

# Modificação da superfície de nanocompósitos de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ visando seu uso para imobilização da glicose oxidase

## *(Surface modification of $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites for use in immobilization of glucose oxidase)*

I. L. T. Albuquerque<sup>1</sup>, P. T. A. Santos<sup>1</sup>, D. R. Cornejo<sup>2</sup>, S. M. C. M. Bicalho<sup>3</sup>, L. S. C. Oliveira<sup>4</sup>, A. C. F. M. Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Materiais, <sup>4</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brasil 58109-970

<sup>2</sup>Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil 05508-900

<sup>3</sup>JHS Laboratório Químico, Sabará, MG, Brasil 34650-120

izabelleliz@hotmail.com, patytaraujo@gmail.com, daniel.r.cornejo@gmail.com, dbrandao@jhs.med.br, libiaconrado@yahoo.com.br, ana.costa@ufcg.edu.br

### Resumo

O aumento no número de pessoas portadoras de diabetes nos últimos anos e a elevada relação custo benefício da tecnologia de biossensores existentes têm motivado um crescente interesse no desenvolvimento de biossensores de detecção de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase (GOD) utilizando-se principalmente nanopartículas magnéticas. Neste contexto, nanocompósitos de  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram sintetizados por reação de combustão e tiveram sua superfície modificada com 3-aminopropiltrimetoxissilano via reação de silanização e com quitosana via reação de funcionalização para obter um material híbrido que foi avaliado como possível imobilizador de GOD. As amostras foram caracterizadas por difração de raios X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, propriedades magnéticas e citotoxicidade *in vitro*. Os resultados mostraram que foi possível obter o compósito ferrimagnético, a modificação da superfície reduziu a magnetização de saturação, mas manteve a característica ferrimagnética, e todas as amostras foram consideradas não tóxicas. Para os testes preliminares de imobilização da GOD foi revelado que o nanocompósito modificado com silano e quitosana apresentou melhor resultado, cerca de 2,7 mg de GOD imobilizados para cada 100 mg de nanocompósito, o que torna este material uma possível alternativa para ser utilizado na fabricação de biossensores de GOD.

**Palavras-chave:** nanocompósitos, modificação da superfície, imobilização de GOD.

### Abstract

The increase in the number of people with diabetes in recent years and the high cost-benefit ratio of the existing biosensor technology have increased the interest for the development of glucose detection biosensor based on immobilization of glucose-oxidase (GOD) mainly using magnetic nanoparticles. In this context, nanocomposites of  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  were prepared by combustion reaction and their surface was functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane via silanization reaction and with chitosan via functionalization to obtain a hybrid material that was evaluated as possible GOD immobilizer. The samples were characterized by powder X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetry, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, magnetic properties and *in vitro* cytotoxicity. The results revealed that it was possible to obtain the ferrimagnetic composite, the surface modification reduced the saturation magnetization, but maintained the ferrimagnetic characteristics, and all samples were considered non-toxic. For preliminary testing of the GOD immobilization it was revealed that the nanocomposite modified with silane and chitosan showed the better result, about 2.7 mg of immobilized GOD for 100 mg of nanocomposite, which makes this material a potential alternative to manufacture GOD biosensors.

**Keywords:** nanocomposites, surface modification, GOD immobilization.

## INTRODUÇÃO

As nanopartículas magnéticas (NPMs) à base de óxido de ferro podem exibir comportamento ferrimagnético, antiferromagnético e/ou superparamagnético dependendo da presença dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e/ou  $\text{Fe}^{3+}$ , da sua distribuição na estrutura cristalina e do tamanho de partícula resultante que

depende exclusivamente do método de síntese utilizado [1]. Dentre as fases polimórficas do óxido de ferro, o  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (hematita) e o  $\text{FeFe}_2\text{O}_4$  (magnetita) são conhecidos por serem antiferromagnético e ferrimagnético, respectivamente. Estas características magnéticas podem ser alteradas dependendo do tipo de método de síntese utilizado na produção, o que pode conferir energia térmica suficiente para alterar a distribuição

dos cátions na estrutura cristalina e contribuir para a formação de nanopartículas. O  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  antiferromagnético com a presença da fase  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  passa a apresentar comportamento ferrimagnético ou superparamagnético dependendo da percentagem correspondente a cada fase e do tamanho da partícula [1]. Deste modo a obtenção de nanocompósitos de  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  em uma só etapa de processamento pode ser promissora para obtenção de novos materiais magnéticos. Dependendo do método de síntese utilizado a NPM à base de óxido de ferro apresenta grande superfície e elevada área de transferência de massa, estabilidade térmica e química, e baixa toxicidade, qualidades ideais para o uso em aplicações biomédicas [2, 3], tais como: biossensores [4], carreadores de fármacos [5, 6], agente de contraste nos exames por ressonância magnética [7], tratamento de hipertermia para células malignas e imunossaios [8], purificação de DNA e RNA [9], separação de enzimas [10, 11] e proteínas [12].

Porém, para estas aplicações as NPMs precisam apresentar alta área de superfície, baixa aglomeração, boa dispersão em fluidos corpóreos para se locomover dentro do corpo humano e acima de tudo comportamento magnético que permita ser facilmente atraída por um ímã e desmagnetizem espontaneamente. Um problema é que quando as partículas são nanométricas, a área de superfície é muito elevada, o que fornece alta energia superficial que atua como força motriz para a aglomeração das NPMs. Como solução ou minimização destes problemas têm-se os materiais híbridos que apresentam novas propriedades devido a diferentes contribuições de cada um dos compostos em sua propriedade resultante, aumentando a sua aplicabilidade. Para obter um material híbrido, faz-se necessária a modificação da superfície, com o auxílio de um agente de acoplamento, permitindo assim uma melhor adesão entre as moléculas inorgânicas e orgânicas. A modificação se dá por reação de silanização, ou seja, reação de compostos organossilanos com a superfície das NPMs, sendo o organossilano imobilizado na superfície das NPMs. Os agentes silanos apresentam fórmula geral  $\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{Si}(\text{OR})_3$ , onde OR é um grupo alcoxi ( $-\text{OCH}_3$  ou  $-\text{OC}_2\text{H}_5$ ), enquanto que Y é um grupo organofuncional ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{NH}_2$  ou  $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ ). A presença de grupos hidroxilas ( $-\text{OH}$ ) na superfície das partículas é indispensável para promover a reação com agentes de acoplamento do tipo silano, onde os grupos  $(\text{OR})_3$  se hidrolisam formando grupos silanois ( $\text{Si}-\text{OH}$ ) que reagem com materiais inorgânicos. Por outro lado, seu grupo R é capaz de reagir com os monômeros a serem polimerizados formando assim materiais híbridos orgânicos inorgânicos [13]. Os agentes silanos mais utilizados são: 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltrióxissilano, tetraetilortossilicato, meta-criloxipropiltrimetoxissilano, 3-cloropropil-trimetoxissilano e trióxivinilsilano [14-17].

Porém, para as aplicações citadas as NPMs necessitam ser funcionalizadas com um material biologicamente ativo. As biomoléculas que podem ser utilizadas para funcionalizar NPMs devem apresentar alta massa molecular, boa estabilidade e sensibilidade, baixo custo, fácil conjugação entre o antígeno e a biomolécula, e detecção

precisa. As biomoléculas mais comuns são dextran, polietileno glicol, álcool polivinílico e quitosana [2, 18]. Dentre estas biomoléculas, a quitosana é um biopolímero com estrutura química formando um polícatión linear, com elevada densidade de carga, atóxico, que apresenta grupos amins e hidroxilas e inúmeras ligações de hidrogênio. Estas características permitem que exiba uma excelente biocompatibilidade, favorecendo a ligação da quitosana com o antígeno, dando uma resposta imunológica [19] e a propriedade de conjugação, que é a capacidade de ligar-se a substâncias como o colesterol, gorduras, íons metálicos, proteínas, células tumorais e enzimas, como a glicose oxidase (GOD) [20-22]. Muitos estudos têm sido realizados sobre a concepção e fabricação da quitosana baseada em sistemas híbridos por modificar quimicamente os grupos amino e/ou hidroxila, a fim de alcançar melhores propriedades mecânicas, bem como favorecer as propriedades biológicas [23]. Estudos mostram resultados promissores em relação à biocompatibilidade e boa propriedade magnética na obtenção de um filme híbrido orgânico inorgânico formado a partir do gel entre o 3-aminopropiltrióxissilano e a quitosana para ser aplicado como um biossensor na imobilização *in situ* da glicose oxidase [24], como o híbrido NPMs/silica/ quitosana no tratamento de tumores cancerígenos [25] e o ternário  $\text{NiFe}_2\text{O}_4/\text{CuO}/\text{FeO}/\text{quitosana}$  como biossensores de glicose [26].

A etapa de funcionalização constituiu basicamente de um núcleo magnético, envolvido por uma camada polimérica com sítios ativos (grupos funcionais) e seletivos para íons ou moléculas [27]. Tem como finalidade evitar a agregação e sedimentação das partículas, bem como conceder pontes de conjugação biológica, onde uma molécula se liga especificamente ao sítio alvo podendo ser atraído para o tecido/célula alvo por manipulação de um campo magnético externo [28-30]. Pesquisas mostram que o efeito de revestimento com o biopolímero quitosana, por meio de diversos métodos, nas nanopartículas magnéticas não afetou a propriedade de magnetização, o que o viabiliza para aplicações em biossensores, hipertemia e agente antimicrobiano e antifúngico, entre outros [31-33]. A Fig. 1 ilustra de forma simplificada a formação do híbrido das nanopartículas de hematita modificando sua superfície com um silano e quitosana.

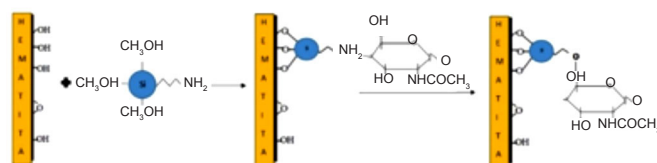


Figura 1: Representação simplificada da modificação da superfície da hematita com o agente silano 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) e quitosana.

[Figure 1: Simplified representation of surface modification of hematite with silane agent 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and chitosan.]

Na literatura científica observa-se a constante utilização

de materiais híbridos na imobilização da enzima GOD [8, 20-22, 34]. Devido à sua alta especificidade, a GOD é usada como elemento biocatalítico para se medir os níveis de açúcar no sangue e por isso tem sido usada na fabricação de biossensores. Neste caso, a enzima pura deve ser imobilizada na superfície do eletrodo, mantendo sua atividade catalítica [35]. O suporte ideal para a imobilização de enzimas deve ser insolúvel em água, se ligar facilmente à enzima e ser inerte quimicamente. Os métodos mais comuns para imobilização de enzimas são através de encapsulamento (em matrizes ou microcápsulas poliméricas) ou através de ligações físicas ou químicas da enzima ao suporte [36]. A seleção do método de imobilização depende essencialmente do suporte a ser utilizado na confecção do biossensor. Segundo [8], a imobilização da GOD utilizando  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  ocorre de acordo com o esquema ilustrativo apresentado na Fig. 2. Neste contexto, propõe-se neste trabalho avaliar a modificação da superfície dos nanocompósitos de  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$ , sintetizados por reação de combustão, com 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) e com o biopolímero quitosana visando a obtenção de um material híbrido para aplicação como biossensores para imobilização da GOD. Para esse fim, as propriedades estruturais, morfológicas, térmicas e magnéticas das amostras foram investigadas, associadas a estudo de citotoxicidade *in vitro* para avaliar a viabilidade celular e imobilização da GOD.

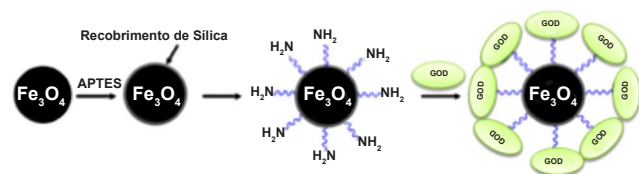


Figura 2: Esquema ilustrativo da imobilização da GOD utilizando  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .  
[Figure 2: Illustrative scheme of GOD immobilization using  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ .]

## EXPERIMENTAL

Os reagentes utilizados neste estudo foram nitrato de ferro [ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , Neon], ureia [ $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , Neon], 3-aminopropiltrimetoxissilano [ $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ , Sigma-Aldrich], álcool etílico ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ , Vetec), tolueno anidro [ $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{O})\text{OH}$ , Vetec], quitosana ( $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$ , Sigma-Aldrich), ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ , Vetec), glicose oxidase (Sigma-Aldrich) e reagente Bradford (Sigma-Aldrich), todos os reagentes com grau de pureza entre 98 e 99%. O processo de síntese por reação de combustão envolveu uma mistura de íons metálicos, como reagentes oxidantes (nitrato) e o combustível (ureia) como agente redutor. Para a realização da reação de combustão, a proporção da mistura inicial de cada reagente foi calculada de acordo com as valências dos elementos reativos, estabelecida pela estequiometria de acordo com os conceitos da química dos propelentes e explosivos [37].

Para a síntese utilizou-se um recipiente de aço inoxidável com capacidade de produção de 10 g de produto/batelada acoplado a um reator cônico [38]. Com o aquecimento ocorreu um aumento da viscosidade, formando bolhas e dando início à volatilização de gases e posteriormente a ignição, seguida da combustão. As NPMs foram desaglomeradas em um almofariz e peneiradas em peneira de 325 mesh (ABNT 44  $\mu\text{m}$ ).

Para a silanização, em um balão de 100 mL foram adicionados 5 g das NPMs sintetizadas, previamente seca a 110 °C, com 5 mL de APTMS (3-aminopropiltrimetoxissilano) e 50 mL de tolueno; o balão foi colocado sobre uma manta a 100 °C e acoplado a um condensador durante 72 h. Em seguida, a solução foi transferida para tubos de vidro e centrifugada em uma centrífuga (Baby, Fanem) por 5 min a uma velocidade de 500 rpm. Esta etapa foi repetida 8 vezes sempre lavando o produto sedimentado com álcool etílico. Depois das lavagens, as NPMs silanizadas (NPMs@ $\text{SiO}_2$ ) foram secas por 24 h a 150 °C em estufa (mod. 315, Fanem). As ferritas foram silanizadas com APTMS, baseada na metodologia descrita em [39], com modificações. Para a funcionalização com quitosana, 5 g das NPMs@ $\text{SiO}_2$  foram adicionados a uma solução de ácido acético (1% v/v) e 1 g de quitosana sob agitação constante por 2 h. Depois a solução foi levada à centrifuga e seca em estufa por 24 h a 60 °C para completa evaporação do solvente.

As amostras foram caracterizadas estrutural e morfológicamente por: difração de raios X em um difratômetro da Shimadzu (XRD 6000) com radiação  $\text{CuK}\alpha$ ; espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em um espectrômetro (400 FT-IR/FT-NIR, Perkin Elmer); análise termogravimétrica em atmosfera de nitrogênio com cadinho de alumina, fluxo de 50  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e taxa de aquecimento 10 °C  $\cdot \text{min}^{-1}$ , na faixa de temperatura ambiente até 1000 °C. Os aspectos morfológicos foram analisados por meio de um microscópio eletrônico de varredura (SuperScan SS500, Shimadzu) e de transmissão (EM420, Philips). O comportamento magnético foi avaliado por meio dos ciclos de histerese magnética obtidos em um magnetômetro de gradiente alternado.

Para os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas células do ovário de hamster chinês (CHO-K1) na linha celular. Polietileno de alta densidade (PEAD) como controle negativo (CN) e látex como controle positivo (CP) foram utilizados como substâncias de referência para a preparação de extratos com concentração de 200 mg/mL. As células ficaram expostas por 24 h. As amostras foram consideradas citotóxicas quando a viabilidade celular foi inferior a 70% ( $\text{VC} < 70\%$ ). Para o teste de imobilização de GOD, 3,0 mg de cada amostra foram adicionados a um volume de 2 mL da solução de GOD de concentração 0,05  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  preparada em uma solução tampão fosfato-salino (PBS, 0,01 M, pH=7,0) e colocadas em uma incubadora shaker (SL-233, Solab) a 150 rpm, 4 °C por 4 h. A quantidade de GOD imobilizada foi analisada pelo método de Bradford [40] e calculada segundo:

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

onde,  $q$  é a quantidade de GOD imobilizada pelas nanopartículas (mg de GOD/mg de NPMs),  $v$  é o volume da amostra (mL),  $C_i$  concentração de GOD inicial (mg/mL),  $C_f$  concentração de GOD após as 4 h (mg/mL) e  $m_{ads}$  é a massa de nanopartículas utilizadas (mg). A eficiência de imobilização (EI) foi calculada por meio de:

$$EI = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (B)$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 3 ilustra os difratogramas de raios X das nanopartículas sintetizadas (NPMs), modificadas superficialmente com o APTMS (NPMs@SiO<sub>2</sub>) e funcionalizadas com quitosana (NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q). Pode-se observar na Fig. 3C a formação de fase antiferromagnética da hematita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), que tem estrutura hexagonal formada apenas por íons de Fe<sup>3+</sup> (Fe<sub>2</sub><sup>3+</sup>O<sub>3</sub>), identificada de acordo com o arquivo JCPDS 33-0664, e presença de 22% de fase magnética magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), que é um óxido de ferro com estrutura tipo espinélio inverso (Fe<sup>2+</sup>Fe<sub>2</sub><sup>3+</sup>O<sub>4</sub>), identificada de acordo com o arquivo JCPDS 79-0419. Isso indicou a formação dos nanocompósitos magnéticos. A formação do nanocompósito Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> só

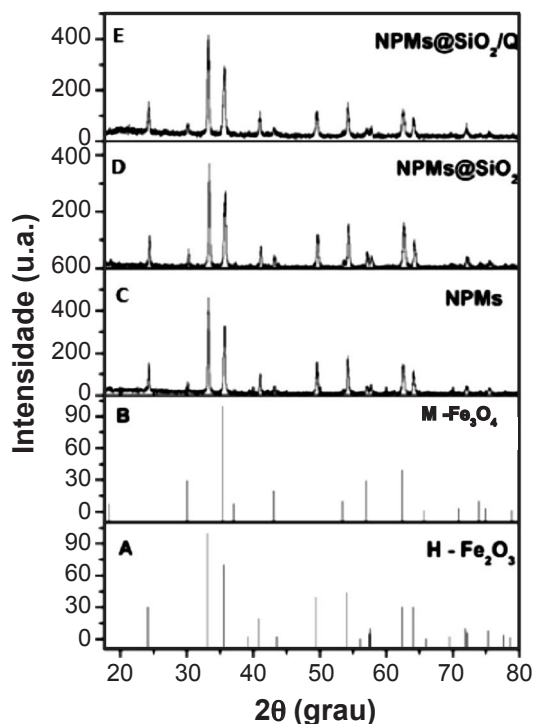


Figura 3: Difratogramas de raios X para: (A) padrão de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, (B) padrão de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (C) NPMs, (D) NPMs@SiO<sub>2</sub> e (E) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.

[Figure 3: X-ray diffraction patterns for: (A) standard Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, (B) standard Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (C) NPMs, (D) NPMs@SiO<sub>2</sub>, and (E) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.]

foi possível pelo fato que, durante a síntese por reação de combustão usando como fonte de cátions metálicos apenas o nitrato de ferro III, parte dos íons de Fe<sup>3+</sup> se reduziu a Fe<sup>2+</sup> devido ao próprio gás de combustão gerado durante a síntese ter agido como atmosfera redutora, favorecendo a formação da magnetita [41]. Esse mesmo comportamento foi reportado em [42], quando foi sintetizada magnetita por reação de combustão em um reator de micro-ondas sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>, usando acetato de ferro II e nitrato de ferro II como fonte de cátions metálicos.

Mediante as Figs. 3D e 3E, verificou-se que a silanização e a funcionalização não alteraram a característica estrutural dos nanocompósitos, apenas se observou na Fig. 3E a formação de uma banda discreta em torno de 22°, característico do pico principal da quitosana. Todos os picos apresentaram-se com elevada intensidade e elevada largura basal, indicando a formação de material cristalino formado por nanopartículas. Esta mesma formação foi obtida em [43], quando foi sintetizada uma mistura de magnetita e hematita pelas seguintes rotas: coprecipitação com atmosfera ambiente e N<sub>2</sub>; e combustão em micro-ondas com diferentes precursores (citratos-nitratos, glicina-nitratos). O tamanho do cristalito das amostras, calculado usando a equação de Scherrer [44], foi 40, 45 e 43 nm para as amostras NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q, respectivamente. Estes resultados corroboraram os encontrados em [43, 45]. Analisando os resultados, pôde-se observar um leve aumento do tamanho do cristalito quando foi acrescentado o APTMS às NPMs, devido ao fato do APTMS ser um material amorfo. Fato que também ocorreu quando foi acrescentada a quitosana na NPMs, porém, como a quitosana apresenta um perfil semicristalino [46, 47], o aumento foi menor do que o apresentado com a presença somente do APTMS. Quando se comparou as NPMs@SiO<sub>2</sub> e as NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q, notou-se uma leve diminuição do tamanho do cristalito; isto ocorreu provavelmente devido à carga superficial das moléculas de quitosana que ficaram aderidas à superfície das NPMs@SiO<sub>2</sub>. Segundo [48], a carga superficial das moléculas de quitosana aderidas à superfície das NPMs reduz o tamanho do cristalito.

Na Fig. 4 encontram-se os espectros de FTIR. Por meio do espectro da Fig. 4A, foi observada uma banda na faixa de aproximadamente 3660 cm<sup>-1</sup> característico de ligação O-H-O, provenientes da presença de água na amostra, a qual pode ter sido proveniente de adsorção superficial pela umidade do ar atmosférico e também devido ao KBr utilizado para a preparação da mesma, o qual é higroscópico, ter grande facilidade de absorver umidade. Em 1380 cm<sup>-1</sup> observou-se uma banda de estiramento simétrico de NO<sub>2</sub> proveniente possivelmente de nitratos que não reagiram durante a combustão. A hematita é caracterizada pela banda na região de 510 cm<sup>-1</sup> relativa à ligação Fe-O. Pode-se observar na Fig. 4B bandas de estiramento na região de 2914 cm<sup>-1</sup> atribuídas a  $\nu$ (C-H) alifáticos tipo sp<sup>3</sup>. Em 1635 cm<sup>-1</sup> observou-se uma banda de estiramento referente a C=O, que indicou possivelmente a coordenação com metais. As bandas múltiplas em torno de 1124 e 1033 cm<sup>-1</sup> corresponderam

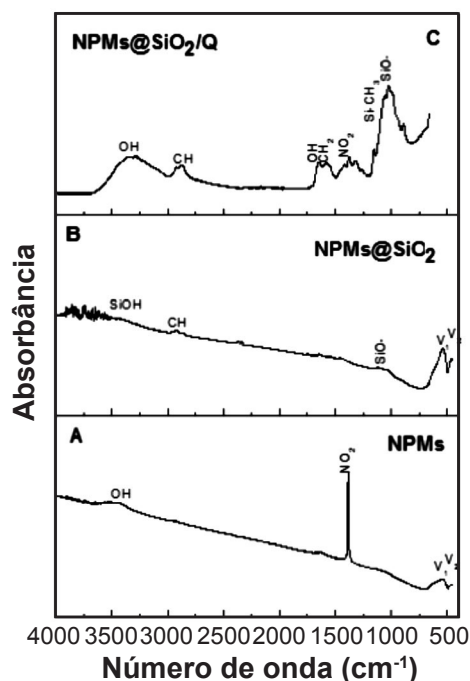


Figura 4: Espectros na região do infravermelho de: (A) NPMs, (B) NPMs@SiO<sub>2</sub> e (C) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.

[Figure 4: FTIR spectra of: (A) NPMs, (B) NPMs@SiO<sub>2</sub>, and (C) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.]

ao estiramento assimétrico  $\nu_{\text{ass}}(\text{Si-O})$ . Observou-se ainda bandas abaixo de 1000 cm<sup>-1</sup> que foram características do espinélio. A presença destas bandas confirmou a efetividade do processo de silanização. Na Fig. 4C observam-se de 3450 a 3200 cm<sup>-1</sup> absorções fracas atribuídas a ligações N-H de aminas primárias. Bandas de estiramento na região de 2919 e 2773 cm<sup>-1</sup> foram ocasionadas por vibrações de estiramento do grupo C-H assimétrico e simétrico, respectivamente, dos grupos de metila pertencente aos radicais da quitosana. As bandas a 1740 e 1554 cm<sup>-1</sup> foram relacionadas ao modo de vibração por estiramento da ligação C=O e à deformação da ligação N-H, respectivamente. Na faixa de 1456 e 1364 cm<sup>-1</sup> ocorreu uma absorção que pode ser atribuída à deformação simétrica de C-H. Em 1254 cm<sup>-1</sup> observou-se uma banda referente ao estiramento Si-CH<sub>3</sub> e em 1177 cm<sup>-1</sup> uma banda atribuída ao estiramento assimétrico Si-O-Si. Em 600 e 508 cm<sup>-1</sup> observaram-se bandas referentes às

vibrações nos sítios tetraédricos e octaédricos na estrutura do espinélio. O APTMS foi caracterizado pelas bandas múltiplas em torno de 1116 e 1023 cm<sup>-1</sup> correspondendo ao estiramento assimétrico  $\nu_{\text{ass}}(\text{Si-O})$ , e bandas N-H em 1632 a 1464 cm<sup>-1</sup> [11, 49]. A quitosana foi caracterizada pelas bandas de estiramento na região de 2926 e 2871 cm<sup>-1</sup>, que foram ocasionadas por vibrações de estiramento do grupo C-H assimétrico e simétrico, respectivamente, dos grupos de metila, uma banda em 1644 cm<sup>-1</sup> de grupamentos C=O e uma em 1577 cm<sup>-1</sup> correspondente à deformação angular assimétrica de N-H (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Essas bandas características da quitosana foram observadas em [25, 50]. Os resultados de FTIR revelaram que a silanização e a funcionalização na superfície da hematita ocorreu com sucesso já que foram observadas as bandas características do agente silano e da quitosana.

A Fig. 5 ilustra a morfologia dos nanocompósitos. Pôde-se observar que as NPMs foram caracterizadas por aglomerados grandes de partículas, com formatos de blocos irregulares e tamanhos variados (maiores e menores que 10 μm). Os aglomerados possuíam um aspecto rígido, indicativo de materiais formados por nanopartículas ligados por forças fortes. Observou-se ainda porosidade interaglomerado, o que provavelmente foi relacionada à liberação de gases durante a síntese de combustão. Para as amostras silanizadas não foram observadas mudanças significativas na morfologia, apenas aglomerados aparentemente com aspecto mais rígido e baixa porosidade, possivelmente devido à ligação covalente do silano com a superfície das NPMs, o que possivelmente tem relação com a presença do agente silano (orgânico) que fez um efeito selador na superfície e porosidade interna dos aglomerados. Este mesmo comportamento foi relatado em [51], quando foram sintetizadas e estudadas nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> revestidas com SiO<sub>2</sub>. Para a amostra após funcionalização com quitosana (Fig. 5C), verificou-se que as NPMs@SiO<sub>2</sub> se encontraram encapsuladas pela quitosana. Este mesmo fenômeno também foi observado em [52], quando foram estudadas nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (SPIONPs) encapsuladas com quitosana para uso como agente de contraste para IRM (imagem por ressonância magnética), e foi observada dispersibilidade na morfologia das nanopartículas após adição da quitosana, característica desejável para o seu uso

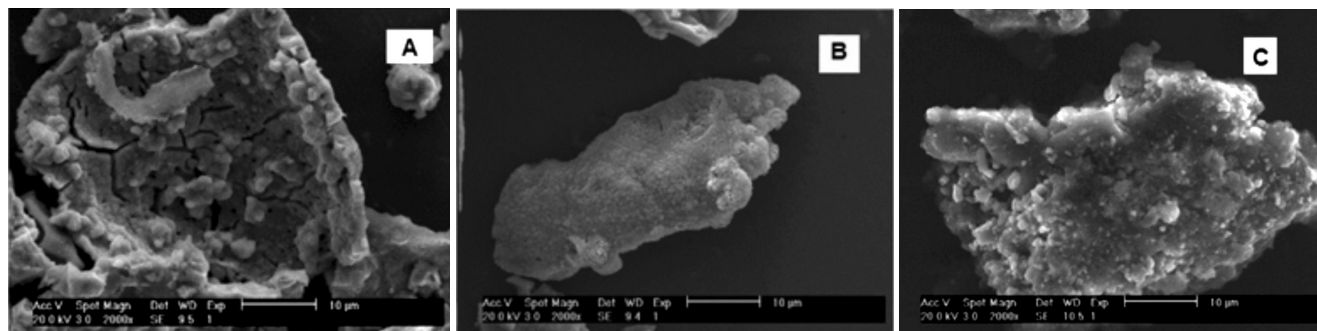


Figura 5: Micrografias obtida por microscopia eletrônica de varredura de: (A) NPMs, (B) NPMs@SiO<sub>2</sub> e (C) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.

[Figure 5: SEM micrographs of: (A) NPMs, (B) NPMs@SiO<sub>2</sub>, and (C) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.]

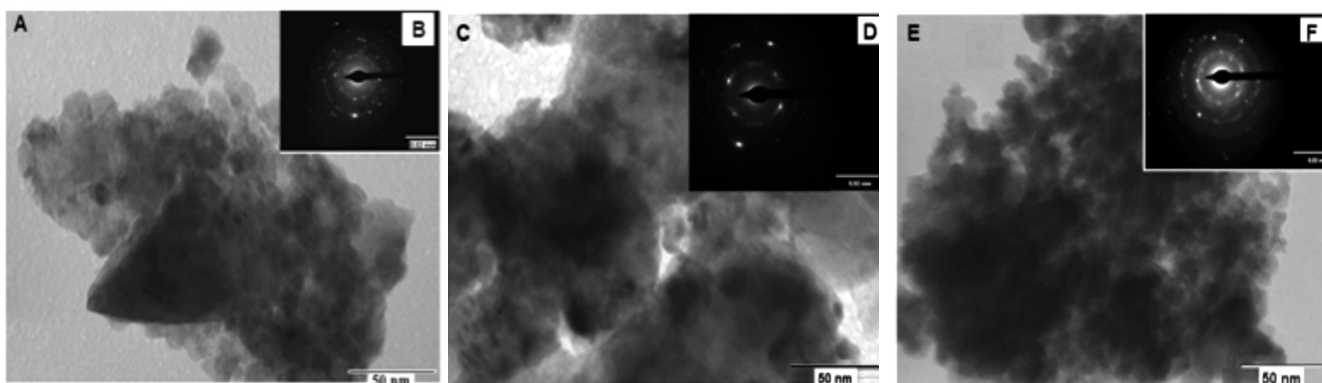


Figura 6: Micrografias obtida por microscopia eletrônica de transmissão e padrão de difração de elétrons de: (A, B) NPMs, (C, D) NPMs@SiO<sub>2</sub> e (E, F) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.

[Figure 6: TEM micrographs and SAED of: (A, B) NPMs, (C, D) NPMs@SiO<sub>2</sub>, and (E, F) NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.]

em aplicações biomédicas.

Nas imagens de microscópio eletrônico de transmissão (MET) apresentadas nas Figs. 6A, 6C e 6E, de forma geral, podem-se observar partículas com tamanho menor que 50 nm, porém aglomeradas. Observou-se que após silanização e funcionalização as nanopartículas ficaram envolvidas pelo APTMS e pela quitosana, devido à interação entre os radicais livres e as nanopartículas. Desta forma o contato interpartícula diminuiu devido à redução da energia superficial. Nos padrões de difração de elétrons da hematita, Figs. 6B, 6D e 6F, observam-se anéis concêntricos bem definidos que corresponderam às famílias de planos  $\{hkl\}$  pertencentes à fase da hematita, comprovando a presença do material cristalino. Com a adição do APTMS e da quitosana, observou-se que estes anéis se tornam menos definidos, indicando a presença de materiais não cristalinos. Comparando os resultados de MET deste trabalho para a amostra Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> com os resultados reportados em [22], notou-se claramente que na referência citada também foi observado o mesmo efeito de aglomeração das partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, o que elevou o tamanho da mesma após a silanização.

As análises termogravimétricas das amostras estudadas são apresentadas na Fig. 7. Analisando a amostra NPMs, observou-se uma pequena perda de massa total em torno de 3% correspondente à perda de água livre adsorvida na superfície das nanopartículas, prováveis transformações dos hidróxidos em ferrita e/ou perda de água estrutural. Analisando a influência do APTMS, observou-se que a amostra apresentou dois eventos principais: i) o primeiro entre 40 e 165 °C, correspondente à perda de água livre adsorvida na superfície das nanopartículas; e ii) entre 189 e 500 °C, atribuído à perda dos grupos funcionais C-H, C=O, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> da cadeia carbônica do agente silano (APTMS) e à decomposição residual dos demais componentes do recobrimento orgânico (Si-O e N-O). Tais eventos são reportados em [53]. A perda de massa total foi cerca de 20%, evidenciando o efeito de que o processo de silanização aumentou a perda de massa, o que já era esperado uma vez que as nanopartículas foram recobertas por um material organometálico (APTMS). A amostra NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q apresentou três etapas de perda de massa:

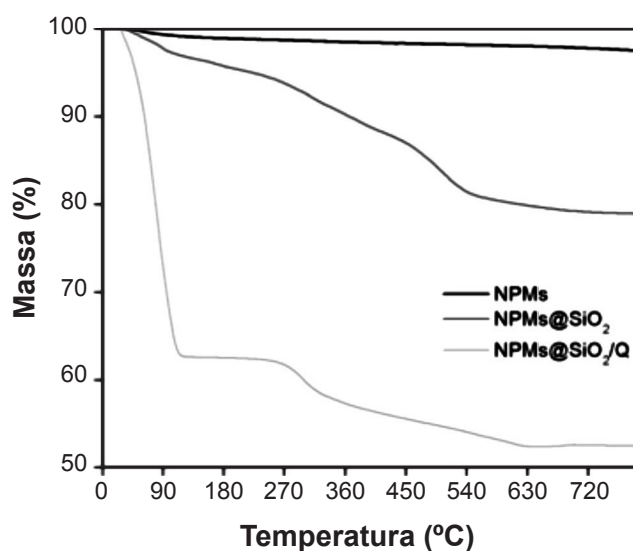


Figura 7: Curvas termogravimétricas para NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.

[Figure 7: TG curves of the NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> and NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.]

a primeira relacionada à perda de água adsorvida e ao teor de umidade no polissacarídeo, na faixa de 25 a 100 °C; a segunda associada à degradação da quitosana, na faixa de 100 a 500 °C; e a terceira relacionada à degradação térmica dos carbonos residuais da fase orgânica e de resíduos das nanopartículas inorgânicas, na faixa de 500 a 800 °C, alcançando perda de massa total de 48%. Verificou-se que as amostras NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q também se comportaram como um material estável termicamente na faixa de temperatura estudada, indicativo que as interações do silano com as nanopartículas foram ligações fortes, o que manteve a estabilidade do material mesmo em temperaturas elevadas.

O comportamento magnético medido por meio das curvas de histerese é apresentado na Fig. 8. As curvas de histerese de NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q, de forma geral, apresentaram o ciclo M x H (magnetização x campo magnético) estreito, sendo portanto característico de material magnético mole. Estudos recentes mostram

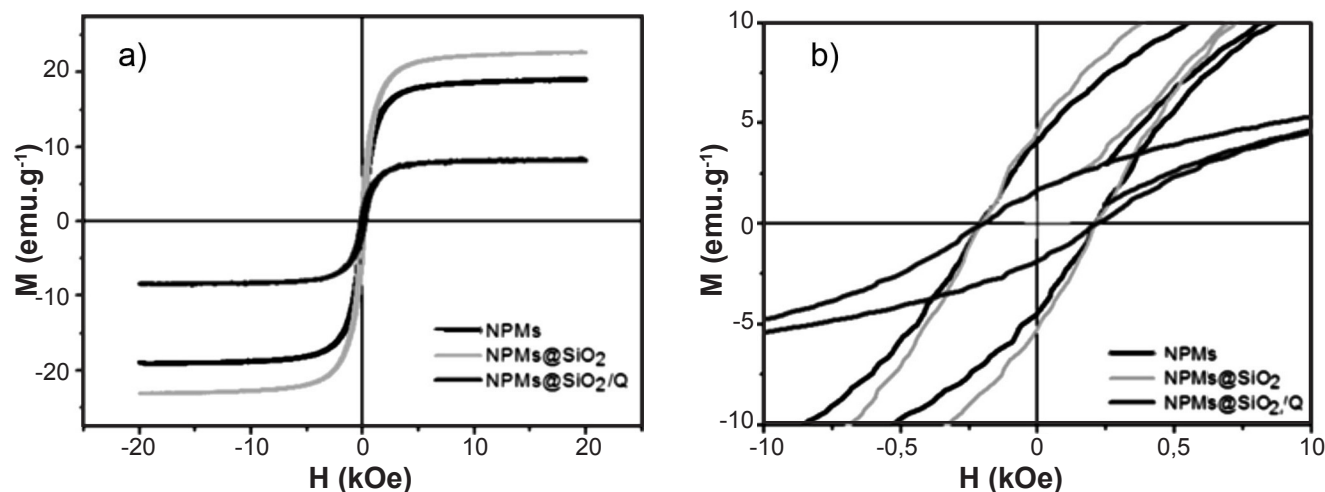


Figura 8: Curvas de histerese magnéticas para as NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q (a) e ampliação das curvas de histerese (b).  
 [Figure 8: Magnetic hysteresis curves of the NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> and NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q (a), and expansion of hysteresis curves (b).]

Tabela I - Parâmetros de histerese para as amostras NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.  
 [Table I - Hysteresis parameters for the samples NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> and NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q.]

Amostra	M <sub>s</sub> (emu.g <sup>-1</sup> )	M <sub>r</sub> (emu.g <sup>-1</sup> )	H <sub>c</sub> (kOe)	M <sub>s</sub> /M <sub>r</sub>	Área (emu.g <sup>-1</sup> .kOe)
NPMs	19,1	4,2	0,2	0,219	338,64
NPMs@SiO <sub>2</sub>	22,6	4,4	0,2	0,207	401,48
NPMs@SiO <sub>2</sub> /Q	8,20	1,7	0,2	0,217	145,07

Tabela II - Resultados para citotoxicidade das amostras estudadas.  
 [Table II - Results for cytotoxicity of the samples.]

	CN	CP	NPMs	NPMs@SiO <sub>2</sub>	NPMs@SiO <sub>2</sub> /Q
VC (%)	107,6	1,8	118,4	120,4	120,4
σ (%)	19,1	1,4	4,9	1,4	4,1

Notas: CN - controle negativo; CP - controle positivo; VC - viabilidade celular; σ - desvio-padrão.

que o comportamento magnético das nanoestruturas de hematita é fortemente dependente de sua forma e estrutura [54]. Na Tabela I encontram-se os parâmetros magnéticos M<sub>s</sub> (magnetização de saturação), M<sub>r</sub> (magnetização remanente), H<sub>c</sub> (campo coercivo), relação M<sub>s</sub>/M<sub>r</sub> e área (perda por histerese). De acordo com o apresentado, os pós obtidos possuíam características ferrimagnéticas, pois não apresentaram M<sub>r</sub>=0 e foram de acordo com o reportado em [1]. Após a funcionalização houve redução na magnetização de saturação, em torno de 43% da hematita pura, indicativo da presença da quitosana, o qual por não ser magnético criou uma barreira para o alinhamento dos spins no interior do domínio magnético. Comportamento semelhante foi encontrado também em [48]. Porém, de forma geral, observou-se que mesmo com a quitosana a hematita continuou sendo atraída pelo campo magnético. Esta mesma tendência se manteve para os resultados obtidos para a magnetização remanente, onde foi observado praticamente o mesmo valor para as amostras NPMs e NPMs@SiO<sub>2</sub> e redução de 57% para NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q. O campo coercivo,

H<sub>c</sub>, para a hematita antes e após silanização e funcionalizada com quitosana se manteve constante. Assim, a partir desses resultados, observou-se que a modificação da superfície manteve as características magnéticas, ou seja, a hematita continuou sendo atraída pelo campo magnético fortemente.

Os dados apresentados na Tabela II são relacionados à citotoxicidade, que mostraram que as amostras-teste (NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q) foram classificadas como não citotóxica, pois apresentaram viabilidade celular acima de 70%, sendo um pouco maior para as amostras NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q, fato esperado já que tanto o APTMS quanto a quitosana não são consideradas tóxicas [15, 25]. Este comportamento foi semelhante ao de amostras de hematita expostas por 24 h a células Hek 293 em níveis de dosagem de 100 até 500 µg/mL [55].

A quantidade de GOD (glicose oxidase) imobilizada e a eficiência de imobilização das amostras NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q estão apresentadas na Tabela III. Pôde-se notar, de forma geral, que os dados foram reprodutivos com desvios-padrão relativamente baixos em relação à mé-

Tabela III - Resultados do teste de imobilização de GOD para as amostras NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q. [Table III - Results for the GOD immobilization test for NPMs, NPMs@SiO<sub>2</sub> and NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q samples.]

Amostra	$m_{ads}$ (mg)	$C_f$ (mg/mL)	$q$ (mg GOD/mg NPMs)	Média	$\sigma$	EI (%)
NPMs	3,30	0,0238	0,0149	0,0157	0,0007	50,76
	3,50	0,0202	0,0161			58,19
	3,10	0,0232	0,0162			52,03
NPMs@SiO <sub>2</sub>	3,30	0,0101	0,0232	0,0237	0,0004	79,21
	3,00	0,0127	0,0238			73,77
	3,50	0,0064	0,0240			86,70
NPMs@SiO <sub>2</sub> /Q	3,20	0,0044	0,0275	0,0273	0,0013	90,98
	3,00	0,0058	0,0284			88,09
	3,30	0,0056	0,0259			88,45

Notas:  $m_{ads}$  - massa de nanopartículas utilizadas;  $C_f$  - concentração de GOD após as 4 h;  $q$  - quantidade de GOD imobilizada pelas nanopartículas;  $\sigma$  - desvio-padrão; EI - eficiência de imobilização.

dia. Com relação à eficiência de imobilização (EI), observou-se que a imobilização da GOD realizada pelo híbrido foi maior que a amostra pura, em média 49% e 66% para NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q, respectivamente. Desta forma, verificou-se que a imobilização da GOD pelos híbridos NPMs@SiO<sub>2</sub> e NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q foi mais eficiente do que as NPMs. Estes resultados foram relacionados ao tipo de mecanismo que ocorreu na imobilização, ou seja, para a hematita pura o mecanismo foi por adsorção física da GOD na superfície das nanopartículas, de forma a minimizar a tensão superficial existente. Porém, este mecanismo resulta em uma ligação fraca o que facilmente faz com que a GOD se desprenda da superfície. No caso dos híbridos, o mecanismo ocorreu por ligação covalente entre a GOD e os híbridos. Para NPMs@SiO<sub>2</sub>, a ligação foi formada nos grupos NH<sub>2</sub> do APTMS [8]; já para o NPMs@SiO<sub>2</sub>/Q, as hidroxilas e as aminas presentes na quitosana formaram ligações com os grupos silanois (-Si-OH) do APTMS [56] e assim com a GOD.

Os resultados de quantidade média de GOD imobilizada por cada 1 mg de nanopartículas nas três amostras estudadas mostraram significativo aumento à medida que se modificou a superfície das nanopartículas com o APTMS e a quitosana (Tabela III). Tais resultados corroboraram os resultados encontrados em [20], quando foi estudada a imobilização da GOD utilizando Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> silanizada com TEOS e APTMS+glutaraldeído (GA) em que foram obtidos 0,13 mg de GOD imobilizada por cada 1 mg de nanopartículas ativadas, o que refletiria uma eficiência de 90% de imobilização das nanopartículas ativadas, sendo a imobilização realizada por ligação cruzada (*cross-linking*) entre a GOD e o GA. No estudo [34], a imobilização de GOD usando óxido de grafeno alcançou eficiência de 75%, por meio de ligação covalente. Comparando os resultados de imobilização da GOD deste trabalho com os encontrados na literatura, observou-se a concordância do fenômeno de maior imobilização da GOD nos compósitos, uma vez que a presença do recobrimento da sílica proveniente do agente silano e/ou da quitosana realizou ligação covalente com a

enzima deixando-a fixada na superfície das nanopartículas. Por outro lado, a imobilização da GOD na superfície do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> se deu por adsorção física, que é uma ligação fraca promovendo fácil remoção da GOD.

## CONCLUSÕES

O compósito de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sintetizado por reação de combustão apresentou como fase majoritária a hematita (78%), com 22% de magnetita, e características nanométricas (40 nm). A modificação da superfície ocorreu de forma satisfatória, comprovada pela presença das bandas características do silano e da quitosana na análise de FTIR. As amostras mostraram comportamento ferrimagnético, e a presença do silano e da quitosana reduziu o valor de magnetização de saturação para cerca de 43% da hematita pura, porém manteve a característica ferrimagnética. A análise de citotoxicidade mostrou que o compósito de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> antes e após modificação não foi considerado tóxico tendo sua viabilidade celular aumentada com a presença do silano e quitosana. Logo, é um material com possibilidade de uso na biomedicina. Os testes preliminares para imobilização da GOD mostraram que a modificação na superfície aumentou o poder de prender a enzima na nanopartícula, o que é necessário para a fabricação de biossensores para os diabéticos.

## REFERÊNCIAS

- [1] K. Supattarasakda, K. Petcharoen, T. Permpool, A. Sirivat, W. Lerdwijitjarud, Powder Technol. **249** (2013) 353-359.
- [2] S. Laurent, S. Dutz, U.O. Hafeli, M. Mahmoudi, Adv. Colloid Interface **166** (2011) 8-23.
- [3] X.P. Shen, J.L. Wu, S. Bai, H. Zhou, J. Alloys Compd. **506** (2010) 136-140.
- [4] A.A.S. Alfaya, L.T. Kubota, Quím. Nova **25**, 5 (2002) 835-841.
- [5] S. Yu, G. Wu, X. Gu, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, J. Ma,



Colloids Surf. B: Biointerfaces **103** (2013)15-22.

[6] M. Tadić, N. Citaković, M. Panjan, Z. Stojanović, D. Marković, V. Spasojević, J. Alloys Compd. **509** (2011) 7639-7644.

[7] F. Herranz, E. Almarza, I. Rodriguez, B. Salinas, Y. Rosell, M. Desco, J.W. Bulte, J. Ruiz-Cabello, Microsc. Res. Tech. **74** (2011) 577-591.

[8] H.U. Lee, C. Park, S.W. Kim, Process Biochem. **47** (2012) 1282-1286.

[9] Z. Ming, Z. Xianqing, W. Sen, C. Chao, C. Yali, J. Medical Colleges PLA **24**, 4 (2009) 239-243.

[10] X.C. Wu, Y. Zhang, C.Y. Wu, H.X. Wu, Trans. Nonferrous Met. Soc. China **22**, 1 (2012) 162-168.

[11] S. Kanimozhi, K. Perinbam, Mater. Res. Bull. **48** (2013) 1830-1836.

[12] L. Xu, M.J. Kim, K.D. Kim, Y.H. Choa, H.T. Kim, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. **350**, 1-3 (2009) 8-12.

[13] B. Diaz-Benito, F. Velasco, F.J. Martinez, N. Encinas, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. **369**, 1-3 (2010) 53-56.

[14] F. Yang, C. Jin, S. Subedi, C.L. Lee, Q. Wang, Y. Jiang, J.I. Li, Y. Di, D. Fu, Cancer Treat. Rev. **38** (2012) 566-579.

[15] S. Kango, S. Kalia, A. Celli, J. Njugna, Y. Habibi, R. Kumar, Progr. Polym. Sci. **38** (2013) 1232-1261.

[16] B. Sahoo, K.S.P. Devi, S. Dutta, T.K. Maiti, P. Pramanik, D. Dhara, J. Colloid Int. Sci. **431** (2014) 31-41.

[17] M. Kooti, S. Gharineh, M. Mehrkhah, A. Shaker, H. Motamedi, Chem. Eng. J. **259** (2015) 34-42.

[18] A.H. Faraji, P. Wipf, Bioorg. Med. Chem. **17** (2009) 2950-2962.

[19] F.K. Tavaría, E.M. Costa, I. Pina-Vaz, M.F. Carvalho, M.M. Pintado, Rev. Bras. Eng. Biom. **29**, 1 (2012) 110-120.

[20] J. Huang, H. Wang, D. Li, W. Zhao, L. Ding, Y. Han, Mater. Sci. Eng. C **31** (2011) 1374-1378.

[21] H. Wang, J. Huang, C. Wang, D. Li, L. Ding, Y. Han, Appl. Surf. Sci. **257** (2011) 5739-5745.

[22] J.J. Feng, A.J. Wang, Y.F. Li, Z.H. Li, Y.L. Sun, J.R. Chen, Mater. Sci. Eng. C **32** (2012) 1640-1647.

[23] L. Khanna, N.K. Verma, Mater. Sci. Eng. B **178** (2013) 1230-1239.

[24] L. Lei, X. Liu, Y. Li, Y. Cui, Y. Yang, G. Qin, Mater. Chem. Phys. **125**, (2011) 866-871.

[25] E.V.E. Zapata, C.A.M. Pérez, C.A.R. González, J.S.C. Carmona, M.A.Q. Lopez, P.E. García-Casillas, J. Alloys Compd. **5365** (2012) 5441-5444.

[26] J. Singh, M. Srivastava, P. Kalita, B.D. Malhotra, Proc. Biochem. **47** (2012) 2189-2198.

[27] A.C.C. Esteves, A. Barros-Timmons, T. Trindade, Quím. Nova **27**, 5 (2004) 798-806.

[28] P.T.A. Santos, C.M. Furtado, M.O. Rodrigues, A.C.F.M. Costa, Mater. Sci. Forum **727-728** (2012) 1119-1124.

[29] A.M. Nowicka, A. Kowalczyk, M. Donten, P. Kryszynski, Z. Stojek, Anal. Chem. **81** (2009) 7474-7483.

[30] B.K. Sunkara, R.D.K. Misra, Acta Biomater. **4** (2008) 273-283.

[31] P.B. Shete, R.M. Patil, N.D. Thorat, A. Prasad, R.S. Ningthoujam, S.J. Ghosh, S.H. Pawar, Appl. Surf. Sci. **288**

(2014) 149- 157.

[32] A.M. Grumezescu, E. Andronescu, A.M. Holban, A. Ficai, D. Ficai, G. Voicu, V. Grumezescu, P.C. Balaure, C.M. Chifiriuc, Int. J. Pharm. **454** (2013) 233-240.

[33] B.L. Wang, X.S. Liu, Y. Ji, K.F. Ren, J. Jian, Carbohydr. Polym. **90** (2012) 8-15.

[34] L. Zhou, Y. Jiang, J. Gao, X. Zhao, L. Ma, Q. Zhou, Biochem. Eng. J. **69** (2012) 28-31.

[35] S.M. Tangutooru, V.L. Koppaarthi, G.G. Nestorova, E.J. Guilbeau, Sens. Actuators B **166-167** (2012) 637-641.

[36] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Biotechnol. Adv. (2009) 489-501.

[37] S.R. Jain, K.C. Adiga, V. Pai Verneker, Flame **40** (1981) 71-79.

[38] A.C.F.M. Costa, R.H.G.A. Kiminami, "Dispositivo para produção de nanomateriais cerâmicos em larga escala por reação de combustão e processo contínuo de produção dos nanomateriais", Rev. Propriedade Industrial, patente nº BR 10 2012 002181-3 (2012).

[39] W. Stober, A. Fink, E. Bohn, J. Colloid Int. Sci. **26** (1968) 62-69.

[40] M.M. Bradford, Anal. Biochem. **72** (1976) 248-254.

[41] T.B. Massalki, *Binary alloy phase diagrams*, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol. 1, Am. Soc. Metals, Ohio, EUA (2007).

[42] V.C.S. Diniz, B.B. Dantas, A.R. Figueiredo, D.R. Cornejo, A.C.F.M. Costa, Cerâmica **61**, 359 (2015) 298-302.

[43] M.A. Ahmed, S.M. Ali, S.I. El-Dek, A. Galal, Mater. Sci. Eng. B **178** (2013) 744-751.

[44] B.D. Cullity, *Elements of X-ray diffraction*, 2<sup>nd</sup> Ed., Addison-Wesley, Reading (1978).

[45] C.A. Dinçer, N. Yildiz, N. Aydogan, A. Çalimli, Appl. Surf. Sci. **318** (2014) 297-304.

[46] J.B.S. Wladymyr, M.J.B. Cardoso, K.V. Almeida, E.P. Nascimento, K.A.S. Farias, M.V.L. Fook, Rev. Eletr. Mater. Proc. **8**, 3 (2013) 136-140.

[47] T. Uragami, S. Tokura, *Material science of chitin and chitosan*, 1<sup>st</sup> Ed., Kodansha Springer, Japan (2006).

[48] H. Shagholani, S.M. Ghoreishib, M. Mousazadeh, Int. J. Biol. Macromol. **78** (2015) 130-136.

[49] K.J. Dussan, C.A. Cardona, O.H. Giraldo, L.F. Gutierrez, V.H. Perez, Bioresour. Technol. **101** (2010) 9542-9549.

[50] A. Sionkowska, H. Kaczmarek, M. Wisniewski, J. Skopinska, S. Lazare, V. Tokarev, Surf. Sci. **600**, 80 (2006) 3775-3779.

[51] K. Nadeem, H. Krenn, W. Sarwar, M. Mumtaz, Appl. Surf. Sci. **288** (2014) 677-681.

[52] C. Sanjai, S. Kothan, P. Gonil, S. Saesoo, W. Sajomsang, Carbohydr. Polym. **104** (2014) 231-237.

[53] Y. Yao, S. Miao, S. Yu, L.P. Ma, H. Sun, S. Wang, J. Colloid Int. Sci. **379** (2012) 20-26.

[54] Y. Li, Z. Jin, T. Li, Z. Xiu, Sci. Total Environ. **421-422** (2012) 260-266.

[55] H. Yan, B. Zhang, Mater. Lett. **65** (2011) 815-817.

[56] A. Mendes, P.C. Oliveira, H.F. Castro, R.L. Giordano, Quím. Nova **34** (2011) 831-840.

(Rec. 01/04/2016, Rev. 01/08/2016, 31/10/2016, Ac. 31/10/2016)