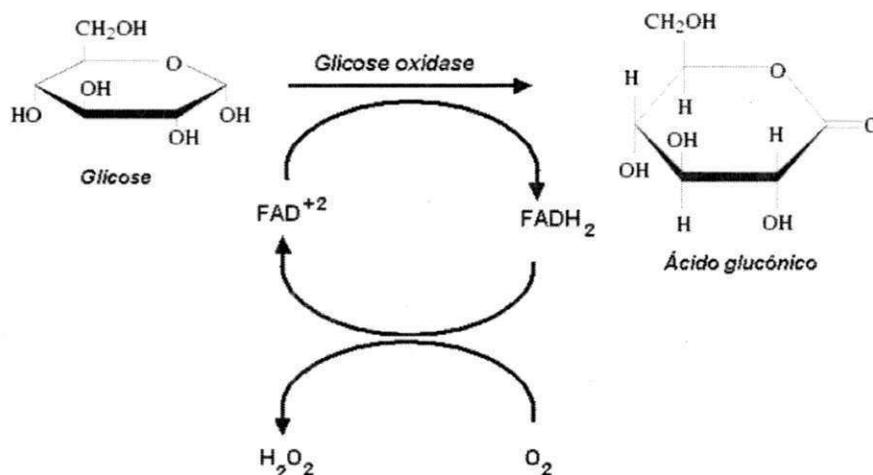


Fonte: SANTOS, 2012.

Como parte ativa da GOX, existe uma molécula orgânica complexa (coenzima), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O FAD é um componente comum nas reações biológicas de oxi-redução. As reações redoxes envolvem um ganho ou uma perda de elétrons por uma molécula. Na GOX, o FAD trabalha comoceptor inicial de elétrons e é reduzido a FADH<sub>2</sub>. O FADH<sub>2</sub> é então oxidado pelo oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) que possui um potencial mais

elevado de redução. O  $O_2$  gasoso é então reduzido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A reação de oxidação de uma molécula de glicose pela GOX é ilustrada na Figura 8 (BANKAR et al., 2009).

Figura 8 – Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.



Fonte: Adaptado de BANKAR et al., 2009.

A GOX é de considerável importância comercial. Tem sido utilizada no cozimento, na produção de ovo em pó, na produção de vinho e na produção de ácido glucônico. Porém suas aplicações não se resumem apenas a aplicações industriais. A GOX é a enzima mais estudada para a atuação em biossensores de glicose devido a sua alta especificidade, estabilidade e baixo custo de obtenção quando comparada a outras enzimas (SANTOS, 2012).

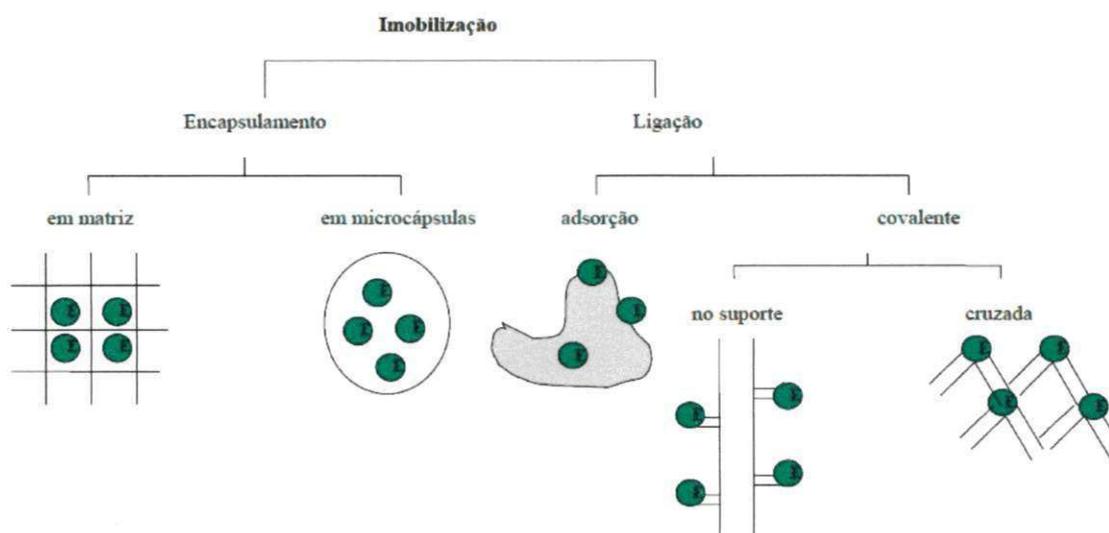
Devido à sua alta especificidade, a GOX é usada como elemento biocatalítico para se medir os níveis de açúcar no sangue e por isso tem sido usada na fabricação de biossensores. Neste caso, a enzima pura deve ser imobilizada na superfície do eletrodo, mantendo sua atividade catalítica. Além de permitir a difusão de substratos e produtos para dentro e para fora da interface biocatalítica, a enzima imobilizada pode ser reutilizada, o que diminui o custo consideravelmente (TANGUTOORU et al., 2012).

## 2.4 Nanopartículas Magnéticas para imobilização da GOX

Em pouco mais de meio século de pesquisas e desenvolvimento de processos tecnológicos, inúmeras técnicas foram desenvolvidas para a imobilização de enzimas. O suporte ideal para a imobilização de enzimas deve ser insolúvel em água, se ligar facilmente à enzima e ser inerte quimicamente. Os métodos mais comuns para imobilização de enzimas se dão através de encapsulamento (em matrizes ou microcápsulas poliméricas) ou através de ligações físicas ou químicas da enzima ao suporte (BANKAR et al., 2009).

A Figura 9 ilustra a classificação dos principais métodos de imobilização de enzimas. A seleção do método de imobilização dependerá essencialmente do suporte a ser utilizado na confecção do biossensor (VIEIRA, 2006).

Figura 9 - Principais métodos desenvolvidos para a imobilização de enzimas.



Fonte: Vieira, 2006.

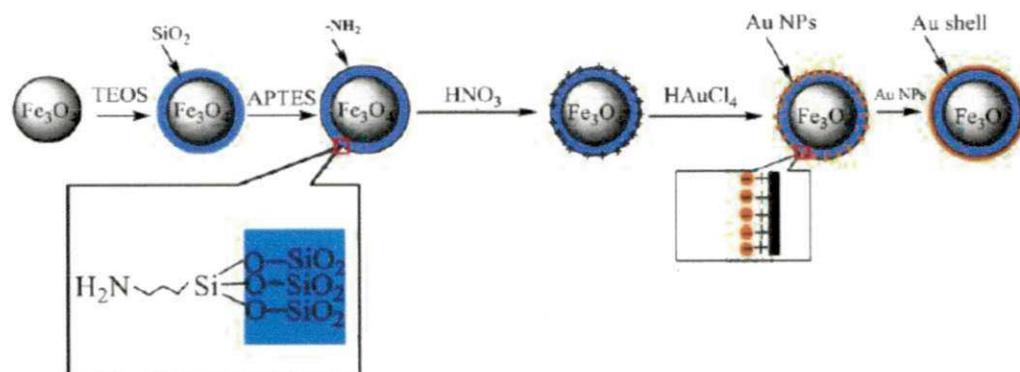
O método mais simples e rápido de imobilização enzimática é a adsorção física, o qual se baseia em interações físicas entre a enzima e a superfície onde a enzima será imobilizada. Nesse método a atividade enzimática observada é próxima à atividade natural da enzima. As principais vantagens desse método são a sua simplicidade e baixo custo experimental. (SANTOS, 2012).

Nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  são altamente compatíveis com enzimas e podem ser usadas na fabricação de sensores amperométricos de glicose. Huang et al. (2011) imobilizaram glicose oxidase (GOX) nas nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  silanizadas com o APTES e demonstraram as condições de imobilização e as propriedades da enzima imobilizada. Neste estudo, a GOX foi imobilizada via ligação covalente, o pH ótimo para a imobilização foi o de 6,5 e a quantidade de GOX imobilizada nas NPs foi 92,6% da GOX inicial o que equivale, segundo os autores, à 68mg/g da enzima imobilizada, sugerindo que estas NPs podem ser usadas em sensores enzimáticos de glicose baseados em fibras ópticas. As NPMs de  $\text{SiO}_2$  silanizadas com o APTES foram escolhidas como transportadores por serem de fácil preparação, com boa compatibilidade e grande área de superfície.

As nanopartículas magnéticas revestidas de agentes silanos podem ser usadas como carreadores ideais para imobilização enzimática devido a sua boa estabilidade em solventes orgânicos, propriedades anti-bacterianas, fácil separação e recuperação. Wang et al. (2011) demonstraram que NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  silanizadas consecutivamente com APTES + TEOS (tetraetilortosilicato) + GA (glutaraldeído) são excelentes carreadores para imobilização da GOX. Segundo os autores a imobilização da GOX nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  se deu via ligação cruzada com o GA. A reação de imobilização ocorreu em 3h com o pH 7,0. Como resultado de imobilização estes autores obtiveram 1,33mg/g da enzima imobilizada.

Feng et al. (2012) prepararam nanopartículas magnéticas monodispersas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , que posteriormente foram funcionalizadas com os agentes silanos TEOS e APTES e recobertas com ouro para formar a partícula *core-shell* (casca/núcleo), obtendo o material híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{Au}$ , ilustrada na Figura 10.

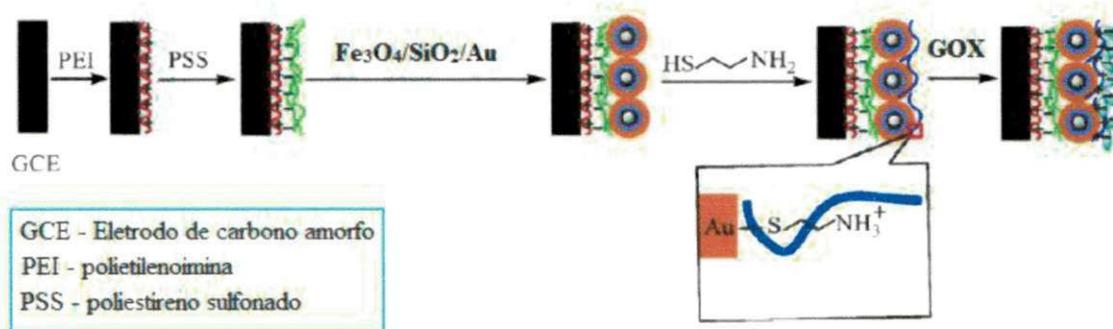
Figura 10 – Esquema ilustrativo do procedimento de preparação das nanopartículas *core-shell* Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/Au.



Fonte: Feng et al., 2012.

Estes materiais híbridos desenvolvidos por Feng et al. (2012) foram posteriormente utilizadas como matriz para a construção de um sensor de glicose, ilustrado na Figura 11. Assim, os testes de imobilização de GOX estudados por Feng et al. (2012) foram realizados utilizando-se um biossensor experimental e não um teste *in vitro*, por exemplo como a imobilização de GOX estudada por Wang et al. (2011).

Figura 11 – Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do sensor de detecção de glicose.



Fonte: Feng et al., 2012.

Feng et al. (2012) utilizaram um método eletroquímico para o teste de imobilização da GOX, o qual foi realizado por voltametria cíclica (100 mV . s<sup>-1</sup>), em uma solução anaeróbica, com pH de 7,4. De acordo com os autores, a imobilização da GOX se deu por adsorção sobre a superfície do híbrido

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{Au}$ , e que o biossensor experimental mostrou-se de ótimo desempenho, apresentando alta sensibilidade à GOX ( $3,92 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), boa reprodutibilidade de dados, resposta rápida (menos de 5s).

Yu et al. (2010) sintetizaram NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por co-precipitação e as recobriram com cloreto de polidialildimetilamônio (PDDA) para realização de imobilização de GOX. Para isto, foi preparada uma solução com as NPMs (11,8 mg/mL) e a GOX em excesso (1 mL, 10mg/mL). Em seguida a solução foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por três horas, com pH controlado em 7,0, gerando assim uma solução GOX- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com concentração aproximadamente 17,6 mg/mL. O método utilizado para a determinação da quantidade de GOX imobilizada foi a colorimetria. Neste trabalho os autores não relataram a forma como ocorreu a imobilização da GOX sobre as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , no entanto afirmaram que conseguiram imobilizar 0,1mmol/L de GOX por cada miligrama de NPMs. Ainda segundo os autores o principal problema dos biossensores enzimáticos amperométricos é a efetiva imobilização da enzima na superfície do eletrodo.

## 2.5 Agentes Silanos

Os agentes silanos, também conhecidos como silanos organofuncionais são a classe de agentes de adesão mais utilizadas no tratamento de superfícies de cargas inorgânicas, visando melhorar a interação destas com compostos orgânicos (LUNG e MATINLINNA, 2012).

Os agentes silanos têm fórmula geral  $\text{Y-Si(OR)}_3$  e podem atuar como agentes de adesão ou como co-agentes de reticulação. Estes compostos são largamente utilizados quando se quer modificar o caráter hidrofílico a hidrofóbico, fazendo com que a matriz orgânica ou inorgânica, tenha certa afinidade com biomoléculas, ou simplesmente quando é necessário promover uma adesão entre compostos orgânicos e inorgânicos (BENVENUTTI et al, 2001). Os silanos têm sido largamente utilizados como: modificadores de superfície (AIROLDI e FARIAS, 2004), adesivo em resinas dentárias (GRULLÓN, 2005) e agentes adsortivos (WANDERLEY, 2009).

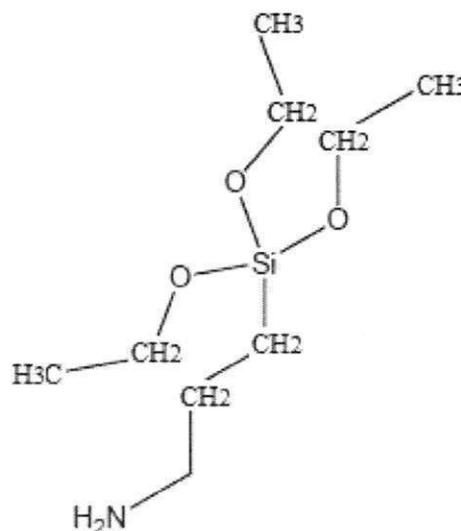
Os grupos Y (organo-funcional) e  $\text{Si(OR)}_3$  (tri-alcóxi) são altamente reativos. O tri-alcóxi permite a ligação da molécula do silano à substratos

inorgânicos, como cerâmicas, metais e vidros. Já o grupo organo-funcional, que pode conter grupos alquil, aril, vinil, amina, epóxi, metacrilato e outros, possibilita a reação da molécula com materiais orgânicos sintéticos como polímeros e naturais como as enzimas (SANTOS, 2011).

Uma vez que este trabalho visa a preparação de um material híbrido para imobilização de GOX, o agente silano a ser utilizado será o 3-aminopropiltrióxissilano ( $C_9H_{23}NO_3Si$ ) – APTES, cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 12.

Um agente silano quimicamente adsorvido sobre uma superfície inorgânica proporciona uma plataforma de reações químicas adicionais, através de uma amina ou outro grupo funcional oposto ao silano. Assim, macromoléculas, como proteínas, enzimas e DNA podem se fixar à esta plataforma, ligando-se o grupo funcional (WANG e VAUGHN, 2008).

Figura 12 – Fórmula química estrutural do 3-aminopropiltrióxissilano.



Fonte: Wang e Vaughn, 2008.

Liu et al (2004) sintetizaram NPMs de magnetita por co-precipitação e as recobriram com uma camada de sílica, proveniente do agente silano N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxissilano (AEAPS), obtendo esferas de 50 a 80 nm. O material híbrido  $Fe_3O_4/SiO_2$  foi testado na imobilização da proteína albumina bovina (BSA), a qual, segundo os autores ocorreu por ligação covalente entre a BSA e as NPMs. Para isso, BSA foi dissolvido em uma

solução tampão (5 mg/mL), com pH 7,0, e mantida sob agitação constante à 30°C por 4 h. A quantidade de BSA imobilizada foi determinada por colorimetria observando-se a absorbância medida na faixa de 280 nm, de acordo com uma curva de calibração previamente realizada para o espectrofotômetro utilizado. Segundo os autores a quantidade máxima de BSA imobilizada foi de 86mg de BSA/g de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Kanimozhi e Perinbam (2013) prepararam nanopartículas superparamagnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita) utilizando o método de coprecipitação química e funcionalizaram a superfície da mesma com 3-aminopropiltrióxissilano (APTES) visando à obtenção de nanopartículas magnéticas funcionalizadas. A lipase purificada a partir de *Pseudomonas fluorescens* (Lp1) foi imobilizada na magnetita funcionalizada usando glutaraldeído como agente acoplamento. Os resultados do estudo de caracterização revelou a imobilização da lipase com sucesso na magnetita funcionalizada por meio de ligação cruzada (*cross linking*). A magnetização de saturação das nanopartículas magnéticas foi de 28,34 emu/g, enquanto que para a nanopartícula magnética funcionalizadas foi 17,07 emu/g. A lipase imobilizada teve maior atividade em 50°C e estabilidade térmica até 70°C. A magnetita funcionalizada exibiu reutilização excelente para 4 ciclos de imobilização e estabilidade de armazenamento de até 15 dias através da retenção de 75% de sua atividade inicial.

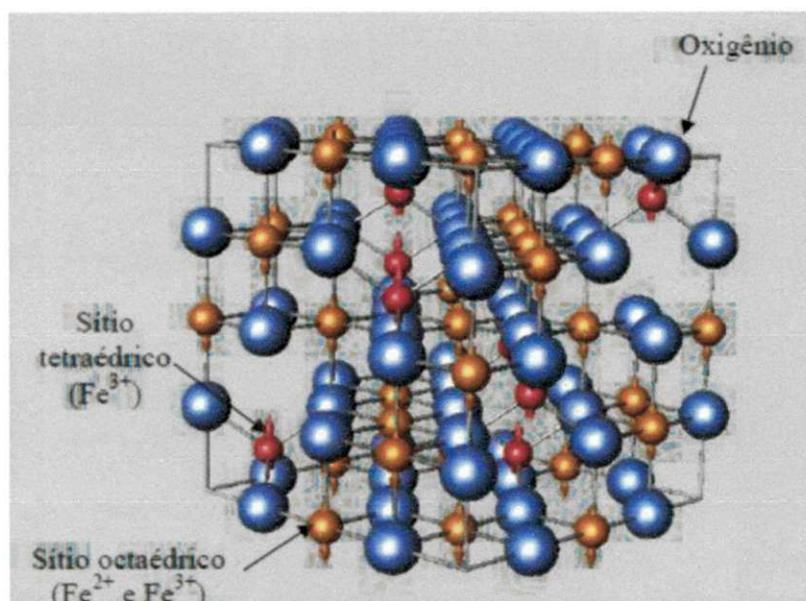
## 2.6 Magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

O óxido de ferro apresenta quatro formas polimórficas: magnetita (FeO·Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), goethita (FeO[OH]) e hematita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

A magnetita é o óxido magnético mais abundante em rochas ígneas, metamórficas e sedimentares, sendo rara a sua ocorrência na forma pura, a qual possui magnetização de saturação teórica ( $M_s$ ) de 100 J T<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> a 20 °C (MAGALHÃES, 2008). Suas propriedades magnéticas e elétricas são funções não apenas de seus raios iônicos e da valência, mas também, das propriedades químicas, morfológicas e estequiométricas. A magnetita difere dos outros óxidos por possuir em sua estrutura ferro bivalente (raio iônico 0,083 nm) e trivalente (raio iônico 0,067 nm) (CALLISTER, 2006).

A célula unitária da magnetita é formada por oito íons  $\text{Fe}^{3+}$  localizados no sítio tetraédrico (ou sítio A) e no sítio octaédrico (ou sítio B) oito íons  $\text{Fe}^{3+}$  e 8 íons  $\text{Fe}^{2+}$ , como visualizado na Figura 13. Sua fórmula pode então ser escrita da seguinte maneira  $[\text{Fe}^{3+}_8]\{\text{Fe}^{3+}_8 \text{Fe}^{2+}_8\}\text{O}_{32}$ , onde [ ] representa o sítio tetraédrico e { } o sítio octaédrico (MAGALHÃES, 2008).

Figura 13 – Representação da estrutura cristalina da magnetita.



Fonte: Magalhães (2008).

A magnetita é um material cerâmico que possui propriedade magnética ou simplesmente magnetismo e por isso é classificado como ferrimagnética. A característica mais marcante da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é a sua magnetização espontânea, ou seja, ela apresenta uma magnetização não nula, mesmo na ausência de campo externo aplicado. Em geral materiais ferrimagnéticos podem ser classificados em dois grupos: materiais duros (ímãs) e materiais moles ou doces. Geralmente esta classificação está associada à resposta magnética do material a um campo aplicado. Uma das propriedades que é utilizada para indicar os dois tipos de magnetismo é a coercividade, ou seja, o campo necessário para levar à magnetização do material a zero (CALLISTER, 2006).

Os materiais magnéticos que possuem uma coercividade alta maior que 10.000 A/m são chamados de duro, e aqueles que possuem coercividade baixa

menor que 500 A/m são chamados de moles ou doces. O requisito principal para os materiais magnéticos moles é que uma alta magnetização de saturação ( $M_s$ ) seja produzida por um pequeno campo aplicado. O campo necessário para provocar a desmagnetização também é pequeno. Em outras palavras, a área do ciclo de histerese e a perda de energia por ciclo são pequenas. Um material magnético mole opera na presença de um campo magnético. Este comportamento é de fundamental importância em aplicações que envolvem mudanças contínuas na direção de magnetização (CALLISTER, 2006).

Materiais magnéticos moles são aqueles capazes de se magnetizar e desmagnetizar facilmente apresentando curvas de histerese de aparência estreita com baixos campos coercivos e alta saturação, tendo, portanto altas permeabilidades magnéticas  $\mu$ . Este fato é devido à presença de poucas imperfeições e defeitos que constituem obstáculos ao movimento das paredes dos domínios magnéticos ou ao giro da magnetização dentro de um domínio. Igualmente, e para favorecer estes movimentos, se faz necessário baixa constante de anisotropia e de magnetização. As aplicações para este tipo de materiais podem ser vistas em transformadores, motores, geradores, equipamentos de comunicação de alta sensibilidade (ZIDARIC e MILJAVEC, 2011).

Na última década as nanopartículas de magnetita têm sido largamente estudadas para as aplicações nos campos da biologia, agronomia e medicina, inclusive para imobilização de enzimas (WU et. al., 2012) e proteínas (XU et. al., 2009), radiofarmacologia (MEDEIROS et. al., 2011), imunoenaios (HONG et. al., 2010), separação celular (CUI et. al., 2011), engenharia de tecidos (KUMARI e SINGH, 2012), purificação de RNA e DNA (MING et. al., 2009), agente de contraste para imagem de ressonância magnética (CHEN e GU, 2012), transportador de fármacos (KUMARI e SINGH, 2013) e para hipertermia magnética (QU et. al. 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Os materiais e reagentes utilizados nesta pesquisa foram:

*Processo de silanização:*

- 3-aminopropiltrióxissilano [H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] 97% (APTES) – SIGMA-ALDRICH;
- Magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) sintética fornecida pelo do Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) na forma de pó com tamanho de cristalito de 45 nm e área superficial de 6,01 m<sup>2</sup>/g;
- Tolueno – C<sub>7</sub>H<sub>8</sub> – SIGMA-ALDRICH;
- Álcool etílico – C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O – SIGMA-ALDRICH;

*Preparação do PBS:*

- Fosfato de sódio monobásico – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O – VETEC;
- Fosfato de potássio dibásico anidro – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – VETEC;

*Imobilização da GOX:*

- Reagente de Bradford- SIGMA-ALDRICH (B6916/ lote SLBB8733V)
- Glicose oxidase (GOX) – SIGMA-ALDRICH;

#### 3.2. Preparação das NPMs

As NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sintetizada por reação de combustão (COSTA et al., 2009; COSTA e KIMINAMI, 2012) como recebidas do LabSMac foram secas em estufa FANEM modelo 315 a 100°C durante 24h. Após secagem as mesmas foram peneiradas em malha ABNT 325 (abertura 45 µm) e em seguida submetidas a modificação de superfície (silanização) pelo método de refluxo com o APTES seguindo o procedimento proposto por Santos et al. (2012.) e posteriormente, encaminhadas a caracterização antes e após a silanização.

### 3.3 Silanização das NPMs

A Figura 14 apresenta um fluxograma esquemático da realização da etapa de silanização.

Figura 14 – Fluxograma da silanização das NPMs com o APTES.



Fonte: Própria, 2013.

A reação de silanização com aminopropiltrimetoxisilano adotada foi baseada na metodologia proposta por Santos et al. (2012). Em um balão de três bocas e fundo redondo com capacidade de 250 mL foram colocadas 5g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 80mL de tolueno e 5mL do APTES. Depois de uma agitação manual, submeteu-se a mistura a um sistema de refluxo sob temperatura de aproximadamente  $110^\circ\text{C}$  sob agitação magnética por 72 horas. Em seguida a solução foi transferida para tubos de ensaios em uma centrífuga FANEM

modelo baby com velocidade 500 rpm/ 30 minutos afim de promover a sedimentação das nanopartículas magnéticas.

Em seguida, lavou-se as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com álcool etílico, repetiu-se o procedimento de lavagem 10 vezes, até que fosse possível notar que após a lavagem o álcool descartado estava praticamente transparente. Para finalizar, levou-se as NPMs a uma estufa marca FANEM modelo 315 a  $150^\circ\text{C}$  durante 24h, para serem secas

### 3.4 Caracterização

#### 3.4.1 Difração de Raios X – DRX

A determinação das fases presentes, cristalinidade e o tamanho de cristalito da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), bem como da  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  obtidos após a silanização com o APTES foram determinados a partir dos dados de difração utilizando um difratômetro de raios X SHIMADZU (modelo XRD 6000, radiação Cu K). A cristalinidade foi determinada a partir da razão entre a área integrada do pico referente à fase cristalina e a área referente à fração amorfa.

O tamanho médio de cristalito foi calculado a partir da linha de alargamento de raios X ( $d_{311}$ ) mediante a deconvolução da linha de difração secundária do cério policristalino (utilizado como padrão) utilizando-se a equação de Scherrer (AZÁROFF, 1964). Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Engenharia de Materiais da UFCG.

O cálculo de tamanho de cristalito  $D_{hkl}$  foi determinado para as reflexões basais principais do material em estudo usando a equação 2 de Scherrer (AZÁROFF, 1964).

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2)$$

Onde  $k$  é o coeficiente de forma do ponto da rede recíproca (0,9-1,0),  $\lambda$  é o comprimento de onda do  $\text{CuK}\alpha$  (1,54 Å) e  $\theta$  é o ângulo de difração. O parâmetro  $\beta$  foi corrigido utilizando a seguinte equação (3):

$$\beta = \sqrt{\beta_{exp}^2 - \beta_{inst}^2} \quad (3)$$

Onde  $\beta_{inst}$  é a largura instrumental extraída de uma amostra padrão que tenha um tamanho de partícula muito grande ( $\sim 6 \mu\text{m}$ ), e  $\beta_{exp}$  é a largura experimental da amostras a ser analisada. O padrão utilizado foi o boreto de lantânio (LaB<sub>6</sub> - NIST).

### 3.4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

Os espectros de FTIR da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> foram obtidos usando um espectrômetro modelo 400 FT-IR/FT-NIR da marca Perkin Elmer, entre 4000 e 450 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4cm<sup>-1</sup> e 20 varreduras do Laboratório de Certificação de Biomateriais (CERTBIO) do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UAEMa/UFCG). Esta técnica foi utilizada para observar as bandas características dos materiais avaliados. A presença de bandas vibracionais, localizadas na região de um número de onda, indica o tipo de grupos funcionais presente na estrutura de uma molécula.

### 3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Os aspectos morfológicos da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>, foram obtidos por MEV. Para serem analisados os pós das NPMs são inicialmente dispersos em acetona. Em seguida, com um conta gota coloca-se uma gota da parte superior e uma gota da parte do meio da solução (NPMs + acetona) sobre uma gota de tinta de prata depositada sobre o porta amostra de alumínio. Após a secagem do material no porta amostra, este é recoberto com a película de ouro, atuando como meio condutor. As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca Shimadzu, modelo SuperScan SS500, do Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM) da UAEMa/ UFCG.

#### 3.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

O tamanho e a morfologia das partículas e/ou aglomerados das amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e da  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a análise foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão modelo EM420, marca Philips (voltagem de 120 KV). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do DEMa/UFSCar.

#### 3.4.5 Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas (TGA/DTA) foram obtidas em um equipamento da marca Shimadzu, modelo DTG-60 em atmosfera de nitrogênio, com fluxo 50 mL/min, com uma taxa de aquecimento de  $15^\circ\text{C}/\text{min.}$ , no intervalo de temperatura de 25 a  $1000^\circ\text{C}$ , buscando identificar a temperatura de eliminação da parte orgânica dos veículos, dos formadores de poros e as possíveis transformações de fase a elevadas temperaturas.

#### 3.4.6 Medidas Magnéticas

As caracterizações magnéticas das amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  tais como: coercividade, magnetização de saturação e magnetização remanente, foram obtidos a partir do gráfico das histereses, observando-se o comportamento das curvas nas proximidades da origem do plano cartesiano. As perdas por histerese foram determinadas pela área da curva  $M_s \times H$ . Os ciclos de histerese magnética das amostras foram obtidos utilizando um magnetômetro de gradiente alternado (AGM) do Departamento de Física da Universidade de São Paulo (DF/USP).

#### 3.4.7 Citotoxicidade

A citotoxicidade de uma amostra é determinada pela porcentagem de células que permanecem viáveis, após a exposição da população celular a diversas concentrações do extrato da substância teste. Para calcular essa

porcentagem utiliza-se um corante vital e um agente acoplador de elétrons que ao ser incorporado pela célula produz um composto de coloração específica que pode ser detectado por um espectrofotômetro. A intensidade da cor resultante da incorporação celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. Uma amostra é considerada citotóxica se a viabilidade celular (V.C.) resultante da exposição das células ao extrato de maior concentração for menor do que 70% (V.C. < 70%).

O teste de citotoxicidade das amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  foi conduzido de acordo com as normas ISO 10993-5 (*Biological Evaluation of Medical Devices – part 5 - Tests for in vitro cytotoxicity*) e ISO 10993-12 – (*Biological Evaluation of Medical Devices – part 12: Sample preparation and reference materials*), em que para a condução desse teste utilizou-se células de ovário de hamster chinês da linhagem CHO-K1 (ATCC CCL-61). Os materiais de referência utilizados foram o PEAD (controle negativo – não citotóxico) e o látex (controle positivo – citotóxico).

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório Biosíntese P&D do Brasil LTDA em São Paulo – SP de acordo com a parceria estabelecida com a Empresa JHS Laboratório Químico LTDA (JHS Biomateriais).

Para a realização do ensaio pesou-se aproximadamente 800 mg do controle negativo e do controle positivo. As amostras dos materiais de referência foram utilizados para preparar dois extratos na concentração de 200 mg/mL, em que os mesmos foram preparados de acordo com o POP\_TEC\_002 – Preparação dos Extratos.

Já a aplicação e preparação da substância em teste, no nosso caso as amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , pesou-se 1,86 g dos pós, em dois tubos de 15 mL, onde as amostras em teste foram utilizadas para preparar dois extratos na concentração de 200 mg/mL, também de acordo com o POP\_TEC\_002 – Preparação dos Extratos.

Para a condução dos testes de citotoxicidade utilizam-se como já tidas anteriormente células de ovário de hamster chinês da linhagem CHO-K1 (ATCC CCL-61), as quais foram mantidas em cultura conforme o procedimento POP\_TEC\_003 – Manutenção da Cultura Celular, até serem utilizadas no teste.

### 3.5 Teste *In Vitro* Magnético

#### 3.5.1 Preparação da Solução Tampão do PBS

Para a preparação da solução de PBS (phosphate buffered saline) 0,1M com pH 7, seguiu-se as seguintes etapas: preparou-se uma solução 27,6g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  e adicionou-se 1 litro de água deionizada. Depois preparou-se uma solução com 28,4g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 1 litro de água deionizada. Para obter um pH 7, misturou-se em um balão volumétrico de 200mL, 39mL da solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  e 61mL da solução de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , completando com 100mL de água deionizada. Após a checagem do pH em 7, acondicionou-se a solução de PBS em geladeira.

#### 3.5.2 Teste de Sedimentação

Primeiramente adicionou-se em uma cubeta de plástico de 3mL, a solução tampão PBS e 50mg das NPMs. Em seguida a cubeta foi tampada e agitada manualmente em  $180^\circ$  por 30 segundos. O tempo de sedimentação foi determinando a partir do momento em que se cessou a agitação e até o momento em que não mais se visualizou a decantação das NPMs. Posteriormente repetiu-se todo o procedimento, mas após a agitação colocou-se a cubeta sobre um ímã de neodímio com diâmetro de 1,2 cm. Novamente mediu-se o tempo de sedimentação. Usou-se como NPMs as amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  antes e após silanização.

#### 3.5.3 Teste de Separação

Em um becker de 5mL, colocou-se 3mL da solução tampão PBS e 50mg das NPM's. Posteriormente, realizou-se agitação manual rotativa com o auxílio de um bastão de vidro e logo em seguida colocou-se o sistema becker + solução de PBS + NPMs sobre o ímã. Após todas as NPMs sedimentarem, descartou-se o líquido e levou-se as NPMs para secagem em estufa FANEM modelo 315 a  $100^\circ\text{C}$  por 3h. Após decorrido este tempo, pesou-se as NPMs. Usou-se como NPMs as amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  antes e após silanização.

### 3.6 Imobilização

#### 3.6.1. Método de Determinação de Proteína

O método de Bradford é utilizado para quantificar proteínas totais solubilizadas em meios sem detergentes. Esta técnica utiliza o reagente de Bradford, cujo principal componente é o corante Coomassie brilliant blue G-250. A interação do corante com as proteínas ocasiona a mudança de coloração da solução, sendo o aumento da tonalidade relacionado ao aumento da concentração protéica (BRADFORD, 1976).

Neste trabalho, a mudança na coloração foi analisada por meio de um espectrofotômetro (marca BEL photonics, modelo SP 2000UV) no comprimento de onda de 595nm.

A concentração de uma substância em uma determinada amostra pode ser determinada através da comparação da intensidade da cor obtida nesta amostra com a intensidade da cor produzida em uma solução padrão. Para isso foi realizada uma série de determinações com concentrações crescentes da solução padrão de BSA (albumina de soro bovino) com a solução tampão PBS, medindo as suas respectivas absorbâncias, gerando assim uma curva de calibração a partir dos valores de absorbância observados, os quais encontram-se no Anexo II.

#### 3.6.2. Imobilização da GOX

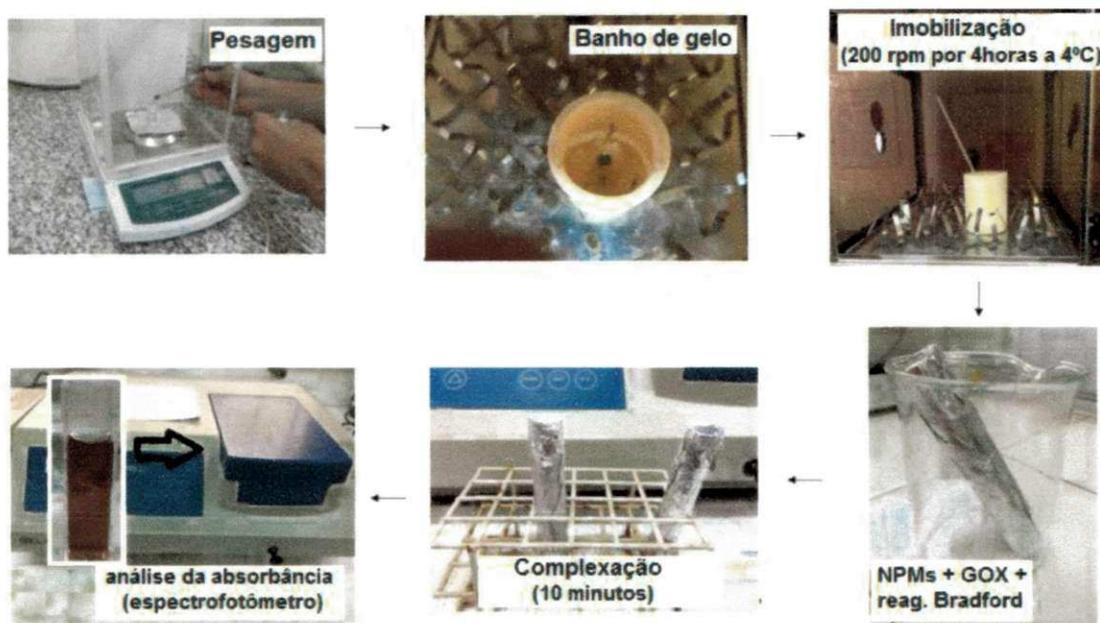
Primeiramente pesou-se 5 mg de GOX, a qual foi diluída em 100mL da solução tampão de PBS. A seguir pesou-se 3 mg das nanopartículas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ). Separou-se 1mL da solução preparada com GOX e adicionou-se as nanopartículas pesadas em um tubo de ensaio. A reação prosseguiu durante 4h em um shaker (marca Marconi, modelo MA-420) sob 4°C, pressão atmosférica de 1atm e agitação de 200rpm. Para atingirmos 4°C, a solução foi colocada em um recipiente de isopor com gelo, e a temperatura ficou sendo monitorada através de um termômetro.

Completadas às 4h, tirou-se uma alíquota de 0,2 mL da solução de GOX e adicionou-se 6 mL do reagente Bradford (de acordo com as informações do próprio reagente), cuja especificações técnicas encontram-se no Anexo III.

A solução GOX + reagente de Bradford foi acondicionada em tubos de vidro, enrolados com papel alumínio, a qual permaneceu em repouso por exatos 10 minutos, tempo necessário para que ocorresse uma interação entre o corante e a proteína. Passados os 10 minutos, 3mL da solução foram colocados nas cubetas e levados para o espectrofotômetro (marca BEL photonics, modelo SP 2000UV), onde leu-se a absorbância medida.

A Figura 15 ilustra o fluxograma de realização do teste de imobilização da GOX.

Figura 15 – Fluxograma do teste de imobilização da GOX



Fonte: Própria, 2013.

A absorbância foi medida para cada amostra em triplicata. Juntamente com os dados de absorbância e a curva de calibração feita anteriormente e apresentada no Anexo II determinou-se a concentração de GOX imobilizada pelas NPMs, as quais encontram-se detalhadas no Anexo IV.

Por meio de um balanço de massa realizado nesse sistema a quantidade de GOX imobilizada pelas NPMs foi calculada por meio da equação 4 e estes resultados encontram-se detalhados no anexo IV:

$$q = \frac{v(C_i - C_f)}{m_{ads}} \quad (4)$$

Onde:

$q$  é a quantidade de GOX imobilizada pelas nanopartículas;

$v$  é o volume da amostra

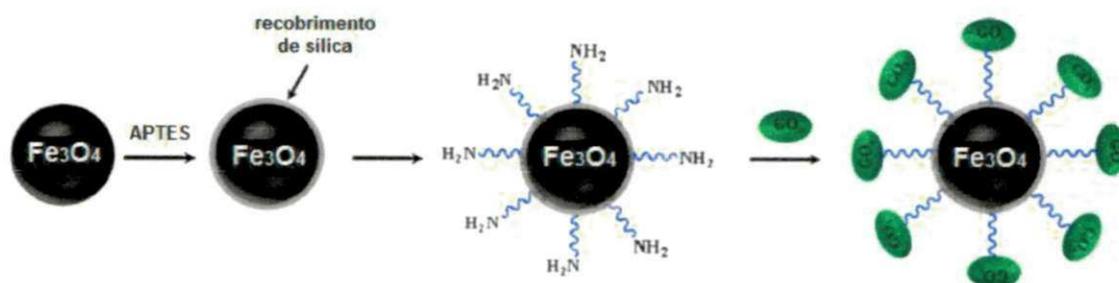
$C_i$  concentração de GOX inicial;

$C_f$  concentração de GOX após as 4 horas

$m_{ads}$  é a massa de nanopartículas utilizadas

A imobilização da GOX ocorreu de acordo com o esquema ilustrativo mostrando a imobilização da GOX utilizando as  $Fe_3O_4/SiO_2$  apresentado na Figura 16.

Figura 16 – Esquema ilustrativo da imobilização da GOX utilizando NPMs silanizadas.



Fonte: Lee et. al., 2012.

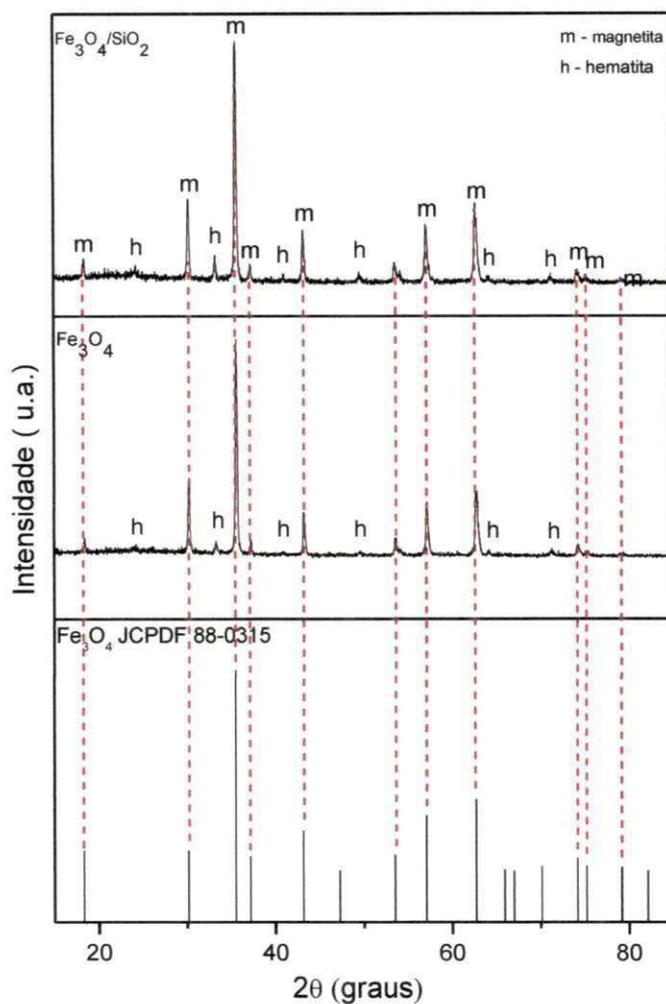
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados de caracterização (DRX, FTIR, MEV, TG e medidas magnéticas), teste *in vitro* de magnetização e imobilização da GOX da amostra de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) bem como as caracterizações da amostra da magnetita silanizada com o agente silano APTES ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ).

### 4.1 Difração de Raios X

Na Figura 17 observa-se os resultados da difração de raios X obtidos para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .

Figura 17 – Difratogramas de raios X das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .



Fonte: Própria, 2013.

Analisando o difratograma da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  observa-se que esta é composta pela fase majoritária de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), identificada pela ficha cristalográfica JCPDS 88-0315, com traços de hematita,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (Ficha JCPDS 33-0664). As fichas catalográficas encontram-se no Anexo I.

Para o espectro de difração da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , constata-se a presença das mesmas fases, indicando que o processo de silanização (modificação de superfície da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pelo acoplamento com o agente silano APTES) não alterou a estrutura da amostra. Estas mesmas características, presença de hematita como segunda fase e preservação da estrutura após a silanização também foram observadas por Kanimozhi e Perinbam (2013) quando estudaram a síntese de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  superparamagnéticas silanizadas com APTES e TEOS (tetraetilortosilicato) para uso em biossensores de imobilização da lipase em *Pseudomonas fluorescens* Lp1.

Os dados estruturais obtidos pelo DRX para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Cristalinidade tamanho de cristalito e percentual das fases para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .

Amostra	Cristalinidade (%)	Tamanho de cristalito d(311) (nm)	Fase (%) $\text{Fe}_3\text{O}_4$	Fase (%) $\text{Fe}_2\text{O}_3$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	90	45	90	10
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	88	40	84	16

Fonte: Própria, 2013.

A cristalinidade da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi maior 2,2% em relação a  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . O tamanho do cristalito foi maior 11,1% e a quantidade da fase  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi 6,7% maior, quando comparado com a  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . A quantidade de fase secundária foi menor 37,5% quando comparado a  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .

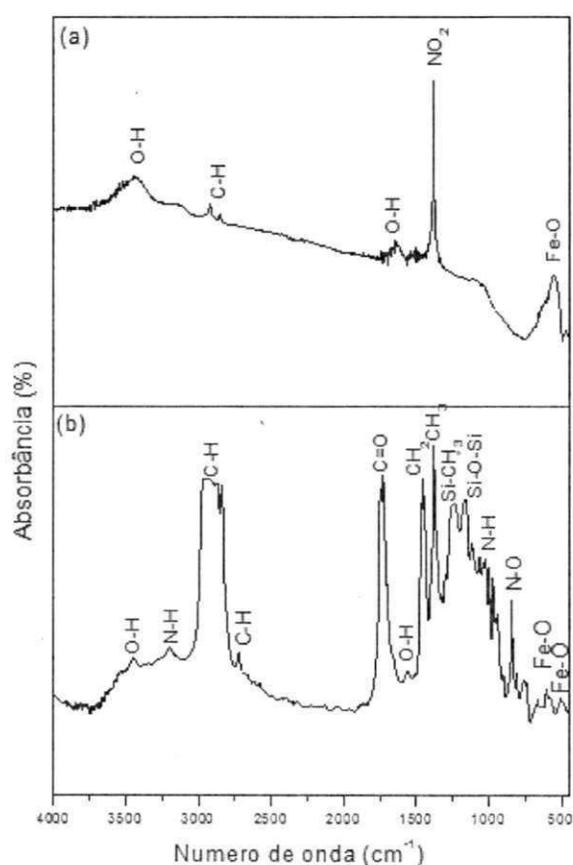
Verifica-se que os valores de cristalinidade para as duas amostras apresentaram valores extremamente próximos. Com relação ao tamanho de cristalito observa-se uma pequena redução, assim como um pequeno aumento no percentual da fase secundária e redução da fase majoritária quando comparamos a amostra silanizada ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ) com a amostra a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Esta pequena diferença está relacionada a interferência da fase amorfa do APTES no espectro de difração, o que interfere no cálculo do tamanho de cristalito e na quantificação das fases. Deve ficar evidenciado que o APTES não modifica a estrutura cristalina da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , apenas o APTES modifica a superfície da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , e deste modo é de se esperar alterações no espectro de difração o que contribui para alterações nos cálculos dos parâmetros estruturais, como cristalinidade, tamanho de cristalito e quantificação de fases.

#### 4.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

A Figura 18 ilustra os resultados do FTIR obtidos para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .

Figura 18 – Espectro de infravermelho. (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .



Fonte: Própria, 2013.

Analisando o espectro da Figura 18a observa-se que na amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  encontram-se as bandas de absorção de infravermelho descritas a seguir. Em aproximadamente  $3500$  e  $1600 \text{ cm}^{-1}$  observa-se bandas correspondentes à ligação O-H que são referentes aos grupos de hidroxilas livres ou ligados à hidrogênio, resultante da água fisicamente adsorvida e à vibração de deformação das moléculas de água interlamelares, respectivamente, a qual ocorre como resultado do uso de KBr higroscópico durante a preparação das amostra para a análise de infravermelho. Entre  $2900$  e  $2700 \text{ cm}^{-1}$  observa-se bandas atribuídas ao estiramento alifático tipo  $\text{sp}^3$  da ligação C-H, possivelmente resultado do resíduo de carbono livre proveniente do método de síntese. Em torno de  $1400 \text{ cm}^{-1}$  verifica-se uma banda intensa e estreita referente à deformações axiais assimétricas do grupo  $\text{NO}_2$  referente ao gás gerado durante a combustão; entre  $600$  e  $500 \text{ cm}^{-1}$  verifica-se bandas atribuídas às vibrações da ligação Fe-O nos sítios tetraédricos e octaédricos na estrutura do espinélio inverso da magnetita.

Na Figura 18b verifica-se que a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  apresentou as mesmas bandas de absorção no infravermelho observadas para a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (O-H, C-H e Fe-O) acrescidas das bandas descritas a seguir: de  $3450$  a  $3200 \text{ cm}^{-1}$  bandas correspondentes às absorções fracas de aminas primárias N-H; uma banda intensa e estreita referente ao estiramento da ligação C=O em torno de  $1736 \text{ cm}^{-1}$ ; uma banda correspondente à deformação angular simétrica da ligação  $\text{CH}_2$  em  $1460 \text{ cm}^{-1}$  e da ligação  $\text{CH}_3$  em  $1380 \text{ cm}^{-1}$ ; em  $1244 \text{ cm}^{-1}$  uma banda referente ao estiramento simétrico da ligação Si- $\text{CH}_3$  e ao estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si em  $1167 \text{ cm}^{-1}$ . Deve-se ainda enfatizar que estas últimas bandas observadas comprovam a presença do agente silano acoplado à estrutura da magnetita.

A Tabela 4 mostra resumidamente as bandas de absorção na região do infravermelho verificadas para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .

Deve-se ressaltar que todas as bandas de absorção que foram observadas neste trabalho, foram também visualizadas por Pingarrón et al. (2012) quando estudaram a obtenção de nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com agentes o silano APTES para aplicação em biossensores, e por Kumar et al. (2013) quando estudaram a obtenção de nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com agentes os

silanos APTES e TEOS para aplicação em nanobiocatalisadores. Assim verifica-se que os autores citados comprovaram a silanização de suas amostras pela presença das bandas C=O, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, Si-CH<sub>3</sub> e Si-O-Si.

Outro fato relevante que deve ser abordado é que todas as bandas observadas nas amostras Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> estão de acordo com a literatura especializada de caracterização de materiais por FTIR (SILVERSTEIN et al., 2007).

Tabela 4 – Bandas de absorção na região do infravermelho verificadas para as amostras Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>.

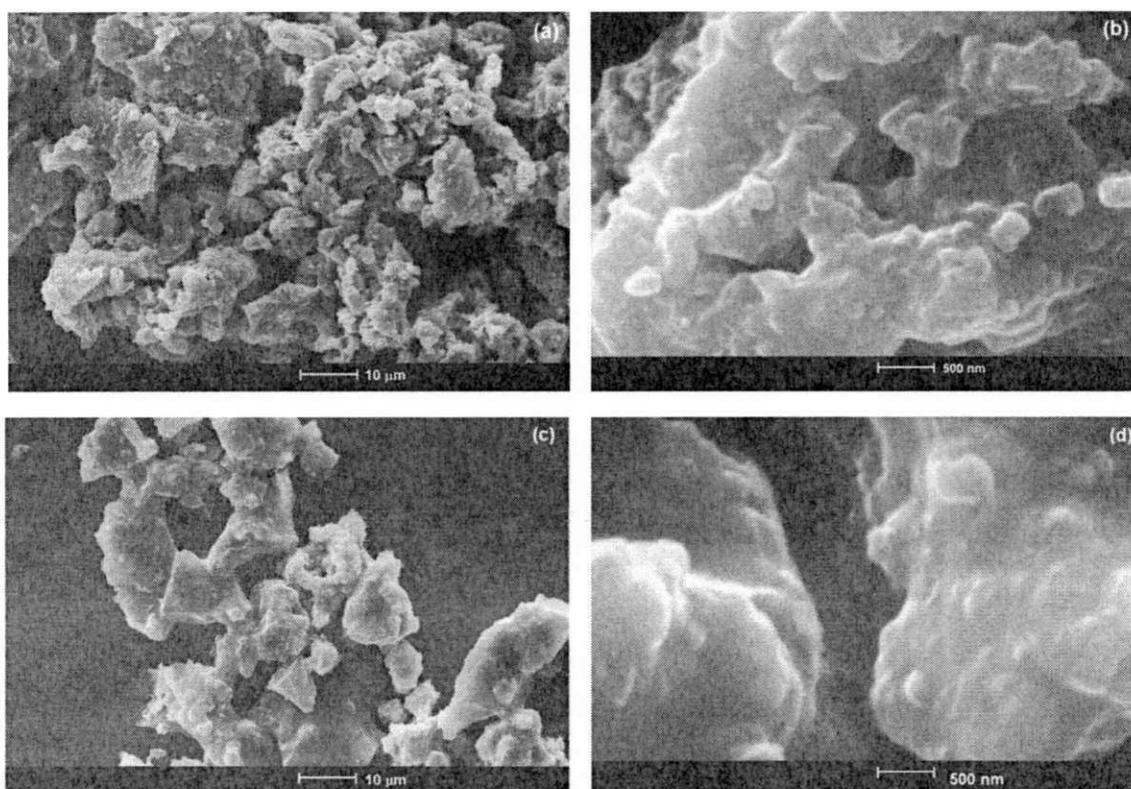
Amostra	Bandas	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	O-H	3500 e 1600	Grupos hidroxilas livres ou ligados a hidrogênio
	C-H	2900 a 2700	Estiramento alifático tipo sp <sup>3</sup>
	NO <sub>2</sub>	1400	Deformações axiais assimétricas
	Fe-O	600 a 500	Vibrações nos sítios tetraédricos e octaédricos na estrutura do espinélio inverso da magnetita
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub>	O-H	3400 e 1500	Grupos hidroxilas livres ou ligados a hidrogênio
	N-H	3450 a 3200	Absorções fracas de aminas primárias
	C-H	3000 a 2700	Estiramento alifático tipo sp <sup>3</sup>
	C=O	1736	Banda intensa e estreita referente ao estiramento
	CH <sub>2</sub>	1460	Deformação angular simétrica
	CH <sub>3</sub>	1380	Deformação angular simétrica
	Si-CH <sub>3</sub>	1244	Estiramento simétrico
	Si-O-Si	1167	Estiramento assimétrico
	N-O	800	Deformações axiais simétricas
Fe-O	600 a 500	Vibrações nos sítios tetraédricos e octaédricos na estrutura do espinélio inverso da magnetita	

Fonte: Própria, 2013.

### 4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 19 ilustra as micrografias eletrônicas de varredura obtidas para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Observando a micrografia referente à amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  contida na Figura 19a, pode-se identificar que esta amostra é constituída de aglomerados na forma de novelos e de tamanhos irregulares maiores que  $10\ \mu\text{m}$  e de aspecto poroso. Observa-se ainda, na Figura 19b, que estes aglomerados são formados por partículas interligadas por forças fortes de ligação, com baixa porosidade interpartícula e com formação de empescoamento (partículas sem e com pré-sinterização).

Figura 19 – Microscopia eletrônica de varredura. (a) e (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (c) e (d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .



Fonte: Própria, 2013.

Na micrografia referente à amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  contida na Figura 19c, observa-se que esta amostra é constituída de aglomerados na forma de blocos irregulares, com tamanho variados, em torno de  $10\ \mu\text{m}$ . Observa-se na Figura 19d que os aglomerado não apresenta aspecto poroso, indicativo que o agente silano APTES ao modificar a superfície da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , aumenta a rigidez do

aglomerado pela obstrução dos poros. Pela Figura 19d, ainda verifica-se que o aglomerado apresenta um aspecto de blocos impregnados com material amorfo, onde não é mais possível se observar a formação de empescoamento entre as partículas fortemente ligadas. Ressalta-se ainda que a silanização modificou o aspecto dos aglomerados favorecendo a uma distribuição de tamanho mais uniforme em comparação a amostra sem silanização (Figura 19c).

O aspecto dos aglomerados em forma de novelos antes da silanização e em blocos após a silanização e o tamanho das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em torno de 10  $\mu\text{m}$  apresentam as mesmas características das amostras reportadas por Lei et al. (2011) quando sintetizaram nanopartículas de magnetita silanizadas com TEOS e APTES para o desenvolvimento de um biossensor poli(GMA)-grafitizado/ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_x$  para imobilização da lipase.

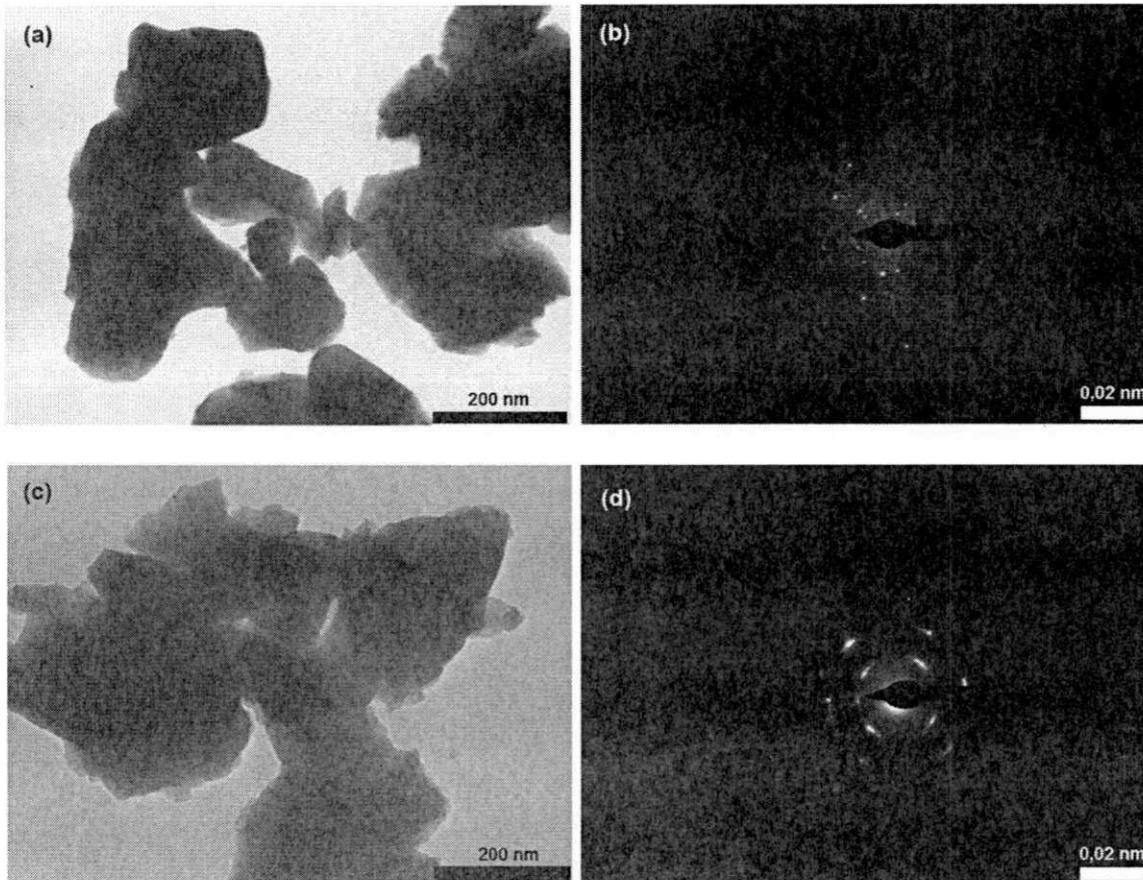
#### 4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Figura 20 ilustra as micrografias eletrônicas de transmissão obtidas para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Observa-se mediante a micrografia da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Figura 20a), que esta apresenta uma morfologia constituída de partículas de formato bem definido, com faces aproximadamente hexagonais e com tamanho variando de 70 a 349 nm, e tamanho médio de 172 nm. Também se verifica que algumas partículas estão sobrepostas e interligadas formando um pequeno aglomerado. No padrão de difração de elétrons (Figura 20b) observam-se anéis com orientação desordenada, sugerindo a presença de partículas nanométrica.

Kulkarni et al. (2013) também sintetizaram magnetita por reação de combustão, porém, utilizando como combustíveis a mistura de glicina + nitrato de amônio e observaram o mesmo formato aproximadamente esférico das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  que foram observadas neste trabalho. No entanto, comparando o tamanho de partícula obtido por MET para a amostra de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Kulkarni et al. (2013) observaram partículas em torno de 20nm, ou seja, bem menores do que as observadas nesta dissertação, 172nm, que foram sintetizadas por reação de combustão utilizando ureia como combustível. Esta discrepância no tamanho das partículas se deve provavelmente ao fato de que

as condições da síntese de combustão foram diferentes em ambas as pesquisas.

Figura 20 – Microscopia eletrônica de transmissão. (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (b) padrão de difração da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , e (d) padrão de difração da  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .



Fonte: Própria, 2013.

Nas micrografias da  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  (Figura 20c) também observa-se uma morfologia de partículas agregadas e com regiões que apresentam faces hexagonais e em outras regiões não apresenta formato definido, o que é um forte indicativo que estas partículas estejam cobertas por uma camada de  $\text{SiO}_2$ , evidenciando a presença do agente silano (APTES) interagindo com as partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como um agente de acoplamento.

O tamanho das partículas observadas variou de 163 a 325 nm, com tamanho médio de 276 nm. Indicando que a presença do silano causou um aumento em torno de 38% no tamanho médio das partículas, o que era esperado, pelo fato que o agente silano se liga covalentemente as NPMs reduzindo a tensão de superfície das NPMs e consequentemente aumentando

o tamanho da partícula. No padrão de difração (Figura 20d) observa-se anéis concêntricos, bem definidos que correspondem a família de planos  $\{hkl\}$  pertencentes à fase da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , comprovando a presença do material cristalino.

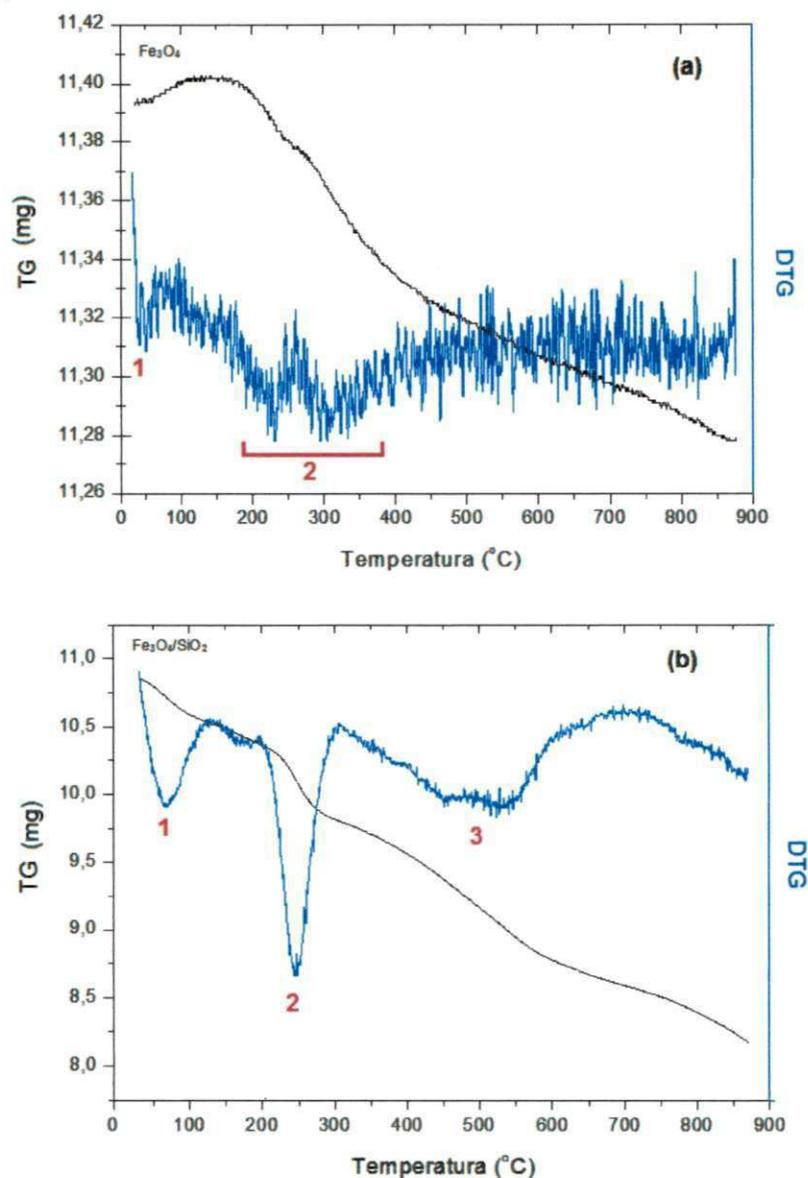
Comparando os resultados reportados nesta dissertação para o MET da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  com os resultados de Feng et al. (2012), vê-se claramente que tais autores também observaram o mesmo efeito de aglomeração das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , o que elevou o tamanho das mesma após a silanização.

#### 4.5 Análise Termogravimétrica

Na Figura 21 encontram-se as curvas termogravimétricas obtidas para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Analisando a Figura 21a, tomando-se como base a curva da DTG, observa-se que a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentou dois eventos térmicos. O primeiro evento ocorre entre 35 e 67°C e é correspondente à perda de água livre adsorvida na superfície das nanopartículas. Entre as temperaturas de 150 e 364°C, ocorre o segundo evento atribuído à transformação de fase parcial da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) para maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_3$ ) e, por conseguinte em hematita ( $\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_3$ ) causada pela oxidação dos íons de  $\text{Fe}^{2+}$  para íons  $\text{Fe}^{3+}$  que ocorre durante o processo da síntese por combustão das NPMs. Ressalta-se que tais eventos térmicos observados para amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  desta dissertação também foram reportados por Fajaroh et al. (2013) quando estudaram a estabilidade térmica de nanopartículas de magnetita recobertas por  $\text{SiO}_2$  preparadas pelo método eletroquímico.

Ainda analisando a Figura 21a, tomando-se como base agora a curva da TG, verifica-se que a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  perdeu apenas 1% de sua massa total entre as temperaturas de 35 e 871°C, mostrando-se como um material altamente estável termicamente na faixa de temperatura estudada.

Figura 21 – Curvas Termogravimétricas: (a) amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e (b) amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .



Fonte: Própria, 2013.

Analisando a Figura 21b, tomando-se como base a curva da DTG, observa-se que a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  apresentou três eventos térmicos. O primeiro evento ocorreu entre 30 e 119°C, correspondente à perda de água livre adsorvida na superfície das nanopartículas. Entre as temperaturas de 198 e 301°C, ocorreu o segundo evento atribuído à perda dos grupos funcionais C-H, C=O,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  da cadeia carbônica do agente silano (APTES). E por fim, o terceiro evento térmico entre 367 e 613°C atribuído à decomposição residual dos demais componentes do recobrimento orgânico (Si-O e N-O).

Novamente vale salientar que todos os eventos térmicos verificados desta dissertação para a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , também foram reportados por Yao et al. (2012) quando estudaram a obtenção de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  núcleo/casca (*core/shell*) suportados em grafeno para uso como material adsorvente.

Ainda analisando a Figura 21b, tomando-se como base agora a curva da TG, verifica-se que a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  perdeu cerca de 24% de sua massa total entre as temperaturas de 30 e 865°C, evidenciando o efeito de que o processo de silanização aumentou a perda de massa, o que já era esperado uma vez que as NPMs de magnetita foram recobertas por um material orgânico (APTES). Verifica-se ainda que como a perda de massa não foi total, as amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  comporta-se como um material estável termicamente na faixa de temperatura estudada, indicativo que as interações do silano com as NPMs são ligações fortes o que mantém a estabilidade do material mesmo em temperaturas elevadas.

Este efeito da maior perda de massa atribuído a silanização das NPMs também foi reportado por Pattarawarapan et. al. (2012), quando estudaram a síntese de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -diisopropilaminoacetamida silanizadas com APTES, indicando uma perda de massa total de aproximadamente 8 e 18% antes e após a silanização.

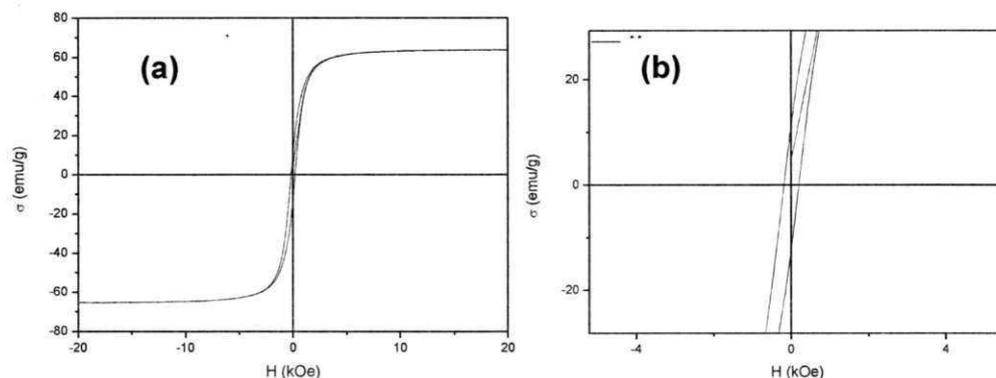
#### 4.6 Medidas Magnéticas

As Figuras 22 e 23 representam as curvas de histerese obtidas para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Por meio das Figuras 22a e 23a verifica-se que as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  tratam-se de materiais magnéticos moles devido ao laço estreito de suas curvas de histerese.

Fazendo-se uma comparação entre as curvas de histerese das Figuras 22a e 23a verifica-se que após a silanização houve uma redução significativa de 21% na magnetização de saturação ( $M_s$ ) que, para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi de 63 emu/g e para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  reduziu para 50 emu/g, no entanto, verifica-se que silanização não alterou o perfil mantendo o mesmo comportamento magnético

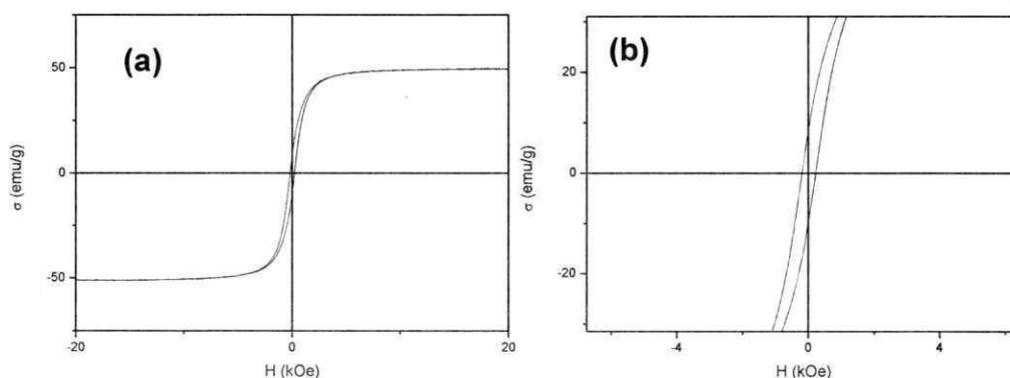
antes e após a modificação da superfície das NPM's com o agente silano APTES.

Figura 22 – Curvas de histerese da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (a) laço de histerese completo e (b) ampliação.



Fonte: Própria, 2013.

Figura 23 – Curvas de histerese da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . (a) laço de histerese completo e (b) ampliação.



Fonte: Própria, 2013.

A Tabela 5 exibe os parâmetros de histerese obtidos para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Verifica-se que apesar de ter ocorrido uma redução na magnetização de saturação após a silanização da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , como já observado na Figura 22, esta redução não modificou o comportamento magnético mole da amostra, pois se verifica que com relação ao campo coercitivo ( $H_c$ ) este continuou baixo e a baixa perda por histerese e valores de magnetização elevados foram mantidos, comprovando que a silanização não afetou na magnetização das amostras estudadas.

Tabela 5 - Parâmetros de histerese para as amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 

Amostra	$H_c$ (kOe)	$M_r$ (emu/g)	$M_s$ (emu/g)	$M_r/M_s$	$W_B$ (emu/g x Oe)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	0,18	11	63	0,17	1156
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	0,19	8	50	0,17	884

Fonte: Própria, 2013.

Ressalta-se que o fenômeno da silanização reduzir a magnetização de saturação ( $M_s$ ) sem modificar o comportamento magnético das amostras submetidas a este processo era de ser esperado, pois a presença do silano aumenta as barreiras entre as partículas o que dificulta a passagem do campo magnético, dificultando assim a orientação dos domínios magnéticos.

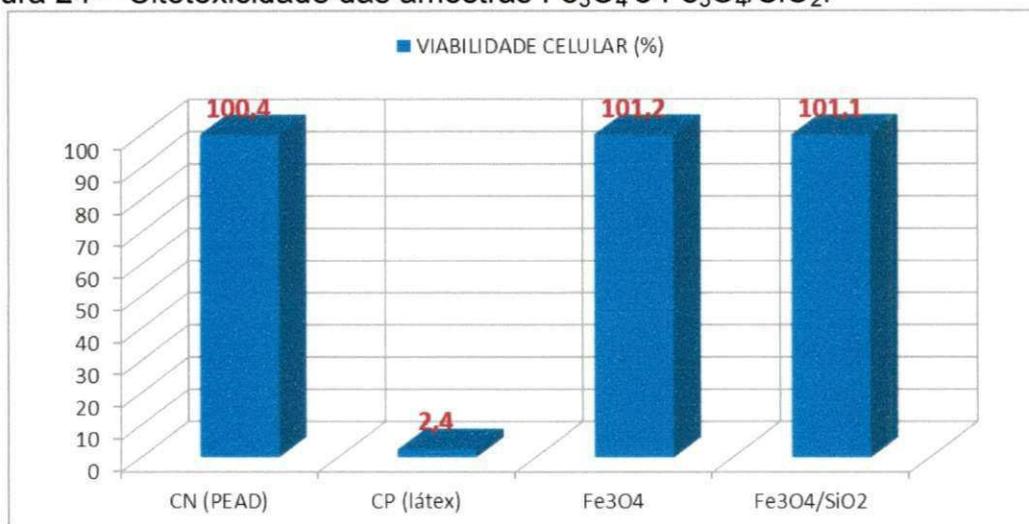
Esse comportamento também foi relatado por Kanimozhi e Perinbam (2013) quando estudaram a síntese de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  superparamagnéticas silanizadas com APTES e TEOS (tetraetilortosilicato) para uso em biossensores de imobilização da lipase em *Pseudomonas fluorescens* Lp1, em seu trabalho. Estes autores relatam que obtiveram uma magnetização de saturação de 28,34 e 17,07 emu/g para as suas amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , evidenciando que realmente a silanização provoca um decréscimo na magnetização de saturação sem modificar o laço de histerese, o que sugere que as NPMs de magnetita são promissoras para fabricação de biossensores de glicose, uma vez que, mesmo após a silanização, que recobre a superfície destas partículas com um material orgânico, a sua característica magnética não é perdida.

#### 4.7. Teste de Citotoxicidade

A Figura 24 ilustra os resultados de citotoxicidade obtidos para as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Analisando os gráficos contidos na Figura 24 verifica-se que o material utilizado como controle negativo (CN) para citotoxicidade (PEAD – polietileno de alta densidade) apresentou uma viabilidade celular de 100,4%, enquanto que o material utilizado como controle positivo (CP) para citotoxicidade (látex) apresentou uma viabilidade celular de apenas 2,4%. As amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  estudadas apresentaram

viabilidade celular de 101,2 e 101,1%, respectivamente, levemente superior ao controle negativo que foi 100,4%.

Figura 24 – Citotoxicidade das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .



Fonte: Própria, 2013.

Sabendo-se que uma amostra só é considerada citotóxica se a viabilidade celular resultante da exposição das células ao substrato for menor do que 70% (V.C. < 70%), verifica-se que as NPMs de magnetita antes e após a silanização mostraram-se não citotóxicas e ainda mais, com alta viabilidade celular, sendo esta levemente superior à do controle negativo.

Ressalta-se que a não citotoxicidade e os valores de viabilidade celular de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  observadas neste trabalho de dissertação corroboram com os resultados reportados por Shundo et al. (2012) quando estudaram a evolução da citotoxicidade de nanopartículas de magnetita em presença de células tronco embrionárias de ratos.

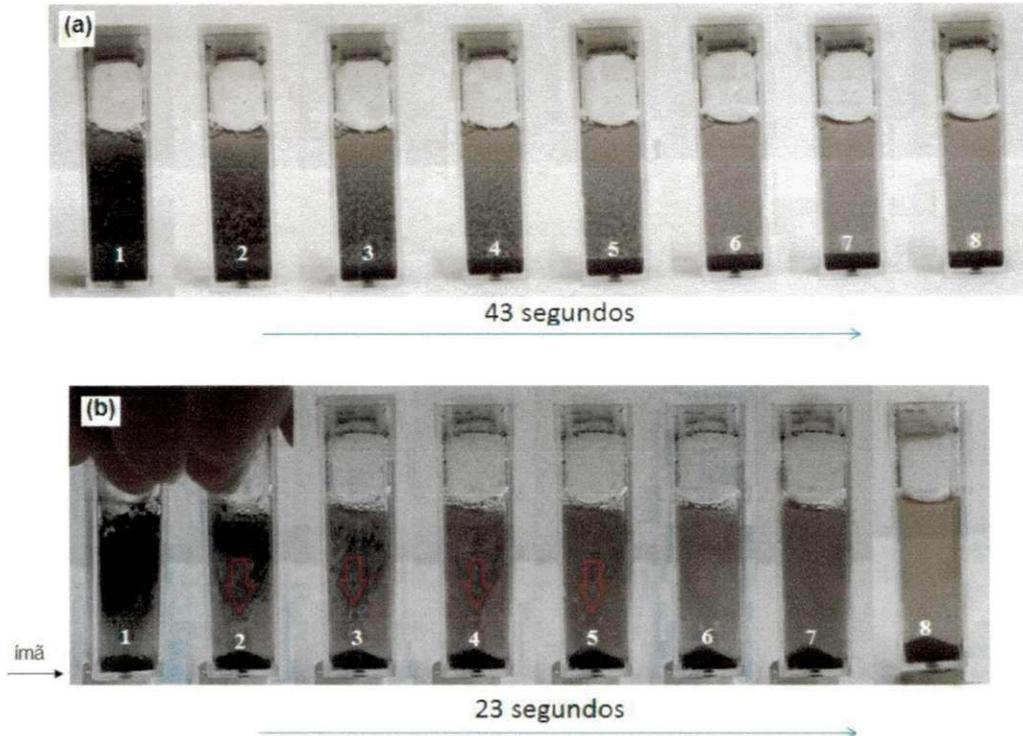
## 4.8 Teste *In Vitro* Magnético

### 4.8.1 Teste de Sedimentação

A Figura 25 ilustra os resultados obtidos para o teste *in vitro* de sedimentação e separação magnética realizado na amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Como

observado na Figura 25, com a presença do ímã o tempo de sedimentação diminuiu de 43s para apenas 23s.

Figura 25 – Teste *in vitro* magnético realizado na amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (a) sem ímã e (b) com ímã.



Fonte: Própria, 2013.

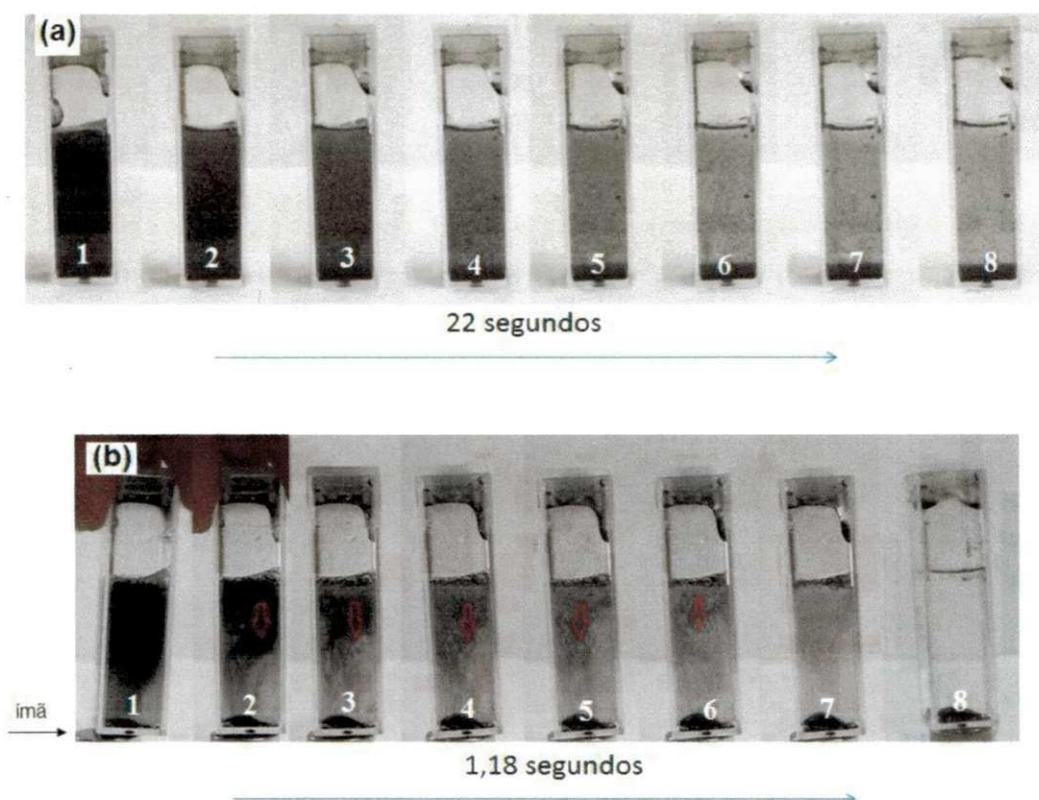
Desta forma, verifica-se que pelo alto comportamento magnético da magnetita suas partículas são fortemente atraídas pelo campo magnético induzido pelo ímã, como observado na Figura 25b que se vê claramente um fluxo de sedimentação em direção ao ímã, como indicado pela seta vermelha nas Figuras 25b2 a 25b5.

A Figura 26 mostra os resultados obtidos para o teste *in vitro* de sedimentação e separação magnética realizado na amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Como observado na Figura 26, com a presença do ímã o tempo de sedimentação diminuiu de 22s para apenas 1,18s.

Desta forma, infere-se que a silanização introduziu um caráter hidrofóbico às nanopartículas de magnetita. Isto pode ser verificado pelo fato da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  sedimentar mais rapidamente do que a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,

com ou sem a presença do ímã, evidenciando que as nanopartículas de magnetita quando silanizadas não apresentam forte interação com a água. Esta hidrofobicidade induzida pela silanização ficou fortemente evidenciada com a presença do campo magnético induzido pelo ímã, pois claramente verifica-se que na Figura 26b8 o líquido está límpido do que na 26a8.

Figura 26 – Teste *in vitro* magnético realizado na amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . (a) sem ímã e (b) com ímã.



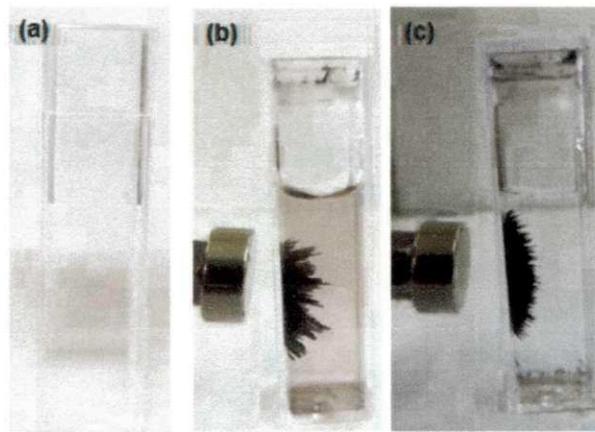
Fonte: Própria, 2013.

#### 4.8.2 Teste de Separação

A Figura 27 ilustra a solução de PBS sem as NPMs e o comportamento das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  imersas na solução de PBS com a aproximação de um ímã. Na Figura 26a observa-se que a solução de PBS sem a presença da NPMs tem aparência transparente. Nas Figuras 27b e 27c verifica-se claramente que a presença de um campo magnético externo possibilita a separação das nanopartículas das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,

do fluido no qual as mesmas estão dispersas. Verifica-se ainda que na Figura 27c a solução apresenta-se com a coloração mais próxima à da solução na Figura 27a, evidenciando que existem menos NPMs dissolvidas na solução do que na Figura 27b.

Figura 27 – Comportamento das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  com a aproximação de um ímã. (a) solução de PBS, (b) solução de PBS,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e ímã e (c) solução de PBS,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  e ímã.

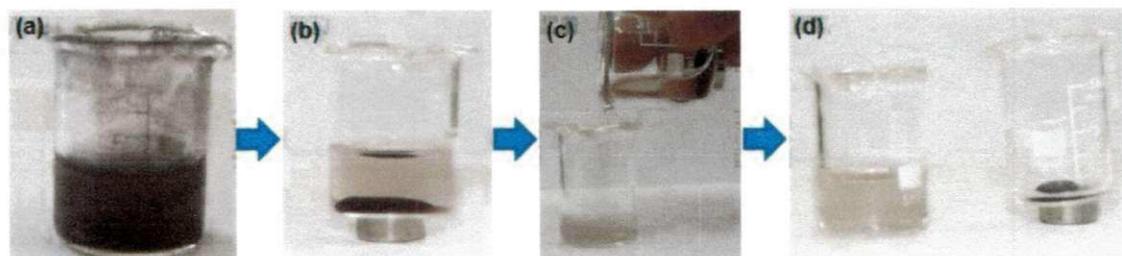


Fonte: Própria, 2013.

Assim comprova-se a possibilidade de reutilização destas amostras, como já relatado por Pattarawarapan et al. (2012) quando estudou a síntese e a caracterização de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -diisopropilaminoacetamida silanizadas com APTES para uso como marcadores magnéticos reutilizáveis.

Com o objetivo ainda de investigar o comportamento magnético das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  determinou-se a eficiência de separação destas nanopartículas quando dispersas numa solução tampão de fosfato de sódio (PBS) simulando um meio biológico, em que as Figuras 28 e 29 e a Tabela 6 ilustram os resultados obtidos.

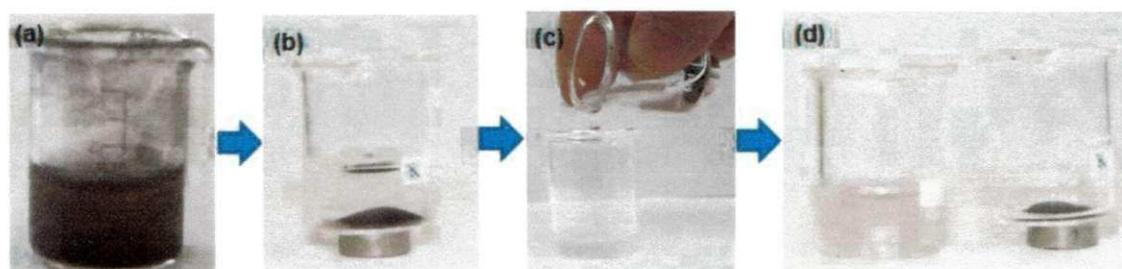
Figura 28 – Eficiência de separação da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (a) solução de PBS e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (b) solução de PBS e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em presença do ímã, (c) momento da separação da solução de PBS das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e (d) béqueres contendo a solução de PBS separada das  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .



Fonte: Própria, 2013.

Analisando a Figura 28 observa-se que imediatamente após a mistura das NPM's da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com a solução de PBS já iniciam a decantação (Figura 28a). Com a presença do ímã essa decantação é acelerada, porém parte dessas NPMs permanece dispersa, o que pode ser verificado pela coloração da solução (Figura 28b).

Figura 29 – Eficiência de separação da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . (a) solução de PBS e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , (b) solução de PBS e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  em presença do ímã, (c) momento da separação da solução de PBS das  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  e (d) béqueres contendo a solução de PBS separada das  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .



Fonte: Própria, 2013.

Por meio da análise da Figura 29 observa-se que mais uma vez a decantação instantânea das NPMs da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  em solução com o PBS (Figura 29a). Com a presença do ímã novamente essa decantação é intensificada, e verifica-se que agora a quantidade de NPMs que permanece dispersa é bem menor do que no caso da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , o que pode ser verificado pela coloração quase transparente da solução na Figura 29b.

Essa eficiência de separação diferenciada das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Eficiência de separação das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .

<b>Massa (mg)</b>			
NPMs adicionada à solução de PBS		NPMs separada da solução de PBS	
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	50	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	38
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	50	$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	45
<b>NPM's separada (%)</b>			
$\text{Fe}_3\text{O}_4$		76	
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$		90	

Fonte: Própria, 2013.

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 6 verifica-se que das 50mg da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  adicionadas à solução de PBS apenas 38mg puderam ser separadas da solução, restando 12mg dispersas na solução. Já das 50mg da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  adicionadas à solução de PBS, 45mg foram separadas da solução, restando apenas 5mg dispersas na solução. Assim, conclui-se que a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  apresentou uma eficiência de separação de 90%, enquanto que a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentou 76% de eficiência de separação, comprovando mais uma vez o caráter hidrofóbico fornecido às nanopartículas de magnetita por meio da silanização.

#### 4.9 Testes de imobilização da GOX

A quantidade de GOX imobilizada e a eficiência de imobilização das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Quantidade e eficiência de GOX imobilizada

<b>Amostra</b>	<b>q (mg de GOX/ mg de NPMs)</b>	<b>Eficiência de imobilização (%)</b>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	0,006	33,33
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	0,008	39,82

Fonte: Própria, 2013.

Analisando os resultados contidos na Tabela 7 observa-se que a magnetita pura ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) imobilizou 0,006 mg de GOX por cada 1 mg de nanopartícula, enquanto que o híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  imobilizou 0,008 mg de GOX por cada 1 mg de NPMs. Com isto, a eficiência de imobilização da GOX realizada pelo híbrido foi de 39,82%, já para a magnetita foi de 33,33%.

Desta forma, verifica-se que com relação à imobilização da GOX o híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  foi mais eficiente do que a magnetita pura ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Estes resultados estão relacionados ao tipo de mecanismo que ocorre na imobilização, ou seja, para a magnetita pura o mecanismo de imobilização é por adsorção física da GOX na superfície das NPMs, de forma a minimizar a tensão superficial existente nas NPMs. Porém este mecanismo é uma ligação fraca o que facilmente faz com que a GOX se desprenda da superfície das NPMs.

Por outro lado, no caso do híbrido o mecanismo ocorre por ligação covalente entre os grupos  $\text{NH}_2$  do APTES e a GOX (LEE et. al., 2012), o que por ser uma ligação forte a GOX se mantém imobilizada com mais eficiência.

Tal resultado corrobora com os resultados encontrados por Huang et al., (2010) quando estudou a imobilização da GOX utilizando  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  silanizada com TEOS e ativada com APTES + glutaraldeído (GA) em que obtiveram 0,13 mg de GOX imobilizada por cada 1 mg NPMs ativadas, o que segundo estes autores reflete uma eficiência de 90% de imobilização das NPMs ativadas, sendo a imobilização realizada por ligação cruzada (*cross-linking*) entre a GOX e o GA.

Os resultados de imobilização desta dissertação também estão em concordância com os estudos de Zhou et. al., (2012) que realizam imobilização de GOX usando óxido de grafeno, onde a eficiência de imobilização de GOX ativada foi de 75%, por meio da ligação covalente.

Comparando os resultados de imobilização da GOX desta dissertação com os resultados encontrados na literatura observa-se a concordância do fenômeno de maior imobilização da GOX em NPMs silanizadas, uma que vez a presença do recobrimento da sílica proveniente do agente silano realiza ligação covalente com a enzima deixando-a fixada na superfície da NPMs. Por outro lado, a imobilização da GOX na superfície da  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se dá por adsorção física, que é uma ligação fraca promovendo fácil remoção da GOX.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Foi possível obter um material híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  utilizando-se as NPMs inorgânicas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .
- A silanização das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com o agente silano 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) foi conseguida com sucesso, uma vez que mesmo tendo modificado a morfologia e a superfície das NPMs não ocasionou danos na microestrutura, não alterou o comportamento magnético da magnetita, apesar da redução magnetização de saturação das amostras silanizadas.
- As amostras de magnetita antes e após a silanização mostraram-se não citotóxicas e com alta viabilidade celular.
- No teste *in vitro* magnético as NPMs do material híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  adquiriram caráter hidrofóbico e apresentaram tempo de decantação e eficiência de separação superiores do que as NPMs não silanizadas.
- Ambas as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  possibilitaram a imobilização da glicose e verificou-se que o tipo de mecanismo de ligação entre a GOX e as NPMs, seja por adsorção física ou por ligação covalente alteram a eficiência da imobilização.
- A magnetita e o híbrido  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  são materiais imobilizadores de GOX e possuem grande potencial para o desenvolvimento de biossensores.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar concentrações variadas do agente silano nas NPMs de magnetita.
- Avaliar a eficácia da imobilização da GOX através dos testes de atividade.
- Avaliar a presença de materiais poliméricos tipo glutaraldeído e quitosana e as suas interações com as NPMs por ligações *cross link* e como isso contribui para o aumento da imobilização.
- Estudar a silanização com o TEOS e associação do TEOS com o APTES.
- Desenvolver um biossensor de glicose utilizando a magnetita e o APTES.

## REFERÊNCIAS

AIROLDI, C.; FARIAS, R. F. Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. **Química Nova**, v.27, n.1, p.84-88, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.31, n.1, p. S55-S60, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2013. **Diabetes Care**, v.36, n.1, p. S11-S66, 2013.

AZÁROFF, L. V. "X-ray diffraction studies of crystal perfection". **Progress in Solid State Chemistry**, v. 1, p. 347-379, 1964.

BANDEIRA, F.; GRAF, H.; GRIZ, L.; FARIA, M.; CASTRO, M.L. **Endocrinologia e Diabetes**, 2<sup>a</sup>. ed. Medbook, 2009.

BANKAR, S. B.; BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANANTHANARAYAN, L. Glucose oxidase – An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 489–501, 2009.

BENVENUTTI, E. V.; FOSCHIERA, J. L.; PIZZOLATO, T. M. FTIR Thermal Analysis on Organofunctionalized Silica Gel. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.12, n.2, p.159-164, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CALLISTER, W. D. Fundamentos da Ciência e Engenharia de Materiais. Uma Abordagem Integrada. Editora LTC, 2<sup>a</sup> Edição, 2006.

CASH, K. J.; CLARK, A. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 12, p. 584-593, 2010.

CHEN, X.; ZHU, J.; CHEN, Z.; XU, C.; WANG, Y.; YAO, C. "A novel bienzyme glucose biosensor based on three-layer Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> magnetic nanocomposite". **Sensors and Actuators B**, v. 159, p. 220 – 228, 2011.

CHEN, Y.; GU, H. Microwave assisted fast fabrication of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs nanocomposites and their application as MRI contrast agentes. **Materials Letters**, v. 67, n. 1, p. 49-51, 2012.

CLARK JR, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.102, p. 29-45, 1962.

COSTA, A. C. F. M.; KIMINAMI, R. H. G. A.; MORELLI, M. R. Combustion synthesis processing of nanoceramics. In: Handbook of nanoceramics and their based nanodevices (Synthesis and Processing). Ed. American Scientific Publishers, v.1, Chapter 14, p. 375-392, 2009.

COSTA, A. C. F. M. e KIMINAMI, R. H. G. A. Dispositivo para produção de nanomateriais cerâmicos em larga escala por reação de combustão e processo contínuo de produção dos nanomateriais. Depósito de patente. Revista de Propriedade Industrial – RPI, depositada em 25/01/2012, recebendo o nº BR 10 2012 002181-3.

CUI, Y. R.; HONG, C.; ZHOU, Y. L.; LI, Y.; GAO, X. M.; ZHANG, X. X. Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au magnetic nanoparticles for cell separation. **Talanta**, v. 85, n. 3, 15 September 2011, p.1246-1252, 2011.

DOLATABADI, J. E. N.; SAEI, A. A.; NAJAFI-MARANDI, P.; ABHARI, A.; LA GUARDIA, M. Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 216-227, 2013.

FAJAROH, F.; SETYAWAN, H.; NUR, A.; LENGGORO, I. W. Thermal stability of silica-coated magnetite nanoparticles prepared by an electrochemical method. **Advanced Powder Technology**, v. 24, p. 507– 511, 2013.

FENG, J. J.; WANG, A. J.; LI, Y. F.; LI, Z. H.; SUN, Y. L.; CHEN, J. R. Amperometric glucose sensor based on enhanced catalytic reduction of oxygen using glucose oxidase adsorbed onto core-shell  $\text{Fe}_3\text{O}_4@silica@Au$  magnetic nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p.1640-1647, 2012.

GOMES, M. B.; LERARIO, A. C. "Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes". 400f. Sociedade Brasileira de Diabetes Sociedade Brasileira de Diabetes, 3ª edição, Itapevi – SP, 2009.

GRULLÓN, P. G. Análise "in vitro" do efeito do agente silano em uma resina laboratorial de segunda geração na resistência adesiva ao substrato dentário utilizando dois sistemas de cimentos resinosos por meio do teste de microtração. 158 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2005.

HE, C.; LIU, J.; ZHANG, Q.; WU, C. "A novel stable amperometric glucose biosensor based on the adsorption of glucose oxidase on poly(methyl methacrylate)-bovine serum albumin core-shell nanoparticles". **Sensors and Actuators B**, v. 166 – 167, p. 802 – 808, 2012.

HONG, X.; CHU, X.; ZOU, P.; LIU, Y.; YANG, G. Magnetic-field-assisted rapid ultrasensitive immunoassays using  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZnO}/\text{Au}$  nanorices as Raman probes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 2, p. 918-922, 2010.

HUANG, E. S.; BASU, A.; O'GRADY, M.; CAPRETTA, J.C. Projecting the future diabetes population size and related costs for the U.S. **Diabetes Care**, v.32, p. 2225-2229, 2009.

HUANG, J.; ZHAO, R.; WANG, H.; ZHAO, W. Q.; DING, L. Y. Immobilization of glucose oxidase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> magnetic nanoparticles. *Biotechnology Letters*, v. 32, p. 817, 2010.

HUANG, J.; WANG, H.; LI, D.; ZHAO, W.; DING, L.; HAN, Y. A new immobilized glucose oxidase using SiO<sub>2</sub> nanoparticles as carrier. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 1374-1378, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). *Diabetes Atlas*, 5<sup>a</sup>.ed, Bruges, Bélgica: International Diabetes Federation 2011.

ISO 10993-5 – Biological Evaluation of Medical Devices – part 5 - Tests for in vitro cytotoxicity. 38p. 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM348890.pdf>

ISO 10993-12 – Biological Evaluation of Medical Devices – part 12: Sample preparation and reference materials. 13p. 2007. Disponível em: [https://marketplace.aami.org/eseries/scriptcontent/docs/Preview%20Files%5C10993-12\\_preview.pdf](https://marketplace.aami.org/eseries/scriptcontent/docs/Preview%20Files%5C10993-12_preview.pdf)

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

KANIMOZHI, S.; PERINBAM, K. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and its application in immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* Lp1. **Materials Research Bulletin**, v. 48, p. 1830–1836, 2013.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126–139, 2004.

KRONENBERG, H.; MELMED, S.; POLONSKY, K.; LARSEN, P. R. Williams Tratado de Endocrinologia, 11<sup>a</sup>ed. Elsevier, 2010.

KULKARNI, S. A.; SAWADH, P. S.; PALEI, P. K.; KOKATE, K. K. "Effect of synthesis route on the structural, optical and magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles". *Ceramics International* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.07.103>

KUMAR, K. S.; SEENUVASAN, M.; MALAR, C. G.; PREETHI, S.; BALAJI, N.; IYYAPPAN, J.; KUMAR, M. A. Fabrication, characterization and application of pectin degrading Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–SiO<sub>2</sub> nanobiocatalyst. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 2273–2279, 2013.

KUMARI, S.; SINGH R. P. Glycolic acid-g-chitosan–Pt–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles nanohybrid scaffold for tissue engineering and drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 1–2, p. 76–82, 2012.

KUMARI, S.; SINGH, R. P. Glycolic acid functionalized chitosan–Au–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hybrid nanoparticle based nanohybrid scaffold for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 244–249, 2013.

KUZUYA, T.; NAKAGAWA, S.; SATOH, J.; KANAZAWA, Y.; IWAMOTO, Y.; KOBAYASHI, M.; NANJO, K.; SASAKI, A.; SEINO, Y.; ITO, C.; SHIMA, K.; NONAKA, K.; KADOWAKI, T. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 55, p. 65–85, 2002.

LEE, H. U.; PARK, C.; KIM, S. W. Immobilization of glucose oxidase onto cobalt based on silica core/shell nanoparticles as carrier. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1282–1286, 2012.

LEI, L.; LIU, X.; LI, Y.; CUI, Y.; YANG, Y.; QIN, G. "Study on synthesis of poly(GMA)-grafted  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_x$  magnetic nanoparticles using atom transfer radical polymerization and their application for lipase immobilization". **Materials Chemistry and Physics**, v. 125, p. 866–871, 2011.

LIU, X.; XING, J.; GUAN, Y.; GUOBIN, S.; LIU, H. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 238, n. 1–3, p.127–131, 2004.

LUNG, C. Y.K.; MATINLINNA, J. P. "Aspects of silane coupling agents and surface conditioning in dentistry: An overview". **Dental Materials**, v. 28, p. 467 – 477, 2012.

MAGALHÃES, F. Síntese e Caracterização de Óxidos de Ferro e Compósitos para Aplicações no Tratamento Redox de Efluentes Aquosos. 215 f. Tese apresentada ao Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MEDEIROS, S. F.; SANTOS, A. M.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, 17 January 2011, p. 139-161, 2011.

MING, Z.; XIANQING, Z.; SEN, W.; CHAO, C.; YALI, C. A simple method for purification of genomic DNA from whole blood using  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$  composite particles as a carrier. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v. 24, n. 4, p. 239-243, 2009.

NEWMAN, J. D.; TURNER, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 2435-2453, 2005.

PATTARAWARAPAN, M.; RATTANABURI, P.; KHUMRAKSA, B. Synthesis and applications of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -diisopropylaminoacetamide as a versatile and reusable magnetic nanoparticle supported N,N-diisopropylethylamine equivalent. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p.2689-2693, 2012.

PINGARRÓN, J. M.; DÍEZ, P.; VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L. Supramolecular immobilization of redox enzymes on cyclodextrin-coated magnetic nanoparticles for biosensing applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 386, p.181-188, 2012.

QU, J.; LIU, G.; WANG, Y.; HONG, R. "Preparation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -chitosan nanoparticles used for hyperthermia". **Advanced Powder Technology**, v. 21, p. 461 – 467, 2010.

SANTOS, J. C. C. Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores. 94f. Diisertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – SP, 2012.

SANTOS, P. T. A.; SANTOS, P. T. A.; ARAÚJO, P. M. A. G.; COSTA, A. C. F. M. Nanoferritas Ni-Zn silanized with 3- aminopropyltrimethoxysilane using the reflux method. In: COLAOB Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2012.

SANTOS, P. T. A. Novos materiais híbridos a base de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  dopados com európio. 111f. Tese apresentada ao programa de Doutorado em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande-PB, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Editora LTC, 7ª edição, 2007.

SHEU, F. S.; VASHIST, S. K.; ZHENG, D.; AL-RUBEAN, K.; LUONG, J. H. T. Technology behind commercial devices for blood glucose monitoring in

diabetes management: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p. 124-136, 2011.

SHUNDO, C.; ZHANG, H.; NAKANISHI, T.; OSAKA, T. Cytotoxicity evaluation of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles in mouse embryonic stem cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 221– 225, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Métodos para avaliação do controle glicêmico. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2012-2013, AC Farmacêutica, p.110-119, 2013.

TANGUTOORU, S. M.; KOPPARTHY, V. L.; NESTOROVA, G. G.; GUILBEAU, E. J. Dynamic thermoelectric glucose sensing with layer-by-layer glucose oxidase immobilization. **Sensors and Actuators B**, v. 166– 167, p. 637– 641, 2012.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes-mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 977-986, 1993.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24-27, 1969.

UNITED KINGTON PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. **The Lancet**, v.352, p.837-853, 1998.

URBAN, G. A. Micro and nanobiosensors- state of the art and trends. **Measurement Science Technology**, v. 20, p. 1-18, 2009.

VASHIST, S. K. Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review. **Analytica Chimica Acta**, n. 750, p.16-27, 2012.

VIEIRA, N. C. S. Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ . 141f. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de Itajubá. 2006.

VILAR, L. Endocrinologia Clínica, 5<sup>a</sup>-ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013.

WANDERLEY, A. F. Vermiculitas Reestruturadas por Tratamento Ácido como Suportes para Silanos, Aminas Alifáticas e Aromáticas para Fins Adsorptivos. 140 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

WANG, H.; HUANG, J.; WANG, C.; LI, D.; DING, L.; HAN, Y. Immobilization of glucose oxidase using  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$  nanoparticles as carrier. **Applied Surface Science**. v. 257, p. 5739-5745, 2011.

WANG, W.; VAUGHN, M. W. Morphology and Amine Accessibility of (3-Aminopropyl) Triethoxysilane Films on Glass Surfaces. **Scanning**, v. 30, p.65–77, 2008.

WITT, S.; WOHLFAHRT, G.; SCHOMBURG, D.; HECHT, H.; KALISZ, H. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of  $\beta$ -D-glucose. *Journal of Biochemistry*, v. 347, p. 553–559, 2000.

WU, X. C.; ZHANG, Y.; WU, C. Y.; WU H. X. Preparation and characterization of magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CRGO}$  nanocomposites for enzyme immobilization. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 22, n. 1, p. 162-168, 2012.

XU, L.; KIM, M. J.; KIM, K. D.; CHOA, Y. H.; KIM, H. T. Surface modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a protein delivery vehicle. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 350, n. 1–3, p. 8-12, 2009.

YAO, Y.; MIAO, S.; YU, S.; MA, L. P.; SUN, H.; WANG, S. Fabrication of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles attached to graphene oxide and its use as an adsorbent. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 379, p. 20–26, 2012.

YU, C. J.; LIN, C. Y.; LIU, C.; CHENG, T.; TSENG, W. Synthesis of poly(diallyldimethylammonium chloride)-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for colorimetric sensing of glucose and selective extraction of thiol. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, p. 913-917, 2010.

ZIDARIC, B.; MILJAVEC, D. "A new ferromagnetic hysteresis model for soft magnetic composite materials". **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 323, p. 67 – 71, 2011.

ZHAO, W.; FANG, Y.; ZHU, Q.; WANG, K.; LIU, M.; HUANG, X.; SHEN, J. "A novel glucose biosensor based on phosphonic acid-functionalized silica nanoparticles for sensitive detection of glucose in real samples". **Electrochimica Acta**, v. 89, p. 278 – 283, 2013.

ZHOU, L.; JIANG, Y.; GAO, J.; ZHAO, X.; MA, L.; ZHOU, Q. Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. *Biochemical Engineering Journal*, v. 69, p. 28 – 31, 2012.

**ANEXOS**

## Anexo I – Fichas catalográficas

## a) Magnetita

88-0315		Wavelength= 1.54060					C
Fe3O4	2 $\theta$	Int	h	k	l		
Iron Oxide	18.333	103	1	1	1		
	30.158	296	2	2	0		
	35.522	999*	3	1	1		
Magnetite, syn	37.158	79	2	2	2		
Rad.: CuK $\alpha$ $\lambda$ : 1.54060 Filter:	43.173	204	4	0	0		
d-sp: Calculated	47.271	5	3	3	1		
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/lor.: 5.10	53.563	84	4	2	2		
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++	57.100	279	5	1	1		
Ref: Sasaki, S., Acta Crystallogr., Sec. B: Structural Science, 53, 762 (1997)	62.704	359	4	4	0		
	65.932	9	5	3	1		
	66.989	1	4	4	2		
Sys.: Cubic S.G.: Fd $\bar{3}m$ (227)	71.142	27	6	2	0		
a: 8.375(2) b: c: A: C:	74.188	68	5	3	3		
$\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ : Z: 8 mp:	75.193	30	6	2	2		
Ref: Ibid.	79.171	22	4	4	4		
	82.119	4	5	5	1		
	86.989	27	6	4	2		
	89.899	97	7	3	1		
Dx: 5.236 Dm:							

Peak height intensity. R-factor: 0.016. PSC: cF56. See PDF 82-1533. Mwt: 231.54. Volume[CD]: 587.43.

## b) Hematita

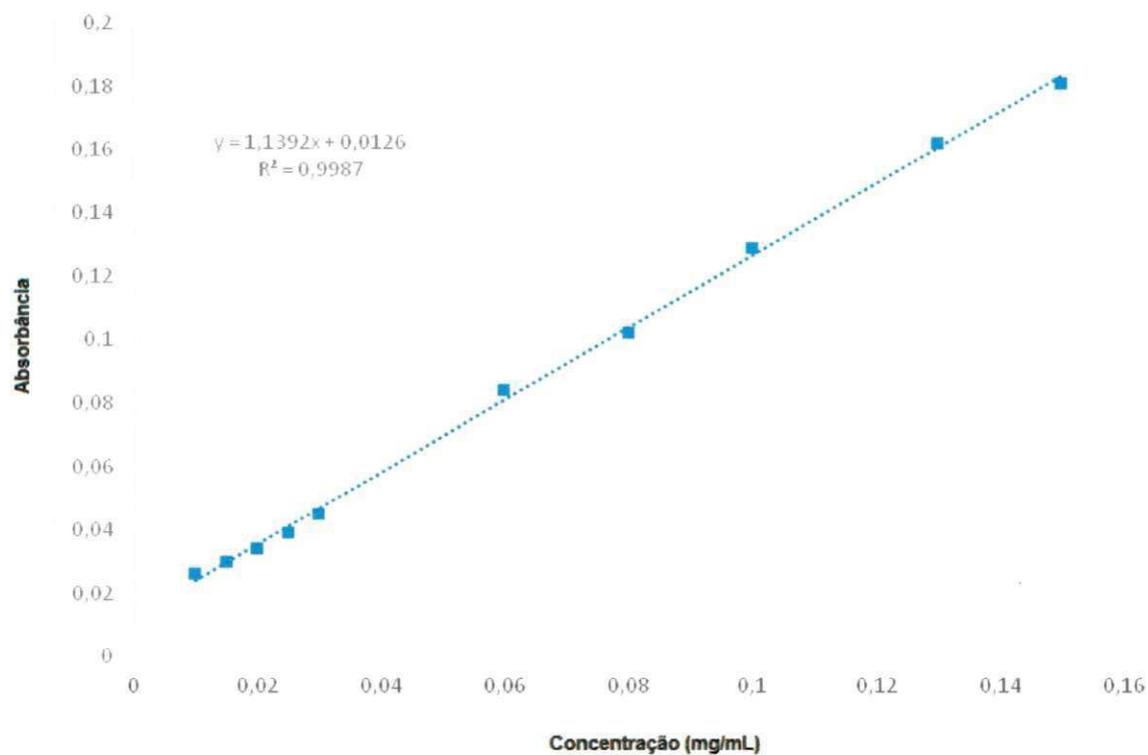
33-0664		Wavelength= 1.540598					*			
Fe2O3	2 $\theta$	Int	h	k	l	2 $\theta$	Int	h	k	l
Iron Oxide	24.138	30	0	1	2	122.431	6	4	1	6
	33.153	100	1	0	4	125.929	1	2	3	8
	35.612	70	1	1	0	128.758	3	4	0	10
Hematite, syn	39.277	3	0	0	6	131.877	5	1	2	14
Rad.: CuK $\alpha$ $\lambda$ : 1.540598 Filter: Mono	40.855	20	1	1	3	133.241	3	3	3	0
d-sp: Diff.	43.519	3	2	0	2	144.456	4	3	2	10
Cut off: Int.: Diffract. I/lor.: 2.4	49.480	40	0	2	4	147.971	4	2	4	4
Ref: Natl. Bur. Stand. (U.S.) Monogr. 25, 18, 37 (1981)	54.091	45	1	1	6					
	56.152	1	2	1	1					
	57.429	5	1	2	2					
	57.590	10	0	1	8					
Sys.: Rhombohedral S.G.: R $\bar{3}c$ (167)	62.451	30	2	1	4					
a: 5.0356(1) b: c: 13.7489(7) A: C: 2.7303	63.991	30	3	0	0					
$\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ : Z: 6 mp: 1350-1360	66.028	<1	[	1	2	5]				
Ref: Ibid.	69.601	3	2	0	8					
	71.937	10	1	0	10					
	72.262	6	1	1	9					
	75.430	6	2	2	0					
Dx: 5.270 Dm: 5.260 SS/POM: F $_{30}$ = 69(.0111, .39)	77.729	4	3	0	6					
$\omega$ : 2.94 $\eta$ : 3.22 $\epsilon$ : Sign: -2V.	78.760	2	2	2	3					
Ref: Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., 1, 529 (1944)	80.711	5	1	2	8					
	82.939	5	0	2	10					
	84.916	7	1	3	4					
	88.542	7	2	2	6					
	91.345	2	0	4	2					
	93.715	7	2	1	10					
	95.239	<1	1	1	12					
Color: Dark reddish brown	95.663	3	4	0	4					
Pattern taken at 25 C. Sample from Pfizer, Inc., New York, USA, heated at 800 C for 3 days. CAS #: 1309-37-1. Opaque mineral optical data on specimen from Elba, R1R0-30.2, RR2Re-26.1.	102.285	4	3	1	8					
Disp.=16, VHN=1038 (mean at 100, 200, 300). Color values=1, 299, 309, 29.8, 2, 299, 309, 25.7. Pattern reviewed by Syvinski, W., McCarthy, G., North Dakota State Univ., Fargo, North Dakota, USA, ICDD Grant-in-Aid (1990). Agress well with experimental and calculated patterns. Additional weak reflection [indicated by brackets] was observed. Al2O3 type. Corundum SuperGroup, corundum Group. Also called: burnt ochre, colcothar, rouge.	104.914	<1	2	2	9					
Fe2O3.Silver used as an internal stand. PSC: hR10. To replace 13-534 and validated by calculated pattern 24-72. See ICSD 64599 (PDF 79-7). Mwt: 159.69. Volume[CD]: 301.93.	106.623	5	3	2	4					
	107.025	4	0	1	14					
	108.090	5	4	1	0					
	111.518	2	4	1	3					
	113.594	2	0	4	8					
	116.044	5	1	3	10					
	117.758	1	3	0	12					
	118.697	3	2	0	14					

## Anexo II – Curva de calibração do espectrofotômetro

Dados da curva de calibração

Tubos	Conc BSA	Vol BSA	Vol Tampão	ABS
1	0,01	0,667	9,333	0,026
2	0,015	1,000	9,000	0,03
3	0,02	1,333	8,667	0,034
4	0,025	1,667	8,333	0,039
5	0,03	2,000	8,000	0,045
6	0,04	2,667	7,333	0,051
7	0,06	4,000	6,000	0,084
8	0,08	5,333	4,667	0,102
9	0,1	6,667	3,333	0,129
10	0,13	8,667	1,333	0,162
11	0,15	10,000	0,000	0,181

Curva de calibração



### Anexo III – Especificações técnicas do reagente de Bradford

Nome do produto: Reagente Bradford,

Concentração: 1 – 1,400 mg / mL de proteína .

Número do Produto: B6916

Marca: SIGMA

Armazenamento: 2 – 8°C

Aparência: amarelo ao marrom claro

Teste de aptidão adequado para a determinação de proteína

Anexo IV – Absorbância medida no espectrofotômetro e quantidade de GOX imobilizada

Tabela 8 – Absorbância medida no espectrofotômetro

Amostra	ABSORBÂNCIA MEDIDA				
	Med 1	Med 2	Med 3	Média	Desvio Padrão
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	0,0602	0,0562	0,0560	0,0575	0,0024
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	0,0460	0,0530	0,0580	0,0523	0,0060

Tabela 9 – Quantidade de GOX imobilizada

Amostra	$C_f$ (mg/mL)	$(C_i - C_f)$ (mg/mL)	$q$ (mg de GOX/ mg de NPMs)	Eficiência de imobilização (%)*
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	0,039391	0,019	0,006	33,33
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$	0,035575	0,023	0,008	39,82

\*  $[(C_i - C_f)/C_i] \times 100$