



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RAPHAEL DA SILVA EDUARDO

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-OXIDASE EM NANOPARTÍCULAS DE  
FERRITA DE COBALTO**

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira  
(UAEQ/CCT/UFCG)

CAMPINA GRANDE

2019

RAPHAEL DA SILVA EDUARDO

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-OXIDASE EM NANOPARTÍCULAS DE  
FERRITA DE COBALTO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Líbia de Sousa Conrado Oliveira.

CAMPINA GRANDE

2019

E24i

Eduardo, Raphael da Silva.

Imobilização da enzima glicose-oxidase em nanopartículas de ferrita de cobalto / Raphael da Silva Eduardo. – Campina Grande, 2019.  
100 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, 2019.  
"Orientação: Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira".  
Referências.

1. Engenharia Química. 2. Enzima Glicose-oxidase – Imobilização.  
3. Nanopartículas – Ferritas de Cobalto. I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado. II. Título.

CDU 66.0(043)


RAPHAEL DA SILVA EDUARDO

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA GLICOSE-OXIDASE EM NANOPARTÍCULAS DE  
FERRITA DE COBALTO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Campina Grande, como requisito final para a obtenção d  
grau de Doutor em Engenharia Química.

Aprovado em: 19/03/2019.

BANCA EXAMINADORA



---

Prof.ª. Dr.ª. Líbia de Sousa Conrado Oliveira (Orientadora)  
(UAEQ/CCT/UFCG)



---

Prof. Dr. Wagner Brandão Ramos  
(UAEQ/CCT/UFCG)



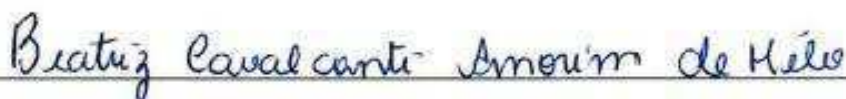
---

Dr.ª. Elvia Leal  
(Pesquisadora- CAPES/UFCG)



---

Prof.ª. Dr.ª. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa  
(UAEMa/CCT/UFCG)



---

Prof.ª. Dr.ª. Beatriz Cavalcanti Amorim de Melo  
(IFSERTÃO-PE)

*Aos meus pais, Maria do Socorro e Martinho Eduardo.*

## AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus em primeiro lugar por ser a força que me impulsiona a buscar meus objetivos sempre de maneira sensata, e por proporcionar sempre momentos de glória em minha vida.

Sou grato aos meus pais Maria do Socorro e Martinho Eduardo, ao meu irmão Eduardo, e a toda minha família, por nunca medirem esforços à busca do meu conhecimento, da minha educação e da minha felicidade, sempre me apoiando nas minhas escolhas, tornando concretos todos os sentimentos mais prazerosos e felizes.

Sou grato a Universidade Federal de Campina Grande e a Unidade Acadêmica e Engenharia Química pela minha formação quanto cidadão, sempre me guiando por caminhos desafiadores, com oportunidades ímpares de desenvolvimento de conhecimentos, proporcionando crescimento profissional e realização pessoal.

Sou grato aos meus professores pela transmissão de valores e experiências no ramo da Engenharia Química, especialmente à minha orientadora e amiga Professora Líbia, pela oportunidade de desenvolver trabalhos em parceria, por sempre me motivar, por acreditar na minha capacidade, e por sempre se fazer presente nos estágios da construção do meu conhecimento.

Sou grato aos meus amigos pelo apoio em todos os passos de minha vida, me incentivando, e me dando alento nas horas crucias. Em nomes, agradeço aos meus amigos Marina Nóbrega, Isley Virgínio, Rebeca de Almeida, Sandra Alves, Beatriz de Melo, João Neto, Geraldo Silva, Samuel Brito, Luana Nascimento, Raphael Almeida, Tamires Santos, e a todos os meus colegas da “Família LEB”.

Sou grato ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da UFCG, em nome da professora Líbia de Sousa Conrado Oliveira; ao Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da UFCG expresse minha gratidão em nome da Professora Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa, por me proporcionar todos os subsídios necessários ao desenvolvimento desse trabalho; em especial, agradeço a Polyana Tarciana, pela amizade e por estar presente nas fases desse trabalho.

Sou grato à CAPES pelo incentivo financeiro à pesquisa.

A todos que fazem parte da minha vida, que compartilham dos meus momentos, e torcem pelo meu crescimento pessoal e profissional, sou grato.

*“Tudo é uma questão de manter a mente quieta,  
a espinha ereta e o coração tranquilo!”*

*Walter Franco*

## RESUMO

A imobilização de enzimas tem se apresentado como uma estratégia promissora em processos que visam separação, recuperação e reutilização de biomoléculas. Diante da necessidade de desenvolvimento de materiais compatíveis com essas características, este trabalho tem como objetivo sintetizar e funcionalizar nanopartículas magnéticas (NPMs) do tipo ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), e utilizá-las na imobilização da enzima glicose-oxidase (GOD), com finalidade de aplicação em biosensores. As NPMs foram preparadas por reação de combustão, silanizadas pelo método de stöber com o agente organosilano tetraetilortossilicato (TEOS), e funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES); as NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{NH}_2$  foram caracterizadas por difração de raios X (DRX), distribuição granulométrica (Horiba), microscopia eletrônica de varredura (MEV), adsorção física de nitrogênio (Método BET), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), medidas termogravimétricas (TG/DTG) e medidas de magnetização (ZFC/FC). Pelos resultados obtidos, observou-se reprodutibilidade das sínteses por reações de combustão, partículas manométricas de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  entre 21nm a 25nm, com cristalinidade em torno de 60%, composição de 83,95% de ferrita de cobalto e 16,05% de hematita, área superficial de  $16,64\text{m}^2/\text{g}$ , potencial zeta de  $-49,2\text{mV}$ , perda de 2,52% em massa após análise termogravimétrica, e magnetização característica de materiais do tipo *hard*; após o recobrimento com TEOS e APTES, observou-se aumento de 3,7% do tamanho da partícula, redução de 21,7% de área superficial, potencial zeta de  $-0,2\text{mV}$ , perda de massa de 12,55%, e aumento da magnetização remanente (31,9%) e da coercividade (12,8%), mantendo boa resposta magnética. Pelos resultados de imobilização da GOD, foi verificado que a ativação com concentração de 2% de glutaraldeído, apresentou melhor resultado de capacidade adsorptiva ( $0,048\text{mgAds}_b/\text{mgAds}_v$ ) de GOD nas NPMs. O modelo de pseudo-primeira ordem previu satisfatoriamente o comportamento da imobilização a baixas concentrações; pela isoterma de adsorção, constatou-se que a concentração inicial de GOD de  $1\text{mg/mL}$  forneceu a maior carga enzimática adsorvida por grama de NPMs ( $0,048\text{mgAds}_b/\text{mgAds}_v$ ); a GOD imobilizada nas NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  apresentou atividade enzimática de  $34,3\text{U/g}$ , e após 5 ciclos de reuso, a atividade decaiu a 1/3 da inicial, mantendo-se constante após 2 ciclos consecutivos.

**Palavras-chave:** ferritas de cobalto, imobilização, glicose-oxidase.

## ABSTRACT

The immobilization of enzymes has been presented as a promising strategy in processes aimed at separation, recovery and reuse of these biomolecules. Due to the need to develop materials compatible with these characteristics, this work aims to synthesize and functionalize magnetic nanoparticles (MNPs) of the type cobalt ferrite ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), and to use them in the immobilization of the glucose oxidase enzyme (GOD), to be applied as biosensors. The MNPs were prepared by combustion reaction using iron and cobalt metal nitrates as precursors and urea as fuel, silanized by the stöber method with the organosilane tetraethylorthosilicate (TEOS), and functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES); the  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{NH}_2$  MNPs were characterized by X-ray diffraction (XRD), granulometric distribution (Horiba), scanning electron microscopy (SEM), physical nitrogen adsorption (BET method), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric measurements (TG/DTG) and magnetization measurements (ZFC/FC). The results showed reproducibility of the synthesis by combustion reactions,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  manometric particles between 21nm and 25nm, crystallinity around 60%, composition of 83.95% of cobalt ferrite and 16.05% of hematite, surface area of  $16.64\text{m}^2/\text{g}$ , zeta potential of  $-49.2\text{mV}$ , loss of 2.52% in mass after thermogravimetric analysis, and characteristic magnetization of hard type materials; after coating with TEOS and APTES, the MNPs showed 3.7% increase in particle size, 21.7% surface area reduction, zeta potential of  $-0.2\text{mV}$ , mass loss of 12.55%, and remaining magnetization (31.9%) and coercivity (12.8%), maintaining a good magnetic response. By the immobilization results of the GOD, it was verified that the activation with a concentration of 2% of glutaraldehyde, presented better adsorptive capacity result of GOD in the NPMs ( $0.048\text{ mg}_{\text{Adsb}}/\text{mg}_{\text{Adsv}}$ ). The proposed pseudo-first order model predicted the immobilization behavior satisfactorily to low concentrations; by the adsorption isotherm, it was found that the initial GOD concentration of  $1\text{ mg} / \text{mL}$  provided the highest adsorbed enzymatic load per gram of NPMs ( $0.048\text{ mg}_{\text{Adsb}}/\text{mg}_{\text{Adsv}}$ ); the GOD immobilized in the  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{NH}_2$  NPMs showed enzymatic activity of  $34.3\text{U/g}$ , and after 5 cycles of reuse, the activity decreased to 1/3 of the initial, remaining constant after 2 consecutive cycles.

**Keywords:** cobalto ferrit, immobilization, glucose-oxidase.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Magnetização (ZFC/FC) em função da temperatura (a) de um composto magnético macroscópico, com curvas de magnetização (histerese) características em função do campo magnético no estado ferromagnético ( $T < T_C$ ) e paramagnético ( $T > T_C$ ); (b) (a) de nanopartículas magnéticas, com curvas de magnetização (histerese) características em função do campo magnético no estado bloqueado ( $T < T_B$ ), superparamagnético ( $T_B < T < T_C$ ) e paramagnético ( $T > T_C$ ). Os estado bloqueado e superparamagnético só são observados em sistemas nanométricos. \_\_\_\_\_ **27**
- Figura 02:** Esquema de uma estrutura representativa de ferrita do tipo espinélio, com os átomos de oxigênio (vermelhos), os sítios tetraédricos (amarelos), e os sítios octaédricos (verdes). \_\_\_\_\_ **28**
- Figura 03:** Mecanismo de reação do processo de crescimento de sílica pelo método de Stober. \_\_\_\_\_ **35**
- Figura 04:** Mecanismo de reação proposto para etapa de formação de oligômeros funcionais na funcionalização com APTES das NPMs de ferrita de cobalto silanizadas com TEOS. \_\_\_\_\_ **37**
- Figura 05:** Representação da reação da Glicose-oxidase (GOD). \_\_\_\_\_ **39**
- Figura 06:** Estrutura da Glicose-oxidase (GOD) de *Asperillus Níger*. \_\_\_\_\_ **40**
- Figura 07:** Reação de acoplamento entre um suporte de alquilamina e glutaraldeído seguido por acoplamento do reagente ativado à proteína. \_\_\_\_\_ **43**
- Figura 08:** Fluxograma da síntese química das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . \_\_\_\_\_ **47**
- Figura 09:** Fluxograma da etapa de silanização das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . \_\_\_\_\_ **48**
- Figura 10:** Fluxograma da etapa de funcionalização das NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  silanizadas. \_\_\_\_\_ **49**
- Figura 11:** Fluxograma da metodologia adotada na imobilização da enzima GOD nas NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . \_\_\_\_\_ **53**
- Figura 12:** Difractogramas de raios X das amostras  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$  comparados aos padrões JCPDF 33-0664, JCPDF 22-1086 e JCPDF 88-0315. \_\_\_\_\_ **57**
- Figura 13:** Distribuição granulométrica das amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . \_\_\_\_\_ **59**

<b>Figura 14:</b> Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) da $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . _____	<b>62</b>
<b>Figura 15:</b> Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) da $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>62</b>
<b>Figura 16:</b> Imagens da amostra de $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ obtidas por MEV. _____	<b>64</b>
<b>Figura 17:</b> Imagens da amostra de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ obtidas por MEV _____	<b>65</b>
<b>Figura 18:</b> Gráficos de TG/DTG das amostras de (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ e (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>66</b>
<b>Figura 19:</b> Curvas de magnetização (histerese) das amostras de $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>67</b>
<b>Figura 20:</b> Imagens da sedimentação das partículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ no decorrer do tempo de análise. _____	<b>69</b>
<b>Figura 21:</b> Curvas cinéticas de adsorção da GOD, na concentração de 0,05mg/ml. _____	<b>72</b>
<b>Figura 22:</b> Isoterma de adsorção a 4°C da GOD nas NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>74</b>
<b>Figura 23:</b> formação do complexo de quinoneimina durante os testes de atividade da GOD, no intervalo de tempo de 20 minutos, para as NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ com GOD imobilizada (a) e para NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ sem presença de GOD adsorvida. _____	<b>77</b>
<b>Figura 24:</b> Percentual de perda de atividade em relação aos ciclos de reuso da enzima imobilizada nas NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Parâmetros avaliados durante a síntese das NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ obtidas por reações de combustão. _____	<b>56</b>
<b>Tabela 02:</b> Cristalinidade e tamanho de cristalito para o pico de maior intensidade (311) para as NPMs. _____	<b>58</b>
<b>Tabela 03:</b> Índices de tendência central do tamanho de partícula das NPMs $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>59</b>
<b>Tabela 04:</b> Valores de área superficial específica ( $S_{\text{BET}}$ ), volume de poro ( $V_p$ ) e diâmetro de poro ( $D_p$ ) das amostras em estudo. _____	<b>60</b>
<b>Tabela 05:</b> Valores do potencial Zeta das amostras $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>61</b>
<b>Tabela 06:</b> Parâmetros magnéticos referentes às NPMs $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . _____	<b>68</b>
<b>Tabela 07:</b> Concentração de GOD após imobilização nas NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ativadas em diferentes concentrações de glutaraldeído. _	<b>70</b>
<b>Tabela 08:</b> Concentração de GOD após imobilização nas NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ativadas com glutaraldeído a 2%, em diferentes tempos de ativação. _____	<b>71</b>
<b>Tabela 09:</b> Valores da capacidade de adsorção ( $\text{mg}_{\text{Ads b}}/\text{mg}_{\text{Ads v}}$ ) e do tempo (min) em equilíbrio, e da constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ) da GOD nas NPMs $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , para concentrações de 0,05mg/ml, 0,5mg/ml e 1,0mg/ml. _____	<b>73</b>
<b>Tabela 10:</b> Parâmetros de adequação aos modelos de isotermas de adsorção. _____	<b>75</b>
<b>Tabela 11:</b> Valores de atividade enzimática para GOD imobilizada nas NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , e o decaimento de atividade relativo à enzima livre e aos ciclos de reuso. _____	<b>78</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Abs** – Absorbância
- AFM** – Antiferromagnético
- APTES** - Agente silano 3-aminopropiltriétoxissilano
- BET** – Método de determinação de área superficial
- DRX** - Difração de raios X
- FAD** – Dinucleotídeo de flavina-adenina
- FM** – Ferromagnético
- FTIR** - Espectroscopia na região do infravermelho cpor transformada de Fourier
- GOD** – Glucose-oxidase
- H<sub>c</sub>** – Campo coercivo
- LabSMaC** – Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos
- LabTer** – Laboratório de Análises Térmicas
- LCM** – Laboratório de Caracterização de Materiais
- LEB** - Laboratório de Engenharia Bioquímica
- LEN** – Laboratório de Ensaios Destrutivo e não Destrutivo
- MEV** – Microscopia eletrônica de varredura
- M<sub>r</sub>** – Magnetização remanente
- M<sub>s</sub>** – Magnetização de saturação
- NFs** – Nanoferritas
- nm** – nanômetro
- NPMs** - Nanopartículas magnéticas
- PBS** – Tampão fosfato
- PM** – Paramagnético
- POD** – Peroxidase
- RM** – Ressonância magnética nuclear
- TEOS** – Tetraetilortossilicato
- TGA** - Análise termogravimétrica
- UAEMA** – Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
- UNIFEI** – Universidade Federal de Itajubá
- UFCG** – Universidade Federal de Campina Grande
- USP** – Universidade de São Paulo
- ZFC/FC** – Medidas magnéticas

## LISTA DE SÍMBOLOS

**AB<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** – Estrutura do tipo espinélio normal

**C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>** – Fórmula molecular do glutaraldeído

**CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** – Ferrita de cobalto

**CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>** – Ferrita de cobalto silanizada com TEOS.

**CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>** – Ferrita de cobalto silanizada com TEOS e funcionalizada com

**COOH** – Grupo carboxílico

**D** – Tamanho de cristalito

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**mV** - Milivolts

**NH<sub>2</sub>** – Grupo amino

**OH** – Grupo hidroxila

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**U** – Unidade de atividade enzimática

**W** - watts

**λ** – Comprimento de onda da radiação eletromagnética (Cu K = 1,5406)

**μ<sub>at</sub>** – Dipolo magnético finito

**°C** – Grau celcius

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
2.1. Objeto geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
<b>3. Fundamentação teórica.....</b>	<b>22</b>
3.1. Nanotecnologia.....	22
3.1.1. Nanopartículas magnéticas.....	23
3.1.1.1. Magnetismo.....	24
3.1.2. Ferritas.....	27
3.1.2.1. Ferritas de cobalto.....	29
3.1.2.2. Silanização.....	31
3.1.2.2.1. Nanopartículas core-shell.....	33
3.1.2.2.2. Método de Stober.....	34
3.1.2.3. Funcionalização.....	36
3.2. Enzimas.....	38
3.2.1. Glicose-oxidase.....	39
3.2.1.1. Parâmetros cinéticos e de capacidade de adsorção.....	40
3.2.1.2. Atividade enzimática.....	41
3.2.2. Imobilização de enzimas.....	42
3.2.2.1. Imobilização da glicose-oxidase.....	43
<b>4. Materiais e métodos.....</b>	<b>45</b>
4.1. Materiais.....	45
4.1.1. NPMs de ferrita de cobalto.....	45
4.1.2. Silanização e funcionalização das NPMs.....	45
4.1.3. Imobilização da glicose-oxidase.....	45
4.1.4. Atividade enzimática.....	46
4.2. Preparação das NPMs de ferrita de cobalto.....	46
4.2.1. Silanização das NPMs.....	47
4.2.2. Funcionalização das NPMs.....	48
4.3. Caracterização das NPMs.....	49
4.3.1. Difração de raiosX (DRX) .....	49
4.3.2. Análise textural.....	49

4.3.3. Distribuição granulométrica.....	50
4.3.4. Potencial zeta.....	50
4.3.5. Espectrometria na região do infravermelho por transformada de fourier (FTIR) .....	50
4.3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	51
4.3.7. Análise termogravimétrica (TG/DTG) .....	51
4.3.8. Medidas magnéticas.....	51
4.3.9. Testes de sedimentação.....	51
4.4. Imobilização da glicose oxidase em NPMs de ferrita de cobalto.....	52
4.4.1. Determinação de proteínas livres.....	52
4.5. Atividade enzimática.....	54
4.6. Testes de reuso.....	55
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>56</b>
5.1. NPMs de ferrita de cobalto.....	56
5.1.1. Parâmetros de síntese por reação de combustão das NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .....	56
5.1.2. Difração de raiosX (DRX) .....	56
5.1.3. Distribuição granulométrica.....	58
5.1.4. Análise textural.....	60
5.1.5. Potencial zeta.....	61
5.1.6. Espectrometria na região do infravermelho por transformada de Ffourier (FTIR) .....	62
5.1.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	64
5.1.8. Análise termogravimétrica (TG/DTG) .....	66
5.1.9. Medidas magnéticas.....	67
5.1.10. Testes de sedimentação.....	69
5.2. Imobilização da glicose oxidase em NPMs de ferrita de cobalto.....	70
5.2.1. Pré-tratamento das NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ com glutaraldeído.....	70
5.2.2. Acompanhamento da cinética de imobilização da GOD - Determinação de parâmetros cinético .....	71
5.2.3. Isoterma de adsroção.....	73
5.3. Atividade enzimática.....	76
<b>6. Conclusões parciais.....</b>	<b>80</b>
<b>7. Sugestões para trabalhos futuros.....</b>	<b>82</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>83</b>

## 1. Introdução

As pesquisas na área de nanotecnologia vêm se intensificando ao longo do tempo, sendo responsáveis por importantes avanços tecnológicos e científicos no desenvolvimento de novos materiais e processos. A variação de escala, obtida pela diminuição de tamanho da partícula, possibilita o estudo de novos fenômenos de interface, o que ocasiona propriedades químicas e físicas diferentes das observadas em partículas micro ou macroscópicas similares, proporcionando o surgimento de novas categorias de materiais e conseqüentemente inovações em processos de diversos ramos do conhecimento, dinamizando assim a aplicabilidade dessas partículas.

Conceitualmente, a nanotecnologia se enquadra no campo do estudo de materiais, sistemas ou dispositivos, que possuem pelo menos uma de suas dimensões de escala “nano”, a qual se refere a um bilionésimo de metro, aplicados a agregados de átomos em um intervalo compreendido entre 1 e 100 nanômetros em relação ao seu diâmetro. A capacidade de criar estruturas de dimensões em nanoescala conduz a materiais com propriedades únicas (PARAK et al., 2015).

Nessa vertente, as nanopartículas magnéticas apresentam vasta aplicabilidade devido à presença de propriedades superparamagnéticas, apresentando a magnetização apenas na presença de um campo magnético sem, contudo, permanecerem magnéticas com a remoção desse campo, sendo essas propriedades observadas unicamente em escala nanométrica. Fazem parte deste grupo as ferritas, as quais apresentam comportamento superparamagnético e formam fluidos magnéticos, caracterizados quando as partículas e a fase líquida movimentam-se como uma única fase (LUQUEZE, 2006).

Ferritas são óxidos de ferro apresentando sítios em uma estrutura cristalina de ânions de oxigênio, com cátions de ferro nos interstícios de uma geometria octaédrica ou tetraédrica. A ferrita de cobalto possui um grande interesse tecnológico devido as suas propriedades magnéticas (AJROUDI et al., 2014), podendo ser aplicada como ferrofluido (AMMAR et al., 2001), carregador de fármaco (WU et al., 2011) e em imagem por ressonância magnética (SHELLOCK, 2002), apresentando também estabilidade química e dureza mecânica, fazendo da ferrita de cobalto um material promissor para ser utilizado em várias áreas tecnológicas (CULLITY e GRAHAM, 2011). Outra aplicação importante desse material é no



processo de separação e seleção de moléculas específicas contidas em grandes volumes de solução, que atualmente representa um grande problema para os processos biotecnológicos. É neste campo que o uso de adsorventes magnéticos ou magnetizáveis ganha notoriedade; neste procedimento, o adsorvente magnético é adicionado a uma solução ou suspensão com o alvo. Este se liga ao adsorvente magnético, podendo o complexo ser recolhido da suspensão, ou ocorrer reações de superfície e posterior recuperação do adsorvente por meio de um sensor magnético apropriado (KNOBEL e GOYA, 2004).

Atualmente é indispensável o desenvolvimento de estratégias de proteção e estabilização química da superfície das nanopartículas, seja durante ou após sua síntese. As diferentes camadas de proteção são utilizadas não somente para estabilizar as nanopartículas, mas para conferir a estas uma funcionalização adicional de acordo com as aplicações desejadas, tornando-as, por exemplo, biocompatíveis, biosseletivas, interagentes ou, mais recentemente, conferindo as nanopartículas magnéticas um conjunto de múltiplas características e propriedades, sendo estas denominadas de nanopartículas multifuncionais, aplicadas a exemplo na imobilização de biomoléculas (GUPTA e GUPTA, 2005; JEONG et al., 2007).

Entre as biomoléculas de interesse industrial que podem ser imobilizadas destacam-se as enzimas e entre elas a glicose-oxidase (GOD) por sua vasta aplicação, a exemplo de melhorias em cor, sabor, e conservação de alimentos (HATZINIKOLAOU et al., 1996), principalmente em biossensores para a detecção e estimativa de glicose em soluções industriais e em fluidos corporais tais como sangue e urina (PETRUCCIOLI et al., 1999), e em sensores de glicose implantáveis aplicados em pacientes com diabetes (GERRITSEN et al., 2001). O uso de glicose-oxidase com propriedades promissoras para aplicações em biotecnologia, continua tendo considerável interesse, apesar da abundante disponibilidade de GOD comercial (RANDO et al, 1997).

Enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos que atuam como catalisadores em processos bioquímicos (FELLOWS, 1994); são proteínas especializadas em catalisar reações biológicas, ou seja, aumentam a velocidade de uma reação química sem interferir no processo. Elas estão associadas a biomoléculas, devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico. A enzima Glicose-oxidase, a exemplo, catalisa a oxidação de  $\beta$ -D-glicose

em ácido glucônico, utilizando oxigênio molecular como um receptor de elétrons, com produção simultânea de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

A imobilização de uma enzima significa que ela foi confinada ou localizada para que ela possa ser reutilizada continuamente. Existem várias razões pelas quais a imobilização pode ser desejável: para processos com enzimas isoladas, uma enzima imobilizada pode ser mantida no reator. Em solução, por outro lado, algumas enzimas deixarão o reator com o produto final; com isso, não só as novas enzimas devem ser introduzidas para substituir as perdidas, mas também enzimas no produto podem ser impurezas indesejáveis que devem ser removidas. Outra vantagem apresentada é que as enzimas imobilizadas podem manter suas atividades por períodos mais longos do que as que estão livres em solução. A imobilização por ligação covalente, método químico de imobilização, geralmente começa com uma modificação de superfície como primeiro passo de ativação. A silanização é uma estratégia amplamente utilizada para a modificação inicial da superfície de suportes inorgânicos (BAILEY e OLLIS, 1986).

Ao se imobilizar uma enzima, podem ocorrer algumas mudanças estruturais, alterando assim suas propriedades e atividade até certo ponto. Assim sendo, uma vez que as enzimas são altamente sensíveis, sua imobilização requer uma metodologia adequada para manter ou eventualmente melhorar suas propriedades como estabilidade e atividade, aumentando assim a possibilidade de reutilizá-la. Desde meados do século XX, as enzimas isoladas e imobilizadas são utilizadas em reatores industriais de grande escala. Atualmente os esforços estão sendo dedicados a otimizar a estrutura dos materiais de transporte para preservar ou melhorar a atividade enzimática (GUISAN, 2006; NETTO et al., 2013).

A imobilização enzimática em suportes apropriados se constitui em uma área de interesse enquanto pode significar a melhoria de processos e barateamento de custos. O suporte ideal deve adsorver a enzima, sem afetar sua atividade e sem interferir na reação enzimática (COMERLATO, 1995).

Estudos com a enzima glicose oxidase (GOD) demonstraram a eficiência da imobilização dessa enzima em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (ANSARI e HUSSAIN, 2012). O progresso nas pesquisas se deve ao fato da alta eficiência dessas enzimas em processos industriais, porém a dificuldade de recuperação em estado livre e separação dos produtos formados se

tornam o maior impasse para utilização em processos em larga escala. As nanopartículas magnéticas funcionalizadas, além de favorecerem a imobilização enzimática, podem ser recuperadas de forma rápida e simples, mesmo na presença de sólidos (CHO, 2012).

Muitas pesquisas referentes à imobilização da GOD em NPMs são reportadas na literatura (WANG et al., 2011; (LEE et al., 2012), porém estudos a respeito da ativação dos grupos funcionalizantes com glutaraldeído e sobre o mecanismo de adsorção dessa biomolécula nas NPMs ainda são escassos.

Nessa vertente, a pesquisa teve como motivação produzir nanopartículas magnéticas (NPMs) de ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) por reação de combustão, silanizadas com tetraetilortosilicato – TEOS, funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano – APTES, e ativadas com glutaraldeído, e utilizá-las na imobilização da enzima glicose-oxidase (GOD), para uso em biosensores.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

- Sintetizar e funcionalizar nanopartículas magnéticas do tipo ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), e utilizá-las na imobilização da enzima glicose-oxidase (GOD) visando aplicação em biosensores.

### 2.2. Objetivos específicos

- Preparar partículas de ferrita de cobalto pelo método de combustão que possuam características nanométricas e ferrimagnéticas;
- Obter perfis de cristalografia, tamanho de partícula, textura, morfologia, espectro de absorção, perda de massa, e magnetismo das partículas de ferrita de cobalto, respectivamente pelas técnicas de difração de raios X (DRX), distribuição granulométrica (Horiba), microscopia eletrônica de varredura (MEV), capacidade de adsorção física de nitrogênio (Método BET), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), medidas termogravimétricas (TG/DTG) e medidas de magnetização (ZFC/FC);
- Silanizar as nanopartículas de ferrita de cobalto utilizando o agente silano tetraetilortosilicato – TEOS;
- Funcionalizar as nanopartículas magnéticas utilizando o agente silano 3-aminopropiltriétoxissilano – APTES;
- Verificar as modificações cristalográficas, morfológicas, texturais e magnéticas das nanopartículas silanizadas e funcionalizadas;
- Verificar a eficiência do ligante glutaraldeído na capacidade de adsorção da GOD nas NPMs;
- Imobilizar a enzima glicose-oxidase nas nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto, silanizadas com TEOS e funcionalizadas com APTES 3-aminopropiltriétoxissilano;

- Obter curvas cinéticas de imobilização da enzima glicose-oxidase na nanopartícula magnética de ferrita de cobalto silanizada com APTES 3-aminopropiltriétoxissilano;
- Obter a isoterma de adsorção na temperatura de imobilização e determinar a capacidade máxima adsortiva das nanopartículas de ferrita de cobalto, aplicando modelos de isotermas de adsorção;
- Determinar a atividade da enzima glicose-oxidase livre e imobilizada;
- Avaliar a atividade da enzima glicose-oxidase imobilizada relativa à enzima livre e aos ciclos de reuso.

### **3. Fundamentação teórica**

A definição mais simples de nanotecnologia é "tecnologia em nanoescala". A essência da nanotecnologia é a capacidade de trabalhar a nível molecular, átomo por átomo, para criar grandes estruturas com organização molecular fundamentalmente nova, estando voltada aos materiais cujas estruturas e componentes exibem novas e significativas melhorias nas propriedades físicas, químicas e biológicas, fenômenos e processos, devido ao seu tamanho em nanoescala. (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2000).

#### **3.1. Nanotecnologia**

A nanotecnologia pode ser definida como um grupo de tecnologias emergentes em que a estrutura da matéria é controlada em escala nanométrica para produzir novos materiais e dispositivos que têm utilidade e propriedades únicas, tendo a função enfatizada no design, síntese, caracterização e aplicação de materiais, dispositivos e sistemas que tenham uma organização funcional em pelo menos uma dimensão na escala nanométrica, referindo-se ao processamento de materiais cuja estrutura possua ao menos uma dimensão inferior a 100nm (CORBERT et al., 2000). Em todas essas definições, há o significado implícito de que, como para qualquer tecnologia, o resultado final deve ser de uso prático.

Ao menos três vantagens distintas podem ser associadas à nanotecnologia: as pesquisas nessa área oferecem a possibilidade de criar materiais com novas combinações de propriedades, gera dispositivos em nanoescala que precisam de menos materiais e energia para ser fabricados, e oferece uma tecnologia de fabricação universal (RAMSDEN, 2016). As aplicações em diferentes áreas da nanotecnologia são vastas; os nanomateriais têm sido usados, a exemplo, para remover contaminantes de efluentes (SUN et al., 2013; ZHU, 2012), como antimicrobianos (KIM, 2007; MORONES, 2005) e como antioxidantes (DELIGIANNAKIS et al., 2012). Além de sensores para detecção de pesticidas, produtos químicos, metais pesados, patógenos de origem alimentar e toxinas, a nanotecnologia também é usada em técnicas de extração para adsorver traços de pesticidas (YU, 2017; YU e YANG, 2017).

### 3.1.1. Nanopartículas magnéticas

Atualmente, as nanopartículas representam quase a única parte da nanotecnologia com significado comercial. A fabricação de diferentes tipos de nanopartículas por meios químicos foi bem estabelecida em meados do século XIX, passando por um período de desaceleração após meados do século XX, até seu recente renascimento como parte da nanotecnologia (RAMSDEN, 2016).

As nanopartículas magnéticas (NPMs) são partículas que podem ser manipuladas por um campo magnético externo. As NPMs são biocompatíveis, não tóxicas, de baixo custo de produção, ambientalmente seguras, fisicamente e quimicamente estáveis (WU, 2015).

As tecnologias que utilizam nanopartículas em conjunto com as modalidades de detecção eletroquímica ou óptica oferecem métodos rápidos, sensíveis e econômicos. Durante a última década, houve uma série de passos promissores para o desenvolvimento e aplicação de novas nanotecnologias. As propriedades únicas dos nanodispositivos e nanomateriais, em conjunto com ligantes apropriados, oferecem oportunidades únicas para o desenvolvimento de estratégias de detecção ultrasensíveis (KRISHNA, 2018). Os biossensores que utilizam NPMs atraíram considerável interesse em aplicações clínicas e médicas durante décadas, em virtude das vantagens exclusivas que oferecem em relação aos métodos convencionais de detecção; a maioria das amostras biológicas exibe propriedades magnéticas insignificantes e, portanto, medidas altamente sensíveis podem ser realizadas em amostras visualmente obscurecidas e minimamente processadas, devido a biocompatibilidade das MPNs (SHAO, 2012).

As NPMs podem ser aplicadas em diferentes áreas como biotecnologia, ciências biomédicas, dispositivos baseados em ferrofluidos, catálise, análises de imagem por ressonância magnética nuclear (RMN) e armazenamento de dados. Em geral as aplicações biomédicas das NPMs compreendem as que envolvem sua administração dentro do organismo (*in vivo*) e as externas ao organismo (*in vitro*). As aplicações *in vivo* ainda podem ser classificadas em terapêuticas (hipertermia e carreamento de drogas) e diagnósticas (imagens de RMN), enquanto as aplicações *in vitro* compreendem essencialmente as diagnósticas (separação/seleção celular). Os maiores obstáculos para a implantação das NPMs no contexto prático estão geralmente relacionados com a relação superfície/volume desses sistemas. Ou seja,

a mesma característica que proporciona às NPMs propriedades especiais também gera problemas de estabilidade ao longo do tempo. As NPMs tendem a formar aglomerados e, se não recobertas com uma camada protetora (sistemas *core/shell*), apresentam tendência à oxidação (FRANCISQUINI, 2014).

As NPMs têm atraído grande atenção como suportes promissores na imobilização de enzimas devido à grande área de superfície e à presença de grupos hidroxila em sua superfície, o que permite sua fácil funcionalização e forte ligação da molécula da enzima. A baixa porosidade e a excepcional estabilidade mecânica são características que reduzem os impedimentos estéricos e são importantes para o desenvolvimento de um sistema catalítico estabilizado (LI et al, 2013).

### 3.1.1.1. Magnetismo

As principais características das NPMs responsáveis por torná-las potencialmente importantes na aplicação tecnológica como suportes em sistemas biocatalíticos, por demonstrarem fácil separação sob campos magnéticos externos, são: a formação de monodomínios magnéticos; a existência de grande área superficial em relação ao volume; e a possibilidade de recobri-las com diversos tipos de ligantes específicos. As propriedades magnéticas das nanopartículas são dominadas por duas características de grande importância: efeitos de tamanho finito e efeitos de superfície. Os efeitos de tamanho finito são resultados do confinamento quântico dos elétrons, já os efeitos de superfície são relacionados com a estrutura de simetria do cristal, na fronteira de cada partícula. Os efeitos de tamanho finito, de forma geral, são de dois tipos: efeitos dos limites de domínios simples e efeitos de limite superparamagnético (SPM) (LU, 2007).

Na natureza os materiais podem ser classificados em dois tipos: os materiais que possuem momento de dipolo magnético atômico finito ( $\mu_{at}$ ) e os materiais que possuem  $\mu_{at} = 0$ . A primeira família envolve os materiais paramagnéticos (PM) e três eventuais ordenamentos: o ferromagnético (FM) dos dipolos, o antiferromagnético (AFM), e o ordenamento ferrimagnético (FIM). A segunda família representa os materiais diamagnéticos que muitas vezes são chamados de materiais não magnéticos (momento de dipolo magnético igual à zero). Os momentos de dipolo magnéticos tem origem no momento angular orbital e no momento angular de *spin*. O momento angular total depende da estrutura eletrônica de cada átomo, e como os



metais de transição possuem momento angular orbital igual à zero, o momento de dipolo magnético é comumente chamado de momento magnético de *spin* (FRANCISQUINI, 2014).

O comportamento dos materiais magnéticos em um campo magnético externo é determinado pela origem de seus dipolos e pela natureza da interação entre eles. Se um material magnético é colocado na presença de um campo magnético externo, os momentos de dipolo individuais irão contribuir, resultando em um campo magnético induzido. Dependendo da configuração dos momentos de dipolo magnético, podem-se definir estados magnéticos do sistema: quando os momentos de dipolo estão desordenados e não interagentes, tem-se o estado PM; quando os momentos de dipolo estão acoplados devido à interação magnética, podemos observar estados ordenados como o FM (ordenamento paralelo), AFM (ordenamento antiparalelo) e o FIM (ordenamento antiparalelo descompensado, cujo comportamento fenomenológico é bastante semelhante ao ordenamento FM). Após a aplicação de um campo, materiais diamagnéticos e paramagnéticos desenvolvem magnetização negativa e positiva, respectivamente, que desaparecem prontamente após a remoção do campo. Em contramão, materiais magnéticos ordenados desenvolvem magnetização positiva que persiste após a remoção do campo, dando origem a laços de histerese que determinam as propriedades tecnológicas do material (PAPAEFTHYMIU, 2009).

O estado PM está sempre presente em materiais com  $\mu \neq 0$  em altas temperaturas, enquanto um estado ordenado (FM, AFM ou FIM) pode ser induzido com a diminuição da temperatura, caracterizando uma transição de fase magnética. Quando se observa uma transição de fase de PM para FM em uma dada temperatura, define-se essa temperatura como temperatura de Curie ( $T_C$ ) e, no caso AFM, é denominada de temperatura de Néel ( $T_N$ ). No estado PM, a magnetização é nula, pois a soma de todos os momentos de dipolo desordenados é igual à zero, e somente com a aplicação de um campo magnético a magnetização ( $M$ ) aumenta. Já os materiais FM e FIM possuem uma magnetização espontânea abaixo de  $T_C$ , o que os torna muito importantes para aplicações tecnológicas, principalmente, quando  $T_C$  ocorre em altas temperaturas. Nesse caso, esses materiais teriam magnetização espontânea à temperatura ambiente (FRANCISQUINI, 2014).

Em certos elementos (por exemplo, Fe, Co, Ni, Gd) e ligas, as interações de troca entre os elétrons de íons vizinhos levam a um acoplamento muito grande entre

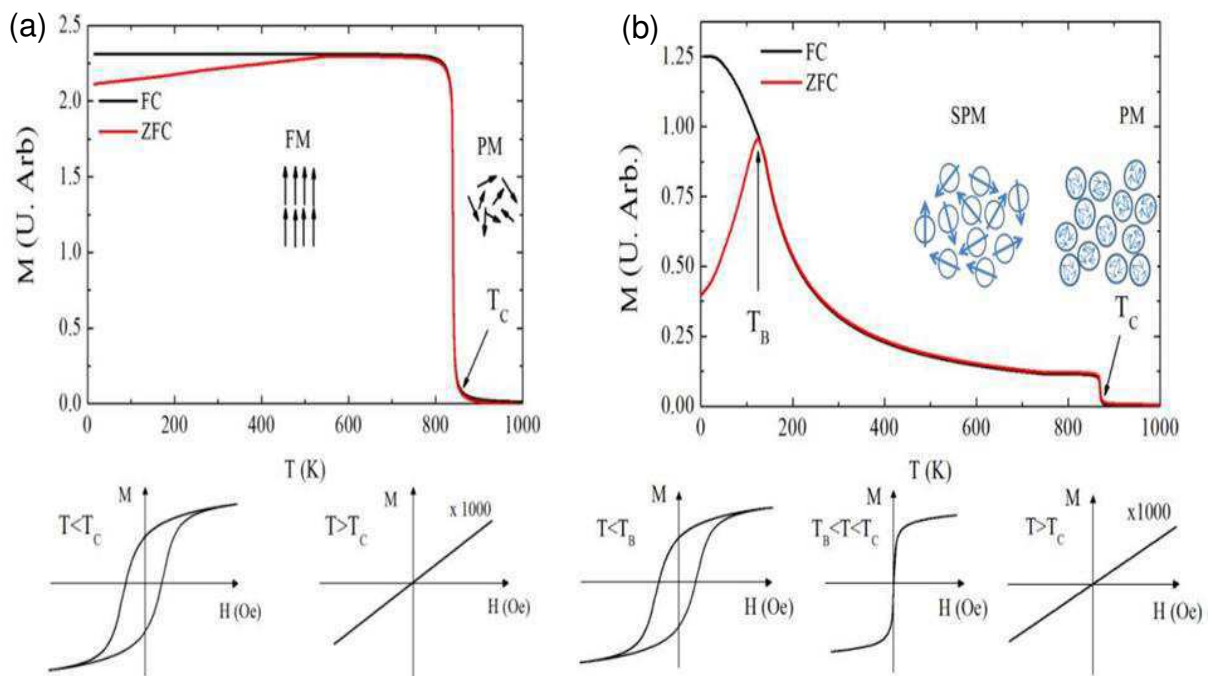
seus spins de forma que, acima de certa temperatura, os spins se alinham espontaneamente. A proliferação de rotas para sintetizar nanopartículas de substâncias ferromagnéticas levou à descoberta de que quando as partículas estão abaixo de um certo tamanho, tipicamente algumas dezenas de nanômetros, a substância ainda tem uma grande suscetibilidade magnética na presença de um campo externo, mas não possui magnetismo remanescente característico do ferromagnetismo. Esse fenômeno é conhecido como superparamagnetismo (SPM) (RAMSDEN, 2016).

O comportamento da magnetização espontânea pode ser representado por medidas do tipo ZFC/FC (do inglês *zero field cooling/field cooling*), que são bastante úteis na caracterização de NPMs, consistindo no resfriamento da amostra em campo magnético nulo (zero) antes de iniciar as medidas (ZFC), iniciadas em baixas temperaturas (por volta de 5K), com término normalmente na temperatura ambiente. Já no procedimento FC, as medidas são realizadas resfriando a amostra na presença de um campo magnético, iniciando-se em altas temperaturas até a temperatura desejada, normalmente 5K. É importante que a magnitude do campo magnético seja menor que os campos coercitivos das curvas de magnetização a baixas temperaturas, para garantir que a diferença entre as curvas ZFC e FC surja intrinsecamente da competição entre a energia interna do material e a excitação térmica (CRUZ et al., 2018).

Na Figura 01 são apresentados os perfis de medidas ZFC/FC de ordenamento ferromagnético e paramagnético (a) em materiais volumosos ou massivos (denominados de *bulk*), e superparamagnético e paramagnético (b) em materiais em nanoescala. Em (a) observa-se que acima de  $T_C$  os momentos de dipolo de cada átomo, representados pelas setas, estão todos desordenados, fazendo com que a magnetização total seja nula. Abaixo de  $T_C$ , surge uma magnetização espontânea, originada do ordenamento FM dos momentos de dipolo, devido às interações microscópicas entre os elétrons dos íons, onde a natureza dessas interações magnéticas depende do tipo de composto e da ligação química. Em (b), acima de  $T_C$ , o momento magnético de cada nanopartícula é nulo devido ao ordenamento desordenado (PM) dos momentos magnéticos atômicos. Abaixo de  $T_C$  e devido ao ordenamento FM do sistema, as partículas possuem momentos magnéticos efetivos, mas não interagentes, análogo ao estado desordenado PM. Como os momentos magnéticos efetivos são de várias ordens de grandeza maior que o momento

magnético de cada nanopartícula, esse estado magnético é chamado de SPM. Em baixas temperaturas (abaixo de  $T_b$ ), as NPMs vão para um estado chamado de estado bloqueado. Esses dois estados magnéticos não são observados em materiais *bulk* (FRANCISQUINI, 2014).

**Figura 01:** Magnetização (ZFC/FC) em função da temperatura (a) de um composto magnético macroscópico, com curvas de magnetização (histerese) características em função do campo magnético no estado ferromagnético ( $T < T_C$ ) e paramagnético ( $T > T_C$ ); (b) de nanopartículas magnéticas, com curvas de magnetização (histerese) características em função do campo magnético no estado bloqueado ( $T < T_B$ ), superparamagnético ( $T_B < T < T_C$ ) e paramagnético ( $T > T_C$ ). Os estados bloqueado e superparamagnético só são observados em sistemas nanométricos.



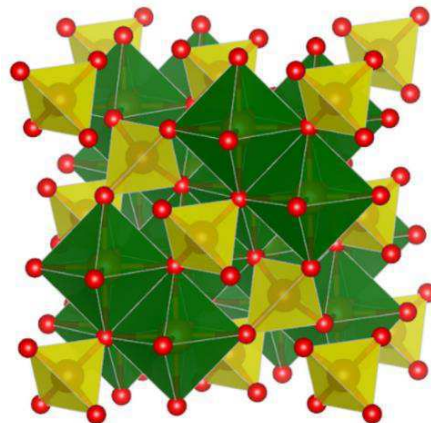
Fonte: FRANCISQUINI, 2014.

### 3.1.2. Ferritas

Ferritas são compostos químicos com propriedades ferrimagnéticas formadas por óxidos de ferro como seus principais componentes,  $Fe_2O_3$  e  $FeO$ , que podem ser parcialmente alterados por outros óxidos de metais de transição (SANTINA MOHALLEM, 2012). São classificadas de acordo com sua estrutura cristalina: hexagonal ( $MFe_{12}O_{19}$ ), granada ( $M_3Fe_5O_{12}$ ) e espinélio ( $MFe_2O_4$ ) (LU, 2011).

As ferritas de configuração do tipo espinélio, que possuem conformação cristalina semelhantes ao cristal  $MgAl_2O_4$  (espinélio) e por isso são denominadas como tal, apresentam em sua estrutura cátions de ferro trivalente ( $Fe^{3+}$ ), com fórmula geral representada por  $MFe_2O_4$ , sendo M um cátion de um metal bivalente ( $M^{2+}$ ) que compõe o óxido. O empacotamento cúbico de face centrada (FCC), determinado pelo anion de oxigênio bivalente ( $O^{2-}$ ), forma 64 interstícios com simetria tetraédrica e 32 com simetria octaédrica. Desses, apenas 1/8 dos sítios tetraédricos são ocupados (8 sítios tetraédricos ocupados), e 1/2 dos octaédricos são preenchidos pelos cátions metálicos (16 sítios octaédricos ocupados) (BLOSS, 1971; WOHLFARTH, 1986). A estrutura cristalina das ferritas está representada na Figura 02.

**Figura 02:** Esquema de uma estrutura representativa de ferrita do tipo espinélio, com os átomos de oxigênio (vermelhos), os sítios tetraédricos (amarelos), e os sítios octaédricos (verdes).



Fonte: REDDY et al, 2016.

As ferritas do tipo espinélio podem assumir dois tipos de arranjo cristalino, de acordo com a distribuição dos cátions metálicos nos interstícios tetraédricos e octaédricos, denominados espinélio normal e espinélio inverso. No arranjo do tipo normal, os sítios tetraédricos são preenchidos apenas por cátions metálicos bivalentes (8 cátions metálicos bivalentes nos oito sítios tetraédricos) e os sítios octaédricos são ocupados apenas pelos cátions de ferro trivalente (16 cátions de ferro trivalente nos 16 sítios octaédricos); na do tipo inverso, os sítios tetraédricos são ocupados pelo pelos cátions de ferro trivalente (8 cátions de ferro trivalente nos 8 sítios tetraédricos) e os sítios octaédricos são ocupados igualmente por cátions

bivalentes e de ferro trivalente (8 cátions metálicos bivalentes e 8 cátions de ferro trivalente nos 16 sítios octaédricos) (HENDERSON et al., 2007).

Os íons dos dois sítios, tetraédrico e octaédrico, se alocam nos nós das sub-redes de *spins* cujo ordenamento é ferromagnético ou antiferromagnético. As interações de super-troca (interação entre o orbital *d* metálico e o orbital *p* do oxigênio) entre as sub-redes cristalinas induzem ao ordenamento anti-paralelo conduzindo ao comportamento antiferromagnético. Entretanto, pela desigualdade de sítios octaédricos e tetraédricos, as ferritas assumem o ferrimagnetismo (WOHLFARTH, 1982).

Por causa das dimensões extremamente pequenas dos materiais nanoestruturados, a exemplo das ferritas do tipo espinélio, existe uma maior porcentagem de átomos na superfície da partícula (GEORGE et al., 2006), permitindo maior potencial de adsorção por partícula. Os óxidos metálicos em nanoescala também apresentam adsorção aprimorada, juntamente com cinética rápida, devido ao aumento da área de superfície específica, menor distância de difusão intraparticular, e maior número de locais reativos superficiais (AUFFAN et al., 2008; RIDLEY, 2015).

Entre as diferentes NPMs, as ferromagnéticas do tipo espinélio são amplamente adotadas para a imobilização de enzimas devido às suas notáveis vantagens de biocompatibilidade e não toxicidade (LIU et al., 2009). Independentemente de seu tipo de estrutura espinélio, as ferritas têm ampla aplicação em tratamentos biomédicos, tratamento de águas residuais, catalisadores e dispositivos eletrônicos. Cada área de aplicação requer que essas nanopartículas tenham propriedades diferentes; para uma rápida remoção do meio em que se encontram, as ferritas devem ter valor de magnetização de saturação razoável para serem facilmente removidas por campo magnético externo (MAHMOUD et al., 2013). Recentemente, enzimas, em sua uma grande variedade, a exemplo das oxidoredutases, hidrolases ou transferases, foram imobilizadas em superfície de NPMs funcionalizadas, desenvolvendo sistemas catalíticos estáveis, com fácil separação e alta repetibilidade (NETTO et al., 2013).

### **3.1.2.1. Ferritas de cobalto**

Ferritas de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) são partículas magnéticas que apresentam configuração do tipo espinélio inverso, e suas aplicações são de particular interesse devido às suas notáveis propriedades físicas, como alta coercividade, ou seja, são classificadas como óxidos magnéticos duros, magnetização de saturação moderada, boa dureza mecânica, resistência ao desgaste, facilidade de síntese e estabilidade química (SALUNKHE et al., 2012). As propriedades magnéticas dessas ferritas se devem principalmente a uma interação de supertroca predominante entre cátions no sítio tetraédrico e no sítio octaédrico por meio de íons de oxigênio. Estudos sugerem que as propriedades dessas NPMs são fortemente afetadas pelo método de síntese (AMIRI et al., 2019).

As ferritas de cobalto são formadas por redes cristalinas constituídas por um empacotamento cúbico de átomos de oxigênio que resultam em 64 sítios tetraédricos e 32 sítios octaédricos, apresentando configuração do tipo espinélio, por apresentarem conformação cristalina semelhante ao cristal de mesmo nome ( $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ ). Desses interstícios, apenas 1/8 dos sítios tetraédricos e 1/2 dos sítios octaédricos são preenchidos por átomos de  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  (BLOSS, 1971). A ferrita de cobalto pode ser preparada pelos métodos de microemulsão água em óleo, microondas, moagem mecânica, micela reversa, sonoquímico, combustão, hidrólise forçada, coprecipitação, hidrotérmico, complexiométrico, pirólise, sol-gel, entre outros (LUQUEZE, 2006). Novas técnicas de decomposição de sais organometálicos a altas temperaturas foram empregadas para obter nanopartículas de ferrita de cobalto com forma controlada, e tamanhos altamente uniformes (TIROSH et al., 2006).

O momento magnético de um átomo livre está relacionado diretamente com o ordenamento do spin dos elétrons em uma região denominada domínio, e com o movimento cinético orbital em relação ao núcleo. Quando houver um ordenamento paralelo de spins no domínio, se caracteriza o ferromagnetismo, conferindo ao material magnetização espontânea. O antiferromagnetismo é caracterizado pelo ordenamento antiparalelo de spins em um domínio, o que resulta em momento magnético nulo. Já o ferrimagnetismo consiste em um ordenamento antiparalelo entre os domínios vizinhos, e como esses domínios possuem momentos de magnetização com magnitudes diferentes, o material ferrimagnético terá magnetização resultante diferente de zero (WEST, 2014), que é o caso das ferritas

do tipo espinélio, que apresentam essa desigualdade entre os sítios octaédricos e tetraédricos (ROSENSWEIG, 1985).

Vários métodos são utilizados na preparação de nanopartículas de ferrita de colbato, e a co-precipitação química, a microemulsão, a decomposição térmica e a síntese sol-gel são consideradas as rotas sintéticas mais utilizadas (LIU et al., 2018). O método de síntese de ferritas por reação de combustão tem permitido a obtenção de ferritas homogêneas puras e nanocristalinas além de ser um método simples, de baixo custo e rápido, com boa reprodutibilidade dos produtos e por ser promissor para a fabricação de diferentes sistemas cerâmicos em nanoescala (SANTOS et al., 2014).

Geralmente, as nanopartículas tendem a se agregar devido à sua alta energia superficial, desencadeada por apresentar grande área superficial específica. Além disso, possuem alta atividade química e são facilmente oxidadas no ar, levando à perda de magnetismo e de dispersibilidade (XU et al., 2014; MEHRASBI et al., 2017). Esses fatores tornam a separação magnética menos eficaz, resultando na ineficiência das nanopartículas se ligarem diretamente a moléculas enzimáticas. Neste contexto, a funcionalização da superfície pode auxiliar na prevenção dos fenômenos indesejados de agregação e de oxidação (BILAL et al., 2018).

### **3.1.2.2. Silanização**

Apesar da facilidade de preparação de nanopartículas magnéticas, o uso de partículas sintetizadas tornou-se pouco frequente devido à sua baixa resistência química a agentes oxidantes que eventualmente levam à perda de sua atividade magnética (ENACH et al., 2017). Para contornar essas limitações ocasionadas por esta instabilidade química, uma solução prática consiste em revestir as NPMs com diferentes polímeros/moléculas orgânicas ou com compostos inorgânicos, como a sílica amorfa (MALLAKPOUR e MADINI, 2015).

Na silanização, a funcionalização das nanopartículas magnéticas é realizada por silanos organofuncionalizantes, chamados de organosilanos, geralmente bifuncionais, em que uma ligação covalente entre o silano e a superfície hidroxilada da nanopartícula é formada. A presença do grupo alcóxido é de fundamental importância, pois é através dele que ocorre a ligação entre o oligômero (formado pela polimerização finita do monômero silanol, resultante da hidrólise do

organosilano) e a nanopartícula, que se liga por meio de ligações de hidrogênio às hidroxilas superficiais da nanopartícula. Com a secagem, essas ligações de hidrogênio se tornam ligações covalentes com a perda de água da partícula (LUQUEZE, 2006).

Dentre os materiais utilizados para revestimentos das NPMs, a sílica apresenta várias vantagens, como forte ligação o com núcleo de óxido de ferro, facilidade de acoplamento, resistência a solventes orgânicos, fácil disponibilidade, e facilidade de funcionalização (GAWANDE et al., 2015; LAURENT et al., 2008). Os revestimentos de sílica fornecem não apenas estabilidade, mas também facilitam inserir ligantes específicos na superfície das NPMs devido à presença de grupos silanois de superfície presentes pós-silanização (LU et al., 2002; PHILIPSE et al., 1994). A presença de ligantes destina-se a melhorar as propriedades de adsorção das NPMs revestidas com sílica em processos específicos de adsorção em fase sólida e é geralmente obtido pela silanização da superfície (pré-funcionalização), usando agentes de acoplamento de silano com grupamentos amina, tiol, aldox e carboxílico, na funcionalização das NPMs (TALLURY et al., 2008).

A modificação de NPMs tem sido utilizada para superar problemas de aglomeração, lixiviação e toxicidade, com o benefício adicional de melhorar a capacidade de adsorção. O revestimento com sílica tem se mostrado promissor, aumentando a estabilidade em ambientes aquosos e a biocompatibilidade com moléculas orgânicas (REDDY e YUN, 2016).

Os materiais híbridos podem ser amplamente definidos como materiais sintéticos contendo uma mistura íntima entre componentes orgânicos e inorgânicos. Esta mistura produz uma sinergia que fornece a esses materiais, com características únicas, uma série de propriedades melhoradas em relação aos precedentes individuais (AZEVEDO et al., 2013).

A sílica é frequentemente usada como revestimento na maioria das aplicações médicas por fornecer nanopartículas magnéticas com biocompatibilidade, por a sílica ser um material atóxico. O revestimento de sílica também pode impedir o contato direto do núcleo magnético com o meio, evitando, assim, interações indesejáveis. Além disso, nanopartículas magnéticas revestidas de sílica têm grupos hidroxila ( $-OH$ ) em suas superfícies, e esses grupos podem ser ligados a vários grupos funcionais, como grupos aminos ( $NH_2$ ) e carboxílicos ( $-COOH$ ), presentes na



maioria das moléculas bioquímicas, que não se ligam diretamente às nanopartículas magnéticas (HE et al., 2005).

O oligômero deve ter uma ligação efetiva com a superfície dos óxidos metálicos, além de amplas possibilidades de reações em função da reatividade do grupo funcional no extremo oposto do polímero. A química dos organosilanos é extremamente versátil; eles são chamados agentes de acoplamento porque permitem melhorias da adesão de materiais inorgânicos com orgânicos. Dentre os organosilanos, o APTES 3-aminopropiltriétoxissilano  $[H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3]$ , pertencente à classe dos organosilanos de fórmula  $H_2N(R')-Si-(OR)_3$ , se torna promissor por apresentar dois grupos funcionais bastante reativos; o grupo amino, identificado como a parte orgânica do organossilano por ser responsável pelas ligações com outros compostos orgânicos, enquanto o grupo alcóxido é responsável pelas ligações entre os oligômeros e a superfície do substrato, normalmente uma matriz inorgânica que possua hidroxilas (-OH) na superfície (LUQUEZE, 2006).

### **3.1.2.2.1. Nanopartículas *core-shell***

O revestimento de nanopartículas magnéticas é uma abordagem promissora e importante no desenvolvimento de nanopartículas magnéticas, e uma variedade de metodologias vem sendo desenvolvidas para revestir estas nanopartículas, incluindo revestimento *in situ*, realizado durante a síntese, e revestimento de pós-síntese, conhecido como revestimento *core-shell* (MA e LIU, 2007; OH e PARK, 2011).

O interesse em nanopartículas do tipo *core-shell*, que apresenta um núcleo magnético revestido por uma matriz isolante, a exemplo da sílica, cresceu consideravelmente nos últimos anos (ZHANG et al., 2006). O sistema *core-shell* (núcleo-casca) consiste em uma nanopartícula composta por dois ou mais materiais, formada por uma estrutura interna (núcleo) envolvida por uma camada de outro material (casca), proporcionando uma diversidade de combinações incluindo compostos inorgânicos e orgânicos. O posicionamento dos materiais nesse sistema (núcleo ou casca) depende da aplicação desejada. A interação das cargas na interface entre o núcleo e a camada, ou entre as camadas, podem ser fundamentais para a formação desse sistema.

Nanopartículas nas quais o núcleo (*core*) e a casca (*shell*) são preparados a partir de diferentes materiais dão origem a um novo grupo de nanomateriais em

comparação com os seus precursores. Tais nanoestruturas permitem combinar propriedades que são típicas do núcleo com propriedades típicas da casca e desenvolver uma única funcionalidade, que é específica apenas para um sistema específico (XU et al., 2007).

A característica superficial das nanopartículas é um fator crucial que não só determina a biocompatibilidade desses materiais magnéticos, mas também desempenha um papel importante na adesão de biomateriais (GUPTA e GUPTA, 2005; GRÜTTNER et al., 2001). Por exemplo, é difícil enxertar a superfície de NMPs com materiais orgânicos, uma vez que existem poucos grupos hidroxila na superfície (HONG et al., 2009). No entanto, revestindo uma camada que contenha grupos hidroxilas, como um revestimento de sílica, este problema pode ser resolvido. A sílica pode ser utilizada como uma matriz na qual fármacos e material genético podem ser dissolvidos, ou como superfície secundária para a ligação de moléculas bioquímicas (KARIMI et al., 2013).

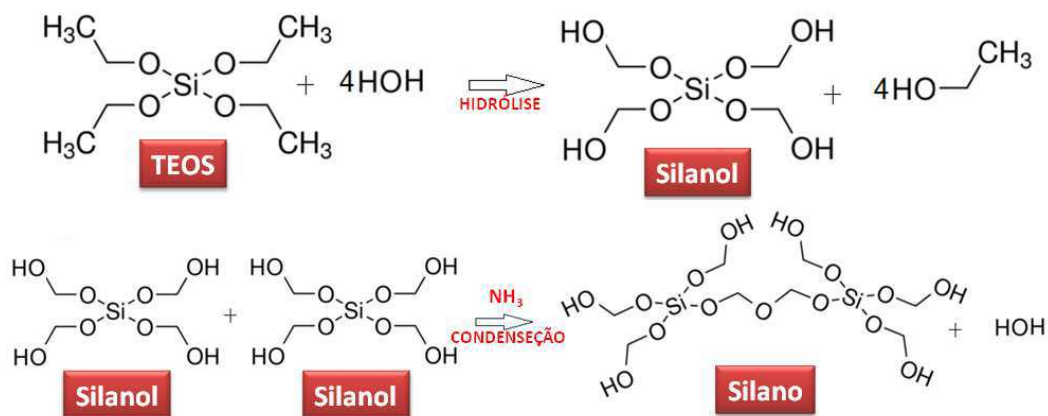
As nanoestruturas *core-shell* podem ser fabricadas usando vários métodos, incluindo deposição química (LIZ-MARZAN et al., 1996), deposição induzida por sementes (OLDENBURG et al., 1999), síntese de camada por camada (CARUSO et al., 2001), condensação sol-gel (POL et al., 2005), entre outros. O preparo de NPMs é frequentemente um processo de múltiplos passos, que requer um controle rigoroso de cada passo da síntese, de modo a obter estruturas com as propriedades desejadas. O controle de cada etapa da síntese permite a obtenção de nanoestruturas com uma dispersão estreita de tamanhos de partículas e o grau desejado de cobertura da superfície do núcleo por nanopartículas metálicas e, simultaneamente, impede uma precipitação excessiva e agregação dessas nanopartículas. Embora existam muitos métodos para a formação de revestimentos de sílica em núcleos metálicos, o controle de sua espessura e homogeneidade ainda permanece uma tarefa muito difícil (JANKIEEWICZ et al., 2012).

#### **3.1.2.2.2. Método de Stöber**

Uma rota muito popular para a síntese de partículas de sílica é o método de Stöber (1968). Este método permite a síntese de partículas de sílica esféricas e homogêneas de tamanho desejado sem o uso de equipamentos sofisticados, relativamente simples e eficaz. Uma metodologia típica para a síntese de partículas de

sílica segundo o método de Stöber envolve a mistura de etanol e amônia (catalisador), frequentemente com uma pequena quantidade de água deionizada, seguida por adição de tetraetilortossilicato - TEOS,  $(\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4)$ , sob agitação contínua, que pode ser substituída por sonicação (JANKIEEWICZ et al., 2012). Durante a síntese de partículas de sílica, o TEOS sofre hidrólise e condensação para formar a estrutura de sílica, representada na Figura 03.

**Figura 03:** Mecanismo de reação do processo de crescimento de sílica pelo método de Stober.



Fonte: (autoria do autor).

A formação de partículas ocorre através de um processo de agregação de subestruturas de siloxano que é influenciado fortemente pelo potencial de superfície das partículas de sílica e a força iônica do meio de reação, denominado de gelificação, que embora explique a formação e crescimento de partículas, seu mecanismo é bastante complexo (VAN BLADEREN et al., 1992). As possíveis reações de hidrólise e condensação do TEOS ocorrem durante o processo de gelificação (CHRUSCIEL e SLUSARSKI, 2003). As partículas de sílica preparadas pelo método de Stöber são amorfas, têm distribuição de tamanho de partícula estreita (menos de 5%) e seu tamanho de partícula, porosidade e morfologia podem ser modificadas pelo controle das condições de reação, ou seja, pelos parâmetros de reação que influenciam sua formação, como os efeitos das concentrações de TEOS,  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , bem como o tipo e quantidade de solvente, temperatura de reação e pH (JANKIEEWICZ et al., 2012).

O maior impacto na formação de partículas de sílica tem a quantidade de TEOS (precursor de sílica), e sua razão molar para água e amônia utilizada na síntese. Em geral, partículas de sílica menores são obtidas em concentrações menores de TEOS adicionadas à mistura de reação (CHEN, 1998; WANG et al., 2006; WANG et al., 2010). Assim, as partículas de sílica de tamanhos diferentes podem ser obtidas alterando a concentração de TEOS. A homogeneidade das partículas de sílica também depende da qualidade do TEOS; este reagente deve ser armazenado em ambiente neutro para evitar sua polimerização, o que pode levar a uma ampla distribuição do tamanho das partículas (JANKIEEWICZ et al., 2012).

### 3.1.2.3. Funcionalização

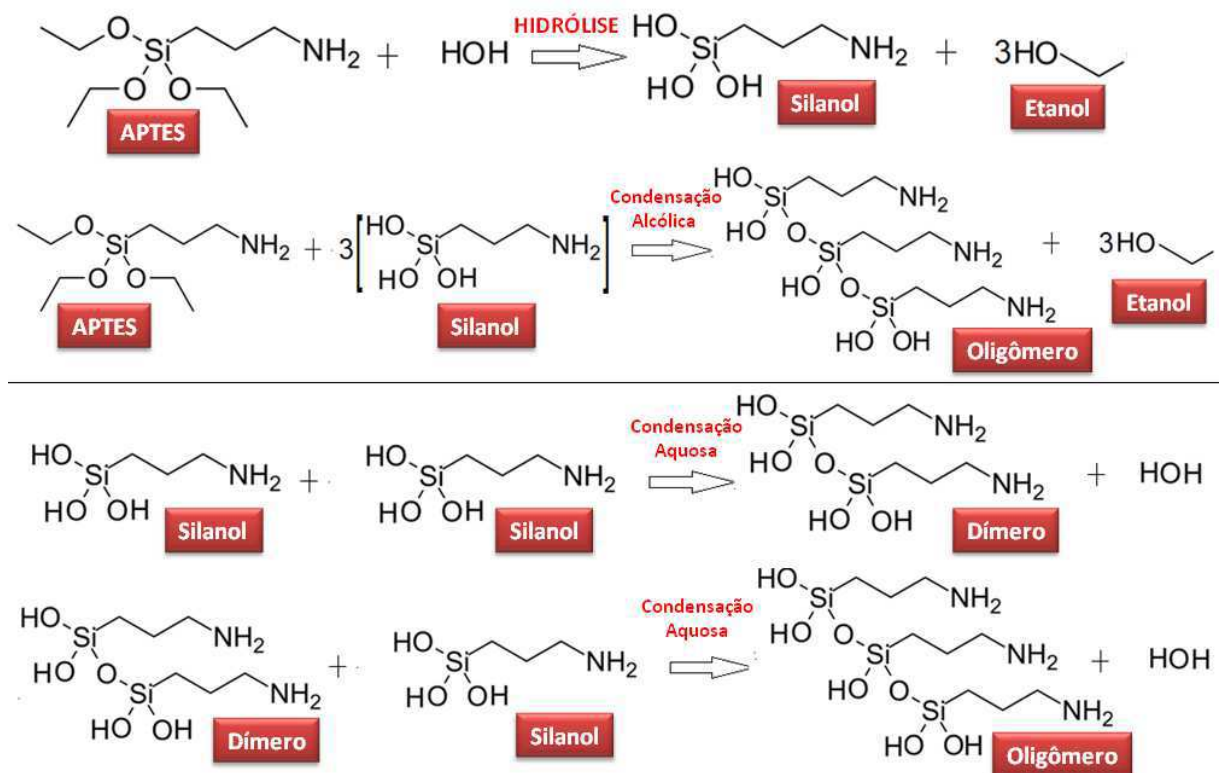
A adesão interfacial entre os materiais orgânicos e inorgânicos pode ser melhorada através da formação de ligações químicas e físicas que se formam através de agentes de acoplamento a exemplo de silanos organofuncionais, que apresentam propriedades tanto orgânicas quanto inorgânicas e podem reagir simultaneamente com polímeros e componentes minerais cerâmicos, resultando em um material com melhores propriedades de adesão e durabilidade (SHARMIN et al., 2012).

A funcionalização da superfície das nanopartículas com moléculas que contenham grupos funcionais tem sido uma estratégia de grande êxito na prevenção da formação de agregados, e a escolha adequada favorece a promoção e maximização das interações com a matriz, formando assim nanocompósitos, que são nanopartículas caracterizadas pela existência de duas ou mais fases. Os nanocompósitos magnéticos de baixa densidade podem ser obtidos através da incorporação de nanopartículas magnéticas em uma matriz polimérica (PASCAULT e WILLIAMS, 2010). 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 ao grupo funcional (WANG e VAUGHN, 2008).

Os agentes silanos apresentam uma fórmula geral  $Y(CH_2)_n.Si(OR)_3$ , onde OR é um grupo sílcio-funcional (O-metil, O-etil, O-propil), enquanto que Y é um grupo organo-funcional (grupo amino, carboxílico, aldox). A presença de grupos hidroxilas

(-OH) na superfície das partículas é indispensável para promover a reação com agentes de acoplamento do tipo silano onde, os grupos  $(OR)_3$  se hidrolisam formando grupos silanóis (Si-OH) que reagem com materiais-inorgânicos. Por outro lado, seu grupo R é capaz de reagir com os monômeros a serem polimerizados formando assim materiais híbridos orgânicos inorgânicos (DIAZ-BENITO et al. 2010). Entre os tipos de agentes silanos mais utilizados e que tem se mostrado eficiente na funcionalização de nanopartículas temos o 3-aminopropiltrietoxissilano – APTES (SAHOO et al., 2014). Na Figura 04 é apresentado um possível mecanismo proposto para a etapa de formação de oligômeros funcionais na funcionalização com APTES das NPMs de ferrita de cobalto silanizadas com TEOS.

**Figura 04:** Mecanismo de reação proposto para etapa de formação de oligômeros funcionais na funcionalização com APTES das NPMs de ferrita de cobalto silanizadas com TEOS.



Fonte: (autoria do autor).

O processo, denominado sol-gel, pode ser facilmente reconhecido, já que se trata de uma rota de síntese de materiais na qual num determinado momento do processo ocorre uma transição do sistema sol para o sistema gel. Desse modo, os

géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias, que só pode ocorrer pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão na qual se promovem reações de polimerização. Neste caso, a gelatificação ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares. O processo sol-gel pode ser dividido em duas classes, dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado: a dos sais e a dos alcóxidos. A reação de polimerização sol-gel pode ser dividida em duas etapas básicas: a hidrólise do grupo alcóxido com formação de grupos reativos do tipo silanol, e a condensação do grupo silanol que leva inicialmente à formação do sol e, posteriormente à formação do gel, com formação dos oligômeros (LIU et al., 2005).

### **3.2. Enzimas**

Enzimas, como todas as proteínas, são longas cadeias poliméricas constituídas de aminoácidos. As unidades monoméricas (aminoácidos) formadoras das proteínas são poucas em número e idênticas em todas as espécies vivas. As proteínas são formadas por ligações peptídicas entre os aminoácidos constituintes, que são ligações entre o grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) de um aminoácido com o grupo carboxila ( $\text{COOH}$ ) de outro aminoácido, através da formação de uma amida. Essas são divididas em seis classes: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (NELSON e COX, 2002).

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma reação, com larga aplicação industrial. Os processos catalisados por enzimas são geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis. As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbiana, e estão presentes em vários processos industriais como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos, e de papel e celulose. O surgimento de novos campos de aplicação de enzimas e o desenvolvimento de novas tecnologias que utilizem enzimas industriais vem em constante crescimento ao longo dos anos (CHOI et al., 2015).

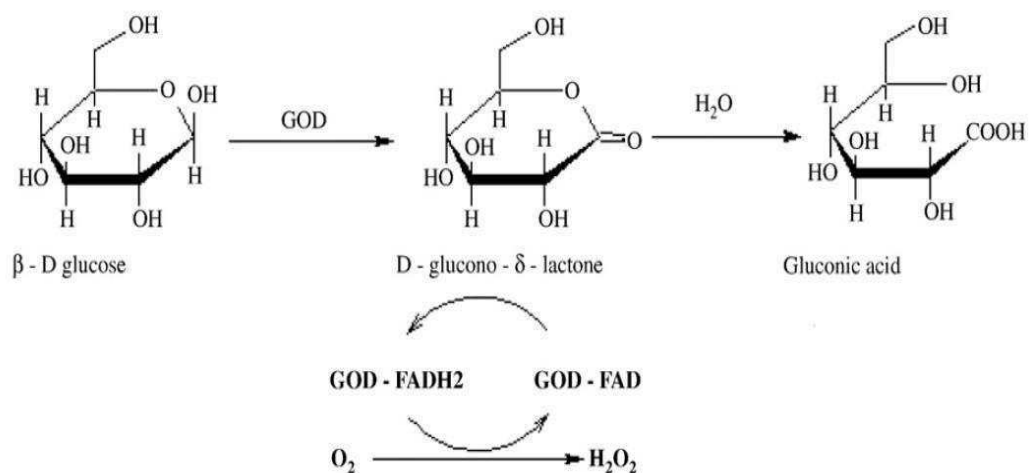
Atualmente, as enzimas desempenham um papel fundamental nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, onde a seletividade do substrato é de extrema importância. A otimização intensiva dos processos envolvendo catálise enzimática permitiu a fabricação de novos produtos biorenavéis, de polímeros, e produtos

químicos de alta especificidade; no entanto, a utilização industrial mais ampla de enzimas é impedida pela sua fraca estabilidade em meios orgânicos, e da baixa reciclabilidade. Além disso, as enzimas geralmente têm melhor desempenho em sistemas homogêneos que exigem processos de separação dispendiosos para remover a enzima da mistura de produtos. Assim, nas últimas décadas, um esforço significativo foi dedicado ao estudo de suportes sólidos utilizados para aumentar a estabilidade e a usabilidade das enzimas (DROUT et al., 2019).

### 3.2.1. Glicose-oxidase

A glicose-oxidase (GOD) faz parte da classe das oxireductases, que catalisam reações por trocas de cargas, ou oxirredução, utilizando oxigênio molecular como receptor de elétrons, gerando como subproduto o peróxido de hidrogênio (MURPHY, 2006). É uma flavoproteína que catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glicose, convertendo-a em D-glucono- $\delta$ -lactona e  $H_2O_2$ . Esta reação pode ser compreendida em duas etapas, uma redutora e outra oxidativa; na etapa redutora, a GOD catalisa a oxidação de  $\beta$ -D-glicose em D-glucono- $\delta$ -lactona, que é hidrolisada em ácido glicônico, porém não enzimaticamente. Posteriormente, nessa mesma etapa, o anel dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD) da GOD é reduzido a  $FADH_2$ ; na etapa oxidativa, a GOD reduzida é reoxidada pelo oxigênio a (FAD), produzindo  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  é oxidado por enzimas oxirredutoras, produzindo água (BANKAR et al., 2009). A representação dessas etapas está ilustrada na Figura 05.

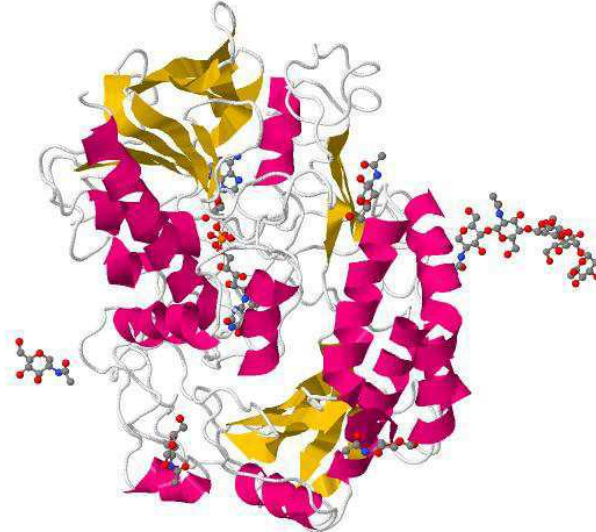
**Figura 05:** Representação da reação da Glicose-oxidase (GOD).



Fonte: WITT et al., 2000.

A GOD é uma enzima globular dimérica, de diâmetro esférico médio de 8nm. Na Figura 06, a molécula de GOD obtida a partir do fungo *Aspergillus Níger* é representada por simulação computacional, através de um modelo de fitas; possui uma faixa de boa atividade entre pH 4-7, e seu ponto isoelétrico é em pH de 4,2 (WILSON, 1992).

**Figura 06:** Estrutura da Glicose-oxidase (GOD) de *Asperillus Níger*.



Fonte: HECHT et al., 1993.

### 3.2.1.1. Parâmetros cinéticos e de capacidade de adsorção

Os estudos de equilíbrio de adsorção são importantes para determinar a eficácia da adsorção. No entanto, também é útil estudar o tipo de mecanismo para o processo de adsorção em estudo. No propósito, de investigar o mecanismo de adsorção e as etapas controladoras do processo que incluem transferência de massa e reações químicas se for o caso, modelos cinéticos têm sido desenvolvidos para testar os dados experimentais, os parâmetros cinéticos provêm informação que é requerida para selecionar as condições ótimas de uma futura aplicação do processo de remoção em escala industrial (HO e MCKAY, 1999). Uma das primeiras equações de taxa estabelecidas para adsorção em superfícies sólidas em um sistema de adsorção sólido/líquido foi a de Lagergren (1898), também conhecida como equação cinética de pseudo-primeiro ordem. É amplamente utilizada em processos de adsorção do soluto de uma solução líquida e está baseada na capacidade de adsorção do sólido.



A isoterma de adsorção é a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes a uma dada temperatura. Para gases, a concentração é dada em porcentagem molar como uma pressão parcial. Para líquidos, a concentração geralmente é expressa em unidades de massa. A concentração do adsorvido no sólido é dada como massa adsorvida por unidade de massa do adsorvente. Algumas características, tais como a natureza do sólido (sítios ativos e distribuição de poros) e natureza do adsorvato (dipolos, forma e tamanho molecular) são determinantes no equilíbrio (MASEL, 1996). Alguns modelos são propostos para adsorção; os mais amplamente utilizados são os de Langmuir (1918), Henry e Freundlich (SUZUKI, 1990). A Equação 01 representa o modelo de Langmuir, a equação 02 representa o modelo de Freundlich, e a Equação 03 representa o modelo de Henry.

$$\theta = \frac{q_{\text{máx}} b C_e}{(1 + b C_e)} \quad (01)$$

Onde  $q$  é a quantidade de soluto adsorvida por unidade de massa do sorvente (mg/g),  $C_e$  é a concentração do soluto no equilíbrio, (mg/g),  $q_{\text{máx}}$  é capacidade máxima adsortiva (mg/g), e  $b$  é a constante de adsorção no equilíbrio ( $K_{\text{adsorção}}/K_{\text{dessorção}}$ ).

$$q = K_{ad} C_e^{1/n} \quad (02)$$

Onde  $q$  quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa do adsorvente (mg/g),  $C_e$  é a concentração de soluto de equilíbrio, (mg/L), e  $K_{ad}$  e  $n$  são constantes experimentais.

$$q_e = K_H C_e \quad (03)$$

Onde  $q_e$  é a capacidade de adsorção no equilíbrio na fase sólida (mg/g),  $C_e$  é a concentração de equilíbrio na fase líquida (mg/L) e  $K_H$  é a constante de Henry.

### 3.2.1.2. Atividade enzimática

Uma maneira de determinar o comportamento enzimático da GOD é avaliar a quantidade de peróxido de hidrogênio formado. Na determinação da atividade da GOD utilizam-se métodos analíticos na detecção do peróxido de hidrogênio baseado no princípio de que a GOD oxida a  $\beta$ -D-glicose na presença de oxigênio à  $\beta$ -D-

glucono- $\delta$ -lactona, com formação de  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  é então utilizado para oxidar um substrato cromogênico em uma reação secundária na presença da enzima peroxidase (POD) com mudança de cor resultante dessa reação que é monitorada espectrofotometricamente (WITT et al., 1998).

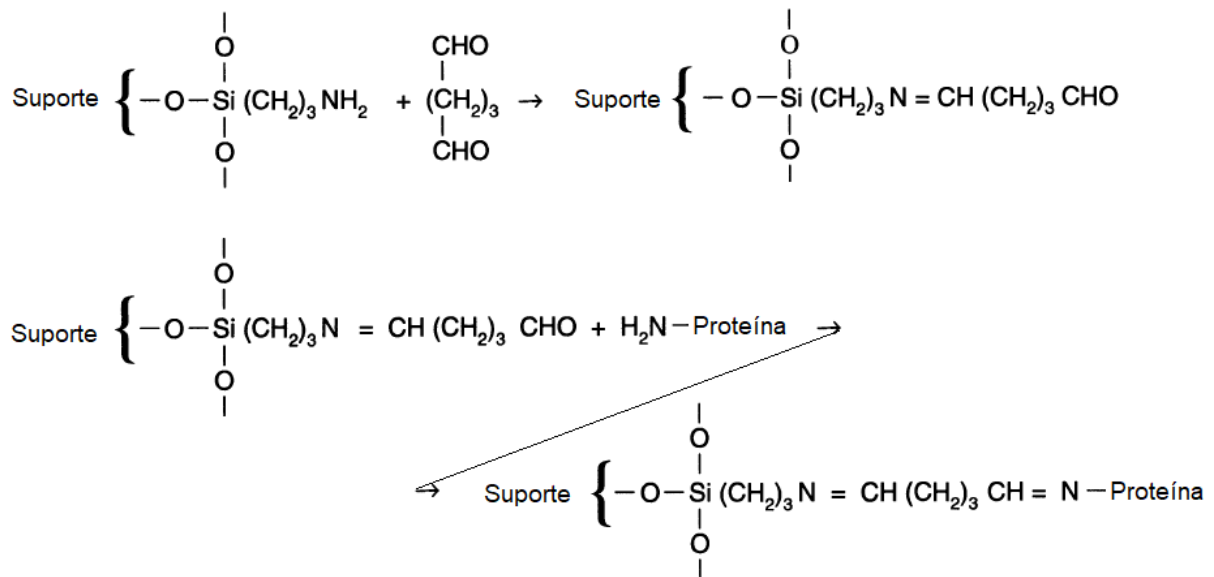
### 3.2.2. Imobilização de enzimas

A imobilização enzimática tem atraído grande interesse, desde a pesquisa acadêmica fundamental até diversas aplicações industriais. Vários processos baseados em enzimas imobilizadas provaram ser econômicos. Eles foram implementados em maior escala, principalmente na indústria alimentícia, onde substituem processos enzimáticos livres e na fabricação de especialidades químicas e farmacêuticas, particularmente onde a síntese assimétrica ou a resolução de enantiômeros para produzir produtos opticamente puros estão envolvidos (KRAJEWSKA, 2004).

As enzimas se ligam covalentemente ao suporte por meio de grupos funcionais presentes na enzima, que não são essenciais para a atividade catalítica. Sabe-se que a imobilização diminui a atividade enzimática; isso ocorre devido ao bloqueio dos sítios ativos ou pelas mudanças na geometria da enzima no final do procedimento de acoplamento (SRERE et al., 1976).

A ativação inicial do grupo funcional no suporte sólido se faz necessário, de que esse grupo funcional reaja com a proteína, ou envolvem a fixação preliminar de uma substância "ligante" bifuncional ao suporte, seguida por acoplamento. O ligante pode ter a mesma função reativa em cada extremidade (homobifuncional), ou as duas extremidades podem ter diferentes grupos funcionais (heterobifuncional). Em qualquer dos casos, o grupo livre é capaz de reagir com a proteína ou com o ligante. Em alguns casos, o ligante é primeiro acoplado à proteína antes da ligação ao suporte sólido. Neste caso, deve ser do tipo heterobifuncional, uma vez que a extremidade livre não deve ser capaz de reagir com uma segunda proteína ou ligante, mas apenas com o suporte. O glutaraldeído é um agente reticulante frequentemente utilizado em aplicações bioquímicas como um ativador homobifuncional de grupos aminos (NGO, 1993). O mecanismo de ativação com glutaraldeído está ilustrado na Figura 07.

**Figura 07:** Reação de acoplamento entre um suporte de alquilamina e glutaraldeído seguido por acoplamento do reagente ativado à proteína.



Fonte: NGO, 1993.

### 3.2.2.1. Imobilização da glicose-oxidase

A GOD vem apresentando considerável importância comercial nos últimos anos devido à grande variedade de aplicações nas indústrias química, farmacêutica, alimentícia, de bebidas, química clínica, biotecnologia, entre outras. A GOD é a enzima mais utilizada como reagente analítico para determinação de glicose, devido ao seu custo relativamente baixo e boa estabilidade. Seus usos variam desde um biossensor de glicose para o controle do diabetes, até um conservante de alimentos. Com essa enzima imobilizada, estabilidade melhorada, capacidade de reutilização, operação contínua, possibilidade de melhor controle de reações, alta pureza, rendimento do produto, e processo economicamente viável podem ser esperados (BANKAR et al., 2009).

Pesquisas na área de imobilização da GOD são desenvolvidas a fim de adaptar essas enzimas para usos mais industriais, levando ao desenvolvimento de vários suportes baseados em matrizes sólidas, que facilitam o uso de enzimas em processos contínuos e ajudam a superar a restrição de custos, auxiliando na separação eficiente e na reciclagem de enzimas caras (SHELDON et al., 2005). Nanopartículas magnéticas (NPMs) recentemente atraíram mais atenção como suportes utilizados na imobilização de enzimas devido às suas propriedades únicas

magnéticas, e por possuírem boa biocompatibilidade. A maioria das pesquisas sobre NPMs em aplicações bioquímicas tem focado nos óxidos de ferro, devido à essas partículas apresentarem estabilidade oxidativa e compatibilidade biológica (WEISSLEDER et al., 1989; MULLER et al., 1996).

## 4. Materiais e Métodos

Os materiais e métodos utilizados na preparação, silanização, e funcionalização das NPMs, e na imobilização e determinação da atividade da glicose-oxidase, são descritos a seguir.

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. NPMs de Ferrita de cobalto

Para o preparo das nanopartículas de ferrita de cobalto por reação de combustão foram utilizados como precursores os reagentes da VETEC nitrato de ferro nonahidratado 99% ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) e nitrato de cobalto II trihidratado 98% ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), como fonte de cátions, e ureia 98% ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) da VETEC como combustível da reação.

#### 4.1.2. Silanização e funcionalização das NPMs

Para a silanização das nanopartículas de ferrita de cobalto, álcool etílico ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) da SIGMA-ALDRICH foi utilizado como solvente, solução de amônia 25% ( $\text{NH}_3$ ) da SIGMA-ALDRICH utilizada como catalisador, e o tetraetilortossilicato – TEOS ( $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$ ) 98% da SIGMA-ALDRICH utilizado como agente silanizante. Para a funcionalização das nanopartículas silanizadas, utilizou-se álcool etílico ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) da SIGMA-ALDRICH como solvente, e o 3-aminopropiltrimetoxisilano – APTES 97% [ $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ ] da SIGMA-ALDRICH como agente funcionalizante.

#### 4.1.3. Imobilização da glicose-oxidase

Fosfato de sódio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) da VETEC e fosfato de potássio dibásico anidro ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) da VETEC foram utilizados na preparação da solução tampão 0,1M pH 7.0. Glutaraldeído 25% ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ) da VETEC foi utilizado como ligante alquilamina. Glicose oxidase (GOD) de *Asperillus Níger* da SIGMA-ALDRICH foi utilizada como enzima nos testes de imobilização nas

nanopartículas funcionalizadas. O reagente Bradford B6916 (SIGMA) da SIGMA-ALDRICH foi utilizado na quantificação de enzimas pelo método de Bradford (1976) de determinação de proteínas.

#### **4.1.4. Atividade enzimática**

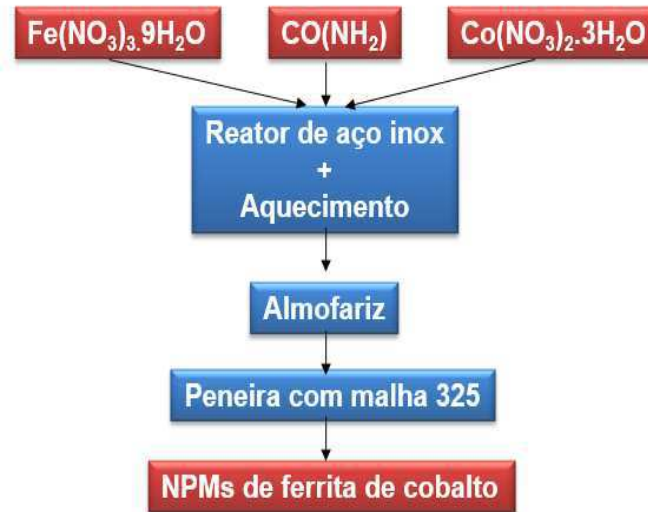
A determinação da atividade enzimática da GOD foi realizada utilizando o kit de determinação de atividade de glicose-oxidase K-GLOX 08/18 da MEGAZYME, que contém o substrato  $\beta$ -D-glucose, os reagentes ácido *p*-hidroxibenzóico ( $C_7H_6O_3$ ) e 4-aminoantipirina ( $C_{11}H_{13}N_3O$ ), e a enzima peroxidase (POD).

#### **4.2. Preparação das NPMs de ferrita de cobalto**

A síntese das ferritas de cobalto, realizada no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais (UAEMa) Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), foi procedida de acordo com metodologia proposta por Costa e Kiminami (2012) que se baseia na reação de combustão dos nitratos metálicos em atmosfera oxidante, aquecida por uma resistência elétrica acoplada a uma base cerâmica, na qual é fixado um reator de aço inox de formato cônico com capacidade volumétrica de 2 litros.

Foram adicionados 655,16g de nitrato de ferro e 291,03g de nitrato de cobalto ao reator inox, acrescidos a 404,31g de ureia. As quantidades exatas dos reagentes foram determinadas com base na estequiometria da reação [1:2:4], e a quantidade necessária de combustível foi determinada pelo cálculo estequiométrico de valência da reação de oxirredução de acordo com a teoria dos propelentes e explosivos (JAIN et al., 1981). A mistura foi submetida ao aquecimento até a ocorrência de auto-ignição (temperatura máxima em torno de 600°C). Foram medidos o tempo de reação, o tempo de chama, a temperatura máxima atingida, e a massa resultante. As amostras, obtidas na estrutura de flocos porosos, foram desaglomeradas em almofariz, e passadas em peneira com malha 325 (abertura ABNT de 45  $\mu$ m). as amostras pós preparação foram calcinadas à 1000°C durante 4 horas. Na Figura 08, é apresentado o fluxograma da síntese da ferrita de cobalto.

**Figura 08:** Fluxograma da síntese química das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

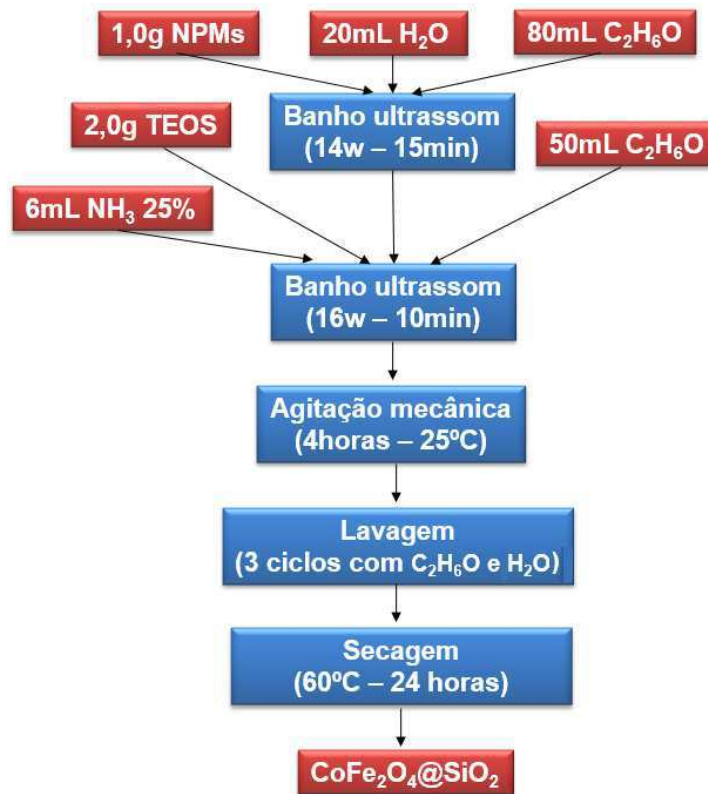


Fonte: (autoria do autor).

#### 4.2.1. Silanização das NPMs

A silanização das NPMs de ferrita de cobalto ocorreu de acordo com método de Stöber (1968), seguindo as adaptações propostas por Khatiri et al. (2013); 1,0g de NPMs sintetizadas foi disperso em uma solução contendo 20ml de água deionizada e 80ml de etanol. A mistura foi sonicada em um banho ultrassom com potência de 14W em um intervalo de tempo de 15 minutos; foi adicionada à mistura contendo as NPMs uma solução composta por 2,0g de TEOS (2,15ml em volume), 50ml de etanol e 6ml de amônia a 25%. A mistura resultante foi sonicada por 10 minutos em um banho ultrassom com potência de 16W. Após essa etapa, a reação de silanização prosseguiu durante 4 horas à temperatura ambiente (25°C), sob agitação mecânica contínua, em sala exaustora. As NPMs silanizadas foram lavadas com água e etanol em 3 ciclos, e submetidas a secagem branda em estufa a 60°C durante um período de 24 horas. O fluxograma da etapa de silanização das NPMs é apresentado na Figura 09.

**Figura 09:** Fluxograma da etapa de silanização das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .



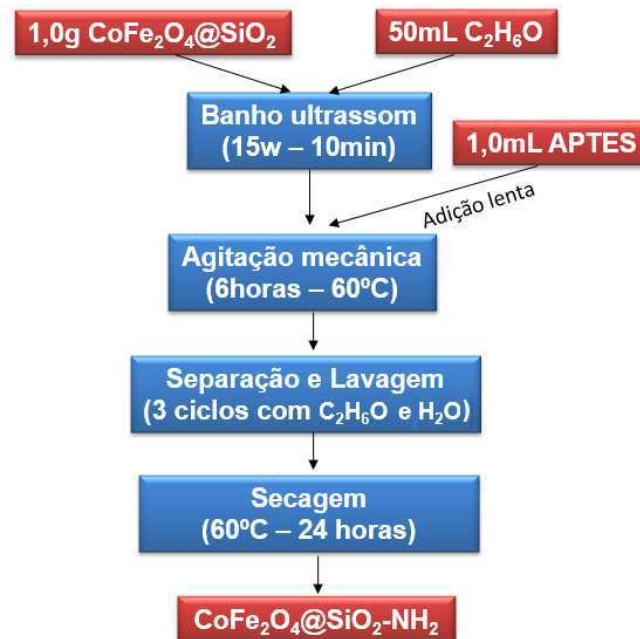
Fonte: (autoria do autor).

#### 4.2.2. Funcionalização das NPMs

A metodologia adotada na funcionalização com APTES das NPMs silanizadas foi adaptada de Liu et al. (2009) e Sadighian et al., (2014); em um Becker, 1,0g de NPMs silanizadas foi disperso em 50mL de etanol utilizando um banho ultrassônico com potência 15W durante 10 minutos. Em seguida, 1,0mL de APTES foi adicionado lentamente à suspensão; após a adição do APTES, o Becker foi coberto e envolto com plástico filme, e a mistura foi agitada mecanicamente à temperatura de 60°C no intervalo de tempo de 6 horas. As NPMs funcionalizadas foram separadas utilizando um ímã externo e lavadas com água deionizada e etanol em 3 ciclos, e finalmente secas em estufa a 60°C por 24 horas. Na Figura 10, pode ser observado o fluxograma da etapa de funcionalização com APTES das NPMs silanizadas, resultando nas NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



**Figura 10:** Fluxograma da etapa de funcionalização das NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  silanizadas.



Fonte: (autoria do autor).

### 4.3. Caracterização das NPMs

#### 4.3.1. Difração de Raios-X (DRX)

As amostras de NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  antes e após funcionalização foram caracterizadas por difração de raios-X utilizando um difratômetro de raios-X da BRUKER (modelo D2 Phaser, radiação Cu-K). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais (UAEMA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Por meio dos dados de difração coletados foram determinadas as fases presentes, a cristalinidade, a partir da razão entre a área integrada do pico referente à fase cristalina e a área referente à área amorfa, e o tamanho de cristalito, determinado pelo método de Scherrer (1918).

#### 4.3.2. Análise Textural

A determinação da área superficial das NPMs foi realizada pelo método de adsorção de nitrogênio desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET) (1938). Foi utilizado um equipamento modelo NOVA 3200, marca Micromeritics. O volume

de poro e o diâmetro de poro foram determinados pela teoria desenvolvida por Brunauer, Joyner e Halenda (BJH). Os ensaios foram realizados no realizados no LabSMaC da UAEMa da UFCG.

#### **4.3.3. Distribuição Granulométrica**

As curvas de distribuição granulométrica das amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , foram obtidas pela técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS), caracterizada pela medição das flutuações na intensidade da luz dispersa com o tempo. Foi utilizado um analisador de nanopartículas HORIBA SCIENTIFIC (modelo SZ-100 series), com capacidade de detecção na faixa de 0,3nm à 8000nm. O dispersante utilizado foi o Ludox TM-50 coloidal, que permite a leitura do movimento Browniano das partículas. As análises foram realizadas no LabSMaC da UAEMa da UFCG.

#### **4.3.4. Potencial Zeta**

A estabilidade referente à capacidade de dispersão das NPMs no meio foi avaliada pela medição do potencial zeta, utilizando um analisador de nanopartículas HORIBA SCIENTIFIC (modelo SZ-100 series). Foi avaliado o potencial zeta das amostras para o pH 7.0, o mesmo utilizado nos testes de imobilização da GOD e na determinação da atividade enzimática. A faixa de estabilidade de partículas compreende regiões maiores do que o 30mV, sendo a faixa de instabilidade para  $-30\text{mV} \leq \text{Potencial Zeta} \leq 30\text{mV}$ . As análises foram realizadas no LabSMaC da UAEMa da UFCG.

#### **4.3.5. Espectrometria na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de FTIR das amostras de NPMs foram obtidos utilizando um espectrômetro modelo modelo 660-IR da VARIAN, entre 4000 e  $200\text{cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{cm}^{-1}$  e 20 varreduras. As análises foram realizadas no LabSMaC da UAEMa da UFCG.

#### **4.3.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As micrografias da NPMs foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura da marca Shimadzu, modelo SSX-550 acoplado a um Espectrofotômetro de Energia Dispersiva (EDS). O procedimento de análise consistiu na preparação de aproximadamente 5mg de amostra, dispersos em 5ml de acetona, homogeneizada manualmente. Com o auxílio de um conta-gotas, uma gota da amostra foi depositada sobre a superfície do porta-amostra, e submetida à metalização em um metalizador modelo SC-701 da marca Sanyu Electron, para ser recoberto por uma fina camada de ouro com o objetivo de proporcionar a condutividade elétrica necessária para a análise. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM) da UAEMa da UFCG.

#### **4.3.7. Análise Termogravimétrica (TG/DTG)**

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) das amostras de NPMs antes e após funcionalização foram obtidas em um analisador térmico Shimadzu DTG-60H, em atmosfera de ar sintético, massa de até 10mg, razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , em um intervalo entre a temperatura ambiente até  $700^{\circ}\text{C}$ . As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas (LabTer) da UAEMa da UFCG.

#### **4.3.8. Medidas magnéticas**

As medidas magnéticas das NPMs foram obtidas utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM), modelo 7404 da Lake Shore, com campo magnético máximo aplicado de 13700G à temperatura ambiente. As características magnéticas de magnetização de saturação ( $M_s$ ), magnetização remanente ( $M_r$ ), e campo coercitivo ( $H_c$ ) foram obtidas a partir do gráfico das histereses, observando-se o comportamento das curvas nas proximidades da origem do plano cartesiano. Os testes foram realizados no Laboratório de Ensaio Destrutivo e não Destrutivo (LEN) do Instituto de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), em parceria com LabSMaC da UAEMa da UFCG.

#### **4.3.9. Teste de Sedimentação**

Para o teste de sedimentação, foram utilizados 3mL de solução tampão fosfato 0,1M pH7,0; 50mg das NPMs foram colocados em uma cubeta com capacidade de 5mL e dispersas na solução tampão; a mistura foi agitada manualmente por 30 segundos. O tempo de sedimentação foi determinando a partir do momento em que se cessou a agitação até o momento em que não mais se visualizava a decantação das NPMs. As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ) da UFCG.

#### **4.4. Imobilização da Glicose Oxidase em NPMs de Ferrita de Cobalto**

A imobilização da enzima glicose oxidase foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wang et al. (2011) com modificações. Inicialmente, 3,0mg de NPMs de ferrita de cobalto foram dispersas em 1mL de solução de glutaraldeído, em um recipiente de vidro com sistema de vedação de base circular com capacidade de 100mL. A mistura foi mantida sob agitação orbital de 150RPM, em uma incubadora shaker refrigerada (SL-233, Solab), a temperatura de 25°C. As NPMs foram separadas da solução por um campo magnético induzido, e lavadas em 3 ciclos com solução tampão fosfato 0,1M pH7,0 para retirada do glutaraldeído livre.

Após a etapa de pré-tratamento com glutaraldeído, as NPMs foram dispersas em 1mL de solução de GOD, com concentração variando entre 0,05 a 2mg/mL, no mesmo recipiente de vidro com sistema de vedação de base circular com capacidade de 100mL. A mistura foi mantida sob agitação orbital de 150RPM em uma incubadora shaker refrigerada (SL-233, Solab) a temperatura de 4°C, em um intervalo de tempo variando entre 15 minutos a 6 horas.

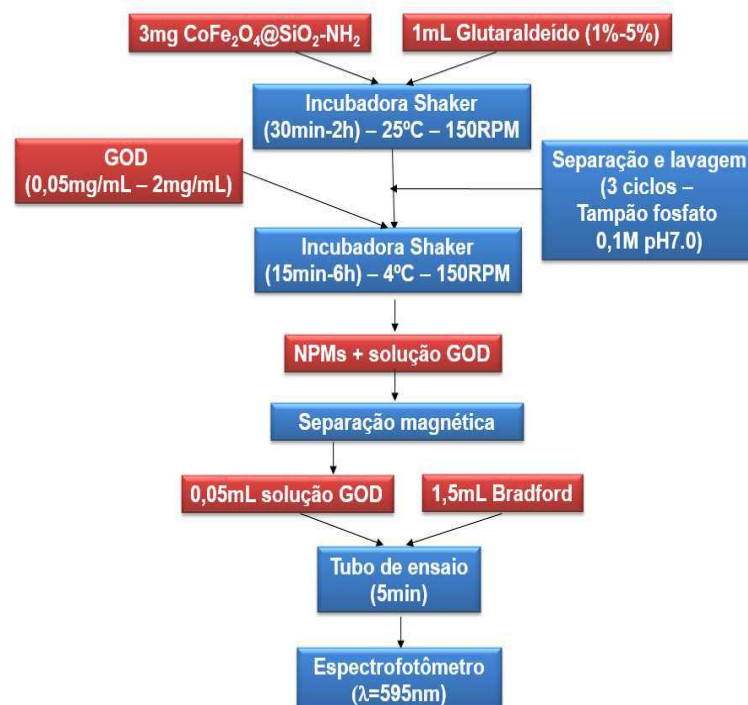
A concentração ideal de glutaraldeído, utilizado na ativação dos grupos funcionais presentes nas NPMs, foi determinada variando a concentração de glutaraldeído entre 1% a 5%, e avaliando a maior capacidade de adsorção da enzima nas NPMs, utilizando uma solução de GOD de concentração de 1mg/mL, no tempo de 120 minutos. Após determinação da melhor concentração, o tempo de ativação foi avaliado em um intervalo de 30 a 120 minutos.

##### **4.4.1. Determinação de Proteínas Livres**

A determinação de proteínas em solução foi realizada segundo método de Bradford (1976), utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda em 595nm, com a curva de calibração para o reagente de Bradford B6916 (SIGMA); em um tubo de ensaio, 0,05mL do sobrenadante da solução de GOD, utilizada na imobilização, foi misturada a 1,5mL do reagente Bradford. Após 5 minutos, foi realizada a leitura no espectro. O mesmo procedimento foi realizado para a solução inicial de concentração conhecida (0,05mg/mL – 2mg/mL).

A metodologia segundo Bradford (1976) segue o princípio da técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Coomassie brilliant blue*” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molar e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em comprimento de onda de 595nm (ZAIA et al., 1998). As análises foram realizadas no LEB da UAEG da UFCG. O fluxograma representativo da metodologia adotada para a imobilização da GOD é apresentado na Figura 11.

**Figura 11:** Fluxograma da metodologia adotada na imobilização da enzima GOD nas NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

A quantidade adsorvida de GOD nas NPMs foi determinada em relação a fase fluida que contém a enzima GOD (adsorbato) e a fase sólida composta pelas nanopartículas magnéticas  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  (adsorvente), por balanço de massa entre a solução inicial e final após imobilização de GOD, calculada pela equação 01.

$$q = \frac{v(C_i - C_f)}{m_{ads}} \quad (01)$$

Sendo  $q$  a capacidade adsortiva,  $v$  o volume de solução utilizada,  $C_i$  a concentração inicial de GOD,  $C_f$  a concentração final de GOD do sobrenadante, e  $m_{ads}$  a massa de adsorvente utilizada (NPMs).

#### 4.5. Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade da glicose-oxidase foi utilizado o kit de determinação de atividade de glicose-oxidase K-GLOX 08/18 da MEGAZYME. Previamente foram preparados três padrões de soluções com os produtos contidos no kit: solução denominada como padrão-POD em pH 7.0 contendo os reagentes ácido *p*-hidroxibenzóico e 4-aminoantipirina, a enzima peroxidase, azida de sódio como conservante, e estabilizantes; solução 0,09mg/mL de D-glucose denominada solução Padrão-D-Glucose; solução de glicose-oxidase (2,9U) pH7.0, com aditivo de BSA e azida de sódio como conservante, denominada solução Padrão-GOD.

Para os testes de atividade, 0,5mL do Padrão-D-Glucose foi misturado a 2mL do padrão-POD em uma cubeta plástica, sob agitação manual branda por inversão; a absorbância ( $A_1$ ) foi lida após 5 minutos do início da reação, sendo adicionado após esse tempo ao sistema reacional 0,5mL da amostra contendo a enzima GOD com concentração conhecida. Após 20 minutos sob agitação manual branda por inversão, a absorbância ( $A_2$ ) foi lida, e a absorbância final foi determinada pela diferença entre as absorbâncias inicial e final ( $A_2-A_1$ ). O valor da atividade em unidades por litro (U/L) foi obtido pela curva de absorbância *versus* atividade disposta no catálogo do kit. A atividade por grama de enzima (U/g) foi determinada pela razão entre a atividade em (U/L) e a concentração em gramas por litro (g/L) da enzima. As absorbâncias das amostras foram obtidas utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda na faixa de 510nm, após tempo de reação de 20 minutos a 25°C.

A glicose-oxidase catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glicose em D-gluconolactona, com liberação simultânea de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Na presença da enzima peroxidase, o peróxido é consumido em uma segunda reação envolvendo o *p*-hidroxibenzóico e 4-aminoantipirina, com a formação quantitativa de um complexo de quinoneimina que gera a coloração, com absorção máxima em  $\lambda=510\text{nm}$ . A atividade enzimática é definida como a quantidade de GOD que converte  $1\mu\text{mol}$  de D-glicose em D-gluconolactona e peróxido de hidrogênio por minuto. As análises foram realizadas no LEB da UAEG da UFCG.

#### **4.6. Testes de Reuso**

Os testes de reuso foram realizados no LEB da UAEG da UFCG; após a primeira determinação da atividade da GOD imobilizada, as NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  foram recuperadas por separação magnética e lavadas 3 vezes com tampão fosfato pH7.0. As NPMs foram novamente dispersas em 0,5mL de tampão fosfato pH7.0 para avaliação da atividade enzimática com o kit de determinação de atividade de glicose-oxidase K-GLOX 08/18 da MEGAZYME.

## 5. Resultados e Discussão

Os resultados relativos à caracterização das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , da imobilização da GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , e de atividade enzimática da GOD, são discutidos a seguir.

### 5.1. NPMs de ferrita de cobalto

#### 5.1.1. Parâmetros de síntese por reação de combustão das NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4$

Os valores dos parâmetros de síntese, como tempo de síntese, tempo de chama, cor da chama, temperatura máxima, e massa final, das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  obtidas por reação de combustão em 3 sínteses, estão reportados na Tabela 01.

**Tabela 01:** Parâmetros avaliados durante a síntese das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  obtidas por reações de combustão.

NPMs	Tempo de síntese (s)	Tempo de chama (s)	Chama (cor)	Temp. máxima (°C)	Massa (g)
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	$12,3 \pm 0,6$	$15 \pm 1,3$	Amarela	$537 \pm 21$	$11,5 \pm 0,6$

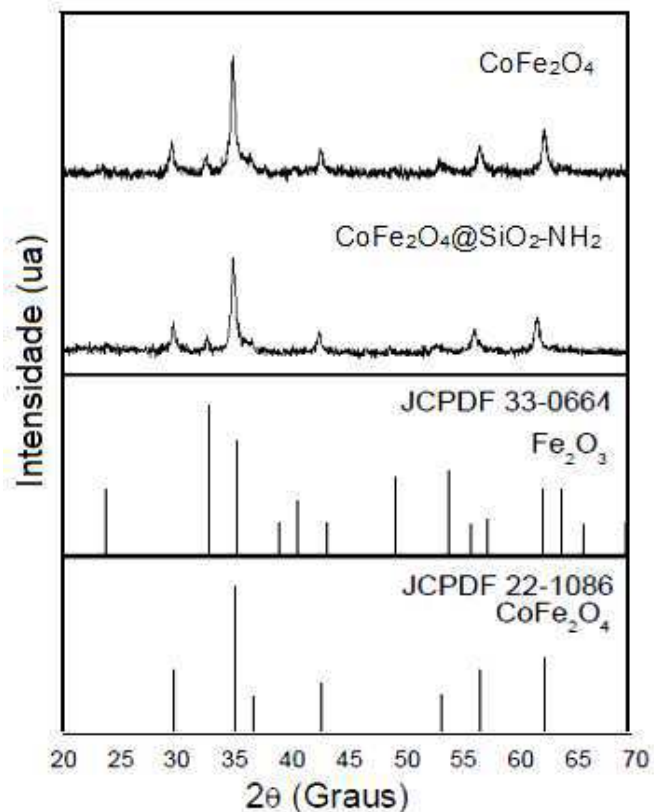
Pelos valores obtidos, verifica-se que foi possível obter reprodutibilidade na síntese de partículas por reações de combustão com características aproximadas, caracterizada pelos desvios padrões menores que 10% em todos os parâmetros.

#### 5.1.2. Difração de Raios-X (DRX)

Na Figura 12 encontram-se ilustrados os difratogramas de raios-X das amostras de NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



**Figura 12:** Difratomogramas de raios X das amostras  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  comparados aos padrões JCPDF 33-0664 e JCPDF 22-1086.



Fonte: (autoria do autor).

Pelos perfis de difração de Raios-x das amostras apresentados na Figura 12, é possível observar picos estreitos, de alta intensidade relativa à largura basal, característicos de materiais cristalinos estruturados, apresentando característica de partículas nanométricas e com boa cristalinidade, definidos pela relação entre a intensidade dos picos e a largura basal. As amostras, antes e após a modificação de superfície com os TEOS e APTES, apresentaram *background* (ruídos), que ocasionam possível imprecisão na determinação da cristalinidade. Contudo, observa-se que a modificação de superfície não diminuiu a cristalinidade do material, caracterizado pela manutenção e amplitude dos picos característicos das fases observadas antes da modificação.

Pelas análises comparativas, observa-se a formação da fase ferrita de cobalto e traços de hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) identificados respectivamente pelas fichas cristalográficas JCPDF 22-1086 e JCPDF 33-0664. O método de refinamento de estrutura corroborou com esse resultado, apresentando a existência da hematita como segunda fase na estrutura das NPMs; as NPMs apresentaram composição de

83,95% de ferrita de cobalto e 16,05% de hematita, enquanto as NPMs após a modificação da superfície com TEOS e APTES apresentaram composição de 84,29% de ferrita de cobalto e 15,72% de hematita.

Na Tabela 02 são exibidos os valores relativos à estrutura das NPMs antes e após a modificação da estrutura referentes à cristalinidade e ao tamanho do cristalito do pico de maior intensidade (311), obtidos a partir dos resultados de DRX.

**Tabela 02:** Cristalinidade e tamanho de cristalito para o pico de maior intensidade (311) para as NPMs.

NPMs	Tamanho do cristalito (nm)	Cristalinidade (%)
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	24,59	60,3
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	21,25	59,1

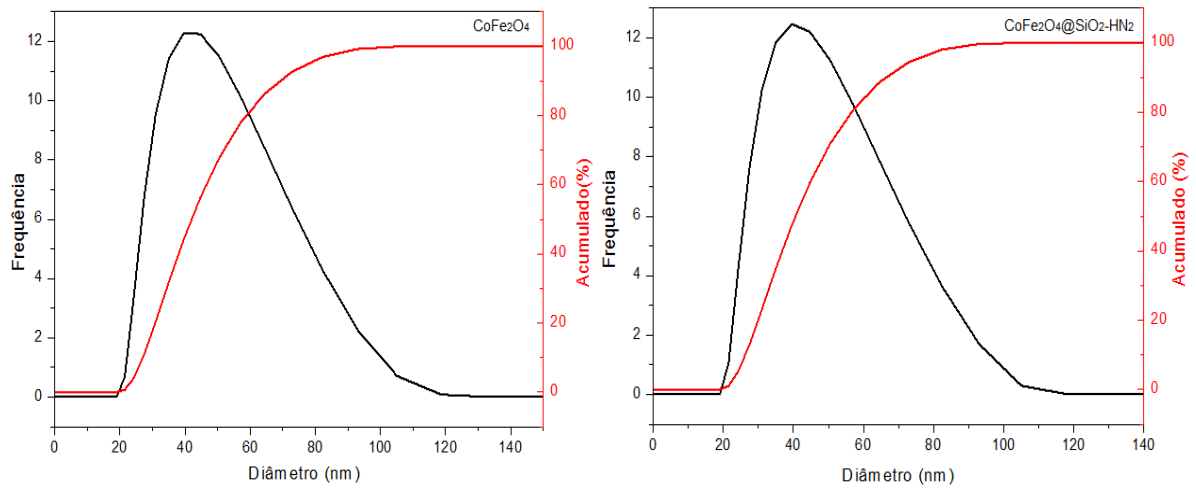
Os resultados obtidos de DRX para as NPMs convergem com os obtidos por França *et al.* (2014) ao prepararem NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modificados com APTES para imobilização da GOD, onde houve a observação da presença da segunda fase de hematita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). A presença dos agentes silanos não é identificada nos espectros de DRX devido a sua característica amorfa.

A confirmação da alta cristalinidade e das fases presentes na estrutura das NPMs, comprovam a eficiência da obtenção desse tipo de material pela síntese de combustão. O efeito de blindagem causado pelo revestimento da sílica amorfa não foi pronunciado em relação à cristalinidade do material, visto que os resultados para as NPMs antes e após modificação não teve diferença significativa; efeitos de desaglomeração de partículas, ocasionados pelo emprego de agentes silanos, podem estar relacionados com a pequena diferença na redução de cristalinidade e tamanho do cristalito das NPMs, ao mesmo tempo que não foi observado modificação na estrutura das nanopartículas. Resultados similares de DRX para NPMs *core-shell* a base de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> revestidas com sílica comprovaram a presença de estruturas nanocristalina sem que a modificação com SiO<sub>2</sub> tenha ocasionado mudanças na estrutura precursora referente à fase espinélio da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (MALEKI *et al.*, 2015).

### 5.1.3. Distribuição Granulométrica

A distribuição granulométrica das NPMs, relativa ao tamanho das partículas em função da frequência e do acumulado, antes e após silanização e funcionalização, pode ser verificada na Figura 13.

**Figura 13:** Distribuição granulométrica das amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

Os valores dos índices de tendência central, média, mediana e moda, das distribuições de tamanho de partícula das NPMs estão dispostas na Tabela 03.

**Tabela 03:** Índices de tendência central do tamanho de partícula das NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .

Amostras	Média (nm)	Mediana (nm)	Moda (nm)
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	43,8	41,8	37,3
$\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	45,4	48,5	37,4

Pelos resultados de distribuição granulométrica verifica-se, para as NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , resultados semelhantes de tendência larga, assimétrica positiva, ou seja, possui moda menor que a mediana, que, por sua vez, é menor que a média aritmética, e unimodal. O aumento discreto de 3,7% do tamanho da partícula se deve ao recobrimento com sílica.

#### 5.1.4. Análise textural

Os valores de área superficial específica ( $S_{BET}$ ), do volume do poro ( $V_p$ ), do diâmetro do poro ( $D_p$ ), e da relação entre o diâmetro de partícula, obtido por distribuição granulométrica, e o tamanho de cristalito ( $T_c$ ), referentes às NPMs de  $CoFe_2O_4$  e  $CoFe_2O_4@SiO_2-NH_2$ , se encontram dispostos na Tabela 04.

**Tabela 04:** Valores de área superficial específica ( $S_{BET}$ ), volume de poro ( $V_p$ ) e diâmetro de poro ( $D_p$ ) das amostras em estudo.

Amostras	$S_{BET}$ ( $m^2/g$ )	VP ( $cm^3/g$ )	Dp (nm)	Tc (nm)	$D_m/T_c$
$CoFe_2O_4$	16,64	0,011	3,12	24,59	1,78
$CoFe_2O_4@SiO_2-NH_2$	3,61	0,004	3,30	21,25	2,13

Pelos dados obtidos, observa-se que as NPMs de  $CoFe_2O_4$  apresentam área superficial de  $16,64m^2/g$ , com diâmetro médio de partícula inferior a 100nm, característico de materiais nanométricos. A modificação de superfície ocasionou o aumento esperado no tamanho da partícula médio em relação ao tamanho da partícula precursora. Conseqüentemente, pela modificação superficial da partícula, a área específica foi reduzida a 21,7% do valor inicial, ocasionado pelo recobrimento com os agentes silanos.

Mediante os valores de volume e diâmetro do poro, verifica-se a diminuição do volume e um aumento inexpressivo do diâmetro poroso, decorrente do preenchimento por sílica nos poros da ferrita, ocasionando perda da capacidade espacial e dilatação das paredes dos poros. Os valores de diâmetro, tanto para a ferrita de cobalto como para a mesma após modificação de superfície, configuram mesoporosidade, ou seja, diâmetro de poro compreendido na faixa entre 2 e 50 nm. As relações entre o diâmetro da partícula e o tamanho do cristalito das NPMs apresentam valores maiores que 1 unidade, característica de materiais policristalinos, e de fácil aglomeração devido a sua alta tensão superficial.

Sem revestimento, as NPMs têm superfícies hidrofóbicas com uma grande área superficial com um propensão à aglomeração; esse fenômeno é reduzido com o recobrimento por sílica (AMIRI e SHOKROLLAHI, 2013). Observa-se que mesmo com as NPMs silanizadas e funcionalizadas apresentando aumento discreto do diâmetro de partícula, ocasionado pelo recobrimento por sílica amorfa, o tamanho do

cristalito de ferrita de cobalto foi reduzido, comprovando o efeito de desaglomeração das NPMs de ferrita de cobalto após a modificação de superfície.

### 5.1.5. Potencial Zeta

Na Tabela 05 estão apresentados os valores de potencial zeta (PZ) das amostras  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , obtidos pela análise das NPMs dispersas em meio aquoso em pH 7.0.

**Tabela 05:** Valores do potencial Zeta das amostras  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .

Amostra	Potencial Zeta (mV)
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	-49,2
$\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	-0,2

As partículas, antes e após a modificação com os agentes silanos, apresentaram valores de potencial zeta negativo, sendo que a amostra  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  apresenta uma densidade de cargas negativas pouco superior à de cargas positivas em sua superfície (-0,2 mV), tornando a superfície do material, próxima do caráter neutro. A NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  apresentou alto valor de potencial zeta negativo (-49,2 mV), caracterizando elevada densidade de cargas negativas na sua superfície, o que propicia a atração eletrostática com biomoléculas carregadas positivamente no pH em estudo.

Para imobilização de biomoléculas, esse balanço de cargas é importante, pois dependendo do pH utilizado, e de acordo com o ponto isoelétrico, a biomolécula pode apresentar carga positiva ou negativa, favorecendo as forças de repulsão ou atração eletrostática com as NPMs com cargas definidas pelas medidas de potencial zeta. Para a enzima em estudo, a GOD possui ponto isoelétrico igual a 4,2, sendo então carregada negativamente em pH7.0. A modificação da superfície com os agentes silanos favorece a diminuição da repulsão eletrostática entre as NPMs e a GOD, beneficiando à imobilização.

A repulsão eletrostática entre as partículas é maior quanto maior for o módulo do potencial zeta, se sobrepondo à tendência à agregação das partículas causada pela ação das forças de Van der Waals (ALVES JUNIOR e BALDO, 2014). Para uma nanosuspensão fisicamente estável em um meio, é requerido um mínimo de PZ

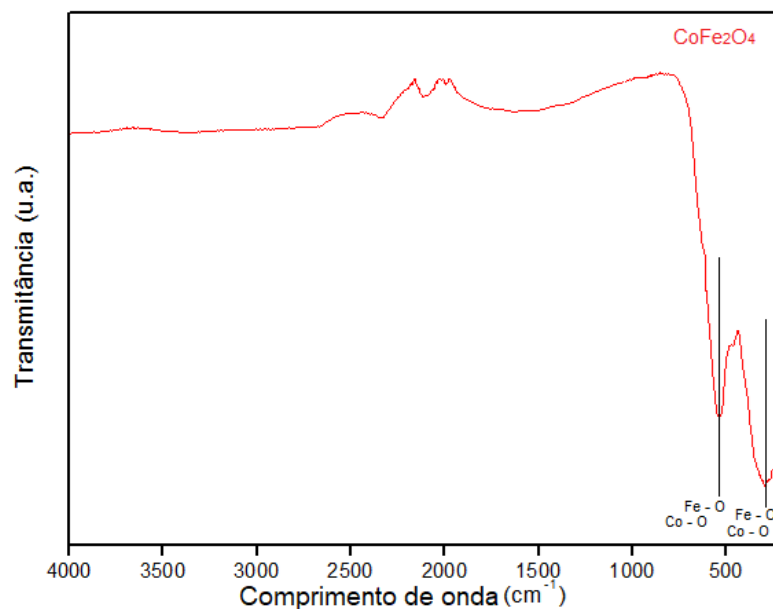
de  $\pm 30$  mV, para que ocorra a estabilidade por forças de repulsão eletrostática; combinando estabilização eletrostática e estérica, relativa à geometria da molécula, ocasionado pela modificação de superfície, para valores de PZ mínimo de  $\pm 20$  mV pode-se considerar nanosuspensões estáveis (MULLER et al., 2001).

A funcionalização da superfície altera o potencial zeta das NPMs. Isso tem um efeito significativo na interação eletrostática entre o substrato e a superfície; os substratos carregados negativamente têm uma forte eletrostática para NPMs carregadas positivamente e vice-versa (CHAIBAKHSH e MORADIOSHOEILI, 2019).

### 5.1.6. Espectrometria na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 14 é exibido o espectro vibracional na região de infravermelho da amostra de ferrita de cobalto, antes da modificação de superfície.

**Figura 14:** Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) da  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .



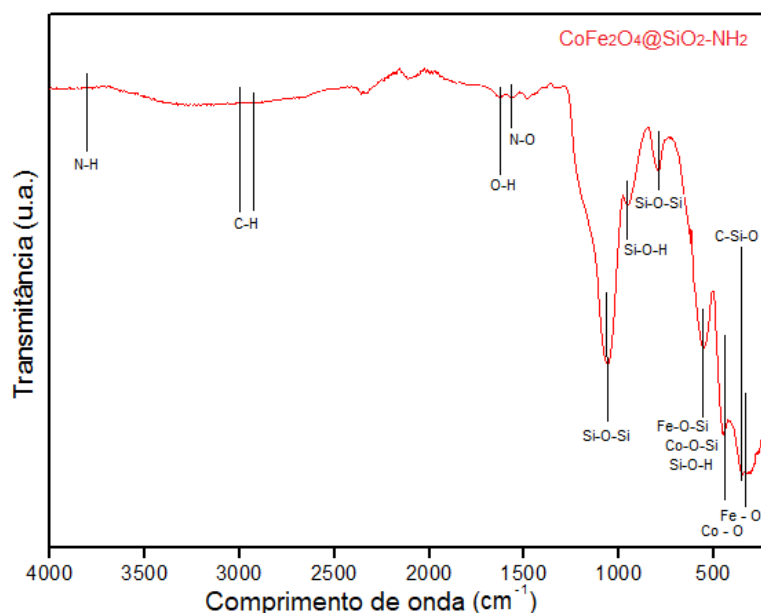
Fonte: (autoria do autor).

De acordo com Srivastava et al., (2010), os modos vibracionais gerados pelas ligações metal-oxigênio (M-O) são detectados por volta de 400 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , sendo tal valor determinado pelo tamanho da ligação  $\text{Fe}^{3+} - \text{O}^{2-}$ , tanto nos sítios octaédricos, quanto nos tetraédricos; os modos vibracionais de íons metálicos bivalentes

tetraédricos são encontrados em regiões próximas a  $590 - 600 \text{ cm}^{-1}$ , enquanto os octaédricos são detectados na região de  $400 \text{ cm}^{-1}$ . (DELIGOZ et al., 2013; SHARIFI et al., 2012; RANA et al., 2010). No espectro apresentado na Figura 14, são detectadas essas bandas referentes aos estiramentos das ligações entre os átomos de oxigênio com os átomos metálicos de ferro e cobalto.

O espectro vibracional na região de infravermelho das amostras de ferrita de cobalto após modificação de superfície é apresentado na Figura 15.

**Figura 15:** Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) da  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

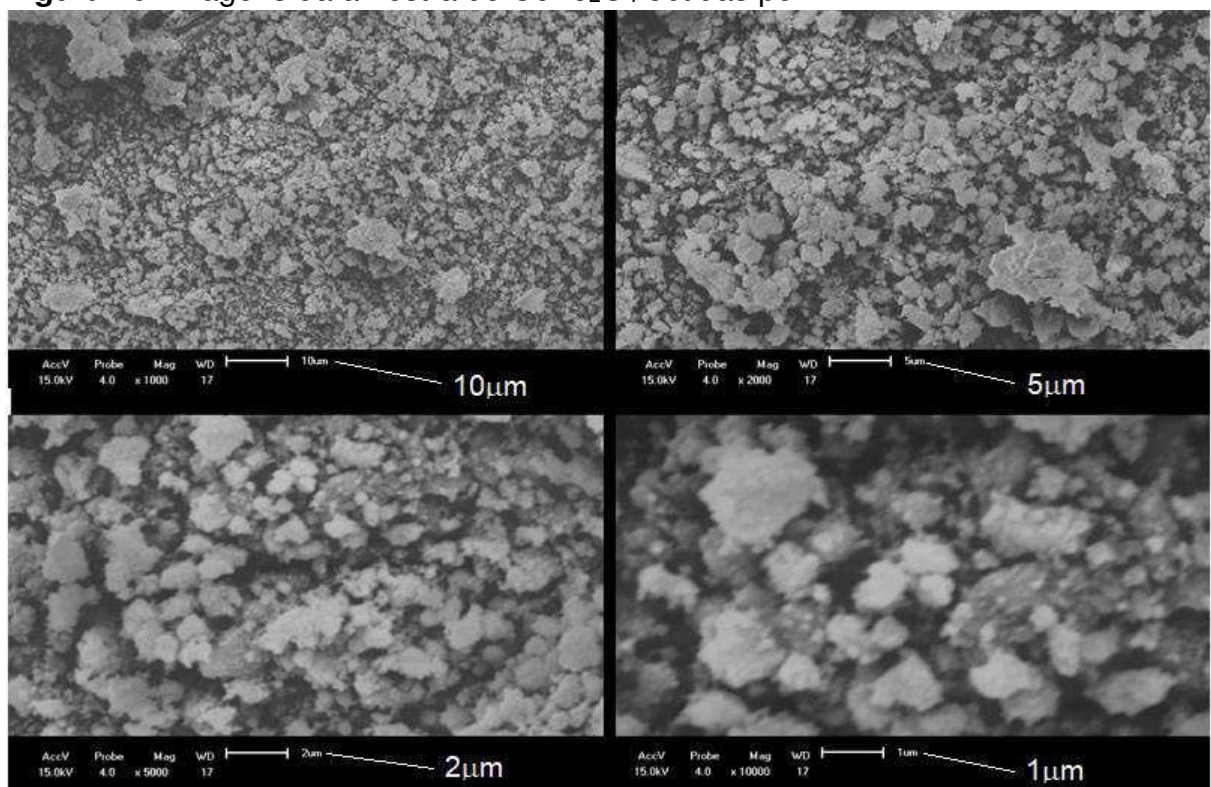
Na Figura 15, a evidência de recobrimento da ferrita de cobalto pelo processo de silanização é constatada pelo surgimento de um ombro na região de  $970\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ , correspondente à banda de absorção das ligações Si-O-Si e Si-O-H, ao lado da banda relativa ao Fe-O e Co-O em  $575 \text{ cm}^{-1}$  da ferrita de cobalto, e da banda em torno de  $600 \text{ cm}^{-1}$  relativa as ligações Si-O-Fe e Si-O-Co; duas impressões típicas para sílica são exibidas no espectro, sendo uma a forte banda larga a  $1094\text{cm}^{-1}$ , correspondentes à vibração de estiramento assimétrica Si-O-Si, e a outra, uma banda fraca a  $477\text{cm}^{-1}$  atribuída à vibração C-Si-O (BADRUDDOZA et al., 2013; ZENG et al., 2013). Os grupamentos ( $\text{NH}_2$ ) são caracterizados por bandas menores na região  $2800\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ , correspondendo à vibração de estiramento C-H da cadeia carbônica do APTES, e em  $1553\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao grupo N-O, possivelmente

formado em reações secundárias. Bandas em  $975\text{ cm}^{-1}$  são correspondentes ao grupo funcional Si-OH, e em  $796\text{ cm}^{-1}$ , são características do estiramento Si-O-Si (LIMAYE et al., 2017).

### 5.1.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias das amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens obtidas para a  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  estão apresentadas na Figura 16, com ampliação variando entre 1000 a 10000 vezes.

**Figura 16:** Imagens da amostra de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  obtidas por MEV.



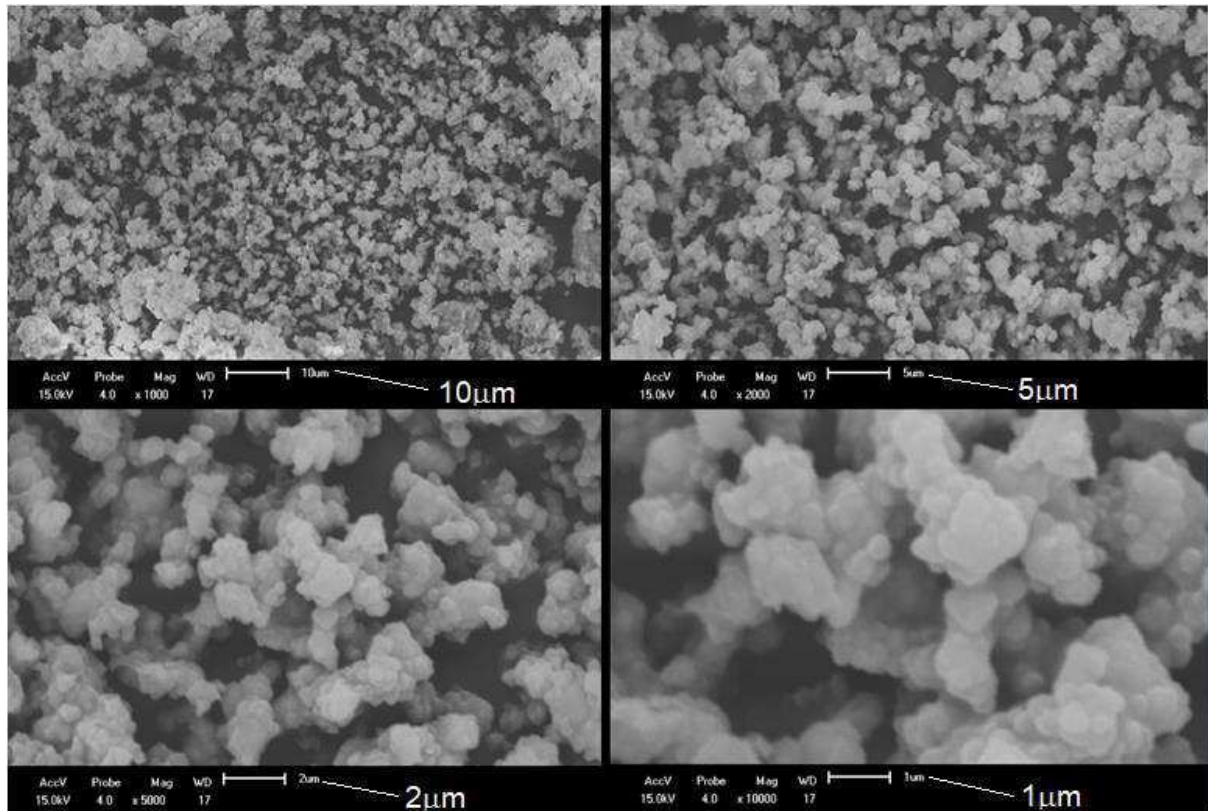
Fonte: (autoria do autor).

Por meio da análise das imagens contidas na Figura 16, as amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , obtidas por reação de combustão, apresentaram morfologia característica de partículas e/ou aglomerados com formatos irregulares e tamanhos variados, menores que  $10\mu\text{m}$ , constituídos por partículas pequenas que estão interconectadas por interações fracas, características de ferritas obtidas pelo método de reação de



combustão (DINIZ et al., 2015). Na Figura 17, estão apresentadas as micrografias em diferentes amplitudes (de 1000 a 10000 vezes) da amostra de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .

**Figura 17:** Imagens da amostra de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  obtidas por MEV.



Fonte: (autoria do autor).

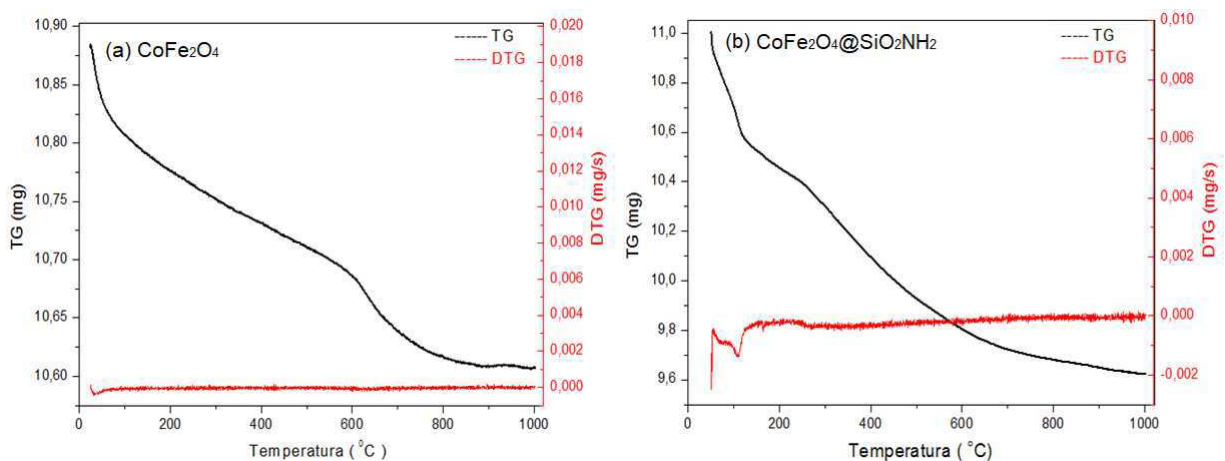
A modificação da superfície pode ser comprovada pelas imagens apresentadas na Figura 17, caracterizada pela formação de aglomerados de formato irregulares. Verifica-se que, apesar do recobrimento com sílica, as partículas preservaram dimensões de aglomerados de tamanho abaixo de  $10\mu\text{m}$ , e que o recobrimento foi uniforme quando comparado as imagens de morfologia apresentadas pela partícula antes e após o recobrimento, mostrando a eficiência do método de Stöber de crescimento uniforme da sílica em volta das NPMs.

O aspecto mais rígido entre as partículas e a baixa porosidade, são verificados nas imagens apresentadas após modificação da superfície das NPMs com agentes silanos; o agente silano APTES, quando acoplado aos aglomerados, aumenta a rigidez das NPMs pelo “bloqueio” dos poros; os aglomerados apresentam um aspecto de blocos impregnados com material amorfo em que não é possível observar o contato entre as partículas (FRANÇA et al., 2014).

### 5.1.8. Análise Termogravimétrica (TG/DTG)

Os valores de temperaturas de decomposição e de perda de massa percentual das NPMs podem ser observados pelos gráficos de termogravimetria apresentados na Figura 18.

**Figura 18:** Gráficos de TG/DTG das amostras de (a)  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e (b)  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

Analisando o gráfico (a) da Figura 18, percebe-se 3 etapas de perda de massa no intervalo de temperatura entre 20°C a 1000°C; a primeira perda de massa, compreendida entre 20°C a 200°C, pode estar associada à evaporação de água adsorvida fisicamente, já a segunda, entre 200°C a 600°C, está associada à remoção de água estrutural da superfície das NPMs, e a terceira, entre 600°C a 900°C, corresponde à recristalização da fase do espinélio da ferrita de cobalto. Em percentual de perda, a amostra apresentou perda de 2,52% em massa, possivelmente proveniente de umidade absorvida, já que o método de obtenção das NPMs se deu por síntese de combustão, com posterior calcinação a 1000°C, mostrando-se como um material altamente estável termicamente na faixa de temperatura estudada.

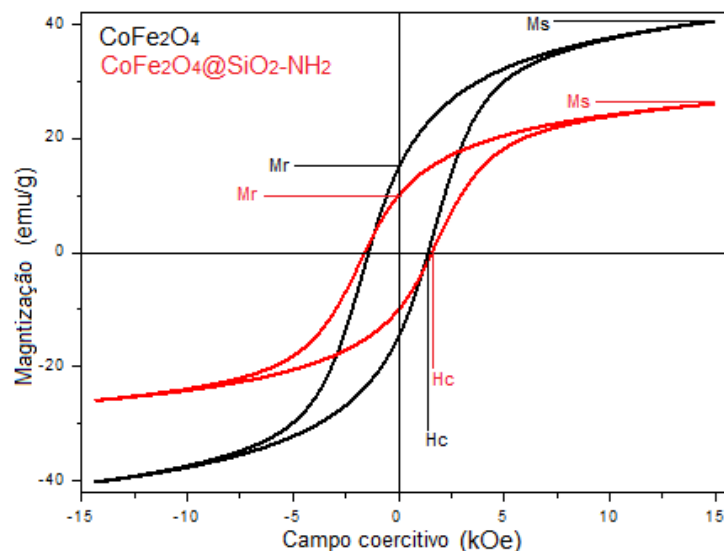
O gráfico (b), apresentado na Figura 18, é relativo às NPMs após recobrimento com os agentes silanos. Para as NPMs silanizadas com TEOS e funcionalizadas com APTES, a primeira perda de massa (30°C a 200°C) está associada à evaporação de água adsorvida fisicamente pelas NPMs silanizadas. A segunda

perda de massa (200°C a 300°C), está associado a remoção de água estrutural (desidroxilação) da superfície das NPMs silanizadas como também a decomposição do agente silano APTES. A terceira perda de massa (300°C a 900°C) pode ser atribuída à condensação do silanol (KHANNA e VERMA, 2013). Para a amostra com superfície modificada com os agentes silanos, a perda de massa foi de 12,55%; o processo de silanização aumentou a perda de massa, o que já era esperado uma vez que as NPMs foram recobertas por um material organometálico (APTES) (YAO et al., 2012).

### 5.1.9. Medidas Magnéticas

Na Figura 19 são apresentadas as curvas de magnetização das amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , em função do campo aplicado.

Figura 19: Curvas de magnetização (histerese) das amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

Pelas curvas dipostas na Figura 19, constata-se que amostras não apresentaram comportamento superparamagnético, nem antes e nem após modificação de superfície com os agentes silanos. Essa propriedade é observada quando a energia térmica do meio é suficiente para quebrar a barreira de energia magnetocristalina, característica de materiais com tamanho médio em torno de 5nm para partículas de ferrita de cobalto (ESHLAGHI e KAMELI, 2011). As NPMs

CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> apresentaram comportamento de estado bloqueado, característico de materiais em escala nanométrica. O estado de bloqueio em nanopartículas é fortemente dependente da anisotropia do sistema; com o aumento do campo, a magnetização das nanopartículas atinge um estado de saturação (Ms) e é definida quando a magnetização assume um valor constante com o aumento do campo magnético. Quando o campo é levado a zero, a magnetização não se anula, e as NPMs apresentam uma magnetização remanente (Mr). Para reverter os efeitos causados pela magnetização induzida pelo campo aplicado, faz-se necessária a aplicação de um campo magnético em direção oposta ao campo anteriormente aplicado, chamado de campo coercivo ou coercividade (Hc) (FRANCISQUINI, 2014).

A coercividade está associada a uma série de parâmetros físicoquímicos do material, como tamanho dos domínios, temperatura, ordenamento cristalino, e composição química (CULLITY e GRAHAM, 2011). A largura da histerese, verificada em ambas as curvas apresentadas na Figura 19, está associada diretamente ao valor da coercividade (Hc); materiais que apresentam maior valores de Hc apresentam uma maior resistência à desmagnetização e constituem a classe dos magnetos duros. Visto que a ferrita de cobalto, dentre tantas ferritas é caracterizada como um material duro, os resultados de magnetização corroboram com os verificados na literatura (SEARS et al., 2008).

Na Tabela 06 estão apresentados os parâmetros magnéticos relativos a magnetização de saturação (Ms), a magnetização remanente (Mr), e ao campo coercitivo (Hc) das amostras de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 06:** Parâmetros magnéticos referentes às NPMs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

<b>Amostras</b>	<b>Ms (emu/g)</b>	<b>Mr (emu/g)</b>	<b>Hc (kOe)</b>	<b>Mr/Ms</b>
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	40,4	14,76	1,41	0,36
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	26,0	10,05	1,59	0,39

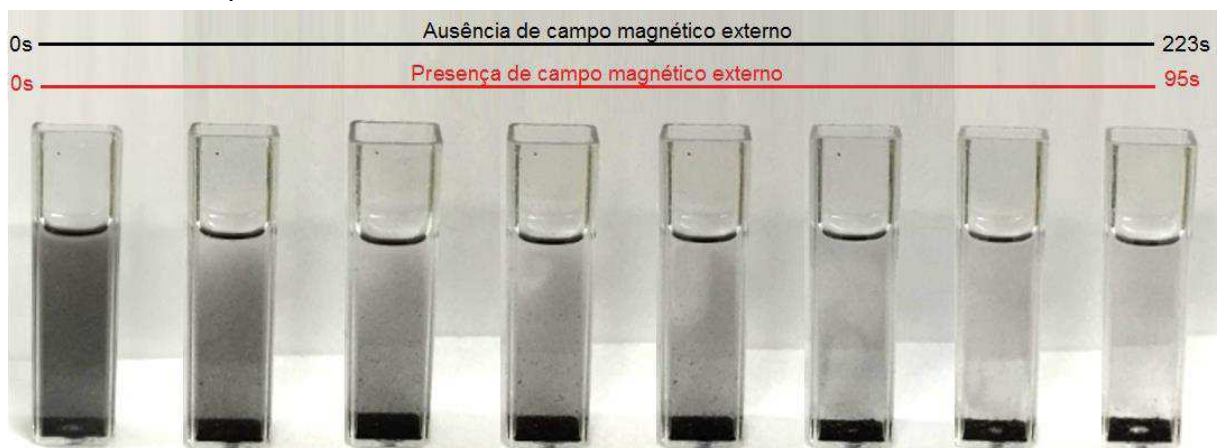
Pela análise dos resultados presentes na Tabela 06, verifica-se diminuição de 35,6% da magnetização de saturação após as NPMs serem silanizadas e funcionalizadas com TEOS e APTES; esse fato se deve ao efeito da camada de revestimento com sílica amorfa sobre as NPMs (WANG et al., 2011). A magnetização remanente decaiu 31,9% para as NPMs com a superfície modificada,

e em compensação dessa magnetização, houve um aumento de 12,8% da coercividade. Relacionando as magnetizações de saturação e a remanente, foram obtidos valores próximos para as curvas de magnetização das amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (0,36) e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  (0,39), comprovando-se que ambas as curvas de histerese apresentam formatos iguais, com campos coercitivos bem próximos (1,41kOe e 1,59kOe).

#### 5.1.10. Teste de sedimentação

As amostras de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  foram submetidas a testes de sedimentação na presença e na ausência de um campo magnético externo. Quando próximos a um ímã, as partículas se apresentaram fortemente atraídas, podendo ser facilmente removidas por atração magnética, comprovando que após a adição de TEOS e APTES, as NPMs apresentaram boa resposta e sensibilidade magnética. Na Figura 20, são apresentadas imagens da observação do comportamento de sedimentação das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  no decorrer do tempo de análise, na presença e na ausência de campo magnético externo.

**Figura 20:** Imagens da sedimentação das partículas de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  no decorrer do tempo de análise.



Fonte: (autoria do autor).

O tempo de sedimentação para as NPMS de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  foi de 223 segundos na presença apenas do campo gravitacional, e de 95 segundos na

presença de um campo magnético externo, apresentando-se como um material de fácil separação magnética.

## 5.2. Imobilização da glicose oxidase

### 5.2.1. Pré-tratamento das NPMs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ com glutaraldeído

Para ativação dos grupos aminos das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , foi utilizado o ligante homobifuncional glutaraldeído. Para se obter as melhores condições de uso desse ligante, relativos à concentração de glutaraldeído utilizada na ativação das NPMs e ao tempo de ativação, testes preliminares de imobilização foram realizados com concentração de GOD igual a 1mg/mL de solução. Na Tabela 07 encontram-se os valores de concentração da solução de GOD após a imobilização no tempo de 1 hora, a 25°C, relativos às diferentes concentrações de glutaraldeído.

**Tabela 07:** Concentração de GOD após imobilização nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  ativadas em diferentes concentrações de glutaraldeído.

Glutaraldeído (%)	GOD <sub>final</sub> (mg/ml)	q (mg <sub>Ads</sub> /mg <sub>Ads</sub> v)
0	1,000	0
1,0	0,866	0,042
2,0	0,848	0,048
3,0	0,857	0,045
4,0	0,867	0,042
5,0	0,871	0,041

Pelos dados obtidos dispostos na Tabela 07, verifica-se a diminuição da concentração da solução enzimática com o uso do glutaraldeído, o que confirma a transferência de massa de GOD, presente na solução, para a superfície das NPMs; as NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  sem o pré-tratamento com o glutaraldeído não foram capazes de imobilizar a GOD, comprovando-se a necessidade do uso do glutaraldeído como ativador dos grupos aminos presentes na estrutura das NPMs.

Analisando os valores de concentração da solução final de GOD, verifica-se que utilizando glutaraldeído a 2%, foram obtidos melhores resultados de

imobilização, com capacidade adsortiva de 0,048 mg<sub>Adsb</sub>/mg<sub>Adsv</sub>. Esse fato pode ser explicado pela reticulação polimérica; o gllutaraldeído é um agente reticulante normalmente usado na formação de redes de polipeptídios e proteínas devido à reatividade dos grupos aldeídos, que prontamente formam bases de Schiff com os grupos amino das proteínas (LIN et al., 2006); em altas concentrações, a o favorecimento de ligação cruzada enzima-glutaraldeído-enzima, ocasionando impedimento estérico, diminuindo a imobilização da GOD nas NPMs. Na Tabela 08, são apresentados os valores referentes ao tempo de ativação das NPMs com glutaraldeído a 2%, e os respectivos valores de concentração final de GOD.

**Tabela 08:** Concentração de GOD após imobilização nas NPMs de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> ativadas com glutaraldeído a 2%, em diferentes tempos de ativação.

<b>Tempo (min)</b>	<b>GOD<sub>final</sub> (mg/mL)</b>	<b>q (mg<sub>Adsb</sub>/mg<sub>Adsv</sub>)</b>
30	0,866	0,047
60	0,862	0,048
120	0,867	0,047

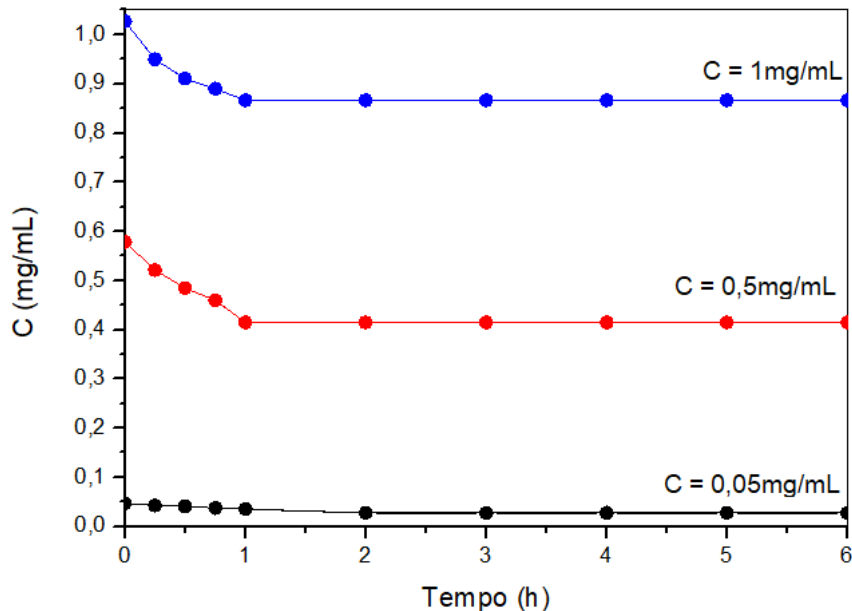
Pelos resultados apresentados na Tabela 08, observa-se que o tempo de ativação das NPMs de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> com glutaraldeído a 2% não influencia de forma significativa na imobilização da GOD. Para os testes, adotou-se o tempo de 1 hora para a ativação das NPMs com solução de glutaraldeído a 2%, a 25°C.

### **5.2.2. Acompanhamento da cinética de imobilização da GOD - Determinação de parâmetros cinéticos**

A fim de investigar o mecanismo de adsorção e as etapas controladoras do processo que incluem transferência de massa, é necessário o ajuste dos dados experimentais a modelos cinéticos (HO e MCKAY, 1998; HO e MCKAY, 1999). Para tal estudo, testes com variação de massa de GOD foram realizados, a fim de se obter perfis em baixas, intermediárias, e altas concentrações, relativas à massa de adsorvente utilizada (3mg NPMs), previamente ativada com solução de glutaraldeído a 2% no tempo de 1 hora. Na Figura 21, são apresentadas as curvas cinéticas do decaimento da concentração da solução com o tempo obtidas na imobilização da

GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  para concentrações iniciais de 0,05mg/mL, 0,5mg/mL e 1,0mg/mL de solução GOD.

**Figura 21:** Curvas cinéticas de adsorção da GOD, nas concentrações de 0,05mg/ml, 0,5mg/ml e 1,0mg/ml, nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

Observa-se, pelas curvas apresentadas na Figura 21, que os perfis cinéticos, para as concentrações em estudo, apresentaram comportamento de adsorção da GOD nas NPMs; as NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  apresentaram afinidade de sorção com a GOD, sendo o equilíbrio estabelecido em um intervalo de tempo igual para as concentrações iniciais de 0,5mg/mL e 1,0mg/mL, e superior ao da concentração de 0,05mg/mL; esse fenômeno era esperado, visto que em concentrações mais baixas, a transferência de massa é desfavorecida devido a resistência à passagem de massa da solução para a fase sólida.

Como modelo cinético adotado para o estudo da imobilização da GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , foi adotado o modelo proposto por Lagergren (1898.) para adsorção em superfícies sólidas em um sistema de adsorção sólido/líquido, conhecido como modelo de pseudo-primeiro ordem. Na Tabela 09 são apresentados os valores da capacidade de adsorção ( $\text{mg}_{\text{Adsb}}/\text{mg}_{\text{Adsv}}$ ) e do tempo (min) em equilíbrio, e da constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ) da GOD nas NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , para a concentração de 0,05mg/mL. A relação



matemática da capacidade adsorptiva com o tempo para um modelo de pseudo-primeira ordem é apresentada na equação 05.

**Tabela 09:** Valores da capacidade de adsorção ( $\text{mg}_{\text{Adsorb}}/\text{mg}_{\text{Adsorb}}$ ) e do tempo (min) em equilíbrio, e da constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ) da GOD nas NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , para concentração de 0,05mg/mL.

Concentração (mg/ml)	$t_{\text{eq}}$ (min)	$q_{\text{eq}}$ ( $\text{mg}_{\text{Adsorb}}/\text{mg}_{\text{Adsorb}}$ )	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )
0,05	120	$0,025 \pm 7 \cdot 10^{-4}$	$0,85 \pm 0,15$

$$q = q_e(1 - e^{-kt}) \quad (5)$$

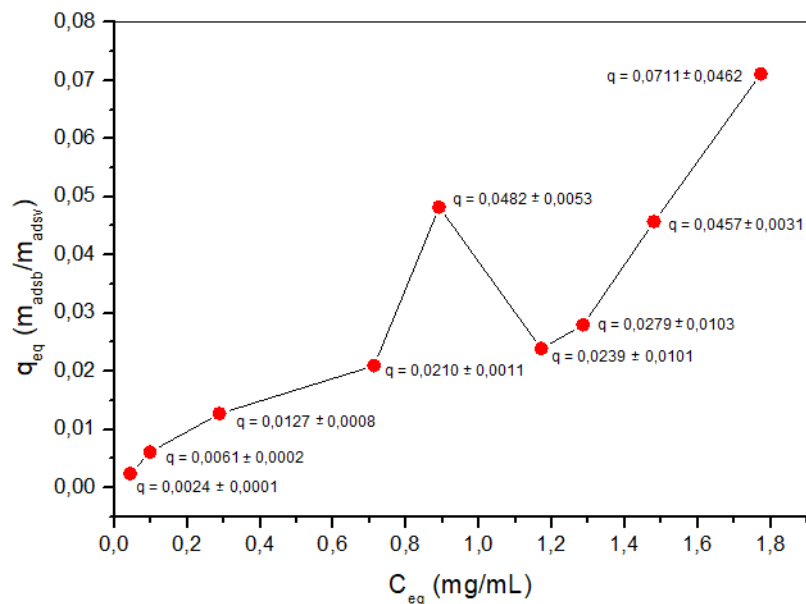
Onde  $q$  é capacidade adsorptiva em um tempo qualquer (mg/mg),  $q_{\text{eq}}$  é a capacidade adsorptiva no equilíbrio (mg/mg), e  $k$  é a constante de taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ).

Verificou-se que o modelo proposto prevê de maneira satisfatória o comportamento da imobilização da GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  para concentração inicial de 0,05mg/mL, apresentando fator de correlação de ajuste de dados experimentais próximo à unidade ( $R=0,94$ ); o modelo de pseudo-primeira ordem não se ajustou aos dados obtidos experimentalmente para as concentrações de 0,5mg/mL e 1mg/mL, contudo, como é esperado que a transferência de massa seja mais lenta a baixas concentrações, os parâmetros cinéticos obtidos com a concentração mais baixa de 0,05mg/mL permitem tirar conclusões a respeito do processo de adsorção da GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . Os parâmetros cinéticos provem informação que é requerida para selecionar as condições ótimas de uma futura aplicação do processo de adsorção em escala industrial (NASCIMENTO et al., 2014). Como o equilíbrio a baixas concentrações foi obtido no tempo de 120 minutos, os testes de imobilização foram conduzidos nesse intervalo de tempo como garantia para atingimento do equilíbrio em qualquer concentração superior a 0,05mg/mL.

### 5.2.3. Isoterma de adsorção

Na Figura 22, é apresentada a isoterma de adsorção da GOD a 4°C nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  ativadas com glutaraldeído, com concentração inicial de GOD variando entre 0,05mg/mL a 2mg/mL, no tempo de equilíbrio de 120 minutos.

**Figura 22:** Isoterma de adsorção a 4°C da GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

Pelo formato da curva, apresentada na Figura 22, observa-se comportamento de formação de monocamada adsorvida entre 0,05mg/mL e 1mg/mL; embora não seja pronunciada, verifica-se curvatura descendente, apresentando regiões mais favoráveis à adsorção, entre 0,05mg/L a 0,3mg/mL e 0,5mg/mL e 1mg/mL, onde a massa do adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente é alta para uma baixa concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida. Entre 0,3mg/mL e 0,5mg/mL a curva apresenta leve comportamento desfavorável à adsorção, observado pela curvatura ascendente, onde a massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente é baixa, porém crescentes mesmo para uma alta concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida (NASCIMENTO et al., 2014).

A isoterma a 4°C verificada na Figura 22, apresenta, acima da concentração inicial de GOD de 1mg/ml, comportamento de dessorção de GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ . Esse fenômeno pode ser explicado pelo tipo de adsorção ocorrida no sistema; entre 0,05mg/mL a 1mg/mL, as forças de atração entre o adsorvente e o adsorbato são de alta intensidade, caracterizada pela formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais do APTES, previamente ativados com glutaraldeído, e a enzima, caracterizando um adsorção química ou quimissorção. Em concentrações um pouco acima de 1mg/ml, devido a ocupação de todos os ligantes funcionais da partícula, as forças predominantes entre o adsorvente e o

adsorbato passam a ser de natureza física, de fraca intensidade, o que pode ocasionar a diminuição da capacidade adsortiva. Em concentrações superiores a 1,5mg/mL, a formação de multicamadas explica o comportamento novamente crescente da capacidade adsortiva, porém na formação de novas camadas, a adsorção da GOD é de natureza física, podendo ocorrer a dessorção da enzima em condições que favoreçam a reversibilidade da adsorção.

Pelos resultados obtidos da isoterma de adsorção, constata-se que a concentração inicial de GOD de 1mg/mL é mais favorável para imobilização dessa enzima nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e que fornece a maior carga enzimática adsorvida por grama de NPMs, visto que o objetivo é garantir a imobilização permanente da maior quantidade de GOD possível nas NPMs, e que acima dessa concentração as interações entre a enzima e o adsorvente não são permanentes.

Partindo das pressuposições de que a superfície contém um número fixo de sítios de adsorção, de que todas as espécies adsorvidas interagem somente com um sítio e não entre si, de que a adsorção é limitada à monocamada, e de que a energia de adsorção de todos os sítios é idêntica e independe da presença de espécies adsorvidas nas vizinhanças dos sítios, alguns modelos de isotermas de adsorção foram correlacionados aos dados experimentais obtidos. Na Tabela 10 são apresentados os parâmetros calculados de correlação (adequação ao modelo), das constantes de equilíbrio de adsorção para os modelos de Langmuir (1918), Henry e Freundlich (SUZUKI, 1990), e dos desvios dos dados experimentais em relação ao modelo proposto, na faixa de concentração entre 0,05mg/mL e 1mg/mL que corrobora com os pressupostos de adsorção em monocamada.

**Tabela 10:** Parâmetros de adequação aos modelos de isotermas de adsorção.

<b>Modelo</b>	<b>Coefficiente de Correlação - <i>R</i></b>	<b><i>K</i></b>	<b><i>Desvio médio (%)</i></b>
Freundlich	0,97	0,042	12,6
Henry	0,96	0,054	13,7
Langmuir	0,93	0,675	33,1

Pelos dados observados na Tabela 10, verifica-se que o modelo de Freundlich apresentou valor inferior de constante de equilíbrio, comparado aos modelos de Henry e Langmuir, porém apresentou melhor correlação com os dados experimentais, proporcionando um desvio menor para os dados obtidos

experimentalmente em relação ao modelo. Esse modelo é um modelo empírico que descreve o equilíbrio em superfícies heterogêneas e assume a adsorção em multicamadas (MASSARANI, 1997). O modelo de Henry, que é caracterizado por apresentar relação linear entre a fase fluida e as concentrações de equilíbrio da fase adsorvida, com uma constante de proporcionalidade que é igual a constante do equilíbrio de adsorção, também se adequou bem aos dados experimentais obtidos na imobilização da GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , apresentando boa correlação entre os dados experimentais e o modelo proposto. Esse modelo é aplicado à adsorção em uma superfície uniforme a baixas concentrações.

O modelo de Langmuir não apresentou boa correlação com os dados obtidos; embora tenha apresentado valor maior de constante de equilíbrio, que representa a relação entre as constantes de adsorção e dessorção, quando comparado aos outros modelos, o modelo apresentou baixa correlação e alto desvio médio em relação aos dados experimentais. Esse modelo assume que as superfícies são homogêneas e que a adsorção ocorre em uma monocamada, representando uma adsorção química. Considera-se que todos os sítios ativos têm igual afinidade pelo adsorbato e, portanto, a adsorção de um sítio não vai afetar a adsorção do sítio adjacente a este. Além disso, as moléculas são adsorvidas em um número finito de sítios, sendo que cada sítio pode conter apenas uma molécula (LANGMUIR, 1918.). Esse resultado levanta a hipótese da adsorção na faixa de concentração até 1mg/mL não ser apenas química, podendo haver paralelamente adsorção física, de fraca intensidade na superfície da partícula, ocasionando uma fraca ligação entre o adsorbato e o adsorvente.

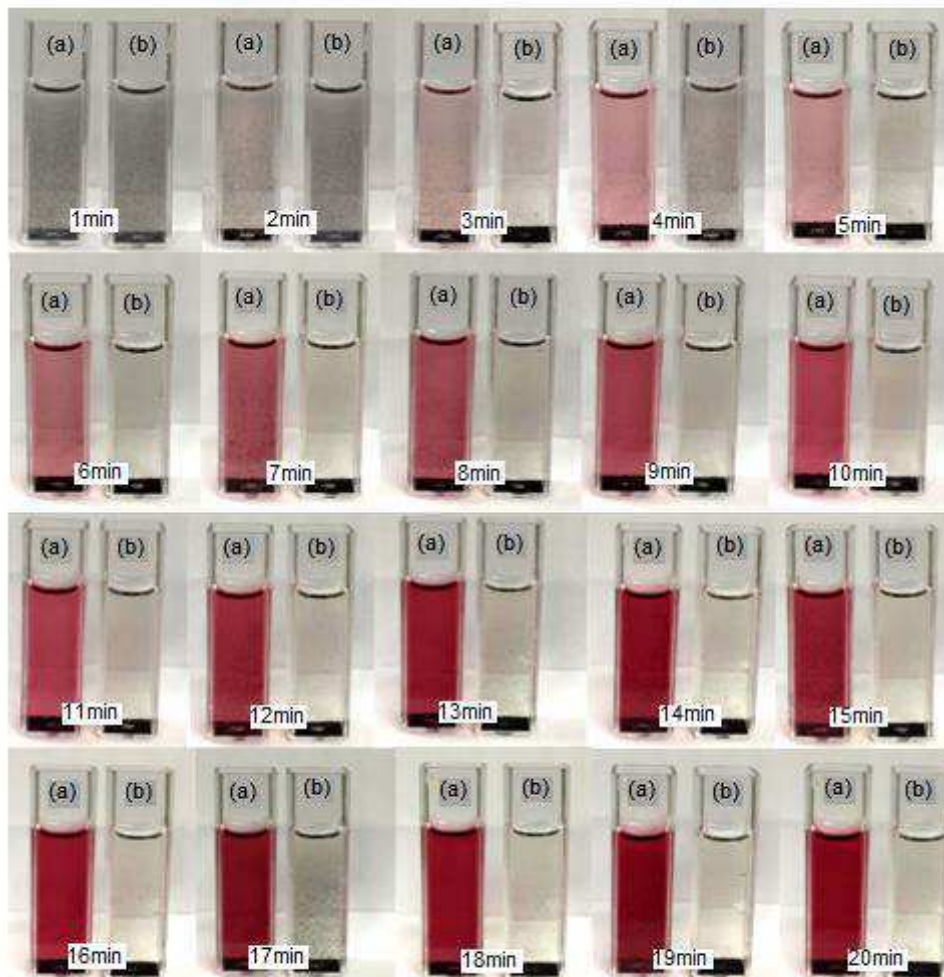
A quantidade imobilizada nas condições otimizadas foi de 48mg de GOD por grama de NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ; essa quantidade é inferior a valores reportados na literatura, onde a quantidade de GOD imobilizada por ligação cruzada com glutaraldeído é de 131mg/g (WANG et al., 2011). No caso em estudo, a imobilização foi conduzida por ligação covalente.

### **5.3. Atividade enzimática**

A atividade enzimática foi determinada para a enzima livre, e para a enzima imobilizada nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  nas condições de ativação com glutaraldeído por 1 hora, utilizando solução de GOD na concentração de 1mg/ml. Na

Figura 23 está ilustrado o desenvolvimento da formação do complexo de quinoneimina durante os testes de atividade da GOD, no intervalo de tempo de 20 minutos, para (a) as NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  com GOD immobilizada e (b) para NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  sem presença de GOD adsorvida.

**Figura 23:** Formação do complexo de quinoneimina durante os testes de atividade da GOD, no intervalo de tempo de 20 minutos, para as (a) NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  com GOD immobilizada e (b) para NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  sem presença de GOD adsorvida.



Fonte: (autoria do autor).

A enzima livre apresentou valores elevados de atividade, com valores em torno de 18,2U/mg de GOD livre. É perceptível a ausência de reação de formação de complexo nos testes utilizando as NPMs sem presença de GOD adsorvida (b), comprovado pela absorvância medida após 20 minutos de reação, a qual apresentou o mesmo valor do branco da amostra, comprovando que nas NPMs silanizadas com TEOS e funcionalizadas com APTES, não há grupamentos que

catalisem a oxidação da  $\beta$ -D-glucose em D-gluconolactona, com liberação simultânea de peróxido de hidrogênio, ou que interajam com os reagentes utilizados nos testes de atividade.

Na Figura 23 é observada a formação do complexo no teste de atividade da GOD imobilizada nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  (a); verifica-se que a GOD apresentou atividade enzimática após ser adsorvida nas NPMs, embora, em relação à enzima livre, a atividade da enzima imobilizada tenha decaído significativamente. Na Tabela 11, são apresentados os valores de atividade da GOD imobilizada nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , e os valores de decaimento percentual em comparação com a atividade da enzima livre. Na mesma Tabela 11, são apresentados os valores relativos à queda da atividade nos ciclos de reuso da GOD imobilizada.

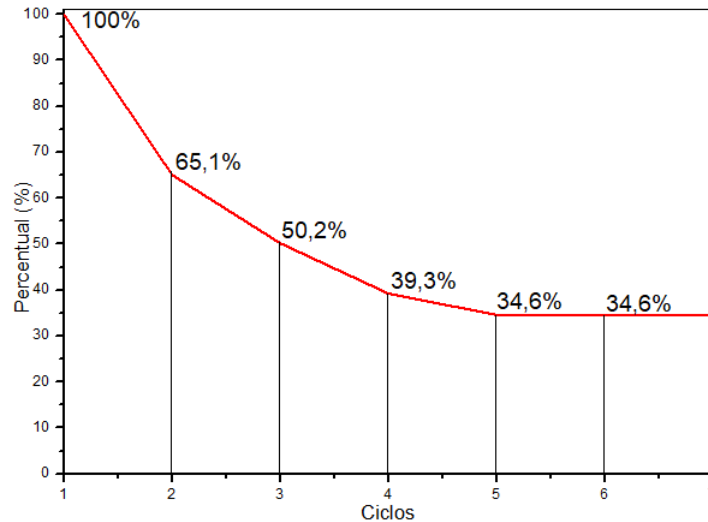
**Tabela 11:** Valores de atividade enzimática para GOD imobilizada nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ , e o decaimento de atividade relativo à enzima livre e aos ciclos de reuso.

Ciclos	Atividade (U/g)	Atividade relativa à enzima livre (%)	Atividade relativa aos ciclos (%)
1	34,3	0,19	100
2	22,3	0,12	65,1
3	17,2	0,09	50,2
4	13,4	0,074	39,3
5	11,8	0,065	34,6
6	11,8	0,065	34,6
7	11,8	0,065	34,6

Consideravelmente, a atividade enzimática da GOD decaiu em relação a enzima no estado livre em solução; esse fato pode ser explicado pela modificação química proveniente das ligações com o adsorvente, por impedimento estérico dos sítios ativos imposto ao substrato, ocasionado pela configuração espacial das moléculas adsorvidas, ou pela desativação dos sítios da enzima. Contudo, todos os sítios não perderam sua atividade, comprovada pela atividade remanescente após imobilização. Valores de atividade de GOD imobilizada em NPMs de ferrita de cobalto são relatados em torno de 24U/g (LEE et al., 2012); os valores de atividade obtidos para GOD imobilizada (34,3U/g) foram superiores aos reportados na

literatura, mostrando uma menor perda de atividade da GOD quando imobilizada nas NPMs. Na Figura 24 é apresentado um gráfico percentual de perda de atividade em relação aos ciclos de reuso, feito por separação magnética e lavagem com tampão fostato, pH7.0, da enzima imobilizada nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .

**Figura 24:** Percentual de perda de atividade em relação aos ciclos de reuso da enzima imobilizada nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ .



Fonte: (autoria do autor).

Pela análise do gráfico apresentado na Figura 24, observa-se que após 3 ciclos de reuso, a atividade da GOD imobilizada decaiu à metade do valor inicial, e que após 5 ciclos de reuso, a atividade decaiu a 1/3 da atividade inicial da GOD imobilizada, mantendo-se constante após 2 ciclos consecutivos; esses valores são confirmados com os reportados por (LEE et al., 2012; ASHTARI et al., 2010). A reutilização e separação da GOD imobilizada é um aspecto crítico e desejável em aplicações industriais; a diminuição na atividade de GOD observada é provavelmente causada pela perda ou aglomeração das NPMs após separação e redispersão nos testes de atividade (ROSSI et al., 2004). Embora a atividade da enzima glicose-oxidase tenha diminuído significativamente, a GOD imobilizada apresentou boa estabilidade, podendo ser prontamente recuperada por separação magnética (LEE et al., 2012). Isso comprova que as NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  podem ser utilizadas na imobilização da enzima GOD, com fácil recuperação e reuso em diversos processos, quando a separação de fases e produtos é fator primordial.

## 6. Conclusões

- As sínteses das NPMs forma reproduzidas por reações de combustão, com partículas manométricas entre 21nm a 25nm e com Cristalinidade em torno de 60%, com composição de 83,95% de ferrita de cobalto e 16,05% de hematita, mantendo-se as mesmas características após modificação de superfície com os agentes silanos TEOS e APTES.
- As NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  apresentaram média de tamanho da partícula igual a 43,8nm, com área superficial de  $16,64\text{m}^2/\text{g}$ , enquanto as NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  apresentaram valor igual de tamanho de partícula de 45,4nm, com 21,7% de redução de área do valor inicial.
- As amostras não apresentaram comportamento superparamagnético, verificado pelos resultados de medidas magnéticas, porém apresentaram comportamento de estado bloqueado, característico de materiais em escala manométrica; verificou-se diminuição de 35,6% da magnetização de saturação após as NPMs serem silanizadas e funcionalizadas com TEOS e APTES; a magnetização remanente decaiu 31,9% para as NPMs com a superfície modificada, e em compensação dessa magnetização, houve um aumento de 12,8% da coercividade, mantendo-se boa resposta magnética.
- Com glutaraldeído a 2% foram obtidos melhores resultados de imobilização, com capacidade adsorviva de  $0,048\text{ mgAds}/\text{mgAds}$ ; o tempo de ativação das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  com glutaraldeído a 2% não influencia de forma significativa a imobilização da GOD.
- O modelo proposto de pseudo-primeira ordem prevê de maneira satisfatória o comportamento da imobilização da GOD nas NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  em baixas concentrações ( $C=0,05\text{mg}/\text{mL}$ ) apresentando fator de correlação de ajuste dos dados experimentais próximo à unidade ( $R=0,94$ ).
- A concentração inicial de GOD de  $1\text{mg}/\text{ml}$  foi a mais favorável para imobilização dessa enzima nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e forneceu a maior carga enzimática adsorvida por grama de NPMs ( $0,048\text{ mgAds}/\text{mgAds}$ ); o modelo de Freundlich e Henry se correlacionaram melhor aos dados experimentais obtidos na imobilização da GOD nas NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ; o modelo de Langmuir não apresentou boa correlação.



- A atividade enzimática (34,3U/g) da GOD imobilizada em NPMs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  evidenciou que mesmo decaindo significativamente em relação a enzima sem solução; em relação a enzima livre, os testes apresentaram valores elevados de atividade, com valores em torno de 18,2U/mg de GOD livre; após 3 ciclos de reuso, a atividade da GOD imobilizada decaiu à metade do valor inicial, e que após 5 ciclos de reuso, a atividade decaiu a 1/3 da atividade inicial da GOD imobilizada, mantendo-se constante após 2 ciclos consecutivos.
- Pelos resultados obtidos de caracterização e aplicabilidade, comprovou-se que as NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  podem ser utilizadas na imobilização da enzima GOD, com fácil recuperação e reuso em diversos processos, quando a separação de fases e produtos é o fator primordial.

## 7. Sugestões para trabalhos futuros

- Utilização de NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  monofásicas;
- Avaliação dos parâmetros de recobrimento com agentes silanos por meio de um planejamento experimental, a fim de se obter a melhor condição de teor de TEOS e APTES na superfície da partícula.
- Utilização de outros agentes reticulantes para avaliar a eficiência da ativação com glutaraldeído;
- Otimização dos parâmetros cinéticos e adsorptivos, a fim de se obter adequação à modelos teóricos e consequente melhor compreensão do mecanismo de adsorção;
- Expansão de uso das NPMs funcionalizadas a outras biomoléculas de interesse industrial, como as enzimas do grupo das celulasas.
- Avaliação do desempenho em biosensores das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  contendo GOD imobilizada nas condições otimizadas no presente trabalho.

## Referências bibliográficas

AJROUDI, L.; MLIKI, N.; BESSAIS, L.; MADIGOU, V.; VILLAIN, S.; LEROUX, C. Magnetic, electric and thermal properties of cobalt ferrite nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, v. 59, p. 49-58, 2014.

ALBUQUERQUE, I. L. T.; SANTOS, P. T. A.; CORNEJO, D. R.; BICALHO, S. M. C. M.; OLIVEIRA, L. S. C.; COSTA, A. C. F. M. Modificação da superfície de nanocompósitos de  $Fe_2O_3/Fe_3O_4$  visando seu uso para imobilização da glicose oxidase. *Cerâmica*, 63, p. 244-252, 2017.

ALVES JÚNIOR, J. A.; BALDO, J. B. The behavior of zeta potential of silica suspensions. *New Journal of Glass and Ceramics*, v. 4, n. 2, p. 29–37, 2014.

AMIRI, S., & SHOKROLLAHI, H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), p.1–8, 2013.

AMIRI, M., SALAVATI-NIASARI, M., AKBARI, A. Magnetic nanocarriers: Evolution of spinel ferrites for medical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 265, p.29-44, 2019.

AMMAR, S.; HELFEN, A.; JOUINI, N.; FIEVET, F.; ROSENMAN, I.; VILLAIN, F.; MOLINIE, P.; DANOT, M. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles synthesized by hydrolysis in a polyol medium. *Journal of Materials Chemistry*, v. 11, n. 1, p. 186-192, 2001.

ANSARI, S. A.; HUSSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, v.30, p. 512–523, 2012.

ASHTARI, K., KHAJEH, K., FASIHI, J., ASHTARI, P., RAMAZANI, A., VALI, H. Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: enzyme immobilization and cytotoxic study. *Int J Biol Macromol*, 50, p.1063–1069, 2010.

AUFFAN, M., ROSE, J., PROUX, O., BORSCHNECK, D., MASION, A., CHAURAND, P., BOTTERO, J.Y.. Enhanced Adsorption of Arsenic onto Maghemites Nanoparticles: As(III) as a Probe of the Surface Structure and Heterogeneity. *Langmuir*, 24(7), p.3215–3222, 2008.

AZEVEDO, C. B.; SOUZA, E. A.; FARIA, E. H.; ROCHA., L. A.; CALEFI, P. S; CIUFFI, K. J.; NASSAR, E. J. Optical properties of eu-doped hybrid materials prepared from dimethyl and methyl alkoxides precursors. *Journal of Luminescence*, 2013.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd edition. McGraw-Hill Book Company, 1986.

BANKAR, S.B., BULE, M.V., SINGHAL, R.S., ANANTHANARAYAN, L. 'Glucose oxidase - An overview', *Biotechnology Advances*, v. 27, n.4, p. 489-501, 2009.

BILAL, M., ZHAO, Y., RASHEED, T., & IQBAL, H. M. N. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, p.2530-2544, 2018.

BLOSS, D. A., *Crystallography and Crystal Chemistry - an Introduction*. Rinehart and Winston Inc.: New York, 1971.

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*. 72, 248-254, 1976.

BADRUDDOZA, A. Z. M. RAHMAN, M. T. GHOSH, S. “ $\beta$ - cyclodextrin conjugated magnetic, fluorescent silica core-shell nanoparticles for biomedical applications,” *Carbohydrate Polymers*, v.95, n.1, p. 449–457, 2013.

BRUNAUER, S., EMMETT, P. H., TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, p.60:309-19, 1938.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. *Materials Science and Engineering: An Introduction*, 8th Edition. Wiley, 2009.

CARUSO, F., SPASOVA, M., SALGUEIRIÑO-MACEIRA, V., & LIZ-MARZÁN, L. M. Multilayer Assemblies of Silica-Encapsulated Gold Nanoparticles on Decomposable Colloid Templates. *Advanced Materials*, 13(14), p.1090–1094, 2001.

CHAIBAKHSH, N., MORADI-SHOEILI, Z. Enzyme mimetic activities of spinel substituted nanoferrites ( $MFe_2O_4$ ): A review of synthesis, mechanism and potential applications. *Materials Science and Engineering: C*, 2019.

CHANG, R. H.-Y.; JANG, J.; WU, K. C. W. Cellulase immobilized mesoporous silica nanocatalysts for efficient cellulose-to-glucose conversion. *Green Chem*, v.13, p.2844-2850, 2011.

CHEN S, L. Preparation of monosize silica spheres and their crystalline stack. *Colloids and Surface A*, v.142, p.59 – 63, 1998.

CHENG, C.; CHANG, K. C. Development of immobilized cellulase through functionalized gold nano-particles for glucose production by continuous hydrolysis of waste bamboo chopsticks. *Enzyme Microb Technol*, v. 53, p.444-451, 2013.

CHENG, Z. Preparation of bromomethylated poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) hollow fiber cation-exchange membranes and immobilization of cellulase thereon. *J Membr Sci*, v. 358, p.93-100, 2010.

CHO, E. J. Co-immobilization of three cellulases on Au-doped magnetic silica nanoparticles for the degradation of cellulose. *Chemical Communications*, v.48, n.6, p.886- 888, 2012.

CHOI, J.M.; HAN, S.S.; KIM, H.S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.*, v.33, p.1443–1454, 2015.

CHRUŚCIEL J, ŚLUSARSKI L. Synthesis of nanosilica by the sol-gel method and its activity toward polymers. *Journal of Material Science*, v.21, p.461–469, 2003.

COMERLATO, M.H. Imobilização de enzimas no suporte crisotila. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p.90, 1995.

CORBETT, J.; MCKEOWN, P. A.; PEGGS, G. N.; WHATMORE, R. Nanotechnology: international developments and emerging products, *Ann. CIRP*, v.49, p.523–545, 2000.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. *Introduction to Magnetic Materials*. Wiley, 2011.

CRUZ, I. F., FREIRE, C., ARAÚJO, J. P., PEREIRA, C., & PEREIRA, A. M. Multifunctional Ferrite Nanoparticles: From Current Trends Toward the Future. *Magnetic Nanostructured Materials*, p.59–116. 2018.

DAOUD, F. B. O.; KADDOUR, S.; SADOON, T. Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.75, n.1, p. 93-99, 2010.

DELIGIANNAKIS, Y., SOTIRIOU, G.A.; PRATSINIS, S.E. Antioxidant and antiradical SiO<sub>2</sub> nanoparticles covalently functionalized with gallic acid. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v.4(12), p.6609-17, 2012.

DELIGOZ, H., BAYKAL, A., TOPRAK, M. S., TANRIVERDI, E. E., DURMUS, Z., SOZERI, H. Synthesis, structural, magnetic and electrical properties of Co<sub>1-x</sub>Zn<sub>x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (x = 0,0, 0,2) nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, v.48, p.646–654, 2013.

DIAZ-BENITO, B.; VELASCO, F.; MARTINEZ, F. J.; ENCINAS, N. Hydrolysis study of bis-1,2-(triethoxysilyl)ethane silane by NMR. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.369, n.(1-3), p.53-56, 2010.

DINIZ, V. C. S.; DANTAS, B. B.; FIGUEIREDO, A. R.; CORNEJO, D. R.; COSTA, A.C. F. M. Avaliação microestrutural e magnética de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sintetizada pelo método de reação de combustão. *Cerâmica*, v.61, n.359, 2015.

DROUT, R. J., ROBISON, L., & FARHA, O. K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. *Coordination Chemistry Reviews*, v.381, p.151-160, 2019.

ENACHE, D. F., VASILE, E., SIMONESCU, C. M., RĂZVAN, A., NICOLESCU, A., NECHIFOR, A.C., DUMITRU, F. Cysteine-functionalized silica-coated magnetite nanoparticles as potential nanoadsorbents. *Journal of Solid State Chemistry*, v.253, p.318–328, 2017

ESHRAHGI A.M, KAMELI, P. Magnetic properties of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles prepared by thermal treatment of ball-milled precursors, *Current Applied Physics*, v. 11, p. 476-481, 2011.

FELLOWS, P. *Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas*. Zaragoza: Editorial Acribia, p.172-177, 1994.

FRANÇA, T. C. P.; DANTAS, B. B.; 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. *Materials Science Forum*, v.798-799, p 460-465, 2014.

FRANCISQUINI, E. Nanopartículas magnéticas e suas aplicações. Em: *Série química: ciência e tecnologia - química supramolecular e nanotecnologia*, editor. Adilson Beatriz: Atheneu, p.269-289, 2014.

GAWANDE, M. B., MONGA, Y., ZBORIL, R., & SHARMA, R. K. Silica-decorated magnetic nanocomposites for catalytic applications. *Coordination Chemistry Reviews*, v.288, p.118–143, 2015.

GEORGE, M., MARY JOHN, A., NAIR, S. S., JOY, P. A., ANANTHARAMAN, M. R. Finite size effects on the structural and magnetic properties of sol–gel synthesized

NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> powders. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.302(1), p.190–195, 2006.

GERRITSEN, M.; KROS, A.; LUTTERMAN, J.; NOLTE, R.; JANSEN, J. A percutaneous device as model to study the in vivo performance of implantable amperometric glucose sensors. *J Mater Sci Mater Med*, v.12(2), p.129–34, 2001.

GUISAN, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 2nd ed., Humana Press Inc., New Jersey, 2006.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

GRÜTTNER, C., RUDERSHAUSEN, S., & TELLER, J. Improved properties of magnetic particles by combination of different polymer materials as particle matrix. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.225(1-2), p.1–7, 2001.

HATZINIKOLAOU, D.; HANSEN, O.; MACRIS, B.; TINGEY, A.; KEKOS, D.; GOODENOUGH, P.; et al. A new glucose oxidase from *Aspergillus niger* characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.46, p.371–81, 2006.

HE, Y. P., WANG, S. Q., LI, C. R., MIAO, Y. M., WU, Z. Y., & ZOU, B. S. Synthesis and characterization of functionalized silica-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> superparamagnetic nanocrystals for biological applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v.38(9), p.1342–1350, 2005.

HENDERSON, C. M. B., CHARNOCK, J. M., & PLANT, D. A. Cation occupancies in Mg, Co, Ni, Zn, Al ferrite spinels: a multi-element EXAFS study. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2007, 19(7), 076214, 2007.



HECHT, H.J, KALISZ, H.M, HENDLE J, SCHMID, R.D, SCHOMBURG, D. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, v.229, p.153-172, 1993.

HO, Y.S. MCKAY, G. A comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents. *Trans IChemE*, v. 76, 1998.

HO, Y.S., MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, v. 34, 1999.

HONG, R.Y., LI, J.H., ZHANG, S.Z., LI, H.-Z., ZHENG, Y., DING, J., & WEI, D.G. Preparation and characterization of silica-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles used as precursor of ferrofluids. *Applied Surface Science*, v.255(6), p.3485–3492, 2009.

JAIN, S. R.; ADIGA, K. C., PAI VERNEKER, V. A new approach to thermo chemical calculations of condensed fuel – oxide mixture. *Combustion and Flame*, v. 40, p.71-79, 1981.

JANKIEWICZ, B. J., JAMIOLA, D., CHOMA, J., & JARONIEC, M. Silica–metal core–shell nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.170(1-2), p.28–47, 2012.

JEONG, U.; TENG, X. W.; WANG, Y.; YANG, H.; XIA, Y. N. Superparamagnetic colloids: Controlled synthesis and niche applications. *Advanced Materials*, v. 19, n. 1, p. 33-60, 2007.

KHANNA, L.; VERMA, N.K. Silica/potassium ferrite nanocomposite: Structural, morphological, magnetic, thermal and in vitro cytotoxicity analysis. *Materials Science and Engineering B*, v.178, p.1230– 1239, 2013.

KARIMI, Z., KARIMI, L., & SHOKROLLAHI, H. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C*, v.33(5), p.2465–2475, 2013.

KHATIRI, R., REYHANI, A., MORTAZAVI, S. Z., & HOSSAINALIPOUR, M. Immobilization of serum albumin on the synthesized three layers core-shell structures of super-paramagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.19(5), p.1642–1647, 2013.

KNOBEL, M.; GOYA, G.F. Ferramentas magnéticas na escala do átomo. *Scientific American Brasil*, p. 58-66, 2004.

KIM, J.S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v.3(1): p. 95-101, 2007.

KRAJEWSKA B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol*, v.35, p.126–39, 2004.

KRISHNA, V. D.; WU, K.; SU, D.; CHEERAN, M. C. J.; WANG, J.-P.; PEREZ, A. Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety. *Food Microbiology*, v.75, p.47–54, 2018.

LAGERGREN, Sten Y. Zur Theorie der sogenannten Adsorption gelöster Stoffe, 1898.

LANGMUIR, I. The Adsorption of Gases on Plane Surface of Glass, Mica and Platinum. *Journal of the American Chemical Society*, v.40 (9), p.1361–1403, 1918.

LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., ROBIC, C., VANDER ELST, L., & MULLER, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, v.108(6), p.2064–2110, 2008.

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.

LI, X., ZHU, H., FENG, J., ZHANG, J., DENG, X., ZHOU, B., LI, Y. One-pot polyol synthesis of graphene decorated with size-and density-tunable  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. *Carbon*, v.60, p.488-497, 2013.

LIMAYE, M. V.; SINGH, S. B.; DAS, R.; PODDAR, P.; ABYANCH, M. K.; KULKARNI, S. K. Magnetic studies of  $\text{SiO}_2$  coated  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 441, p. 683-690, 2017.

LIU, X. Surface Modification and Characterization of Magnetic Polymer Nanospheres Prepared by Miniemulsion Polymerization. *Langmuir*, v.20, n.23, p.10278-10282, 2004.

LIU, Z.; LI, Z.; ZHOU, H.; WEI, G.; SONG, Y.; WANG, L. Immobilization and condensation of DNA with 3-aminopropyltriethoxysilane studied by atomic force microscopy. *Journal of Microscopy*, v.218, p.233-239, 2005.

LIU, J., SUN, Z., DENG, Y., ZOU, Y., LI, C., GUO, X., ZHAO, D. Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups. *Angewandte Chemie International Edition*, v.48(32), p.5875-5879, 2009.

LIU, G., WANG, H., YANG, X., & LI, L. Synthesis of tri-layer hybrid microspheres with magnetic core and functional polymer shell. *European Polymer Journal*, v.45(7), p.2023–2032, 2009.

LIU, D. M., CHEN, J., & SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v.102, p332-342, 2018.

LIN, W.; YU, D.; YANG, M.; Blood compatibility of novel poly( $\gamma$ -glutamic acid)/polyvinyl alcohol hydrogels *Colloids Surf. B*, v.47, p.43-49, 2006.

LIZ-MARZÁN, L. M., GIERSIG, M., & MULVANEY, P. Synthesis of Nanosized Gold–Silica Core–Shell Particles. *Langmuir*, v.12(18), p.4329–4335, 1996.

LU, Y., YIN, Y., MAYERS, B. T., & XIA, Y. Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach. *Nano Letters*, v.2(3), p.183–186, 2002.

LU, A. H. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int.* v,46: p.1222-44, 2007.

LU, H.C. Porous ferrite synthesis and catalytic effect on benzene degradation. *Int. J. Phys. Sci.*, v.6 (4), p.855–865, 2011.

LUQUEZE, R. C. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Universidade de São Paulo, SP, 2006.

MA, Z., LIU, H. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine, *J. China Particuology*, v.5, p.1-10, 2007.

MAEDA, R.N.; BARCELOS, C.A; ANNA, S.M.M.L.; PERERIRA JR, N. Celulase production *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolise of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotchenology*, v.123, p.38-44, 2013.

MAHMOUD, M. E., ABDELWAHAB, M. S., & FATHALLAH, E. M. Design of novel nano-sorbents based on nano-magnetic iron oxide-bound-nano-silicon oxide-immobilized-triethylenetetramine for implementation in water treatment of heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, v.223, p.318–327, 2013.

MALLAKPOUR, S., & MADANI, M. A, review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles. *Progress in Organic Coatings*, 2015, 86, 194–207.

MALEKI, A.; ALREZVANI, Z.; MALEKI, S. Design, preparation and characterization of urea-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> magnetic nanocatalyst and application for the one-pot multicomponent synthesis of substituted imidazole derivatives. *Catalysis Communications*, v. 69, p.29-33, 2015.

MASSARANI, G.; *Fluidodinâmica em Sistemas Particulados*, Editora UFRJ: Rio de Janeiro, 1997.

MASEL, R. *Principles of Adsorption and Reaction on solid Surfaces*. Wiley Series in Chemical Engineering. 1996.

MEHRASBI, M. R., MOHAMMADI, J., PEYDA, M., & MOHAMMADI, M. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renewable Energy*, v.101, p.593-602, 2017.

MORONES, J.R. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v.16(10), p. 2346-53, 2005.

MÜLLER R.H, MAABEN S, WEYHERS H, SPECHT F, LUCKS J.S. Cytotoxicity of magnetiteloaded polylactide poly(lactide/glycolide) particles and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*, v.138, p.85–94, 1996.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug Deliv. Ver.*, v. 47, p.3-19, 2001.

MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*. *Bioinorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation*, v.10, n.2, p. 177-184, 2006.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE: The Initiative and its Implementation Plan, National Science and Technology Council, Committee on Technology,

Subcommittee on Nanoscale Science, Engineering and Technology, Washington, D.C., p.19–20, 2000.

NASCIMENTO, R.; LIMA, A. C. A.; VIDAL, C. B.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S.; Adsorção- Aspectos teóricos e aplicações ambientais, Edição UFS, 2014.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.85–86, p.71-92, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger princípios de bioquímica*. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, p.1202, 2002..

NGO, T. T. *Molecular interactions in bioseparations* / edited by That T. Ngo. Other Authors. Ngo, T. T. (That Tjen), 1944-. Published. New York : Plenum Press c, 1993.

OH, J.K. PARK, J.M. *Iron Oxide-Based Superparamagnetic Polymeric Nanomaterials: Design, Preparation, and Biomedical Application*. *Progress in Polymer Science*, v.36, p.168-189, 2011.

OLDENBURG, S. J., JACKSON, J. B., WESTCOTT, S. L., & HALAS, N. J. Infrared extinction properties of gold nanoshells. *Applied Physics Letters*, v.75(19), p.2897–2899, 1999.

PAPAEFTHYMIIOU, G. C. (2009). Nanoparticle magnetism. *Nano Today*, v.4(5), p.438-447, 2009

PARAK, W. J.; NEL, A. E.; WEISS, P. S. Grand Challenges for Nanoscience and Nanotechnology. *Acs Nano*, v.9, n.7, p.6637-6640, 2015.

PASCAULT, J. P., WILLIAMS, R. J. J. General concepts about epoxy polymers. In Pascault J-P, Williams R.J.J. (eds.) *Epoxy polymers*,. Wiley-VCH, Germany; p.1-12, 2010.

PETRUCCIOLI, M.; FEDERICI, F.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Enhancement of glucose oxidase production by *Penicillium variabile* P16. *Enzyme Microb Technol*, v.24: p.397–401 , 1999.

PHILIPSE, A. P., VAN BRUGGEN, M. P. B., PATHMAMANO HARAN, C. Magnetic silica dispersions: preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core. *Langmuir*, v.10(1), p.92–99, 1994.

POL, V. G., GRISARU, H., & GEDANKEN, A. Coating Noble Metal Nanocrystals (Ag, Au, Pd, and Pt) on Polystyrene Spheres via Ultrasound Irradiation. *Langmuir*, 2005, v.21(8), p.3635–3640.

RAMSDEN, J. *Nanotechnology: an introduction*. Oxford: William Andrew. (LIBRUNAM: T174.7 R36, 2016.

RANA, S., PHILIP, J., RAJ, B. Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry. *Materials Chemistry and Physics*, v.124, p.264–269, 2010.

RANDO, D.; KOHRING, G.; GIFFHORN, F. Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.48, p.34–40, 1997.

REDDY, D. H. K.; YUN, Y. S. Spinel ferrite magnetic adsorbents: Alternative future materials for water purification? *Coordination Chemistry Reviews*, v.315, p.90–111, 2016.

RIDLEY, M. K., MACHESKY, M. L., & KUBICKI, J. D. Experimental Study of Strontium Adsorption on Anatase Nanoparticles as a Function of Size with a Density Functional Theory and CD Model Interpretation. *Langmuir*, v.31(2), p.703–713, 2015.

ROSENSWEIG, R. E., *Ferrohidrodynamics*. Cambridge University Press: Cambridge, 1985.

ROSSI, L.M. QUACH, A.D. ROSENZWEIG, Z. Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 606–613.

SADIGHIAN, S., ROSTAMIZADEH, K., HOSSEINI-MONFARED, H., & HAMIDI, M. Doxorubicin-conjugated core–shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.117, p.406–413, 2014.

SAHOO, B.; DEVI, K. S. P.; DUTTA, S.; MAITI, T. K., PRAMANIK, P.; DHARA, D. Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for targeted drug delivery and MR imaging applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.431, p.31–41, 2014.

SALUNKHE, A.B.; KHOT, V.M.; PHADATARE, M.R.; PAWAR, S.H. Combustion synthesis of cobalt ferrite nanoparticles-Influence of fuel to oxidizer ratio, *J. Alloys Compd.* 514 (2012) 91–96.

SANTINA MOHALLEM, N.D.. Study of multifunctional nanocomposites formed by cobalt ferrite dispersed in a silica matrix prepared by sol-gel process. In: Farzad, E. (Ed.), *Nanocomposites – New Trends and Developments*. InTech, p.457–482, 2012.

SANTOS, P. T. A.; ARAÚJO, P. M. A. G.; COSTA, A. C. F. M.; CORNEJO, D. R. Magnetic Study of Nanoferritas  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  Obtained by Reaction of Combustion. *Materials Science Forum*, v.798-799, p.402-406, 2014.

SEARS, F.; ZEMANSKY, M.; YOUNG, H. *Física iii - eletromagnetismo*. 12a Edição ed. São Paulo: Addison-Wesley, 2008.

SHAO, H. *Magnetic nanoparticles and microNMR for diagnostic applications*. 2012..

SHARIFI, I., SHOKROLLAHI, H., DOROODMAND, M. M., SAFI, R. Magnetic and structural studies on  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles synthesized by co-precipitation, normal



micelles and reverse micelles methods. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.324, p.1854–1861, 2012.

SHARMIN, N.; KHAN, R. A.; DUSSAULT, D. S.; STEPHANE, AKTER, NOUSIN.; LACROIX, M. Effectiveness of silane monomer and gamma radiation on chitosan films and PCL-based composites. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 81, p 932–935, 2012.

SHELDON RA, SCHOEVAART R, VAN LANGEN LM. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): a novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal Biotransform*, v.23, p.141–7, 2005.

SHELLOCK, F. G. Magnetic resonance safety update 2002: implants and devices. *JMRI-J. Magn. Reson. Im.*, v.16, p.485-496, 2002.

SCHERRER, P. Bestimmung der Grosse und der Inneren Struktur von Kolloidteilchen Mittels Rontgenstrahlen, *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften, Gottingen. Mathematisch-Physikalische Klasse*, v.2, p.98-100, 1918.

SCHELLER, H.V.; ULVSKOR, P. Hemicellulose. *Rev. Plant. Biol*, v.61, p.263-89, 2010.

SRERE PA, UYEDA K, MOSBACH K. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. *Methods Enzymol* 1976; v. 44: p.134–48, 1976.

SRIVASTAVA, M., OJHA, A. K., CHAUBEY, S., SHARMA, P. K., PANDEY, A. C. Influence of pH on structural morphology and magnetic properties of ordered phase cobalt doped lithium ferrites nanoparticles synthesized by sol–gel method, *Materials Science and Engineering B*, v.175, p.14–21, 2010.

STÖBER, W., FINK, A., & BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.26(1), p.62–69, 1968.

SUN, S. P., ZENG, X.; LEMLEY, A.T. Nano-magnetite catalyzed heterogeneous Fentonlike degradation of emerging contaminants carbamazepine and ibuprofen in aqueous suspensions and montmorillonite clay slurries at neutral pH. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.371, p.94-103, 2013.

SUZUKI, M. Adsorption and engineering. *Chemical engineering monographs*, v.25. Japan: Kodansha, 1990.

TALLURY, P., PAYTON, K., & SANTRA, S. Silica-based multimodal/multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing applications. *Nanomedicine*, 2008, 3(4), 579–592.

TIROSH, E.; SHEMER, G.; MARKOVICH, G. Optimizing cobalt ferrite nanocrystal synthesis using a magneto-optical probe. *Chem. Mater.*, v. 18, p. 465–470, 2006.

VAN BLAADEREN, A., VAN GEEST, J., & VRIJ, A. Monodisperse colloidal silica spheres from tetraalkoxysilanes: Particle formation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.154(2), p.481–501, 1992.

XU, Z., HOU, Y., SUN, S. Magnetic Core/Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au/Ag Nanoparticles with Tunable Plasmonic Properties. *Journal of the American Chemical Society*, v.129(28), p.8698–8699, 2007.

XU, J., SUN, J., WANG, Y., SHENG, J., WANG, F., & SUN, M. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. *Molecules*, v.19(8), p.11465-11486, 2014.

WANG, H.-C., WU, C.-Y., CHUNG, C.-C., LAI, M.-H., & CHUNG, T.-W. Analysis of Parameters and Interaction between Parameters in Preparation of Uniform Silicon Dioxide Nanoparticles Using Response Surface Methodology. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.45(24), p.8043–8048, 2006.

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

WANG, X.-D., SHEN, Z.-X., SANG, T., CHENG, X.-B., LI, M.-F., CHEN, L.-Y., & WANG, Z.-S. Preparation of spherical silica particles by Stober process with high concentration. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.341(1), p.23–29, 2010.

WANG, H., HUANG, J., WANG, C., LI, D., DING, L., & HAN, Y. Immobilization of glucose oxidase using CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles as carrier. *Applied Surface Science*, v.257(13), p.5739–5745, 2011.

WEISSLEDER R, STARK D.D, ENGELSTAD B.L, BACON B.R, COMPTON C.C, WHITE D.L. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am J Roentgenol*, p.152:167–73, 1989.

WEST, A. R. *Solid state chemistry and its applications*. 2nd. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 2014.

WILSON, R. T. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.

WITT, S., SINGH, M., KALISZ, H.. Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, v.64 (4), p.1405–11, 1998.

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. *J Biochem*, v.347, p. 553–9, 2000.

WOHLFARTH, E. P. *Ferromagnetic materials: A handbook on the properties of magnetically ordered substances*. North-Holland: New York, v. 2, 1986.

WU, H. X.; LIU, G.; WANG, X.; ZHANG, J. M.; CHEN, Y.; SHI, J. L.; YANG, H.; HU, H.; YANG, S. P. Solvothermal synthesis of cobalt ferrite nanoparticles loaded on multiwalled carbon nanotubes for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Acta Biomaterialia*, v.7, n.9, p.3496-3504, 2011.

WU, K. A simulation study on superparamagnetic nanoparticle based multi-tracer tracking. *Applied Physics Letters*, v.07(17), p.173701, 2015.

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. *J. Colloid Interf.Sci.* 2012, v. 379, p.20 – 26, 2012.

YU, X. Low temperature cleanup combined with magnetic nanoparticle extraction to determine pyrethroids residue in vegetables oils. *Food Control*, v.74, p.112-120, 2017.

YU, X.; YANG, H. Pyrethroid residue determination in organic and conventional vegetables using liquid-solid extraction coupled with magnetic solid phase extraction based on polystyrene-coated magnetic nanoparticles. *Food Chemistry*, v.217, p.303-310, 2017.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 21,6, p.787-793, 1998.

ZENG, Y. B. ZHOU, Y. KONG, L. ZHOU, T. SHI, G. "A novel composite of SiO<sub>2</sub>-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine," *Biosensors and Bioelectronics*, v.45, n.1, p.25–33, 2013.

ZHANG, S., DONG, D., SUI, Y., LIU, Z., WANG, H., QIAN, Z., & SU, W. Preparation of core shell particles consisting of cobalt ferrite and silica by sol–gel process. *Journal of Alloys and Compounds*, v.415(1-2), p.257–260, 2006.

ZHANG, W. Increase in stability of cellulase immobilized on functionalized magnetic nanospheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.375, p.117-123, 2015.

ZHU, J. Magnetic graphene nanoplatelet composites toward arsenic removal. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, v.1(1), p.M1-M5, 2012.