

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDO DE Fe_3O_4 /APTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE GOX

T. C. P. T. FRANÇA⁽¹⁾; B. B. DANTAS⁽¹⁾; K. M. S. VIANA⁽²⁾; P. T. A. SANTOS⁽¹⁾; A. C. F. M. COSTA⁽¹⁾

¹Universidade Federal de Campina Grande

Av. Aprígio Veloso, 882 – Bodocongó, Campina Grande - PB, 58109-900

Email: tatianafranca@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Norte/ EC&T

RESUMO

Com o crescente aumento no número de casos de pessoas portadoras de diabetes nos últimos anos e tendo em vista que a tecnologia de biossensores existentes ainda apresenta uma alta relação custo benefício, viu-se na última década uma corrida pelo desenvolvimento de biossensores de detecção de glicose baseados na imobilização da glicose-oxidase (GOX) utilizando-se principalmente nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 funcionalizadas com agentes silanos. Desta forma, este trabalho objetiva obter híbrido a partir de nanopartículas de Fe_3O_4 modificada superficialmente com o 3-aminopropiltriétoxissilano visando sua utilização na imobilização da GOX. O material obtido foi caracterizado por DRX, FTIR, MEV, teste de sedimentação e separação magnética. Com base nos resultados obtidos verifica-se que a modificação da superfície com o agente silano APTES foi conseguida com sucesso e que o APTES não alterou a característica magnética e nem a estrutura da Fe_3O_4 , indicando ser um material híbrido promissor para a imobilização da GOX.

Palavras-chave: magnetita, híbrido, 3-aminopropiltriétoxissilano, glicose oxidase.

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) constitui um dos mais sérios problemas de saúde na atualidade, devido ao grande número de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura e alto custo financeiro dos governos, devido às internações hospitalares prolongadas, aposentadorias precoces e gastos com medicações e insumos. No momento, existem 120 milhões de diabéticos no mundo, e estima-se que em 2025 teremos cerca de 300 milhões, segundo a *American Diabetes Association*⁽¹⁾. Por exemplo, o *diabetes mellitus* hoje afeta cerca de 24 milhões de pessoas nos Estados Unidos e estima-se que em 2034 serão 44 milhões de norte americanos diabéticos⁽²⁾.

A automonitorização domiciliar das glicemias hoje se constitui um procedimento altamente eficaz no controle metabólico de pacientes diabéticos. No DM, a automonitorização é importante quando se visa o bom controle metabólico. Essa monitorização previne e ajuda a minimizar o risco de hipoglicemias; ajuda a tomar decisões sobre qual tipo e doses de insulinas usar, possibilitando aos pacientes fazer os ajustes necessários a medicação ou insulina; auxilia no melhor entendimento do efeito dos diversos alimentos, do estresse e dos exercícios sobre a glicemia⁽³⁾. A automonitorização glicêmica é realizada com os biossensores de glicose ou glicosímetros, como são mais conhecidos pela população. Infelizmente, a minoria das pessoas diabéticas se automonitoriza devido, principalmente, a baixa adesão ao tratamento, às punções digitais dolorosas e ao alto custo financeiro⁽⁴⁾.

Os biossensores são dispositivos analíticos que convertem uma resposta biológica em um sinal elétrico, com o objetivo de detectar substâncias ou condições específicas. Os biossensores têm sido desenvolvidos para detectar ou mensurar a temperatura corporal, pressão arterial, pH, glicose, enzimas, anticorpos, bactérias específicas, entre outros usos. Um biossensor é composto por um receptor, que entra em contato com um componente biológico ativo (por exemplo, sangue e urina); um transdutor físico-químico e um processador eletrônico do sinal⁽⁵⁾. A grande maioria dos biossensores produzidos no mundo é empregada para a detecção de glicose, totalizando cerca de 10 bilhões de ensaios sendo realizados em todo o mundo a cada ano. O mercado de detectores de glicose no sangue é altamente lucrativo, uma vez que é responsável por 85% do mercado total dos biossensores^(6,7).

Testes de glicose rápidos e práticos podem ser efetuados através de biossensores que baseiam-se no sinal elétrico (corrente ou tensão) criado na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOX). A reação bioquímica de oxidação da GOX (equação 1) pode alterar o pH do meio devido à formação de ácido glucônico, criando uma diferença de potencial (biossensor potenciométrico). A polarização do eletrodo pode gerar uma corrente devido à oxidação do peróxido de hidrogênio (biossensor amperométrico). O sinal amperométrico produzido é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra a ser analisada⁽⁸⁾.



Assim, um biossensor para determinação da glicose é formado essencialmente por uma enzima (GOX) depositada (imobilizada) em um eletrodo. A imobilização de uma enzima pode ocorrer de quatro formas: encapsulamento, adsorção, ligação covalente e ligação covalente cruzada. A imobilização covalente de uma enzima a um suporte sintético envolve a ligação efetiva entre a enzima e o suporte através da ativação prévia de grupos reativos da matriz. Desta forma, os suportes devem: possuir grupos funcionais que possam ser ativados, ter boa estabilidade mecânica e elevada área superficial⁽⁸⁾.

A ativação do suporte, na maioria das vezes consiste em silanização, reações com carboiminas, carbonóimidas e glutaraldeído. As enzimas são ligadas na matriz através de grupos funcionais presentes em seus aminoácidos. Uma vez que a enzima não pode ser imobilizada diretamente sobre os eletrodos, pois esta poderia ser inativada, novos materiais são sintetizados para que possam desempenhar a função de suportes para o biocatalisador e ao mesmo tempo mediadores para o transporte de elétrons na interface⁽⁸⁾. Daí surge a necessidade de se obter um material que tenha ao mesmo tempo, compatibilidade com a enzima e com o eletrodo, ou seja, materiais híbridos.

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos são constituídos pela combinação dos componentes orgânicos e inorgânicos que, normalmente, apresentam propriedades

complementares, dando origem a um único material com propriedades diferenciadas daquelas que lhe deram origem. Esses materiais são homogêneos, devido à mistura dos componentes em nível molecular, usualmente em escala de nanômetro a sub-micrômetro. Embora tais materiais sejam macroscopicamente homogêneos, suas propriedades refletem a natureza química dos blocos pelos quais foram formados⁽⁹⁾.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo a preparação e caracterização do híbrido Fe₃O₄/APTES para imobilização de GOX. Sugere-se que este novo material atue como agente imobilizador da GOX por meio da geração de ligações covalentes entre o APTES e a enzima e, que o Fe₃O₄ por sua alta magnetização seja facilmente atraído pelo eletrodo metálico.

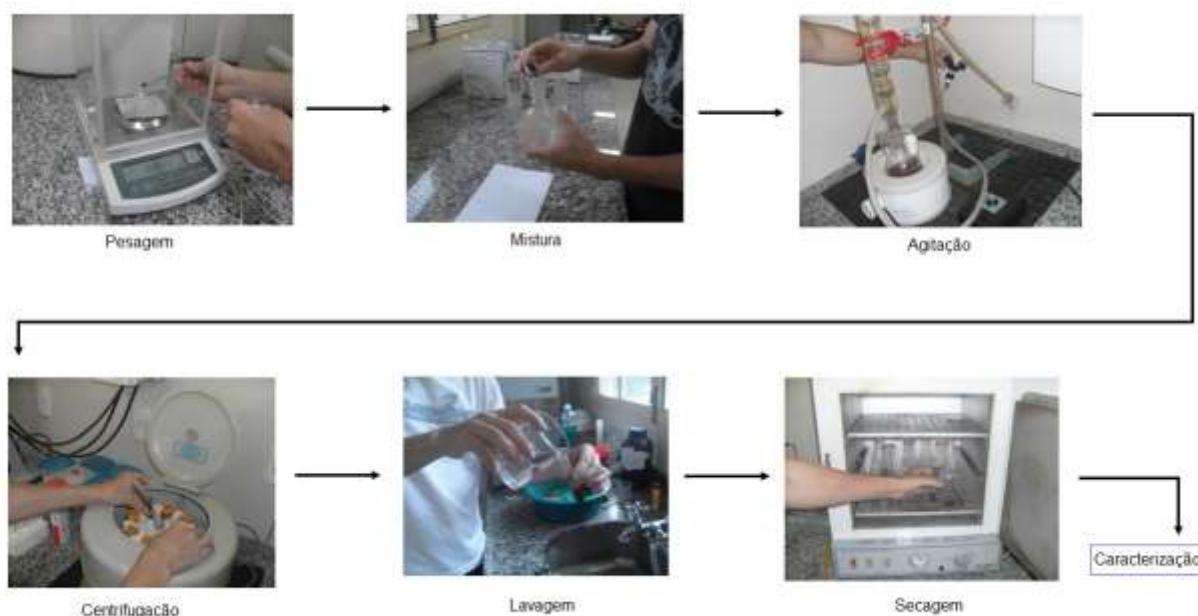
MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa foram utilizados os seguintes materiais: 3-aminopropiltrietoxissilano [H₂N(C₂H₅)₃Si(OCH₃)₃] 97% (APTES) – Aldrich e a magnetita (Fe₃O₄) sintética (NPMs) fornecida pelo do Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da UFCG, na forma de pó com tamanho de cristalito de 45 nm e área superficial de 6,01 m²/g. A amostra de magnetita como recebida foi peneirada na malha #325 e em seguida silanizada com o APTES.

A funcionalização teve início com a adição, em um balão de três bocas, de 5g de Fe₃O₄, 80ml de tolueno e 5ml do APTES. Depois de uma agitação manual, submeteu-se a mistura a um sistema de refluxo sob temperatura de aproximadamente 110°C. Após 72h, desligou-se o sistema de refluxo e sedimentou-se as NPM's em uma centrífuga FANEM modelo baby no nível 9 de velocidade. Em seguida, lavou-se as NPMs com álcool etílico, repetiu-se o procedimento de lavagem 10 vezes, até que fosse possível notar que após a lavagem o álcool descartado estava praticamente transparente. Para finalizar, levou-se as NPMs a uma estufa FANEM modelo 315 a 100°C durante 24h, para serem secas.

A etapa de silanização das NPMs foi realizada seguindo o fluxograma ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma da silanização das NPMs com o APTES.



Após a etapa de silanização os materiais híbridos de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ foram caracterizadas por:

- *Difração de raios X (DRX)* num difratometro Shimadzu (XRD-6000) a 40 kV e 30 mA, radiação $\text{CuK}\alpha = 0,154 \text{ nm}$, no intervalo de varredura de 2θ , entre 10 a 90 graus, a uma taxa de $2^\circ/\text{min}$.
- *Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)* usando um espectrômetro modelo 400 FT-IR/FT-NIR da marca Perkin Elmer, entre 4000 e 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras.
- *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)* em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca Shimadzu, modelo SuperScan SS500.
- *Tempo de sedimentação*, utilizando-se 50mg do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$, 3 mL uma solução tampão de PBS (*phosphate buffered saline*) com pH 7,4, cubetas de plástico de 3 mL e um ímã de neodímio com diâmetro de 1,2 cm. Após adicionar a solução de PBS e as NPMs do híbrido na cubeta de plástico, realizou-se uma agitação manual em 180° por 30 segundos. O tempo de sedimentação foi determinando a partir do momento em que cessou-se a agitação e até o momento em que não mais visualizou-se a decantação das NPMs.
- *Eficiência de separação magnética*, utilizando-se 50mg do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$, um becker de 5mL, solução de PBS com pH 7,4, uma estufa FANEM modelo 315 e o mesmo ímã de neodímio descrito anteriormente. Este teste foi

realizado da seguinte forma: adicionou-se as NPMs +solução PBS no becker, realizou-se agitação manual rotativa com o auxílio de um bastão de vidro e logo em seguida colocou-se o sistema becker + solução de PBS + NPMs sobre o ímã. Após todas as NPMs sedimentarem, descartou-se o líquido e levou-se as NPMs para secagem em estufa em 100°C por 24h. Após decorrido este tempo, pesou-se as NPMs.

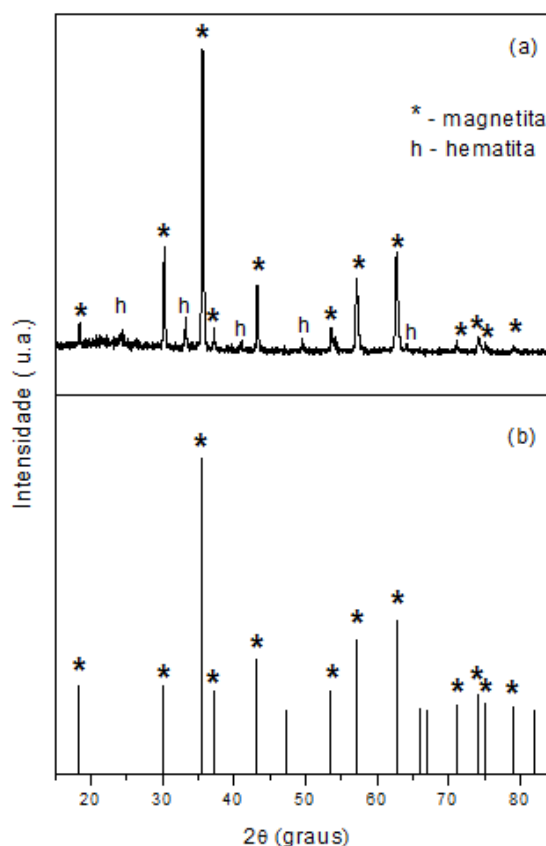
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta o resultado da difração de raios X obtida para o híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$.

Observa-se que o híbrido é composto de 84% da fase majoritária de magnetita (Fe_3O_4), identificada pela ficha cristalográfica JCPDS 88-0315, e traços de hematita (Fe_2O_3) em 16%. Como o APTES é um material de característica amorfa a presença do mesmo não é identificada no DRX, de modo que se pode afirmar que o processo de silanização (modificação de superfície das NPMs pelo acoplamento com o agente silano APTES) não alterou a estrutura cristalina da amostra.

Estas mesmas características, presença de hematita como segunda fase e preservação da estrutura após a silanização também foram observadas por Kanimozhi e Perinbam⁽¹⁰⁾ quando estudaram a síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 superparamagnéticas silanizadas com APTES e TEOS (tetraetilortosilicato) para uso em biossensores de imobilização da lipase em *Pseudomonas fluorescens* Lp1.

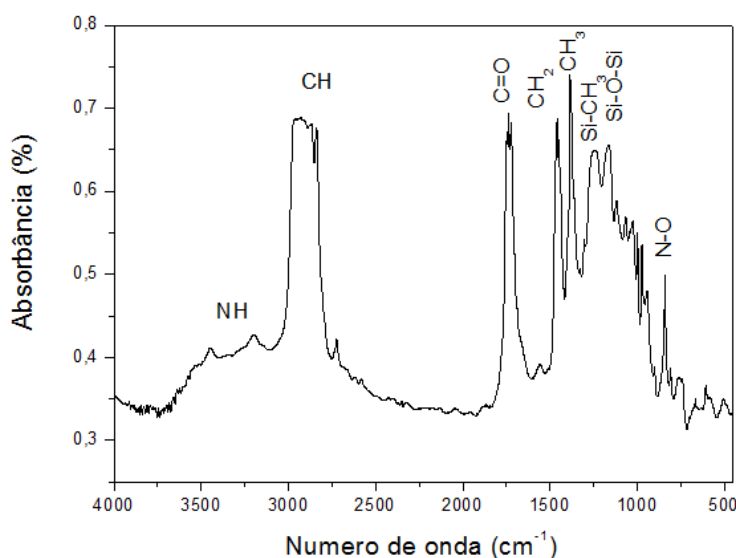
Figura 2 – Difratomogramas de raios X: (a) padrão de DRX do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ e (b) padrão de DRX da ficha JCPDS 88-0315 da magnetita



A Figura 3 apresenta o FTIR obtido para o híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$. Mediante o espectro, observa-se de 3450 a 3200 cm^{-1} absorções fracas atribuídas a ligações N-H de aminas primárias. Na região de 2926 cm^{-1} verificam-se bandas de estiramento atribuídas a $\nu(\text{C-H})$ alifáticos tipo sp^3 . Em 1736 cm^{-1} , observa-se uma banda intensa e estreita referente ao estiramento C=O. Em 1460 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} , observa-se bandas referente à CH_2 e CH_3 , respectivamente. Em 1244 cm^{-1} , observa-se uma banda referente ao estiramento Si-CH₃ e 1167 cm^{-1} uma banda atribuída ao estiramento assimétrico Si-O-Si. Em 661, 611 e 509 cm^{-1} , observa-se bandas referente a ligação Fe-O, caracterizando as vibrações nos sítios tetraédricos na estrutura do espinélio inverso da magnetita.

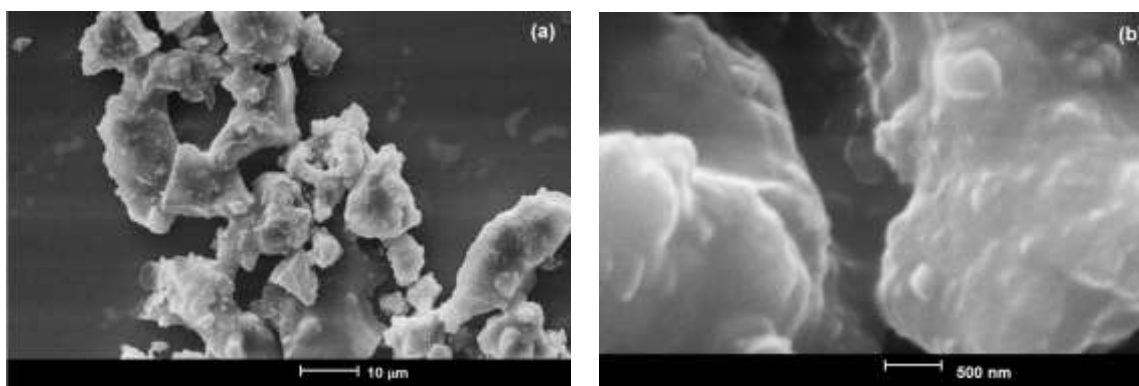
Vale ressaltar que todas as bandas de absorção que foram observadas neste trabalho, foram também visualizadas por Pingarrón et. al.⁽¹¹⁾ e Kumar et. al.⁽¹²⁾ quando estudaram a obtenção de nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com agentes os silanos APTES e APTES + TEOS para aplicação em biossensores e nanobiocatalisadores, respectivamente.

Figura 3 – Espectro de infravermelho do $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$.



A Figura 4 apresenta o resultado de MEV obtido para o híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$. Pela micrografia da Figura 4a, observa-se que a amostra é constituída de aglomerados na forma de blocos irregulares, com tamanhos variados, ou seja, com tamanho inferior e superior a 10 μm .

Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$. (a) aumento de 1000X e (b) aumento de 20000X.



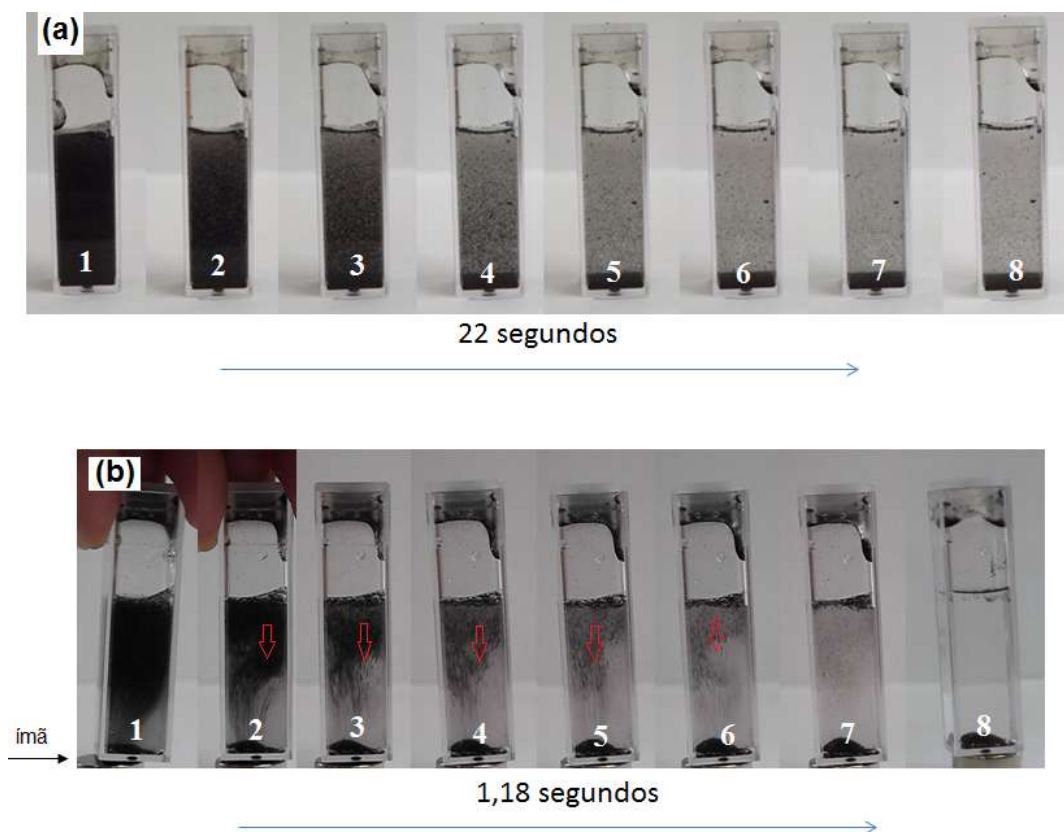
Mediante a Figura 4b, observa-se que os aglomerados não apresentam aspecto poroso, indicativo que o agente silano APTES ao se acoplar à Fe_3O_4 , aumentou a rigidez do aglomerado pela obstrução dos poros. Verifica-se ainda que o aglomerado apresenta um aspecto de blocos impregnados com material amorfo, onde não é mais possível se observar o contato entre as partículas.

A Figura 5 apresenta o resultado do teste de sedimentação obtido para o híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ sem e com a presença de o ímã de neodímio. Pela Figura 5a mostra a presença de 0,05 g do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ disperso em 3 mL do PBS e, sequencialmente as imagens da sedimentação das NPMs na ausência do ímã. Verifica-se na imagem da Figura 5a1 as nanopartículas do híbrido disperso no PBS, e a partir da Figura 5a2 até 5a8, que rapidamente as nanopartículas sedimentam no decorrer de 22 segundos. Percebe-se que ainda existe nanopartículas no sobrenadante na solução, devido à coloração preta do líquido.

Na Figura 5b, se observa as imagens da sedimentação de 0,05 g das nanopartículas do híbrido na presença do ímã dispersa em 3 mL do PBS. Verifica-se então, na Figura 5b1 que as nanopartículas quando na presença do ímã são fortemente atraídas. Isto pode ser percebido pelo direcionamento do alinhamento do fluxo das nanopartículas na direção do ímã. A partir da Figura 5b2 até a Figura 5b7 percebe-se mais facilmente o direcionamento das nanopartículas na direção do ímã. Na Figura 5b8, verifica-se que praticamente todas as nanopartículas foram fortemente atraídas pelo ímã, ficando o líquido com coloração quase que totalmente transparente semelhante como o PBS puro. Do início da dispersão até o momento

em que nanopartículas foram totalmente sedimentadas, decorreu-se apenas 1,18 segundos.

Figura 5 – Teste de sedimentação do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$. (a) sem a presença do ímã e (b) com o ímã.



Como observado na Figura 5, com a presença do ímã o tempo de sedimentação diminuiu de 22s para apenas 1,18s. Desta forma, infere-se que a silanização introduziu um caráter hidrofóbico às nanopartículas de magnetita. Isto pode ser verificado pelo fato do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ sedimentar rapidamente, com ou sem a presença do ímã, evidenciando que as nanopartículas de magnetita quando silanizadas não apresentam forte interação com a água. Esta hidrofobicidade induzida pela silanização ficou fortemente evidenciada com a presença do campo magnético induzido pelo ímã, pois claramente verifica-se que na Figura 5b o líquido está límpido.

A Tabela 1 e a Figura 6 apresentam o resultado do teste de separação magnética obtido para o híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$. Por meio da Figura 6a, observa-se que as nanopartículas do híbrido são atraídas fortemente pelo ímã, ficando

praticamente o líquido totalmente límpido. Na Figura 6b, verifica-se que o líquido PBS é facilmente removido ficando as nanopartículas fortemente atraídas no ímã, e na Figura 6c nanopartículas e o líquido PBS totalmente separados.

Figura 6 – Teste de separação magnética do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$: (a) solução de PBS + híbrido, (b) momento da separação do líquido e (c) líquido e híbrido separados.

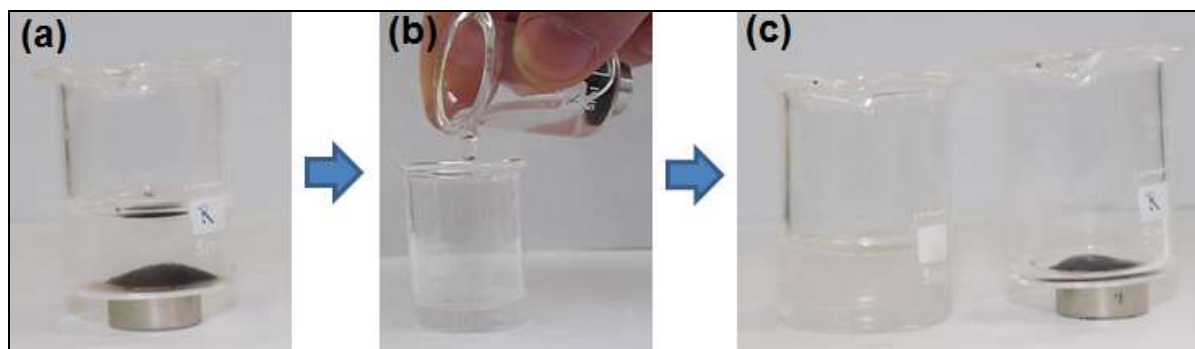


Tabela 1 – Eficiência de separação do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$.

Massa adicionada à solução de PBS (g)	0,050
Massa separada da solução de PBS (g)	0,045
Massa separada (%)	90,00

Pelos resultados apresentados na Tabela 1 observa-se que das 50mg do híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ que foi adicionado na solução de PBS, conseguiu-se separar 0,045g o que indicou uma eficiência de separação de 90%, comprovando mais uma vez o caráter hidrofóbico fornecido às nanopartículas de magnetita por meio da silanização.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho conclui-se que: as nanopartículas de Fe_3O_4 quando modificadas a superfície com o agente de acoplamento APTES, não tiveram sua estrutura alterada e ainda acrescentou-se a estas, a característica de hidrofobicidade, indicando que silanização da magnetita foi efetiva e o material híbrido $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ foi preparado com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às instituições brasileiras Inct-INAMI/CNPq CAPES e CNPq pelo apoio financeiro dado a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- (1) AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v.31, n.1, p. S55-S60, 2008.
- (2) HUANG, E. S.; BASU, A.; O'GRADY, M.; CAPRETTA, J.C. Projecting the future diabetes population size and related costs for the U.S. *Diabetes Care*, v. 32, p. 2225-2229, 2009.
- (3) VILAR, L. *Endocrinologia Clínica*, 3ª.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.
- (4) GOMES, M.B., LERARIO, A. C. Métodos para monitorar o tratamento da hiperglicemia. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes*, 3ª.ed., p. 88-92, 2009.
- (5) ORAZIO, P. D. Biosensor in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, v. 334, p. 41-69, 2003.
- (6) SHEU, F. S.; VASHIST, S. K.; ZHENG, D.; AL-RUBEAAAN, K.; LUONG, J. H. T. Technology behind commercial devices for blood glucose monitoring in diabetes management: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 703, p. 124-136, 2011.
- (7) VASHIST, S. K. Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review. *Analytica Chimica Acta*, n. 750, p.16-27, 2012.
- (8) VIEIRA, N. C. S. Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes finos de $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$. 141f. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de Itajubá. 2006.
- (9) JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.
- (10) KANIMOZHI, S.; PERINBAM, K. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles and its application in immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* Lp1. *Materials Research Bulletin* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.materres-bull.2013.01.024>
- (11) PINGARRÓN, J. M.; DÍEZ, P.; VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L. Supramolecular immobilization of redox enzymes on cyclodextrin-coated magnetic

nanoparticles for biosensing applications. Journal of Colloid and Interface Science, v. 386, p.181-188, 2012.

(12) KUMAR, K. S.; SEENUVASAN, M.; MALAR, C. G.; PREETHI, S.; BALAJI, N.; IYYAPPAN, J.; KUMAR, M. A. Fabrication, characterization and application of pectin degrading $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ nanobiocatalyst. Materials Science and Engineering C, (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.050>

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF HYBRID Fe_3O_4 /APTES FOR DETENTION OF GOX

ABSTRACT

With the growing increase in the number of cases of people with diabetes in recent years and in view of the existing biosensor technology still has a high cost-benefit ratio, found himself in a race last decade the development of biosensors for detection of glucose based on the immobilization of glucose oxidase (GOX) using mainly of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles functionalized with silanes agents. Thus, this paper aims to obtain hybrid from Fe_3O_4 nanoparticles surface modified with 3-aminopropyltriethoxysilane for their use in the immobilization of GOX. The material obtained was characterized by XRD, FTIR, SEM, test sedimentation and magnetic separation. Based on the results obtained it appears that the surface modification with silane agent APTES was achieved with success and that the APTES did not change the magnetic characteristics nor the structure of Fe_3O_4 and could be a promising hybrid material for the immobilization of GOX.

Keywords: magnetite, hybrid, 3-aminopropyltriethoxysilane, glucose oxidase.