

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

Tese de Doutorado

**Sistemas combinados de magnetita e sílica:
mobilidade magnética e porosidade elaboradas para bioaplicações**

MONIQUE DEON

Orientador: Edilson Valmir Benvenutti
Co-orientadora: Eliana Weber de Menezes

Porto Alegre, agosto de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MONIQUE DEON

**Sistemas combinados de magnetita e sílica:
mobilidade magnética e porosidade elaboradas para bioaplicações**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenutti
Orientador

Prof. Dra. Eliana Weber de Menezes
Co-orientadora

Porto Alegre, agosto de 2019

A presente tese foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre abril de 2015 e julho de 2019, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Edilson Valmir Benvenutti e Co-orientação da Professora Doutora Eliana Weber de Menezes. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Jadna Catafesta

Profa. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch

Prof. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos

Dedicatória

“Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas”

Gonzaguinha

*Dedico esse trabalho
com todo meu amor,
minha admiração
e meu reconhecimento
aos meus pais, Mário e Salete.*

Agradecimentos

Os agradecimentos são muitos, pois muitas foram as pessoas que me transformaram – como química, como pesquisadora, como docente, como pessoa – ao longo do doutorado.

Obrigada **Prof. Edilson Benvenuti**, meu orientador. Depois de seis anos de orientação e convivência, percebo como meu crescimento acadêmico foi pautado no seu senso de ética e de sociedade. Agradeço pela paciência e cuidado em me orientar nos mais diversos percalços dos últimos seis anos: no mestrado, no doutorado, no meu período como docente, nas viagens para congressos, no período de sanduíche, no futuro e nas escolhas profissionais. Não só na orientação das atividades experimentais que se constrói um doutor, mas também na troca de conhecimentos tácitos da academia. Obrigada por ser excelente nisso.

Obrigada **Prof. Eliana de Menezes**, minha co-orientadora, por me entusiasmar desde o início com esse projeto que nasceu contigo. Obrigada por estar comigo em todas as encruzilhadas do doutorado, por todas as vezes que me dissestes “vou contigo” e “vamos agora”. Tua trajetória acadêmica me inspira! Agradeço também por ter me incentivado a prestar o concurso para professora substituta: foi transformador para mim e sem teu apoio talvez não o fosse.

Obrigada **Prof. Tania Haas Costa**, minha orientadora emprestada. Talvez faltem meios de expressar todo o reconhecimento que lhe devo. Em todos os momentos, fostes gratuitamente além: obrigada pelas ricas discussões (acadêmicas ou não), pela sabedoria admirável em química, física, materiais, técnicas de caracterização, docência, relações interpessoais e em vida como um todo. Por fim, obrigada, claro, pelas incontáveis caronas e pelos cinco minutos de tolerância.

Merci beaucoup **Dr. Michel Wong Chi Man**, mon co-directeur de thèse français, parce que vous êtes remarquable en tant que chercheur et en tant que personne. Merci de m'avoir reçue dans votre groupe unique, d'avoir suivi près l'évolution du projet, de partager toutes vos expériences et vos idées de génie. Bien sûr, vous avez été mon meilleur “collègue de laboratoire”. Merci aussi de votre préoccupation pour mon avenir et pour toutes les portes ouvertes.

Agradeço ao **Prof. Fabiano Rodembusch** pela colaboração nas caracterizações fotofísicas e também pela sempre boa vontade em ajudar, pelo bom humor e pelo pronto-atendimento via whatsapp.

Agradeço à **Prof. Roberta Bussamara** pela colaboração nas aplicações envolvendo enzimas, por me ensinar que elas devem ser sempre ouvidas.

Agradeço à *Prof. Sabrina Nicolodi* pelas medidas de magnetismo e pelas discussões que se seguiram.

Agradeço à *Prof. Patrícia Malheiros* e suas alunas *Michele* e *Daniela* pela realização dos testes antimicrobianos.

Agradeço ao *Centro de Microscopia e Microanálise* da UFRGS pela infraestrutura e atendimento, em especial ao *Tao Hasse* pela curiosidade, entusiasmo e horas dedicadas a decifrar meus materiais sob os olhos do EVO e do FEG.

Agradeço muito às minhas grandes amigas químicas, ***Andressa da Cruz Schneid*** e ***Elisangela Muncinelli Caldas***. Dentre os inúmeros outros motivos pelos quais levo vocês no coração, aqui vão alguns. À *Andressa*, que dividiu a vida comigo no período do doutorado, agradeço pela parceria de (literalmente) todas as horas, pela amizade sincera que construímos, pelo apoio nos momentos de crise de resultados, pelas discussões acadêmicas acalouradas e por ter me puxado nos momentos de inércia, especialmente com a tese. À *Elisangela*, por ser uma amiga única, uma colega inspiradora e uma pessoa extraordinária. Obrigada por não apenas me incentivar aos desafios da vida, mas por ser parte fundamental da rede de apoio (quantas hospedagens, caronas e conselhos na conta?). Eu te admiro como mulher, docente, doutora e pesquisadora e agradeço por todos os nossos ricos momentos de aprendizado juntas.

Agradeço à dupla dinâmica *Natália Ricardi* e *Douglas Charqueiro* porque permaneceram comigo nas situações adversas, nas pseudo-intoxicações e nem um dia (bom ou ruim) passou sem que eu tenha gargalhado com vocês. Foram (e são) meus grandes amigos, fiéis e disponíveis 24/24, mesmo quando em fusos diferentes. Ao *Carlos Caneppele*, a quem já venho agradecendo desde a graduação, obrigada pela amizade retomada, pela integração no Passinho, pelas divertidíssimas cervejas e pelo alto nível de diálogo, gifs e stickers.

Agradeço às amigas *Franciele Morawski* e *Danielle da Rosa* por nossa simples e divertida amizade e por todos os momentos que choramos de rir juntas. À *Fran*, agradeço ainda pela nossa colaboração frutífera, pela companhia nos sábados e feriados de trabalho no laboratório, pelos ótimos momentos que passamos na redação de artigos e pela parceria nas noites de distração.

Obrigada à *Anike Virgili* que foi a melhor companhia em congresso, viagens, waffles, pékets e passeios randômicos. E obrigada também por todo o apoio logístico durante os últimos meses do doutorado.

Aos demais colegas do Laboratório de Sólidos e Superfícies, *Oleg*, *Prof. Leliz*, *Cezar*, *Karine*, *Billy*, *Luana*, *Carol* pelo bom clima, companhia, discussões e

companheirismo. *Rafaela*, em especial, por me exigir bastante, por me fazer perguntas capciosas, por me obrigar a pensar além e por dar continuidade com autonomia aos trabalhos que começamos juntas.

Merci beaucoup *Mathilde*, porque contigo minha estadia em Montpellier foi incrível; obrigada por todos os abraços franco-brasileiros, interpretações de TLC, pelas ricas discussões (acadêmicas ou não), pelo bom gosto musical, pelas dicas com “selo de qualidade” e por cultivar nossa amizade na ponte Brasil-França. Merci aussi au *Dr. Carole Carcel*, à *Albane*, *Andreia* et *Nadège* pour m'avoir accueillie comme une Wongchimette. Merci à mes collègues *Pierre*, *Eleonora*, *Simon*, *Jimmy* et *Julien* pour les moments très agréables arrosés de bière et de saucisson.

Ao *Bernardo Antônio Beledeli Perin*, pela nossa linda amizade de uma década que se estreita continuamente, mesmo à distância, e por todos os comentários certos nos momentos de pouca racionalidade.

Aos meus pais, *Salete* e *Mário*, porque vocês são a rede de segurança sempre que eu me aventuro nos limites das acrobacias da vida. Se me desequilibro, sei que vocês continuam firmes me esperando; se caio, são vocês que me lançam de volta para o alto. Obrigada por sempre se entusiasmarem com meus saltos; o amor e orgulho de vocês é o que mais me motiva a seguir em frente. Eu amo vocês.

Ao meu irmão, Marcos – mas meu *Vini* – que me lembra, sempre que necessário, que as oportunidades são criadas pelas nossas atitudes e pela nossa garra. Obrigada por sempre ter sido determinado e visionário, por pensar além do comum e também por me ensinar que ser humilde e gentil nos leva mais longe. À minha cunhada *Nayane*, pelas sábias e democráticas discussões de vida e sociedade, e também pelo apoio emocional de alguém que seria uma psicóloga bastante inusitada.

A quem caminhou comigo durante grande parte do doutorado, mas que numa bifurcação da vida trilhou um caminho diferente, obrigada.

A todos os discentes que passaram por mim nesses últimos quatro anos (PEAC, DQI- e Engenharias-UFRGS, ICEG-UPF), obrigada por terem embarcado nas minhas propostas e por todos os feedbacks que plantaram em mim a certeza que o caminho da minha realização pessoal e profissional adentra na docência.

A Deus, que por caminhos aparentemente aleatórios persistiu, me trouxe até aqui e orientou meus próprios processos de significação.

Agradeço por fim, à UFRGS pela estrutura usufruída no desenvolvimento deste trabalho, à CAPES e ao CNPq pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche.

Lista de trabalhos gerados a partir dos resultados da tese

Artigos publicados

M. Deon, F.M. Morawski, C. Passaia, M. Dalmás, D.C. Laranja, P.S. Malheiros, S. Nicolodi, L.T. Arenas, T.M.H. Costa, E.W. de Menezes, E.V. Benvenuti. Chitosan-stabilized gold nanoparticles supported on silica/titania magnetic xerogel applied as antibacterial system. *J Sol-Gel Sci Technol*, **2019**, 89, 333-342.

M. Deon, R.C. de Andrade, S. Nicolodi, J.B.M. da Cunha, T.M.H. Costa, F.S. Rodembusch, E.W. de Menezes, E.V. Benvenuti. Magnetically responsive silica hollow spheres: straightforward synthesis of accessible micro-sized containers. *Part Part Syst Char*, **2018**, 35, 1800160.

Trabalhos publicados em eventos científicos internacionais

M. Deon, F.M. Morawski, C. Passaia, M. Dalmás, D.C. Laranja, P.S. Malheiros, S. Nicolodi, L.T. Arenas, T.M.H. Costa, E.W. de Menezes, E.V. Benvenuti. Designing a novel and recyclable antimicrobial agent based on SiO₂/TiO₂-Fe₃O₄-AuNP. *Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs*, 2018, Marseille (França).

M. Deon, F.M. Morawski, C. Passaia, S. Nicolodi, L.T. Arenas, T.M.H. Costa, E.W. de Menezes, E.V. Benvenuti. Chitosan-stabilized gold nanoparticles supported on a magnetically recoverable silica/titania xerogel. *6th ISGS Summer School - Frontiers in Hybrid Materials*, 2018, Alghero (Itália).

M. Deon, F.M. Morawski, R.C. de Andrade, T.M.H. Costa, L.T. Arenas, E.W. de Menezes, E.V. Benvenuti. Gold nanoparticles supported on silica/titania magnetic xerogel. *XVI Brazilian MRS Meeting*, 2017, Gramado (Brasil).

M. Deon, F.M. Morawski, L.T. Arenas, T.M.H. Costa, E.W. de Menezes, E.V. Benvenuti. Magnetic silica/titania xerogel applied as electrochemical biosensor for dopamine and catechol. *The 19th International Sol-Gel Conference*, 2017, Liège (Bélgica).

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Lista de figuras | xi |
| Lista de tabelas | xiv |
| Lista de siglas e abreviaturas | xv |
| Resumo | xvi |
| Abstract..... | xvii |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Objetivos | 5 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 5 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 5 |
| 3. Revisão de literatura | 6 |
| 3.1 Dentre os materiais magnéticos, a magnetita..... | 6 |
| 3.1.1 Estrutura e propriedades da magnetita..... | 6 |
| 3.1.2 Potencialidades e limitações da magnetita..... | 9 |
| 3.2 Sistemas combinados de magnetita e sílica | 10 |
| 3.2.1 Estrutura e propriedades da sílica | 10 |
| 3.2.2 Alguns sistemas combinados de sílica e magnetita | 13 |
| 3.3 Partículas ocas: micro e nanocontêineres multifuncionais | 16 |
| 3.3.1 Estratégias de síntese de esferas ocas | 17 |
| 3.3.2 Vantagens e potencialidades do uso de esferas ocas | 19 |
| 3.3.3 Esferas ocas magnéticas: contêineres móveis..... | 20 |
| 3.4 Suportes porosos e magnéticos para imobilização de bioestruturas..... | 20 |
| 3.4.1 Lipases..... | 21 |
| 3.4.2 A importância de compatibilizar suporte e enzima | 23 |
| 3.4.3 Suportes magnéticos: praticidade e reciclabilidade | 26 |
| 3.5 Aplicação de suportes magnéticos para nanoestruturas com impacto biológico | 26 |
| 3.5.1 Nanotecnologia em sistemas biológicos..... | 26 |
| 3.5.2 Propriedades antimicrobianas de nanopartículas..... | 27 |
| 3.5.3 Mecanismos de ação antimicrobiana de nanopartículas | 28 |
| 3.5.4 Nanopartículas de ouro: um agente antimicrobiano conveniente | 29 |
| 3.5.5 Heterogeneização de sistemas antimicrobianos: reuso..... | 30 |
| 4. Procedimento experimental..... | 32 |
| 4.1 Metodologias compartilhadas..... | 32 |
| 4.1.1 Síntese de partículas de magnetita pelo método solvotérmico | 32 |
| 4.1.2 Recobrimento das partículas de magnetita com sílica pelo método de Stöber | 32 |
| 4.2 Metodologias específicas – Capítulo I..... | 33 |
| 4.2.1 Obtenção das esferas ocas de sílica | 33 |
| 4.3 Metodologias específicas – Capítulo II | 33 |
| 4.3.1 Síntese do xerogel de sílica contendo partículas magnéticas pelo método sol-gel. 33 | |
| 4.3.2 Modificação do xerogel magnético com silsesquioxano iônico | 34 |
| 4.3.3 Incorporação do ânion estearato no xerogel magnético por troca iônica..... | 34 |
| 4.3.4 Imobilização da enzima lipase nos materiais..... | 34 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.4 | Metodologias específicas – Capítulo III..... | 35 |
| 4.4.2 | Síntese da dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana..... | 35 |
| 4.4.3 | Incorporação das nanopartículas de ouro no xerogel magnético de sílica/titânia... | 36 |
| 4.5 | Técnicas de caracterização compartilhadas..... | 36 |
| 4.5.1 | Microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (TEM) | 36 |
| 4.5.2 | Difração de raios X (DRX)..... | 37 |
| 4.5.3 | Medidas de magnetismo | 37 |
| 4.5.4 | Análise termogravimétrica (TGA)..... | 37 |
| 4.5.5 | Espectroscopia de absorção na região do UV-Visível..... | 37 |
| 4.5.6 | Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ | 38 |
| 4.6 | Técnicas de caracterização específicas – Capítulo I..... | 38 |
| 4.6.1 | Caracterização fotofísica | 38 |
| 4.7 | Técnicas de caracterização específicas – Capítulo II | 38 |
| 4.7.1 | Medidas de ângulo de contato | 38 |
| 4.7.2 | Medidas de atividade enzimática da enzima lipase | 39 |
| 4.8 | Técnicas de caracterização específicas - Capítulo III..... | 40 |
| 4.8.1 | Medidas de atividade antimicrobiana | 40 |
| 5. | Resultados e discussão | 43 |
| 5.1 | Esferas ocas de sílica acopladas à magnetita: microcontêineres magneto-responsivos..... | 43 |
| 5.1.1 | Características físicas e microestruturais dos materiais..... | 43 |
| 5.1.2 | Acessibilidade das esferas ocas: caracterização fotofísica | 52 |
| 5.1.3 | Conclusões parciais | 55 |
| 5.2 | Sílicas hidrofílicas/hidrofóbicas e magnéticas: suportes recuperáveis para lipase em biocatálise enzimática | 57 |
| 5.2.1 | Características físicas, químicas e microestruturais dos materiais | 57 |
| 5.2.2 | Ensaio de imobilização e atividade enzimática..... | 64 |
| 5.2.3 | Conclusões parciais | 66 |
| 5.3 | Sílica/titânia/magnetita: suportes recuperáveis para nanopartículas de ouro em sistemas antimicrobianos | 68 |
| 5.3.1 | Características físicas, morfológicas e microestruturais dos materiais..... | 68 |
| 5.3.2 | Ensaio de atividade antimicrobiana | 76 |
| 5.3.3 | Conclusões parciais | 78 |
| 6. | Conclusão | 79 |
| 7. | Referências..... | 80 |

Lista de figuras

| | |
|--|-------------------------------------|
| Figura 1. Ilustração do arranjo cristalino do tipo espinélio inverso da magnetita..... | 7 |
| Figura 2. Distribuição dos momentos magnéticos de spin dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na magnetita. | 8 |
| Figura 3. Representação dos laços obtidos em uma medida de magnetização vs campo magnético externo para comportamento ferrimagnético e superparamagnético. Adaptado da referência ⁴ | 9 |
| Figura 4. Ilustração da rede tridimensional de uma sílica amorfa e das possíveis espécies silanol presentes em sua estrutura..... | Error! Bookmark not defined. |
| Figura 5. Reações de hidrólise e condensação de um alcóxido de silício para a obtenção de sílica..... | 12 |
| Figura 6. Esquema dos principais tipos de <i>template</i> empregados na preparação de estruturas ocas. | 17 |
| Figura 7. Ilustração de exemplos de estruturas obtidas a partir da arquitetura <i>core-shell</i> | 19 |
| Figura 8. Ilustração do equilíbrio entre as formas aberta e fechada da lipase, bem como de sua ativação em uma interface hidrofóbica. Adaptado das referências ^{40,147} | 22 |
| Figura 9. Ilustração da imobilização da lipase em um suporte poroso hidrofóbico. | 23 |
| Figura 10. Fluxograma das etapas para o desenvolvimento de um biocatalisador. Adaptado da referência ²⁰ | 24 |
| Figura 11. Ilustração da influência do tamanho de poro na quantidade de enzima imobilizada. Adaptado da referência ¹⁹ | 25 |
| Figura 12. Mecanismos mais reportados de atividade antimicrobiana de nanopartículas. Adaptado das referências ^{164,171,183} | 29 |
| Figura 13. Imagens de MEV adquiridas com elétrons secundários, obtidas para os materiais (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, (c) MHS-10, (d) MHS-20, (e) e (f) MHS-30. Tensão de aceleração: 15 kV..... | 44 |
| Figura 14. Imagem de MEV-FEG adquirida com elétrons secundários obtida para o material MHS-30 (tensão de aceleração: 15 kV) e os mapas de EDS obtidos para os elementos Si, O e Fe obtidos com as respectivas linhas $K\alpha 1$ | 45 |
| Figura 15. Imagens obtidas por TEM dos materiais contendo esferas ocas de sílica e esferas ocupadas por Fe_3O_4 sendo (a) MHS-30 com magnificação de 50 k \times e (b) MHS-20 com magnificação de 100 k \times . Tensão de aceleração de 80 kV..... | 46 |
| Figura 16. Perfis de difração de raios X das amostras Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ e da série MHS. As barras em preto localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores de 2θ para a magnetita (JCPDS n ^o 19-0629). | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Esquema do processo de síntese dos materiais contendo esferas ocas de sílica incluindo uma imagem de TEM do material MHS-30 (tensão de aceleração: 200 kV)..... | 49 |
| Figura 18. Curvas de magnetização para os materiais Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ e série MHS. | 49 |
| Figura 19. Fotografia do material MHS-30 (a) disperso em etanol e (b) separado pela aplicação de um campo magnético..... | 51 |
| Figura 20. Espectros de emissão e excitação de fluorescência do tolueno na presença do material MHS-30 (100 mg·L ⁻¹). | 52 |
| Figura 21. Espectros de emissão de fluorescência do tolueno na presença do material (a) MHS-30 (100 a 14,83 mg·L ⁻¹) e (b) Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ (100 a 34,87 mg·L ⁻¹) sob excitação em 380 nm. O asterisco indica o sinal Raman. | 53 |
| Figura 22. Espectros de emissão de fluorescência do tolueno em diferentes λ de excitação contendo os materiais (a) MHS-30 e (b) Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ , (100 mg·L ⁻¹). O asterisco indica sinal Raman. | 54 |
| Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência em diferentes λ de excitação para os sistemas (a) MHS-30 em etanol e (b) Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ em etanol, (100 mg·L ⁻¹). O asterisco indica sinal Raman. | 54 |
| Figura 24. Difratomogramas de raios X dos materiais Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ e dos xerogéis magnéticos MX, HFL-MX e HFB-MX. | 57 |
| Figura 25. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os materiais (a) Fe ₃ O ₄ , (b) Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ (elétrons secundários), (c) MX e (d) HFL-MX (elétrons retroespalhados). Tensão de aceleração: 15 kV. | 59 |
| Figura 26. Termogramas obtidos para os xerogéis magnéticos MX, HFL-MX e HFB-MX. | 60 |
| Figura 27. Curvas de magnetização obtidas para os materiais Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ e dos xerogéis magnéticos MX, HFL-MX e HFB-MX. | 61 |
| Figura 28. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e (b) distribuição de diâmetro de poros dos materiais MX, HFL-MX e HFB-MX..... | 62 |
| Figura 29. Fotografias das amostras (a) HFL-MX e (b) HFB-MX em água e (c) formação de uma gota d'água na superfície do material HFB-MX, a temperatura ambiente. (d) Esquema ilustrando os íons estearato na superfície do material HFB-MX. | 64 |
| Figura 30. Resultados de reciclo dos materiais contendo a enzima TLL para os suportes (a) MX e (b) HFB-MX. As barras indicam o desvio do valor médio das duplicatas. | 65 |
| Figura 31. Imagens das partículas de magnetita adquiridas por microscopia eletrônica de (a) varredura (MEV-FEG, voltagem de aceleração: 1,0 kV) e (b) transmissão (tensão de aceleração: 80 kV). | 68 |

| | |
|---|----|
| Figura 32. Difractogramas de raios X dos materiais Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. As barras localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores padrão de 2θ para a magnetita (JCPDS n° 19-0629)..... | 69 |
| Figura 33. Imagem de TEM do material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (tensão de aceleração de 80 kV). | 70 |
| Figura 34. Difractogramas de raios X dos materiais $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ e $\text{AuNP-SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$. As barras localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores padrão de 2θ para a magnetita (JCPDS n° 19-0629) e para o composto $(\text{NH}_4)_{0.3}\text{TiO}_{1.1}\text{F}_{2.1}$. ²⁰⁷ | 71 |
| Figura 35. Imagens de MEV-FEG do material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ adquiridas com elétrons retroespalhados (tensão de aceleração de 15 kV)..... | 71 |
| Figura 36. Espectro na região do UV-Vis da dispersão de AuNP estabilizada por quitosana (fator de diluição: 10×) e do sobrenadante (após imobilização no material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$), | 72 |
| Figura 37. Imagem de TEM da dispersão de AuNP estabilizada por quitosana e histograma da distribuição de tamanho das partículas. | 73 |
| Figura 38. Termogramas obtidos para os materiais $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ e $\text{AuNP-SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ | 74 |
| Figura 39. Imagem de TEM do material $\text{AuNP-SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ (tensão de aceleração: 80 kV)..... | 74 |
| Figura 40. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) distribuição de diâmetro de poros para os materiais $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ e $\text{AuNP-SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ | 75 |
| Figura 41. Laços de histerese dos materiais $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ e $\text{AuNP-SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ | 76 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Sistemas frequentemente reportados contendo sílica e magnetita..... | 14 |
| Tabela 2. Tamanhos médios de cristalito obtidos a partir da equação de Scherrer. | 48 |
| Tabela 3. Parâmetros magnéticos dos materiais, onde M_S é a magnetização de saturação, H_C é o campo coercitivo, M_R é a remanência..... | 50 |
| Tabela 4. Dados de área superficial obtidos por análise textural utilizando o método BET. | 51 |
| Tabela 5. Perdas de massa, discriminadas pelas regiões de temperaturas, obtidas por análise termogravimétrica. | 60 |
| Tabela 6. Parâmetros magnéticos obtidos para os materiais. | 62 |
| Tabela 7. Dados de análise textural dos xerogéis MX, HFL-MX e HFB-MX..... | 63 |
| Tabela 8. Resultados dos ensaios de atividade enzimática para a enzima TLL. | 65 |
| Tabela 9. Perdas de massa obtidas a partir dos termogramas e discriminadas de acordo com as faixas de temperatura. | 74 |
| Tabela 10. Dados obtidos por análise textural dos materiais. | 75 |
| Tabela 11. Atividade antimicrobiana frente à bactéria <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739). | 77 |

Lista de siglas e abreviaturas

| | |
|-----------|---|
| AuNP | Nanopartículas de Ouro |
| BET | Brunauer, Emmett e Teller |
| BHI | Infusão Cérebro Coração, do inglês <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BJH | Barret, Joyner e Halenda |
| Db | Grupo Catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano |
| DRX | Difração de Raios X |
| EDS | Espectroscopia de Energia Dispersiva, do inglês <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> |
| H | Campo Magnético Externo |
| H_c | Coercividade ou Campo Coercitivo |
| H_s | Campo Magnético de Saturação |
| M | Magnetização |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MEV-FEG | Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, do inglês <i>Field Emission Gun</i> |
| M_r | Magnetização de Remanência |
| M_s | Magnetização de Saturação |
| OD | Densidade Óptica |
| PCZ | Ponto de Carga Zero |
| PMO | Organossilica Periódica Mesoporosa, do inglês <i>Periodic Mesoporous Organosilica</i> |
| PNP | <i>p</i> -nitrofenol |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| S_{BET} | Área Superficial Específica |
| T_{am} | Temperatura Ambiente |
| TEM | Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i> |
| TEOS | Ortossilicato de Tetraetila |
| TGA | Análise Termogravimétrica, do inglês <i>Thermogravimetric Analysis</i> |
| TLL | <i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase |
| UFC | Unidade Formadora de Colônias |
| VSM | Magnetômetro de Amostra Vibrante, do inglês <i>Vibrating Sample Magnetometer</i> |

Resumo

Neste trabalho, três abordagens foram utilizadas para desenvolver materiais porosos e magnéticos combinando a forte resposta magnética da magnetita com a versatilidade de configurações porosas da sílica. Em primeiro lugar, microesferas ocas de sílica foram sintetizadas a partir da lixiviação controlada de partículas de magnetita de um sistema *core-shell* magnetita@sílica, proporcionando esferas completamente vazias conectadas pelo *shell* de sílica com esferas ocupadas por magnetita. As esferas ocas apresentaram-se acessíveis e com características de espaço confinado, uma vez que detectou-se a formação de possíveis excímeros de tolueno induzidos pelo efeito de confinamento. Esses sistemas, quando acessíveis, podem ser utilizados como microcontêineres para espécies de até dezenas de nanômetros, com a vantagem de serem magneticamente controláveis. Em segundo lugar, um biocatalisador reciclável foi alcançado a partir da síntese de um xerogel de sílica contendo partículas de magnetita dispersas em sua microestrutura. A superfície da sílica foi funcionalizada com um silsesquioxano iônico com contra-íon de cadeia longa, o que proporcionou hidrofobicidade à superfície do xerogel. O mesmo foi utilizado como suporte para a enzima lipase, que conhecidamente atua em interfaces hidrofílicas/hidrofóbicas. Observou-se que a enzima lipase imobiliza-se em maior quantidade no suporte hidrofóbico em comparação com o suporte não-modificado (hidrofílico). Embora a lipase encontra-se hiperativada no suporte não-modificado, o suporte hidrofóbico apresenta melhor retenção da atividade nos ciclos, mantendo 51% de atividade enzimática no quinto ciclo. Por fim, em terceiro lugar, foi desenvolvido um sistema antimicrobiano a partir da síntese de um xerogel de sílica/titânia contendo partículas de magnetita dispersas em sua microestrutura e nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana ancoradas em sua superfície. Esse material apresentou efeito inibitório no crescimento de colônias de *Escherichia coli*, podendo ser magneticamente recuperado e reutilizado. O material manteve 102% de atividade antimicrobiana no segundo ciclo, confirmando sua potencial aplicação como agente antimicrobiano reciclável.

Abstract

In this work, three approaches were employed in order to develop porous and magnetic materials, matching the strong magnetic response of magnetite with the versatility of silica's porous configurations. Firstly, silica hollow microspheres were synthesized through controlled etching of magnetite particles from the inwards of a magnetite@silica core-shell system, yielding completely empty spheres connected by the silica shell to magnetite-occupied spheres. The hollow spheres were proven accessible with features of confined space, once likely toluene excimers were detected, induced by a confinement effect. When the inner space is accessible, these systems could be used as microcontainers for species of up to tens of nanometers, with the advantage of being magnetically controllable. Secondly, a recyclable biocatalyst was reached through the synthesis of a silica xerogel with embedded magnetite particles on its microstructure. The silica surface was functionalized with an ionic silsesquioxane containing a long chain counter-ion, which conferred hydrophobicity to the xerogel surface. The same material was applied as support for the immobilization of lipase enzyme, known to act on hydrophilic/hydrophobic interfaces. It was observed that a bigger amount of lipase enzyme is immobilized on the hydrophobic support when compared to the non-modified support (hydrophilic). Although lipase was hyperactivated on the non-modified support, the hydrophobic one presented better preservation of activity on the recycling, with 51% of enzymatic activity retained in the fifth cycle. At last, an antimicrobial system was developed through the synthesis of a silica/titania xerogel containing magnetite particles embedded on its microstructure and chitosan-stabilized gold nanoparticles anchored on its surface. This material presented inhibitory effect against *Escherichia coli* colonies, and it can be magnetically recovered and reused. The material preserved 102% of its initial activity in the second cycle, proving its potential as a recyclable antimicrobial agent.

1. Introdução

Dentre as formas abundantes de óxidos de ferro encontradas na natureza – hematita (α -Fe₂O₃), maghemita (γ -Fe₂O₃) e magnetita (Fe₃O₄) – a magnetita é largamente conhecida por seu caráter ferrimagnético,¹ tendo sido o primeiro material magnético conhecido pelo homem.² O seu magnetismo é proveniente da estrutura cristalina do tipo espinélio inverso, com fórmula [(Fe³⁺)₈]^{tetraédricos} [(Fe³⁺)₈(Fe²⁺)₈]^{octaédricos} O₃₂, onde os momentos magnéticos dos íons Fe³⁺ localizados nos sítios tetraédricos e octaédricos se anulam e o momento magnético líquido é dado pelos íons Fe²⁺.^{3,4} Mesmo dentre os óxidos de metais de transição, a magnetita apresenta o mais forte magnetismo¹ e também por apresentar baixa toxicidade vem sendo utilizada no desenvolvimento de agentes de contraste em imagens obtidas por ressonância magnética,⁵ no carregamento e liberação controlada de fármacos,^{5,6} em separação de proteínas,⁷ em tratamentos por hipertermia,⁸ e também no desenvolvimento de materiais facilmente recuperáveis para aplicação em catálise heterogênea.⁹⁻¹¹

Um importante fator a ser considerado no desenvolvimento de materiais contendo Fe₃O₄ é sua susceptibilidade a oxidação, visto que sob condições aeróbias e ação da temperatura, a transição da fase Fe₃O₄ para γ -Fe₂O₃ ou α -Fe₂O₃ é termodinamicamente espontânea, ocorrendo a oxidação dos íons Fe²⁺ a Fe³⁺,¹²⁻¹⁵ e a diminuição ou perda da propriedade magnética. O processo de oxidação (e transição de fase) é mais rápido quanto menor o tamanho da partícula de Fe₃O₄ e também pode ser favorecido por um maior número de grupos OH na sua superfície.¹³

Uma alternativa para retardar o processo de oxidação é revestir, encapsular ou funcionalizar as partículas de Fe₃O₄. A sílica é uma excelente alternativa para essa função, pois apresenta elevada resistência mecânica e boa estabilidade térmica e química,¹⁶ podendo tanto revestir as partículas de Fe₃O₄ (*core-shell*)¹² quanto encapsulá-las na rede inorgânica (método sol-gel).¹⁷ Em ambos os casos, há uma menor exposição das partículas de Fe₃O₄ ao ambiente, o que leva à maior estabilidade operacional.¹² Em geral, as partículas de Fe₃O₄ apresentam baixa área superficial e ausência de poros,¹⁸ características contrárias às que são desejadas no desenvolvimento de suportes tanto para carregamento de fármacos quanto para catálise, já que as propriedades texturais estão diretamente ligadas à capacidade de comportar espécies como moléculas ou complexos ativos, enzimas ou nanopartículas metálicas. Assim, a

utilização de Fe_3O_4 aliada a sílicas porosas é um poderoso recurso no desenvolvimento de novos compósitos que atuem eficientemente como suportes e que sejam magneticamente recuperáveis.

O processo de arquitetura de suportes porosos (magnéticos ou não) deve obrigatoriamente considerar a compatibilidade de tamanho entre as espécies que serão imobilizadas ou ancoradas e as dimensões da estrutura porosa.¹⁹⁻²¹ Sendo assim, para atuar como suporte para biomacromoléculas ou nanoestruturas, as metodologias de preparo de materiais meso (2 a 50 nm) ou macroporosos (> 50 nm)²² podem ser distintas. Materiais à base de sílica mesoporosos são frequentemente preparados utilizando o método sol-gel, podendo ser realizado (ou não) na presença de agentes direcionadores de estrutura.²³ A síntese de sílicas macroporosas também pode envolver *templates* que, ao serem removidos, deixam cavidades gravadas na sílica com o seu formato.^{24,25}

Partículas ocas de sílica são materiais meso ou macroporosos compostos por uma parede de sílica e um amplo espaço vazio em seu interior.²⁵ São comumente obtidas utilizando um núcleo de sacrifício, que é posteriormente removido por lixiviação ou calcinação, o qual determina o tamanho dos poros e cavidades do material.²⁴ Com a boa área superficial e o grande volume de poros desse tipo de estrutura, os materiais obtidos apresentam alta capacidade de carga.^{26,27} O ambiente interno pode proporcionar efeitos singulares em aplicações, como por exemplo em catálise, em decorrência da limitação de espaço ou mobilidade das espécies (efeito de confinamento).^{25,28} Além disso, a estabilidade mecânica da sílica protege as espécies encapsuladas de influências e variações do ambiente.²⁹

O uso de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4 como *template* para obter esferas ocas de sílica foi reportado empregando ácido clorídrico para extrair o óxido de ferro do interior das esferas de sílica.^{30,31} Entretanto, os sistemas reportados na literatura levam a esferas ocas não magnéticas (extração completa do óxido de ferro), ou esferas magnéticas mas não completamente ocas (estrutura do tipo chocalho).^{30,31} Obter, portanto, um sistema macroporoso contendo esferas de sílica completamente ocas e que estejam acopladas a partículas de magnetita resulta em um sistema magneticamente responsivo e com elevado volume disponível para atuar como hospedeiro de macroespécies.

No que se refere a sílicas mesoporosas, as mesmas são frequentemente obtidas pelo método sol-gel e podem ter suas propriedades texturais – como área superficial, volume e diâmetro de poros – arquitetadas durante a síntese.^{19,32} O método sol-gel

utiliza-se de reações de hidrólise e condensação de um alcóxido de silício (ortossilicato de tetraetila - TEOS) na presença de catalisador, em temperatura ambiente.^{32,33} Por envolver reações de cinética lenta, é possível incorporar espécies de interesse na sílica, como partículas de Fe₃O₄, as quais são encapsuladas e homoganeamente dispersas na rede inorgânica.¹⁷ Como a sílica possui grupos silanóis (Si-OH) funcionalizáveis,¹⁶ sua superfície pode ser modificada com compostos de interesse como silsesquioxanos iônicos, que são materiais híbridos à base de sílica com cargas na sua fração orgânica e capacidade de troca iônica.³⁴⁻³⁶

A síntese de um silsesquioxano iônico com contra íon de cadeia longa já foi reportada,³⁷⁻³⁹ e proporcionou um aumento na hidrofobicidade das superfícies recobertas com o material.³⁷ Sendo assim, sílicas mesoporosas poderiam ser funcionalizadas com esse composto e atuar como potenciais suportes para espécies com afinidade por superfícies hidrofóbicas, como é o caso da enzima lipase.^{16,40-42} As lipases são uma família de enzimas que podem catalisar a hidrólise de ésteres de triglicerídeos em uma interface hidrofílica/hidrofóbica.^{40,42} Podem ser utilizadas também para inúmeras outras reações,⁴³ dentre elas a transesterificação (produção de biodiesel).⁴⁴ Nesse sentido, com a necessidade de processos verdes e sustentáveis, imobilizar a enzima em um suporte promove economia no processo pela sua recuperação e reuso. Se o suporte apresenta resposta magnética, a separação do biocatalisador do meio reacional e seu reuso são facilmente alcançados pela aplicação de um campo magnético,^{9,10,44,45} dispensando atividades laboriosas de separação como centrifugação e filtração.

O método sol-gel também permite realizar a hetero-condensação de precursores inorgânicos distintos, como alcóxidos de silício e titânio, resultando em materiais mesoporosos à base de sílica/titânia.^{17,46} A titânia, por possuir sítios ácidos de Lewis em sua superfície, facilita a incorporação direta de espécies de interesse que possuam grupos básicos, como é o caso da quitosana,⁴⁷⁻⁴⁹ um biopolímero não tóxico que possui grupos amino em sua estrutura⁵⁰⁻⁵² e é um conhecido agente estabilizante de nanopartículas metálicas.^{53,54} Nanopartículas de ouro (AuNP), diferentemente do ouro na forma *bulk*, apresentam propriedades únicas como elevada relação área/volume, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade mesmo em concentrações relativamente altas, e atividade antimicrobiana.^{52,55-57} Distintamente de nanopartículas de prata, AuNPs produzem menos espécies reativas de oxigênio⁵⁸ (comumente responsáveis pela atividade antimicrobiana), no entanto, possuem outros meios que conduzem à morte bacteriana, como: a alteração do potencial da parede celular; inibição da enzima ATP

sintase, diminuindo o metabolismo da bactéria; e ligação ao DNA inibindo processos de transcrição e colapsando todo o processo biológico.⁵⁶⁻⁵⁸ Trabalhos prévios reportaram a boa atividade antimicrobiana de AuNP frente a bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁹ e *Escherichia coli*.^{58,60,61} Como os mecanismos antimicrobianos de nanopartículas são majoritariamente estabelecidos por contato,⁶² materiais com alta área superficial resultam em melhor atividade antimicrobiana. Assim, AuNP estabilizadas por quitosana podem ser incorporadas à matrizes mesoporosas de sílica/titânia, que possuem alta área e superfície reativa. Quando procede-se a síntese sol-gel na presença de partículas de Fe₃O₄, os suportes obtidos podem ser magneticamente separáveis, e todo o sistema antimicrobiano pode ser facilmente recuperado e reutilizado.

Neste contexto, este trabalho desenvolve três abordagens para a obtenção de materiais porosos e magnéticos à base de sílica e magnetita, com propriedades texturais planejadas, que atuem como potenciais suportes para macroespécies, como enzimas ou nanopartículas. A primeira abordagem envolve a síntese de um sistema contendo esferas ocas de sílica acopladas à partículas de magnetita, que atuam como microcontêineres acessíveis com mobilidade magnética. As duas demais abordagens foram conduzidas utilizando o método sol-gel de síntese para obter xerogéis mesoporosos de sílica e sílica/titânia, magnéticos pela presença de partículas de magnetita encapsuladas, e que atuam como suportes no desenvolvimento de biocatalisadores e sistemas antimicrobianos de fácil recuperação e reciclo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver novos sistemas magnéticos com características texturais planejadas que atuem como suportes de biomacromoléculas e nanoestruturas, visando aplicação como (bio)catalisadores e sistemas antimicrobianos de alto desempenho e de fácil separação do meio reacional.

2.2 Objetivos específicos

- i. Desenvolver um sistema combinado contendo sílica macroporosa e partículas de magnetita que apresente mobilidade magnética, e estudar suas características morfológicas, microestruturais e sua acessibilidade para potencial uso como suporte na imobilização de macroespécies;
- ii. Obter xerogéis mesoporosos de sílica contendo partículas de magnetita e funcionalizá-los com compostos hidrofóbicos para a adsorção de espécies lipofílicas, como a enzima lipase, e avaliar o desempenho dos materiais obtidos como biocatalisadores na reação de hidrólise de ácidos graxos;
- iii. Sintetizar xerogéis de sílica/titânia magnéticos, mesoporosos e com alta área superficial que atuem como suporte para nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana e explorar a sua aplicação como um sistema antimicrobiano facilmente reutilizável.

3. Revisão de literatura

3.1 Dentre os materiais magnéticos, a magnetita

Os fenômenos magnéticos são intrínsecos ao enredo tecnológico da vida moderna. Materiais com propriedades magnéticas são aplicados como agentes de contraste em medicina diagnóstica,⁶³ em motores e sistemas de armazenamento de informações,⁶⁴ e também como interfaces recuperáveis em sistemas adesivos para ancoragem de espécies.⁶⁵ Entretanto, a biografia dos fenômenos magnéticos começou há quase três mil anos, em aproximadamente 800 a.C., quando iniciaram-se os registros de contato humano por parte dos gregos com a pedra-íma, um mineral que apresentava forte atração por peças de ferro.² Em inglês, a pedra-íma é descrita como *lodestone* ou *leading stone* – a pedra que conduz – visto que a mesma foi muito utilizada como agulha em jogos de adivinhação e, posteriormente, em bússolas de orientação geográfica.⁶⁶ A pedra-íma é composta por magnetita, um óxido de ferro abundante na região da Magnésia, na Grécia, local onde foi inicialmente explorada e estudada.² Magnésia, do grego *Μαγνησία*, significa “local de pedras mágicas”, justamente porque suas pedras apresentavam atração umas sobre as outras.

3.1.1 Estrutura e propriedades da magnetita

A magnetita (Fe_3O_4) apresenta-se como uma ferrita de fórmula química $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ e arranjo cristalino do tipo espinélio inverso. Sua rede de Bravais corresponde a uma estrutura cúbica de face centrada, originada pelo empacotamento compacto dos ânions O^{2-} que dão origem a duas subredes de sítios tetraédricos e octaédricos a serem preenchidos pelos cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} (Figura 1). Em um espinélio normal, os cátions trivalentes ocupam os sítios octaédricos, enquanto os cátions divalentes se localizam nos sítios tetraédricos. Já no caso da magnetita – espinélio inverso – os íons Fe^{3+} estão localizados nos sítios tetraédricos, cercados por 4 átomos de oxigênio, enquanto que os sítios octaédricos são ocupados por números iguais de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , cada um cercado por 6 átomos de oxigênio. Em uma cela unitária, 32 átomos de oxigênio dão origem a 64 sítios tetraédricos (apenas $\frac{1}{8}$ ocupados por Fe^{3+}) e

32 sítios octaédricos ($\frac{1}{4}$ ocupados por Fe^{2+} e $\frac{1}{4}$ ocupados Fe^{3+}). Desta forma, a cela unitária da Fe_3O_4 tem fórmula $[(\text{Fe}^{3+})_8]_{\text{tetraédricos}} [(\text{Fe}^{3+})_8 (\text{Fe}^{2+})_8]_{\text{octaédricos}} \text{O}_{32}$.^{3,4,18}

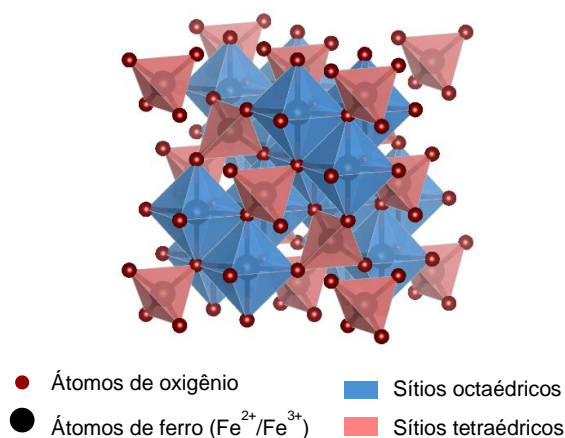


Figura 1. Ilustração do arranjo cristalino do tipo espinélio inverso da magnetita.

O estado de oxidação e localização de cada cátion nos dois tipos de sítios intersticiais influenciam fortemente as propriedades magnéticas e eletrônicas dos materiais. Do ponto de vista eletrônico, o processo de *electron hopping* entre os cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} nos sítios octaédricos da magnetita explicam sua boa condutividade quando comparada com outros óxidos de ferro como Fe_2O_3 e FeO .^{67,68} Já do ponto de vista das interações magnéticas, os spins dos cátions Fe^{3+} nos sítios tetraédricos (A) e os spins dos cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} nos sítios octaédricos (B) estão acoplados através do mecanismo de super-troca, mediados pelos átomos de oxigênio. Existem três interações de super-troca, A–O–B, A–O–A e B–O–B, entretanto a interação entre os sítios tetraédricos e octaédricos A–O–B é a mais determinante.³ No espinélio inverso, o acoplamento dos íons Fe^{3+} por super-troca A–O–B é antiparalelo, o que leva ao cancelamento de suas contribuições magnéticas à estrutura.^{3,67} Dessa forma, conforme ilustrado na Figura 2, o momento magnético de rede na estrutura de espinélio inverso da magnetita é ocasionado unicamente pela contribuição dos cátions Fe^{2+} nos sítios octaédricos; portanto, é do arranjo de espinélio inverso que provém o caráter ferrimagnético da magnetita.

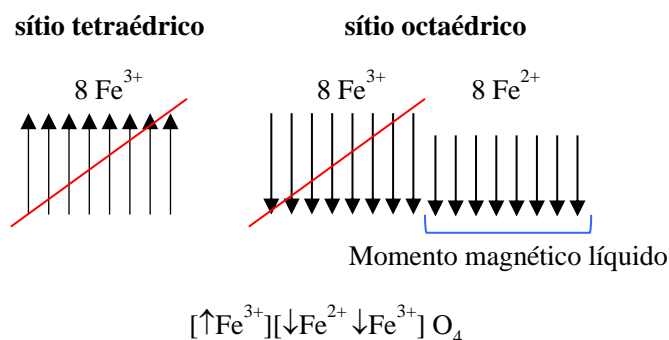


Figura 2. Distribuição dos momentos magnéticos de spin dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na magnetita.

A magnetização de saturação da magnetita na forma *bulk* é de $92 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ a temperatura ambiente. Entretanto, como as propriedades magnéticas da magnetita são fortemente dependentes do seu tamanho de partícula, esse valor dificilmente é alcançado em sistemas nanométricos. O tamanho crítico para a transição ferrimagnético–superparamagnético na magnetita é próximo de 20 nm, o que significa que nanopartículas de magnetita menores que 20 nm são suficientemente pequenas para apresentarem um único domínio magnético na presença de um campo magnético aplicado.^{1,4,69,70}

Em uma típica medida de magnetização vs campo magnético externo ($M \times H$), exemplificada na Figura 3, à medida que um campo externo é aplicado, os domínios magnéticos do sólido começam a se orientar em direção favorável ao campo. Quando todos os domínios encontram-se orientados ao campo H , ocorre a saturação. Em um material com multidomínios magnéticos, ao reduzir e inverter o campo magnético externo, a curva de magnetização não retorna pelo seu caminho inicial, dando origem a uma histerese. Nesse caso, quando o campo magnético externo é nulo ($H = 0$), ainda existem domínios orientados ao campo inicial e o material permanece magnetizado, gerando o efeito conhecido como remanência (M_r).^{1,4} O campo magnético externo que deve ser aplicado no sentido inverso para reduzir a magnetização até zero ($M = 0$) é chamado de coercividade ou campo coercitivo (H_c).^{1,4}

Em um comportamento superparamagnético (Figura 3), não há a presença de histerese em uma medida $M \times H$, o que também significa ausência de M_r e H_c .^{1,4} Isso significa que partículas superparamagnéticas só podem ser magnetizadas na presença de um campo magnético externo, o que lhes promove resposta forte e rápida e as torna facilmente controláveis.

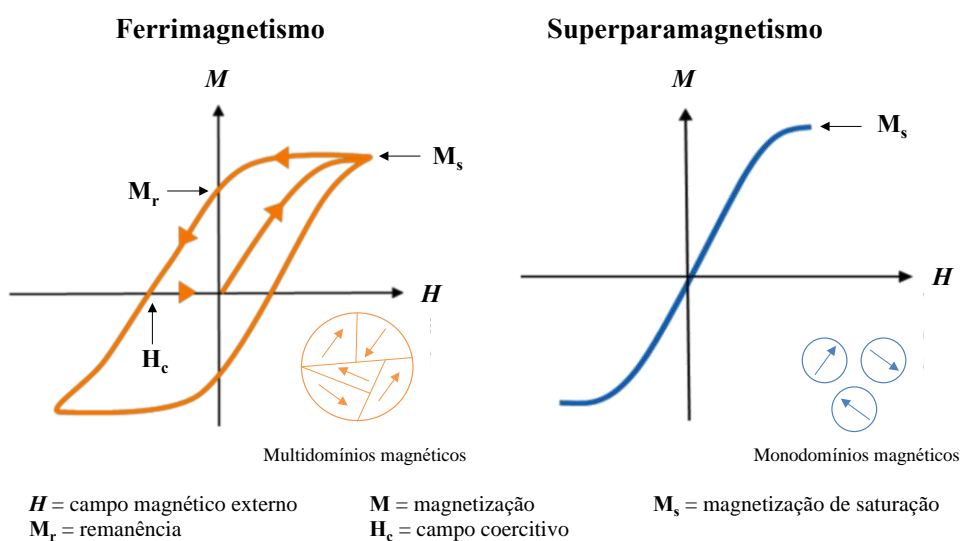


Figura 3. Representação dos laços obtidos em uma medida de magnetização vs campo magnético externo para comportamento ferrimagnético e superparamagnético. Adaptado da referência ⁴.

3.1.2 Potencialidades e limitações da magnetita

Dentre os óxidos de metais de transição, a magnetita apresenta a mais forte propriedade magnética.¹ Isso, aliado a sua baixa toxicidade, biocompatibilidade,⁷¹ rápida resposta e simples metodologia de separação,⁷²⁻⁷⁴ coloca os materiais à base de magnetita em destaque nas áreas de imageamento por ressonância magnética,⁶³ agentes terapêuticos para tratamento de câncer,^{63,75} nanosensores magnéticos *in vivo* e *ex vivo*,⁷⁶ separação de proteínas,⁷ remediação de recursos naturais⁷⁷ e tratamento de efluentes,⁶⁵ catalisadores recuperáveis,⁷⁸ armazenamento de dados,⁷⁹ dentre outras.

Embora a presença de ambos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em sua estrutura de espinélio inverso seja crucial para seu forte magnetismo, isso também abre a principal limitação do emprego de magnetita: sua tendência natural à oxidação. Para a magnetita na forma *bulk* (mineral), a cinética de oxidação é lenta;¹³ entretanto, para magnetita sintética, os íons Fe^{2+} podem ser facilmente oxidados à Fe^{3+} sob condições aeróbias.¹² Os dois produtos da oxidação da magnetita são a maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) e a hematita ($\alpha-Fe_2O_3$), sendo que a maghemita é a rota mais espontânea por apresentar o mesmo arranjo cristalino, cúbico compacto, que a magnetita. A hematita possui arranjo hexagonal compacto e por esse motivo a oxidação da magnetita à hematita, e consequente rearranjo de estrutura, é um processo mais energético.¹³ A importância de evitar a

oxidação da magnetita às demais fases de óxido de ferro é a diminuição, no caso da maghemita, ou perda, no caso da hematita, da propriedade magnética.

O mecanismo de oxidação da magnetita é difusivo e, por isso, é tanto retardado quando na forma *bulk*, quanto acelerado quando na forma nanométrica. Visto que os caminhos de difusão em nanopartículas são curtos, a constante de difusão é inversamente relacionada com o tamanho das nanopartículas; logo, quanto menor a partícula, mais rapidamente ocorrerá sua oxidação.¹³ A oxidação de nanopartículas de magnetita também é favorecida pela maior área superficial e maior disponibilidade de grupos –OH em sua superfície,¹³ quando comparado com micropartículas.

Outra limitação do emprego de partículas de magnetita é a formação de aglomerados,⁸⁰ seja na presença ou ausência de um campo magnético externo. Além de afetar o tamanho hidrodinâmico das partículas, que é crítico para aplicações em meios biológicos, por exemplo, a formação de aglomerados afeta também as propriedades magnéticas, aumentando parâmetros como coercividade e remanência.⁸¹

As estratégias para superar essas limitações envolvem o recobrimento das partículas com componentes orgânicos e inorgânicos^{73,82} e também a fixação/imobilização das partículas em suportes, limitando sua mobilidade. Dentre os componentes orgânicos, destacam-se o uso de agentes estabilizantes moleculares como: os ácidos graxos ácido oleico,^{77,83,84} esteárico,^{85,86} mirístico⁸⁶ e palmítico;⁸⁶ os aminoácidos tirosina,^{87,88} histidina,⁸⁸ arginina,⁸⁷ leucina,⁸⁷ glicina,⁸⁹ glutamina⁸⁹ e cisteína;^{87,89} e polímeros tanto sintéticos, como polietilenoglicol,^{90,91} polivinilpirrolidona⁷⁷ e polidopamina,^{92–94} quanto naturais como amido,⁹⁵ quitosana,^{96,97} albumina⁹⁸ e caseína.⁹⁵ Por outro lado, os componentes inorgânicos para recobrimento das partículas envolvem principalmente ouro⁹⁹ e prata,¹⁰⁰ e óxidos como a titânia¹⁰¹ e a sílica.^{12,17,45,63,81,102} A sílica, além de largamente reportada como recobrimento, também é empregada como suporte para as partículas magnéticas, sejam elas embutidas na microestrutura da sílica,^{17,78} sejam preparadas *in situ* dentro de sílicas porosas.¹⁰³

3.2 Sistemas combinados de magnetita e sílica

3.2.1 Estrutura e propriedades da sílica

Sílica e silicatos são compostos muito abundantes na crosta terrestre.¹⁰⁴ A sílica é um sólido covalente com fórmula mínima SiO₂ e sua rede é estruturada em um arranjo

tetraédrico com cada átomo de silício ligado a quatro átomos de oxigênio. Cada átomo de oxigênio, por sua vez, está ligado a dois átomos de silício, conectando os tetraedros em uma rede tridimensional.¹⁰⁴

A sílica se apresenta na natureza majoritariamente em sua forma amorfa, mas também possui polimorfos como a cristobalita e o quartzo.^{16,104} A sílica amorfa, entretanto, é foco de pesquisas em diversas aplicações graças a duas de suas principais características: sua química de superfície e sua versatilidade como estrutura porosa.

No que se refere à sua química de superfície, é necessário contextualizar a rede tridimensional da qual a sílica é constituída. Embora pensa-se a sílica como uma rede infinita de ligações siloxano Si–O–Si, o sólido possui dimensões finitas com regiões de superfície que são compostas por grupos silanóis (Si–OH) (Figura 4).^{16,104} Apenas acima de 1500 K há a sinterização completa e eliminação de todas as suas funcionalidades de superfície.¹⁶ Fora dessas condições, a sílica apresenta sua superfície hidroxilada e, portanto, hidrofílica. Existem três tipos de grupos silanóis na superfície da sílica: silanol livre, silanóis geminais e silanóis vicinais (Figura 4).¹⁰⁴

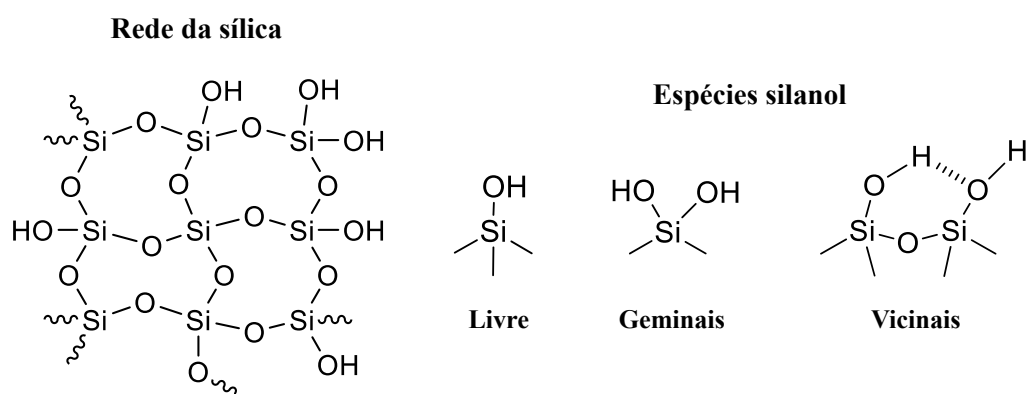


Figura 4 Ilustração da rede tridimensional de uma sílica amorfa e das possíveis espécies silanol presentes em sua estrutura.

A sílica se comporta como um ácido fraco e, embora seja comum tratar seu ponto de carga zero (PCZ) como pH 2 e considerar a presença majoritária de silanatos (Si–O⁻) acima desse pH, esse modelo é pouco condizente com dados experimentais. O mais aceito é o conceito de heterogeneidade dos silanóis de superfície, considerando que os sítios são todos ácidos mas apresentam diferentes constantes de acidez, sendo, portanto, ainda passíveis de protonação e formação de ligações de H acima de pH 2.^{16,104} Essa rica química de superfície faz da sílica uma excelente fase estacionária em

técnicas de separação e adsorção. Além de tudo, os grupos silanóis são reativos e de relativa fácil funcionalização, o que abre horizontes para a inserção de novas funcionalidades com grupos orgânicos ou inorgânicos, enriquecendo substancialmente suas potencialidades.

A combinação entre propriedades texturais e aplicação é crucial no desenvolvimento de materiais contendo sílica, uma vez que materiais com alta área superficial e elevado volume de poros são atrativos, por exemplo, no desenvolvimento de suportes para catálise ou carreamento de fármacos com elevada capacidade de carga. Essa versatilidade na porosidade é proporcionada pela disponibilidade de métodos de síntese que permitem manipular propriedades controlando os precursores, o estado coloidal ou os processos de acabamento dos materiais. A rota de hidrólise e condensação de alcóxidos de silício é largamente empregada, visto que a cinética das reações é relativamente lenta e permite interferência.^{32,33,104} Nessa rota, ilustrada na Figura 5, ocorre primeiramente a hidrólise de um alcóxido de silício, introduzindo grupos silanol na molécula e gerando o respectivo álcool como subproduto. Em seguida, iniciam-se as reações de condensação que podem ocorrer tanto entre um grupo silanol e um alcóxido quanto entre grupos silanol de moléculas diferentes, dando origem às ligações siloxano que compõe a rede da sílica. Os subprodutos das reações de condensação são tanto água quanto o álcool correspondente.

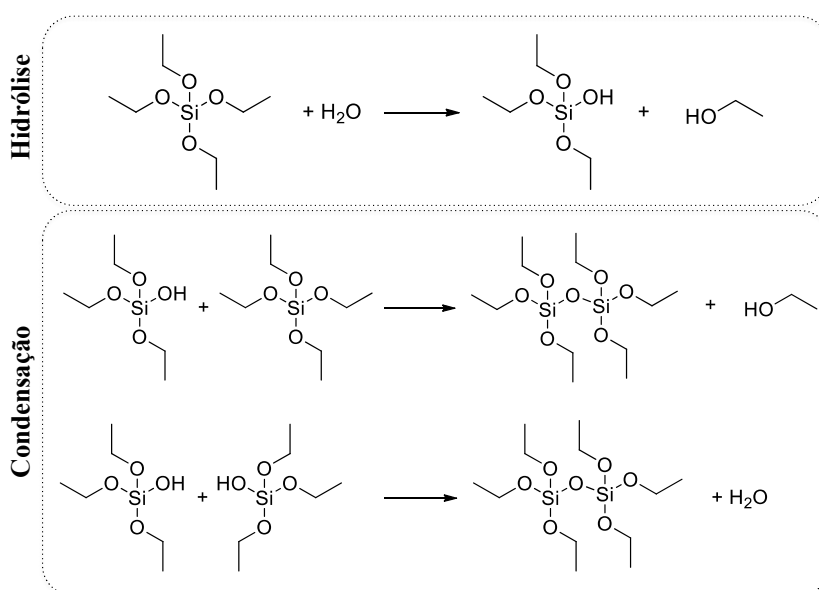


Figura 5. Reações de hidrólise e condensação de um alcóxido de silício para a obtenção de sílica.

Utilizando a rota de hidrólise e condensação, o método de Stöber para síntese de partículas de sílica é largamente empregado, seja para obtenção de partículas densas (em n tamanhos),¹⁰⁵ seja para recobrir outras partículas em um sistema *core-shell*.^{81,102} O método de Stöber utiliza amônia como catalisador para controlar o crescimento de nanopartículas de sílica em suspensão coloidal.¹⁰⁵ Esse método sozinho não permite desenvolver materiais com mesoporos planejados, embora seja frequentemente combinado com o uso de agentes direcionadores de estrutura²⁷ que suprem essa necessidade ao orientar a formação de uma estrutura porosa.

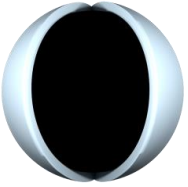
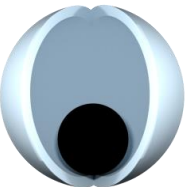
O método sol-gel por si só permite o controle das propriedades texturais, onde tanto o tipo de catalisador empregado quanto as condições de gelificação influenciam no formato, tamanho e volume dos poros, bem como na área superficial específica.^{32,33} Catalisadores ácidos (HCl, HNO₃, AcOOH) tipicamente dão origem à materiais microporosos (tamanho de poro < 2 nm), enquanto que catalisadores básicos – ou nucleofílicos – (NaOH, NH₃OH) são conhecidos por produzirem materiais mesoporosos (2 nm < tamanho de poro > 50 nm). Um especial destaque ao uso de HF que, apesar de seu caráter ácido, é um forte nucleófilo e origina materiais mesoporosos.^{32,33} Quanto às condições de gelificação, quando o processo se dá em condições ambientes, o monolito obtido ao final da secagem se denomina xerogel.^{19,32-34} É possível, entretanto, realizar a secagem em condições supercríticas e o material final – aerogel – é altamente poroso, com elevada área superficial.³³

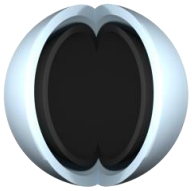
O método sol-gel permite também realizar a co-condensação de precursores distintos,¹⁰⁶ permitindo incorporar diferentes funcionalidades na rede da sílica (co-condensação de diferentes precursores alcóxidos de silício ou organossilanos na obtenção de organossilicas)¹⁰⁷ ou mesmo obter óxidos mistos (co-condensação de alcóxidos de silício com alcóxidos de outros metais, como o titânio, por exemplo).^{17,46}

3.2.2 Alguns sistemas combinados de sílica e magnetita

Tendo em vista as propriedades individuais da magnetita e da sílica, é fácil antecipar a frutífera combinação de ambas. A Tabela 1 traz algumas das combinações mais comuns na literatura.

Tabela 1. Sistemas frequentemente reportados contendo sílica e magnetita.

| Sistema | Configuração | Aplicação | Referência |
|---|---|--|-------------------------------------|
|  <i>Core-shell</i> | <i>Shell</i> mesoporoso de sílica, funcionalizado com grupos tetrassulfeto, <i>core</i> de magnetita | Adsorção de íons de metais pesados | Vojoudi <i>et al</i> ¹⁰⁹ |
| | <i>Shell</i> de sílica, funcionalizado com -NH ₂ -AuNP, <i>core</i> de magnetita | Catálise na redução de compostos nitrofenólicos | Bhaduri <i>et al</i> ¹¹⁰ |
| | <i>Shell</i> de sílica funcionalizado com anidrido glutárico, <i>core</i> de magnetita sintetizada com extrato de folhas de <i>Excoecaria cochinchinensis</i> | Adsorção de doxorrubicina para liberação controlada em tratamentos anticâncer | Cai <i>et al</i> ¹¹¹ |
| | <i>Shell</i> de sílica funcionalizado com albumina, <i>core</i> de magnetita | Liberação de curcumina e agente de contraste em nanomedicina teranóstica | Maboudi <i>et al</i> ⁶³ |
|  <i>Rattle-type</i> ou <i>yolk-shell</i> | Esferas ocas e mesoporosas de sílica, <i>core</i> tipo chocalho de magnetita | Liberação de doxorrubicina em tratamentos anticâncer | Zhu <i>et al</i> ¹¹² |
| | Esferas ocas e mesoporosas de PMO (organossílicas periódicas mesoporosas) contendo nanopartículas de Pd, <i>core</i> de magnetita recoberta por sílica | Adsorção de contaminantes orgânicos e íons de metais nobres de água e efluentes; catálise em oxidação seletiva de álcoois. | Dai <i>et al</i> ¹¹³ |

| Sistema | Configuração | Aplicação | Referência |
|--|---|---|-------------------------------------|
|  <p><i>Double-shell</i></p> | Esferas ocas com duplo <i>shell</i> de magnetita (interno) e sílica (externo), funcionalizada com poliácido láctico e polietileno glicol | Liberação de ioversol (agente de contraste) para imageamento por ressonância magnética e tomografia | Zhao <i>et al</i> ¹¹⁴ |
| Filmes finos | Substrato de sílica recoberto com magnetita por deposição por laser pulsado | Estudo da magnetização | Yin <i>et al</i> ¹¹⁵ |
| Dispersão na matriz | Xerogel de SiO ₂ /TiO ₂ mesoporoso funcionalizado com a enzima tirosinase, partículas de magnetita encapsuladas na matriz | Biossensor eletroquímico para catecol e catecolaminas | Morawski <i>et al</i> ¹⁷ |
| | Sílica mesoporosa do tipo SBA-15, funcionalizada com complexo de Pd(II), nanopartículas de magnetita encapsuladas na sílica | Catalisador para reações de Hiyama | Nuri <i>et al</i> ⁷⁸ |
| Dispersão nos poros da matriz | Sílica mesoporosa do tipo SBA-15, partículas de magnetita sintetizadas <i>in situ</i> nos poros por redução térmica | Estudo das condições de síntese | Yiu <i>et al</i> ¹⁰³ |

Os sistemas *core-shell* são os mais reportados, especialmente porque a sílica como *shell* promove aumento da estabilidade química da magnetita, encerrada no *core*.¹² Além disso, os grupos silanol em sua superfície permitem a inserção de espécies multifuncionais na partícula. Nesse contexto, as aplicações mais comuns envolvem i) sistemas de adsorção ou catálise em que a propriedade magnética é utilizada na fase de separação do meio reacional;¹⁰⁸ ii) sistemas de terapia e diagnóstico em meio biológico, em que a magnetita pode atuar tanto como agente magnético de contraste quanto na promoção de hipertermia;⁷⁵ iii) sistemas sensores em que a propriedade magnética interfere construtivamente na resposta do sensor.¹⁷

Em todos esses sistemas, a sílica atua como agente de proteção à oxidação e de promoção de propriedades texturais, onde destaca-se as configurações contendo partículas ocas, que atuam como contêineres com alta capacidade de carga. O uso de sílicas mesoporosas também é largamente reportado, onde a área superficial e o tamanho de poros são arquitetados para comportar desde moléculas até biomacromoléculas e nanoestruturas.

3.3 Partículas ocas: micro e nanocontêineres multifuncionais

As inúmeras vantagens dos materiais porosos que os levam a ser tão comuns em estudos científicos estão pautadas na capacidade de comportar grande quantidade de espécies de interesse, seja pela elevada área superficial, seja pelo elevado volume de poros. Nesse sentido, as estruturas ocas são uma nova classe de materiais em destaque, as quais são constituídas por um *shell* (casca) e por cavidades ou espaços vazios em seu interior.^{25,116,117} Esses amplos reservatórios podem apresentar propriedades únicas em seu interior, como por exemplo efeito de confinamento.²⁸ Existem estruturas ocas desde a escala nano³¹ até a escala micrométrica,^{114,118} o que as torna suportes polivalentes podendo hospedar desde átomos e moléculas¹¹⁹ até nanoestruturas¹¹⁸ e biomacromoléculas.²⁶ Além disso, há uma diversidade de estruturas ocas, mono ou multicamadas,^{120–122} como cubos¹²³, prismas¹²⁴ e esferas,^{121,125,126} sendo esta última a mais difundida pela facilidade na obtenção de *templates*.

3.3.1 Estratégias de síntese de esferas ocas

Embora existam rotas sintéticas *template-free*,^{126,127} as estruturas ocas são majoritariamente preparadas com o auxílio de *templates*. Dessa forma, o tamanho das estruturas e da cavidade é diretamente dependente do *template* utilizado, uma vez que o mesmo atua como o molde positivo da concavidade. O *template* deve ser posteriormente removido de forma a deixar sua impressão na estrutura sem, entretanto, danificá-la. A escolha de um *template* adequado é determinante para que as partículas possuam formato e tamanho homogêneos e duas classes de materiais são utilizadas como *cores* de sacrifício na síntese de partículas ocas: *hard* e *soft templates*.^{24,117,128,129} A Figura 6 esquematiza essa divisão.

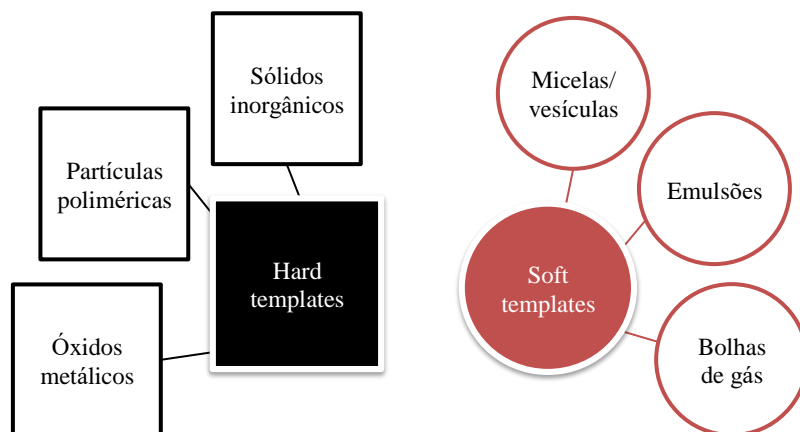


Figura 6. Esquema dos principais tipos de *template* empregados na preparação de estruturas ocas.

Soft templates compreendem principalmente estratégias envolvendo emulsões, vesículas/micelas e bolhas de gás e são conhecidos como *templates in-situ*. São menos difundidos, mas apresentam a vantagem de arquitetar não só a morfologia, mas também a estrutura interna e externa das partículas.²⁴ No caso de emulsões, dois líquidos normalmente imiscíveis passam pelo processo de emulsificação, em que gotas de um deles são forçadas a se quebrarem e se dispersarem em uma fase contínua. Então, um precursor do que será o *shell* da partícula oca é adicionado e se deposita na superfície da gota.¹³⁰ O tamanho das gotas em emulsões pode variar de 10 nm a 100 μm ,^{24,117} abrangendo a principal faixa de trabalho de partículas ocas. No caso do uso de micelas, a faixa de trabalho se limita às dimensões nanométricas, uma vez que utiliza-se de um

surfactante (espécie anfifílica). O mesmo é empregado acima de sua concentração micelar crítica, de forma a organizar-se em uma mesoestrutura. Vários parâmetros influenciam na organização da mesoestrutura – como pH, temperatura, concentração, força iônica – o que permite obter *templates*, e conseqüentemente partículas ocas, de vários tamanhos e formatos.^{24,117} A estratégia de síntese de partículas ocas a partir de bolhas de gás é muito próxima das emulsões, visto que se estabelece uma emulsão de bolhas de gás em um solvente. As cargas de superfície e a hidrofiliçidade do precursor ou das partículas que são depositadas sobre a bolha interferem nas características das partículas ocas finais. As bolhas de gás, por sua vez, podem ser obtidas soprando um gás em um líquido, por cavitação com auxílio de ultrassom ou geradas por reação química.¹¹⁷

Já os *hard templates* são universais na síntese de esferas ocas devido à estreita distribuição de tamanhos e diversidade de morfologias, rigidez do *template* (não são deformáveis durante o recobrimento) e conseqüente precisão na formação de estruturas ocas.¹¹⁷ Nesse contexto, partículas poliméricas são excelentes candidatas como *templates* pois seu tamanho pode ser facilmente controlado e também podem passar por funcionalizações que facilitam a deposição do *shell*.²⁴ Partículas esféricas de poliestireno (*beads*) estão entre as mais reportadas na literatura.^{114,131,132} Por outro lado, dentro dos *hard templates* inorgânicos, óxidos como sílica (SiO₂),^{133,134} carbonatos como CaCO₃¹³⁵ e óxidos metálicos como Fe₂O₃³⁰ e Fe₃O₄³¹ são usados, especialmente porque podem ser preparados em formatos mais singulares, sem necessidade de solventes orgânicos e geralmente dispensando funcionalizações que facilitem a formação do *shell*. Destaque especial para *beads* de sílica – que podem ser sintetizadas com formato e tamanho homogêneos pelo método de Stöber,¹⁰⁵ em uma ampla faixa de diâmetros – e para partículas de magnetita – que são magnéticas e também podem ser seletiva e controladamente extraídas em condições experimentais relativamente brandas.³¹

Em ambos os tipos de *templates* – *soft* ou *hard* – é necessária uma etapa de remoção do mesmo para o esvaziamento da partícula e formação da cavidade, que normalmente acontece por calcinação ou por extração química. Assim, controlando o *template* e as condições de esvaziamento, é possível arquitetar o interior das esferas de forma a obter esferas completamente vazias ou estruturas multifuncionais como multi-*shell*,^{120,122} *yolk-shell* ou *rattle-type*^{108,112,113,136} (Figura 7). Nesse tipo de estrutura, o interior da esfera oca é desenhado para apresentar funcionalidades como

compartimentos separados para reações em cascata ou reações seletivas, isolamento de espécies catalíticas, ou mantendo um *core* ativo dentro do reservatório, como é o caso das estruturas *yolk-shell* ou *rattle-type*.

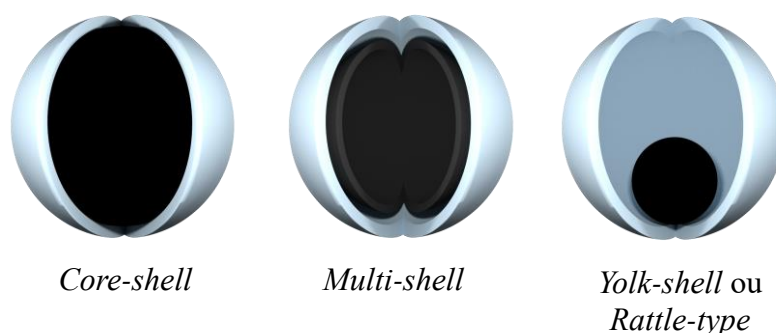


Figura 7. Ilustração de exemplos de estruturas obtidas a partir da arquitetura *core-shell*.

A composição do *shell*, por sua vez, abrange desde orgânicos como polímeros¹³⁷ e biopolímeros;^{138,139} superfícies metálicas como paládio¹³³ e prata;¹⁴⁰ até óxidos como titânia,^{126,141} alumina¹⁴² e sílica.^{27,114,118} Estruturas inorgânicas e, em especial a sílica, possuem propriedades mecânicas que lhes conferem estabilidade durante etapas de preparação e aplicação.¹⁴³ Nesse sentido, esferas ocas de sílica, além de possuírem grande capacidade de carga,²⁶ também são eficientes em encapsular e proteger suas espécies confinadas de influências do meio reacional.¹⁴⁴ Entretanto, o *shell* precisa ser permeável ao meio, para que haja difusão das espécies dependendo da aplicação desejada.²⁶

3.3.2 Vantagens e potencialidades do uso de esferas ocas

Com base em suas características, existem inúmeras aplicações de esferas ocas já reportadas e outras inúmeras a serem exploradas. Destacam-se, entretanto, a alta capacidade de carga, a possibilidade de isolamento de espécies e também efeitos de confinamento.

A alta capacidade de carga abre as portas para aplicação de esferas ocas na encapsulação de complexos e estruturas moleculares, como fármacos em liberação controlada e contínua,^{5,114,134} como *host* para nanoestruturas, caso de nanopartículas em catálise^{118,144} e enzimas em biocatálise,²⁶ essas últimas que possuem suficiente mobilidade dentro do amplo interior das estruturas; como adsorventes de

contaminantes,¹¹³ visto as boas taxas de difusão no interior das esferas. Quando no interior das esferas ocas, as espécies encapsuladas encontram-se relativamente bem isoladas dos meios reacionais. Nesse caso, é factível que espécies pouco solúveis possam ser eficientemente transportadas através de um solvente que lhes é incompatível.¹³⁴ Por fim, em nanoesferas a restrição de mobilidade promove efeitos únicos de confinamento como seletividade em reações catalíticas por restrição de tamanho e mobilidade.²⁸

3.3.3 Esferas ocas magnéticas: contêineres móveis

A versatilidade das esferas ocas reside principalmente na possibilidade de inserção de infundáveis espécies, dentre elas componentes magnéticos. Nesse caso, as esferas ocas apresentam fácil manipulação, separação e mobilidade pela simples aplicação de um campo magnético externo.

Várias estratégias de síntese foram reportadas combinando estruturas magnéticas e ocas de sílica. Chen *et al.* elegeram a impregnação pós-síntese para incorporar nanopartículas de magnetita em esferas ocas e mesoporosas de sílica.²⁶ Zhao *et al.* depositaram um *shell* de magnetita sobre *beads* de poliestireno, posteriormente recobrando com sílica e removendo o *template* por calcinação.¹¹⁴ Nanopartículas de magnetita também foram incorporada no próprio *template* de poliestireno.¹³² Partículas *rattle-type* de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ foram preparadas por Zhu *et al.* ao adicionar um precursor de ferro no *template* de esferas de carbono.¹¹² Nanopartículas de magnetita também foram incorporadas em um *template* – vesículas de surfactante – e então o *shell* de sílica foi depositado no seu entorno.¹⁴⁵ O uso de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4 como *template* para obter esferas ocas de sílica também foi reportado, empregando ácido clorídrico para extrair o óxido de ferro do interior das esferas de sílica.^{30,31} Entretanto, os sistemas reportados na literatura levam a esferas ocas não magnéticas, com extração completa do óxido de ferro, ou esferas magnéticas mas não completamente ocas, com *design* do tipo chocalho.

3.4 Suportes porosos e magnéticos para imobilização de bioestruturas

Estruturas biológicas como enzimas, proteínas e anticorpos são de alto impacto no cenário científico e tecnológico. As enzimas, em especial, se sobressaem aos catalisadores sintéticos pelas altas taxas de conversão, excelente enantioespecificidade e

seletividade, operando sob condições brandas de pressão (pressão atmosférica), temperatura (próxima da temperatura ambiente) e pH (próximo ao fisiológico).^{20,146} Por isso, o emprego de enzimas nas indústrias alimentícia, química fina e farmacêutica é amplo, sendo uma alternativa sustentável.¹⁴⁶ Entretanto a maior parte das enzimas é solúvel em meios reacionais aquosos e os métodos clássicos de separação e purificação podem levar ao desenovelamento da estrutura quaternária ou mesmo quebra das cadeias de aminoácidos que as compõem, o que as desativa.²⁰ Por outro lado, empregar biocatalisadores de uso único é altamente custoso e pouco viável em escala industrial.

Nesse sentido, a preparação de suportes adequados e de métodos experimentais para imobilizar enzimas está atrelado ao desenvolvimento de biocatalisadores recicláveis. Imobilizar a enzima em um sólido insolúvel, desde que haja retenção da configuração ativa, apresenta benefícios como: i) recuperação do catalisador após a reação e seu reuso imediato em múltiplos ciclos catalíticos;^{10,41,44} ii) minimização de contaminação dos produtos por resíduos do catalisador; iii) aumento da especificidade, seletividade,¹⁴⁷ estabilidade operacional^{44,148} e de armazenamento⁴⁴ mesmo em condições possivelmente desnaturantes como pH extremo, calor, solventes orgânicos; iv) possibilidade de reações em cascata utilizando multi-enzimas.^{16,146,149}

3.4.1 Lipases

A lipase (E.C. 3.1.1.3) é parte da família das hidrolases, atuando na hidrólise de éster carboxílicos.^{40,42,43} Embora seus substratos naturais sejam os triglicerídeos, a lipase é uma enzima conhecida por sua promiscuidade catalítica (catálise em outras reações como hidrólise de amidas, condensação aldol, condensação Knoevenagel, adição de Michael)⁴³ e ambiguidade de substratos (quebra de especificidade atuando também na hidrólise de vários ésteres).¹⁵⁰

Do ponto de vista de suas estruturas, todas as lipases possuem uma característica em comum: seus sítios ativos são oclusos do meio por uma cadeia de polipéptidos chamada *lid*. Na presença de uma interface hidrofóbica – uma gota de óleo, suporte hidrofóbico, proteína hidrofóbica ou mesmo outra lipase “aberta” – a *lid* se move e permite a interação entre a interface hidrofóbica e os resíduos hidrofóbicos da enzima, que normalmente circundam o centro ativo. Nesse sentido, a lipase se adsorve na superfície hidrofóbica e seu sítio ativo fica disponível para o meio, estando a lipase na forma aberta, também conhecida como interfacialmente ativada (Figura 8).⁴⁰

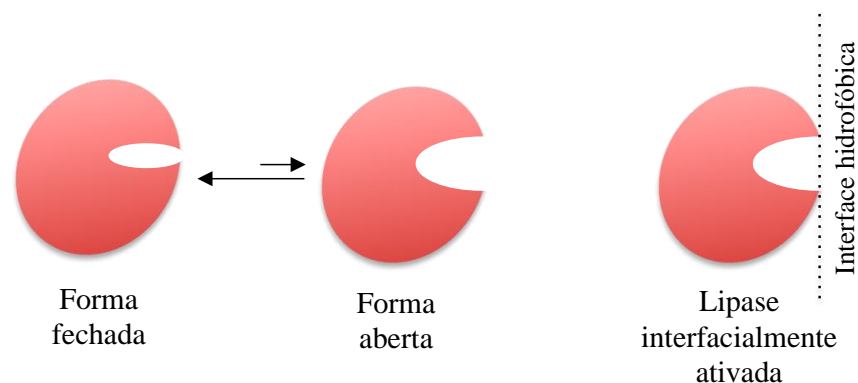


Figura 8. Ilustração do equilíbrio entre as formas aberta e fechada da lipase, bem como de sua ativação em uma interface hidrofóbica. Adaptado das referências ^{40,147}.

Embora as lipases catalisem, de um modo geral, as mesmas reações, sua estrutura proteica difere em função do micro-organismo que as produz. A lipase do microorganismo *Thermomyces lanuginosus* (TLL) é uma das lipases mais empregadas na pesquisa em química fina e hidrólise de ácidos graxos, e na indústria para a produção de biodiesel, sendo também conhecida por constituir o detergente comercial Lipolase®. A TLL é constituída por uma única cadeia de 269 aminoácidos, massa molar de 31700 g·mol⁻¹ e ponto isoelétrico de 4,4. Sua estrutura foi resolvida com formato esférico e tamanho de 3,5 × 4,5 × 5,0 nm,⁴⁰ o que a torna uma excelente candidata para imobilização em suportes com poros na faixa dos mesoporosos (2 a 50 nm). A TLL possui *lid* móvel na forma de alfa-hélice com 86 a 93 aminoácidos cobrindo o sítio ativo.⁴⁰

A enzima TLL é ativa em uma ampla faixa de temperatura, mantendo sua atividade mesmo a 55-60 °C.⁴⁴ Embora estável, possui a tendência de formar agregados, afrontando seus sítios ativos abertos, mesmo quando imobilizadas.¹⁵¹ Apesar de a imobilização covalente multipontual ser uma das alternativas para evitar desativações da TLL, a mesma é de difícil realização. A imobilização covalente normalmente se dá com os grupos amino primários da TLL e a mesma apresenta apenas sete lisinas que podem reagir.⁴⁰ Protocolos de aminação para aumentar o número de grupos funcionais úteis para imobilização da TLL já foram reportados com sucesso na literatura.¹⁵²

Entretanto, existem outras alternativas para a imobilização eficiente da TLL. A principal delas é a adsorção da enzima em um suporte hidrofóbico via ativação interfacial.⁴⁰⁻⁴² Nesse caso, como a enzima possui a região do sítio ativo com

características hidrofóbicas, a TLL se imobiliza em sua conformação aberta (Figura 9) e exibe hiperatividade com substratos hidrofóbicos.^{40,147}

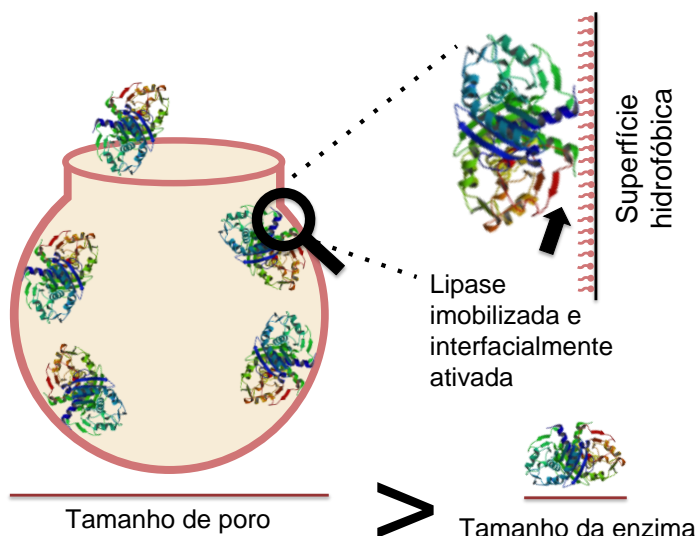


Figura 9. Ilustração da imobilização da lipase em um suporte poroso hidrofóbico.

3.4.2 A importância de compatibilizar suporte e enzima

Desde o “boom” de materiais porosos no início da década de 1990, iniciando com a arquitetura de materiais como zeólitas microporosas e posteriormente com a síntese de materiais mesoporosos da série dos MCM e SBA, há uma enorme expectativa do emprego desses materiais em imobilização de proteínas, enzimas, peptídeos e outras biomacromoléculas em função da possibilidade de reuso e aumento de estabilidade ao imobilizá-las dentro dos poros das matrizes.^{20,147} Entretanto, nem todas as expectativas se concretizaram visto que vários fatores devem ser levados em consideração ao imobilizar essas estruturas, como tamanho relativo dos mesoporos e da espécie, área superficial e distribuição de tamanho de poro, volume dos mesoporos, tamanho de partícula, força iônica, ponto isoelétrico e química de superfície de ambos suporte e bioespécie.²⁰ A Figura 10 apresenta o fluxograma de um processo ideal de preparo de um biocatalisador.

O primeiro fator a ser considerado é puramente físico: a compatibilidade de tamanhos entre espécie e poro. Se a proteína é maior que a abertura do poro, a mesma irá se adsorver apenas na área disponível fora dos mesoporos,²⁰ inclusive em

multicamadas, o que desperdiça justamente as duas principais vantagens de empregar materiais porosos: alta área superficial e abrigo para a proteína.

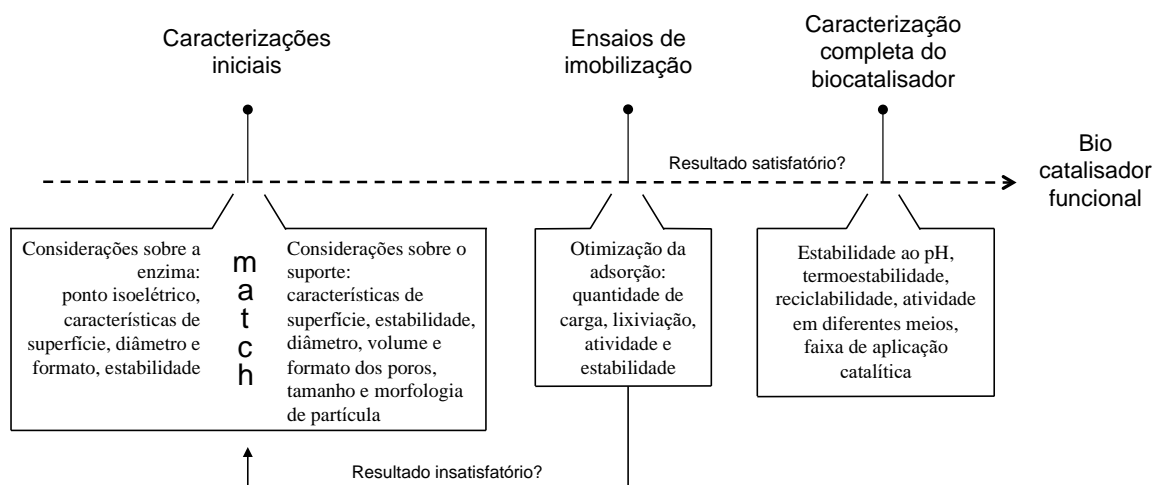


Figura 10. Fluxograma das etapas para o desenvolvimento de um biocatalisador. Adaptado da referência ²⁰.

É importante pensar além do diâmetro do poro, também no seu formato. Mesmo em materiais de poros cilíndricos, há dificuldades na difusão das espécies ao longo dos canais.¹⁵³ Em poros do tipo tinteiro, há a presença de um gargalo²² e seu tamanho não corresponde ao diâmetro observado por técnicas de análise textural como adsorção de N₂, que informa a distribuição de diâmetros máximos dos poros. Caldas *et al.* avaliaram a influência do tamanho de poros do tipo tinteiro na imobilização da enzima glicose oxidase (~ 7 nm de diâmetro) e estabeleceram a seguinte ordem em relação à quantidade de enzima imobilizada e consequente atividade: 7 nm < 14 nm < 21 nm (Figura 11).¹⁹ Nesse sentido, a presença de um gargalo é crítica ao estabelecer o tamanho adequado para imobilização e atividade satisfatórios.

Materiais à base de sílica combinam a boa estabilidade térmica e mecânica com as principais características texturais (controle de porosidade e área superficial) necessárias para atuarem como suportes para enzimas. Além disso, apresentam a vantagem de serem passíveis de funcionalização e ativação que facilitam a fixação da enzima no suporte. A química de superfície do suporte deve apresentar um micro-ambiente ótimo que favoreça as propriedades catalíticas da enzima.¹⁶ Desenhar a superfície é um dos desafios da química de materiais no desenvolvimento de novos suportes para enzimas. De uma forma geral, a hidrofobicidade dos suportes deve ser minimizada para evitar adsorção de proteínas indesejadas ou mesmo a desnaturação das

enzimas.¹⁶ Entretanto, em casos específicos, a hidrofobicidade é um ponto a favor, como é o caso da enzima lipase.

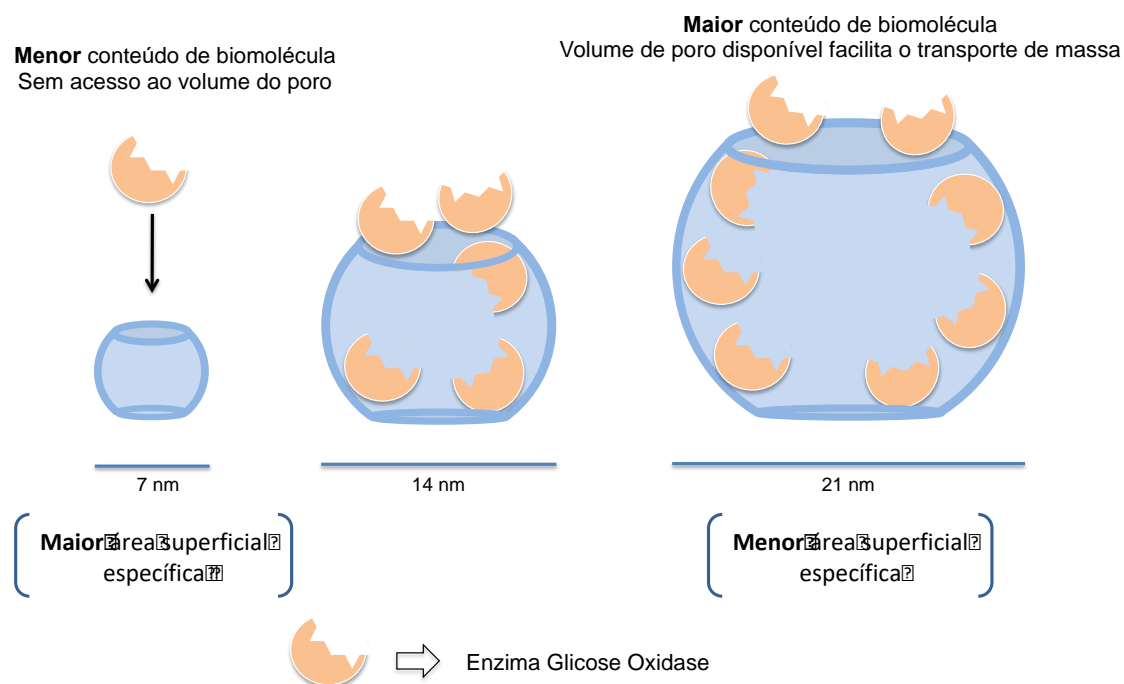


Figura 11. Ilustração da influência do tamanho de poro na quantidade de enzima imobilizada. Adaptado da referência ¹⁹.

A modificação de sílicas com grupos hidrofóbicos pode ser facilmente realizada ao funcionalizar os grupos silanol disponíveis na superfície com espécies hidrofóbicas. Nesse sentido, diversos organossilanos de cadeia longa podem ser utilizados. O octiltrióxissilano foi empregado por Blanco *et al.* com sucesso ao imobilizar *Candida antarctica* lipase B em uma monocamada, sem formação de agregados e com boa atividade e estabilidade operacional.⁴¹ Além de organossilanos, silsesquioxanos iônicos com contra-íon de cadeia longa também já foram reportados como modificadores de óxidos inorgânicos na obtenção de superfícies hidrofóbicas.³⁷ Silsesquioxanos iônicos são materiais híbridos à base de sílica com cargas na sua fração orgânica e pela capacidade de troca iônica^{34,35} podem ser obtidos com diversos contra-íons, sendo versáteis para inserir espécies funcionais na superfície da sílica.

3.4.3 Suportes magnéticos: praticidade e reciclabilidade

A enzima lipase, uma vez que catalisa reações de interesse industrial como a produção de biodiesel, é muito estudada sob suportes que facilitem seu manuseio. Nesse sentido, suportes magnéticos são facilmente manipuláveis através de um campo magnético externo, evitando etapas laboriosas de separação, tais como filtração, decantação e centrifugação.

Diversos trabalhos já reportaram o emprego de suportes à base de magnetita na imobilização de lipases. Iuliano e Sarno imobilizaram TLL em partículas de magnetita funcionalizadas com nanopartículas de ouro e alcançaram 70% de atividade para produção de biodiesel mesmo após o quinto ciclo, destacando a fácil separação e pronto reuso do material nos ciclos seguintes.⁴⁴ Onoja *et al.* alcançaram dezessete ciclos mantendo até 50% de conversão na síntese de butil butirato empregando *Candida rugosa* lipase imobilizada em nanopartículas de magnetita recobertas com sílica.⁴⁵ Ferreira, Lassalle e Nicolás imobilizaram a *Candida antarctica* lipase B em nanopartículas de magnetita e obtiveram resultados semelhantes, mantendo 60% da atividade inicial no oitavo ciclo. Nesse trabalho os autores ainda destacaram a competitividade do suporte à base de magnetita com biocatalisadores comercialmente disponíveis como o Novozym® 435, que pode ser degradado em etanol e contaminar o meio reacional.¹⁰

3.5 Aplicação de suportes magnéticos para nanoestruturas com impacto biológico

3.5.1 Nanotecnologia em sistemas biológicos

A nanotecnologia é um dos principais avanços do século XXI, quando conscientemente passou-se a manipular a estrutura dos materiais na escala nanométrica ou mesmo atômica.¹⁵⁴ No cenário atual, a nanotecnologia é intrínseca ao cotidiano humano e os nanomateriais têm sido extensivamente investigados em diversas áreas, da medicina à eletrônica. Na medicina, os nanomateriais emergem no carreamento de fármacos,^{6,155,156} em terapia,^{82,90,156,157} como agentes antibacterianos^{52,57,74,158} e antivirais,^{159,160} em medicina diagnóstica^{5,161} e regeneração de tecidos.^{154,162,163} As

expectativas, entretanto, sugerem inúmeras outras potencialidades que ainda devem despontar com o refino dos conhecimentos da área.

Nanomateriais apresentam algumas características singulares que lhes conferem esse comportamento. Conforme o tamanho da partícula diminui, o número de átomos localizados na superfície em relação ao número total de átomos na partícula aumenta consideravelmente, o que aumenta também a relação área/volume e a área superficial desses nanomateriais quando comparados aos respectivos materiais na forma *bulk*.¹⁵⁴ Nesse sentido, além de diferenças nas propriedades mecânicas e físico-químicas, as nanopartículas ou *nanoclusters* são quimicamente muito mais reativos quando comparados com a mesma quantidade de material contendo partículas maiores.^{55,154} Além disso, efeitos de confinamento quântico (confinamento do movimento dos elétrons na estrutura) em função da redução de tamanho ao nível nanométrico também podem ser observados. Quando o tamanho da partícula é menor que o comprimento de onda de *de Broglie*, elétrons e lacunas estão espacialmente confinados e promovem o surgimento de dipolos elétricos; isso, por sua vez, dá origem a níveis discretos de energia nos materiais, refletindo-se em fenômenos como oxidação, redução, propriedades catalíticas, ressonância de plasmon de superfície,¹⁵⁴ dentre outros observados em nanopartículas metálicas e de semi-condutores.

3.5.2 Propriedades antimicrobianas de nanopartículas

Uma das principais preocupações na área de saúde humana é o aumento da resistência de bactérias à drogas e agentes antimicrobianos convencionais, a qual vem acontecendo cada vez em menores períodos de tempo e competem duramente com o lançamento de novos antibióticos no mercado.^{164,165} A *Escherichia coli*, por exemplo, é uma *Enterobacteriaceae*, residente inócua do trato gastrointestinal, mas frequentemente relacionada com infecções¹⁶⁶ em humanos adquiridas por condições sanitárias precárias, surtos alimentícios e águas contaminadas.^{167,168} Uma vez que a bactéria *E. coli* faz parte da microbiota endógena, é constantemente atingida pelo uso recorrente de antibióticos, o que promove a evolução dos micro-organismos pelo desenvolvimento de genes de resistência que se propagam entre as células microbianas.^{169,170}

Além do desenvolvimento de agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções bacterianas, o controle microbiológico em alimentos, água e efluentes é

importante para a manutenção de condições salubres à população, inibindo ou até mesmo suprimindo o crescimento de micro-organismos patogênicos.^{171,172} Nesse âmbito, nanoestruturas são amplamente estudadas como agentes antimicrobianos em embalagens alimentícias¹⁷³ e em processos de tratamento de água.¹⁷¹

Nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos são conhecidos agentes antibióticos e, além de apresentarem forte atividade antibacteriana contra um amplo espectro de bactérias, também possuem o potencial de reduzir ou mesmo impedir a evolução de cepas resistentes.^{52,164,165} De um modo geral, o tamanho diminuto das nanopartículas favorece tanto sua inserção no biofilme – que torna os micro-organismos muito mais resistentes aos antibióticos comuns – quanto na travessia da própria membrana celular da bactéria. O formato e consequente reatividade das faces também influencia a interação da partícula com a membrana celular da bactéria,¹⁷⁴ modulando o grau de dano às células.¹⁶⁴

3.5.3 Mecanismos de ação antimicrobiana de nanopartículas

As nanoestruturas mais estabelecidas como agentes antimicrobianos são nanopartículas ou *nanoclusters* de Ag,^{53,175,176} Au,^{55,173,176} ZnO,^{177–179} AgO¹⁸⁰ e TiO₂.^{181,182} De um modo geral, quando em contato com as células das bactérias, as nanopartículas alteram sua atividade metabólica. Após interagir com a membrana celular e cruzá-la, as nanopartículas desvirtuam os componentes básicos das células, como DNA, lisossomos, ribossomos e enzimas, causando estresse oxidativo, mudanças na permeabilidade da membrana celular, desbalanço de eletrólitos, desativação de proteínas e inibição de enzimas, além de mudanças na expressão de alguns genes.^{56,164}

Dentre as nanopartículas mais empregadas como agentes antimicrobianos, três mecanismos são frequentemente propostos como principais na atividade bactericida. São eles: estresse oxidativo, liberação de íons metálicos e demais mecanismos não-oxidativos.¹⁶⁴ O estresse oxidativo é caracterizado pela produção de moléculas e intermediários com elevado e positivo potencial de redução, normalmente espécies reativas de oxigênio (ROS) do inglês *Reactive Oxygen Species*). Os quatro tipos de ROS são radicais superóxidos (O₂⁻), radicais hidroxilas (•OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio singlete (O₂). Estes, quando produzidos em excesso, levam ao estresse oxidativo da célula e à degradação dos seus componentes. As principais consequências reportadas são alterações na permeabilidade da membrana celular e no

aumento da expressão de genes de proteínas oxidativas, que leva à apoptose da célula.^{164,177,183} Algumas nanopartículas que comumente apresentam estresse oxidativo como mecanismo bactericida são TiO_2 ,⁵⁶ ZnO ¹⁷⁷ e Ag ¹⁸⁰ e a via fotocatalítica de produção é comum.¹⁷¹

O mecanismo de liberação de íons envolve a liberação de cátions metálicos das nanopartículas de óxidos metálicos. Estes, em função de seu caráter ácido de Lewis, interagem com grupos funcionais das proteínas e ácidos nucleicos, como mercapto ($-\text{SH}$), amino ($-\text{NH}_2$) e ácidos carboxílicos ($-\text{COOH}$), interferindo na atividade de enzimas, alterando a estrutura da célula e os processos fisiológicos da mesma, levando, por fim, à inibição do micro-organismo.¹⁶⁴ Nanopartículas de Ag e AgO comumente apresentam esse mecanismo associado com o estresse oxidativo.¹⁸⁰

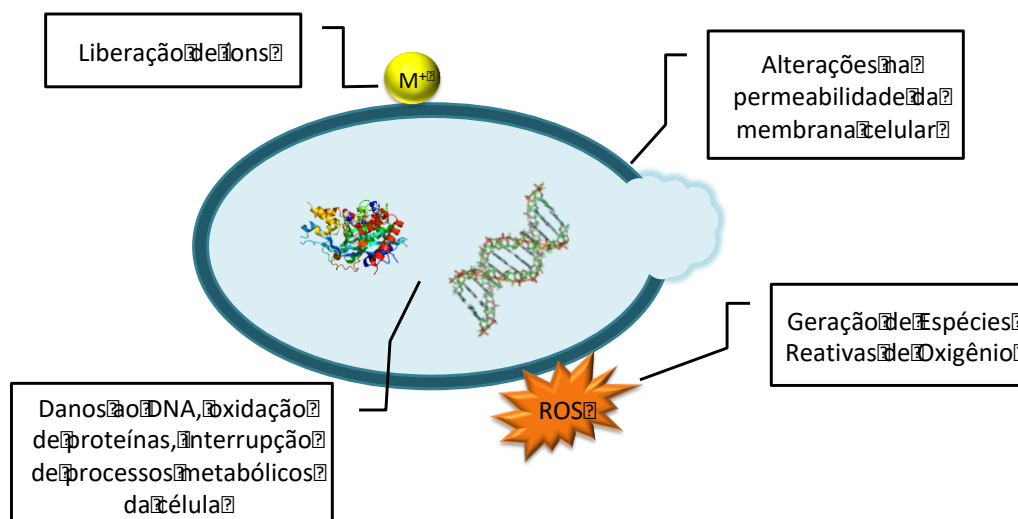


Figura 12. Mecanismos mais reportados de atividade antimicrobiana de nanopartículas. Adaptado das referências ^{164,171,183}.

3.5.4 Nanopartículas de ouro: um agente antimicrobiano conveniente

Diferentemente do ouro na sua forma *bulk* – que está dentre os metais mais nobres e, portanto, pouco reativos – nanopartículas de ouro apresentam propriedades diferenciadas para aplicação em nanomedicina, como elevada razão área/volume, rotas simples de síntese e modificação de superfície, excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade à células humanas mesmo em concentrações relativamente altas.^{52,55–57}

Embora nanopartículas de prata foram, por décadas, as mais empregadas como agentes antimicrobianos para um amplo espectro de bactérias,^{53,175,176} as mesmas não

apresentam bons resultados de biocompatibilidade com células humanas, o que levanta questionamentos sobre seu uso em ensaios clínicos.⁵⁵ Nesse sentido, como o seu mecanismo de ação envolve a liberação de íons Ag^+ – que são tóxicos tanto para bactérias quanto para células humanas – as nanopartículas de ouro se diferenciam por não se dissociarem-se com facilidade e apresentarem, portanto, menor citotoxicidade e maior biocompatibilidade.⁵⁷ Além disso, é estabelecido que a produção de ROS não é o mecanismo predominante de ação das nanopartículas de ouro,^{57,58} o que converge para sua boa biocompatibilidade em células humanas hospedeiras mesmo como agente bactericida. Já foram reportados os mecanismos de alteração do potencial da parede celular, inibição da enzima ATP sintase diminuindo o metabolismo da bactéria, e ligação ao DNA inibindo processos de transcrição e colapsando todo o processo biológico.⁵⁶⁻⁵⁸ Embora existam trabalhos que apresentam a boa atividade antimicrobiana de nanopartículas de ouro com micro-organismos variados, bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁹ e a *Escherichia coli*^{60,61}, são frequentemente reportadas.

3.5.5 Heterogeneização de sistemas antimicrobianos: reuso

Quando se avalia o uso de nanomateriais em sistemas de desinfecção para controle microbiológico de águas e efluentes – especialmente no caso de nanomateriais que tem seu mecanismo de ação predominantemente por contato e não apenas por internalização – a ideia de suportar os nanomateriais em sólidos que possam ser recuperados e reutilizados torna-se atrativa. Nesse sentido, suportes magnéticos provém a fácil e rápida separação de meios reacionais, bem como o fácil manuseio entre ciclos de atividade.

Lazic *et al.* suportaram nanopartículas de prata sobre nanopartículas de magnetita funcionalizadas com grupos amino. O sistema apresentou inativação das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e pode ser magneticamente recuperado e utilizado por até cinco ciclos, mantendo sua performance bactericida.¹⁸⁴ Yong *et al.* também empregaram nanopartículas de prata em um sistema contendo magnetita recoberta com copolímero quitosana/ácido poliacrílico e modificada com etilenodiamina. A resposta biocida contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi inalterada mesmo após dez ciclos.¹⁵⁸ Nanopartículas de ouro

também foram suportadas em magnetita recoberta com polietileno glicol com excelente atividade contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.⁹¹

4. Procedimento experimental

Para realizar a síntese dos materiais porosos à base de sílica contendo magnetita, três procedimentos distintos foram empregados, dando origem aos capítulos I, II e III dessa tese. No entanto, a síntese das partículas de magnetita e seu recobrimento com um *shell* de sílica buscando aumentar sua estabilidade operacional foram comuns a todos os trabalhos. Os procedimentos de síntese e técnicas de caracterização foram, portanto, classificados como “compartilhados” ou agrupados de acordo com sua pertinência a cada trabalho. Todos os procedimentos de síntese foram realizados no Laboratório de Sólidos e Superfícies da UFRGS e todas as etapas de secagem à vácuo empregaram bomba de vácuo Edwards® E2M5.

4.1 Metodologias compartilhadas

4.1.1 Síntese de partículas de magnetita pelo método solvotérmico

Para a síntese de magnetitas utilizou-se como precursor o sal cloreto férrico hexahidratado (4 mmol, 2,16 g) dissolvido em etilenoglicol (100 mL), o qual é empregado como solvente devido a seu alto ponto de ebulição e caráter redutor. Adicionou-se acetato de sódio trihidratado (40 mmol, 10,88 g), e a solução, antes amarelada e límpida, assumiu a coloração marrom e turva. Após 1 h sob agitação magnética, a mistura foi transferida para uma autoclave de aço inoxidável com copo interno de Teflon. O sistema foi aquecido a 180 °C por 10 h. Após resfriado, o precipitado preto foi recuperado com um ímã, e lavado extensivamente com etanol para remover quaisquer impurezas. A esse precipitado nomeou-se Fe₃O₄. O mesmo foi seco sob vácuo, a temperatura ambiente, até evaporação do etanol.

4.1.2 Recobrimento das partículas de magnetita com sílica pelo método de Stöber

Para recobrimento das partículas com sílica utilizou-se uma adaptação do método de Stöber,¹⁰⁵ onde dispersou-se, em banho de ultrassom, 300 mg de Fe₃O₄ em uma solução composta por 90 mL de etanol, 22,5 mL de água destilada e 2,7 mL de hidróxido de amônia concentrado (25%). Após 1 h, adicionou-se o precursor de sílica,

ortossilicato de tetraetila (TEOS, 3 mmol, 0,670 mL). O banho ultrassônico foi mantido por mais 2 h. Após, com auxílio de um ímã, recuperou-se o material denominado $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, o qual foi lavado com etanol, água, e novamente etanol, sendo então seco sob vácuo a temperatura ambiente.

4.2 Metodologias específicas – Capítulo I

4.2.1 Obtenção das esferas ocas de sílica

As esferas ocas de sílica foram obtidas pela dissolução de algumas partículas de magnetita do material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ utilizando-se ácido clorídrico. Para isso, três porções de 400 mg do material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ foram imersas, individualmente, em 20 mL de uma solução de HCl $1,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, permanecendo sob agitação com uma barra magnética de vidro por 10, 20 e 30 h. Os materiais finais, denominados MHS-10, MHS-20 e MHS-30, foram recuperados com um ímã, lavados com água destilada até atingir pH neutro, então enxaguados com etanol e secos sob vácuo.

4.3 Metodologias específicas – Capítulo II

4.3.1 Síntese do xerogel de sílica contendo partículas magnéticas pelo método sol-gel

O xerogel de sílica magnético foi sintetizado pelo método sol-gel na presença de partículas de magnetita, com base em uma proporção em massa esperada no material final de 35% de sílica e 65% de partículas magnéticas. Como a catálise escolhida para o método sol-gel ocorre em meio ácido e a magnetita é instável nesse meio, as partículas de magnetita foram previamente recobertas com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$). Primeiramente, 1,5 g do material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ foram dispersos em 7 mL de etanol absoluto, com banho de ultrassom por 30 minutos. A seguir, sob agitação com barra magnética de vidro, foram adicionados 3,0 mL de TEOS. Transcorridos 30 minutos, adicionou-se o catalisador, composto por 600 μL de uma solução de HF/HCl $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 1400 μL de água destilada. Após ocorrida a gelificação, o gel foi mantido sob condições ambientes por 7 dias para evaporação do solvente. O xerogel magnético obtido, denominado MX, foi triturado, lavado com água destilada e recuperado com um ímã para remover

resíduos do catalisador, então lavado com etanol e seco sob vácuo a temperatura ambiente.

4.3.2 *Modificação do xerogel magnético com silsesquioxano iônico*

O silsesquioxano iônico contendo o grupo catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano e contra íon cloreto (Db) foi incorporado ao material MX através de reação de *grafting*. O volume de 25 mL de uma solução de Db ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi adicionado a 1,0 g do material MX, previamente seco sob vácuo a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. O sistema permaneceu sob agitação mecânica por 6 h. Então, o material foi separado com ímã e o sobrenadante removido. O xerogel magnético hidrofílico, denominado HFL-MX, foi seco sob vácuo por 2 h a temperatura ambiente, então lavado com água destilada, etanol, e seco novamente por 2 h.

4.3.3 *Incorporação do ânion estearato no xerogel magnético por troca iônica*

A reação de troca iônica dos íons cloreto presentes no material HFL-MX pelos íons estearato foi realizada dissolvendo 1,22 g de estearato de sódio em 35 mL de água destilada sob aquecimento a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ e sob agitação mecânica. A seguir, adicionou-se 0,6 g do material HFL-MX. O sistema permaneceu sob agitação e aquecimento a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 h, e posteriormente o material foi separado com um ímã e lavado exaustivamente com água aquecida a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. O xerogel magnético hidrofóbico foi seco sob vácuo a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h e denominado HFB-MX.

4.3.4 *Imobilização da enzima lipase nos materiais*

A enzima utilizada foi a *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL) e procedeu-se diluições com tampão fosfato ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,5, fator de diluição = 125) para não ultrapassar o teto de absorvância da curva de calibração nas medidas de atividade enzimática. Para a imobilização da enzima nos suportes, utilizou-se 20 mg dos materiais MX, HFL-MX e HFB-MX, acondicionados em frascos de 2,0 mL. Adicionou-se, então, alíquotas de 1200 μL das suspensões diluída de enzima, com atividade de $0,079 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os frascos foram mantidos por 12 h sob agitação, em temperatura ambiente. Após, os materiais foram separados com ímã e lavados três vezes com tampão fosfato. Os

sobrenadantes e lavagens foram coletados para posterior medida de atividade enzimática (descrição no item 4.7.2). Os ensaios de imobilização foram realizados em triplicata.

4.4 Metodologias específicas – Capítulo III

4.4.1 Síntese do xerogel de sílica/titânia contendo partículas magnéticas pelo método sol-gel

Para a síntese do xerogel magnético de sílica/titânia utilizou-se o método sol-gel a partir da heterocondensação dos precursores de sílica (TEOS) e titânia (isopropóxido de titânio) na presença de partículas de magnetita recobertas com sílica.¹⁷ As quantidades empregadas na síntese se basearam na proporção esperada de 50:35:15 de partículas magnéticas:sílica:titânia, em massa.

Em um béquer de 50 mL, TEOS (2,6 mL) foi pré-hidrolisado em etanol (2,5 mL), água destilada (310 µL) e ácido clorídrico concentrado (90 µL) por 1 h. Após, adicionou-se isopropóxido de titânio (1,1 mL) acompanhado da adição de 3,5 mL de etanol. Essa solução dos precursores foi adicionada a 1,0 g do material Fe₃O₄@SiO₂ previamente disperso em mínima quantidade de etanol. Para acelerar as reações de gelificação dos precursores, adicionou-se uma mistura contendo 625 µL de ácido clorídrico e 625 µL de ácido fluorídrico. A reação de gelificação ocorreu quase que instantaneamente e o gel obtido foi deixado para evaporação do solvente em condições ambientes por 10 dias. Após, o xerogel obtido foi triturado, lavado com água destilada para remover resíduos da catálise ácida, e seco sob vácuo por 2 h a temperatura ambiente. O xerogel de sílica/titânia com partículas magnéticas obtido foi denominado SiO₂/TiO₂-MGP.

4.4.2 Síntese da dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana

A dispersão de nanopartículas de ouro foi preparada utilizando quitosana como agente estabilizante (Ch-AuNP). Para isso, 75 mg de quitosana foram dissolvidos em uma solução de 1,0 mL de ácido fórmico e 9,0 mL de água destilada. Após, foram adicionados 2,0 mL de ácido cloroáurico (HAuCl₄ 1,5×10⁻² mol·L⁻¹), seguidos de 5,0

mL de uma solução de NaBH_4 $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A mistura mudou sua coloração rapidamente de amarelo para vermelho intenso.

Para promover a adsorção das nanopartículas de ouro no xerogel magnético, a dispersão teve seu pH aumentado até 5,2 pela adição de NaOH $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, monitorada em pHmetro. Desta forma, aumenta-se a proporção de grupos amino desprotonados da quitosana que podem interagir com a superfície da sílica/titânia.^{47,48} A concentração final de ouro na dispersão foi de $[\text{Au}] = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.4.3 Incorporação das nanopartículas de ouro no xerogel magnético de sílica/titânia

Para a adsorção das Ch-AuNP, adicionou-se o volume de 25,0 mL da dispersão a 1,0 g do material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$. O sólido foi mantido imerso, sob leve agitação, até a completa descoloração do sobrenadante (aproximadamente 48 h), monitorada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.

4.5 Técnicas de caracterização compartilhadas

4.5.1 Microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (TEM)

As imagens de MEV foram adquiridas no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS e na Central de Microscopia e Microanálises da PUCRS utilizando o microscópio eletrônico Zeiss modelo EVO MA10 e os microscópios eletrônicos com emissão de campo (MEV-FEG) Zeiss modelo Auriga e FEI modelo Inspect F50. A análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizada com o detector Oxford Instruments modelo X-act. Os materiais foram dispersos em isopropanol, e duas gotas da dispersão foram adicionadas à uma lâmina de silício. A lâmina foi colada em uma fita condutora dupla-face em um suporte de alumínio. As imagens foram obtidas utilizando elétrons secundários ou retroespalhados, conforme indicado em cada figura.

As imagens de TEM foram adquiridas no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS empregando os microscópios JEOL JEM-1200 EXII e JEOL JEM 2010, os quais foram operados nas tensões de aceleração de 80 kV e 200 kV, respectivamente. As amostras foram dispersas em isopropanol e duas gotas da dispersão foram

adicionadas a uma *grid* de cobre recoberta com carbono. As *grids* contendo amostras magnéticas foram subsequentemente recobertas com um filme fino de carbono.

O tratamento de imagens para determinação do diâmetro médio das partículas foi realizado utilizando o software *Quantikov Image Analyzer*.

4.5.2 *Difração de raios X (DRX)*

A análise de difração de raios X foi realizada com os materiais na forma de pó, no Instituto de Física da UFRGS, utilizando o difratômetro Siemens modelo D500 e empregando como fonte $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154056$ nm) a uma voltagem de 40 kV com uma corrente de 17,5 mA.

4.5.3 *Medidas de magnetismo*

As propriedades magnéticas dos materiais foram estudadas utilizando o magnetômetro de amostra vibrante (VSM) EZ9MicroSense, no Laboratório de Magnetismo do Instituto de Física da UFRGS. Os dados de magnetização foram adquiridos em função do campo aplicado ($M \times H$), com varredura de campo entre -15 e $+15$ kOe, a temperatura ambiente.

4.5.4 *Análise termogravimétrica (TGA)*

As análises termogravimétricas dos materiais foram realizadas no Laboratório de Altas Pressões e Materiais Avançados do Instituto de Física da UFRGS, utilizando o equipamento Shimadzu modelo TGA-50, sob fluxo de argônio e com taxa de aquecimento de 20 °C \cdot min $^{-1}$, partindo da temperatura ambiente até 900 °C.

4.5.5 *Espectroscopia de absorção na região do UV-Visível*

Os espectros em solução foram obtidos utilizando os espectrofotômetros Shimadzu modelo UV-1601PC e Varian modelo CARY 50 Conc, na janela espectral de 200 a 800 nm.

4.5.6 Isotermas de adsorção e dessorção de N₂

A aquisição das isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foi conduzida na temperatura do N₂ líquido utilizando o equipamento Micromeritics modelo Tristar Krypton 3020. As amostras foram previamente degasadas a 60 °C sob vácuo por 20 h. A área superficial específica foi obtida pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller), e as distribuições de tamanho de poros foram determinadas pelo método BJH (Barret, Joyner e Halenda).^{185,186}

4.6 Técnicas de caracterização específicas – Capítulo I

4.6.1 Caracterização fotofísica

A acessibilidade das cavidades das esferas ocas foi investigada em colaboração com o Grupo de Pesquisa em Fotoquímica Orgânica Aplicada do Instituto de Química da UFRGS, utilizando tolueno (grau espectroscópico) como molécula-sonda.¹⁸⁷ Foram preparadas dispersões dos materiais Fe₃O₄@SiO₂ e MHS-30 em tolueno, de concentração 100 mg·L⁻¹ e adquiridos espectros de emissão de fluorescência partindo de 100 até 4 mg·L⁻¹. Esse mesmo experimento foi realizado utilizando etanol como solvente. Os espectros foram adquiridos utilizando o espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF5301PC a temperatura ambiente (25 °C).

4.7 Técnicas de caracterização específicas – Capítulo II

4.7.1 Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas no Laboratório de Laser e Óptica do Instituto de Física da UFRGS, através do método *Static Sessile Drop*, que consiste em capturar fotografias em tempo real da gota d'água sendo depositada sobre a superfície em estudo. O equipamento utilizado foi manufaturado no próprio laboratório. Os materiais MX, HFL-MX e HFB-MX foram submetidos à pressão de aproximadamente 3 ton/cm² para a confecção de pastilhas de 1 cm de diâmetro, as quais foram usadas na análise. Utilizou-se o software *Surftens* para determinar o ângulo de contato entre a amostra e a gota. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

4.7.2 Medidas de atividade enzimática da enzima lipase

As medidas de atividade enzimática foram realizadas no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, utilizando a reação de hidrólise de ácidos graxos com o substrato *p*-nitrofenilpalmitato. A liberação de *p*-nitrofenol é medida espectrofotometricamente pelo aumento na absorbância no comprimento de onda de 410 nm.^{188,189}

Para o preparo da solução contendo o substrato, 15 mg de *p*-nitrofenilpalmitato foram dissolvidos em 5,0 mL de isopropanol sob leve aquecimento (40 °C) em um frasco vedado. Uma alíquota de 1,0 mL dessa solução foi lentamente gotejada, sob agitação constante, a 9,0 mL da seguinte solução: tampão fosfato (50 mmol·L⁻¹ pH 7,5) + 40 mg de Triton X100.

Para os ensaios de atividade, 20 mg de suporte contendo a enzima imobilizada foram acondicionados em frascos, sendo então oferecido o volume de 5400 µL da solução contendo o substrato *p*-nitrofenilpalmitato. O sistema foi homogeneizado com leve agitação, e após 5 minutos o material foi rapidamente separado com ímã, realizando-se a leitura de absorbância do sobrenadante.

A enzima livre, bem como os sobrenadantes e as lavagens provenientes dos ensaios de imobilização também foram submetidos à medidas de atividade enzimática de acordo com o mesmo procedimento, substituindo-se a presença do suporte por alíquotas de 200 µL e o volume oferecido por 1800 µL da solução contendo o substrato *p*-nitrofenilpalmitato. O volume final da medida (2,0 mL) foi levado em consideração nos cálculos de atividade enzimática, uma vez que nas medidas com a enzima suportada o volume final é de 5,4 mL. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, à temperatura de 25 °C.

Os resultados de absorbância foram convertidos em concentração de *p*-nitrofenol através de uma curva de calibração na faixa de 0 a 0,09 µmol·mL⁻¹ e define-se como 1 unidade de atividade enzimática (1 U) a quantidade de enzima que converte 1 µmol de *p*-nitrofenilpalmitato em *p*-nitrofenol em 1 minuto, sob as condições padrões de ensaio descritas acima. As equações utilizadas estão descritas como Equação 1 e 2.

$$A_{enzimática}(U) = \frac{[PNP] \times v_{ensaio}}{t} \quad \text{Equação 1}$$

$$A_{enzimática}(U/mL) = \frac{[PNP] \times v_{ensaio}}{t \times v_{enzima}} \quad \text{Equação 2}$$

onde: $A_{enzimática}$ corresponde a atividade enzimática (em U) ou atividade enzimática relativa ao volume oferecido de enzima no ensaio (em $U \cdot mL^{-1}$); $[PNP]$ corresponde a concentração de *p*-nitrofenol calculada a partir da curva de calibração (em $\mu mol \cdot mL^{-1}$); v_{ensaio} corresponde ao volume final do ensaio (em mL); t corresponde ao tempo do ensaio (em minutos) e v_{enzima} corresponde ao volume de enzima livre ou do sobrenadante adicionado no ensaio, ou volume de enzima oferecido ao suporte (em mL).

O rendimento de imobilização¹⁴⁶ foi calculado segundo a Equação 3.

$$Imobilização(\%) = \frac{A_{livre} - (A_{sobrenadante} + A_{lavagens})}{A_{livre}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

onde: A_{livre} corresponde a atividade da enzima livre (oferecida ao suporte), $A_{sobrenadante}$ corresponde a atividade da enzima que resta no sobrenadante e $A_{lavagens}$ corresponde a atividade da enzima nas lavagens, relativas ao volume oferecido no ensaio (em $U \cdot mL^{-1}$).

O reciclo dos materiais contendo a enzima TLL foi avaliado frente à repetidos ciclos de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato, intercalados por dois enxágues com tampão PBS $0,05 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, pH 7,5 para remover excesso de *p*-nitrofenol.

4.8 Técnicas de caracterização específicas - Capítulo III

4.8.1 Medidas de atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos materiais foi avaliada no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, frente à bactéria *Escherichia coli* ATCC 8739. Para o preparo do inóculo, a cepa foi cultivada em caldo Infusão Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 18-24 h. A suspensão de bactérias foi diluída até atingir a densidade óptica ($OD_{630 \text{ nm}}$) de 0,5, correspondente a *c.a.* $10^8 \text{ UFC} \cdot mL^{-1}$. Utilizou-se o espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 Pro. A concentração de bactérias foi confirmada pela contagem das colônias em placas utilizando ágar BHI. Esta suspensão foi submetida a diluição com caldo BHI, a fim de obter uma população final de $10^4 \text{ UFC} \cdot mL^{-1}$, e para cada ensaio, 1,0 mL foi adicionado a 20 mg dos materiais testados. Os frascos foram incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h em uma incubadora B.O.D., equipada com agitação orbital. As amostras foram, então, agitadas em vórtex por 30

segundos e os materiais foram separados com um ímã. O sobrenadante contendo as células de *E. coli* foi submetido a diluições em série com água peptonada 0,1%, e alíquotas de 20 µL das diluições foram inoculadas em placas com o ágar seletivo VRB.^{190,191} As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e as células viáveis de *E. coli* foram estimadas contando as colônias nas placas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

O reuso dos materiais foi avaliado submetendo a mesma amostra a testes sequenciais de atividade antibacteriana. Entre os ciclos, as amostras foram lavadas com água peptonada 0,1% para remover células adsorvidas, desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 15 minutos, e então lavadas exaustivamente com água peptonada.

Capítulo I

*Esferas ocas de sílica acopladas à magnetita:
microcontêineres magneto-responsivos*

5. Resultados e discussão

5.1 Esferas ocas de sílica acopladas à magnetita: microcontêineres magneto-responsivos

Neste trabalho, partículas de magnetita (Fe_3O_4) foram sintetizadas a partir do método solvotérmico, recobertas com um *shell* de sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) empregando o método de Stöber, e submetidas a um processo de lixiviação em ácido clorídrico. O processo de lixiviação foi realizado sob tempos diferentes (10 a 30 h), de forma a remover controladamente o conteúdo de magnetita, resultando em esferas ocas de sílica em diferentes frações, acopladas às partículas magnéticas remanescentes. Os materiais finais foram designados como série MHS (MHS-10, -20 e -30), onde os números especificam o tempo do tratamento ácido.

5.1.1 Características físicas e microestruturais dos materiais

Para avaliar as características morfológicas dos materiais foram adquiridas imagens de MEV das amostras Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e da série MHS, as quais estão apresentadas na Figura 13. As partículas de Fe_3O_4 apresentam formato esférico e podem ser visualizadas na Figura 13a com formato homogêneo e esférico. O diâmetro médio das partículas foi calculado considerando uma população de 1345 partículas, obtendo-se o valor de 603 nm, com desvio padrão de 96 nm. As partículas de Fe_3O_4 foram homogeneamente recobertas com um *shell* de sílica, conforme pode ser observado na Figura 13b. O *shell* de sílica pode ser identificado pela presença de uma camada opaca e acinzentada que contorna as partículas densas e brilhantes de Fe_3O_4 . Após o tratamento com ácido clorídrico para lixiviação de algumas partículas de Fe_3O_4 (série MHS), a presença de esferas ocas de sílica é claramente observada (Figuras 13c-f). As esferas ocas são observadas com menor brilho, o que é resultado do menor espalhamento de elétrons quando o feixe interage com partículas ocas de sílica (menos densas) em comparação com as esferas de sílica ocupadas com a Fe_3O_4 (mais densas, maior espalhamento de elétrons).

O aumento no tempo do tratamento ácido de 10 a 30 h levou a um visível aumento na proporção de esferas ocas para esferas preenchidas, uma vez que o material

MHS-10 apresenta maior quantidade de esferas de sílica preenchidas com Fe_3O_4 , enquanto o material MHS-30 é majoritariamente constituído por esferas ocas.

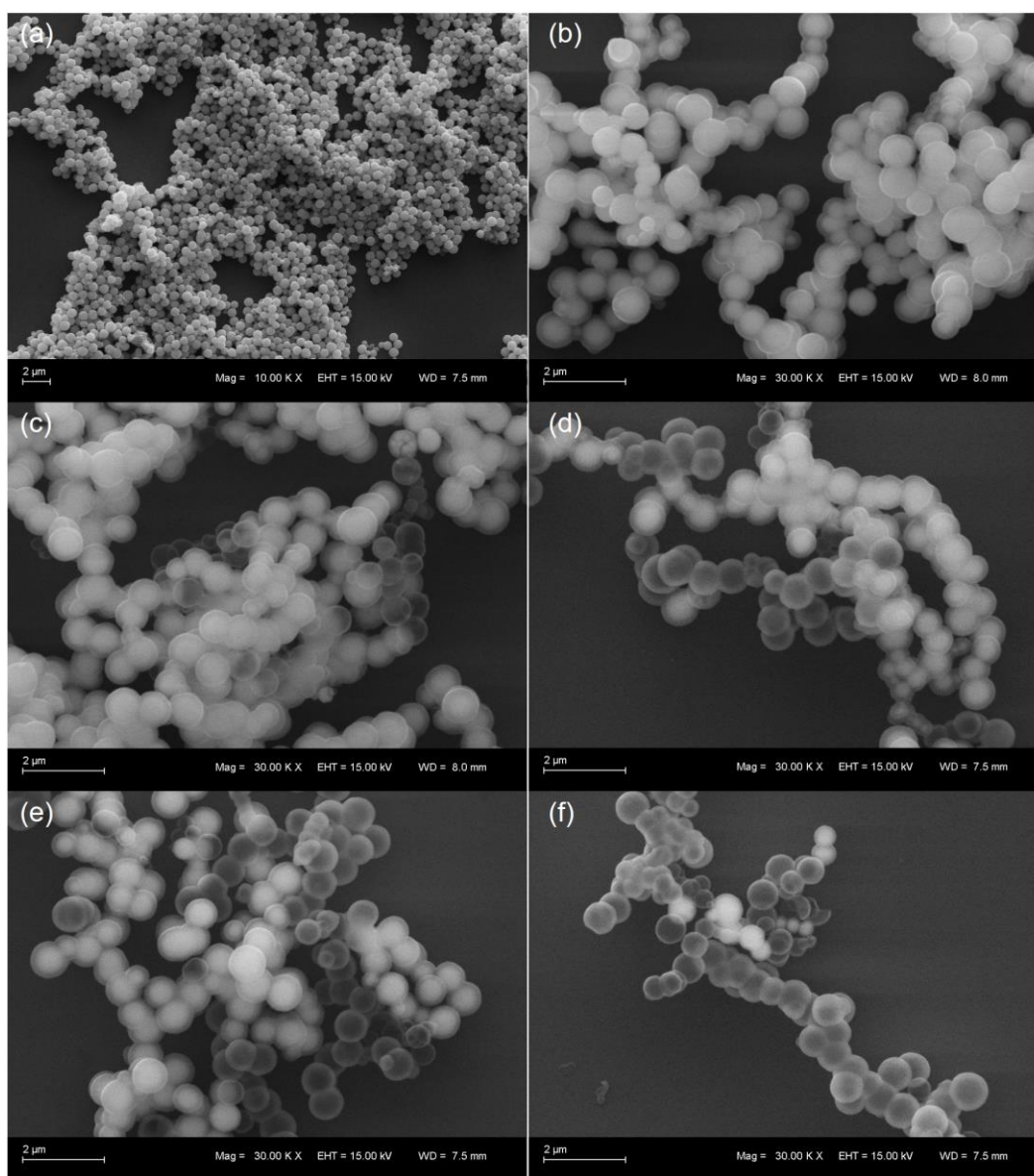


Figura 13. Imagens de MEV adquiridas com elétrons secundários, obtidas para os materiais (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$, (c) MHS-10, (d) MHS-20, (e) e (f) MHS-30. Tensão de aceleração: 15 kV.

As partículas ocas de sílica estão aleatoriamente dispersas, mas sempre diretamente conectadas com esferas de sílica ocupadas por Fe_3O_4 . Essa característica propicia espaços amplos no interior das esferas ocas de sílica – os quais foram impressos pelo tamanho da partícula de Fe_3O_4 antes ali contida – que agora podem ser empregados como contêineres ou micro-reatores com mobilidade magnética. Para

avaliar se as esferas foram completamente esvaziadas, mapas de EDS foram obtidos considerando as linhas $K\alpha_1$ características dos elementos Si, O e Fe. As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 14.

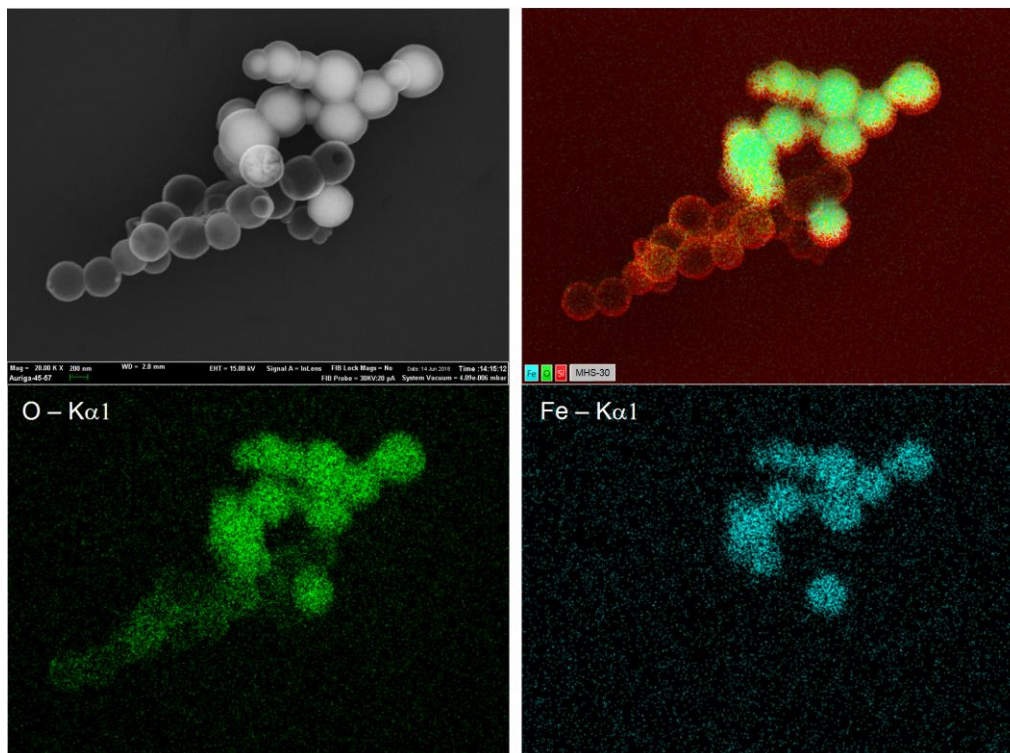


Figura 14. Imagem de MEV-FEG adquirida com elétrons secundários obtida para o material MHS-30 (tensão de aceleração: 15 kV) e os mapas de EDS obtidos para os elementos Si, O e Fe obtidos com as respectivas linhas $K\alpha_1$.

Considerando os mapas obtidos, é possível observar que enquanto o oxigênio está presente em toda a extensão do material – uma vez que compõe ambos magnetita e sílica – o ferro está ausente nas regiões das esferas ocas. O silício está distribuído em toda a imagem pois a amostra foi depositada sobre uma lâmina de silício. Nesse sentido, é possível concluir que as esferas ocas de sílica são completamente vazias, e sua resposta ao campo magnético é proveniente das partículas de Fe_3O_4 vizinhas e remanescentes. Esse sistema se diferencia do *design rattle-type* (do tipo chocalho) frequentemente reportado,^{30,112} onde a resposta magnética é proveniente de resquícios de magnetita no interior das esferas.

Imagens de TEM típicas da série MHS estão apresentadas na Figura 15, e diferentemente das imagens de MEV, agora as partículas de Fe_3O_4 são observadas como esferas escuras, consequência da maior densidade do óxido de ferro que bloqueia a

transmissão do feixe de elétrons. O *shell* de sílica, por apresentar menor densidade, é observado como um contorno acinzentado nas partículas de Fe_3O_4 , e possui espessura média de 32 nm, com desvio padrão de 7,4 nm. As esferas ocas de sílica podem ser observadas pela ausência de Fe_3O_4 no interior da esfera, o que resulta em uma região clara onde o feixe de elétrons encontra barreiras mínimas ao transpassar a amostra. Algumas regiões com obscuridade na Figura 15a são observadas como consequência da sobreposição de esferas ocas, e as bordas de uma esfera podem ser observadas mesmo sob várias outras. Ainda, a conexão entre as esferas, observada anteriormente nas imagens de MEV, é confirmada na Figura 15b, onde esferas ocas e esferas ocupadas por Fe_3O_4 frequentemente partilham a mesma parede de sílica. Essa característica leva à obtenção das esferas ocas com a mobilidade magnética proporcionada pela partícula magnética vizinha.

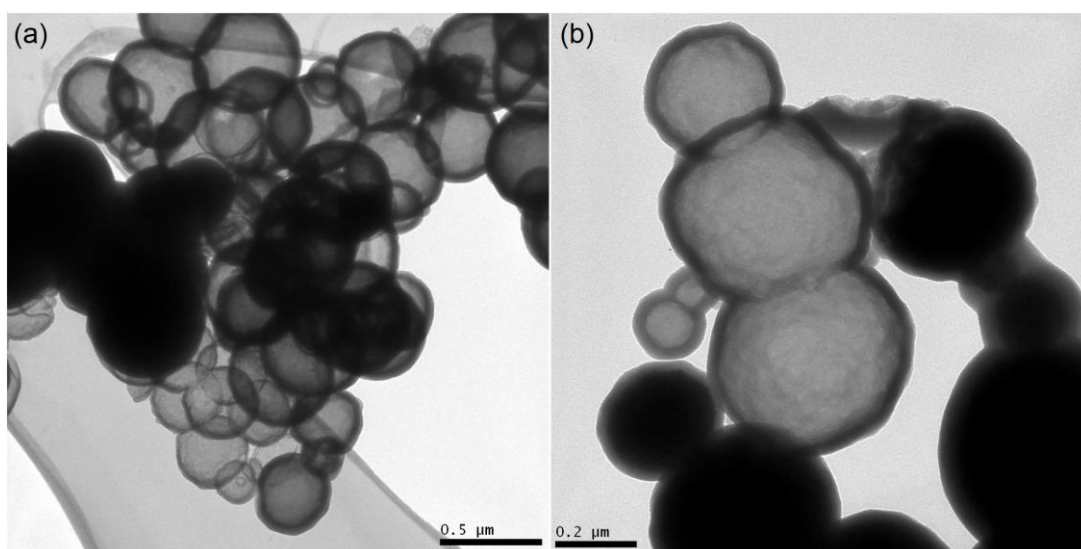


Figura 15. Imagens obtidas por TEM dos materiais contendo esferas ocas de sílica e esferas ocupadas por Fe_3O_4 sendo (a) MHS-30 com magnificação de 50 k \times e (b) MHS-20 com magnificação de 100 k \times . Tensão de aceleração de 80 kV.

A estrutura cristalina de todos os materiais sintetizados foi avaliada através da análise de difração de raios X e os difratogramas obtidos estão apresentados na Figura 16.

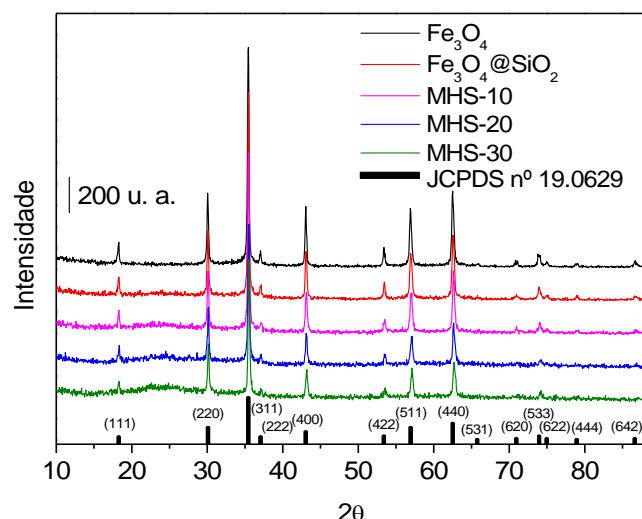


Figura 16. Perfis de difração de raios X das amostras Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e da série MHS. As barras em preto localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores de 2θ para a magnetita (JCPDS n° 19-0629).

Os padrões de difração para todas as amostras apresentaram as reflexões de Bragg correspondentes a estrutura de espinélio inverso da magnetita (JCPDS N°. 19-0629), o que confirma, portanto, a obtenção dessa fase, destacando-se o fato de que nenhuma outra fase de óxido de ferro foi observada.

Ainda no que se refere aos difratogramas de raios X, observa-se uma leve diminuição na intensidade dos picos partindo do material Fe_3O_4 até o MHS-30, o que pode ser justificado pelo aumento do conteúdo de sílica amorfa por grama de material, quer seja pela adição de sílica (amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), quer seja pela redução do conteúdo de magnetita (processos de lixiviação na série MHS). Esse efeito também pode ser observado pelo surgimento, ainda que discreto, do halo da sílica amorfa em 2θ próximo de 24° .¹⁹²

De forma a avaliar a estabilidade da estrutura cristalina da magnetita ao longo dos processos de síntese, os tamanhos de cristalito para as amostras foram calculados utilizando a equação de Scherrer.^{193,194} Desta forma, foram calculadas as larguras a meia altura para os picos correspondentes aos planos (220), (311) e (440), e os tamanhos médios de cristalito para cada uma das amostras estão apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Tamanhos médios de cristalito obtidos a partir da equação de Scherrer.

| Materiais | Tamanho médio de cristalito (± 1 nm) |
|--|--|
| Fe ₃ O ₄ | 29 |
| Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ | 28 |
| MHS-10 | 29 |
| MHS-20 | 29 |
| MHS-30 | 27 |

De acordo com a Tabela 2, o tamanho médio de cristalito estimado para a amostra Fe₃O₄ foi de 29 nm. Considerando isso, e com base nos tamanhos de partícula observados por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, pode-se concluir que as partículas de magnetita sintetizadas são policristalinas, *i.e.*, compostas por n cristalitos¹⁹³ com distribuição de tamanho próxima de 29 nm. Ainda, o tamanho médio de cristalito para as amostras Fe₃O₄@SiO₂ e série MHS manteve-se constante, o que indica que o processo de lixiviação da magnetita de algumas esferas de sílica não afetou a cristalinidade das partículas de magnetita remanescentes.

Uma imagem da amostra MHS-30 obtida por TEM sob voltagem de aceleração de 200 kV está apresentada na Figura 17, juntamente com um esquema explicativo. Nesta imagem observa-se uma partícula de sílica oca da amostra MHS-30, com a presença de recessos na superfície interna da cavidade. Esses recessos possuem tamanho próximo de 28 nm, consistentes com o tamanho de cristalito estimado pela equação de Scherrer. Desta forma, sugere-se que essa rugosidade da superfície interna da partícula oca é ocasionada por um processo de impressão/gravura dos cristalitos de superfície da partícula de magnetita no *shell* de sílica.

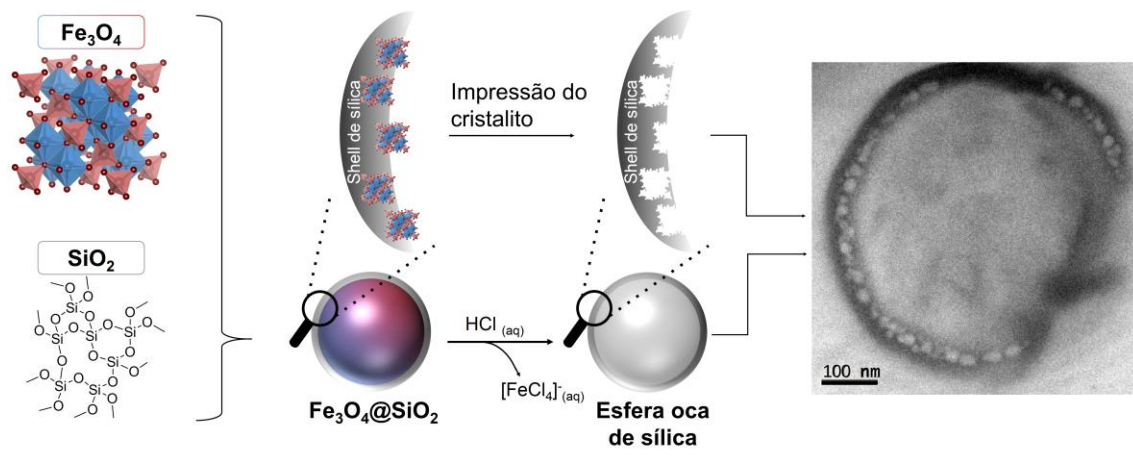


Figura 17. Esquema do processo de síntese dos materiais contendo esferas ocas de sílica incluindo uma imagem de TEM do material MHS-30 (tensão de aceleração: 200 kV).

A resposta magnética das amostras foi avaliada através de medidas de magnetização em função do campo aplicado e as histereses obtidas estão apresentadas na Figura 18. Os dados de alguns parâmetros magnéticos obtidos estão sumarizados na Tabela 3.

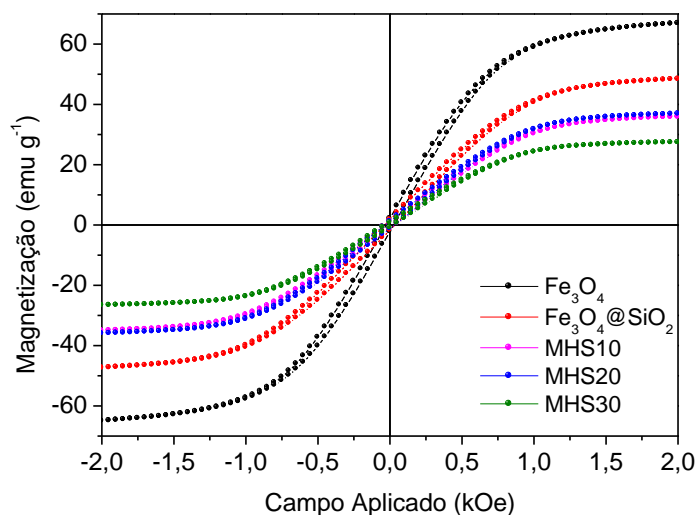


Figura 18. Curvas de magnetização para os materiais Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e série MHS.

O laço de histerese para a amostra Fe_3O_4 apresentou valores de campo de saturação (H_S), campo coercitivo (H_C) e remanência (M_R) típicos da presença de multidomínios ou vórtex magnéticos, já esperados para partículas de magnetita com tamanho menor que $1 \mu\text{m}$.^{195,196} Observaram-se baixos valores de remanência e campo coercitivo tendendo a um comportamento superparamagnético, entretanto, o caráter

ferromagnético ainda é prevalente. Esse comportamento é esperado, uma vez que o tamanho crítico de domínio magnético, à temperatura ambiente, para a transição superparamagnético-ferromagnético é próximo de 20 nm (monodomínio magnético).^{1,4,69,70} A histerese foi classificada como laço maior uma vez que a saturação magnética foi alcançada para o campo máximo disponível.¹⁹⁷

Tabela 3. Parâmetros magnéticos dos materiais, onde M_S é a magnetização de saturação, H_C é o campo coercitivo, M_R é a remanência.

| Materiais | $M_S (\pm 5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1})$ | $H_C (\pm 5 \text{ Oe})$ | $M_R (\text{emu}\cdot\text{g}^{-1})$ | M_R/M_S |
|--|---|--------------------------|--------------------------------------|-----------|
| Fe ₃ O ₄ | 70 | 25 | 2,2 | 0,03 |
| Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ | 51 | 35 | 1,7 | 0,03 |
| MHS-10 | 37 | 35 | 1,2 | 0,03 |
| MHS-20 | 38 | 33 | 1,2 | 0,03 |
| MHS-30 | 28 | 29 | 0,8 | 0,03 |

A magnetização de saturação (M_S) observada para a amostra Fe₃O₄ foi de 70 emu·g⁻¹, sendo menor que o valor teórico de M_S para a magnetita *bulk* (92 emu·g⁻¹), e esse desvio é atribuído a desordens de superfície ou ordenamento não colinear dos spins na superfície da partícula.⁷⁰

Quando compara-se as curvas das amostras Fe₃O₄, Fe₃O₄@SiO₂ e da série MHS, o formato similar das curvas de histerese indica respostas magnéticas comparáveis. O decréscimo observado no valor de M_S para a amostra Fe₃O₄@SiO₂ é resultado da incorporação de material não-magnético (SiO₂) na massa total da amostra. Do mesmo modo, a tendência de decréscimo de M_S nas amostras da série MHS está relacionada com a redução no conteúdo magnético por grama de material, ocasionado pelo tratamento de lixiviação. No entanto, a razão M_R/M_S permanece constante em todas os materiais ($M_R/M_S = 0,03$), o que indica que o tratamento ácido não interferiu nas propriedades magnéticas da magnetita, em concordância com os resultados de difração de raios X, onde a estrutura cristalina das partículas remanescentes é preservada.

Embora o material MHS-30 possua o menor conteúdo magnético, ele ainda apresenta magnetização suficiente para permitir a separação imediata quando um campo magnético externo é aplicado (Figura 19), sendo rapidamente redisperso com agitação suave.

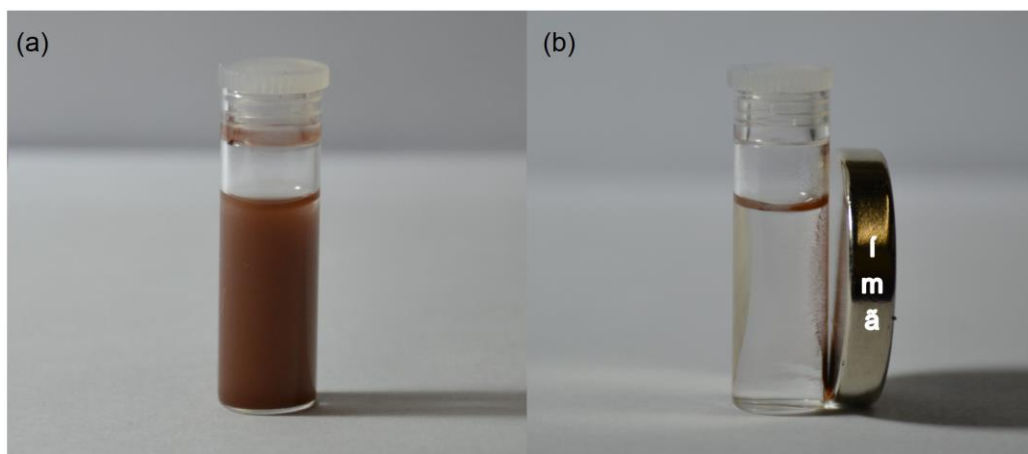


Figura 19. Fotografia do material MHS-30 (a) disperso em etanol e (b) separado pela aplicação de um campo magnético.

As áreas superficiais específicas (S_{BET}) dos materiais foram determinadas a partir das isotermas de adsorção e dessorção de N_2 utilizando o método BET e os valores obtidos estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados de área superficial obtidos por análise textural utilizando o método BET.

| Materiais | S_{BET} ($m^2 \cdot g^{-1}$) |
|------------------|---|
| Fe_3O_4 | $6,4 \pm 0,3$ |
| $Fe_3O_4@SiO_2$ | $3,4 \pm 0,2$ |
| MHS-10 | 14 ± 1 |
| MHS-20 | 18 ± 1 |
| MHS-30 | 86 ± 4 |

A área superficial das partículas de Fe_3O_4 determinada foi de $6,4 m^2 \cdot g^{-1}$, que apesar de pequena, é compatível com o esperado para partículas densas com tamanhos de ordem submicrométrica.^{198,199} Para o material $Fe_3O_4@SiO_2$, observou-se um decréscimo na área superficial específica após a formação do *shell* de sílica, comportamento consistente com uma camada de sílica que bloqueia, durante a análise, o acesso do nitrogênio aos defeitos e espaços intersticiais no empacotamento dos cristalitos de magnetita previamente expostos. Após o tratamento de lixiviação, um aumento progressivo nos valores de área superficial específica é observado (MHS-10 até MHS-30) e pode ser atribuído i) a exposição da superfície interna das esferas ocas, as quais apresentam rugosidades provenientes da impressão dos cristalitos de magnetita,

como apresentado na Figura 17 e ii) ao decréscimo do conteúdo de magnetita, a qual não contribui significativamente para a área superficial, conseqüentemente aumentando o número de esferas ocas por grama de material.

5.1.2 Acessibilidade das esferas ocas: caracterização fotofísica

A acessibilidade das esferas ocas de sílica foi investigada utilizando espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário, onde tolueno foi utilizado como solvente e molécula sonda.^{187,200,201} Na Figura 20 estão apresentados os espectros de excitação e emissão do tolueno contendo o material MHS-30 disperso, na concentração de 100 mg·L⁻¹.

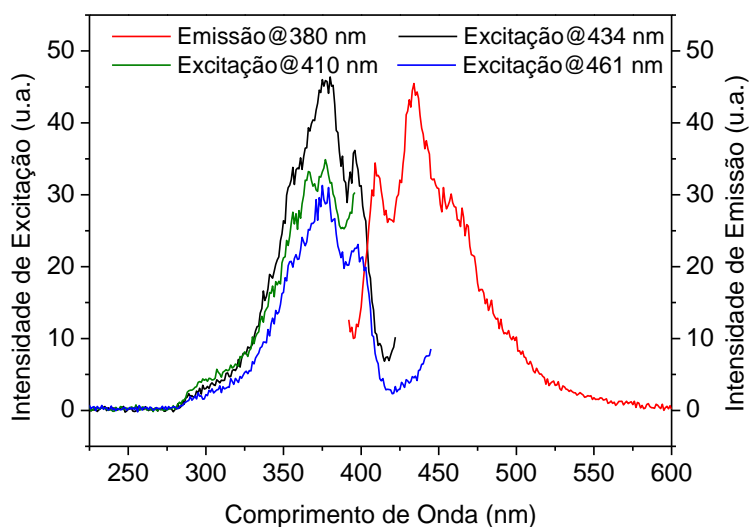


Figura 20. Espectros de emissão e excitação de fluorescência do tolueno na presença do material MHS-30 (100 mg·L⁻¹).

Observa-se a presença de uma banda de emissão de fluorescência localizada em 450 nm e avaliando os espectros de excitação nos comprimentos de onda de 410 nm, 434 nm e 461 nm, tem-se que as espécies responsáveis por essa emissão apresentam uma região de absorção distinta. Nesse sentido, o comportamento fluorescente poderia ser atribuído à excímeros de tolueno (dímeros excitados), que poderiam ser formados por um efeito de confinamento nas esferas ocas de sílica da amostra MHS-30. Outros trabalhos já reportaram a formação de excímeros de tolueno em solução, onde a banda de fluorescência encontra-se deslocada para o vermelho.^{187,202} Apesar de encontrar-se também deslocada para o vermelho, a localização e formato da banda observada com o

material MHS-30 são distintos dos resultados da literatura. Entretanto, a intensidade de emissão dessa banda é dependente da concentração do material MHS-30, como pode ser observado na Figura 21.

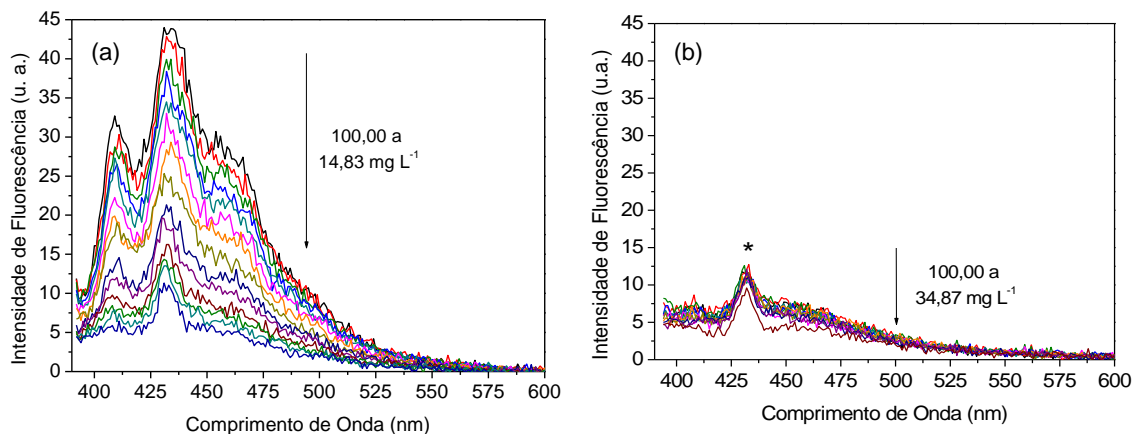


Figura 21. Espectros de emissão de fluorescência do tolueno na presença do material (a) MHS-30 (100 a $14,83 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (100 a $34,87 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) sob excitação em 380 nm. O asterisco indica o sinal Raman.

Sendo assim, o efeito fotofísico observado é diretamente relacionado com a maior quantidade do material MHS-30 e, conseqüentemente, com a maior disponibilidade de esferas ocas, sugerindo que o efeito fotofísico se relaciona com a acessibilidade das cavidades das esferas. Quando se realiza o mesmo experimento com o material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (Figura 21b), não se observa aumento na intensidade de fluorescência, reforçando a hipótese de que o comportamento fluorescente é favorecido por efeito de confinamento do tolueno no material MHS-30.

O comportamento fotofísico do tolueno na presença dos materiais $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e MHS-30 foi estudado também em diferentes comprimentos de onda de excitação e os espectros de emissão de fluorescência estão apresentados na Figura 22. De acordo com os espectros apresentados, nenhum efeito significativo foi observado além do esperado pela regra de Kasha.²⁰³ A excitação em diferentes comprimentos de onda também foi útil para descartar uma possível contribuição de sinal Raman na banda localizada em 450 nm.

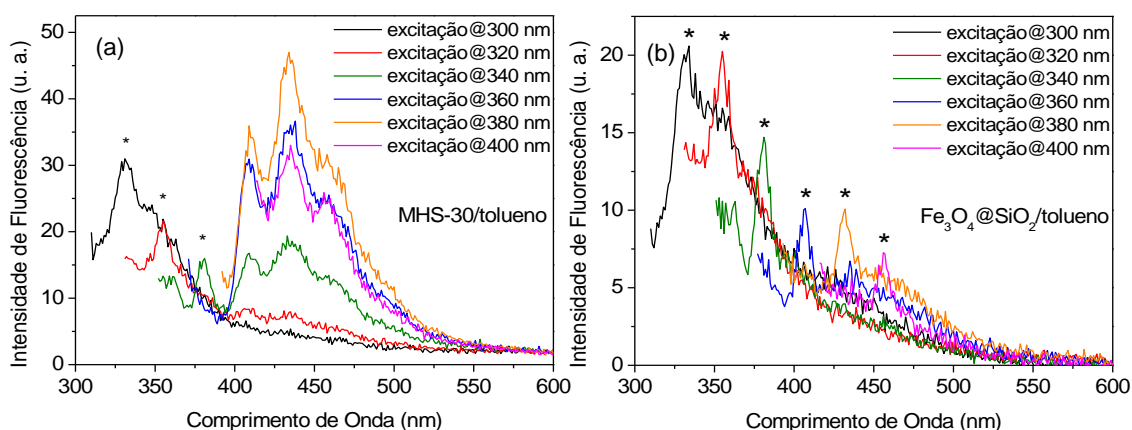


Figura 22. Espectros de emissão de fluorescência do tolueno em diferentes λ de excitação contendo os materiais (a) MHS-30 e (b) Fe₃O₄@SiO₂, (100 mg·L⁻¹). O asterisco indica sinal Raman.

Para descartar os efeitos das matrizes Fe₃O₄@SiO₂ e MHS-30, os mesmos experimentos foram realizados em etanol, que é um solvente não fluorescente, na presença dos materiais MHS-30 and Fe₃O₄@SiO₂. Os espectros estão apresentados na Figura 23 e novamente nenhum efeito distinto e aparente foi observado. A contribuição dos solventes puros etanol e tolueno nos mesmos comprimentos de onda de excitação também não foi observada.

Neste sentido, tendo descartados outros efeitos possíveis, sugere-se que a banda estruturada de fluorescência localizada em 450 nm e com grande deslocamento de Stokes é de fato produto da formação de excímeros do tolueno em situação de confinamento, efeito esse promovido pelas esferas ocas presentes no material MHS-30.

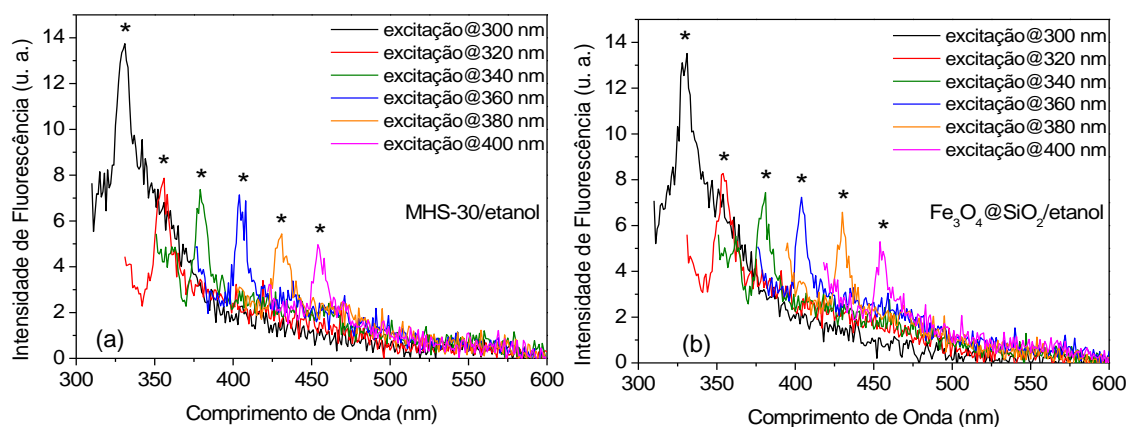


Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência em diferentes λ de excitação para os sistemas (a) MHS-30 em etanol e (b) Fe₃O₄@SiO₂ em etanol, (100 mg·L⁻¹). O asterisco indica sinal Raman.

5.1.3 Conclusões parciais

Este trabalho levou a obtenção de um sistema magneticamente responsivo constituído por esferas ocas de sílica acopladas a partículas *core-shell* magnetita@sílica. As esferas ocas de sílica com resposta magnética foram obtidas tendo as partículas de magnetita atuado tanto como componente magneticamente responsivo, quanto como núcleo de sacrifício definindo o tamanho das cavidades das esferas de sílica oca. Isso foi possível pela lixiviação parcial e controlada de algumas partículas de magnetita do interior das esferas de sílica de um sistema *core-shell* magnetita@sílica. Esse procedimento levou à obtenção de materiais com quantidades variadas de esferas ocas de sílica que podem atuar como contêineres com mobilidade induzida por campo magnético. As partículas de magnetita remanescentes não tiveram sua estrutura cristalina alterada e a magnetização do material com maior proporção de esferas ocas de sílica ainda permite separação imediata. O interior das cavidades de sílica foi comprovado ser acessível, com características de espaço confinado, pela presença de uma banda estruturada de emissão de fluorescência relacionada à formação de excímeros do tolueno submetidos ao efeito de confinamento no interior das esferas. Essas características abrem a perspectiva de trabalhos futuros envolvendo o emprego destes materiais como suporte na imobilização de macroespécies como biomacromoléculas ou nanoestruturas.

Capítulo II

Sílicas hidrofílicas/hidrofóbicas e magnéticas: suportes recuperáveis para lipase em biocatálise enzimática

5. Resultados e discussão

5.2 Sílicas hidrofílicas/hidrofóbicas e magnéticas: suportes recuperáveis para lipase em biocatálise enzimática

Neste trabalho, um xerogel mesoporoso e magnético foi preparado combinando sílica porosa e partículas de magnetita. Para isso, utilizou-se o método sol-gel que permite a obtenção de materiais porosos com alta área, tamanho de poro controlado e boa dispersão das partículas magnéticas na rede de sílica. O xerogel resultante, denominado MX, foi modificado com o silsesquioxano iônico contendo o grupo catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano e o íon cloreto como contra íon (Db), e denominado HFL-MX. Os grupos amônio quaternário, agora presentes na superfície da sílica, possibilitaram a incorporação por troca iônica do íon cloreto pelo íon estearato, resultando no material HFB-MX com uma superfície hidrofóbica.

5.2.1 Características físicas, químicas e microestruturais dos materiais

A Figura 24, a seguir, apresenta o perfil de difração de raios X para os materiais sintetizados, de acordo com a ordem de obtenção: Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, MX, HFL-MX e HFB-MX.

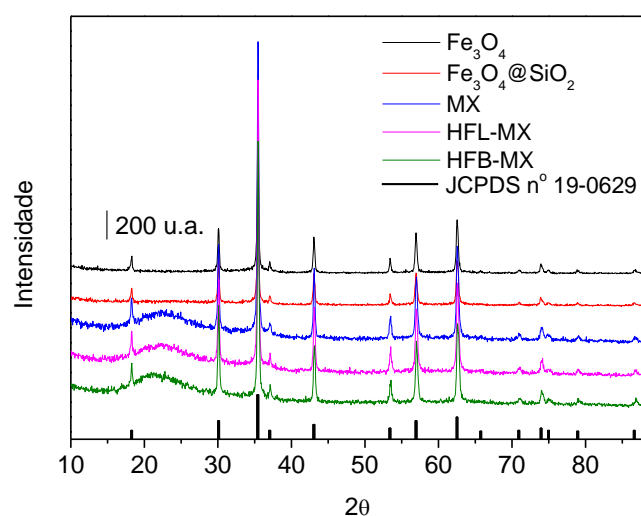


Figura 24. Difrátogramas de raios X dos materiais Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e dos xerogéis magnéticos MX, HFL-MX e HFB-MX.

Todos os materiais apresentaram os picos referentes as reflexões de Bragg da estrutura de espinélio inverso da magnetita (JCPDS N°. 19-0629), e, pela ausência de outros picos, nenhuma outra fase cristalina, especialmente de óxido de ferro, pôde ser observada. Utilizando a medida da largura a meia altura do pico referente ao plano (311) – o mais intenso – e a equação de Scherrer,^{193,194} obteve-se o tamanho médio de cristalito na amostra Fe₃O₄, sendo ele 25 nm. Após o recobrimento das partículas de magnetita com uma camada de sílica, o difratograma do material Fe₃O₄@SiO₂ não foi modificado, indicando a inalteração da estrutura cristalina da magnetita. Com a obtenção do material MX observa-se em 2θ próximo a 22° o surgimento do halo da sílica amorfa,¹⁹² decorrente do drástico aumento da proporção de sílica, agora correspondendo a *c.a.* 35% em massa no material MX. O perfil de difração do material MX é idêntico aos encontrados após a modificação com o silsesquioxano iônico no material HFL-MX e após troca iônica com o íon esterarato no material HFB-MX. Isso indica que, ao longo dos processos de síntese e modificações, a estrutura cristalina da magnetita permanece inalterada e que as partículas foram eficientemente incorporadas na microestrutura de sílica amorfa.

A morfologia das partículas de Fe₃O₄ e sua dispersão no material MX foram avaliadas a partir de imagens de MEV, sendo algumas apresentadas na Figura 25. Com base na Figura 25a, as partículas de Fe₃O₄ sintetizadas apresentam formato esférico e diâmetro médio de 561 nm, com desvio padrão de 88 nm, considerando uma população de 139 partículas. O recobrimento das partículas com sílica no material Fe₃O₄@SiO₂ (Figura 25b) é observado pelo aparecimento de um contorno acinzentado nas partículas. A perda de detalhes de superfície nas partículas também é uma evidência da formação de uma camada de sílica visto que, pela sílica ser isolante e com a incidência do feixe de elétrons, ocorre um processo de carregamento da superfície da amostra que resulta em regiões de intenso brilho e baixa definição.

As imagens apresentadas nas Figuras 25c-d correspondentes aos materiais MX e HFL-MX foram adquiridas com elétrons retroespalhados, o que torna possível distinguir regiões de acordo com sua composição química. Elementos mais pesados, como é o caso do ferro, tem um maior poder de retroespalhamento do feixe de elétrons incidente do que elementos mais leves como o silício. Como mais elétrons retroespalhados provenientes dessas regiões chegam até o detector, as regiões densas tornam-se muito brilhantes na imagem.²⁰⁴ Sendo assim, as imagens apresentam as partículas de Fe₃O₄ com brilho intenso e incrustadas na estrutura da sílica, localizada

nas regiões opacas das imagens. Comparando as imagens dos materiais MX e HFL-MX, pode-se afirmar que nenhuma alteração significativa na morfologia do material foi observada após a incorporação do silsesquioxano iônico Db.

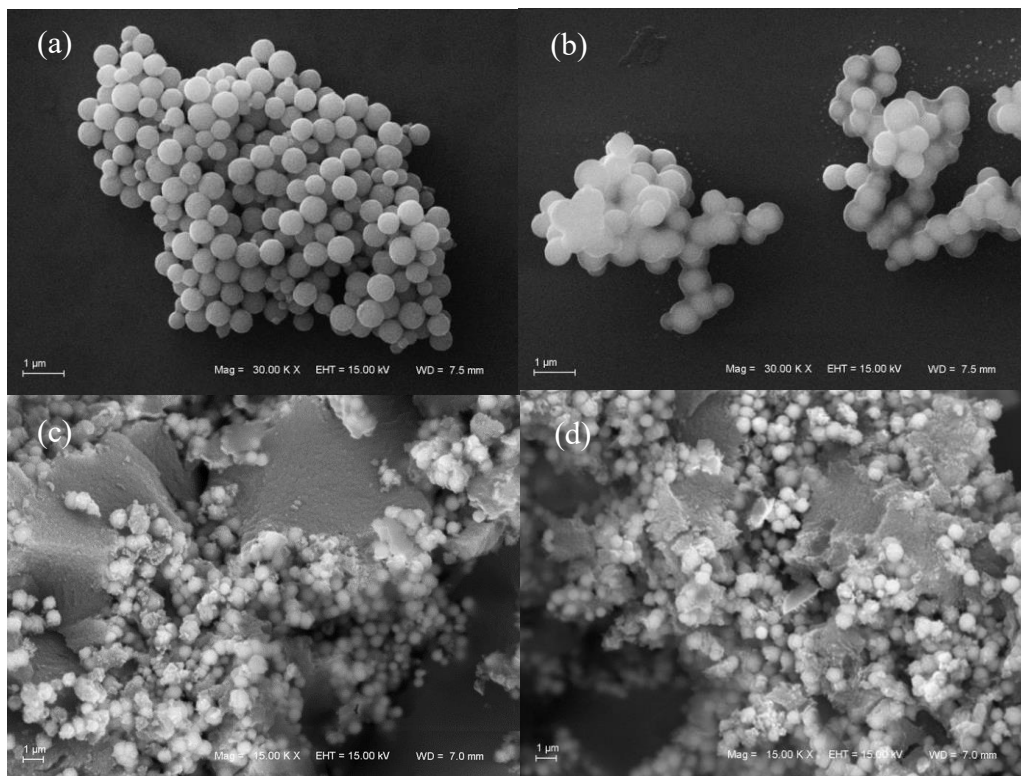


Figura 25. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os materiais (a) Fe_3O_4 , (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (elétrons secundários), (c) MX e (d) HFL-MX (elétrons retroespalhados). Tensão de aceleração: 15 kV.

Para comprovar a modificação com o silsesquioxano iônico Db contendo cloreto como contra íon e a incorporação do íon estearato, análises termogravimétricas foram realizadas. As curvas termogravimétricas obtidas estão apresentadas na Figura 26 e também a Tabela 5 foi construída discriminando as perdas de massa de acordo com a faixa de temperatura.

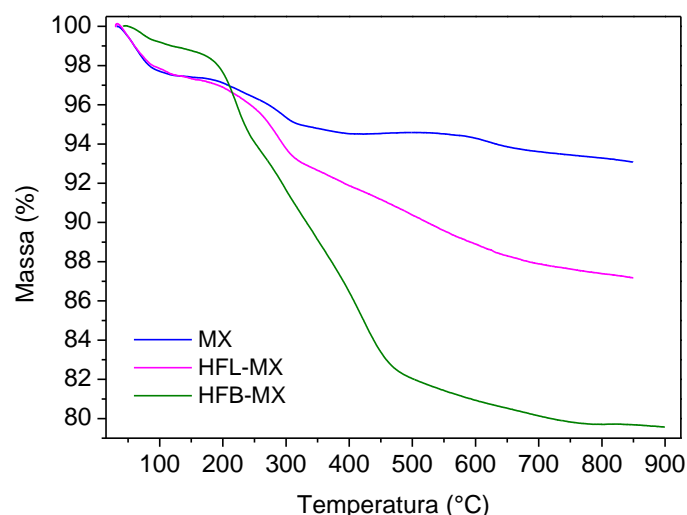


Figura 26. Termogramas obtidos para os xerogéis magnéticos MX, HFL-MX e HFB-MX.

Tabela 5. Perdas de massa, discriminadas pelas regiões de temperaturas, obtidas por análise termogravimétrica.

| Material | Perdas de massa (%) | |
|----------|-------------------------|------------|
| | T _{am} -150 °C | 150-750 °C |
| MX | 2,58 | 3,97 |
| HFL-MX | 2,67 | 9,69 |
| HFB-MX | 1,08 | 18,92 |

As curvas termogravimétricas para os três materiais apresentam uma primeira região de perda de massa até 150 °C que é atribuída à dessorção de moléculas de água da superfície dos xerogéis.³⁴ Nota-se que, conforme apresentado na Tabela 5, a quantidade de água dessorvida no material HFB-MX é consideravelmente menor do que nos materiais predecessores, o que sugere uma maior hidrofobicidade de sua superfície. Uma segunda região de perda de massa é observada acentuadamente na região de 150 a 525 °C, porém se estende até 750 °C. Essas perdas de massa são atribuídas à reações de desidroxilação da superfície da sílica e à decomposição de compostos orgânicos.^{34,205} Assim sendo, o aumento nos valores de perda de massa na faixa de 150-750 °C partindo do material MX até o material HFB-MX evidenciam o sucesso tanto na modificação de superfície com o grupo Db, quanto na posterior troca iônica com o íon estearato. É interessante destacar também que quando se analisa o material MX, o qual é puramente

inorgânico, um aumento de massa entre 400 e 600 °C é observado e atribuído à oxidação dos íons Fe^{3+} da magnetita que ocorre nessa faixa de temperatura.^{12,13}

Para avaliar o comportamento magnético dos materiais, a Figura 27 apresenta os laços de histerese obtidos para os materiais, enquanto que a Tabela 6 sumariza os dados de magnetização de saturação obtidos. Assim como as amostras obtidas na Parte I, as partículas de Fe_3O_4 sintetizadas apresentaram histerese magnética do tipo laço maior, valores de campo de saturação, campo coercitivo e remanência que indicam a presença de multi-domínios ou vórtex magnéticos.^{195,196} O comportamento ferromagnético também é predominante sobre o superparamagnético e o valor de magnetização de saturação ($M_S = 70 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$) foi igual ao obtido na Parte I ($M_S = 70 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$), o qual é menor que o valor teórico para a magnetita *bulk* ($M_S = 92 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$) em função dos efeitos de desordens de superfície.⁷⁰

Após o recobrimento das partículas com sílica, o valor de magnetização de saturação diminui, comportamento esperado novamente pela redução na proporção de material magnético no material. Essa mesma tendência ocorre mais acentuadamente no material MX, visto que a quantidade de sílica incorporada ao MX na síntese do xerogel é maior. Quando compara-se os valores de magnetização de saturação dos materiais MX, HFL-MX e HFB-MX, observa-se que após as modificações com os grupos orgânicos, o decréscimo é muito menos acentuado. Isso se deve às menores quantidades de material não-magnético incorporadas nessas etapas, não influenciando significativamente na sua resposta magnética.

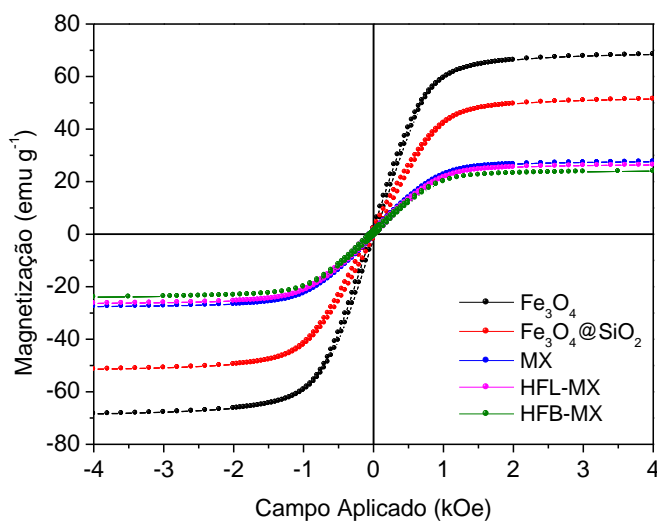


Figura 27. Curvas de magnetização obtidas para os materiais Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e dos xerogéis magnéticos MX, HFL-MX e HFB-MX.

Tabela 6. Parâmetros magnéticos obtidos para os materiais.

| Materiais | $M_S (\pm 5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1})$ | $H_C (\pm 5 \text{ Oe})$ | $M_R (\text{emu}\cdot\text{g}^{-1})$ | M_R/M_S |
|--------------------------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|-----------|
| Fe_3O_4 | 70 | 26 | 2,1 | 0,03 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ | 52 | 40 | 2,0 | 0,04 |
| MX | 28 | 46 | 1,3 | 0,04 |
| HFL-MX | 27 | 46 | 1,2 | 0,04 |
| HFB-MX | 25 | 40 | 1,0 | 0,04 |

Com o objetivo de avaliar as propriedades texturais dos materiais, a Figura 28 traz as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio e as distribuições de diâmetro de poros para os materiais MX, HFL-MX e HFB-MX.

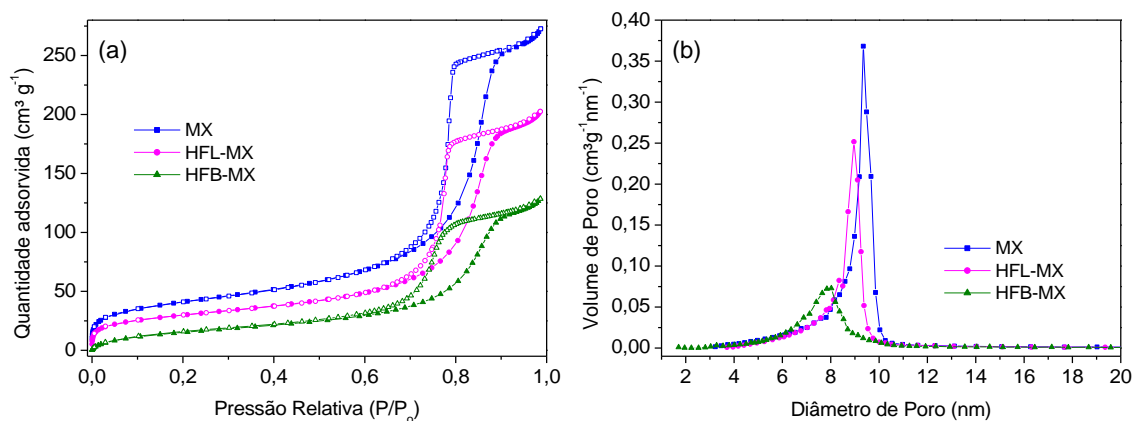


Figura 28. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e (b) distribuição de diâmetro de poros dos materiais MX, HFL-MX e HFB-MX.

As isotermas obtidas são classificadas como tipo IV, típicas para materiais mesoporosos, onde a condensação capilar ocorre em pressões relativas altas (Figura 28a).²² A porosidade em materiais obtidos pelo método sol-gel é consequência do empacotamento das partículas primárias de sílica geradas no estado sol; essas partículas são esféricas quando o ânion fluoreto é empregado como catalisador e o seu empacotamento dá origem a poros intersticiais com tamanho na região de mesoporos (2 a 50 nm),^{19,185} o que pode ser comprovado pelas distribuições de diâmetro de poros apresentadas na Figura 28b. Quando compara-se as isotermas dos três xerogéis, pode-se observar uma tendência de decréscimo na quantidade de nitrogênio adsorvido para os materiais HFL-MX e HFB-MX. A Tabela 7 apresenta os valores de área superficial

específica, determinada pelo método BET (S_{BET}), e de volume de poro empregando o método BJH, onde observa-se a mesma tendência ao decréscimo nos valores de S_{BET} e de volume de poro com as sucessivas modificações com grupos orgânicos.

Tabela 7. Dados de análise textural dos xerogéis MX, HFL-MX e HFB-MX.

| Materiais | S_{BET} ($\pm 5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) | Volume de Poro ($\pm 0,001 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) |
|------------------|--|---|
| MX | 143 | 0,413 |
| HFL-MX | 105 | 0,307 |
| HFB-MX | 61 | 0,193 |

Na distribuição de diâmetro de poros apresentada na Figura 28b, os efeitos da incorporação dos grupos orgânicos também são observados. A modificação da superfície do material MX com o silsesquioxano iônico Db (material HFL-MX) resultou no deslocamento do ponto máximo da curva de 9,3 para 9,0 nm, o que condiz com a formação de um filme de Db na superfície do xerogel, comportamento já observado anteriormente.³⁴ Por outro lado, a incorporação do íon estearato (material HFB-MX), além de deslocar o máximo da curva de distribuição para 8,0 nm, também diminuiu consideravelmente o volume de poros (Figura 28b e Tabela 7). Esse efeito pode ser ocasionado pelo tamanho do íon estearato, que, sendo grande, é capaz de ocluir alguns poros e impedir o acesso do N_2 durante a análise. No entanto, a S_{BET} e o tamanho médio de poros do material HFB-MX ainda são adequados para que o mesmo atue como suporte para biomacromoléculas como a enzima lipase.^{20,21}

A hidrofobicidade do material HFB-MX, que contém o íon estearato, pôde ser observada já durante tentativas de dispersá-lo em água (Figura 29b), visto que o mesmo não é disperso na totalidade do solvente como o material HFL-MX (Figura 29a). Ainda, a fim de melhor avaliar a hidrofobicidade do material, foram realizadas medidas de ângulo de contato entre uma gota d'água e os materiais MX, HFL-MX e HFB-MX. Os resultados foram, respectivamente, 0° , 0° e 125° . Estes resultados caracterizam o material HFB-MX como hidrofóbico,²⁰⁶ e a fotografia da gota d'água em contato com uma pastilha do material HFB-MX está apresentada na Figura 29c.

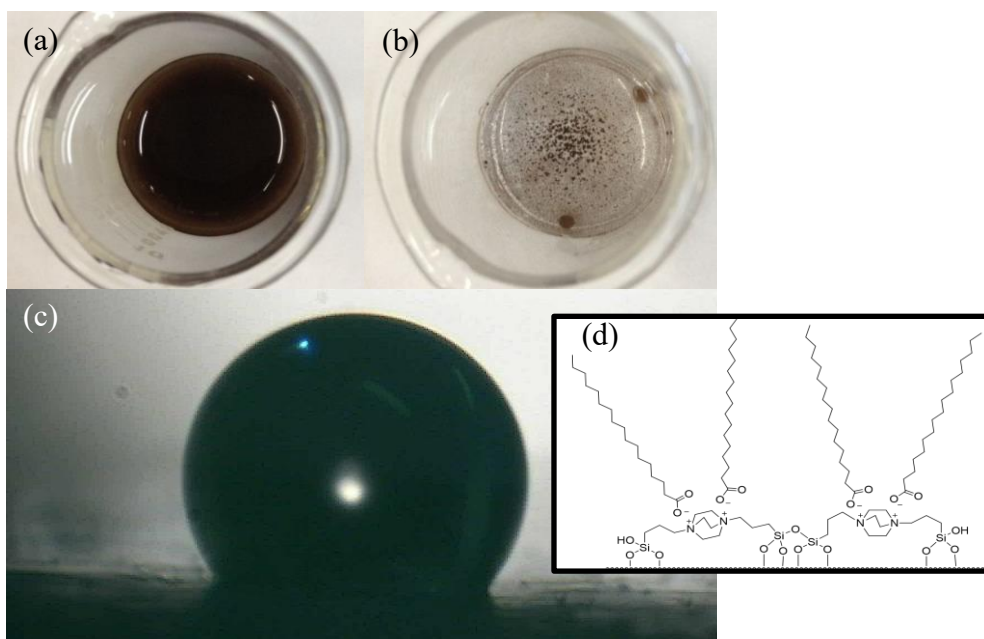


Figura 29. Fotografias das amostras (a) HFL-MX e (b) HFB-MX em água e (c) formação de uma gota d'água na superfície do material HFB-MX, a temperatura ambiente. (d) Esquema ilustrando os íons estearato na superfície do material HFB-MX.

5.2.2 Ensaios de imobilização e atividade enzimática

Os testes de imobilização e atividade enzimática foram realizados empregando a enzima *Thermomyces lanuginosus* Lipase (TLL) e utilizando como suporte os materiais MX e HFB-MX. O material HFL-MX foi preterido por não apresentar resultados satisfatórios como suporte para a enzima TLL ao longo de etapas de otimização de imobilização. Os dados de rendimento de imobilização (%), atividade (U), atividade relativa ao volume oferecido de enzima no ensaio ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e atividade por grama de suporte ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) estão apresentados na Tabela 8. Os rendimentos de imobilização foram consideravelmente maiores (próximo de 100%) com o suporte hidrofóbico HFB-MX, o que sugere que a hidrofobicidade possui papel importante na imobilização da enzima. O baixo rendimento de imobilização no xerogel MX (36%) pode ser interpretado como consequência da ausência de grupos funcionais de afinidade com a enzima (a superfície da sílica apresenta apenas grupos silanol Si-OH).

No entanto, ainda de acordo com a Tabela 8, no material MX os resultados de atividade por grama de suporte foram, inesperadamente, os maiores dentre os materiais estudados. Inclusive, os resultados de atividade $\cdot\text{mL}^{-1}$ foram superiores aos obtidos para a enzima livre, o que indica que a enzima TLL encontra-se muito mais ativa quando imobilizada nesse suporte. Essa elevada atividade pode ser consequência da preservação

da conformação da enzima durante o processo de imobilização, ou também de uma maior disponibilidade e acessibilidade do sítio ativo da enzima para o substrato.

Tabela 8. Resultados dos ensaios de atividade enzimática para a enzima TLL.

| Materiais | Imobilização (%) | Atividade | | | Atividade recuperada (%) |
|-----------|------------------|-----------|-----------------------|----------------------|--------------------------|
| | | (U) | (U·mL ⁻¹) | (U·g ⁻¹) | |
| MX | 36 | 0,113 | 0,095 | 5,7 | 345 |
| HFB-MX | 97 | 0,095 | 0,079 | 4,7 | 104 |
| Livre | n.a. | 0,016 | 0,079 | n.a. | 100 |

n.a. = não se aplica

O reciclo dos materiais MX e HFB-MX contendo a enzima TLL foi avaliado frente à repetidos ciclos de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato, intercalados por enxágues com tampão PBS 0,05 mol·L⁻¹, pH 7,5. Os resultados de atividade relativa estão apresentados na Figura 30.

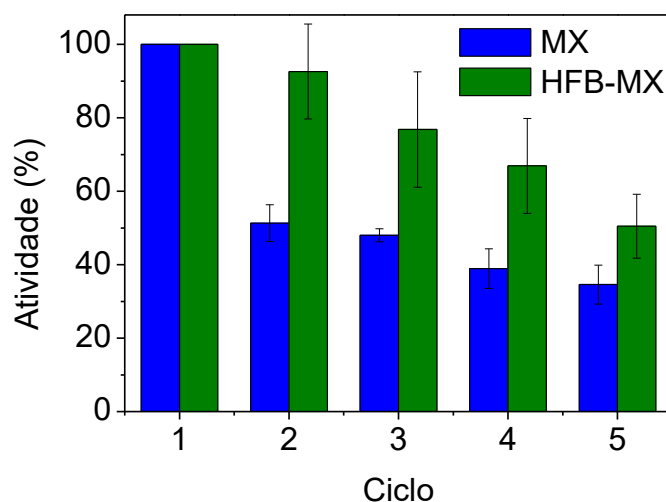


Figura 30. Resultados de reciclo dos materiais contendo a enzima TLL para os suportes (a) MX e (b) HFB-MX. As barras indicam o desvio do valor médio das duplicatas.

Embora o material MX tenha apresentado os melhores valores de atividade recuperada, indicando uma hiperatividade da TLL, os resultados de reciclo mostram uma perda considerável de atividade da enzima a partir do segundo ciclo, estabilizando-se próximo a 35% ao final do quinto ciclo. Nesse sentido, as mesmas fracas interações entre a superfície do suporte MX e a enzima lipase que facilitam a hiperatividade, são

agora uma explicação para a piora na performance ao longo dos ciclos, consequência da lixiviação da própria enzima. Já para o material hidrofóbico HFB-MX, a queda na atividade é muito menos abrupta e o biocatalisador ainda mantém 51% da atividade inicial após cinco ciclos. A perda de 49% da atividade até o quinto ciclo não deve-se, necessariamente, à desnaturação da enzima ou lixiviação, podendo estar relacionada com possíveis perdas de massa do catalisador ao longo dos ciclos. Uma vez que a massa inicial de biocatalisador utilizado nos ensaios é de 20 mg, pequenas perdas de massa no processo de reciclo representam uma fração importante do total. Um comportamento similar pode ser relacionado quando avalia-se desvio médio das medidas, que são maiores no material HFB-MX possivelmente devido aos menores valores absolutos de atividade, onde pequenas variações nas duplicatas são suficientes para desencadear grandes desvios.

5.2.3 Conclusões parciais

O xerogel magnético de sílica foi obtido com sucesso ao dispersar as partículas de magnetita no precursor de sílica durante o processo sol-gel, resultando em um material com elevada área superficial e poros bem definidos na região de mesoporos. A modificação com silsesquioxano iônico com contra íon de cadeia longa foi realizada com sucesso, promovendo maior hidrofobicidade da superfície do material. Buscando explorar as características texturais e química de superfície dos xerogéis magnéticos e mesoporosos, estudou-se o emprego como suportes para a enzima TLL, onde parâmetros como rendimento de imobilização, saturação dos suportes e atividades das enzimas suportadas foram avaliados. Nos ensaios de atividade enzimática, observou-se que a hidrofobicidade do suporte HFB-MX desempenha um papel importante na imobilização, enquanto que a superfície hidrofílica e estrutura desimpedida do material MX favorecem a atividade enzimática. Por promover uma imobilização mais consistente, o material HFB-MX também apresentou maior retenção da atividade inicial após cinco ciclos (51%). Nesse sentido, o uso de sílicas porosas magneto-responsivas aliado ao *design* de superfícies é uma ferramenta importante no desenvolvimento de biocatalisadores heterogêneos de fácil reutilização e alta eficiência.

Capítulo III

*Sílica/titânia/magnetita: suportes
recuperáveis para nanopartículas de ouro em
sistemas antimicrobianos*

5. Resultados e discussão

5.3 Sílica/titânia/magnetita: suportes recuperáveis para nanopartículas de ouro em sistemas antimicrobianos

Neste trabalho, um xerogel magnético composto de sílica/titânia e magnetita foi sintetizado utilizando o método sol-gel, a partir das reações de hidrólise e condensação dos precursores TEOS e isopropóxido de titânio, na presença de partículas de magnetita revestidas com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$). Em função da reatividade da superfície da sílica/titânia, este material ($\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$) foi utilizado como suporte para nanopartículas de ouro (AuNP) estabilizadas por quitosana. AuNP são largamente utilizadas como catalisadores, mediadores eletroquímicos e agentes antimicrobianos, promovendo excelente performance dos materiais em suas respectivas aplicações.

5.3.1 Características físicas, morfológicas e microestruturais dos materiais

As partículas de magnetita, sintetizadas pelo método solvotérmico, foram caracterizadas quanto a sua morfologia utilizando microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As imagens representativas estão apresentadas na Figura 31.

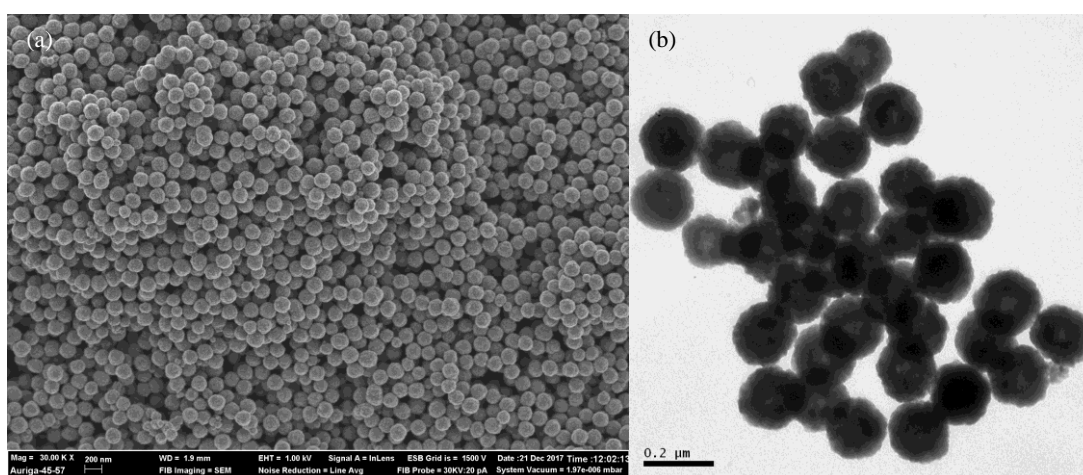


Figura 31. Imagens das partículas de magnetita adquiridas por microscopia eletrônica de (a) varredura (MEV-FEG, voltagem de aceleração: 1,0 kV) e (b) transmissão (tensão de aceleração: 80 kV).

As partículas de magnetita sintetizadas apresentam-se esféricas e com tamanho uniforme, como pode ser observado em ambas as imagens. O tamanho médio de partícula estimado pelas imagens de MEV foi de 187 nm, com desvio padrão de 15 nm, considerando uma população de 550 partículas. Por TEM foram obtidos resultados concordantes, onde o diâmetro foi estimado em 175 nm, com desvio padrão de 12 nm e população de 70 partículas.

A estrutura cristalina das partículas de magnetita foi avaliada por difração de raios X e os difratogramas obtidos estão apresentados na Figura 32.

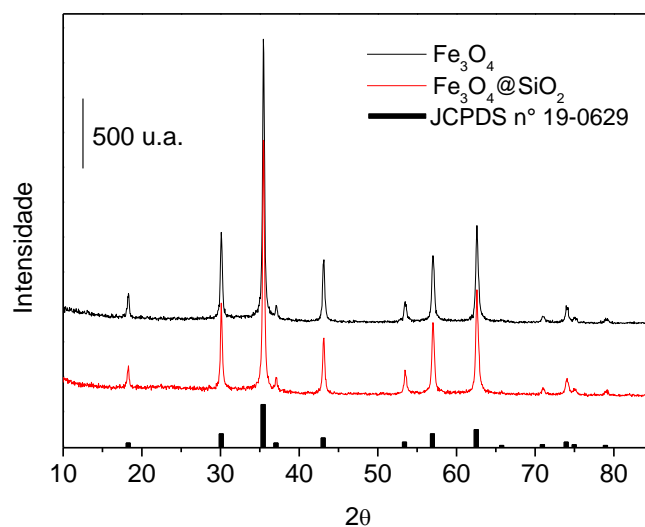


Figura 32. Difratogramas de raios X dos materiais Fe₃O₄ e Fe₃O₄@SiO₂. As barras localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores padrão de 2θ para a magnetita (JCPDS n° 19-0629).

O perfil de difração obtido para a amostra Fe₃O₄ é concordante com os valores de 2θ padrões para a magnetita (JCPDS n° 19-0629), caracterizando, portanto, sua estrutura de espinélio inverso com arranjo cúbico de face centrada. O tamanho do domínio cristalino foi estimado utilizando a equação de Scherrer,^{193,194} através da largura a meia altura para o pico correspondente ao plano cristalino (311), o qual se apresenta com maior intensidade. O tamanho de cristalito calculado foi de 28 nm e com base nos tamanhos das partículas observados por microscopia eletrônica, pode-se dizer que as partículas de Fe₃O₄ obtidas são policristalinas, *i.e.* compostas por vários grãos cristalinos¹⁹³ com tamanho médio de 28 nm.

A similaridade entre os perfis de difração dos materiais Fe₃O₄ e Fe₃O₄@SiO₂ indica que o processo de crescimento de uma camada de sílica em torno das partículas

de magnetita não afeta sua estrutura cristalina. A confirmação do recobrimento das partículas com sílica no material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ foi obtida por TEM, conforme apresentado na Figura 33, onde um contorno acinzentado é observado nas partículas, com espessura média de 30 nm.

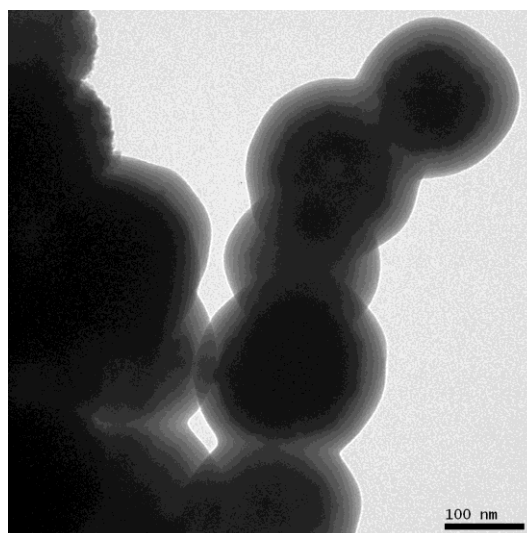


Figura 33. Imagem de TEM do material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (tensão de aceleração de 80 kV).

O xerogel magnético de sílica/titânia foi sintetizado empregando o método sol-gel, que, pelo controle nos parâmetros de síntese, permite realizar a hetero-condensação de precursores distintos, no caso os alcóxidos de silício e titânio.⁴⁶ Ainda, em função da cinética relativamente lenta das reações, é possível adicionar as partículas magnéticas no estado sol que, evoluindo para o estado gel e após evaporação do solvente, leva a obtenção de um xerogel de $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ com as partículas magnéticas homogeneamente dispersas.¹⁷

A incorporação das magnetitas no material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ -MGP pode ser evidenciada pela presença do padrão de difração da magnetita (JCPDS n° 19-0629) no seu difratograma (Figura 34). Ainda, o halo da sílica/titânia amorfa pode ser observado em 2θ próximo de 24° .¹⁹² A presença de picos em $13,8^\circ$, $23,5^\circ$, $27,9^\circ$, $48,1^\circ$, $49,4^\circ$ nos difratogramas foi atribuída a possível formação de um derivado do oxofluorotitanato de amônio,²⁰⁷ resultado da presença de amônia residual e do catalisador fluoreto nas reações de gelificação do precursor de titânia.

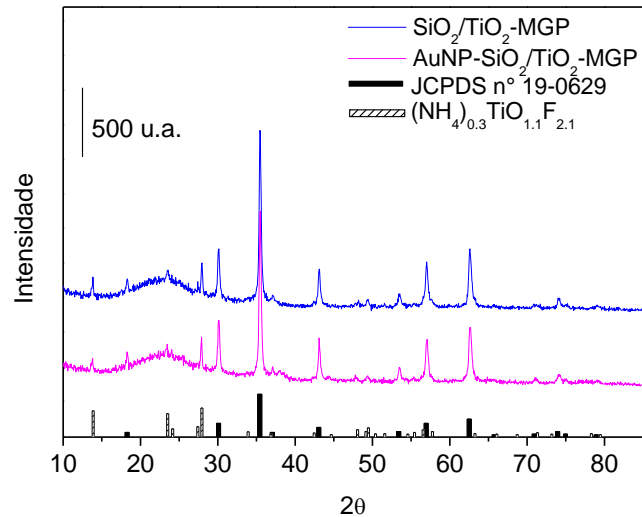


Figura 34. Difratomogramas de raios X dos materiais $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ e $\text{AuNP-SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$. As barras localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores padrão de 2θ para a magnetita (JCPDS n° 19-0629) e para o composto $(\text{NH}_4)_{0.3}\text{TiO}_{1.1}\text{F}_{2.1}$.²⁰⁷

A dispersão das partículas de magnetita no material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ pode ser observada na imagem obtida por MEV-FEG apresentada na Figura 35. A imagem foi adquirida com elétrons retroespalhados²⁰⁴ e, portanto, as magnetitas são observadas como pontos brilhantes incrustados em um grão fosco de sílica/titânia. Na figura inserida, com maior magnificação da região, é possível melhor observar a presença das partículas esféricas de magnetita na microestrutura de sílica/titânia.

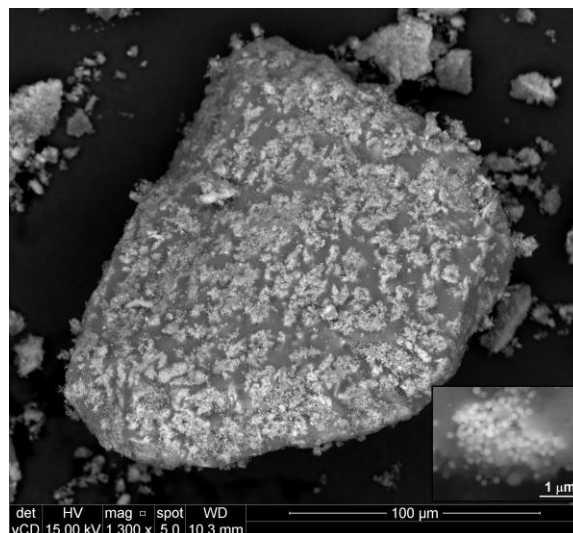


Figura 35. Imagens de MEV-FEG do material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ adquiridas com elétrons retroespalhados (tensão de aceleração de 15 kV).

O material SiO₂/TiO₂-MGP foi empregado como suporte para nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana (Ch-AuNP). A dispersão aquosa de Ch-AuNP foi caracterizada por espectroscopia na região do UV-Vis (Figura 36), onde observou-se a presença de uma banda com máximo em 527 nm. Esta banda é devido à ressonância de plasmon de superfície, resultado da oscilação coletiva e coerente dos elétrons de condução do ouro quando sob ação do campo eletromagnético da luz.^{208,209} A presença da banda nessa região é típica para nanopartículas de ouro esféricas, sendo reportadas na literatura nanopartículas de ouro menores que 10 nm com valores de λ no máximo de absorção próximos ao encontrado neste trabalho.^{208,210} A dispersão de Ch-AuNP também foi caracterizada por TEM (Figura 37), onde confirmou-se a obtenção de nanopartículas esféricas, com um diâmetro médio de 6,5 nm ($\sigma = 2,0$ nm), considerando uma população de 947 partículas.

Após o contato da dispersão de Ch-AuNP com o material SiO₂/TiO₂-MGP, o sobrenadante coletado foi submetido à espectroscopia na região do UV-Vis (Figura 36), onde a ausência da banda de ressonância de plasmon das AuNP foi observada, o que sugere a completa adsorção das Ch-AuNP na superfície do xerogel.

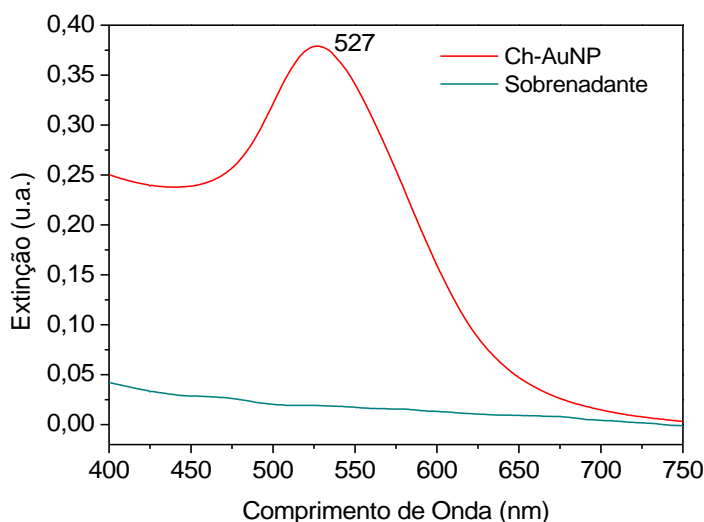


Figura 36. Espectro na região do UV-Vis da dispersão de AuNP estabilizada por quitosana (fator de diluição: 10 \times) e do sobrenadante (após imobilização no material SiO₂/TiO₂-MGP),

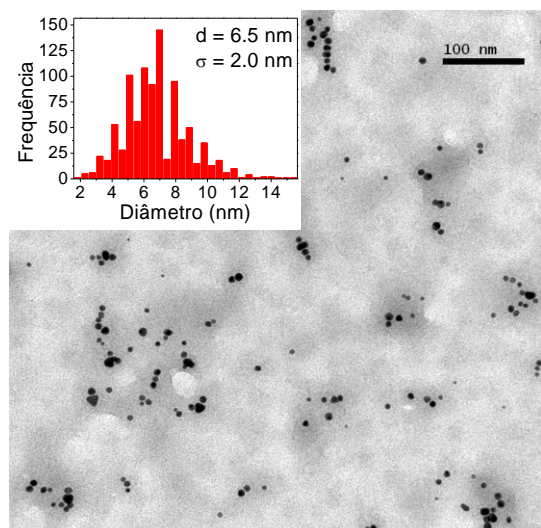


Figura 37. Imagem de TEM da dispersão de AuNP estabilizada por quitosana e histograma da distribuição de tamanho das partículas.

A interação entre Ch-AuNP e a superfície do material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ pode ser explicada pela coordenação entre os grupos amino da quitosana (caráter σ doador) e a titânia (caráter ácido de Lewis).^{47,48} Neste sentido, ao ser imobilizada na superfície da sílica/titânia, a quitosana permite o ancoramento das nanopartículas de ouro. O conteúdo de ouro ancorado no material AuNP- $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$ foi estimado considerando a adsorção total da quantidade de Au oferecida como AuNP em dispersão. O valor estimado é de 0,51% ou 5,1 mg Au por g de material. Essa baixa quantidade justifica o não aparecimento de picos relacionados à estrutura cristalina do ouro no difratograma de raios X apresentado na Figura 34.

Por análise termogravimétrica foi evidenciado a imobilização das Ch-AuNP no material $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$. Os termogramas obtidos estão apresentados na Figura 38 e os respectivos valores de perda de massa estão sumarizados na Tabela 9.

Partindo da temperatura ambiente até 150 °C, as perdas de massa foram atribuídas à dessorção de água.²¹¹ Partindo de 150 °C até 750 °C, em ambos os materiais, é observada uma perda de massa contínua atribuída às reações de desidroxilação da sílica/titânia. No material AuNP- $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$, esta perda de massa é acentuada pela decomposição e dessorção da quitosana.²¹¹ Na Tabela 9, é melhor observado o aumento nos valores de perda de massa para o material AuNP- $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2\text{-MGP}$, comprovando a imobilização da quitosana e, conseqüentemente, a incorporação das AuNP.

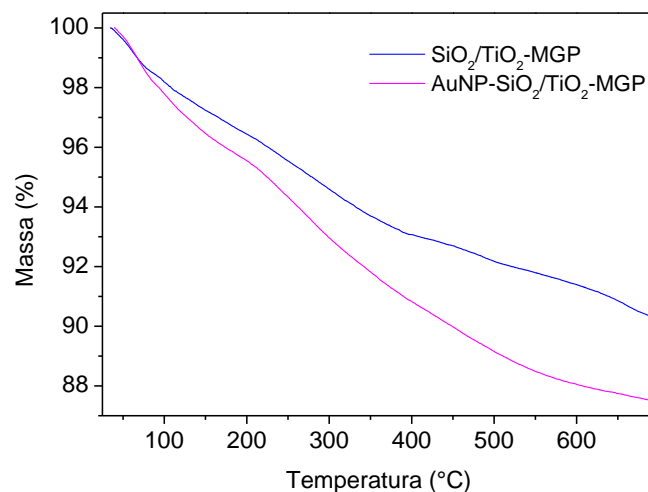


Figura 38. Termogramas obtidos para os materiais SiO₂/TiO₂-MGP e AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP.

Tabela 9. Perdas de massa obtidas a partir dos termogramas e discriminadas de acordo com as faixas de temperatura.

| Material | Perdas de massa (%) | |
|--|-------------------------|------------|
| | T _{am} -150 °C | 150-750 °C |
| SiO ₂ /TiO ₂ -MGP | 2,65 | 5,83 |
| AuNP-SiO ₂ /TiO ₂ -MGP | 3,48 | 8,38 |

A Figura 39 apresenta uma imagem de TEM do material AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP, onde é possível distinguir agregados das partículas de magnetita (> 100 nm) nas regiões escuras unidos pela sílica/titânia (região cinza), e também alguns pequenos pontos densos correspondentes às Ch-AuNP inseridas na sílica/titânia.

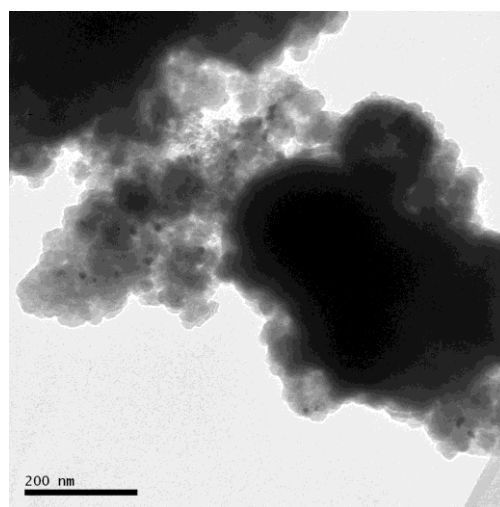


Figura 39. Imagem de TEM do material AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP (tensão de aceleração: 80 kV).

Para os materiais SiO₂/TiO₂-MGP e AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP realizou-se análise textural através das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio, as quais estão apresentadas na Figura 40.

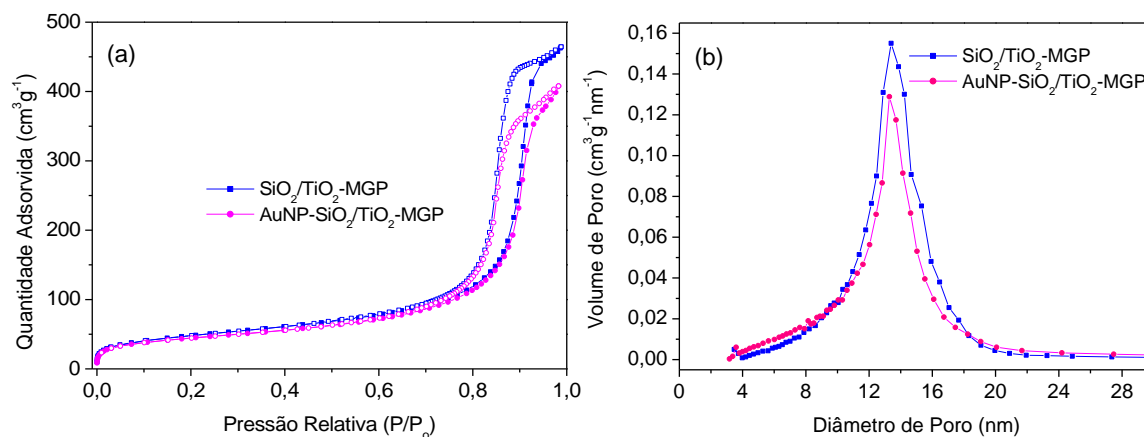


Figura 40. (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e (b) distribuição de diâmetro de poros para os materiais SiO₂/TiO₂-MGP e AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP.

É possível identificar ambas as isotermas como tipo IV, características de materiais mesoporosos,²² resultado do uso de fluoreto como catalisador no método sol-gel.^{19,185} Na Figura 40b estão apresentadas as distribuições de diâmetro de poro obtidas pelo método BJH, onde ambos os materiais apresentam máximo da distribuição localizado próximo de 13 nm. Como pode ser observado, a presença das AuNP não produz alterações marcantes nos diâmetros de poros, entretanto uma diminuição na área superficial específica e no volume de poro pode ser observada nos dados sumarizados na Tabela 10. Estas alterações também são um indicativo da imobilização das AuNP no xerogel magnético.

Tabela 10. Dados obtidos por análise textural dos materiais.

| Material | S _{BET} (± 5 m ² .g ⁻¹) | Volume de poro (± 0,001 cm ³ .g ⁻¹) |
|--|---|--|
| SiO ₂ /TiO ₂ MX | 170 | 0,708 |
| AuNP-SiO ₂ /TiO ₂ MX | 158 | 0,621 |

Todos os materiais foram estudados quanto às suas propriedades magnéticas e as histereses magnéticas obtidas a temperatura ambiente estão apresentadas na Figura 41. As histereses foram classificadas como laço maior, uma vez que a saturação magnética

foi alcançada com o campo máximo disponível,¹⁹⁷ comportamento esperado para materiais ferromagnéticos.

Os valores de magnetização de saturação para os materiais SiO₂/TiO₂-MGP e AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP foram 19 e 18 emu·g⁻¹ (± 2) e o campo coercitivo foi de 50 e 49 Oe (± 2), respectivamente, indicando que a incorporação de AuNP não interferiu na resposta magnética do material. Os valores discretos de magnetização de saturação são consequência da presença da sílica/titânia não-magnética, reduzindo o conteúdo de magnetita na massa total da amostra. Mesmo assim, o material AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP ainda apresenta resposta magnética adequada, sendo instantaneamente separado quando aplica-se um campo magnético externo.

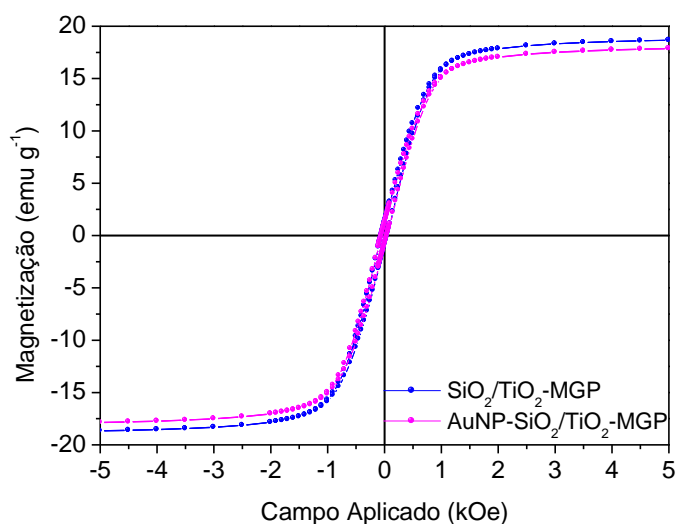


Figura 41. Laços de histerese dos materiais SiO₂/TiO₂-MGP e AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP.

5.3.2 Ensaios de atividade antimicrobiana

Testes antimicrobianos *in vitro* foram realizados para a bactéria Gram-negativa *E. coli*, a qual é considerada um indicador de contaminação fecal e está entre os principais agentes etiológicos envolvidos em surtos alimentares ou envolvendo água.^{167,168} Os resultados de inibição para essa bactéria, empregando os materiais sintetizados, estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Atividade antimicrobiana frente à bactéria *Escherichia coli* (ATCC 8739).

| Material | Contagens (log UFC·mL ⁻¹) ^a |
|---|--|
| SiO ₂ /TiO ₂ -MGP | 7,38 ± 0,02 |
| Quitosana-SiO ₂ /TiO ₂ -MGP | 7,41 ± 0,14 |
| AuNP-SiO ₂ /TiO ₂ -MGP | 4,46 ± 0,78 |

^a média das duplicatas

Para o material SiO₂/TiO₂-MGP a contagem foi de 7,38 log UFC·mL⁻¹, enquanto para o material AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP o valor obtido foi de 4,46 log UFC·mL⁻¹. Considerando a população inicial de bactérias 10⁴ UFC·mL⁻¹, é possível inferir que o material AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP apresentou efeito inibitório no crescimento da bactéria, uma vez que o material SiO₂/TiO₂-MGP permitiu o crescimento de *E. coli* em três ordens de magnitude. A quitosana por si só é um agente antimicrobiano extensamente conhecido,^{51,212-214} e portanto uma amostra branco, contendo quitosana mas não AuNP, foi preparada. Os testes antimicrobianos foram realizados nas mesmas condições e os resultados estão apresentados na Tabela 11. É claramente observado que a atividade antimicrobiana do AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP é unicamente devida às AuNP imobilizadas, uma vez que a amostra Quitosana-SiO₂/TiO₂-MGP apresentou a mesma resposta de sua matriz não modificada. O efeito inibitório observado para o material AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP (aproximadamente 3 log UFC·mL⁻¹) foi alcançado mesmo considerando a pequena quantidade de ouro no experimento (0,52 μmol de átomos na forma de nanopartículas). Já a falta de protagonismo da quitosana na ação antimicrobiana do sistema AuNP-SiO₂/TiO₂-MGP pode ser relacionada com o pH, uma vez que a quitosana possui maior atividade antimicrobiana em pH reduzido.^{213,215}

Uma vez que o material é magneticamente separável, seu reciclo como agente antimicrobiano foi avaliado submetendo o mesmo material a duas suspensões de bactéria, individualmente e intercaladas por uma etapa de desinfecção. O efeito inibitório no segundo ciclo foi de 102% em relação ao primeiro ciclo, o que indica a eficiência e a reciclabilidade do material.

5.3.3 Conclusões parciais

O xerogel magnético de sílica/titânia funcionalizado com AuNP foi obtido utilizando o método sol-gel, através da hetero-condensação dos precursores de sílica e titânia. Esse xerogel combinou diversas funcionalidades em um único material: a estrutura porosa da sílica, a reatividade de superfície da titânia, a separação magnética da magnetita e a atividade antimicrobiana das AuNP estabilizadas pela quitosana. As análises estruturais e morfológicas confirmaram a presença das partículas de magnetita no xerogel, e também a incorporação de AuNP esféricas e menores que 10 nm. Com uma elevada área superficial específica mesmo após a imobilização das AuNP, o material final apresentou efeito inibitório no crescimento da bactéria *E. coli*, mantendo 102% da atividade inicial no segundo ciclo. Por apresentar propriedades texturais arquitetadas, este material apresenta-se como um suporte versátil para nanoestruturas. Ainda, a boa biocompatibilidade de seus componentes e a atividade antimicrobiana das AuNP permitem a esse sistema excelente desempenho antimicrobiano, sendo imediatamente recuperados e reutilizados.

6. Conclusão

Neste trabalho, buscou-se desenvolver novas metodologias para a obtenção de suportes com separabilidade magnética e propriedades texturais adequadas para a imobilização e reutilização de espécies, com potenciais bioaplicações em catálise enzimática e dispositivos antimicrobianos. Para isso, foram utilizadas partículas de magnetita, sintetizadas pelo método solvotérmico com elevada magnetização, as quais propiciaram resposta magnética mesmo quando presentes em menor proporção nos materiais. As características texturais, como alta área superficial e meso ou macroporosidade, foram arquitetadas e alcançadas utilizando sílica em duas diferentes configurações: esferas ocas de sílica acopladas às partículas de magnetita ou partículas de magnetita encapsuladas na rede de sílica com porosidade controlada pelo método sol-gel.

Sendo assim, este trabalho demonstra a versatilidade de utilizar rotas sintéticas já estabelecidas, como o método sol-gel e o método de Stöber, na arquitetura de novos sistemas porosos e magnéticos, com morfologias, propriedades texturais e configurações distintas. O método sol-gel permitiu a obtenção de materiais mesoporosos – sílicas e óxidos mistos como sílica/titânia – contendo partículas de magnetita encapsuladas. Ainda, ao empregar o método de Stöber no recobrimento de partículas de magnetita com sílica e combiná-lo com lixiviação ácida controlada, foram obtidos microcontêineres acessíveis e com mobilidade magnética. Esses materiais foram utilizados em aplicações com impacto biológico, como biocatálise e sistemas antimicrobianos, com ótimas performances, fácil manuseio e excelente reciclabilidade. Abrem, ainda, perspectivas para aplicações em outras áreas, como catálise em ambiente confinado, encapsulação e carreamento de fármacos, bem como adsorção de contaminantes.

7. Referências

- (1) Teja, A. S.; Koh, P. Y. Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2009**, *55*, 22–45.
- (2) Mattis, D. C. History of Magnetism. In *The Theory of Magnetism I*; Springer, Berlin, Heidelberg: Berlin, 1981; p 1–38.
- (3) Silva, F. G. da; Depeyrot, J.; Campos, A. F. C.; Aquino, R.; Fiorani, D.; Peddis, D. Structural and Magnetic Properties of Spinel Ferrite Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 4888–4902.
- (4) Koo, K. N.; Ismail, A. F.; Othman, M. H. D.; Rahman, M. A.; Sheng, T. Z. Preparation and Characterization of Superparamagnetic Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles: A Short Review. *Malaysian J. Fundam. Appl. Sci.* **2019**, *15* (1), 23–31.
- (5) Sahu, S.; Sinha, N.; Bhutia, S. K.; Majhi, M.; Mohapatra, S. Luminescent Magnetic Hollow Mesoporous Silica Nanotheranostics for Camptothecin Delivery and Multimodal Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3799–3808.
- (6) Iglesias, G. R.; Reyes-Ortega, F.; Fernandez, B. L. C.; Delgado, Á. V. Hyperthermia-Triggered Gemcitabine Release from Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles. *Polymers.* **2018**, *10*, 269.
- (7) Nicolás, P.; Ferreira, M. L.; Lassalle, V. A Review of Magnetic Separation of Whey Proteins and Potential Application to Whey Proteins Recovery, Isolation and Utilization. *J. Food Eng.* **2019**, *246*, 7–15.
- (8) Reyes-Ortega, F.; Delgado, Á. V.; Schneider, E. K.; Fernández, B. L. C.; Iglesias, G. R. Magnetic Nanoparticles Coated with a Thermosensitive Polymer with Hyperthermia Properties. *Polymers.* **2018**, *10*, 10.
- (9) Baghban, A.; Heidarizadeh, M.; Doustkhah, E.; Rostamnia, S.; Rezaei, P. F. Covalently Bonded Pancreatic Lipase onto the Dithiocarbamate / Chitosan-Based Magnetite: Stepwise Fabrication of Fe₃O₄@CS/NHCS-Lip as a Novel and Promising Nanobiocatalyst. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *103*, 1194–1200.
- (10) Nicolás, P.; Lassalle, V.; Ferreira, M. L. Immobilization of CALB on Lysine-Modified Magnetic Nanoparticles: Influence of the Immobilization Protocol. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2018**, *41*, 171–184.
- (11) Kalantari, F.; Ramazani, A.; Heravi, M. R. P. Recent Advances in the Applications of Hybrid Magnetic Nanomaterials as Magnetically Retrievable Nanocatalysts. *Curr. Org. Chem.* **2019**, *23*, 136–163.
- (12) Cendrowski, K.; Sikora, P.; Zielinska, B.; Horszczaruk, E.; Mijowska, E. Chemical and Thermal Stability of Core-Shelled Magnetite Nanoparticles and Solid Silica. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *407*, 391–397.
- (13) Khan, U. S.; Amanullah; Manan, A.; Khan, N.; Mahmood, A.; Rahim, A. Transformation Mechanism of Magnetite Nanoparticles. *Mater. Sci. Pol.* **2015**, *33*, 278–285.
- (14) Ketteler, G.; Weiss, W.; Ranke, W.; Schlögl, R. Bulk and Surface Phases of Iron Oxides in an Oxygen and Water Atmosphere at Low Pressure. *Phys. Chem.*

- Chem. Phys.* **2001**, *3*, 1114–1122.
- (15) Muan, A. Phase Equilibria at High Temperatures in Oxide Systems Involving Changes in Oxidation States. *Am. J. Sci.* **1958**, *256*, 171–207.
 - (16) Zucca, P.; Sanjust, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules* **2014**, *19*, 14139–14194.
 - (17) Morawski, F. M.; Deon, M.; Nicolodi, S.; de Menezes, E. W.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Benvenuti, E. V.; Arenas, L. T. Magnetic Silica/Titania Xerogel Applied as Electrochemical Biosensor for Catechol and Catecholamines. *Electrochim. Acta* **2018**, *264*, 319–328.
 - (18) Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, 2 ed.; Wiley-VCH, 2003.
 - (19) Caldas, E. M.; Novatzky, D.; Deon, M.; de Menezes, E. W.; Hertz, P. F.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T.; Benvenuti, E. V. Pore Size Effect in the Amount of Immobilized Enzyme for Manufacturing Carbon Ceramic Biosensor. *Microporous Mesoporous Mater.* **2017**, *247*, 95–102.
 - (20) Hudson, S.; Cooney, J.; Magner, E. Proteins in Mesoporous Silicates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 8582–8594.
 - (21) Hudson, S.; White, S.; Goradia, D.; Essa, H.; Liu, B.; Qiao, L.; Liu, Y.; Cooney, J.; Hodnett, B. K.; Magner, E. Proteins in Mesoporous Silicates. In *Biomolecular Catalysis*; 2008; Vol. 986, pp 49–60.
 - (22) Sing, K. S. W.; Everett, D. H.; Haul, R. A. W.; Moscou, L.; Pierotti, R. A.; Rouquérol, J.; Siemieniowska, T. Reporting Physisorption Data For Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603–619.
 - (23) Feinle, A.; Elsaesser, M. S.; Hüsing, N. Sol-Gel Synthesis of Monolithic Materials with Hierarchical Porosity. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 3377–3399.
 - (24) Bao, Y.; Shi, C.; Wang, T.; Li, X.; Ma, J. Recent Progress in Hollow Silica: Template Synthesis, Morphologies and Applications. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *227*, 121–136.
 - (25) Lee, J.; Kim, S. M.; Lee, I. S. Functionalization of Hollow Nanoparticles for Nanoreactor Applications. *Nano Today* **2014**, *9*, 631–667.
 - (26) Chen, Y.; Chen, H.; Guo, L.; Shi, J. Magnetic Hollow Mesoporous Silica Nanospheres: Facile Fabrication and Ultrafast Immobilization of Enzymes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 10844–10848.
 - (27) Zhao, Q.; Wang, S.; Yang, Y.; Li, X.; Di, D.; Zhang, C.; Jiang, T.; Wang, S. Hyaluronic Acid and Carbon Dots-Gated Hollow Mesoporous Silica for Redox and Enzyme-Triggered Targeted Drug Delivery and Bioimaging. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 475–484.
 - (28) Tan, L.; Wu, X.; Chen, D.; Liu, H.; Meng, X.; Tang, F. Confining Alloy or Core-Shell Au-Pd Bimetallic Nanocrystals in Silica Nanorattles for Enhanced Catalytic Performance. *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 10382–10388.
 - (29) Gao, A.; Xu, W.; Ponce de León, Y.; Bai, Y.; Gong, M.; Xie, K.; Park, B. H.; Yin, Y. Controllable Fabrication of Au Nanocups by Confined-Space Thermal Dewetting for OCT Imaging. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1–7.

- (30) Yi, D. K.; Lee, S. S.; Papaefthymiou, G. C.; Ying, J. Y. Nanoparticle Architectures Templated by SiO₂/Fe₂O₃ Nanocomposites. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 614–619.
- (31) Yang, J.; Lee, J.; Kang, J.; Lee, K.; Suh, J.-S.; Yoon, H.-G.; Huh, Y.-M.; Haam, S. Hollow Silica Nanocontainers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir* **2008**, *24*, 3417–3421.
- (32) Benvenuti, E. V.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; Gallas, M. R. Materiais Híbridos à Base de Sílica Obtidos Pelo Método Sol-Gel. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1926–1933.
- (33) Ciriminna, R.; Fidalgo, A.; Pandarus, V.; Béland, F.; Ilharco, L. M.; Pagliaro, M. The Sol-Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6592–6620.
- (34) Deon, M.; Caldas, E. M.; da Rosa, D. S.; de Menezes, E. W.; Dias, S. L. P.; Pereira, M. B.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T.; Benvenuti, E. V. Mesoporous Silica Xerogel Modified with Bridged Ionic Silsesquioxane Used to Immobilize Copper Tetrasulfonated Phthalocyanine Applied to Electrochemical Determination of Dopamine. *J. Solid State Electrochem.* **2015**, *19*, 2095–2105.
- (35) Gay, D. S. F.; Fernandes, T. H. M.; Amavisca, C. V.; Cardoso, N. F.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H.; Lima, E. C. Silica Grafted with a Silsesquioxane Containing the Positively Charged 1,4-Diazoniabicyclo[2.2.2]Octane Group Used as Adsorbent for Anionic Dye Removal. *Desalination* **2010**, *258*, 128–135.
- (36) Didó, C. A.; Caneppele, C. D. G.; Schneid, A. C.; Pereira, M. B.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V. Small Gold Nanoparticles with Narrow Size Distribution Achieved in SBA-15 Pores by Using Ionic Silsesquioxane Instead of Thiol Group as Stabilizer and Adhesion Agent. *Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *270*, 48–56.
- (37) Machado, G. B. Preparação e Aplicações Dos Silsesquioxanos Dicarboxilatos de Cadeia Longa Derivados Do Precursor Dicatiônico Bis(3-N-Propiltri-hidroxisilil)-1,4 Diazoniabicyclo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
- (38) Osorio, A. G.; Machado, G. B.; Pereira, M. B.; Benvenuti, E. V.; Pereira, L. G.; Bergmann, C. P.; de Oliveira, A. H.; Costa, T. M. H. Synthesis and Characterization of Magnetic Carbon Nanotubes/Silsesquioxane Nanocomposite Thin Films. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *371*, 9–15.
- (39) Silva, P. R.; Almeida, V. O.; Machado, G. B.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H.; Gallas, M. R. Surfactant-Based Dispersant for Multiwall Carbon Nanotubes to Prepare Ceramic Composites by a Sol-Gel Method. *Langmuir* **2012**, *28*, 1447–1452.
- (40) Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Uses and Prospects as an Industrial Biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *62*, 197–212.
- (41) Blanco, R. M.; Terreros, P.; Fernández-Pérez, M.; Otero, C.; Díaz-González, G. Functionalization of Mesoporous Silica for Lipase Immobilization: Characterization of the Support and the Catalysts. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2004**, *30*, 83–93.
- (42) Carvalho, N. B.; Lima, Á. S.; Soares, C. M. F. Use of Modified Silicas for Lipase

- Immobilization. *Quim. Nova* **2014**, *38*, 399–409.
- (43) Dwivedee, B. P.; Soni, S.; Sharma, M.; Bhaumik, J.; Laha, J. K.; Banerjee, U. C. Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (9), 2441–2466.
- (44) Sarno, M.; Iuliano, M. Highly Active and Stable Fe₃O₄/Au Nanoparticles Supporting Lipase Catalyst for Biodiesel Production from Waste Tomato. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *474*, 135–146.
- (45) Onoja, E.; Chandren, S.; Razak, F. I. A.; Wahab, R. A. Extraction of Nanosilica from Oil Palm Leaves and Its Application as Support for Lipase Immobilization. *J. Biotechnol.* **2018**, *283*, 81–96.
- (46) Laranjo, M. T.; Ricardi, N. C.; Arenas, L. T.; Benvenuti, E. V.; de Oliveira, M. C.; Santos, M. J. L.; Costa, T. M. H. TiO₂ and TiO₂/SiO₂ Nanoparticles Obtained by Sol–Gel Method and Applied on Dye Sensitized Solar Cells. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2014**, *72*, 273–281.
- (47) El Kadib, A.; Bousmina, M. Chitosan Bio-Based Organic-Inorganic Hybrid Aerogel Microspheres. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8264–8277.
- (48) El Kadib, A.; Molvinger, K.; Cacciaguerra, T.; Bousmina, M.; Brunel, D. Chitosan Templated Synthesis of Porous Metal Oxide Microspheres with Filamentary Nanostructures. *Microporous Mesoporous Mater.* **2011**, *142*, 301–307.
- (49) Karthikeyan, K. T.; Nithya, A.; Jothivenkatachalam, K. Photocatalytic and Antimicrobial Activities of Chitosan-TiO₂ Nanocomposite. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1762–1773.
- (50) Bui, V. K. H.; Park, D.; Lee, Y. C. Chitosan Combined with ZnO, TiO₂ and Ag Nanoparticles for Antimicrobial Wound Healing Applications: A Mini Review of the Research Trends. *Polymers.* **2017**, *9*, 21.
- (51) Anitha, A.; Sowmya, S.; Kumar, P. T. S.; Deepthi, S.; Chennazhi, K. P.; Ehrlich, H.; Tsurkan, M.; Jayakumar, R. Chitin and Chitosan in Selected Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1644–1667.
- (52) Rudramurthy, G. R.; Swamy, M. K.; Sinniah, U. R.; Ghasemzadeh, A. Nanoparticles: Alternatives against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules* **2016**, *21*, 836.
- (53) Thomas, V.; Yallapu, M. M.; Sreedhar, B.; Bajpai, S. K. Fabrication, Characterization of Chitosan/Nanosilver Film and Its Potential Antibacterial Application. *J. Biomater. Sci.* **2009**, *20*, 2129–2144.
- (54) Leiva, A.; Bonarrrd, S.; Pino, M.; Saldías, C.; Kortaberria, G.; Radić, D. Improving the Performance of Chitosan in the Synthesis and Stabilization of Gold Nanoparticles. *Eur. Polym. J.* **2015**, *68*, 419–431.
- (55) Zheng, K.; Setyawati, M. I.; Leong, D. T.; Xie, J. Antimicrobial Gold Nanoclusters. *ACS Nano* **2017**, *11*, 6904–6910.
- (56) Dizaj, S. M.; Lotfipour, F.; Barzegar-Jalali, M.; Zarrintan, M. H.; Adibkia, K. Antimicrobial Activity of the Metals and Metal Oxide Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *44*, 278–284.
- (57) Fernandez-Moure, J. S.; Evangelopoulos, M.; Colvill, K.; Van Eps, J. L.;

- Tasciotti, E. Nanoantibiotics: A New Paradigm for the Treatment of Surgical Infection. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 1319–1334.
- (58) Cui, Y.; Zhao, Y.; Tian, Y.; Zhang, W.; Lü, X.; Jiang, X. The Molecular Mechanism of Action of Bactericidal Gold Nanoparticles on Escherichia Coli. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2327–2333.
- (59) Niemirowicz, K.; Swiecicka, I.; Wilczewska, A. Z.; Misztalewska, I.; Kalska-Szostko, B.; Bienias, K.; Bucki, R.; Car, H. Gold-Functionalized Magnetic Nanoparticles Restrict Growth of Pseudomonas Aeruginosa. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 2217–2224.
- (60) Osonga, F. J.; Yazgan, I.; Kariuki, V.; Luther, D.; Jimenez, A.; Le, P.; Sadik, O. A. Greener Synthesis and Characterization, Antimicrobial and Cytotoxicity Studies of Gold Nanoparticles of Novel Shapes and Sizes. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 2302–2313.
- (61) Khan, F. U.; Chen, Y.; Khan, N. U.; Ahmad, A.; Tahir, K.; Khan, Z. U. H.; Khan, A. U.; Khan, S. U.; Raza, M.; Wan, P. Visible Light Inactivation of E. Coli, Cytotoxicity and ROS Determination of Biochemically Capped Gold Nanoparticles. *Microb. Pathog.* **2017**, *107*, 419–424.
- (62) Hoseinzadeh, E.; Makhdoumi, P.; Taha, P.; Hossini, H.; Stelling, J.; Amjad Kamal, M.; Md. Ashraf, G. A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. *Curr. Drug Metab.* **2016**, *18*, 120–128.
- (63) Maboudi, S. A.; Shojaosadati, S. A.; Aliakbari, F.; Arpanaei, A. Theranostic Magnetite Cluster@silica@albumin Double-Shell Particles as Suitable Carriers for Water-Insoluble Drugs and Enhanced T2 MR Imaging Contrast Agents. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *99*, 1485–1492.
- (64) Hasegawa, T.; Niibori, T.; Takemasa, Y.; Oikawa, M. Stabilisation of Tetragonal FeCo Structure with High Magnetic Anisotropy by the Addition of V and N Elements. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5248.
- (65) Ali, N.; Zaman, H.; Bilal, M.; Shah, A. ul H. A.; Nazir, M. S.; Iqbal, H. M. N. Environmental Perspectives of Interfacially Active and Magnetically Recoverable Composite Materials – A Review. *Sci. Total Environ.* **2019**, *670*, 523–538.
- (66) Pessoa Júnior, O. Modelo Causal Dos Primórdios Da Ciência Do Magnetismo. *Sci. Stud.* **2010**, *8*, 195–212.
- (67) Wang, X.; Liao, Y.; Zhang, D.; Wen, T.; Zhong, Z. A Review of Fe₃O₄ Thin Films: Synthesis, Modification and Applications. *J. Mater. Sci. Technol.* **2018**, *34*, 1259–1272.
- (68) Moyer, J. A.; Vaz, C. A. F.; Arena, D. A.; Kumah, D.; Negusse, E.; Henrich, V. E. Magnetic Structure of Fe-Doped CoFe₂O₄ Probed by x-Ray Magnetic Spectroscopies. *Phys. Rev. B* **2011**, *84*, 054447.
- (69) Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M. F.; Gutiérrez, L.; Morales, M. P.; Böhm, I. B.; Heverhagen, J. T.; Prospero, D.; Parak, W. J. Biological Applications of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4306–4334.
- (70) Lin, C.-R.; Chu, Y.-M.; Wang, S.-C. Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles Prepared by Mechanochemical Reaction. *Mater. Lett.* **2006**, *60*, 447–450.

- (71) Abakumov, M. A.; Semkina, A. S.; Skorikov, A. S.; Vishnevskiy, D. A.; Ivanova, A. V.; Mironova, E.; Davydova, G. A.; Majouga, A. G.; Chekhonin, V. P. Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles: Size and Coating Effects. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2018**, *32*, e22225.
- (72) Drozdov, A. S.; Shapovalova, O. E.; Ivanovski, V.; Avnir, D.; Vinogradov, V. V. Entrapment of Enzymes within Sol-Gel-Derived Magnetite. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 2248–2253.
- (73) Khanna, L.; Verma, N. K.; Tripathi, S. K. Burgeoning Tool of Biomedical Applications - Superparamagnetic Nanoparticles. *J. Alloys Compd.* **2018**, *752*, 332–353.
- (74) Sangaiya, P.; Jayaprakash, R. A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *J. Supercond. Nov. Magn.* **2018**, *31*, 3397–3413.
- (75) Morita, Y.; Sakurai, R.; Wakimoto, T.; Kobayashi, K.; Xu, B.; Toku, Y.; Song, G.; Luo, Q.; Ju, Y. TLYP-1-Conjugated Core-Shell Nanoparticles, Fe₃O₄NPs@mSiO₂ for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *474*, 17–24.
- (76) Doswald, S.; Stark, W. J.; Beck-Schimmer, B. Biochemical Functionality of Magnetic Particles as Nanosensors: How Far Away Are We to Implement Them into Clinical Practice? *J. Nanobiotechnology* **2019**, *17*, 73.
- (77) López, Y. C.; Ortega, G. A.; Reguera, E. Magnetic Detergent with Potential Application for Diesel Spills Removal from Seawater. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, *561*, 120–127.
- (78) Nuri, A.; Mansoori, Y.; Bezaatpour, A.; Shchukarev, A.; Mikkola, J. P. Magnetic Mesoporous SBA-15 Functionalized with a NHC Pd(II) Complex: An Efficient and Recoverable Nanocatalyst for Hiyama Reaction. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 1820–1829.
- (79) Döpke, C.; Grothe, T.; Steblinski, P.; Klöcker, M.; Sabantina, L.; Kosmalka, D.; Blachowicz, T.; Ehrmann, A. Magnetic Nanofiber Mats for Data Storage and Transfer. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 92.
- (80) Favela-Camacho, S. E.; Samaniego-Benítez, E. J.; Godínez-García, A.; Avilés-Arellano, L. M.; Pérez-Robles, J. F. How to Decrease the Agglomeration of Magnetite Nanoparticles and Increase Their Stability Using Surface Properties. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, *574*, 29–35.
- (81) Barnakov, Y. A.; Yu, M. H.; Rosenzweig, Z. Manipulation of the Magnetic Properties of Magnetite-Silica Nanocomposite Materials by Controlled Stober Synthesis. *Langmuir* **2005**, *21*, 7524–7527.
- (82) Dadfar, S. M.; Roemhild, K.; Drude, N. I.; von Stillfried, S.; Knüchel, R.; Kiessling, F.; Lammers, T. Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 302–325.
- (83) Zhang, L.; He, R.; Gu, H.-C. Oleic Acid Coating on the Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2006**, *253*, 2611–2617.
- (84) Mao, J.; Jiang, W.; Gu, J.; Zhou, S.; Lu, Y.; Xie, T. Synthesis of P (St-DVB)/Fe₃O₄ Microspheres and Application for Oil Removal in Aqueous Environment. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *317*, 787–793.

- (85) Zuin, A.; Cousseau, T.; Sinatora, A.; Toma, S. H.; Araki, K.; Toma, H. E. Lipophilic Magnetite Nanoparticles Coated with Stearic Acid: A Potential Agent for Friction and Wear Reduction. *Tribol. Int.* **2017**, *112*, 10–19.
- (86) Dadwal, A.; Joy, P. A. Influence of Chain Length of Long-Chain Fatty Acid Surfactant on the Thermal Conductivity of Magnetite Nanofluids in a Magnetic Field. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2018**, *555*, 525–531.
- (87) Tie, S. L.; Lin, Y. Q.; Lee, H. C.; Bae, Y. S.; Lee, C. H. Amino Acid-Coated Nano-Sized Magnetite Particles Prepared by Two-Step Transformation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *273*, 75–83.
- (88) Culita, D. C.; Marinescu, G.; Patron, L.; Carp, O.; Cizmas, C. B.; Diamandescu, L. Superparamagnetic Nanomagnetites Modified with Histidine and Tyrosine. *Mater. Chem. Phys.* **2008**, *111*, 381–385.
- (89) Aghazadeh, M.; Karimzadeh, I.; Doroudi, T.; Ganjali, M. R.; Kolivand, P. H.; Gharailou, D. Facile Electrosynthesis and Characterization of Superparamagnetic Nanoparticles Coated with Cysteine, Glycine and Glutamine. *Appl. Phys. A* **2017**, *123*, 529.
- (90) Dabbagh, A.; Hedayatnasab, Z.; Karimian, H.; Sarraf, M.; Yeong, C. H.; Madaah Hosseini, H. R.; Abu Kasim, N. H.; Wong, T. W.; Rahman, N. A. Polyethylene Glycol-Coated Porous Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery of Chemotherapeutics under Magnetic Hyperthermia Condition. *Int. J. Hyperth.* **2019**, *36*, 104–114.
- (91) Keihan, A. H.; Veisi, H.; Biabri, P. M. Facile Synthesis of PEG-Coated Magnetite (Fe₃O₄) and Embedment of Gold Nanoparticle as a Nontoxic Antimicrobial Agent. *Appl. Organomet. Chem.* **2017**, *31*, e3873.
- (92) Jaime, J.; Rangel, G.; Muñoz-Bonilla, A.; Mayoral, A.; Herrasti, P. Magnetite as a Platform Material in the Detection of Glucose, Ethanol and Cholesterol. *Sensors Actuators B* **2017**, *238*, 693–701.
- (93) Andrade, M. F. C.; Parussulo, A. L. A.; Netto, C. G. C. M.; Andrade, L. H.; Toma, H. E. Lipase Immobilized on Polydopamine-Coated Magnetite Nanoparticles for Biodiesel Production from Soybean Oil. *Biofuel Res. J.* **2016**, *10*, 403–409.
- (94) Zhao, Y.; Yeh, Y.; Liu, R.; You, J.; Qu, F. Facile Deposition of Gold Nanoparticles on Core-Shell Fe₃O₄@polydopamine as Recyclable Nanocatalyst. *Solid State Sci.* **2015**, *45*, 9–14.
- (95) Somu, P.; Kannan, U.; Paul, S. Biomolecule Functionalized Magnetite Nanoparticles Efficiently Adsorb and Remove Heavy Metals from Contaminated Water. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2019**, *94*, 2009–2022.
- (96) El-kharrag, R.; Abdel Halim, S. S.; Amin, A.; Greish, Y. E. Synthesis and Characterization of Chitosan-Coated Magnetite Nanoparticles Using a Modified Wet Method for Drug Delivery Applications. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2019**, *68*, 73–82.
- (97) Khoramian, S.; Saeidifar, M.; Zamanian, A.; Saboury, A. A. Synthesis and Characterization of Biocompatible Ferrofluid Based on Magnetite Nanoparticles and Its Effect on Immunoglobulin G as an Immune Protein. *J. Mol. Liq.* **2019**, *273*, 326–338.

- (98) Hiremath, C. G.; Kariduraganavar, M. Y.; Hiremath, M. B. Synergistic Delivery of 5-Fluorouracil and Curcumin Using Human Serum Albumin-Coated Iron Oxide Nanoparticles by Folic Acid Targeting. *Prog. Biomater.* **2018**, *7*, 297–306.
- (99) Karamipour, S.; Sadjadi, M. S.; Farhadyar, N. Fabrication and Spectroscopic Studies of Folic Acid-Conjugated Fe₃O₄@Au Core-Shell for Targeted Drug Delivery Application. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *148*, 146–155.
- (100) Singh, P.; Shukla, M.; Upadhyay, C. Signatures of Consolidated Superparamagnetic and Spin-Glass Behavior in Magnetite-Silver Core-Shell Nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10*, 22583–22592.
- (101) Khashan, S.; Dagher, S.; Tit, N.; Alazzam, A.; Obaidat, I. Novel Method for Synthesis of Fe₃O₄@TiO₂ Core/Shell Nanoparticles. *Surf. Coatings Technol.* **2017**, *322*, 92–98.
- (102) de Mendonça, E. S. D. T.; de Faria, A. C. B.; Dias, S. C. L.; Aragón, F. F. H.; Mantilla, J. C.; Coaquira, J. A. H.; Dias, J. A. Effects of Silica Coating on the Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles. *Surf. Interface* **2019**, *14*, 34–43.
- (103) Yiu, H. H. P.; Keane, M. A.; Lethbridge, Z. A. D.; Lees, M. R.; El Haj, A. J.; Dobson, J. Synthesis of Novel Magnetic Iron Metal-Silica (Fe-SBA-15) and Magnetite-Silica (Fe₃O₄-SBA-15) Nanocomposites with a High Iron Content Using Temperature-Programed Reduction. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 255606.
- (104) Rimola, A.; Costa, D.; Sodupe, M.; Lambert, J.-F.; Ugliengo, P. Silica Surface Features and Their Role in the Adsorption of Biomolecules: Computational Modeling and Experiments. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4216–4313.
- (105) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- (106) Issa, A. A.; Luyt, A. S. Kinetics of Alkoxysilanes and Organoalkoxysilanes Polymerization: A Review. *Polymers* **2019**, *11*, 537.
- (107) Liu, X.; Qian, G.; Jiao, Z.; Wu, M.; Zhang, H. The Transformation of Hybrid Silica Nanoparticles from Solid to Hollow or Yolk-Shell Nanostructures. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 8066–8072.
- (108) Jin, C.; Wang, Y.; Tang, H.; Zhu, K.; Liu, X.; Wang, J. Versatile Rattle-Type Magnetic Mesoporous Silica Spheres, Working as Adsorbents and Nanocatalyst Containers. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2016**, *77*, 279–287.
- (109) Vojoudi, H.; Badiei, A.; Bahar, S.; Ziarani, G. M.; Faridbod, F.; Ganjali, M. R. A New Nano-Sorbent for Fast and Efficient Removal of Heavy Metals from Aqueous Solutions Based on Modification of Magnetic Mesoporous Silica Nanospheres. *J. Magn. Magn. Mater.* **2017**, *441*, 193–203.
- (110) Bhaduri, K.; Das, B. D.; Kumar, R.; Mondal, S.; Chatterjee, S.; Shah, S.; Bravo-Suárez, J. J.; Chowdhury, B. Recyclable Au/SiO₂-Shell/Fe₃O₄-Core Catalyst for the Reduction of Nitro Aromatic Compounds in Aqueous Solution. *ACS Omega* **2019**, *4*, 4071–4081.
- (111) Cai, W.; Guo, M.; Weng, X.; Zhang, W.; Chen, Z. Adsorption of Doxorubicin Hydrochloride on Glutaric Anhydride Functionalized Fe₃O₄@SiO₂ Magnetic Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *98*, 65–73.

- (112) Zhu, Y.; Ikoma, T.; Hanagata, N.; Kaskel, S. Rattle-Type Fe₃O₄@SiO₂ Hollow Mesoporous Spheres as Carriers for Drug Delivery. *Small* **2010**, *6*, 471–478.
- (113) Dai, J.; Zou, H.; Wang, R.; Wang, Y.; Shi, Z.; Qiu, S. Yolk-Shell Fe₃O₄@SiO₂@PMO: Amphiphilic Magnetic Nanocomposites as an Adsorbent and a Catalyst with High Efficiency and Recyclability. *Green Chem.* **2017**, *19*, 1336–1344.
- (114) Zhao, M.; Liu, J.; Lei, Z. PLA-PEG-Grafted Hollow Magnetic Silica Microspheres as the Carrier of Iodinated Contrast Media. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, 44914, DOI 10.1002/app.44914.
- (115) Yin, J. X.; Liu, Z. G.; Wu, S. F.; Wang, W. H.; Kong, W. D.; Richard, P.; Yan, L.; Ding, H. Unconventional Magnetization of Fe₃O₄ Thin Film Grown on Amorphous SiO₂ Substrate. *AIP Adv.* **2016**, *6*, 065111.
- (116) Li, Y.; Shi, J. Hollow-Structured Mesoporous Materials: Chemical Synthesis, Functionalization and Applications. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3176–3205.
- (117) Wang, X.; Feng, J.; Bai, Y.; Zhang, Q.; Yin, Y. Synthesis, Properties, and Applications of Hollow Micro-/Nanostructures. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10983–11060.
- (118) Ai, C.; Gong, G.; Zhao, X.; Liu, P. Macroporous Hollow Silica Microspheres-Supported Palladium Catalyst for Selective Hydrogenation of Nitrile Butadiene Rubber. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2017**, *77*, 250–256.
- (119) Ghasemi, S.; Farsangi, Z. J.; Beitollahi, A.; Mirkazemi, M.; Rezayat, S. M.; Sarkar, S. Synthesis of Hollow Mesoporous Silica (HMS) Nanoparticles as a Candidate for Sulfasalazine Drug Loading. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 11225–11232.
- (120) Huang, X.; Li, W.; Wang, M.; Tan, X.; Wang, Q.; Zhang, M.; Wang, C.; Zhang, H. Synthesis of Multiple-Shelled Organosilica Hollow Nanospheres via a Dual-Template Method by Using Compressed CO₂. *Microporous Mesoporous Mater.* **2017**, *247*, 66–74.
- (121) Yang, Y.; Lu, Y.; Abbaraju, P. L.; Zhang, J.; Zhang, M.; Xiang, G.; Yu, C. Multi-Shelled Dendritic Mesoporous Organosilica Hollow Spheres: Roles of Composition and Architecture in Cancer Immunotherapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*, 8446–8450.
- (122) Ma, X.; Wei, Z.; Han, H.; Wang, X.; Cui, K.; Yang, L. Tunable Construction of Multi-Shell Hollow SiO₂ Microspheres with Hierarchically Porous Structure as High-Performance Anodes for Lithium-Ion Batteries. *Chem. Eng. J.* **2017**, *323*, 252–259.
- (123) Gao, X.; Wang, Y.; Wang, Q.; Wu, X.; Zhang, W.; Luo, C. Facile Synthesis of Hollow Cube-like ZnSnO₃ Wrapped by Nitrogen-Doped Graphene: As a High-Performance and Enhanced Synergistic Microwave Absorber. *J. Magn. Magn. Mater.* **2019**, *486*, 165251.
- (124) Yang, Y.; Yang, P. Controllable Synthesis of Hollow Prism CoS for Supercapacitors Application. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 4758–4764.
- (125) Park, M.; Go, H.; Kim, J.-H.; Rhee, S. W. Synthesis of Hollow Silver Spheres Using Spherical Vaterite-Type Calcium Carbonate as Template. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2016**, *37*, 269–275.

- (126) Bao, Y.; Kang, Q. L.; Ma, J. Z.; Liu, C. Monodisperse Hollow TiO₂ Spheres for Thermal Insulation Materials: Template-Free Synthesis, Characterization and Properties. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 8596–8602.
- (127) Zhu, L.; Xiao, H.; Zhang, W.; Yang, G.; Fu, S. One-Pot Template-Free Synthesis of Monodisperse and Single-Crystal Magnetite Hollow Spheres by a Simple Solvothermal Route. *Crystal Growth & Design* **2008**, *8*, 957–963
- (128) Prieto, G.; Tüysüz, H.; Duyckaerts, N.; Knossalla, J.; Wang, G. H.; Schüth, F. Hollow Nano- and Microstructures as Catalysts. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 14056–14119.
- (129) Hu, J.; Chen, M.; Fang, X.; Wu, L. Fabrication and Application of Inorganic Hollow Spheres. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5472–5491.
- (130) Ai, C.; Gong, G.; Zhao, X.; Liu, P. Macroporous Hollow Silica Microspheres-Supported Palladium Catalyst for Selective Hydrogenation of Nitrile Butadiene Rubber. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2017**, *77*, 250–256.
- (131) Caruso, F.; Spasova, M.; Sussha, A.; Giersig, M.; Caruso, R. A. Magnetic Nanocomposite Particles and Hollow Spheres Constructed by a Sequential Layering Approach. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 109–116.
- (132) Yu, B.; Cong, H.; Wang, Y.; Yuan, H.; Xue, L.; Yang, R. Synthesis of Fe₃O₄-NPs/SiO₂ Core-Shell Hollow Microspheres and Application in Water Treatment. *Colloid Polym. Sci.* **2015**, *293*, 985–991.
- (133) Kong, Q.; Feng, W.; Zhong, X.; Liu, Y.; Lian, L. Hydrogen Absorption/Desorption Properties of Porous Hollow Palladium Spheres Prepared by Templating Method. *J. Alloys Compd.* **2016**, *664*, 188–192.
- (134) Liu, Q.; Xu, N.; Liu, L.; Li, J.; Zhang, Y.; Shen, C.; Shezad, K.; Zhang, L.; Zhu, J.; Tao, J. Dacarbazine-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles Grafted with Folic Acid for Enhancing Antimetastatic Melanoma Response. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 21673–21687.
- (135) Nakashima, Y.; Takai, C.; Razavi-Khosroshahi, H.; Suthabanditpong, W.; Fuji, M. Synthesis of Ultra-Small Hollow Silica Nanoparticles Using the Prepared Amorphous Calcium Carbonate in One-Pot Process. *Adv. Powder Technol.* **2018**, *29*, 904–908.
- (136) Cui, X.; Zheng, Y.; Tian, M.; Dong, Z. Novel Yolk–Shell-Structured Fe₃O₄@ γ -AlOOH Nanocomposite Modified with Pd Nanoparticles as a Recyclable Catalyst with Excellent Catalytic Activity. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *416*, 103–111.
- (137) Bai, M. Y.; Moran, C. H.; Zhang, L.; Liu, C.; Zhang, Y.; Wang, L. V.; Xia, Y. A Facile and General Method for the Encapsulation of Different Types of Imaging Contrast Agents within Micrometer-Sized Polymer Beads. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 764–770.
- (138) Ji, F.; Li, J.; Qin, Z.; Yang, B.; Zhang, E.; Dong, D.; Wang, J.; Wen, Y.; Tian, L.; Yao, F. Engineering Pectin-Based Hollow Nanocapsules for Delivery of Anticancer Drug. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *177*, 86–96.
- (139) Fu, Y. N.; Li, Y.; Li, G.; Yang, L.; Yuan, Q.; Tao, L.; Wang, X. Adaptive Chitosan Hollow Microspheres as Efficient Drug Carrier. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 2195–2204.

- (140) Li, C.; Liu, H.; Cui, P.; Ye, F.; Yang, J. Insight into the Formation of Hollow Silver Nanoparticles Using a Facile Hydrothermal Strategy. *Particuology* **2016**, *24*, 197–202.
- (141) Cheng, J.; Zhao, S.; Gao, W.; Jiang, P.; Li, R. Au/Fe₃O₄@TiO₂ Hollow Nanospheres as Efficient Catalysts for the Reduction of 4-Nitrophenol and Photocatalytic Degradation of Rhodamine B. *React. Kinet. Mech. Catal.* **2017**, *121*, 797–810.
- (142) Tian, J.; Tian, P.; Pang, H.; Ning, G. A Recyclable Sacrifice-Template Route to Prepare Al₂O₃ Hollow Microspheres. *Mater. Lett.* **2018**, *210*, 35–38.
- (143) Dobó, D. G.; Berkesi, D.; Kukovecz, Á. Morphology Conserving Aminopropyl Functionalization of Hollow Silica Nanospheres in Toluene. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1140*, 83–88.
- (144) Kong, X.; Wu, C.; Feng, L.; Qu, J.; Liu, P.; Wang, X.; Zhang, X. Silica-Based Hierarchical Porous Janus Microcapsules: Construction and Support of Au Nanoparticle Catalyst Inside. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8054–8057.
- (145) Zhang, L.; Qiao, S.; Jin, Y.; Chen, Z.; Gu, H.; Lu, G. Q. Magnetic Hollow Spheres of Periodic Mesoporous Organosilica and Fe₃O₄ Nanocrystals: Fabrication and Structure Control. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (4), 805–809.
- (146) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235.
- (147) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
- (148) Klein, M. P.; Nunes, M. R.; Rodrigues, R. C.; Benvenutti, E. V.; Costa, T. M. H.; Hertz, P. F.; Ninow, J. L. Effect of the Support Size on the Properties of β -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2456–2464.
- (149) Jung, D.; Streb, C.; Hartmann, M. Oxidation of Indole Using Chloroperoxidase and Glucose Oxidase Immobilized on SBA-15 as Tandem Biocatalyst. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *113*, 523–529.
- (150) Khersonsky, O.; Tawfik, D. S. Enzyme Promiscuity – Evolutionary and Mechanistic Aspects. In *Comprehensive Natural Products II*; Elsevier Science, 2010; p 47–88.
- (151) Fuentes, M.; Mateo, C.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G. General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1–6.
- (152) Rodrigues, R. C.; Godoy, C. A.; Volpato, G.; Ayub, M. A. Z.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Immobilization-Stabilization of the Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Critical Role of Chemical Amination. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 963–968.
- (153) Yiu, H. H. P.; Wright, P. A.; Botting, N. P. Enzyme Immobilisation Using Siliceous Mesoporous Molecular Sieves. *Microporous Mesoporous Mater.* **2001**, *44-45*, 763–768.

- (154) Su, H.; Wang, Y.; Gu, Y.; Bowman, L.; Zhao, J.; Ding, M. Potential Applications and Human Biosafety of Nanomaterials Used in Nanomedicine. *J. Appl. Toxicol.* **2018**, *38*, 3–24.
- (155) Farjadian, F.; Roointan, A.; Mohammadi-Samani, S.; Hosseini, M. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Pharmaceutical Applications, Biodistribution, and Biosafety Assessment. *Chem. Eng. J.* **2019**, *359*, 684–705.
- (156) Li, L.; Yang, W. W.; Xu, D. G. Stimuli-Responsive Nanoscale Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 423–433.
- (157) Yang, G.; Chen, S.; Zhang, J. Bioinspired and Biomimetic Nanotherapies for the Treatment of Infectious Diseases. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 751.
- (158) Yong, C.; Chen, X.; Xiang, Q.; Li, Q.; Xing, X. Recyclable Magnetite-Silver Heterodimer Nanocomposites with Durable Antibacterial Performance. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 80–86.
- (159) Alghrair, Z. K.; Fernig, D. G.; Ebrahimi, B. Enhanced Inhibition of Influenza Virus Infection by Peptide – Noble-Metal Nanoparticle Conjugates. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2019**, *10*, 1038–1047.
- (160) Wan, C.; Tai, J.; Zhang, J.; Guo, Y.; Zhu, Q.; Ling, D.; Gu, F.; Gan, J.; Zhu, C.; Wang, Y.; Liu, S.; Wei, F.; Cai, Qiliang. Silver Nanoparticles Selectively Induce Human Oncogenic γ -Herpesvirus-Related Cancer Cell Death through Reactivating Viral Lytic Replication. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 392.
- (161) Wang, L.; Lin, H.; Ma, L.; Sun, C.; Huang, J.; Li, A.; Zhao, T.; Chen, Z.; Gao, J. Geometrical Confinement Directed Albumin-Based Nanoprobes as Enhanced: T 1 Contrast Agents for Tumor Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 8004–8012.
- (162) Ebrahimi, M.; Botelho, M.; Lu, W.; Monmaturapoj, N. Synthesis and Characterization of Biomimetic Bioceramic Nanoparticles with Optimized Physicochemical Properties for Bone Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2019**, *107A*, 1654–1666.
- (163) Rahmanian, M.; Seyfoori, A.; Dehghan, M. M.; Eini, L.; Naghib, S. M.; Gholami, H.; Mohajeri, S. F.; Mamaghani, K. R.; Majidzadeh-A, K. Multifunctional Gelatin–Tricalcium Phosphate Porous Nanocomposite Scaffolds for Tissue Engineering and Local Drug Delivery: In Vitro and in Vivo Studies. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2019**, *101*, 214–220.
- (164) Linlin, W.; Chen, H.; Longquan, S. The Antimicrobial Activity of Nanoparticles: Present Situation and Prospects for the Future. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 1227–1249.
- (165) Khan, S. T.; Musarrat, J.; Al-Khedhairi, A. A. Countering Drug Resistance, Infectious Diseases, and Sepsis Using Metal and Metal Oxides Nanoparticles: Current Status. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *146*, 70–83.
- (166) Croxen, M. A.; Law, R. J.; Scholz, R.; Keeney, K. M.; Wlodarska, M.; Finlay, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia Coli. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 822–880.
- (167) Lambrechts, A. A.; Human, I. S.; Doughari, J. H.; Lues, J. F. R. Microbiological Contamination of the Hands of Food Handlers as Indicator of Hand Washing Efficacy in Some Convenience Food Industries in South Africa. *Pakistan J. Med. Sci.* **2014**, *30*, 755–758.

- (168) Park, J.; Kim, J. S.; Kim, S.; Shin, E.; Oh, K. H.; Kim, Y.; Kim, C. H.; Hwang, M. A.; Jin, C. M.; Na, K.; et al. A Waterborne Outbreak of Multiple Diarrhoeagenic Escherichia Coli Infections Associated with Drinking Water at a School Camp. *Int. J. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 45–50.
- (169) Vuthy, Y.; Lay, K. S.; Seiha, H.; Kerleguer, A.; Aidara-Kane, A. Antibiotic Susceptibility and Molecular Characterization of Resistance Genes among Escherichia Coli and among Salmonella Subsp. in Chicken Food Chains. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2017**, *7*, 670–674.
- (170) Wang, L.; Nakamura, H.; Kage-Nakadai, E.; Hara-Kudo, Y.; Nishikawa, Y. Prevalence, Antimicrobial Resistance and Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Profiles of Diarrheagenic Escherichia Coli Isolated from Different Retail Foods. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *249*, 44–52.
- (171) Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D. Y.; Brunet, L.; Liga, M. V.; Li, D.; Alvarez, P. J. J. Antimicrobial Nanomaterials for Water Disinfection and Microbial Control: Potential Applications and Implications. *Water Res.* **2008**, *42*, 4591–4602.
- (172) Das, S. K.; Das, A. R.; Guha, A. K. Gold Nanoparticles: Microbial Synthesis and Application in Water Hygiene Management. *Langmuir* **2009**, *25*, 8192–8199.
- (173) Pagno, C. H.; Costa, T. M. H.; De Menezes, E. W.; Benvenuti, E. V.; Hertz, P. F.; Matte, C. R.; Tosati, J. V.; Monteiro, A. R.; Rios, A. O.; Flôres, S. H. Development of Active Biofilms of Quinoa (Chenopodium Quinoa W.) Starch Containing Gold Nanoparticles and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Food Chem.* **2015**, *173*, 755–762.
- (174) Actis, L.; Srinivasan, A.; Lopez-Ribot, J. L.; Ramasubramanian, A. K.; Ong, J. L. Effect of Silver Nanoparticle Geometry on Methicillin Susceptible and Resistant Staphylococcus Aureus , and Osteoblast Viability. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 215.
- (175) Schneid, A. C.; Roesch, E. W.; Sperb, F.; Matte, U.; Da Silveira, N. P.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V.; De Menezes, E. W. Silver Nanoparticle-Ionic Silsesquioxane: A New System Proposed as an Antibacterial Agent. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 1079–1086.
- (176) Shanmugasundaram, T.; Radhakrishnan, M.; Gopikrishnan, V.; Kadirvelu, K.; Balagurunathan, R. In Vitro Antimicrobial and in Vivo Wound Healing Effect of Actinobacterially Synthesised Nanoparticles of Silver, Gold and Their Alloy. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 51729–51743.
- (177) Kumar, R.; Umar, A.; Kumar, G.; Nalwa, H. S. Antimicrobial Properties of ZnO Nanomaterials: A Review. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 3940–3961.
- (178) Sanmugam, A.; Vikraman, D.; Park, H.; Kim, H.-S. One-Pot Facile Methodology to Synthesize Chitosan-ZnO-Graphene Oxide Hybrid Composites for Better Dye Adsorption and Antibacterial Activity. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 363.
- (179) Singh, A.; Singh, N. B.; Afzal, S.; Singh, T.; Hussain, I. Zinc Oxide Nanoparticles: A Review of Their Biological Synthesis, Antimicrobial Activity, Uptake, Translocation and Biotransformation in Plants. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53*, 185–201.
- (180) Zhao, Y.; Xing, Q.; Janjanam, J.; He, K.; Long, F.; Low, K. Bin; Tiwari, A.; Zhao, F.; Shahbazian-Yassar, R.; Friedrich, C.; et al. Facile Electrochemical

- Synthesis of Antimicrobial TiO₂ Nanotube Arrays. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 5177–5187.
- (181) Wanag, A.; Rokicka, P.; Kusiak-Nejman, E.; Kapica-Kozar, J.; Wrobel, R. J.; Markowska-Szczupak, A.; Morawski, A. W. Antibacterial Properties of TiO₂ Modified with Reduced Graphene Oxide. *Ecotox. Environ. Safe.* **2018**, *147*, 788–793.
- (182) Venkatesan, R.; Rajeswari, N. TiO₂ Nanoparticles/Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) Bionanocomposite Films for Packaging Applications. *Polym. Adv. Technol.* **2017**, *28*, 1699–1706.
- (183) Raghunath, A.; Perumal, E. Metal Oxide Nanoparticles as Antimicrobial Agents: A Promise for the Future. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49*, 137–152.
- (184) Lazic, V.; Mihajlovski, K.; Mrakovic, A.; Illés, E.; Stoiljkovic, M.; Ahrenkiel, S. P.; Nedeljkovic, J. M. Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Supported by Magnetite. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 4018–4024.
- (185) Gregg, S. J.; Sing, K. S. W. *Adsorption, Surface Area and Porosity*; Academic Press: London, 1982.
- (186) Webb, P. A.; Orr, C.; Camp, R. W.; Olivier, J. P.; Yunes, Y. S. *Analytical Methods in Fine Particle Technology*; Micromeritics Instrument Corporation: Norcross, 1997.
- (187) Birks, J. B.; Braga, C. L.; Lumb, M. D. 'Excimer' Fluorescence VI. Benzene, Toluene, p-Xylene and Mesitylene. *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* **1965**, *283*, 83–99.
- (188) Winkler, U. K.; Stuckmann, M. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia Marcescens*. *J. Bacteriol.* **1979**, *138*, 663–670.
- (189) Maia, M. M. D.; Heasley, A.; Camargo De Morais, M. M.; Melo, E. H. M.; Morais, M. A.; Ledingham, W. M.; Lima Filho, J. L. Effect of Culture Conditions on Lipase Production by *Fusarium Solani* in Batch Fermentation. *Bioresour. Technol.* **2001**, *76*, 23–27.
- (190) Miles, A. A.; Misra, S. S.; Irwin, J. O. The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood. *J. Hyg. (Lond)*. **1938**, *38*, 732–749.
- (191) Silva, N. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*; Blucher: São Paulo, 2017.
- (192) Cullity, B. D. *Elements of X-Ray Diffraction*; Addison-Wesley Publishing Company: Massachusetts, 1956.
- (193) Langford, J. I.; Wilson, A. J. C. Scherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size. *J Appl Cryst* **1978**, *11*, 102–103.
- (194) Scherrer, P. Bestimmung Der Größe Und Der Inneren Struktur von Kolloidteilchen Mittels Röntgenstrahlen. *Nachr Ges Wiss Göttingen* **1918**, *26*, 98–100.
- (195) Williams, W.; Wright, T. M. High-Resolution Micromagnetic Models of Fine Grains of Magnetite. *J. Geophys. Res.* **1998**, *103*, 30537–30550.

- (196) Heider, F.; Zitzelsberger, A.; Fabian, K. Magnetic Susceptibility and Remanent Coercive Force in Grown Magnetite Crystals from 0.1 μm to 6 μm . *Phys. Earth Planet. Inter.* **1996**, *93*, 239–256.
- (197) Harres, A.; Mikhov, M.; Skumryev, V.; De Andrade, A. M. H.; Schmidt, J. E.; Geshev, J. Criteria for Saturated Magnetization Loop. *J. Magn. Magn. Mater.* **2016**, *402*, 76–82.
- (198) Issa, A. A.; Al-Saad, K. A.; Luyt, A. S. Magnetic Solid Phase Extraction for Chromatographic Separation of Carbamates. *J. Am. Ceram. Soc.* **2018**, *101*, 2038–2049.
- (199) Yean, S.; Cong, L.; Yavuz, C. T.; Mayo, J. T.; Yu, W. W.; Kan, A. T.; Colvin, V. L.; Tomson, M. B. Effect of Magnetite Particle Size on Adsorption and Desorption of Arsenite and Arsenate. *J. Mater. Res.* **2005**, *20*, 3255–3264.
- (200) Cundall, R. B.; Pereira, L. C.; Robinson, D. A. Photophysical Decay Processes of Toluene in Dilute Solution. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1973**, *69*, 701–707.
- (201) Berlman, I. B. *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2nd ed.; Academic Press: New York and London, 1971.
- (202) Saigusa, H.; Morohoshi, M.; Tsuchiya, S. Excimer and Exciplex Formation in van Der Waals Dimers of Toluene and Benzene. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 7334–7340.
- (203) Del Valle, J. C.; Catalán, J. Kasha's Rule: A Reappraisal. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 10061–10069.
- (204) Goldstein, J.; Newbury, D. E.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Echlin, P.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*; Springer US, 2003.
- (205) Almeida, V. O.; Balzaretto, N. M.; Costa, T. M. H.; Machado, G. B.; Gallas, M. R. Surfactants for CNTs Dispersion in Zirconia-Based Ceramic Matrix by Sol-Gel Method. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2013**, *65*, 143–149.
- (206) Law, K. Y. Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 686–688.
- (207) Laptash, N. M.; Maslennikova, I. G.; Kaidalova, T. A. Ammonium Oxofluorotitanates. *J. Fluor. Chem.* **1999**, *99*, 133–137.
- (208) Csáki, A.; Thiele, M.; Jatschka, J.; Dathe, A.; Zopf, D.; Stranik, O.; Fritzsche, W. Plasmonic Nanoparticle Synthesis and Bioconjugation for Bioanalytical Sensing. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 266–275.
- (209) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209–217.
- (210) Panigrahi, S.; Basu, S.; Praharaj, S.; Pande, S.; Jana, S.; Pal, A.; Ghosh, S. K.; Pal, T. Synthesis and Size-Selective Catalysis by Supported Gold Nanoparticles: Study on Heterogeneous and Homogeneous Catalytic Process. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 4596–4605.

- (211) Ramos, J. V. H.; Morawski, F. D. M.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Benvenuti, E. V.; De Menezes, E. W.; Arenas, L. T. Mesoporous Chitosan/Silica Hybrid Material Applied for Development of Electrochemical Sensor for Paracetamol in Presence of Dopamine. *Microporous Mesoporous Mater.* **2015**, *217*, 109–118.
- (212) Chung, Y. C.; Wang, H. L.; Chen, Y. M.; Li, S. L. Effect of Abiotic Factors on the Antibacterial Activity of Chitosan Against Waterborne Pathogens. *Bioresour. Technol.* **2003**, *88*, 179–184.
- (213) Ryan, C.; Alcock, E.; Buttimer, F.; Schmidt, M.; Clarke, D.; Pemble, M.; Bardosova, M. Synthesis and Characterisation of Cross-Linked Chitosan Composites Functionalised with Silver and Gold Nanoparticles for Antimicrobial Applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2017**, *18*, 528–540.
- (214) Cheung, R. C. F.; Ng, T. B.; Wong, J. H.; Chan, W. Y. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5156–5186.
- (215) Liu, H.; Du, Y.; Wang, X.; Sun, L. Chitosan Kills Bacteria Through Cell Membrane Damage. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95*, 147–155.