Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

MÉTODO SOL-GEL PARA A OBTENÇÃO DE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS APLICADOS COMO FILMES ANTIMICROBIANOS, SENSORES ELETROQUÍMICOS E SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Anike Hübner Virgili

Tese de Doutorado

Porto Alegre, novembro de 2023.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

MÉTODO SOL-GEL PARA A OBTENÇÃO DE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS APLICADOS COMO FILMES ANTIMICROBIANOS, SENSORES ELETROQUÍMICOS E SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Anike Hübner Virgili

Tese de doutorado realizada sob orientação da Profª Eliana Weber de Menezes, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para obtenção do título Doutor(a) em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, novembro de 2023.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS DURANTE O DOUTORADO

Artigos publicados

A.H. Virgili, D.C. Laranja, P.S. Malheiros, M.B. Pereira, T.M.H. Costa, E.W. de Menezes; Nanocomposite film with antimicrobial activity based on gold nanoparticles, chitosan and aminopropylsilane. *Surf. Coat. Technol.,* **2021**, 415, 12708633. doi: 10.1016/j.surfcoat.2021.127086

O. Tkachenko, D.S. da Rosa, A.H. Virgili, M.A. Vasconcellos, T.M.H. Costa, L.T. Arenas, M. Deon, E.V. Benvenutti, E.W. de Menezes; Magnetic and Mesoporous Silica-Niobia Material as Modifier of Carbon Paste Electrode for *p*-Nitrophenol Electrochemical Determination. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2021**, 32, 609. doi: 10.21577/0103-5053.20200215

L.V. de Souza, A.H. Virgili, G.O. Teixeira, R. Hinrichs, D. Bianchini, T.M.H. Costa, , L.T.Arenas, E.V.Benvenutti, E.W. de Menezes; Mesoporous structured silica modified with niobium oxide and cobalt hematoporphyrin applied to the simultaneous electrochemical evaluation of oxalic and uric acids. J. Sol-Gel Sci. Technol., **2021**. doi: 10.1007/s10971-021-05638-3

F.M. Morawski, B.B. Xavier, A.H. Virgili, K.S. Caetano, E.W.de Menezes, E.V. Benvenutti, T.M.H. Costa, L.T. Arenas; A novel electrochemical platform based on mesoporous silica/titania and gold nanoparticles for simultaneous determination of norepinephrine and dopamine. *Mater. Sci. Eng. C.*, **2021**, 120, 111646. doi: 10.1016/j.msec.2020.111646

Trabalhos publicados em eventos científicos

A.H. Virgili, D.C. Laranja, P.S. Malheiros, T.M.H. Costa, M.B. Pereira, E.W. de Menezes. Filmes contendo AuNP/Quitosana, obtidos por *drop-casting*, com propriedades antimicrobianas. VI Mostra do Centro de Nanociência e Nanotecnologia - CNANO/UFRGS, **2021**.

A.H. Virgili, D.C. Laranja, P.S. Malheiros, T.M.H. Costa, M.B. Pereira, E.W. de Menezes. Antibacterial properties of Chitosan/AuNP films obtained by drop-casting method. XVIII Brazilian MRS Meeting, **2019**.

A.H. Virgili, L. Luza, J.A. Fernandes, T.M.H. Costa, E.V. Benvenutti, E.W. de Menezes. Gold nanoparticles stabilized by chitosan and its use as nanocatalyst for hydrogenation reactions. XVIII Brazilian MRS Meeting, **2019**.

A.H. Virgili, L. Luza, J.A. Fernandes, T.M.H. Costa, E.V. Benvenutti, E.W. de Menezes. Nanocatalisador de ouro suportado em quitosana e sua aplicação em reações de hidrogenação. V Mostra do Centro de Nanociência e Nanotecnologia - CNANO/UFRGS, **2019**.

DEDICATÓRIA

"Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que você sabe."

(Aldous Huxley)

Dedico este trabalho aos meus pais José Carlos e Carla,
e à Matilda. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Dra. Eliana Weber de Menezes, pelo apoio, confiança, por todos os ensinamentos, compreensão e principalmente, paciência. Obrigada pela dedicação e orientação ao longo destes 7 anos!!

Aos Professores, Dr. Edilson Valmir Benvenutti, Dra. Tania Maria Haas Costa e Dra. Leliz Ticona Arenas agradeço pela confiança em fazer parte deste grupo, pelos ensinamentos e amizade. Serei sempre grata!

Ao Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues, pela possibilidade e confiança em realizar as análises enzimáticas em seu Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática. Agradeço também os ensinamentos neste longo período e paciência para as explicações. Obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática. À Denise, pela parceria, principalmente durante a pandemia. Obrigada pelas conversas (até sobre Itaqui) e muitas risadas tomando nosso cafezinho da máquina do Professor. Obrigada!!

Aos colegas do LSS muito obrigada pelos momentos de descontração, conversas, risadas. À Danielle, Karine e Gabriela, minhas companheiras de Campus do Vale durante a pandemia. Obrigada pela parceria daqueles momentos que foram tão difíceis!!

Ao Henrique, obrigada pelo apoio destes anos, que foram fundamentais e que se tornaram mais especiais contigo ao meu lado. Te amo!

À minha família, em especial aos meus amados pais, José Carlos e Carla, por todo amor, compreensão, e principalmente incentivo para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada por tudo, amo vocês!!

À Capes pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos materiais com diferentes configurações, através do método sol-gel de síntese, que foram aplicados como: filmes antimicrobianos, sensores eletroquímicos e suportes para imobilização de enzimas. Assim, na primeira parte do trabalho foi desenvolvido um sistema constituído por nanopartículas de ouro, quitosana e APTMS (3-aminopropiltrimetoxisilano), que foi utilizado na preparação de filmes nanoestruturados empregando a técnica *drop-casting*. Estes filmes apresentaram boa homogeneidade e baixa rugosidade. Os filmes contendo os três componentes (nanopartículas de ouro, quitosana e APTMS) exibiram alto desempenho antimicrobiano contra a bactéria *Salmonella* Typhimurium, em comparação com o filme branco (preparado na ausência de nanopartículas de ouro). Na segunda parte do trabalho foi desenvolvido um sistema constituído por um xerogel magnético, mesoporoso, de sílica/nióbia, contendo partículas de magnetita esféricas (com diâmetro médio de 330 nm), que foi utilizado na preparação de um sensor eletroquímico para determinação de *p*-nitrofenol. Este material (MP@SiNb), composto por Fe_3O_4 (*ca.* 25% m/m), SiO_2 (*ca.* 42% m/m) e Nb_2O_5 (*ca.* 33% m/m) apresentou mesoporos na faixa de 20 a 50 nm e uma área superficial específica significativa de 68 $m^2.g^{-1}$. Essas características permitiram sua aplicação na construção de um eletrodo de pasta de carbono modificado (MP@SiNb-CPE), que se mostrou sensível e seletivo para determinação de *p*-nitrofenol, abrangendo amostras reais de água. Na terceira parte do trabalho foi desenvolvido um sistema constituído por um xerogel mesoporoso de sílica, organofuncionalizado com 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS), que foi utilizado como suporte para imobilização de enzimas lipase. Este suporte, denominado Si-GPTMS, apresentou bons parâmetros para a imobilização de enzimas, como área superficial específica de ~160 $m^2.g^{-1}$ e mesoporos com máximo de distribuição em ~22 nm. Devido a estas características texturais, este material foi aplicado para a imobilização de enzimas lipase *Candida antarctica* B (CalB) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Foram feitos testes de imobilização utilizando diversas cargas de enzima CalB no suporte Si-GPTMS. O maior rendimento e eficiência de imobilização foi obtido para o material com a menor carga de enzima, SiGCalB-10. Alguns testes de imobilização, onde foi modificado o volume total de solução enzimática por grama de suporte, mostraram diferentes valores dos parâmetros de imobilização, atividade e massa de proteína imobilizada através da reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP). Os ensaios de estabilidade térmica mostraram que a enzima livre perde sua atividade em temperatura de 60 ºC, enquanto que o biocatalisador SiGCalB-10 apresentou atividade após 1 h de reação em temperatura de 80 ºC. A enzima livre e o biocatalisador heterogêneo foram aplicados na reação de síntese do éster butirato de butila, atingindo 80% de conversão em até 6 h de reação, a 50 ºC. Os ensaios de reuso do biocatalisador SiGCalB-10 mostraram que após 9 ciclos de 3 h, ao longo de 40 dias, o mesmo manteve aproximadamente 90% da atividade inicial.

Palavras-chave: materiais nanoestruturados, sílica, filmes antimicrobianos, sensor eletroquímico, determinação de *p*-nitrofenol, catalisador enzimático, biocatálise heterogênea.

ABSTRACT

In this study, materials with different configurations were developed using the sol-gel synthesis method, which were applied as: antimicrobial films, electrochemical sensors and support for enzyme immobilization. Thus, in the first part of the study, a system composed of gold nanoparticles, chitosan, and APTMS (3-aminopropyltrimethoxysilane) was developed, which was used to prepare nanostructured films using the *drop-casting* technique. These films exhibited good homogeneity and low roughness. The films containing all three components (gold nanoparticles, chitosan, and APTMS) exhibited high antimicrobial performance against the bacteria *Salmonella* Typhimurium compared to the blank film (prepared in the absence of gold nanoparticles). In the second part of the study, a system was developed consisting of a magnetic, mesoporous, silica/niobia xerogel, containing spherical magnetite particles (with an average diameter of 330 nm), which was used in the preparation of an electrochemical sensor for the determination of *p*-nitrophenol. This material (MP@SiNb), comprised of Fe_3O_4 (*ca*. 25% w/w), SiO_2 (*ca*. 42% w/w), and Nb_2O_5 (*ca*. 33% w/w), exhibited mesopores in the range of 20 to 50 nm and a significant specific surface area of 68 $m^2.g^{-1}$. These characteristics allowed its application in the construction of a modified carbon paste electrode (MP@SiNb-CPE), which proved to be sensitive and selective for the determination of *p*-nitrophenol, including real water samples. In the third part of the study, a system was developed consisting of a mesoporous silica xerogel, organofunctionalized with 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS), which was used as a support for immobilizing lipase enzymes. This support, named Si-GPTMS, presented good parameters for enzyme immobilization, such as a specific surface area of ~160 $m^2.g^{-1}$ and mesopores with maximum distribution at ~22 nm. Due to these textural characteristics, this material was applied for the immobilization of *Candida antarctica* B (CalB) and *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase enzymes. Immobilization tests were carried out using various loads of CalB enzyme on the Si-GPTMS support. The highest yield and immobilization efficiency was obtained for the material with the lowest enzyme load, SiGCalB-10. Some immobilization tests, where the total volume of enzyme solution per gram of support was modified, showed different values of the immobilization parameters, activity and mass of immobilized protein through the hydrolysis reaction of *p*-nitrophenylpalmitate (*p*-NPP). Thermal stability tests showed that the free enzyme loses its activity at a temperature of 60 ºC, while the SiGCalB-10 biocatalyst showed activity after 1 h of reaction at a temperature of 80 ºC. The free enzyme and the heterogeneous biocatalyst were applied in the synthesis reaction of butyl butyrate ester, achieving 80% conversion within 6 hours of reaction, at 50 ºC. Reusability tests of SiGCalB-10 biocatalyst indicated that after 9 cycles of 3 hours, over 40 days, it retained approximately 90% of its initial activity.

Keywords: nanostructured materials, silica, antimicrobial films, electrochemical sensor, determination of *p*-nitrophenol, enzymatic catalyst, heterogeneous biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese de nanomateriais através dos métodos *top-down* e *bottom-up*.[2] 17
Figura 2: Estrutura do 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS).[42] 21
Figura 3: Imagens de amostras de nanopartículas de ouro após a redução do precursor metálico (A). As cores indicam diferentes tamanhos das nanopartículas (A,B) e cada solução com um diferente Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) (C) no espectro de UV-Vis.[55] 23
Figura 4: Mecanismos de estabilização: estérico, eletrostático, eletrostérico.[64] 24
Figura 5: Estruturas da quitina e quitosana.[69] 25
Figura 6: Estrutura esquemática das paredes celulares Gram-negativas e Gram-positivas.[76] 27
Figura 7: Mecanismos de atividade antimicrobiana de nanopartículas metálicas.[83] 28
Figura 8: Representação de uma célula eletroquímica.[124] 32
Figura 9: Estrutura cristalina e dados cristalográficos da hematita, magnetita e maghemita: as bolas pretas correspondem a Fe^{2+}, as bolas verdes a Fe^{3+} e as bolas vermelhas a O^{2-}.[165] 36
Figura 10: Sobreposição de conformações fechadas e abertas da lipase *Thermomyces lanuginosus* (nas cores verde e ciano). A tampa fechada, a tampa aberta e a tríade catalítica estão destacadas pelas cores magenta, laranja e azul, respectivamente.[195] 40
Figura 11: Preenchimento dos poros na imobilização enzimática em sílica mesoporosa.[214] 42
Figura 12: Funcionalização de uma superfície contendo grupos silanóis com 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS).[222] 44
Figura 13: Reação de grupos epóxi com grupos nucleófilos localizados na superfície da molécula da enzima de resíduos de aminoácidos.[230] 44
Figura 14: Dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS: a) Espectro no UV-Vis; b) Imagens obtidas com câmera fotográfica digital. 58
Figura 15: Imagens de MET das dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS (500.000×). Ao lado, distribuição de tamanho das nanopartículas de ouro. 59
Figura 16: Espectro de absorção no UV-Vis do filme AuNP-ch-AP, juntamente com sua imagem fotográfica. 60
Figura 17: Imagens de MET de fragmentos do filme AuNP-ch-AP (300.000×) e distribuição dos tamanhos das nanopartículas de ouro. 61
Figura 18: Imagens de MEV do filme Branco e do filme AuNP-ch-AP (30.000×). 62
Figura 19: Imagem topográfica de AFM do filme AuNP-ch-AP. 62
Figura 20: Imagens das séries nas placas com o crescimento da bactéria S. Typhimurium em diferentes diluições: a) 1:10; b) 1:100; c) 1:1000; e d) 1:10.000. 63
Figura 21: Difração de raios X dos materiais: (a) MP; (b) MP@SiO_2; e (c) MP@SiNb. As barras verdes correspondem ao padrão de magnetita (JCPDS 19-0629). 65
Figura 22: Imagens de MEV obtidas em magnificações de 10.000 e 80.000 ×. (a) MP; (b) MP@SiO_2 e (c) MP@SiNb. 66
Figura 23: Curvas de magnetização não normalizadas para os materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb. 67
Figura 24: Análise textural dos materiais. (a) isotermas de adsorção-dessorção de N_2; (b) Curvas de distribuição de tamanho de poro BJH. 68
Figura 25: Voltamogramas cíclicos (CV) dos materiais CPE-NMOD, MP@SiO_2-CPE e MP@SiNb CPE: (a) na ausência e; (b) na presença de *p*-NP (148 μmol.L^{-1}); solução de eletrólito suporte (0,04 mol.L^{-1} de tampão Britton-Robbinson, pH = 6,0, 0,5 mol L^{-1} de $NaNO_3$) a uma taxa de varredura de 20 $mV.s^{-1}$. Figuras inseridas: CVs de CPE-NMOD e MP@SiO_2-CPE ampliados. 69
Figura 26: Voltamogramas de pulso diferencial na presença de *p*-NP (117,9 μmol.L^{-1}), empregando-se CPE não modificado, MP@SiO_2-CPE e MP@SiNb-CPE, em solução de eletrólito suporte (0,04 mol.L^{-1} de tampão Britton-Robinson, 0,5 mol.L^{-1} de $NaNO_3$) em pH = 6,0. 70
Figura 27: Voltamogramas de pulso diferencial de MP@SiNb-CPE na presença de *p*-NP (117,9 μmol L^{-1}) utilizando eletrodos com diferentes proporções (mg) dos componentes MP@SiNb, grafite e óleo

mineral, respectivamente: A) 5, 15 e 5; B) 8, 12 e 5; C) 9, 11 e 5; D) 9, 11 e 7,5. Solução eletrolítica de suporte: 0,04 mol L^{-1} de tampão Britton-Robinson, 0,5 mol L^{-1} de $NaNO_3$, pH=6,0..... 71
Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial de *p*-NP (39,4 μmol.L^{-1}) com MP@SiNb-CPE variando o pH em tampão Britton-Robbinson. 72
Figura 29: Voltamogramas de pulso diferencial de *p*-NP com MP@SiNb-CPE em tampão Britton-Robbinson 0,04 mol.L^{-1}, pH 7,0 e 0,5 mol.L^{-1} de $NaNO_3$. Figura inserida: correlação linear entre a corrente de pico e a concentração de p-NP. 72
Figura 30: a) Quatro voltamogramas de pulso diferencial, obtidos com o mesmo eletrodo (MP@SiNb-CPE), em um único dia. Tampão Britton-Robinson, pH 7,0 (47,75 μmol.L^{-1} de *p*-NP); b) Voltamogramas de pulso diferencial, com o mesmo eletrodo (MP@SiNb-CPE), obtidos em cinco dias diferentes. Tampão Britton-Robinson, pH 7,0 (47,75 μmol.L^{-1} de *p*-NP). 74
Figura 31: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em 1 dia, com a mesma célula, usando 4 eletrodos MP@SiNb-CPE preparados da mesma forma. Tampão Britton Robinson, pH 7,0 (47,75 μmol.L^{-1} de *p*-NP). 75
Figura 32: Voltamogramas de pulso diferencial de *p*-NP (78,6 μmol.L^{-1}) usando eletrodo MP@SiNb CPE em tampão Britton-Robinson, pH 7,0: (a) em solução tampão, sem interferente (vermelho); 0,05 mol.L^{-1} de 4-bromofenol (verde); 0,43 mol.L^{-1} de 2-bromofenol (azul); 0,01 mol.L^{-1} de 2-aminofenol (ciano); 0,05 mol.L^{-1} de hidroquinona (magenta); (b) em solução tampão, sem interferente (vermelho); 38 μmol.L^{-1} de 2-nitrofenol (magenta); 76 μmol.L^{-1} de 2-nitrofenol (ciano); 152 μmol.L^{-1} de 2 nitrofenol (azul). 76
Figura 33: Parâmetros de imobilização para os biocatalisadores SiGCalB-50 e SiGTLL-50. 77
Figura 34: Parâmetros de imobilização para os biocatalisadores SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100 e 200 mg de proteína/ g de suporte). 79
Figura 35: a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2; b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para os materiais: Sílica (Si), Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg de proteína/g de suporte). 81
Figura 36: Cinética da imobilização de SiGCalB-100. 83
Figura 37: Curvas termogravimétricas dos materiais: Sílica (Si), Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg/g de suporte). 83
Figura 38: Imagens de MEV para os materiais: (a) Sílica, (b) SiGPTMS, (d) Mapa de EDS para o elemento C, na região da imagem (c). 84
Figura 39: Estabilidade térmica da enzima CalB livre e enzima imobilizada SiGCalB-10 após 1 h e temperaturas entre 50 e 80 °C. 85
Figura 40: Conversão em butirato de butila a 50 °C, razão molar ácido butírico:butanol 1:1, 100 μL da enzima CalB livre, em tampão fosfato de sódio pH 7 0,1 mol.L-1 e 100 mg do biocatalisador SiGCalB-10. 86
Figura 41: Reusos do biocatalisador SiGCalB-10 na reação de esterificação do butirato de butila a 50 °C, razão molar ácido butírico:butanol 1:1; 3 h e 100 mg de biocatalisador. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medidas de viscosidade dinâmica a 25°C. 58
Tabela 2: Atividade antimicrobiana contra a bactéria *S.* Typhimurium. 63
Tabela 3: Análise elementar por EDS, % em massa de óxido. 67
Tabela 4: Análise textural dos materiais. 69
Tabela 5: Composição dos eletrodos 70
Tabela 6: Parâmetros de sensores eletroquímicos para *p*-NP publicados recentemente. 73
Tabela 7: Determinação de *p*-NP em amostras reais de água, ... 76
Tabela 8: Parâmetros de imobilização para SiGCalB-50 com diferentes razões de volume total de solução enzimática/massa de suporte. 80
Tabela 9: Área superficial específica (A_{BET}), volume de poros e diâmetro de poros para os materiais: Sílica, Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg de proteína/g de suporte). 82
Tabela 10: Percentual de perda de massa para os materiais: Sílica (Si), Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg/g de suporte). 84

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
Asp	Ácido Aspártico
AuNP	Nanopartículas de Ouro
AuNP-ch	Dispersão de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana
AuNP-ch-AP	Filme formado pela dispersão AuNP-ch-APTMS
AuNP-ch-APTMS	Dispersão AuNP-ch após adição de APTMS
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BHI	*Brain Heart Infusion* (caldo de nutrientes)
BSA	Albumina de Soro Bovino
CalB	Isoforma B da lipase de *Candida antarctica*
CE	Contra-eletrodo
CPE	Eletrodo de Pasta de Carbono
CPE-NMOD	Eletrodo de pasta de carbono não modificado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
GPTMS	3-glicidoxipropiltrimetoxisilano
$HAuCl_4$	Ácido Cloroáurico
His	Histidina
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LSPR	Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
MP	Partículas magnéticas
MP@SiNb	Xerogel magnético a base de sílica-nióbia
MP@SiNb-CPE	Eletrodo de pasta de carbono modificado com MP@SiNb
$MP@SiO_2$	Partículas magnéticas recobertas com sílica
$MP@SiO_2$-CPE	Eletrodo de pasta de carbono modificado com $MP@SiO_2$
o-NP	*o*-nitrofenol
p-NP	*p*-nitrofenol
p-NPP	*p*-nitrofenilpalmitato
RE	Eletrodo de referência
SCE	Eletrodo de calomelano saturado
Ser	Serina
SHE	Eletrodo padrão de hidrogênio
SiGCalB-X	Enzima CalB imobilizada em Si-GPTMS
Si-GPTMS	Xerogel de sílica organofuncionalizada com GPTMS
SiGTLL-X	Enzima TLL imobilizada em Si-GPTMS
TEOS	Tetraetilortosilicato
TLL	Lipase *Thermomyces lanuginosus*
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
WE	Eletrodo de trabalho
XLD	Xilose Lisina Desoxicolado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1 MATERIAIS NANOESTRUTURADOS 16
2.1.1 Métodos de obtenção de materiais nanoestruturados 16
2.1.2 Método sol-gel de síntese 18
2.1.3 Propriedades e estrutura da sílica mesoporosa 19
2.1.4 Organosilanos 20
2.2 FILMES NANOESTRUTURADOS ANTIBACTERIANOS 22
2.2.1 Nanopartículas de ouro (AuNP) 22
2.2.2 Quitosana 25
2.2.3 Obtenção de filmes finos nanoestruturados antibacterianos 29
2.3 SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS 30
2.3.1 Eletrodos de pasta de carbono (CPE) modificados com sílica mesoporosa e óxidos metálicos 34
2.4 BIOCATÁLISE HETEROGÊNEA 38
2.4.1 Enzimas como biocatalisadores 38
2.4.1.1 Enzimas Lipase 39
2.4.2 Métodos de imobilização de enzimas 41
2.4.3 Sílica mesoporosa como suporte para a imobilização de enzimas 42
2.4.3.1 Organofuncionalização de sílica mesoporosa visando a imobilização de enzimas 43
2.4.4 Reações de esterificação: síntese do éster flavorizante butirato de butila 45
3. OBJETIVOS 47
3.1 OBJETIVO GERAL 47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 47
4. PARTE EXPERIMENTAL 48
4.1 FILMES ANTIMICROBIANOS 48
4.1.1 Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana e aminopropilsilano (AuNP-ch-APTMS) 48
4.1.2 Preparação dos filmes 48
4.1.3 Caracterizações 48
4.1.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos filmes 50
4.2 SENSOR ELETROQUÍMICO 51
4.2.1 Síntese de partículas magnéticas (MP) pelo método solvotérmico 51
4.2.2 Partículas magnéticas recobertas com sílica (MP@SiO_2) 51
4.2.3 Síntese do xerogel magnético a base de sílica-nióbia (MP@SiNb) 51

4.2.4 Caracterizações 52
4.2.5 Medidas eletroquímicas 52
4.3 CATÁLISE ENZIMÁTICA 53
4.3.1 Síntese do xerogel de sílica 53
4.3.2 Organofuncionalização do xerogel de sílica (Si-GPTMS) 53
4.3.3 Imobilização das enzimas lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Candida antarctica* B (CalB) 54
4.3.3.1 Imobilizações das enzimas lipase 54
4.3.3.2 Quantificação de proteínas 55
4.3.3.3 Determinação da atividade enzimática na reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP) 55
4.3.3.4 Estabilidade térmica 55
4.3.4 Reação de síntese de butirato de butila 56
4.3.5 Ensaios de reuso 56
4.3.6 Caracterizações 57
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 57
5.1 FILMES ANTIMICROBIANOS 57
5.1.1 Caracterizações das dispersões e dos filmes 57
5.1.2 Atividade antibacteriana dos filmes 63
5.2 SENSOR ELETROQUÍMICO 65
5.2.1 Caracterizações dos materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb 65
5.2.2 Medidas eletroquímicas 69
5.2.3 Conclusão 77
5.3 CATÁLISE ENZIMÁTICA 77
5.3.1 Estudo da imobilização de enzimas lipase no suporte Si-GPTMS 77
5.3.2 Estudo das cargas de imobilização da enzima CalB no suporte Si-GPTMS 78
5.3.3 Influência da razão volume total de solução enzimática / massa de suporte na imobilização da enzima CalB no suporte Si-GPTMS 79
5.3.4 Caracterização 80
5.3.5 Estabilidade térmica da enzima CalB livre e imobilizada SiGCalB-10 85
5.3.6 Aplicação do biocatalisador na síntese de butirato de butila e ensaios de reuso 86
5.3.7 Conclusão 88
6. CONCLUSÃO GERAL 89

1. INTRODUÇÃO

A nanociência e a nanotecnologia envolvem a ideia de manipular a matéria em escala nanométrica, geralmente entre 1 e 100 nm, compreendendo, arquitetando e aplicando essas estruturas, nas mais variadas áreas. Materiais nanoestruturados são aqueles que apresentam pelo menos uma grandeza nessa escala, tais como tamanho de partícula, poros ou qualquer tipo de ordenação nessa escala, incluindo filmes, materiais lamelares, nanopartículas metálicas, entre outros.

Materiais com poros na escala entre 2 e 50 nm, também considerados nanoestruturados, são conhecidos como materiais mesoporosos. Estes podem ser sintetizados a partir do método sol-gel, que é baseado em reações de hidrólise e condensação de precursores moleculares. Comumente são utilizados precursores de silício, que apresentam cinética lenta, resultando em sílica como produto. Assim, pelo método sol-gel, podem ser obtidos xerogéis com alta porosidade e elevada área específica (m^2/g) devido à rede interconectada de poros formada durante a evaporação do solvente. Essa superfície pode ser modificada através da sua funcionalização com grupos orgânicos (organofuncionalização) ou inorgânicos (inorganofuncionalização).

A organofuncionalização da sílica geralmente é feita com grupos organosilanos, que além de conter um grupo orgânico funcional, também contém grupos hidrolisáveis que reagem com os grupos silanóis da superfície da sílica. Dependendo do organosilano utilizado na organofuncionalização da sílica, é possível obter um material mesoporoso e usá-lo como suporte para a imobilização de enzimas, produzindo biocatalisadores heterogêneos seletivos para reações específicas. Já na inorganofuncionalização da sílica são utilizados precursores metálicos como alcóxidos ou haletos que dão origem a filmes de óxidos metálicos na superfície da sílica. Portanto, a capacidade de combinar grupos orgânicos ou inorgânicos com a rigidez da sílica permite a obtenção de materiais multifuncionais, podendo ser empregados em diversas áreas.

Adicionalmente, o método sol-gel pode ser utilizado com precursores de outros elementos como titânio, zircônio e nióbio, para produzir titânia, zircônia e nióbia, respectivamente. Alguns destes óxidos metálicos, como nióbia, além de apresentarem *band gap* na faixa de semicondutores, mostram propriedades ácidas de Brønsted e Lewis que permitem interações com várias espécies orgânicas. Também, estes precursores metálicos podem ser aplicados simultaneamente com precursores de silício, tendo como produtos da heterocondensação óxidos

mistos, como sílica/titânia, sílica/nióbia, sílica/magnetita, que além de apresentarem as propriedades intrínsecas dos respectivos óxidos, podem apresentar expressiva área superficial e porosidade advindas da matriz sílica.

Portanto, a versatilidade do método sol-gel de síntese permite a obtenção de materiais com diferentes configurações que podem ser aplicados nas mais variadas áreas. É nesse contexto que esse trabalho se insere, no uso do método sol-gel para desenvolver materiais nanoestruturados na forma de filmes e matrizes porosas para serem aplicados como sistemas antimicrobianos, sensores eletroquímicos e biocatalisadores.

Desta forma, o trabalho está dividido em três partes, conforme descrito a seguir:

A primeira parte envolve o estudo da função que o 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) desempenha em um sistema de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana, seguido do uso deste material para a construção de filmes na superfície de vidro utilizando o método *drop-casting*, caracterização destes filmes e avaliação da atividade antimicrobiana contra a bactéria *Salmonella* Typhimurium;

Na segunda parte, um xerogel magnético e mesoporoso contendo sílica-nióbia-magnetita foi sintetizado, empregando o método sol-gel, e aplicado como um dispositivo eletroquímico sensível e seletivo para determinação de *p*-nitrofenol;

Na terceira parte, um xerogel de sílica, sintetizado pelo método sol-gel, foi organofuncionalizado com 3-glicidoxipropiltrimetroxisilano (GPTMS) e utilizado como suporte para a imobilização de enzimas lipase, *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Candida antarctica* B (CalB). O biocatalisador heterogêneo foi aplicado em reações de síntese do éster butirato de butila, e também em testes de reuso para esta mesma reação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS NANOESTRUTURADOS

Em 1959, o físico Richard Feynman apresentou uma palestra chamada "Há Muito Espaço no Fundo", na qual introduziu o conceito de nanotecnologia. Ele enfatizou a possibilidade de manipular a matéria em escalas atômicas e moleculares, destacando que as leis da natureza não eram um impedimento para trabalhar em escalas menores, e sim a falta de equipamentos e técnicas apropriadas.[1,2] Norio Taniguchi, em 1974, definiu a nanotecnologia como o processamento, separação, consolidação e deformação de materiais em nível atômico ou molecular.[1,2] As ideias apresentadas por Feynman e Taniguchi semearam a possibilidade de manipular a matéria em escalas atômicas e moleculares, o que impulsionou a transformação da nanotecnologia de uma ideia abstrata em um campo de pesquisa concreto, com promissores avanços potenciais em diversas áreas científicas e tecnológicas.[2] A era da nanotecnologia evoluiu com o desenvolvimento de ferramentas precisas, como o microscópio de varredura por tunelamento e o microscópio de força atômica, possibilitando os estudos de materiais nanoestruturados utilizados em diversas áreas nos últimos anos.[1,3]

Materiais nanoestruturados são materiais com uma dimensão na faixa da nanoescala e são feitos de um único material ou de vários materiais.[1,3] No entanto, os nanomateriais são interpretados de maneiras distintas devido à falta de uma definição rigorosa. Alguns estudos consideram nanomaterial aquele que apresenta alguma característica na escala 1 a 100 nm ou 1 a 1000 nm.[2-6] Na escala nanométrica, as partículas exibem excelentes propriedades ópticas, magnéticas, catalíticas, químicas e eletrônicas que diferem dos materiais em maior escala.[1-3] Por isso, esta área possui um enorme potencial em pesquisas relacionadas ao meio ambiente, diagnóstico de doenças, sensores eletroquímicos, catálise, na redução de infecções bacterianas e fúngicas nos campos da medicina, produtos farmacêuticos e agricultura.[3-9] As propriedades dos nanomateriais podem ser ajustadas conforme desejado através do controle preciso do tamanho, forma, condições de síntese e funcionalização apropriada.[2]

2.1.1 Métodos de obtenção de materiais nanoestruturados

Existem outras formas de produzir nanomateriais, mas geralmente os dois métodos de preparação são: método *top-down* (cima-para-baixo), que é um método destrutivo, que

decompõe materiais em grande escala em nanomateriais e o método *bottom-up* (baixo-para-cima), que é um método construtivo, que envolve a construção de um material, desde átomos até nanopartículas[2,5,10-13], conforme representado na Figura 1.

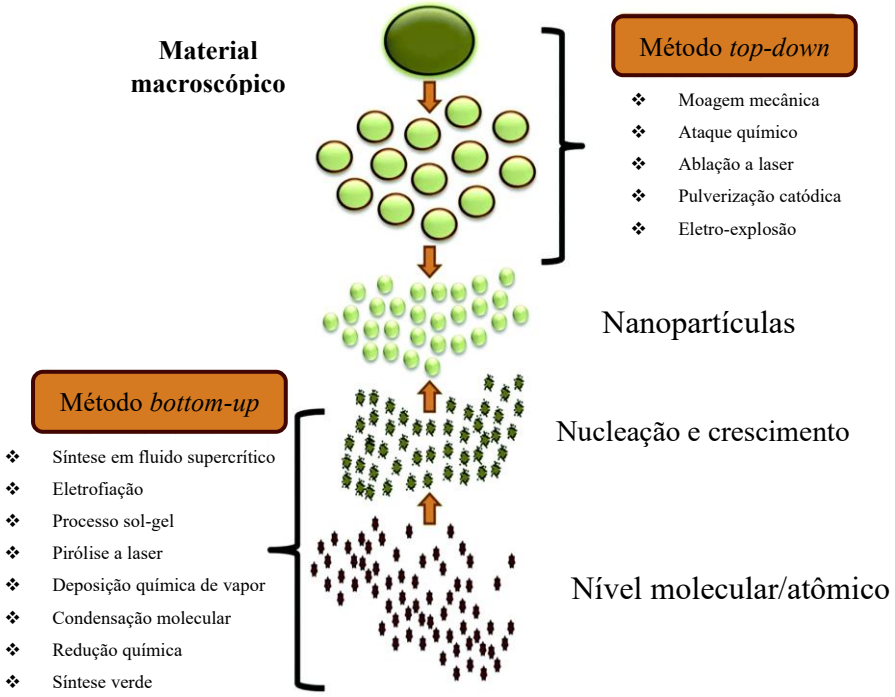

Figura 1: Síntese de nanomateriais através dos métodos top-down e bottom-up.[2]

Dentre os materiais nanoestruturados, aqueles classificados pela composição química se dividem em nanomateriais orgânicos (por exemplo, micelas, dendrímeros, hidrogéis, nanoconjugados), nanomateriais inorgânicos (por exemplo, metais, óxidos metálicos, sílicas porosas, zeólitas), nanomateriais baseados em carbono (fulerenos, nanofibras de carbono, diamantes, nanotubos de carbono, grafeno e derivados de grafeno) e nanomateriais compósitos.[2,3,10] Estes materiais podem ser obtidos como materiais simples (metais, carbono, polímeros), compósitos (metal-polímero, metal-sílica, metal-grafeno) ou na forma núcleo-invólucro (*core-shell*).[3]

Com base na porosidade, os nanomateriais podem ser classificados em materiais porosos e não porosos.[3] Os materiais porosos têm uma estrutura molecular menos densa que permite o fluxo de ar ou a absorção de espécies (átomos, íons e moléculas) e são classificados em 3 grupos: macroporosos (com poros > 50 nm), mesoporosos (poros entre 2–50 nm) e microporosos (poros < 2 nm).[3,10,14]

Materiais mesoporosos, possuem canais que podem ser isolados ou interconectados, e paredes que podem ser funcionalizadas com fases orgânicas, grupos alifáticos ou aromáticos.[13,15] Esses materiais podem ser classificados como ordenados, quando possuem estruturas de canais de poros unidirecionais e uniformes, e desordenados quando estas estruturas se orientam aleatoriamente e com tamanhos variáveis.[16,17] Dentre estes materiais sem ordenação definida, que podem ser obtidos pelo método *bottom-up*, estão aqueles que podem ser sintetizados a partir do método sol-gel, baseado em processos de hidrólise e policondensações.[18]

2.1.2 Método sol-gel de síntese

No método sol-gel, a solução coloidal chamada "sol", é uma mistura na qual partículas sólidas de dimensões de 1 a 100 nm, estão suspensas em um líquido.[18,19] Nesta etapa, são usados, como materiais iniciais, compostos orgânicos de metal ou sais de metais inorgânicos como alcóxidos metálicos [$M(OR)_n$], em que "M" pode ser B, Al, Zr, Ti, Si e "R" geralmente um grupo alquil.[18,20]

O processo de gelificação que envolve a transição entre as etapas "sol" e "gel", depende de reações de hidrólise e condensação, que podem ser aceleradas através da adição de um catalisador (ácido ou base).[18,21] Geralmente são utilizados como catalisadores ácidos inorgânicos, como HCl, NH_3, HF, ou ácidos orgânicos, como o ácido acético e ácido cítrico.[21]

Na primeira etapa da síntese sol-gel, ocorre a hidrólise dos grupos alcóxi dos alcóxidos metálicos (M–OR) para formar hidróxido metálico (M–OH) e álcool (Reação 1). Após, através de reações de condensações consecutivas, há a formação das pontes oxo (M–O–M) (Reações 2 e 3), com a produção de água e álcool como subprodutos (Esquema 1). Nesta etapa ocorre a gelificação, e assim, pelo crescimento da cadeia polimérica das pontes de oxo, há a formação de uma estrutura de rede tridimensional.[18,19,20]

Reação 1: $M–O–R + H_2O \rightarrow M–OH + R–OH$ (Hidrólise)

Reação 2: $M–OH + HO–M \rightarrow M–O–M + H_2O$ (Condensação da água)

Reação 3: $M–O–R + HO–M \rightarrow M–O–M + R–OH$ (Condensação do álcool)

Esquema 1: Representações esquemáticas das reações de hidrólise e condensação, onde "M" pode ser B,Al, Zr, Ti, Si e "R" geralmente um grupo alquil.[18]

As propriedades físico-químicas e a composição do material final são consideravelmente afetadas pelas reações químicas que acontecem ao longo do processo sol-gel e por parâmetros que podem ser controlados, como: pH da solução, temperatura, concentração dos reagentes.[15,20,22] Portanto, através deste método é possível sintetizar materiais com propriedades texturais controladas, já que estas reações ocorrem de forma lenta, possibilitando interferências através de variações nos parâmetros que afetam as etapas de síntese.[18,23,24] Além disso, o processo sol-gel apresenta várias vantagens em relação a outras metodologias de síntese convencionais, como a capacidade de produzir materiais híbridos orgânico-inorgânicos, além do baixo custo de produção em comparação com outros métodos de síntese.[15,23]

Existem três tipos de materiais sólidos que podem ser formados após a remoção do solvente: xerogel, criogel ou aerogel. O material é denominado xerogel quando a evaporação do solvente é realizada sob pressão ambiente e em temperatura ambiente, geralmente, por vários dias. Nestas condições, há o encolhimento dos poros e colapso da estrutura devido à tensão superficial do solvente e ao efeito capilar na interface sólido-líquido-vapor nos poros dos géis.[19,20,22,25] Quando a água (gelo) dentro do hidrogel é sublimada por liofilização, os materiais resultantes são chamados de criogéis e possuem uma estrutura macroporosa, caracterizada por poros grandes e irregulares.[19,26] Os aerogéis são geralmente produzidos, utilizando CO_2 supercrítico, em altas pressões e assim, se evita o colapso da nanoestrutura do gel nativo, preservando as excelentes propriedades texturais do gel.[20,22,26]

Dentre os materiais obtidos pelo método sol-gel, os xerogéis exibem propriedades únicas, como alta porosidade e uma grande área de superfície devido à rede interconectada de poros formados durante a evaporação do solvente.[23] Essa rede tridimensional final, pode ser adaptada mudando os precursores, alterando catalisadores ou através da funcionalização da superfície externa do material com organosilanos conferindo características específicas para o material.[27] Essas vantagens tornam o método sol-gel uma rota de síntese promissora para preparar diferentes tipos de materiais funcionais com estruturas e porosidade variadas, que podem ser aplicados como catalisadores, adsorventes, sensores, membranas e sistemas de administração de medicamentos.[13,15,18,23]

2.1.3 Propriedades e estrutura da sílica mesoporosa

Nos últimos anos, materiais a base de sílica mesoporosa tornaram-se alguns dos materiais mais usados em todo o mundo. A sílica possui propriedades como boa estabilidade, resistência

mecânica, caráter neutro para a maioria das moléculas e boas propriedades de superfície, como área superficial e presença de grupos hidroxila.[28]

Devido às propriedades já citadas, além de biocompatibilidade, não toxicidade e estabilidade, materiais à base de sílica podem ser aplicados em várias áreas, tais como: para imobilização de enzimas (que são importantes para o processamento e produção de alimentos); na detecção de analitos, como os pesticidas (relacionados ao monitoramento da segurança alimentar); embalagens de alimentos (a fim de melhorar a vida útil e qualidade dos alimentos), entre outros.[22,28-30]

Para o caso de uso de precursores de silício, na síntese sol-gel, a cadeia polimérica gera partículas primárias amorfas, que ficam embebidas no solvente. A remoção do solvente por evaporação, gera a porosidade.[18,31] A sílica tem fórmula mínima SiO_2, sendo constituída por unidades tetraédricas de SiO_4, onde cada átomo de Si se liga covalentemente a quatro átomos de O, e por sua vez, cada átomo de O se liga a dois átomos de Si. Portanto, a sílica é formada por grupos siloxanos (≡Si–O–Si≡), sendo que, na sua superfície são encontrados grupos silanol (≡Si–OH).[29]

2.1.4 Organosilanos

Os compostos monoméricos de silício são conhecidos como silanos. Quando contêm pelo menos uma ligação silício-carbono (por exemplo, $Si–CH_3$) são chamados de organosilanos.[32] Os organoalcoxisilanos são um tipo de composto organosilano em que o átomo de silício está ligado a um ou mais grupos orgânicos através de um grupo alcoxisilano $Si(OR')_3$, onde R' denota um grupo alquil ou aril.[33] Estes compostos carregam a funcionalidade alcoxisilano em uma extremidade e uma funcionalidade orgânica na outra extremidade.[34,35]

A fórmula geral é $R_{(4-n)}–Si–(R'X)_n$, onde n = 1 ou 2; X é um grupo organofuncional tal como vinil, amino, metacril, epóxi, etc.; R' é uma cadeia alquílica, hidrolisável, que conecta o átomo de Si ao grupo organofuncional; R é um grupo alcóxi hidrolisável, que pode incluir os grupos metóxi ($–OCH_3$), etóxi (OC_2H_5) ou acetóxi ($–OCOCH_3$).[34,36,37]

Suas aplicações são vastas e incluem compósitos, tintas, adesivos e promotores de adesão.[34] Na forma de promotores de adesão, eles funcionam como agentes de ligação, podendo formar ligações entre dois materiais que possuam propriedades diferentes.[34,37] Através de uma série de reações de hidrólise e condensação envolvendo os grupos hidrolisáveis, assim como os grupos hidroxila superficiais do substrato, os organosilanos podem ser ligados a superfícies inorgânicas, como sílica, alumina, titânia, zircônia, entre outros óxidos metálicos, formando

uma rede de polisiloxano.[34,35,38] Como resultado, os grupos organofuncionais, que não participam destas ligações, são orientados para o outro lado da superfície, o que influencia nas propriedades da superfície e na reatividade do substrato modificado.[38] Ao introduzir porções orgânicas apropriadas, os organoalcoxisilanos desempenham um papel crucial na modificação tanto da superfície quanto da matriz de materiais à base de sílica. Eles podem funcionar como agentes de acoplamento, além de atuar como direcionadores e portadores de funcionalidades bioativas.[33] Essa capacidade multifuncional de combinação de grupos orgânicos-inorgânicos em um único material, torna os organoalcoxisilanos materiais atraentes devido à possibilidade de combinar diferentes funcionalidades orgânicas com as vantagens de uma estrutura de sílica estável e robusta.[33]

O organoalcoxisilano 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) é uma molécula bifuncional que contém um grupo funcional silano e grupos metóxi, que sofrem polimerização em solução aquosa, e na outra extremidade uma amina (Figura 2).[39,40] Este silano pode melhorar as propriedades de vários nanocompósitos, modificar nanomateriais, sintetizar polímeros híbridos e muito mais.[41,42]

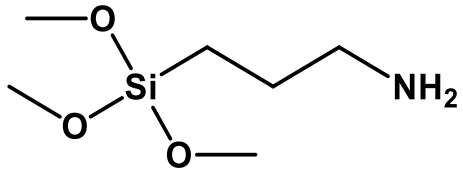

Figura 2: Estrutura do 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS).[42]

Os grupos amino (–NH_2) são responsáveis pelas interações eletrostáticas e ligações covalentes com grupos funcionais carregados negativamente de várias moléculas, como DNA e proteínas.[15] Devido às suas propriedades, tem sido utilizado como sorvente no tratamento de águas residuais, na imobilização de íons metálicos cataliticamente ativos, como agentes de acoplamento em termoplásticos ou termoendurecíveis para tratar a superfície de materiais inorgânicos antes da mistura com resina polimérica.[43,44] A modificação de superfícies de nanopartículas metálicas por este organosilano, proporciona à superfície potencial para diversas aplicações como em, remediação ambiental e biomedicina entre outras, pois permite a possibilidade de outras reações químicas, gerando assim materiais multifuncionais.[40] Com a ligação entre o silano e a superfície de nanopartículas, há a formação do grupo silanol na superfície das nanopartículas, o que reduz as interações partícula-partícula sendo assim possível obter uma dispersão homogênea de nanopartículas na matriz polimérica, melhorando a

dispersibilidade das partículas devido à alteração da carga da superfície.[44,45] Com o tempo, essas moléculas de silano hidrolisadas podem se autocondensar e formar longos oligômeros em solução, o que pode levar à aglomeração de partículas durante a formação das nanopartículas.[46]

2.2 FILMES NANOESTRUTURADOS ANTIBACTERIANOS

2.2.1 Nanopartículas de ouro (AuNP)

Dentre as nanoestruturas metálicas, as nanopartículas de ouro (AuNP) são de grande interesse devido às suas propriedades químicas, físicas e ópticas.[7,47,48] Isso se deve ao tamanho reduzido, à forma variável e à grande área de superfície, conferindo a elas um potencial biocompatível significativo, com baixa toxicidade.[48-51]

As notáveis propriedades ópticas das nanopartículas de ouro, e metálicas em geral, se devem à capacidade de sintonizar sua Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) na faixa visível do espectro, que consiste na oscilação coletiva de elétrons induzida pela radiação eletromagnética da luz.[5,52-54] O comprimento de onda do pico das nanopartículas varia de acordo com o tamanho, forma e composição, resultando em propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas distintas devido às oscilações de plasmons de superfície, o que tem levado a aplicações interessantes em diversos campos, como armazenamento de informações, optoeletrônica, imagens biológicas e terapia de câncer, entre outros.[5,52,54] Na síntese de nanopartículas esféricas de ouro, a LSPR gera uma forte banda de absorção única na região visível, com pico em torno de 520 nm, enquanto nanobastões de ouro exibem duas bandas de absorção distintas, correspondendo à LSPR transversal e longitudinal, devido à sua forma anisotrópica.[5,52] Portanto, o desafio na síntese de nanopartículas metálicas reside em manter um controle preciso sobre a forma e o tamanho das partículas para obter as propriedades desejadas.[52,53] À medida que o tamanho das AuNPs aumenta, a cor das suas dispersões muda de vermelho para tons de azul/roxo. Esse fenômeno ocorre devido ao deslocamento da banda de LSPR em direção à região de cor vermelha, resultando na absorção da luz nessa faixa de comprimento de onda, conforme é mostrado na Figura 3.[5,53,55]

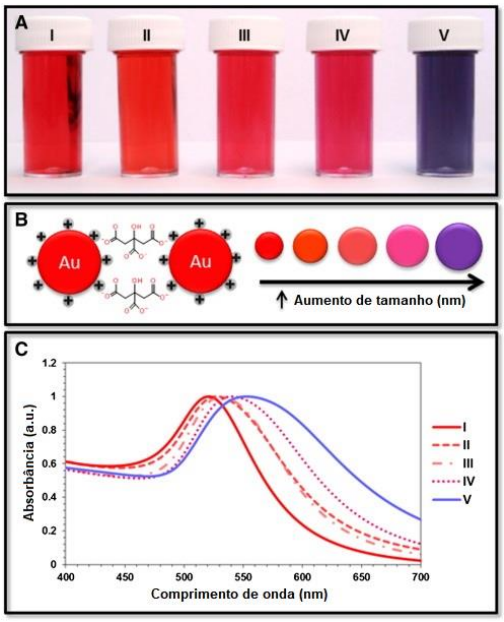

Figura 3: Imagens de amostras de nanopartículas de ouro após a redução do precursor metálico (A). As cores indicam diferentes tamanhos das nanopartículas (A,B) e cada solução com um diferente Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) (C) no espectro de UV-Vis.[55]

Diversos métodos têm sido empregados na preparação de nanopartículas de ouro (AuNP), considerando a variedade de abordagens tanto na síntese física quanto na química.[56,57]

Dentre os métodos físicos para obtenção de AuNP destacam-se: litografia, ablação a laser, radiação ultravioleta e ultrassônica, síntese à base de aerossol e redução fotoquímica do ouro metálico.[57,58] No entanto, esses métodos necessitam de uso de equipamentos mais complexos, tornando o processo demorado e dispendioso.[57,58] Dentre os métodos químicos para a produção de AuNP, o mais eficiente é a redução química, na qual um precursor de ouro, geralmente Au(III) na forma de $HAuCl_4$ ou $AuCl_4^-$, é reduzido por um agente redutor.[54,59] Na redução química do Au^+/Au^{+3} à Au^0 (nanopartículas de ouro) podem ser usados peróxido de hidrogênio, ácidos oxálico e cítrico, sulfitos, borohidretos e polióis como agentes redutores.[57,60,61] Durante o processo de síntese, é necessário também, a adição de um agente estabilizante para obter uma solução monodispersa de nanopartículas, já que estas tendem a se agregar.[54,59] É possível que o agente estabilizante e o agente redutor sejam as mesmas moléculas.[57] Turkevitch, em 1951, foi quem introduziu com sucesso a redução de derivados de ouro, especificamente $HAuCl_4$, por concentrações aquosas de citrato como uma das formas tradicionais de produção de AuNP.[57] Neste método, a redução química do ouro ocorre devido à íons citrato, que atuam como agente redutor e estabilizante, em temperatura próxima a 100˚C para produzir AuNP na forma de uma dispersão coloidal estável.[53,60]

O uso de agentes estabilizadores na preparação de AuNP, confere uma força repulsiva, que influencia a velocidade, o tamanho final e a geometria das nanopartículas

sintetizadas.[54,57,59-61] A excelente estabilidade coloidal das AuNP é obtida quando predominam mecanismos de repulsão através de três métodos de estabilização: (a) eletrostático, (b) estérico e (c) pela junção desses dois métodos: eletroestérico (Figura 4).[5,61-64]

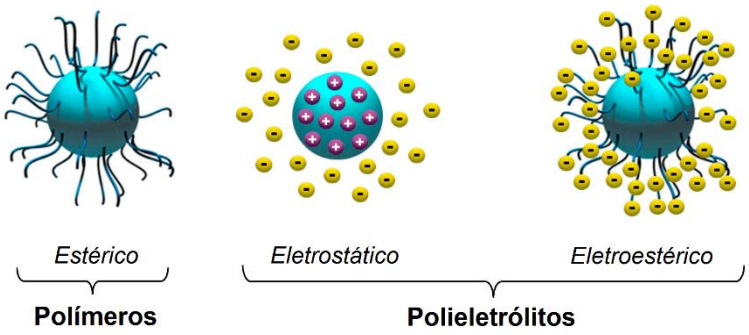

Figura 4: Mecanismos de estabilização: estérico, eletrostático, eletrostérico.[64]

(a) Na estabilização por repulsão eletrostática, íons presentes na dispersão podem aderir à superfície de uma nanopartícula coloidal, criando uma camada carregada.[61,63,64] Isto leva à formação de camadas duplas eletro-neutras, com um número equivalente de íons de carga oposta adjacentes às nanopartículas coloidais.[5,61] Esta estabilização, que envolve uma dupla camada elétrica originada pela presença de forças repulsivas e atrativas entre as nanopartículas, pode ser resultado da ação de alguns compósitos iônicos.[61,63] A força da repulsão eletrostática está ligada ao grau de carga superficial, que, por sua vez, depende de algumas variáveis como temperatura, valor do pH e da força iônica da solução.[61,63] Assim, componentes que tenham altas cargas superficiais, tais como: carboxilatos, citrato e polímeros iônicos podem ser empregados como agentes estabilizantes.[61,63]

(b) Quando é adicionada uma camada de proteção à superfície da nanopartícula, criando uma barreira física, diz-se que a estabilização ocorre por repulsão estérica.[5,61,64] A quantidade e orientação do agente estabilizante em relação às nanopartículas são cruciais para determinar a força das interações com outras moléculas.[63] Isso ocorre porque a estabilização estérica restringe a movimentação livre das nanopartículas, influenciando diretamente sua interação com o meio.[61,63] Essa estratégia desempenha um papel essencial na manutenção da estabilidade coloidal e na prevenção de aglomeração indesejada. Os agentes estabilizantes utilizados neste tipo de estabilização incluem vários grupos funcionais, tais como grupos hidroxila, citratos, surfactantes e diferentes oligômeros/polímeros.[57,61,65]

(c) A estabilidade das nanopartículas também pode ser mantida por outro tipo de estabilização, que envolve a unificação da estabilização eletrostática e estérica.[61,64] Neste caso,

é empregado um polieletrólito que irá proporcionar efeitos combinados de estabilização eletrostática e estérica em uma única molécula.[61,64] Uma dupla camada elétrica é formada ao redor da nanopartícula, com cadeias terminais alongadas e grupos polares na extremidade.[61] Isso proporciona repulsão estérica interna nas nanopartículas, prevenindo a aglomeração e resultando em um sistema de estabilização mútua.[61] O biopolímero quitosana, na forma protonada, pode estabilizar as AuNP através deste mecanismo conjugado.[56]

2.2.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, obtido a partir da desacetilação da quitina, principal componente estrutural dos exoesqueletos de crustáceos, insetos, bactérias e paredes celulares de fungos.[66-71] As fontes mais comuns de quitina comercial são cascas de caranguejo e camarão e, portanto, pode ser preparada a partir de resíduos das indústrias de processamento de frutos do mar.[67,71] A quitina tem aplicações limitadas devido à insolubilidade em muitos solventes, por isto, grande atenção tem sido dada para converter a quitina em derivados mais solúveis, sendo a modificação mais simples a N-desacetilação, que converte a quitina em quitosana.[69,71,72] Neste processo, algumas porções de N-acetilglucosamina da quitina são convertidas em unidades de glucosamina, dando origem a grupos amino, NH_2, na quitosana.[12,72] Este processo é incompleto, e por isto este polímero não possui estrutura definida, mas uma família de moléculas com diferenças em sua composição, tamanho e distribuição de monômeros, como pode ser observado na Figura 5.[12,67]

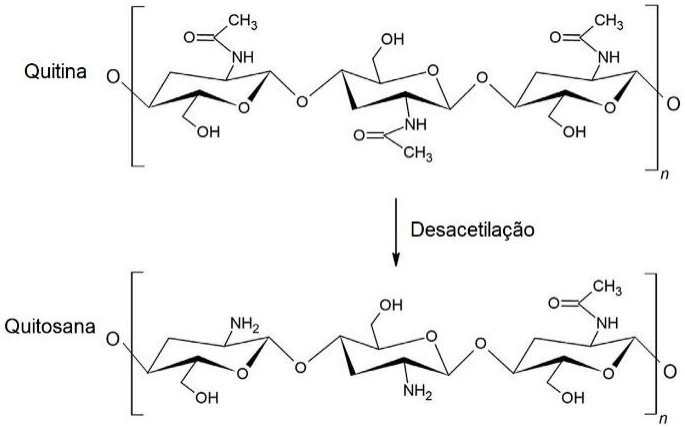

Figura 5: Estruturas da quitina e quitosana.[69]

O grande interesse na quitosana é devido às suas propriedades como solubilidade em diferentes meios, viscosidade, ação polieletrolítica, capacidade de formar filmes e quelação de

metais. Também possui características importantes como não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antibacteriana e antifúngica.[40,66,71]

Suas propriedades físico-químicas, como solubilidade e viscosidade, dependem principalmente do seu grau de desacetilação, peso molecular e presença de grupos amino protonados ($-NH_3^+$).[71] A protonação dos grupos amino ocorre em meio ácido, geralmente utilizando ácido acético ou fórmico, uma vez que seu valor de pKa é de aproximadamente 6,5.[12,40,69,71,72] Estes grupos funcionais também são responsáveis pela atividade antibacteriana, antifúngica e capacidade da quitosana de interagir eletrostaticamente com moléculas carregadas negativamente, como células, nanopartículas, lipídios, medicamentos e polímeros.[69,71,73] Suas propriedades únicas fazem da quitosana um biopolímero notável, exibindo aplicações em diversos campos, tais como: no tratamento de águas residuais (remoção de íons metálicos e corantes); membranas em processos de purificação; material para embalagens; revestimento de sementes e fertilizantes para liberação controlada de agroquímicos; na indústria de celulose e papel; em cosméticos (cremes corporais, loções); farmácia e medicina (cicatrização de feridas e como excipientes para entrega de medicamentos), etc.[71-75]

Com relação a atividade antimicrobiana, quitosana, APTMS e AuNP desempenham papéis significativos na inibição de bactérias (Gram positivas e Gram negativas). As bactérias são microorganismos caracterizados pela coloração obtida nos testes de Gram, que reflete a composição de suas elaboradas e complexas paredes celulares.[76,77] Essas estruturas desempenham um papel essencial ao proteger os componentes internos do ambiente muitas vezes desafiador, ao mesmo tempo que facilitam a importação e exportação seletiva de nutrientes e resíduos celulares.[77] As bactérias Gram-positivas (Figura 6), como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes,* contêm uma parede celular uniforme e relativamente espessa, variando entre 20 a 80 nm.[76-80] Essa estrutura, muito polar que só permite a permeação de compostos hidrofílicos, é composta por numerosas camadas de peptidoglicano, com a qual a quitosana reage.[71,76,77,79] Já as bactérias Gram-negativas (Figura 6), como *Escherichia coli* e *Salmonella spp*, contêm uma parede mais fina de peptidoglicano (<10 nm) e complexa.[76,77,79,80] Neste sistema, o peptidoglicano é circundado por uma membrana externa contendo uma camada interna de fosfolipídios e um lipopolissacarídeo externo, com o qual a quitosana consegue interagir.[71,76,77,79] A presença da membrana externa torna a parede altamente seletiva, dificultando também a passagem de pequenas moléculas hidrofílicas ou macromoléculas.[76,77]

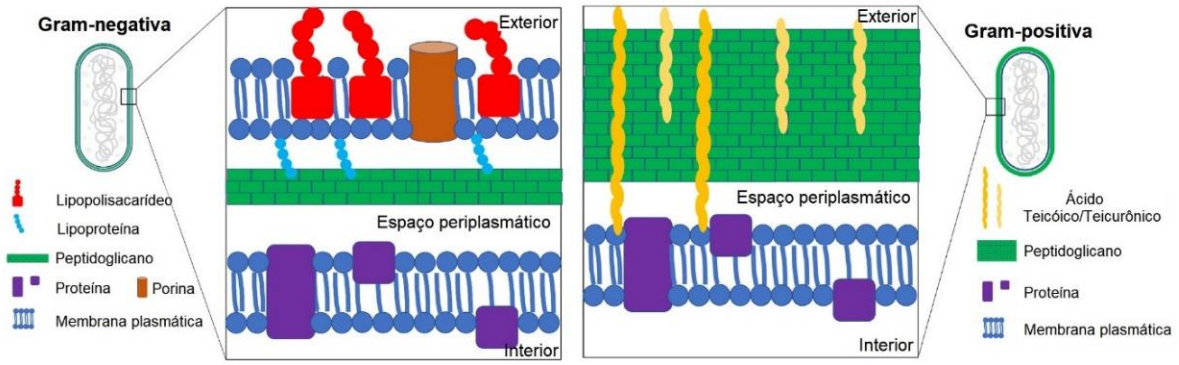

Figura 6: Estrutura esquemática das paredes celulares Gram-negativas e Gram-positivas.[76]

As propriedades e mecanismos de ação da quitosana, organosilanos e nanopartículas metálicas diferem, sendo que alguns aspectos ainda não foram completamente esclarecidos.[71,81-83] Acredita-se que a quitosana possui propriedades bacteriostáticas devido à capacidade de formação de sais de amônio nos grupos amino do biopolímero.[84] O número de grupos amino protonados ($–NH_3^+$), presentes na quitosana, aumenta com o aumento do grau de desacetilação, o que influencia a atividade antibacteriana.[71,78,80,84] No entanto, grande parte da literatura assume que a própria quitosana inibe o crescimento de bactérias.[84] Organosilanos com grupos amino em sua estrutura, tal como 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), quando protonados, apresentam o mesmo modo de ação da quitosana.[85-87] O mecanismo de ação envolve interações eletrostáticas entre os grupos $–NH_3^+$ com a membrana celular (com carga negativa), que aumenta a permeabilidade da membrana, produzindo o seu rompimento, o vazamento de componentes intracelulares e, consequentemente, a morte celular.[71,78,84,88,89] No caso da quitosana, ainda existem outras hipóteses para o mecanismo, como a inibição da síntese de proteínas assim que a quitosana se liga ao DNA intranuclear de microorganismos; quelação entre a quitosana e metais essenciais (que inibe o crescimento microbiano, já que o complexo quitosana-metal ajuda a obter uma carga positiva mais elevada, levando a uma melhor atividade antimicrobiana); e a criação de uma membrana de quitosana que funciona como barreira, impedindo a entrada de nutrientes e oxigênio.[84,88,89]

AuNP, quando estabilizadas por cargas positivas, são fortemente atraídas para a superfície das bactérias, danificando a membrana celular e modificando os diversos processos que ocorrem no interior da membrana.[51,76,79,82] A adesão das nanopartículas à superfície das bactérias é o primeiro passo de um complexo mecanismo de inibição bacteriana (Figura 7).[51,77,79,82] A carga superficial das nanopartículas (que pode ser positiva, negativa ou neutra dependendo do agente estabilizante) influencia fortemente a propriedade antibacteriana das nanopartículas e do sistema que as contém.[82] Como a superfície bacteriana apresenta uma carga

ligeiramente negativa, as nanopartículas com carga positiva são fortemente atraídas para a superfície das bactérias, o que altera a carga da parede para se tornar mais permeável resultando em um aumento da atividade antibacteriana.[51,76,79,82] Por outro lado, aquelas que possuam carga negativa ou neutra têm um efeito antibacteriano significativamente diminuído.[82] Após essa primeira etapa de aderência à superfície bacteriana, as nanopartículas menores que penetram na célula podem interagir com os constituintes internos, enquanto que as maiores são retidas fora da bactéria.[79,82] Como resultado, o DNA é afetado devido à inativação de proteínas, levando à morte celular.[51,77,83] Neste processo, também são liberados continuamente íons metálicos, que se ligam à estrutura da membrana celular que irá desestabilizar a membrana, causando vazamento de prótons, permitindo a entrada das nanopartículas maiores na célula.[6,47,82,83]

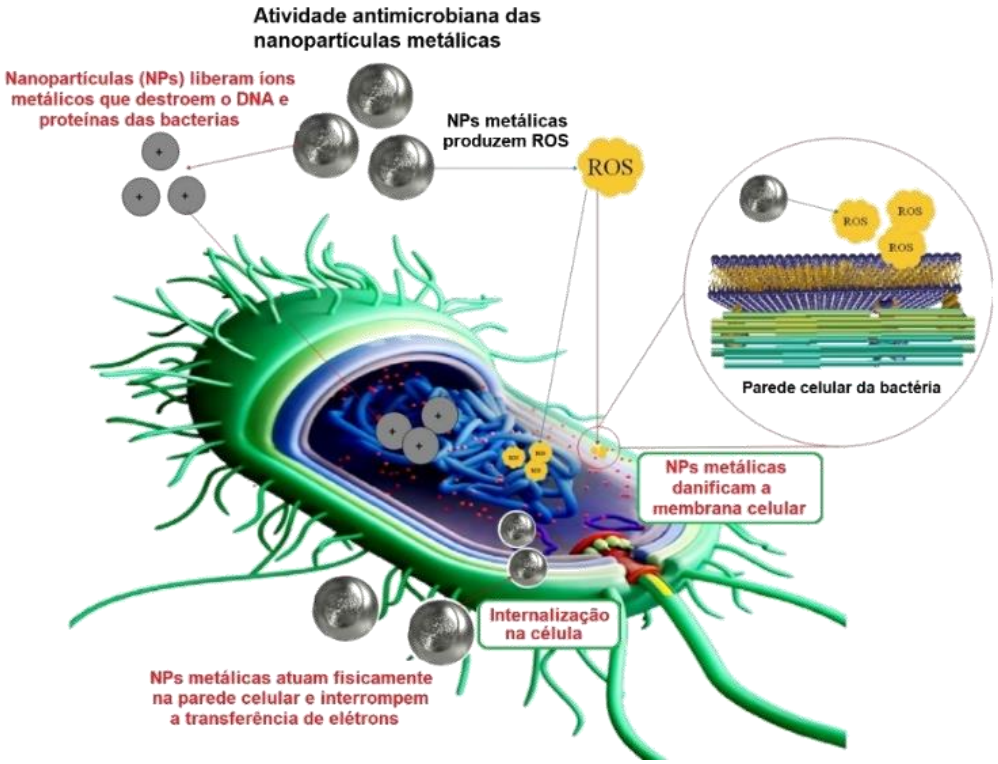

Figura 7: Mecanismos de atividade antimicrobiana de nanopartículas metálicas.[83]

Diversos estudos mostram que as AuNP são mais eficazes contra bactérias Gram-negativas, o que se deve à incorporação mais fácil das nanopartículas nas bactérias, já que estas possuem uma camada fina de peptidoglicano coberta por uma camada de lipopolissacarídeos.[76,79,90] Nas bactérias Gram-positivas, a espessa camada de peptidoglicano funciona como uma proteção, dificultando a entrada das nanopartículas nessas bactérias, de forma que as nanopartículas interagem diretamente com a superfície bacteriana.[51,76,79,90]

2.2.3 Obtenção de filmes finos nanoestruturados antibacterianos

Filmes finos nanoestruturados e antimicrobianos podem ser obtidos pelo método *drop-casting*, que é um método de deposição em pequenas áreas, simples e barato, que permite identificar condições de revestimento, podendo avaliar o material em relação à composição do sistema, solvente, aditivos, como na produção de filmes finos.[91-95] Para realizar o processo, aplica-se uma quantidade específica de solução em um substrato, o qual pode ser aquecido para melhorar a evaporação, e então permite-se que a solução seque no substrato por um tempo desejado, formando um filme fino sólido.[92,96,97] Contudo, as principais desvantagens deste método são a dificuldade em obter um revestimento uniforme e contínuo sobre a camada depositada. Isto pode ocorrer devido ao gradiente de temperatura e/ou concentração em uma gota que se espalha, resultando na geração de movimentos internos, criando um anel de café conhecido como "*coffee ring*".[94,96] A taxa de evaporação local é, portanto, um fator importante que controla o fluxo radial da solução para fora.[92,96]

A deposição de filme fino é o processo de criação e deposição de revestimentos em um material de substrato, com espessura de alguns nanômetros a vários micrômetros.[97,98] Os revestimentos de filmes finos possuem muitas características diferentes que são aproveitadas para alterar e/ou melhorar as propriedades estruturais, elétricas, magnéticas, ópticas e mecânicas de materiais.[98,99] Até agora, esta tecnologia encontrou aplicações em dispositivos semicondutores, células solares, eletrocatálise, indústria alimentícia e outros.[96,98-101]

O método *drop-casting* permite avaliar a atividade antimicrobiana da superfície de filmes, que é uma propriedade muito interessante quando se trata de embalagens para produtos na indústria alimentícia. As embalagens de alimentos desempenham uma função essencial ao isolar os produtos do ambiente, reduzindo o contato com fatores de deterioração como microorganismos, oxigênio, variações de temperatura e umidade, visando prevenir ou retardar a perda de valor nutricional e qualidade, prolongando assim a vida útil do produto.[68,101,102]

O desenvolvimento de filmes finos nanoestruturados contendo AuNP, quitosana e APTMS, com propriedades antimicrobianas contra bactérias patogênicas (como *Salmonella*) é uma alternativa para promover a segurança alimentar de forma mais segura e eficaz. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a *Salmonella*, é um dos microorganismos mais comuns envolvidos em doenças de origem alimentar, sendo uma ameaça à saúde pública mundial.[4,103-105] Essas bactérias são bastonetes Gram negativos, móveis e não formadoras de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e responsáveis por infecções esporádicas ou gastrointestinais generalizadas.[104,105]

A *Salmonella spp.* pode ser transmitida por meio de alimentos contaminados, sejam de origem animal (como ovos e carnes) ou vegetal (como frutas e nozes). Mais recentemente, também foi observada a transmissão através de água contaminada, podendo conter fezes, ração para animais e outros elementos.[104,105] O leite de vaca, também pode ser alvo de contaminação após o processo de pasteurização, através do contato com recipientes e superfícies previamente contaminados, especialmente quando as condições higiênicas não forem adequadamente mantidas.[106] O gênero *Salmonella* inclui duas espécies principais, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* e seis subespécies, cada uma das quais contendo vários sorotipos associados a infecções animais e humanas.[107,108] Este gênero de bactéria possui mais de 2.500 sorotipos, dentre estes, os serovares "tifóides" *S. entérica;* serovar Typhi e serovar Paratyphi, são hospedeiros adaptados aos humanos, onde causam uma infecção sistémica conhecida como febre tifóide ou paratifóide.[4,104,107,109] Outros serovares, como *S.* Typhimurium, têm uma ampla gama de hospedeiros e, em humanos, são frequentemente causadores de gastroenterite e são referidos como serovares "não tifóides".[107-109] Os sintomas de infecção como febre, náusea, vômito, diarreia, desidratação, fraqueza e perda de apetite geralmente aparecem 12 a 72 horas após a ingestão de produtos contaminados.[110]

2.3 SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos desempenham um papel importante no setor industrial, onde são utilizados como matéria-prima na produção e fabricação de resinas, plásticos, germicidas, produtos farmacêuticos, têxteis, corantes e produtos petroquímicos. Porém, quando liberados no meio ambiente, seus resíduos contaminam o solo e a água.[111-113]

Recentemente, a água contaminada pelo composto fenólico *p*-nitrofenol (*p*-NP), tem se tornado um problema, já que foi considerado inclusive um composto perigoso e tóxico pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).[111,114,115] O problema da contaminação está relacionado à sua liberação no meio ambiente após utilização como precursor e material intermediário na fabricação de corantes, pesticidas, pigmentos, explosivos, produtos farmacêuticos, polímeros de engenharia, reveladores fotográficos e lubrificantes anticorrosivos.[114,116] O *p*-NP possui alta solubilidade em água e estabilidade química, o que pode ser prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana, mesmo em baixas concentrações.[114,116] A ingestão de *p*-NP através de água ou alimentos contaminados, mesmo em concentrações mais baixas, resulta em problemas como dores de cabeça, náuseas, danos no fígado e nos rins e

distúrbios relacionados com o sistema nervoso.[114,116,117] Para superar os efeitos tóxicos do *p*-NP, ele precisa ser monitorado rotineiramente em amostras de alimentos e águas residuais industriais.[111,115]

Atualmente, vários métodos analíticos têm sido utilizados para detecção e quantificação de *p*-NP, tais como: quimioluminescência, fluorescência, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, cromatografia gasosa-espectrometria de massa, etc., porém muitos destes métodos requerem um pré-tratamento complexo de amostras, usuários bem treinados, instrumentos caros e solventes perigosos.[111] Por outro lado, os métodos eletroanalíticos são bem conhecidos por sua excelente resposta, além disso, são comparativamente mais simples, fáceis de usar e respondem à analitos específicos com melhor sensibilidade e menor custo.[115] Estes métodos pertencem à área da eletroquímica, que trata das alterações químicas provocadas pela passagem de eletricidade, mais especificamente de corrente elétrica através de uma solução.[118,119]

Nos métodos eletroquímicos, a conversão de dados em sinais elétricos é realizada através de sensores eletroquímicos. Segundo a IUPAC, um sensor químico é definido como "um dispositivo que converte dados químicos, desde a concentração de um único componente da amostra até a análise completa da composição, em um sinal analiticamente utilizável".[120,121] Nos sensores eletroquímicos, um sensor específico reage com um analito-alvo para produzir um sinal de detecção, convertendo o sinal elétrico à concentração do analito-alvo por um transdutor, para fornecer informações precisas e em tempo real sobre a composição química do ambiente.[120,121] Assim, se tais medições forem feitas repetidamente e armazenadas, o comportamento do sistema pode ser estudado.[122] Essencialmente, todos os processos eletroquímicos ocorrem na superfície do eletrodo ou próximo à ela, com o eletrodo atuando como fonte ou sumidouro de elétrons, por reações de oxidação-redução e também a outros processos químicos secundários, que acontecem quando os elétrons da superfície do metal interagem com os íons presentes na solução.[118]

Basicamente, a célula eletroquímica, conforme representada na Figura 8, é composta por três eletrodos imersos em um eletrólito: (a) o eletrodo de trabalho (WE), que é o eletrodo em estudo; (b) o contra-eletrodo (CE); e (c) o eletrodo de referência (RE).[116,123,124]

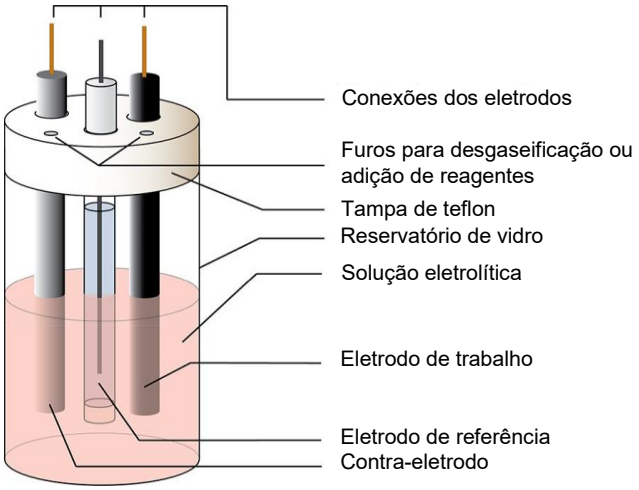

Figura 8: Representação de uma célula eletroquímica.[124]

(a) O eletrodo de trabalho realiza o evento eletroquímico de interesse e deve ser composto de material redox-inerte na faixa de potencial desejada, para que a corrente medida seja devido à corrente gerada pela reação redox da solução, sem a própria reação do eletrodo. O tipo de eletrodo de trabalho pode variar de experimento para experimento para fornecer diferentes janelas de potencial ou para reduzir/promover a adsorção superficial das espécies de interesse.[123,124]

(b) O contra-eletrodo tem a finalidade de completar o circuito elétrico após a aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho, para que ocorra redução/oxidação do analito. É possível registrar a corrente à medida que os elétrons fluem entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. Este eletrodo deve ser o mais inerte possível, podendo ser utilizados fios ou discos de platina, ou também materiais à base de carbono.[124]

(c) O eletrodo de referência possui um potencial de equilíbrio bem definido e estável e é usado como ponto de referência contra o qual o potencial de outros eletrodos pode ser medido em uma célula eletroquímica.[123,124] Alguns eletrodos de referência comuns usados em meios aquosos incluem o eletrodo de calomelano saturado (SCE), o eletrodo padrão de hidrogênio (SHE) e o eletrodo AgCl/Ag.[124]

Os sensores eletroquímicos são classificados em cinco tipos: (i) voltamétricos; (ii) amperométricos; (iii) potenciométricos; (iv) impedimétricos e (v) condutimétricos.[125] Os métodos de medida utilizando estes sensores são vantajosos pois podem ser adaptados para medir analitos específicos de forma rápida, direta e não destrutiva em uma matriz de amostra complexa.[119]

Os métodos voltamétricos permitem a análise qualitativa e quantitativa de diferentes substâncias com diversos comportamentos eletroquímicos, mesmo em quantidades vestigiais,

boa repetibilidade e capacidade de trabalhar com uma ampla gama de solventes e eletrólitos.[126] Uma grande quantidade de dados informativos pode ser obtida a partir dos métodos voltamétricos, tais como: constante de taxa de transferência de elétrons, tipo de mecanismo de reação, coeficientes de difusão de espécies eletroativas; além da concentração do analito. Estas medidas são baseadas em reações redox, que geram corrente elétrica na célula. Se a oxidação ou redução for limitada pela difusão do analito para o eletrodo, a corrente medida da célula será proporcional à quantidade de substância na célula, resultando em uma medição quantitativa do analito em solução.[119,126]

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica amplamente utilizada devido à sua capacidade de adquirir rapidamente informações sobre reações eletroquímicas.[127] Na maioria dos experimentos, a voltametria cíclica é aplicada como primeiro teste, pois fornece uma localização rápida dos potenciais redox das espécies eletroativas a partir de picos formados no voltamograma e avalia os efeitos do meio na reação.[124,127,128] A velocidade de varredura (*scan rate*) e a corrente derivada do potencial aplicado são alguns dos parâmetros importantes observados na VC. A velocidade de varredura do experimento controla a rapidez com que o potencial aplicado é varrido, sendo que velocidades mais rápidas levam a uma diminuição no tamanho da camada de difusão, resultando em correntes mais altas.[124]

Também é possível determinar se o processo é reversível, irreversível e/ou quase-reversível, ou seja, se é estável após a redução e poderá ser reoxidado.[127] Estes conceitos referem-se à cinética de transferência de elétrons entre o eletrodo e o analito; quando existe uma baixa barreira à transferência de elétrons, o equilíbrio de Nernst é estabelecido imediatamente após qualquer mudança no potencial aplicado, indicando reversibilidade do sistema.[127] Por outro lado, quando existe uma alta barreira à transferência de elétrons (irreversibilidade eletroquímica), as reações de transferência de elétrons são lentas e são necessários potenciais mais negativos/positivos para observar reações de redução/oxidação, resultando em maiores diferenças de potenciais entre os picos.[124,127] Um processo quase-reversível é um tipo intermediário de reação redox que exibe características tanto de reversibilidade quanto de irreversibilidade. Isso ocorre quando a taxa de transferência de carga é significativamente mais lenta do que em um processo reversível, mas ainda mais rápida do que em um processo irreversível.[127]

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica utilizada tanto para a análise química quantitativa quanto para a investigação do mecanismo, da termodinâmica e da cinética das reações químicas.[125] A VPD como ferramenta analítica oferece vantagens características quando comparada à outras estratégias eletroquímicas, sendo uma técnica sensível com

detecção de espécies inorgânicas e orgânicas no nível de partes por bilhão (ppb).[125-127] A sensibilidade da VPD se deve à sua natureza de análise diferencial, que reduz as correntes de cargas de fundo, enquanto que o tempo de pulso relativamente curto aumenta as correntes medidas.[125,126] Nesta técnica, uma série de pulsos de amplitude constante é aplicada, sendo a corrente medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no final do pulso.[125,127] O voltamograma é gerado na forma de pico, devido à mudança entre as duas intensidades de corrente, em relação ao potencial no início do pulso.[126,128]

2.3.1 Eletrodos de pasta de carbono (CPE) modificados com sílica mesoporosa e óxidos metálicos

Nos últimos anos, tem havido um aumento no número de sensores eletroquímicos e ópticos em diversas aplicações industriais em áreas, tais como: de saúde/medicina, automotiva, segurança alimentar, monitoramento ambiental e agricultura.[120,122] Os sensores eletroquímicos constituem hoje uma ferramenta poderosa em química analítica, pois oferecem vantagens sobre outros instrumentos analíticos, como tamanho portátil de campo, baixos limites de detecção, respostas rápidas e geralmente não destrutivas, possibilidade de aplicação *in situ* e baixo custo.[121,129] Com o objetivo de melhorar ainda mais o desempenho destes sistemas, várias estratégias tem sido desenvolvidas a fim de modificar os eletrodos. A partir de alterações funcionais na sua estrutura, é possível aprimorar seus resultados em termos de sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e confiabilidade, estabilidade e robustez.[120,130,131]

Eletrodos de pasta de carbono (CPE) são amplamente utilizados como eletrodos de trabalho para a determinação de compostos eletroquimicamente ativos. Nestes eletrodos, uma pasta de carbono é colocada em um suporte feito de vidro, Teflon® ou outro material isolante, que é contatada eletricamente através de um fio condutor, para obter um eletrodo de disco renovável.[132,133] A pasta de carbono é uma mistura de material carbonáceo (grafite, carbono vítreo, negro de acetileno, diamante, nanofibras de carbono, microesferas de carbono ou nanotubos de carbono) com um aglutinante líquido, que pode ser um óleo mineral, óleo de parafina, hexadecano ou óleo e graxa de silicone.[132,134,135] Este material é atraente devido às suas características eletroquímicas, incluindo uma corrente de fundo muito baixa (em comparação com eletrodos de grafite sólido ou de metal nobre), inércia química; possuem grandes janelas de trabalho; baixo custo e simples renovação da superfície do eletrodo; possibilidade de utilização de diversas interações (adsorção, catálise) e uma variedade de modificações possíveis.[132,135-137]

Apesar das vantagens anteriormente citadas, a modificação de CPEs através da adição de diferentes espécies muitas vezes se faz necessária. A incorporação de modificadores nos CPEs, pode ser feita adicionando-se o modificador diretamente à pasta de carbono, tornando-o ainda mais atraente em aplicações eletroanalíticas.[136,137] A adição de materiais mesoporosos, tais como sílica, permite uma dispersão homogênea dos componentes, melhorando propriedades importantes do eletrodo, tais como aumento da área eletroativa, maior difusão dos analitos na matriz, resistência mecânica e estabilidade química.[138,139] Adicionalmente, a presença dos grupos silanol na superfície da sílica permite a adição de grupos funcionais ou espécies eletroativas.[140,141] Entretanto, de modo a minimizar a resistência eletroquímica da sílica e melhorar a performance dos CPEs, outros óxidos metálicos, tais como titânia (TiO_2)[142,143], nióbia (Nb_2O_5)[144-146], céria (CeO)[147] ou magnetita (Fe_3O_4)[148,149] também tem sido adicionados. O uso destes óxidos metálicos é devido a sua baixa energia de *band gap*[150-153] e também devido a sua acidez e basicidade de Brønsted e Lewis, que permite as interações com várias espécies orgânicas.[154-156]

As propriedades dos óxidos metálicos incluem: alta estabilidade química e estrutural; elevada relação área superficial/volume; excelentes propriedades eletrônicas e de transferência de carga elétrica; e boa interatividade da superfície com moléculas contaminantes.[157] Embora os óxidos sejam considerados isolantes, alguns deles têm propriedades de semicondutores, o que os tornam uma "classe única de semicondutores" em comparação com materiais covalentes convencionais.[158] Esta característica está relacionada ao seu *band gap*, que corresponde à diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução, primeiro estado excitado, e determina se um material é condutor, semicondutor ou isolante.[157-159] Para materiais isolantes, a energia do *band gap* é superior a 5 eV e a densidade de portadores de carga livres é extremamente baixa.[157] No caso de materiais semicondutores, o *band gap* é muito mais estreito (menos de 5 eV): permitindo a transição de isolante para condutor quando absorvem energia de fótons, o que impulsiona elétrons da banda de valência para a banda de condução, dando origem às excelentes propriedades dos semicondutores.[157,158]

Na eletroquímica, o uso de nanopartículas de óxidos metálicos é vasto e abrange a fabricação de sensores químicos, adsorção e remediação da contaminação da água por compostos orgânicos, fotocatalisadores, circuitos microeletrônicos e revestimentos de superfícies contra corrosão, além de dispositivos de conversão de energia como células de combustível e solares.[157,159,160] Estes óxidos podem formar nanocompósitos com outros materiais funcionais, como polímeros condutores e materiais à base de carbono,

proporcionando uma maior relação área superficial/volume, resultando em uma adsorção e desempenho de detecção superiores em comparação aos óxidos puros.[157]

Em geral, a superfície dos óxidos metálicos consiste em cátions insaturados que promovem acidez de Lewis e/ou cátions ligados a grupos –OH que promovem acidez de Brønsted.[160-164] A adsorção de H_2O (base de Lewis) e forte ligação ao cátion de superfície (ácido de Lewis) resulta na dissociação da molécula de água produzindo os grupos OH.[160,161] As características ácido-base dos óxidos metálicos têm três efeitos principais: na ativação da molécula reagente, nas taxas de vias competitivas de transformação, influenciando as rotas que uma reação pode seguir, e na taxa de adsorção e dessorção de reagentes e produtos, impactando a eficiência da reação.[163]

Além disso, os óxidos podem ser revestidos/funcionalizados por sílica, como os compostos de óxido de ferro, que possuem propriedades magnéticas atraentes e na natureza são abundantes, podendo ser encontrados principalmente como: hematita (α-Fe_2O_3, mais estável), magnetita (Fe_3O_4) e maghemita (γ-Fe_2O_3) (Figura 9).[165]

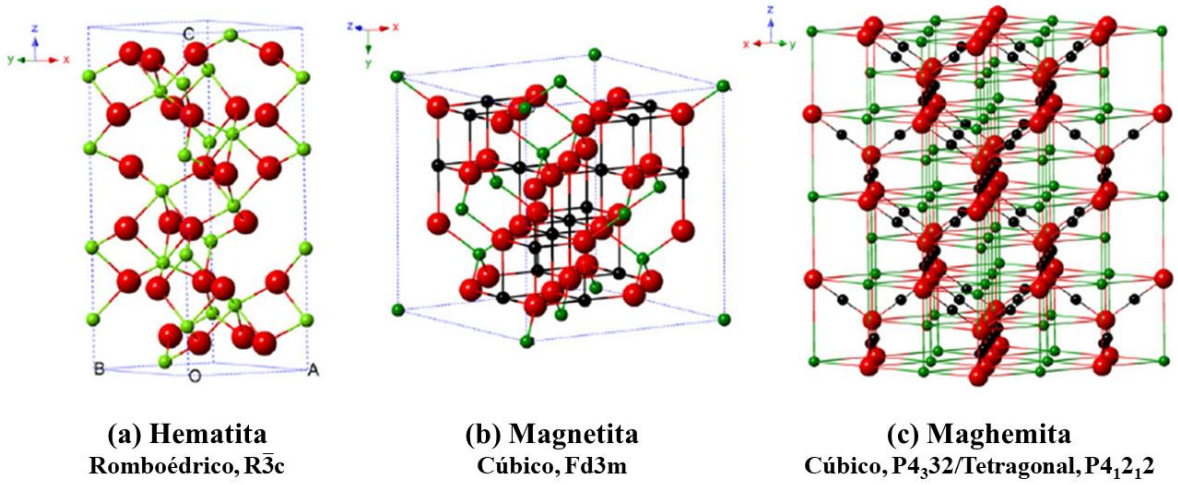

Figura 9: Estrutura cristalina e dados cristalográficos da hematita, magnetita e maghemita: as bolas pretas correspondem a Fe^{2+}, as bolas verdes a Fe^{3+} e as bolas vermelhas a O^{2-}.[165]

Esses compostos são de grande interesse em diversas aplicações nas áreas de biotecnologia, biomedicina e remediação ambiental.[166,167] Embora o ferro tenha caráter ferromagnético, a magnetita e a maghemita apresentam comportamento ferrimagnético, sendo que a principal diferença entre essas duas estruturas é que, enquanto a magnetita possui cátions Fe^{+2} e Fe^{3+}, a maghemita possui apenas cátions Fe^{3+}.[165,168,169] No entanto, após exposição ao oxigênio do ambiente, a magnetita tende a se oxidar à maghemita com conversão parcial de íons ferrosos em íons férricos. Por sua vez, uma mudança na estrutura de magnetita leva a uma

mudança em sua carga superficial e nas suas propriedades magnéticas.[168,169] Neste sentido, o revestimento das partículas de magnetita com sílica torna-se uma alternativa interessante para a melhora de sua estabilidade e armazenamento a longo prazo, mantendo as suas propriedades, aumentando a sua vida útil pela conservação do núcleo magnético (*core*).[170,171]

Como as propriedades das partículas de magnetita sintetizadas dependem do seu tamanho e formato, vários métodos foram desenvolvidos para a sua síntese, incluindo métodos de coprecipitação, sonoquímico, solvotérmico, redução química, moagem em moinho de bolas de alta energia e síntese hidrotérmica.[167,172] Dentre estes, destaca-se o método solvotérmico, no qual utiliza-se uma autoclave, temperaturas entre 100-200 ºC, tempo de reação entre 12-24 h, e um volume limitado de solvente para criar alta pressão e formar partículas com bom controle de forma e tamanho.[170,173]

Após a síntese das magnetitas, a sílica pode ser usada no revestimento destas partículas, formando uma estrutura tipo *core-shell*. Uma vez que a sílica possui grupos silanóis na sua superfície, sua presença permite ainda a funcionalização destas estruturas, a fim de melhorar a biocompatibilidade e a relação hidrofílica-hidrofóbica, tornando esses sistemas magnéticos excelentes materiais para diversas aplicações.[170] Adicionalmente, pode-se realizar a síntese de xerogéis magnéticos à base de magnetita/sílica, produzindo materiais com elevada área superficial, possibilitando ainda a inserção de novo grupos funcionais, incluindo outros óxidos metálicos, tais como nióbia.[171]

O nióbio é um elemento químico encontrado na forma de minerais, sendo mais abundante na natureza do que o cobalto, o chumbo e o estanho. No mundo, existem algumas minas de nióbio economicamente viáveis, sendo o Brasil o maior produtor mundial, respondendo por 75% da produção mundial.[174] O nióbio já pode ser considerado um insumo essencial para as indústrias aeroespacial, de petróleo e gás, naval e automotiva. Além disso, vários estudos ao redor do mundo estão sendo realizados para utilizar compostos de nióbio em diferentes áreas como catálise, medicina, tecnologia de materiais, energia e remediação ambiental.[174]

Na natureza, nióbio é comumente encontrado na forma de pentóxido de nióbio (Nb_2O_5), que é um óxido não tóxico, semicondutor do tipo “n”, que tem sido relatado na literatura como um bom catalisador para fotocatálise, células solares, sensores, catálise e outras aplicações.[175-177] Na área da eletroquímica, na preparação de sensores, este óxido se torna interessante devido a presença de sítios ácidos de Lewis e Brønsted reativos, que apresentam afinidade por moléculas orgânicas com grupos carboxílicos em sua estrutura, possibilitando sua interação seletiva com moléculas-alvo e analitos específicos.[175,178-180]

Desta forma, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos contendo materiais semicondutores com elevada área superficial, tal como um xerogel magnético mesoporoso à base de sílica, nióbia e magnetita, torna-se uma alternativa interessante para a detecção de poluentes ambientais, tal como *p*-nitrofenol (*p*-NP).

2.4 BIOCATÁLISE HETEROGÊNEA

2.4.1 Enzimas como biocatalisadores

Enzimas são proteínas que catalisam reações com alta especificidade e estereosseletividade.[181-184] O uso desses biocatalisadores tem aumentado nos últimos anos em bioprocessos industriais, principalmente nas indústrias alimentícias (pães, laticínios), processamento de bebida (cerveja, vinho, sucos), indústria farmacêutica e química (síntese orgânica), e desenvolvimento de biocombustíveis (biodiesel e etanol), devido às suas reações altamente seletivas.[181-183,185,186] Esses biocatalisadores aumentam a taxa de reação, reduzindo a energia de ativação.[183,187,188] As enzimas exibem efeitos catalíticos mais rápidos em certas condições "ótimas" de temperatura, pH, força iônica, entre outros fatores.[183] Suas funções catalíticas dependem da química do sítio ativo, da estrutura molecular e da conformação.[183] Isso ocorre devido às configurações espaciais das enzimas, que possuem um sítio ativo, localizado em uma posição precisa na molécula, que estabiliza o estado de transição entre o substrato e o produto.[183,187] Alterações na conformação global da molécula podem afetar sua atividade catalítica, como no caso da desnaturação das enzimas, quando a estrutura da proteína se desdobra a tal ponto que a orientação tridimensional do sítio ativo é interrompida.[183,187]

As propriedades desejáveis das enzimas e suas amplas aplicações na indústria frequentemente enfrentam desafios devido à sua baixa estabilidade operacional em ambientes de pH extremo e temperaturas relativamente altas, vida útil limitada durante o armazenamento e complexidade na recuperação e reutilização.[182,185] Assim, um grande desafio na biocatálise industrial é o desenvolvimento de biocatalisadores estáveis, robustos e preferencialmente insolúveis, já que enzimas na forma livre são líquidas, sendo solúveis na mistura reacional.[183,185,186] Estas desvantagens podem ser superadas pela imobilização de enzimas, um método que foi inicialmente criado para recuperar e reutilizar enzimas, a fim de diminuir o custo econômico geral da produção do processo.[182,185,189] Esta técnica permite a operação em lote, contínuo ou repetido e facilita a recuperação e reutilização das enzimas, aumentando sua

estabilidade e melhorando o rendimento e a qualidade do produto, em relação à estabilidade enzimática, atividade, seletividade, especificidade e pureza.[182,185,186,189]

A melhora da estabilização enzimática nem sempre está relacionada com uma melhoria real das características moleculares da enzima, pois este fato pode estar relacionado à exposição da enzima à agentes que causam a inativação.[189] As proteínas podem sofrer distorções quando expostas à temperaturas elevadas e valores extremos de pH, e imobilizadas na superfície externa de um suporte.[189] Porém esta interação não é possível se estas estiverem na superfície interna de um sólido poroso, pois a enzima se encontra protegida do meio.[189,190]

2.4.1.1 Enzimas Lipase

Enzimas lipase (E.C. 3.1.1.3) são enzimas versáteis que podem ser encontradas em animais, plantas e microorganismos naturais ou geneticamente modificados.[131,191] Estão entre as enzimas mais utilizadas na tecnologia enzimática devido à sua ampla especificidade para alguns substratos, sendo capazes de catalisar diversas reações, como hidrólise ou síntese de ésteres, aminações, transesterificações, alcoólise.[191-193] São usadas em uma variedade de campos biotecnológicos, como alimentos e laticínios, farmacêuticos, agroquímicos, oleoquímicos, indústrias cosméticas e detergentes.[131,188]

As enzimas lipase pertencem à classe das hidrolases e não necessitam cofatores.[188,194] Essas enzimas hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa, em glicerol e ácidos graxos que são substratos insolúveis em água.[131,181,194] Em comparação com outras enzimas, elas mostram uma cinética interfacial incomum, apresentando alta atividade catalítica em interfaces entre água e óleo, um fenômeno conhecido como ativação interfacial.[131,193,195] Esta atividade interfacial está relacionada com a estrutura do núcleo central, que se encontra próximo ao sítio ativo da enzima e é formada por uma cadeia polipeptídica móvel, a tríade catalítica (Figura 10), que é composta pelos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp).[131,181,192-194]

Esta estrutura, denominada “tampa”, quando isola o sítio ativo, faz com que a lipase adote uma conformação fechada, impedindo a entrada do substrato; já na forma aberta, a “tampa” se desloca ao entrar em contato com uma superfície hidrofóbica, resultando na exposição total do sítio ativo ao meio de reação.[131,181,186,189,192,194]

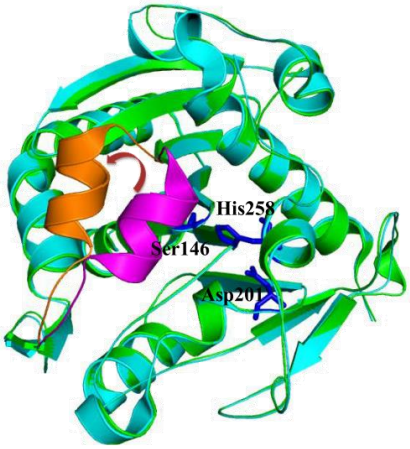

Figura 10: Sobreposição de conformações fechadas e abertas da lipase *Thermomyces lanuginosus* (nas cores verde e ciano). A tampa fechada, a tampa aberta e a tríade catalítica estão destacadas pelas cores magenta, laranja e azul, respectivamente.[195]

Assim, é preferível imobilizar a lipase na conformação ativa de tampa aberta, de forma que o biocatalisador se torne mais estável do que a enzima em equilíbrio conformacional.[131,189] Isso é possível utilizando suportes hidrofóbicos, uma vez que as lipases reconhecem superfícies hidrofóbicas semelhantes às de seus substratos naturais e sofrem ativação interfacial durante a imobilização, produzindo biocatalisadores muito estáveis.[131,186,189] Um suporte hidrofóbico para adsorção pode ser obtido pela funcionalização da sílica com grupos hidrofóbicos.[131] Embora os suportes sejam estáveis, este processo de adsorção é reversível, o que significa que a lipase pode lixiviar do suporte sólido, especialmente na presença de detergentes, aditivos ou solventes orgânicos, ou mesmo na presença de substratos e produtos da reação, o que pode limitar a aplicação do biocatalisador.[181,189]

Dentre as enzimas lipases destacam-se: (a) isoforma B da lipase de *Candida antarctica* (CalB) e (b) *Thermomyces lanuginosus* (TLL). (a) A enzima lipase CalB é formada por 317 aminoácidos e possui estrutura globular de aproximadamente 30Å × 40Å × 50Å.[196,197] Possui maior atividade catalítica em pH neutro e 45 ºC.[198] Esta enzima catalisa diversas reações, incluindo a síntese de ésteres de sabor e fragrância (ésteres de cadeia curta), biodieséis (ésteres de cadeia longa) e glicerídeos modificados.[131,199-201] Suas inúmeras aplicações são devido à sua ampla seletividade e alta tolerância à solventes orgânicos e temperatura.[202-204] (b) A enzima lipase TLL tem sido bem conhecida como um biocatalisador versátil em diversas áreas industriais, incluindo a produção de biodiesel, modificação de óleos, química fina, na resolução quiral de compostos racêmicos entre outras.[194,205,206] Esta lipase consiste em uma proteína de cadeia única com 269 aminoácidos, massa molecular 31,7 kDa, pH ótimo em torno de 9 e faixa de temperatura ótima de 55–60 ºC. [206,207]

2.4.2 Métodos de imobilização de enzimas

Os métodos de imobilização envolvem, normalmente, a fixação física ou química de enzimas dentro ou sobre um suporte sólido, com a formação de um sistema heterogêneo.[183,208] Estes métodos podem ser classificados em duas categorias: (a) métodos físicos, como adsorção e aprisionamento; e (b) métodos químicos, que incluem a ligação covalente e a reticulação.[131,208]

A adsorção é um processo simples em que as enzimas se ligam à superfície de um suporte sólido sem a necessidade de reações químicas, a partir de interações iônicas ou interações hidrofóbicas.[131,186,190,209,210] Neste método, as interações (iônicas e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio) entre a enzima e o suporte são "mais fracas", tornando o biocatalisador heterogêneo instável em comparação com àqueles produzidos por outros métodos.[190,209,210] Entretanto, a interação por adsorção é considerada mais fraca e instável que a covalente somente quando ela ocorre como um processo reversível.

As enzimas podem ser aprisionadas ou encapsuladas em estruturas sólidas, em membranas e sol-géis, seja incorporando-as no processo de fabricação, ou filtrando uma solução enzimática através de uma membrana para que as enzimas fiquem presas nos poros.[209,210] O aprisionamento é o fechamento físico de enzimas em um espaço confinado, permitindo a difusão de substratos e produtos, mas retendo a enzima.[131,190] O método de imobilização por encapsulamento envolve o aprisionamento de diversas biomoléculas em diferentes matrizes poliméricas.[190]

A ligação covalente fornece interações fortes e estáveis entre a enzima e o suporte, sendo um dos métodos de imobilização mais amplamente utilizado.[190,209,210] A ligação covalente é um processo de várias etapas que geralmente requer a promoção de grupos reativos na superfície como uma primeira etapa, seguido de funcionalização e ativação, e por último reação com a enzima.[210] A enzima é então ligada ao agente ativador, normalmente através do grupo ε-amino da lisina, do grupo tiol da cisteína ou do grupo carboxílico dos ácidos aspártico e glutâmico.[210] A ligação covalente possui muitas vantagens, como produzir enzimas duráveis e obter uma recuperação suficiente das enzimas para serem reutilizadas.[190]

A imobilização por reticulação envolve a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, sem transportadores.[190] Para isto, é necessário utilizar agentes de reticulação, que são moléculas químicas que possuem pelo menos duas extremidades reativas, e são usados como ponte entre grupos específicos de duas moléculas enzimáticas.[190,209] A imobilização por reticulação proporciona uma conexão robusta entre as enzimas, levando a estabilidades

superiores.[190] A escolha do método apropriado para imobilização de enzimas depende da aplicação específica, das propriedades da enzima e das condições de reação desejadas.

2.4.3 Sílica mesoporosa como suporte para a imobilização de enzimas

O desenvolvimento de materiais nanoestruturados para imobilização enzimática com aplicações em biotecnologia, biocatálise, sistemas de entrega de proteínas e sensores biológicos está atualmente se tornando uma área emergente de pesquisa.[187] A sílica mesoporosa organofuncionalizada se destaca como uma matriz extremamente apropriada para a imobilização enzimática, demonstrando-se uma escolha altamente adequada para essa aplicação específica.[131,185,211-213] Esses materiais possuem áreas superficiais muito elevadas, com a possibilidade de sintetizá-los com diferentes estruturas de poros (por exemplo, semelhantes a espuma, cúbicos, hexagonais) e diâmetros de poros na faixa de 2 a 50 nm.[130,131,212-214] Idealmente, o tamanho dos poros deve ser maior do que o das enzimas, o que torna estes materiais interessantes em relação às dimensões de enzimas, que se encontram entre 3 e 7 nm (Figura 11).[187,212]

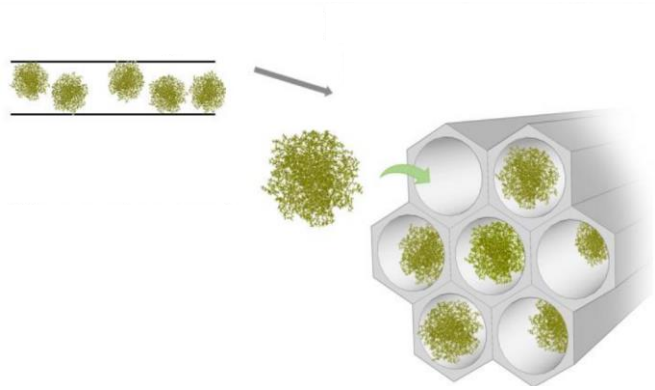

Figura 11: Preenchimento dos poros na imobilização enzimática em sílica mesoporosa.[214]

A modificação da superfície da sílica mesoporosa contribui para o aumento da interação entre o suporte e a enzima através de interações eletrostáticas e/ou hidrofílicas/hidrofóbicas, resultando no aumento da estabilidade das enzimas imobilizadas, benéficas para execuções repetitivas.[185,215]

2.4.3.1 Organofuncionalização de sílica mesoporosa visando a imobilização de enzimas

A funcionalização é o ato de modificar materiais proporcionando características físicas, químicas ou biológicas diferentes daquelas originalmente encontradas em um material.[32,216] Os processos de funcionalização introduzem grupos desejados na superfície dos materiais, com base nas reações químicas, que posteriormente podem participar de outras reações orgânicas para construir materiais funcionalizados de superfície aplicáveis.[216] A modificação pode ser feita por métodos distintos para alterar as características de origem da superfície (rugosidade, hidrofilicidade/hidrofobicidade, carga superficial, energia superficial, resistência à abrasão, biocompatibilidade e reatividade).[32,34,35]

A incorporação de grupos funcionais orgânicos na sílica mesoporosa através da formação de ligações covalentes e não covalentes é uma das formas de funcionalização, a fim de aumentar sua aplicabilidade potencial.[43] A funcionalização covalente geralmente ocorre através da formação de ligações químicas do silano e, neste caso, a fração silano se liga à sílica tanto de forma direta como indireta.[217] O processo de co-condensação ocorre de forma direta no processo sol-gel, combinando um alcoxisilano com outro organosilano, enquanto na forma indireta, a funcionalização acontece através de métodos de enxerto "*grafting*" após a formação definitiva da estrutura de sílica.[43,217,218] Esta técnica normalmente envolve reações entre grupos hidroxila nas superfícies da estrutura mesoporosa com um organosilano, para formar ligações covalentes de siloxano (Si-O-Si), permitindo um bom controle das propriedades finais, bem como a estabilização da matriz estrutural.[36,43,131,211,217,218] Muitos organosilanos com uma grande variedade de combinações estão disponíveis, de acordo com a aplicação específica desejada e/ou o tipo de uso.[34,43] Dentre os organosilanos, os mais utilizados possuem as seguintes funcionalidades orgânicas: vinil, epóxi, amino e mercapto.[15,34,36]

O 3-glicidoxipropiltrimetóxisilano, GPTMS, é um dos organosilanos que podem ser utilizados na preparação de materiais híbridos orgânico-inorgânicos, sendo um grupo bifuncional com três grupos metóxi de um lado da estrutura e um grupo epóxi do outro lado, que pode facilmente sofrer reações de abertura de anel e também pode ser usado como agente de acoplamento para ligar covalentemente compostos orgânicos e inorgânicos.[219-221] Várias aplicações importantes são relatadas para estes materiais, sendo comumente utilizado como agente de enxerto para funcionalizar superfícies de sílica (Figura 12), em camadas protetoras em polímeros orgânicos, revestimentos anticorrosivos, imobilização de enzimas e área têxtil.[220,222-225]

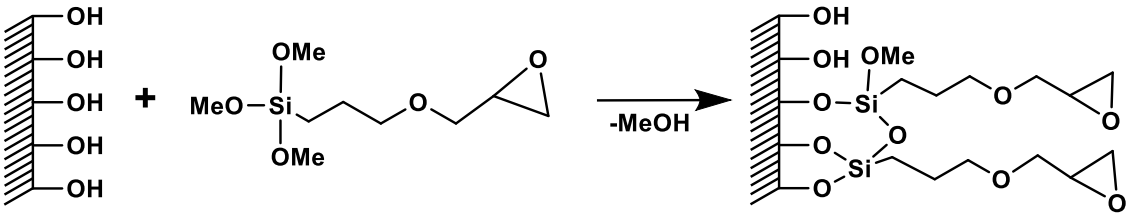

Figura 12: Funcionalização de uma superfície contendo grupos silanóis com 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS).[222]

A introdução de grupos epóxi na superfície de suportes para imobilização de enzimas é um dos métodos de modificação mais promissores devido à alta estabilidade do grupo epóxi em pH neutro, à reatividade da superfície coberta por esses grupos (em relação às aminas primárias) e à possibilidade de formação de ligações covalentes com as enzimas (Figura 13).[226] Suportes funcionalizados com o grupo epóxi, como o GPTMS, são ideais para estabilizar enzimas por meio de ligações covalentes devido à sua estabilidade.[189,194,227,228] Esses grupos são considerados braços espaçadores curtos, que podem reagir com grupos nucleófilos localizados na superfície da molécula da enzima de resíduos de aminoácidos.[228-230] Nucleófilos, como grupos amino primários (de lisinas), tióis (de cisteína), imidazóis (de histidinas), fenóis (de tirosinas) e ácidos carboxílicos (de ácido aspártico ou ácido glutâmico), podem reagir através da formação de aminas secundárias, tio éteres e éteres, resultando em pequenas modificações na estrutura da proteína.[189,204,221,228-231]

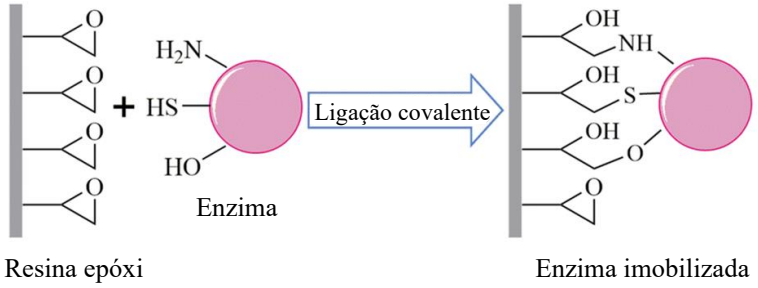

Figura 13: Reação de grupos epóxi com grupos nucleófilos localizados na superfície da molécula da enzima de resíduos de aminoácidos.[230]

Nesse sentido, suportes contendo grupos epóxi são úteis para gerar ligações covalentes multipontuais muito intensas devido às possíveis reações com os diferentes nucleófilos da superfície de moléculas de enzimas.[228,231,232] Quando a ligação ocorre através de multipontos, ocorre uma rigidificação das moléculas de proteína no suporte.[227] Assim, as posições relativas

de cada resíduo de proteína envolvida no processo de imobilização devem ser preservadas inalteradas durante qualquer alteração conformacional induzida na enzima imobilizada por qualquer agente de distorção (calor, solventes orgânicos, etc.), levando à uma estabilização muito forte.[227,232] No entanto, os grupos epóxi exibem uma baixa reatividade intermolecular em relação aos nucleófilos e, portanto, as enzimas não são capazes de reagir diretamente com os suportes epóxi sob condições experimentais suaves como pH neutro e baixa força iônica, o que faz com que a imobilização de enzimas nestes suportes seja produzida através de um mecanismo de duas etapas.[189,194,227,232,233] Primeiro, é produzida uma adsorção física rápida e suave da enzima no suporte; muitas vezes necessitando alta força iônica para que ocorra a adsorção hidrofóbica da enzima no suporte; em segundo lugar, se orientada favoravelmente, a enzima previamente adsorvida é ligada covalentemente aos grupos epóxi através dos grupos nucleofílicos.[194,226,227,232,233] Embora esta reatividade melhore em pH alcalino, em pH neutro é possível a imobilização da enzima, mas não uma intensa reação multipontual entre a enzima e o suporte.[189,194,227]

2.4.4 Reações de esterificação: síntese do éster flavorizante butirato de butila

Uma aplicação em meio orgânico de lipases que merece destaque especial é a síntese de ésteres, que são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e farmacêuticas.[234-238]

A síntese química de ésteres por reações de esterificação de Fisher-Speier utiliza altas temperaturas e pressões, o que leva à degradação do éster formado. Nessas reações são utilizados catalisadores como ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, que são altamente corrosivos e liberam produtos secundários prejudiciais, sendo necessárias etapas adicionais para purificação do produto final, elevando o custo do processo.[235,237-239]

Já a esterificação utilizando a rota biotecnológica, catalisada por lipases, surge como uma opção ecologicamente sustentável, apresentando uma série de vantagens notáveis, além de oferecer vantagens econômicas que indiretamente contribuem para o aumento do seu valor de mercado.[234,235,238] Dentre as vantagens, destacam-se as altas especificidades e seletividades, elevado rendimento sob condições reacionais brandas (baixa temperatura e pressão), minimização da formação de subprodutos, possibilidade de reutilização do biocatalisador, consumo reduzido de energia e, consequentemente, uma redução significativa nos custos gerais de produção.[234,235,238,239]

Os ésteres são bastante interessantes quando aplicados como solventes, fragrâncias (ésteres aromáticos), sabores (ésteres alifáticos) e precursores para diversos processos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.[234,235,238] Os ésteres flavorizantes, são compostos, com sabores e fragrâncias, derivados de álcoois de cadeia curta e ácidos carboxílicos, que pertencem à classe de compostos amplamente distribuídos na natureza, conhecidos como ésteres de ácido carboxílico.[235,240,241] Eles estão presentes em fontes naturais como flores, bebidas fermentadas e principalmente em frutas.[200,235,241] Dentre estes, o butirato de butila é um éster que possui aroma frutado semelhante ao de banana, abacaxi e pêra.[234,239,241,242] Pode ser obtido por via natural, química ou biotecnológica e é amplamente utilizados em alimentos, bebidas, perfumes e cosméticos, além de ser empregado como solvente na produção de plásticos, fibras e no processamento de produtos petrolíferos.[200,234,239,241-243]

Embora a produção de frutas tenha crescido significativamente e estas sejam utilizadas como matéria-prima para extração de butirato de butila (e outros ésteres de cadeia curta), esse método resulta em baixa produção, sendo incapaz de atender às crescentes demandas do mercado.[237,243] Já a síntese química de butirato de butila, a partir de ácido butírico e butanol, não é ecologicamente correta devido às suas condições adversas de temperatura relativamente alta, ácido sulfúrico concentrado como catalisador e subprodutos nocivos gerados.[200,237,241,242,243] A produção de butirato de butila pela via biotecnológica, enzimática, é um método alternativo, mais econômico, que se baseia em uma reação de esterificação controlada termodinamicamente, na qual ácidos carboxílicos e álcoois são empregados para produzir o éster, que será um produto final com melhor qualidade, além de formar água como subproduto.[237,239]

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver materiais com diferentes configurações que possam ser aplicados como filmes antimicrobianos, dispositivos eletroquímicos e como suportes para a imobilização de enzimas, usando a versatilidade do método sol-gel de síntese.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Parte I – Sintetizar nanopartículas de ouro em meio aquoso, empregando como agente estabilizante o biopolímero quitosana e o organosilano APTMS (3-aminopropiltrimetoxisilano); Utilizar este sistema híbrido nanoestruturado para a construção de filmes em superfície de vidro, empregando a técnica *drop-casting*; Caracterizar os filmes e determinar sua atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella* Typhimurium;

Parte II – Sintetizar um xerogel magnético mesoporoso contendo sílica-nióbia-magnetita; Aplicar este material na modificação de um eletrodo de pasta de carbono; Aplicar este eletrodo na determinação eletroquímica de *p*-nitrofenol;

Parte III – Sintetizar um xerogel de sílica e posteriormente organofuncionalizá-lo com o organosilano GPTMS (3-glicidoxipropiltrimetoxisilano); Aplicar este material como suporte para a imobilização de enzimas lipase, *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Candida antarctica* B (CalB); Determinar suas propriedades catalíticas; Aplicar o biocatalisador em reações de síntese do éster butirato de butila e também em testes de reuso para esta mesma reação.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 FILMES ANTIMICROBIANOS

4.1.1 Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana e aminopropilsilano (AuNP-ch-APTMS)

Nanopartículas de ouro foram sintetizadas utilizando solução de ácido cloroáurico ($HAuCl_4$) 5×10^{-3} mol.L^{-1} preparada a partir da dissolução de ouro em pó na presença de água régia. Uma solução de $NaBH_4$ (Vetec) 0,02 mol.L^{-1} recém preparada foi usada como agente redutor. Quitosana (baixo peso molecular, Sigma-Aldrich) foi empregada como agente estabilizador das nanopartículas de ouro. Para isto, 75 mg de quitosana foram dissolvidas em 10 mL de ácido fórmico (10% v/v) seguido da adição de 1 mL de $HAuCl_4$ e 10 mL de $NaBH_4$. A dispersão de nanopartículas de ouro de cor avermelhada resultante foi denominada AuNP-ch. No dia seguinte, 0,5 mmol de APTMS (3-aminopropiltrimetoxisilano) (Sigma-Aldrich, 97%) foi adicionado à dispersão AuNP-ch, sob agitação. Esse sistema foi denominado AuNP-ch-APTMS.

4.1.2 Preparação dos filmes

Primeiramente, lâminas de vidro quadradas (1,3 cm^2) foram tratadas com solução de NaOH 1 mol.L^{-1}, sob ultrassom, por 2 h a 50 ºC e, posteriormente, com solução de HCl 1 mol.L^{-1}. Após lavagem com água destilada e secagem em estufa, essas lâminas foram utilizadas como substrato na preparação de filmes pelo método de deposição *drop-casting*, usando 100 µL da dispersão AuNP-ch-APTMS. Após secagem em estufa a 30 ºC (por 24 h) e 70 ºC (por 1 h), o filme resultante foi designado como AuNP-ch-AP. Também foi preparado um filme contendo somente quitosana e APTMS, na ausência de nanopartículas de ouro, aqui denominado de Branco, que foi usado como comparação.

4.1.3 Caracterizações

Viscosidade dinâmica (η): As viscosidades das soluções de quitosana, quitosana-APTMS e dispersão AuNP-ch-APTMS foram medidas a 25 ºC usando um viscosímetro capilar

(k=0,01529 mm^2/s^2). A determinação experimental consistiu em medir o tempo que o líquido levou para escoar através do capilar, entre duas marcas de calibração. Para o cálculo da viscosidade utilizou-se a Equação 1, onde ρ é a densidade da solução, k é a constante de viscosidade e t é o tempo de escoamento.[244]

$$\eta = \rho.k.t \qquad (1)$$

Espectroscopia na região do UV-Vis: Dispersões aquosas de AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS foram analisadas utilizando-se um espectrofotômetro UV-160 1PC Shimadzu. Para a análise do filme AuNP-ch-AP, espectros de transmitância e refletância total foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 5000. Para calcular a porcentagem de luz absorvida (%Abs) pelos filmes com e sem nanopartículas de ouro, utilizou-se a Equação 2, onde %T corresponde a porcentagem de luz transmitida e %R corresponde a porcentagem de luz refletida, respectivamente. Já a absorbância apenas das nanopartículas de ouro ($\%\Delta Abs_{AuNP}$) foi calculada conforme a Equação 3:

$$\%Abs = 100 - \%T - \%R \qquad (2)$$

$$\%\Delta Abs_{AuNP} = \%Abs_{amostra} - \%Abs_{branco} \qquad (3)$$

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): As imagens de MET das dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS e do filme AuNP-ch-AP foram adquiridas em um microscópio eletrônico JEOL JEM-1220, operando a 80 kV, no Centro de Microscopia da UFRGS. O programa *Quantikov* foi usado para determinar a distribuição dos tamanhos das nanopartículas de ouro.

Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG): As imagens de MEV do filme Branco e AuNP-ch-AP foram obtidas a partir de um microscópio eletrônico Zeiss, modelo Auriga, utilizando 0,7 kV e detector de elétrons secundários, no Centro de Microscopia da UFRGS. As lâminas, contendo os filmes, foram previamente fixadas com fita de carbono em porta-amostras de alumínio.

Microscopia de Força atômica (AFM): As imagens de AFM do filme AuNP-ch-AP foram obtidas a partir de um equipamento Bruker ICON-PT-PKG (Centro de Microscopia e Microanálise – PUCRS) com um *cantilever* de silício (RTESPA-300, frequência de ressonância de 300 kHz), operando no modo *peak force tapping*, em temperatura ambiente e umidade controlada. A taxa de varredura foi fixada em 1 Hz e a ponteira empregada foi de 10 nm de raio médio.

Potencial Zeta (ζ): Para as medidas de ζ das dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS, foi utilizado um Analisador de Potencial ZetaPALS, em água deionizada, pH 2 e temperatura ambiente.

Perfilometria: Para estimar a rugosidade e espessura do filme AuNP-ch-AP, utilizou-se um perfilômetro óptico Ambios Technology, modelo XP2, do Grupo de Laser & Óptico (Instituto de Física – UFRGS) e ponteira de raio 2,5 μm.

4.1.4 Avaliação da atividade antibacteriana dos filmes

Com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana dos filmes, a bactéria *Salmonella enterica sorovar* Typhimurium (*S.* Typhimurium) L12031 foi empregada. Esta cepa foi isolada de surtos de alimentos que ocorreram no Estado do Rio Grande do Sul. Em primeiro lugar, foi feito o preparo do inóculo em caldo BHI (Brain Heart Infusão) a 37 ºC por 24 h. Após a incubação, a suspensão bacteriana foi ajustada para 10^8 unidades formadoras de colônias ($UFC.mL^{-1}$), diluindo-se a solução inicial em caldo BHI até absorbância igual a 0,5 (λ = 630 nm), em um espectrofotômetro Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences, United Kingdom). Após, essa suspensão foi diluída até 10^6 $UFC.mL^{-1}$ e em seguida, 100 μL desta suspensão foram adicionados à lâmina de vidro contendo o filme, dentro de uma placa de Petri estéril e incubada a 37 ºC por 24 h. Posteriormente, a lâmina de vidro foi colocada dentro de um tubo falcon contendo 15 mL de água peptonada e sonicada por 10 min. Em seguida, uma alíquota de 100 μL desta fase líquida sofreu uma diluição em série de 10, 100, 1000 e 10.000 ×. Essas placas foram divididas em 4 partes, correspondendo às 4 diluições, e duas alíquotas de 20 μL de cada diluição foram aplicadas em cada uma das partes contendo ágar XLD (xilose lisina desoxicolato). Na sequência, foram incubadas a 37 °C por 24 h. Esses ensaios foram feitos em duplicata. A contagem de colônias bacterianas foi estimada e expressa como log ($UFC.mL^{-1}$), considerando a normalização das diluições, usando a Equação 4.[245]

$$log\ (UFC/mL) = log\ (n°\ de\ colônias \times diluição) / alíquota\ (mL) \quad (4)$$

4.2 SENSOR ELETROQUÍMICO

4.2.1 Síntese de partículas magnéticas (MP) pelo método solvotérmico

Partículas magnéticas (MP) foram sintetizadas pelo método solvotérmico, empregando $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Vetec, 97%) como precursor metálico e etilenoglicol (Merck, 99,5%) como solvente e agente redutor. Assim, dissolveu-se 4,32 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (16 mmol) em 100 mL de etilenoglicol sob agitação. Após, 10,89 g de acetato de sódio tri-hidratado (Vetec) (80 mmol) foram adicionados e misturados durante 1 h. Após a formação de uma mistura homogênea, esta foi colocada em autoclaves a 180 °C por 12 h. Em seguida, as partículas foram separadas magneticamente, lavadas com etanol e secas sob vácuo a 50 °C por 4 h.[246]

4.2.2 Partículas magnéticas recobertas com sílica (MP@SiO_2)

O recobrimento das partículas magnéticas com um *shell* de sílica foi realizado adicionando-se 330 mg dessas partículas em uma mistura contendo 25 mL de água destilada, 100 mL de etanol (Merck) e 3 mL de solução de amônia (Merck, 25%), em banho ultrassônico por 1 h. Após, adicionou-se 0,730 mL de tetraetilortosilicato (TEOS, Sigma-Aldrich) e o sistema foi colocado em ultrassom por mais 2 h.[247] Ao finalizar este tempo, foram feitas lavagens com água destilada e etanol e secagem a vácuo. Este material foi denominado MP@SiO_2.

4.2.3 Síntese do xerogel magnético a base de sílica-nióbia (MP@SiNb)

O xerogel contendo sílica, nióbia e magnetita foi obtido pelo método sol-gel de síntese. Primeiramente, foram preparados três sistemas separados: (i) uma solução de etóxido de nióbio por dissolução de $NbCl_5$ (Sigma-Aldrich) 3,1 mmol em 1 mL de etanol, sob atmosfera inerte; (ii) uma mistura contendo TEOS (6,4 mmol), 1,15 mL de etanol, 0,22 mL de água destilada e 0,14 mL de HCl concentrado (Merck, 37%), mantida sob agitação durante 1 h; (iii) 0,8 g de MP@SiO_2 em 1,5 mL de etanol. Os sistemas (i) e (ii) foram adicionados ao sistema (iii) sob agitação, seguido pela adição de 0,9 mL de HF (Merck, 40%) e mantido por 72 h a 25 ºC, para a etapa de gelificação. O sólido formado foi então moído, lavado com água destilada e etanol, e seco sob vácuo, à temperatura ambiente, durante 2 h. Este material foi denominado MP@SiNb.

4.2.4 Caracterizações

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): As imagens de MEV das partículas magnéticas (MP), MP@SiO_2 e MP@SiNb foram obtidas a partir de um microscópio eletrônico Zeiss, modelo Auriga. As amostras foram dispersas em uma fita condutora sobre suporte de alumínio e revestidas com filme de ouro. O tamanho médio das partículas magnéticas foi estimado usando o software *Quantikov*.

Difração de raios X (DRX): Medidas de DRX dos materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb foram realizadas em um difratômetro Shimadzu XRD 6000, usando como fonte Cu-Kα.

Magnetismo: Medidas de magnetismo dos materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb foram obtidas empregando-se um magnetômetro EZ9 MicroSense (VSM) com campo magnético (H) ciclado entre -22 e +22 kOe.

Análise textural: As isotermas de adsorção e dessorção de N_2 dos materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb foram adquiridas a 77 K, utilizando o equipamento Tristar II Kr Micromeritics, após degaseificação das amostras a 60 ºC, por 24 h. Os métodos BET e BJH foram aplicados para obtenção da área superficial e distribuição de tamanho de poros, respectivamente.[248]

Análise elementar (EDS): A análise elementar por Espectroscopia com Dispersão em Energia (EDS) do material MP@SiNb foi realizada usando um microscópio eletrônico de varredura Jeol LV5800. Discos dos materiais foram previamente compactados a 4,5 ton.cm^{-2}, e posteriormente revestidos com carbono.

4.2.5 Medidas eletroquímicas

Medidas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foram obtidas em um galvanostato/potenciostato IviumStat. Para análise de *p*-nitrofenol (*p*-NP, Vetec) a faixa de potencial aplicada foi de -1,0 a -0,3 V. O sistema foi agitado por 60 s seguidos por 60 s adicionais de tempo de descanso, antes de cada medição. A célula de três eletrodos utilizada foi constituída por um eletrodo de cloreto de prata como referência; um fio de platina como eletrodo auxiliar; e o eletrodo de trabalho. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (20 ºC) em solução tampão Britton-Robinson (BRbs) 0,04 mol L^{-1}, utilizando $NaNO_3$ (Dinâmica, 0,5 mol.L^{-1}) como eletrólito suporte.

O material MP@SiNb foi empregado para modificar o eletrodo de pasta de carbono (CPE) a ser usado como eletrodo de trabalho. Foram feitos alguns testes com diferentes composições do material modificador, grafite e óleo mineral. A composição ideal escolhida do CPE foi: 9 mg do material MP@SiNb, 11 mg de grafite e 5 mg de óleo mineral. Os componentes foram completamente misturados e uma fração da pasta foi depositada em uma cavidade de teflon com 1 mm de profundidade, conectada a um disco de platina (4 mm de diâmetro) colado a um tubo de vidro com um fio de cobre. O eletrodo preparado foi designado como MP@SiNb-CPE. Além disso, utilizou-se CPE modificado com MP@SiO_2 e CPE não modificado, para comparação, os quais foram chamados de MP@SiO_2-CPE e CPE-NMOD, respectivamente.

4.3 CATÁLISE ENZIMÁTICA

4.3.1 Síntese do xerogel de sílica

O xerogel de sílica foi preparado através do método sol-gel de síntese. Para isso, 5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS, Sigma-Aldrich) e 5 mL de etanol (Merck) foram misturados em um béquer de 100 mL. Sob agitação, foram adicionados 2 mL de catalisador, preparado a partir da mistura de 1,2 mL de HF/HCl 6 $mol.L^{-1}$ e 0,8 mL de água destilada. Após a adição do catalisador, a gelificação ocorreu quase que instantaneamente. O produto da gelificação foi mantido sob temperatura ambiente por 10 dias. Após, o material sólido foi triturado, lavado com água destilada e etanol e seco em linha de vácuo. O material foi peneirado e separado na granulometria de 20–35 Mesh (0,85–0,50 mm). Essa síntese foi realizada em 10 replicatas, a fim de obter uma quantidade significativa para ser usada ao longo de todos os experimentos deste trabalho.

4.3.2 Organofuncionalização do xerogel de sílica (Si-GPTMS)

A funcionalização do xerogel de sílica com GPTMS (3-glicidoxipropiltrimetoxissilano) (Sigma-Aldrich) foi feita através de reação de *grafting*. Para isso, a sílica foi previamente ativada em linha de vácuo a 140 °C por 4 h. Na sequência, a sílica foi adicionada em um balão de reação de três bocas, contendo 100 mL de tolueno (Merck) e GPTMS (na proporção de 0,5 mmol por grama de sílica). A reação permaneceu a 80°C, por 24 h, sob agitação mecânica e atmosfera de N_2. Após, o sobrenadante foi retirado e o material sólido foi lavado com tolueno

(8 vezes), éter dimetílico (2 vezes) e seco em linha de vácuo. O material resultante foi designado como Si-GPTMS.

4.3.3 Imobilização das enzimas lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Candida antarctica* B (CalB)

4.3.3.1 Imobilizações das enzimas lipase

Foram feitos testes de imobilização das enzimas *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (Novozymes) e *Candida antarctica B* (CalB) (Novozymes) no suporte Si-GPTMS. Para isso, foram preparadas soluções enzimáticas em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L^{-1} pH 7,0, com diferentes cargas de proteína para cada 1,00 g de suporte. O sistema permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por 20 h. Após, retirou-se o sobrenadante e foram feitas lavagens com tampão de imobilização. Na sequência, os materiais foram colocados em placas de Petri e levados à geladeira para secagem. Esses materiais foram denominados biocatalisadores SiGCalB-X e SiGTLL-X, onde X corresponde a carga de proteína (mg) / g de suporte).

Os parâmetros de Rendimento (%) e Eficiência (%) de imobilização, bem como Atividade recuperada (%), foram calculados através das atividades hidrolíticas da solução enzimática, sobrenadante, lavagens e biocatalisador imobilizado (Equações 5-7).[246] A atividade hidrolítica (U), corresponde à liberação de 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio.

$$Rendimento\ (\%) = \frac{Atividade\ imobilizada}{Atividade\ inicial}\ x\ 100 \qquad (5)$$

$$Eficiência\ (\%) = \frac{Atividade\ observada}{Atividade\ imobilizada}\ x\ 100 \qquad (6)$$

$$Atividade\ recuperada\ (\%) = \frac{Atividade\ observada}{Atividade\ inicial}\ x\ 100 \qquad (7)$$

A atividade imobilizada é a diferença entre a atividade inicial e a soma das atividades determinadas no sobrenadante e lavagens. A atividade inicial é a atividade da enzima oferecida (solução enzimática) ao suporte e a atividade observada corresponde à atividade da enzima imobilizada no suporte.

4.3.3.2 Quantificação de proteínas

Inicialmente foi feita a quantificação de proteínas da enzima livre, para as duas lipases, através do método de Bradford[249], que utiliza o corante "Coomassie brilliant blue" BG-250. Para isto, foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações de uma solução padrão de proteína (albumina do soro bovino, BSA) (Sigma-Aldrich) entre 0,125 e 1,0 mg.mL^{-1}. Para a quantificação de proteínas da enzima livre, foram feitas diluições da enzima comercial. Foram adicionados 20 μL da solução enzimática e 1 mL do reagente de Bradford (Êxodo Científica) em *eppendorfs*. Após aproximadamente 5 min de estabilização da cor, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 595 nm, contra um controle preparado apenas com água destilada. Esta etapa é necessária para a imobilização enzimática, pois é preciso determinar qual a carga de proteína deve ser adicionada por grama de suporte.

4.3.3.3 Determinação da atividade enzimática na reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP)

A atividade da enzima livre e da enzima imobilizada foi avaliada na reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP, Sigma-Aldrich). Para isso, foi preparada uma solução na proporção volumétrica de 1:10 [solução de *p*-NPP 8 mmol.L^{-1} em 2-propanol: tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 8,0, contendo Triton X-100 (0,44 %) (Sigma-Aldrich) e goma arábica (0,11 %) (Dinâmica)]. A atividade enzimática foi medida a 37 °C, em banho termostatizado e agitação, utilizando-se 900 μL da solução de *p*-NPP e 100 μL de solução enzimática, e tempo de reação de 2 min. O *p*-NPP, ao ser hidrolisado, é convertido em ácido palmítico e *p*-nitrofenol, sendo este último, monitorado por espectrofotometria, a 410 nm. Uma unidade de atividade de lipase (U) foi expressa como a liberação de 1 μmol de *p*-nitrofenol por min, sob as condições de ensaio. A curva de calibração foi preparada usando *p*-nitrofenol como padrão. Os valores foram obtidos em duplicata para cada ponto da curva de calibração.

4.3.3.4 Estabilidade térmica

Para a análise da estabilidade térmica da solução enzimática (que contém a enzima livre em tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L^{-1} pH 7,0), foram adicionados 200 μL dessa solução em *eppendorfs* nas temperaturas de 50 e 60 °C. Após 1 h, os *eppendorfs* foram retirados do banho termostatizado e levados a um banho de gelo por 3 min. Na sequência, os mesmos foram

colocados em banho a 37 °C por 1 min e centrifugados por 15 seg. A atividade do sobrenadante foi analisada pela reação de hidrólise do *p*-NPP.

O biocatalisador SiGCalB-10 foi incubado por 1 h em *erlenmeyer* contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L^{-1} pH 7,0. As temperaturas testadas em banho termostatizado, sob agitação, foram 50, 60, 70 e 80 °C e foram utilizadas massas de biocatalisador entre 30-60 mg. Na sequência, os *erlenmeyers* foram levados a um banho de gelo e, após, colocados em banho a 37 ºC, antes da adição da solução de *p*-NPP, para a análise da atividade enzimática.

Para a análise da enzima livre e imobilizada, foi considerada a atividade relativa, em que a atividade do material sem aquecimento (controle) foi considerado como 100%.[250]

4.3.4 Reação de síntese de butirato de butila

A reação de esterificação para produção de butirato de butila (éster com aroma de abacaxi) foi escolhida como reação modelo por sua importância na indústria alimentícia. A reação de esterificação foi realizada a 50 ºC, por 6 h, em *erlenmeyer* de 25 mL, através da mistura de 46 µL de ácido butírico (Sigma-Aldrich), 46 µL de *n*-butanol (Vetec) em 4,9 mL de hexano (Dinâmica) (resultando em uma concentração de 0,1 mol.L^{-1}) e 100 µL de solução enzimática (2,2 U) ou 100 mg (1,2 U) de SiGCalB-10.

O progresso da reação de esterificação foi determinado através da titulação de ácido residual, em que alíquotas de 0,5 mL foram retiradas em intervalos de 1 h (durante 6 h) e diluídas em 5 mL de etanol (agente de parada), usando-se NaOH 0,0025 mol.L^{-1} como agente titulante e fenolftaleína como indicador. O cálculo do rendimento da reação de esterificação foi realizado de acordo com a Equação 8, onde Co corresponde à concentração de ácido antes do início da reação e C é a concentração de ácido residual, após o tempo de reação.[251]

$$Esterificação\ (\%) = \frac{Co-C}{Co}\ x\ 100 \qquad (8)$$

4.3.5 Ensaios de reuso

O biocatalisador SiGCalB-10 foi reutilizado sob condições iguais às da reação de esterificação (50 ºC; razão molar ácido butírico:butanol de 1:1; 100 mg de biocatalisador; hexano como solvente), porém com tempo de reação de 3 h. Após, o biocatalisador foi lavado com hexano a fim de remover qualquer resíduo da reação. Em seguida, foi levado para geladeira

até secagem, pesado e colocado novamente em reação. Os ensaios de reuso foram realizados em um intervalo de 40 dias.

4.3.6 Caracterizações

Análise textural: As isotermas de adsorção e dessorção de N_2 dos materiais sólidos Sílica (Si), Si-GPTMS e SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100 e 200 mg de proteína/g de suporte) foram adquiridas a 77 K, utilizando o equipamento Tristar II Kr Micromeritics, após degaseificação das amostras a 120 ºC, por 12 h. Os métodos BET e BJH foram aplicados para obtenção da área superficial e distribuição de tamanho de poros, respectivamente.[248]

Análise Termogravimétrica (TGA): As curvas termogravimétricas dos materiais Sílica (Si), Si-GPTMS e SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100 e 200 mg de proteína/g de suporte) foram obtidas utilizando-se um equipamento Shimadzu Instrument modelo TGA-50, sob fluxo de N_2, com taxa de aquecimento de 20 °C min^{-1}, iniciando na temperatura ambiente até 900 °C.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): As imagens de MEV dos materiais Sílica (Si) e Si-GPTMS foram adquiridas no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS utilizando o microscópio eletrônico Zeiss modelo EVO MA10. As amostras foram dispersas em fita condutora dupla-face de carbono (fixadas em suportes de Al) e recobertas com uma fina camada de ouro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 FILMES ANTIMICROBIANOS

5.1.1 Caracterizações das dispersões e dos filmes

Uma dispersão aquosa de nanopartículas de ouro foi sintetizada usando quitosana como estabilizador e controlador de tamanho das nanopartículas. Posteriormente, foi adicionado ao sistema 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS). Este sistema foi aplicado na preparação de filmes homogêneos, contendo nanopartículas de ouro, em superfícies de vidro, usando o método de *drop-casting*[94], que é um método de deposição simples e de baixo custo para a fabricação de filmes com pequenas áreas.

Primeiramente, foi investigada a influência da adição de APTMS e de nanopartículas de ouro na viscosidade dos sistemas precursores líquidos. Os valores da viscosidade dinâmica são apresentados na Tabela 1. Observou-se que a adição de APTMS na quitosana produziu uma diminuição significativa na viscosidade dinâmica, que é uma característica que pode contribuir para a obtenção de maior miscibilidade e um filme mais homogêneo. Uma diminuição adicional na viscosidade foi observada na solução contendo as nanopartículas de ouro. Esse efeito já foi relatado e foi interpretado como sendo a quebra da cadeia da quitosana pelo meio ácido forte (água régia), que vem da dispersão de nanopartículas de ouro.[252]

Tabela 1: Medidas de viscosidade dinâmica a 25°C.

Amostra	η^a (mPa.s) (dp)[b]
Quitosana	4,2
Quitosana-APTMS[c]	3,2
AuNP-ch-APTMS[d]	2,2

[a] (η) = Média da viscosidade dinâmica em triplicata
[b] (dp) = Desvio padrão
[c] Solução precursora do filme Branco
[d] Dispersão precursora do filme AuNP-ch-AP

A dispersão aquosa de nanopartículas de ouro (AuNP-ch) foi analisada por Espectroscopia UV-Vis antes e depois da adição de APTMS e os espectros são apresentados na Figura 14.

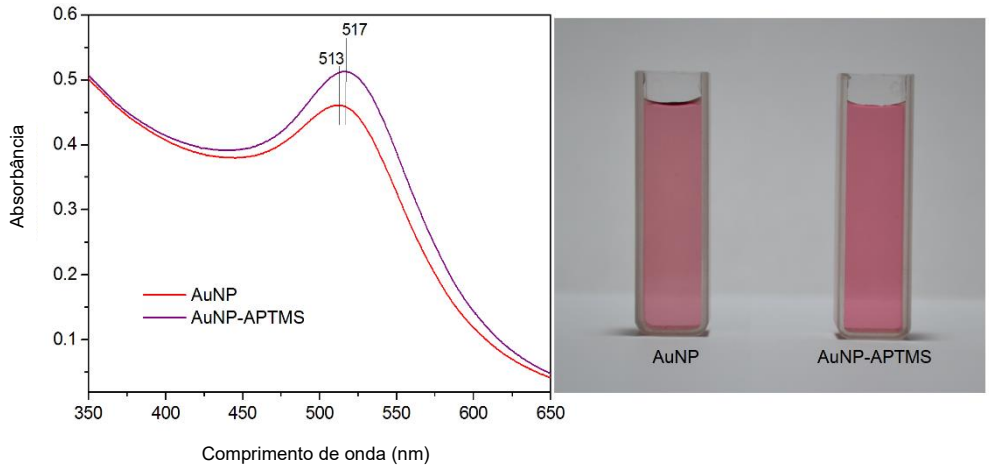

Figura 14: Dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS: a) Espectro no UV-Vis; b) Imagens obtidas com câmera fotográfica digital.

AuNP-ch apresentou uma banda de ressonância de plasmon de superfície com máximo em 513 nm devido às nanopartículas de ouro esféricas.[253] Após a adição de APTMS (AuNP-ch-APTMS), esta banda se desloca para 517 nm. A absorção na região verde é responsável pela cor avermelhada das dispersões de nanopartículas de ouro e ligeiras diferenças no máximo das bandas de ressonância de plasmon foram interpretadas levando em consideração dois efeitos: i) diferenças de tamanho das nanopartículas metálicas[254] ou ii) mudanças de espaçamento entre as partículas.[255] Com o objetivo de elucidar este resultado, imagens obtidas por MET das dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS foram adquiridas e são apresentadas na Figura 15.

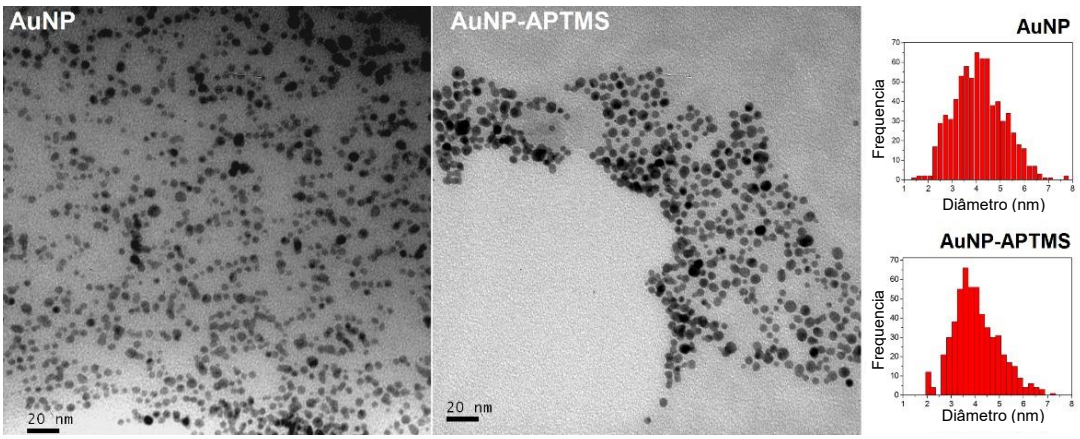

Figura 15: Imagens de MET das dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS (500.000×). Ao lado, distribuição de tamanho das nanopartículas de ouro.

As imagens de MET mostram claramente nanopartículas de ouro esféricas para ambas as amostras. No entanto, as nanopartículas de ouro se encontram mais aglomeradas na dispersão de AuNP-ch-APTMS quando comparadas com AuNP-ch, isto é, na dispersão AuNP-ch-APTMS o espaçamento entre as partículas é menor. Esta aglomeração resulta em um acoplamento de campo próximo que pode explicar o *red-shift* (deslocamento para maior comprimento de onda) observado nos espectros de UV-Vis.

As distribuições do tamanho das nanopartículas de ouro são apresentadas no lado direito da Figura 15. O tamanho médio estimado das nanopartículas na dispersão AuNP-ch foi 3,97 nm com desvio padrão de 0,96 nm, considerando 558 partículas. Já para a dispersão AuNP-ch-APTMS, o tamanho médio estimado foi de 3,99 nm com desvio padrão de 1,03, para uma população de 731 partículas. Portanto, o tamanho médio das nanopartículas de ouro pode ser considerado igual, com um diâmetro de 4,0 nm e desvio padrão de 1,0 nm.

A mobilidade eletroforética das dispersões AuNP-ch e AuNP-ch-APTMS foi medida em pH 2 e os resultados mostraram valores positivos de 30,39 mV (± 0,05) e 27,06 mV (± 1,0), respectivamente. O valor do potencial-ζ indica o grau de repulsão eletrostática entre as partículas na dispersão. Quanto maior o potencial-ζ, maior a estabilidade da dispersão coloidal, dificultando a agregação ou aglomeração das partículas.[256] Os resultados obtidos estão de acordo com as imagens TEM, ou seja, as nanopartículas de ouro estão mais aglomeradas na dispersão AuNP-ch-APTMS do que AuNP-ch. Valores absolutos de potencial-ζ superiores a |30| (mV) são indicativos de boa estabilidade do sistema coloidal, como resultado da forte repulsão eletrostática entre as partículas carregadas.[256,257] Embora o valor potencial-ζ da dispersão AuNP-ch-APTMS seja ligeiramente menor do que 30 mV, a dispersão se mostrou estável ao longo de um período de vários meses, mantendo a banda de ressonância de plasmon de superfície inalterável por pelo menos 6 meses. Essa alta estabilidade foi interpretada devido à contribuição da estabilização estérea das nanopartículas de ouro proporcionada pelo APTMS, que forma espécies poliméricas híbridas oriundas da cadeia orgânica e da sílica.

A dispersão AuNP-ch-APTMS foi usada para formar filmes na superfície de lâminas de vidro usando o método de deposição *drop-casting*. Esse método foi escolhido por permitir avaliar a quantidade de ouro no filme resultante, que foi estimada em 17,5 μmol de átomos de ouro por cm^2, na forma de nanopartículas.

O espectro UV-Vis do filme AuNP-ch-AP é mostrado na Figura 16, juntamente com sua fotografia. A presença das nanopartículas de ouro no filme é claramente identificada pela banda de ressonância de plasmon de superfície, na região verde, com máximo em 524 nm, bem como pela coloração avermelhada (imagem inserida na Figura 16) que é a cor complementar do verde absorvido pelo filme.

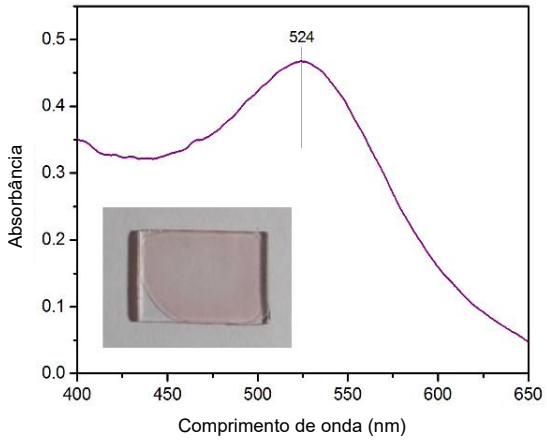

Figura 16: Espectro de absorção no UV-Vis do filme AuNP-ch-AP, juntamente com sua imagem fotográfica.

Quando comparada com a dispersão AuNP-ch-APTMS, a banda de ressonância de plasmon sofre um deslocamento de 7 nm para um comprimento de onda maior. Essa mudança pode ser interpretada levando-se em consideração vários fatores, tais como: i) agregação das nanopartículas de ouro; ii) diminuição do espaçamento entre as partículas de ouro pela evaporação do solvente durante a formação do filme; iii) efeitos ópticos da matriz sólida, como índice de refração.[9,258] A contribuição de todos esses fatores de forma combinada também deve ser considerada. Com o objetivo de esclarecer este ponto, imagens de MET de fragmentos do filme foram obtidas e estão representadas na Figura 17.

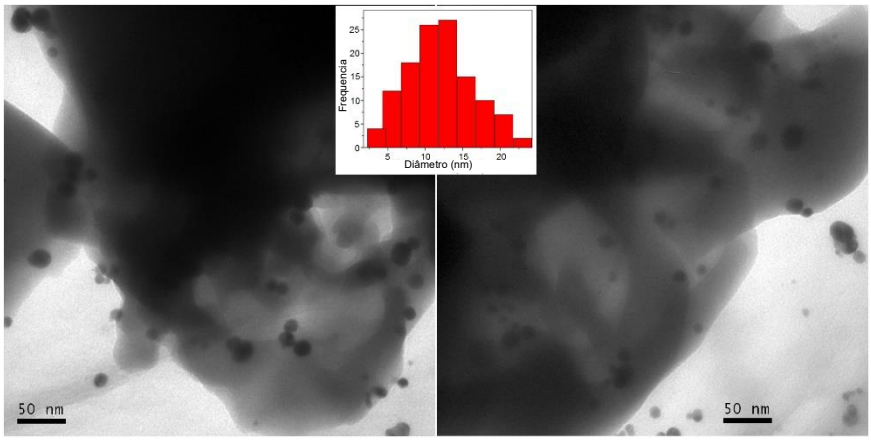

Figura 17: Imagens de MET de fragmentos do filme AuNP-ch-AP (300.000×) e distribuição dos tamanhos das nanopartículas de ouro.

A partir das imagens de MET da Figura 17, nanopartículas de ouro esféricas foram identificadas em toda a amostra e parecem maiores no filme sólido do que na dispersão de AuNP-ch-APTMS. O tamanho médio das nanopartículas de ouro foi estimado em 11,9 nm, com desvio padrão de 4,6 nm, para uma população de 120 nanopartículas. Portanto, um crescimento no tamanho das nanopartículas mostrou-se evidente durante a formação do filme. Este crescimento pode estar relacionado à aglomeração de nanopartículas com a evaporação do solvente durante a preparação/secagem do filme e pode explicar o desvio para o vermelho da banda de ressonância de plasmon observado por UV-vis. No entanto, os efeitos da matriz devido ao estado sólido não podem ser descartados.

A Figura 18 mostra as imagens de MEV do filme AuNP-ch-AP, juntamento com o filme Branco, que contém quitosana e APTMS, mas sem nanopartículas de ouro.

As imagens da Figura 18 mostram diferenças significativas. A imagem do filme AuNP-ch-AP apresenta pontos brilhantes que foram interpretados como sendo nanopartículas

de ouro na superfície do filme. Embora o filme AuNP-ch-AP pareça mais áspero quando comparado ao filme Branco, nenhuma rachadura ou fissura foi detectada.

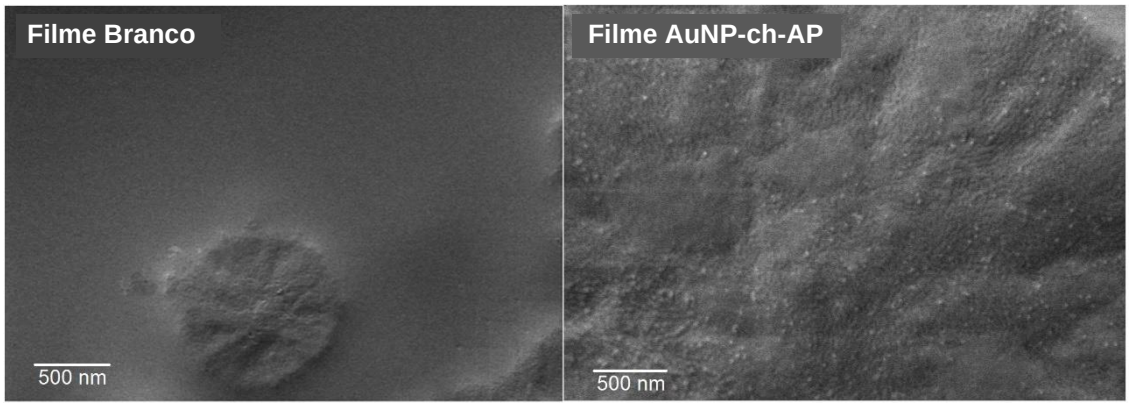

Figura 18: Imagens de MEV do filme Branco e do filme AuNP-ch-AP (30.000×).

Com o objetivo de investigar a rugosidade do filme AuNP-ch-AP, foram utilizadas as análises de perfilometria de contato e AFM. As medidas de perfilometria revelaram que o filme apresenta espessura de 36 µm (± 3 µm), enquanto a rugosidade média estimada foi de apenas 0,22 µm (± 0,03 µm). Esses resultados permitem afirmar que o filme AuNP-ch-AP é fisicamente muito homogêneo, conforme a imagem de MEV. A rugosidade da superfície do filme AuNP-ch-AP também foi investigada por AFM e uma imagem topográfica típica é apresentada na Figura 19. Os resultados de AFM confirmam que a rugosidade está na mesma ordem daquela obtida por perfilometria e é inferior a 1% da espessura do filme. Desta forma, é possível afirmar que o filme AuNP-ch-AP cobre uniformemente a superfície da lâmina de vidro.

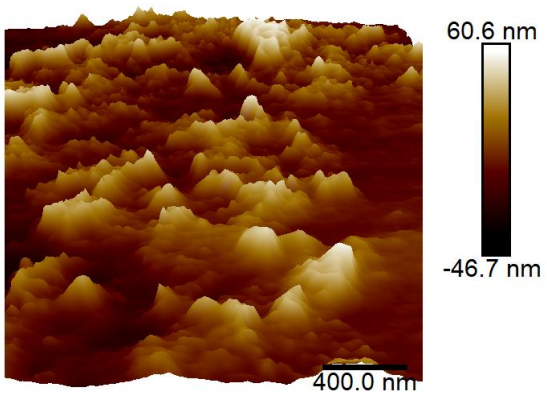

Figura 19: Imagem topográfica de AFM do filme AuNP-ch-AP.

5.1.2 Atividade antibacteriana dos filmes

O filme AuNP-ch-AP foi avaliado contra a bactéria *S.* Typhimurium, que é um microorganismo prejudicial comumente encontrado em alimentos como aves e ovos crus. A atividade antibacteriana do filme AuNP-ch-AP foi comparada com o filme Branco, que não contém nanopartículas de ouro, assim como com a lâmina de vidro não modificada. Duas séries (duplicatas) foram realizadas considerando quatro diluições, 1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10.000. As imagens de uma dessas séries nas placas estão mostradas na Figura 20. Os resultados da atividade antibacteriana, que foram estimados e expressos em log (UFC/mL) em relação às diluições normalizadas, são apresentados na Tabela 2.

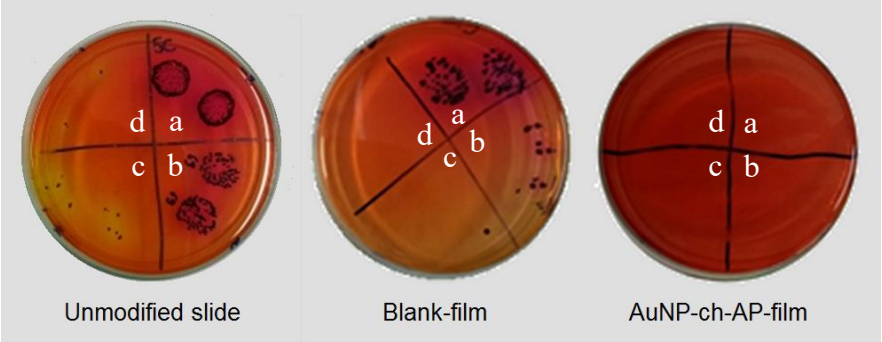

Figura 20: Imagens das séries nas placas com o crescimento da bactéria *S.* Typhimurium em diferentes diluições: a) 1:10; b) 1:100; c) 1:1000; e d) 1:10.000.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana contra a bactéria *S.* Typhimurium.

	Contagem média (log UFC/mL)			
	Diluição			
Amostra	1:10	1:100	1:1000	1:10.000
Filme AuNP-ch-AP	nd[a]	-	-	-
Filme Branco	4,39 ± 0,01	4,44 ± 0,04	nd[a]	-
Lâmina de vidro	Incontável	5,52 ± 0,02	5,54 ± 0,03	nd[a]

[a] nd = não detectado

É importante enfatizar que as contagens normalizadas não variam com as diferentes diluições para ambos, Branco e lâmina de vidro não modificada. Exceto para a diluição mais alta (1:10), um crescimento significativo de colônias de bactérias *S.* Typhimurium ocorreu na lâmina não modificada. Por outro lado, para o filme Branco, que contém apenas quitosana e

APTMS, foi observada uma diminuição na contagem de colônias bacterianas, em cerca de dez vezes, uma vez que o log (UFC) diminuiu de 5,5 para 4,4. Este resultado evidencia que o filme constituído por quitosana e APTMS possui atividade antimicrobiana intrínseca, conforme já relatado para quitosana e APTMS separadamente.[259,260] Finalmente, uma maior atividade antibacteriana foi observada para o filme AuNP-ch-AP, uma vez que nenhuma colônia bacteriana foi detectada em qualquer diluição aplicada e esse resultado foi interpretado levando-se em consideração o efeito sinérgico de todos os componentes: nanopartículas de ouro, quitosana e APTMS.

Geralmente, as bactérias Gram-negativas, como *Salmonella*, são consideradas mais resistentes, pois possuem uma membrana externa como barreira, que está ausente nas bactérias Gram-positivas. Além disso, essa membrana externa é carregada negativamente e, consequentemente, atrai espécies positivas.[261,262] Embora o mecanismo exato da ação antibacteriana da quitosana não seja totalmente compreendido, a hipótese mais amplamente aceita está relacionada à sua forma policatiônica em meio ácido. Quitosana e outros compostos contendo grupos amina, quando carregados positivamente, podem interagir eletrostaticamente com a superfície da membrana externa e perturbar suas funções normais como transporte de nutrientes dentro da célula, e até mesmo causar sua ruptura com consequente vazamento de componentes intracelulares.[263-265] Semelhante mecanismo de ruptura da membrana externa foi relatado para nanopartículas de ouro.[266,267] No entanto, outros mecanismos também têm sido propostos para nanopartículas de ouro, como a inibição da síntese de proteínas, devido a interação das nanopartículas com os ácidos nucléicos da bactéria ou a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que causam danos às células.[268-270]

Com base nos resultados positivos de potencial-ζ para a dispersão AuNP-ch-APTMS, é consistente afirmar que a maior atividade antibacteriana do filme AuNP-ch-AP pode ser atribuída às interações eletrostáticas dos constituintes do filme (carregados positivamente) com a membrana citoplasmática (carregada negativamente).

Quanto às aplicações em embalagens de alimentos, é interessante que os filmes tenham atividade antimicrobiana, a fim de preservar e prolongar a validade do alimento. Nesse sentido, filmes que apresentam atividade contra a bactéria *Salmonella* são interessantes, uma vez que esta bactéria é responsável por surtos de salmonelose e infecções relacionadas a alimentos. Assim, este filme à base de nanopartículas de ouro, quitosana e APTMS, torna-se promissor para aplicação em embalagens de alimentos, uma vez que todos esses componentes possuem atividade antimicrobiana inerente.

5.1.3 Conclusão

Filmes nanoestruturados contendo nanopartículas de ouro, quitosana e APTMS foram obtidos empregando a técnica *drop-casting*. Os filmes apresentaram boa homogeneidade e baixa rugosidade. Também exibiram alto desempenho antimicrobiano devido à presença de cargas positivas na quitosana, APTMS e nanopartículas de ouro, resultando em um efeito sinérgico desses componentes na interação com a membrana celular da bactéria *S.* Typhimurium, causando sua morte.

5.2 SENSOR ELETROQUÍMICO

5.2.1 Caracterizações dos materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb

O material magnético de sílica-nióbia (MP@SiNb) foi obtido pelo método de síntese sol-gel, que se baseia na hidrólise e condensação de precursores moleculares. Precursores de sílica e nióbia foram empregados junto com partículas magnéticas (MP) revestidas com sílica (MP@SiO_2). Os difratogramas de raios X dos materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb, são apresentados na Figura 21 e confirmam a estrutura cristalina da magnetita, do tipo espinélio inverso, com rede de Bravais cúbica de face centrada (JCPDS 19-0629), indicando que a camada de sílica e o xerogel sílica-nióbia não perturbaram sua estrutura cristalina.

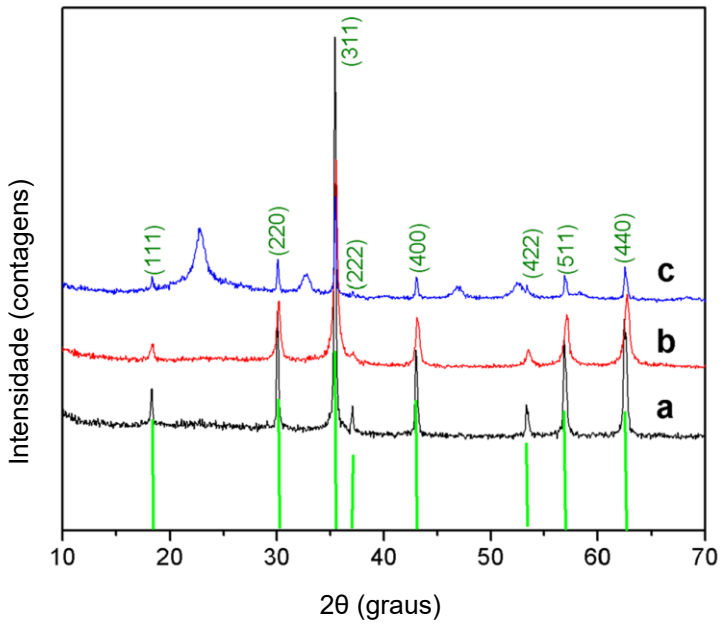

Figura 21: Difração de raios X dos materiais: (a) MP; (b) MP@SiO_2; e (c) MP@SiNb. As barras verdes correspondem ao padrão de magnetita (JCPDS 19-0629).

Os novos picos largos que aparecem no material MP@SiNb foram interpretados como consequência de uma nova fase formada durante o processo de gelificação. Esse comportamento já foi relatado para xerogéis de sílica-titânia, e foram atribuídos à fase derivada do oxofluorotitanato de amônio, uma vez que o processo de gelificação ocorre na presença do amônio e do flúor como catalisadores.[271]

As imagens de MEV do material MP@SiNb são apresentadas na Figura 22, juntamente com as imagens dos materiais intermediários MP e MP@SiO_2. Para o material MP, partículas esféricas de magnetita são claramente vistas na Figura 22a. O diâmetro médio dessas partículas foi de 334 nm com desvio padrão de 78 nm, para uma população de 843 partículas. As imagens de MEV do material MP@SiO_2, mostradas na Figura 22b, revelam que a modificação com a camada de sílica produz partículas de magnetita mais agregadas com superfície mais lisa. As imagens de MEV do material MP@SiNb (Figura 22c) mostram que o xerogel foi obtido com sucesso e as partículas de magnetita estão embutidas nele.

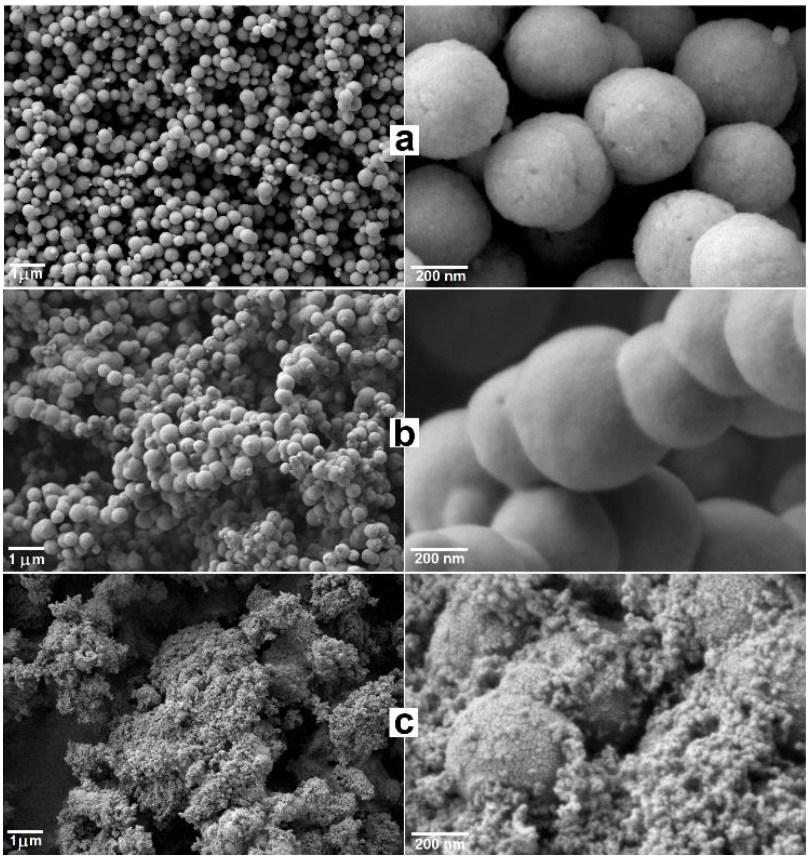

Figura 22: Imagens de MEV obtidas em magnificações de 10.000 e 80.000 ×. (a) MP; (b) MP@SiO_2 e (c) MP@SiNb.

A composição elementar do material MP@SiNb (% em massa de óxido) foi obtida por análise EDS, usando cinco regiões diferentes da amostra. Os valores médios obtidos foram Fe_3O_4 (24,7%); SiO_2 (41,8%) e Nb_2O_5 (33,5%).

Tabela 3: Análise elementar por EDS, % em massa de óxido.

Análise[a]	SiO_2 (% m/m)	Fe_3O_4 (% m/m)	Nb_2O_5 (% m/m)
1	43,6	24,3	32,1
2	40,8	26,8	32,4
3	40,9	25,9	33,2
4	41,8	22,4	35,8
5	42,0	24,0	34,0
Média	41,8	24,7	33,5
Desvio padrão	1,1	1,7	1,5

[a] = Regiões (~ 25 x 25 µm)

A magnetização dos materiais é mostrada na Figura 23. A magnetização de saturação diminui na seguinte ordem: MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb. Esta característica se deve à incorporação de uma camada de sílica não magnética e subsequente massa de sílica-nióbia não magnética ao sistema. No entanto, mesmo após a última modificação, o material MP@SiNb permanece magnético.

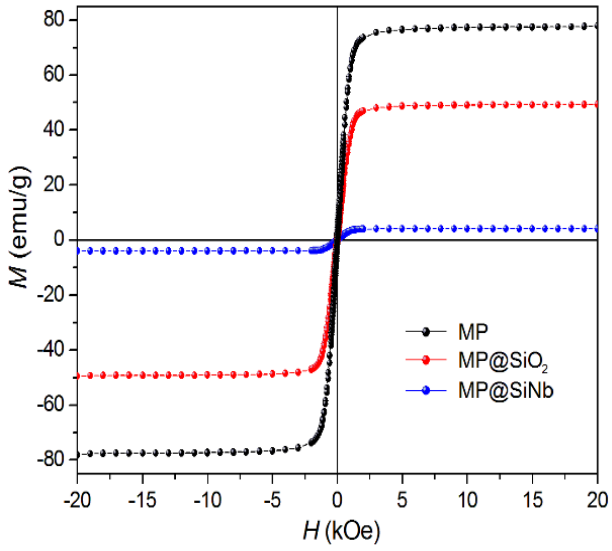

Figura 23: Curvas de magnetização não normalizadas para os materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb.

As isotermas de adsorção-dessorção de N_2 e as curvas de distribuição de tamanho de poros BJH dos materiais MP, MP@SiO_2 e MP@SiNb estão apresentadas na Figura 24. As áreas superficiais específicas BET e os volumes de poros estão resumidos na Tabela 4.

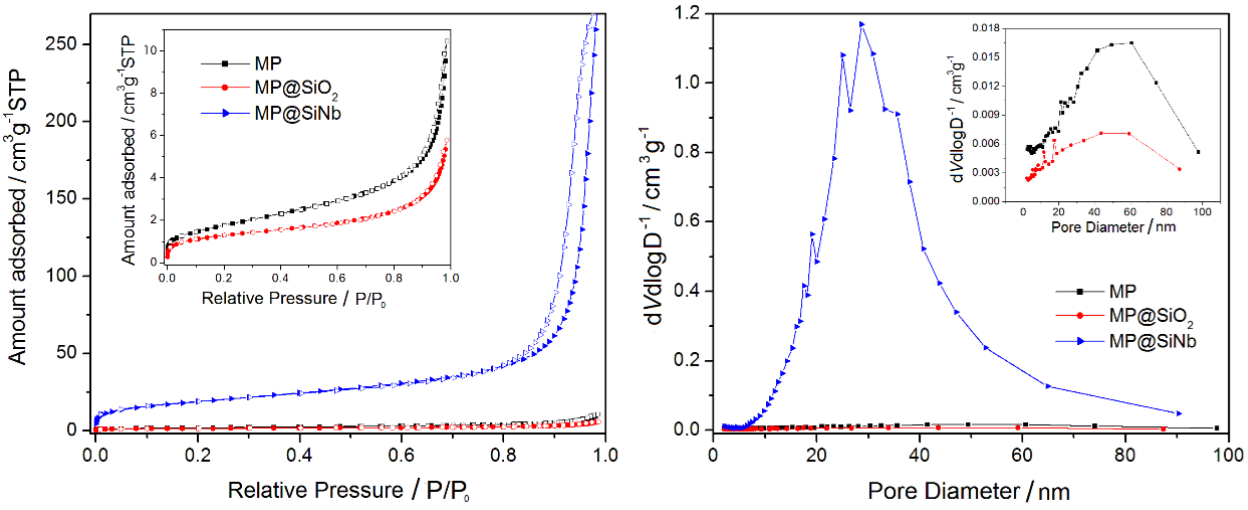

Figura 24: Análise textural dos materiais. (a) isotermas de adsorção-dessorção de N_2; (b) Curvas de distribuição de tamanho de poro BJH.

Inicialmente, uma diminuição na porosidade pode ser vista após a formação da camada de sílica (MP para MP@SiO_2), através da redução na quantidade de nitrogênio adsorvido (inserções da Figura 24a), bem como da diminuição na área superficial e no volume dos poros (Tabela 4). Esse comportamento já foi relatado para o sistema magnetita *core-shell* de sílica, e a interpretação leva em consideração que o revestimento de sílica não porosa bloqueia o acesso do gás N_2 tanto aos espaços intersticiais quanto aos defeitos de empacotamento cristalino da magnetita, que eram acessíveis antes da formação da camada de sílica.[247] Para o material magnético de sílica-nióbia (MP@SiNb), a porosidade aumenta drasticamente por ser um xerogel. As isotermas do material MP@SiNb mostram maiores quantidades de N_2 adsorvido em altas pressões relativas P/P_0 (Figura 24a).

A distribuição de tamanho de poros do material MP@SiNb, que é mostrada na Figura 24b, revela um perfil mesoporoso, com uma ampla distribuição de tamanho, com máximo em torno de 30 nm.[248] O aumento da porosidade para o material MP@SiNb também é confirmado por sua maior área específica e volume de poros, apresentados na Tabela 4. Essas características, como magnetismo e porosidade[272,273], tornam o material MP@SiNb adequado para ser aplicado na construção e modificação de CPE.

Tabela 4: Análise textural dos materiais.

Amostra	Área superficial BET ($m^2.g^{-1}$)	Volume de poro BJH ($cm^3.g^{-1}$)
MP	6,5 ± 0,3	0,015 ± 0,001
MP@SiO_2	4,4 ± 0,3	0,008 ± 0,001
MP@SiNb	68 ± 3	0,422 ± 0,001

5.2.2 Medidas eletroquímicas

A Figura 25 mostra os voltamogramas cíclicos para os materiais CPE-NMOD, MP@SiO_2-CPE e MP@SiNb-CPE. Os eletrodos de todos esses materiais não apresentaram reações de oxi-redução dentro da faixa de potencial estudada, na ausência de *p*-nitrofenol (*p*-NP). Já a adição de *p*-NP (148 µmol.L^{-1}) resultou no aparecimento de um pico de redução para todos os eletrodos. No entanto, o MP@SiNb-CPE apresentou maior corrente de pico catódico (-29,1 µA) e menor potencial de pico (-0,69 V) quando comparado com CPE-NMOD (-6,0 µA e -0,88 V, respectivamente).

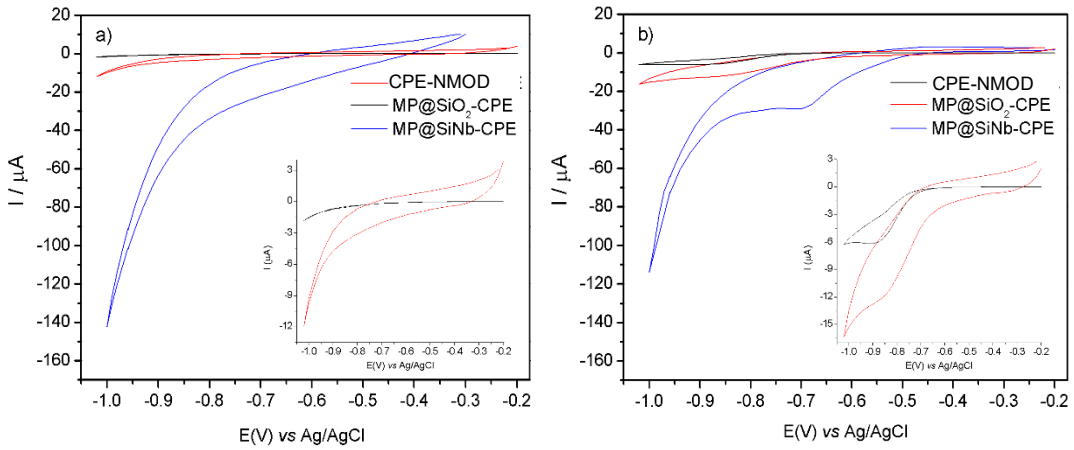

Figura 25: Voltamogramas cíclicos (CV) dos materiais CPE-NMOD, MP@SiO_2-CPE e MP@SiNb-CPE: (a) na ausência e; (b) na presença de *p*-NP (148 µmol.L^{-1}); solução de eletrólito suporte (0,04 mol.L^{-1} de tampão Britton-Robbinson, pH = 6,0, 0,5 mol L^{-1} de $NaNO_3$) a uma taxa de varredura de 20 mV.s^{-1}. Figuras inseridas: CVs de CPE-NMOD e MP@SiO_2-CPE ampliados.

Os resultados obtidos por voltametria de pulso diferencial, apresentados na Figura 26, mostram que o eletrodo modificado MP@SiNb-CPE exibe maior corrente de pico catódico (-33,2 µA) e menor valor de potencial negativo (-0,64 V) quando comparado com

MP@SiO_2-CPE (-20,7 µA, -0,74 V) ou com CPE-NMOD (-11,9 µA, -0,77 V). O comportamento eletroquímico do MP@SiNb-CPE foi interpretado considerando: i) a presença da magnetita, que possui baixa energia de *band gap* e tem sido reconhecida como componente amplificador de sinal;[272,153] ii) as propriedades texturais do xerogel magnético de sílica-nióbia, como área superficial e mesoporosidade, que melhoram a área eletroativa e facilitam a difusão dos analitos, possibilitando seu acesso aos sítios ativos da superfície;[273] e iii) a acidez de Brønsted e Lewis de sistemas nióbia-sílica, já relatadas, que apresentam afinidade com fenóis;[179,274,275] essa interação deve facilitar o processo de redução de *p*-NP na interface eletrodo/solução.

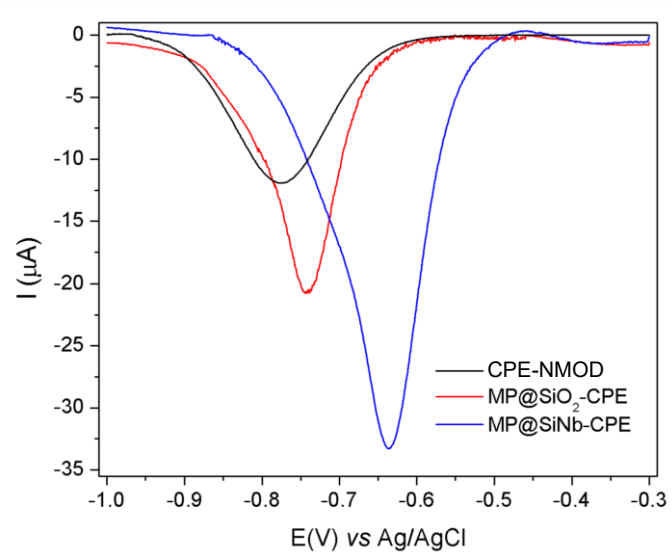

Figura 26: Voltamogramas de pulso diferencial na presença de *p*-NP (117,9 µmol.L^{-1}), empregando-se CPE não modificado, MP@SiO_2-CPE e MP@SiNb-CPE, em solução de eletrólito suporte (0,04 mol.L^{-1} de tampão Britton-Robinson, 0,5 mol.L^{-1} de $NaNO_3$) em pH = 6,0.

Com o objetivo de obter a composição otimizada do MP@SiNb-CPE, diversos eletrodos foram preparados utilizando diferentes proporções do material MP@SiNb, grafite e óleo mineral. Essas composições foram baseadas em resultados de testes anteriores e em trabalhos científicos prévios, os quais forneceram uma boa base para a seleção das diferentes proporções.

Considerando a intensidade de corrente, Figura 27, observou-se que a melhor resposta analítica foi obtida para o eletrodo preparado com a seguinte composição: MP@SiNb (9 mg), grafite (11 mg) e óleo mineral (5 mg). Desta forma, esta composição foi utilizada para as demais medidas eletroquímicas.

Tabela 5: Composição dos eletrodos

Componentes (mg)			
Eletrodos	MP@SiNb	Grafite	Óleo mineral
A	5	15	5
B	8	12	5
C	9	11	5
D	9	11	7,5

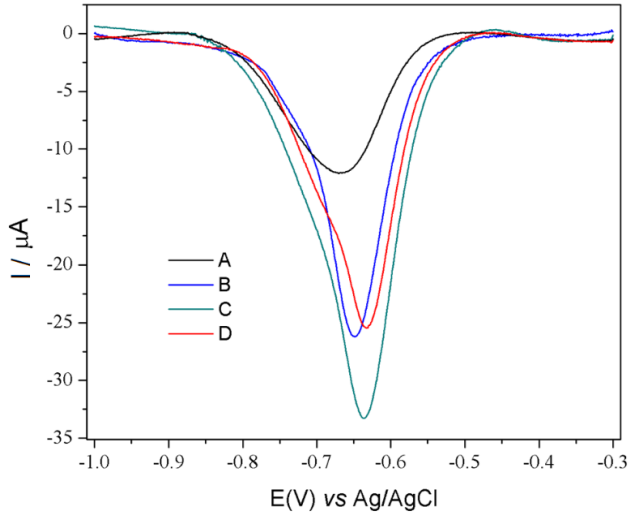

Figura 27: Voltamogramas de pulso diferencial de MP@SiNb-CPE na presença de *p*-NP (117,9 µmol L^{-1}) utilizando eletrodos com diferentes proporções (mg) dos componentes MP@SiNb, grafite e óleo mineral, respectivamente: A) 5, 15 e 5; B) 8, 12 e 5; C) 9, 11 e 5; D) 9, 11 e 7,5. Solução eletrolítica de suporte: 0,04 mol L^{-1} de tampão Britton-Robinson, 0,5 mol L^{-1} de $NaNO_3$, pH=6,0.

Adicionalmente, o comportamento eletroquímico do MP@SiNb-CPE foi investigado em diferentes valores de pH, visando encontrar a condição de pH ideal. Os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos em uma faixa de pH de 3 a 8 na presença de 39,4 µmol.L^{-1} de *p*-NP. Estes resultados são apresentados na Figura 28 onde é possível observar o aumento gradual na corrente de pico de redução (pico catódico) com o aumento do pH de 3 para 7. Nenhuma mudança significativa no valor da corrente foi detectada em pH 8, mas o pico tornou-se mais largo. Devido a isto, o pH 7 foi escolhido como o pH ideal.

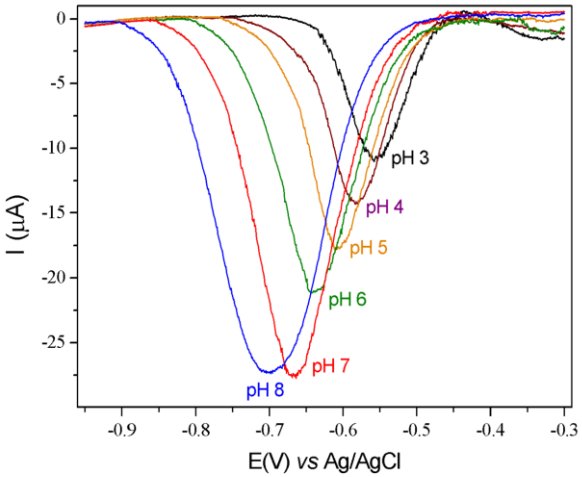

Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial de *p*-NP (39,4 μmol.L^{-1}) com MP@SiNb-CPE variando o pH em tampão Britton-Robbinson.

Para avaliar a aplicabilidade analítica do MP@SiNb-CPE, voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos em tampão Britton-Robinson com adições sucessivas de *p*-NP. Os voltamogramas são apresentados na Figura 29.

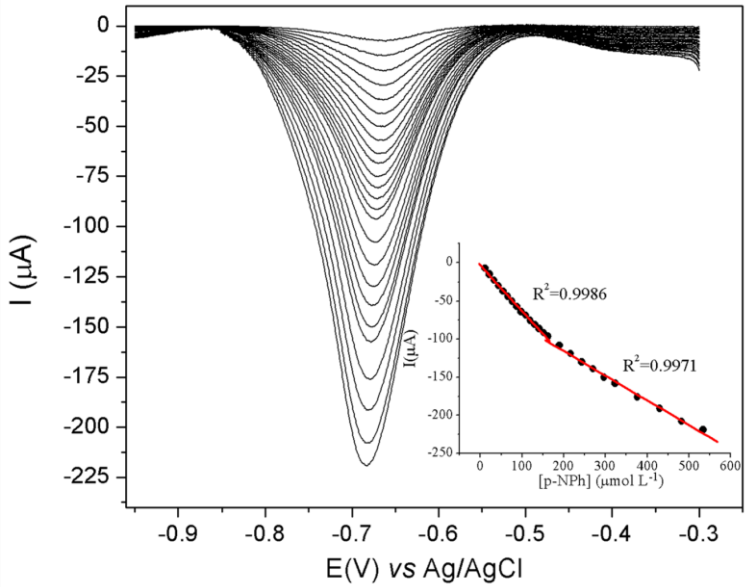

Figura 29: Voltamogramas de pulso diferencial de *p*-NP com MP@SiNb-CPE em tampão Britton-Robbinson 0,04 mol.L^{-1}, pH 7,0 e 0,5 mol.L^{-1} de $NaNO_3$. Figura inserida: correlação linear entre a corrente de pico e a concentração de *p*-NP.

Conforme a Figura 29, um pico de redução bem definido em -0,67 V é claramente observado e uma dependência linear entre a concentração de *p*-NP e a corrente de pico foi alcançada em duas faixas: de 10 a 170 μmol.L^{-1} e de 170 a 490 μmol.L^{-1}, que são expressos pelas curvas de calibração da Figura inserida. As intensidades de pico da corrente (Ipc) foram obtidas subtraindo a corrente de fundo. As respectivas equações são:

$$Ipc\ (\mu A) = -3{,}35\ (\mu A) - 0{,}60\ (\mu A\ L.\mu mol^{-1}) \times [p\text{-NP}]\ (\mu mol.L^{-1}),\ R^2 = 0.9986 \qquad \text{Equação (5)}$$

$$Ipc\ (\mu A) = -50{,}6\ (\mu A) - 0{,}36\ (\mu A\ L.\mu mol^{-1}) \times [p\text{-NP}]\ (\mu mol.L^{-1}),\ R^2 = 0.9971 \qquad \text{Equação (6)}$$

As sensibilidades estimadas, obtidas a partir da inclinação das equações (5) e (6), foram de 0,60 e 0,36 µA.L.µmol^{-1}, respectivamente. O limite de detecção (LD) foi calculado como LD = 3×σb/sensibilidade, onde σb é o desvio padrão obtido a partir das últimas 8 medições do branco. Desta forma, o LD foi de 1,2 µmol.L^{-1}. O limite de quantificação (LQ) foi calculado como 10×σb/inclinação da reta e o valor encontrado foi 4 µmol.L^{-1}.

A Tabela 6 apresenta a faixa de concentração para a determinação de *p*-NP e o limite de detecção em comparação com outros trabalhos recentemente publicados na literatura, que utilizam diferentes tipos de eletrodos.

Tabela 6: Parâmetros de sensores eletroquímicos para *p*-NP publicados recentemente.

Eletrodo	Faixa linear (µmol L^{-1})	Limite de detecção (µmol L^{-1})	Referência
GCE/rGO [a]	50 – 800	42	[276]
rGO-Ag/GCE [b]	1 - 1100	0,32	[277]
Ni–Co_{OX} NPs/GCE [c]	7 – 682	4,8	[278]
MnONPs/BCA/Au [d]	200 – 550	15,7	[279]
TLISS/GCE [e]	1,4 – 55,9 55,9 – 553,7	1,1	[280]
MIP-PANI/GO-CPE [f]	60 – 140	20	[281]
AcSCD-AuNPs-MC [g]	0,1 – 10 10 – 350	3,6	[282]
ITO/PANI [h]	250 – 1400	2	[283]
BiFe [i]	1,0 – 100	3,4	[284]
vAuE-AgAP [j]	1 – 200	5	[285]
FA-rGO [k]	2 – 140	0,65	[286]
AcSCD-AuNPs-MC [l]	0,1 – 350	3,63	[282]
NiO-CeO_2/GCE [m]	1 – 20	2,48	[287]
bPGE/AgAPs [n]	1 – 100	1,5	[288]
BSO-gCN [o]	1,6 – 50	1	[289]
GDYO/GCE [p]	0,6 – 692	0,2	[290]
MP@SiNb-CPE	10 – 170 170 – 490	1,2	Este trabalho

[a] Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido;
[b] Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno e nanopartículas de prata;
[c] Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de óxido de níquel-cobalto;

[d] Eletrodo de ouro modificado com nanopartículas de óxido de manganês e acetato de butil carbitol;
[e] Eletrodo de carbono vítreo modificado com sulfeto de prata e índio;
[f] Eletrodo de pasta de carbono e óxido de polianilina/grafeno com impressão molecular;
[g] Carbono mesoporoso modificado com (2-carboxi-metil)tio-β-ciclodextrina (AcSCD) e nanopartículas de ouro;
[h] Filmes de polianilina em eletrodo de vidro e óxido de estanho dopado com índio;
[i] Eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de bismuto;
[j] Filme de ouro-AgNP por deposição de vapor;
[k] Eletrodo de carbono vítreo de óxido de grafeno reduzido por ácido fúlvico;
[l] Eletrodo de carbono vítreo mesoporoso de ciclodextrina decorada com nanopartículas de ouro;
[m] Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido binário;
[n] Eletrodo de grafite pirolítico modificado com partículas de amálgama de prata bPGE/AgAPs;
[o] Nanocompósito de nitreto de carbono e estanato de bário-grafítico;
[p] Eletrodo de carbono vítreo/óxidos de grafidino.

Como pode ser visto na Tabela 6, o limite de detecção alcançado para a determinação de *p*-NP com MP@SiNb-CPE foi comparável com os melhores sensores relatados e apresentou uma ampla faixa linear de aplicação. Portanto, este eletrodo torna-se promissor para ser aplicado como sensor na determinação de *p*-NP.

A repetibilidade, ou precisão intradiária, do MP@SiNb-CPE foi estimada em quatro experimentos, realizados em um único dia, na mesma célula eletroquímica, utilizando o mesmo eletrodo.[291] A precisão intermediária foi avaliada usando o mesmo eletrodo, a mesma célula, mas em cinco dias diferentes.[291] Os voltamogramas de pulso diferencial são apresentados nas Figura 30a e b, respectivamente.

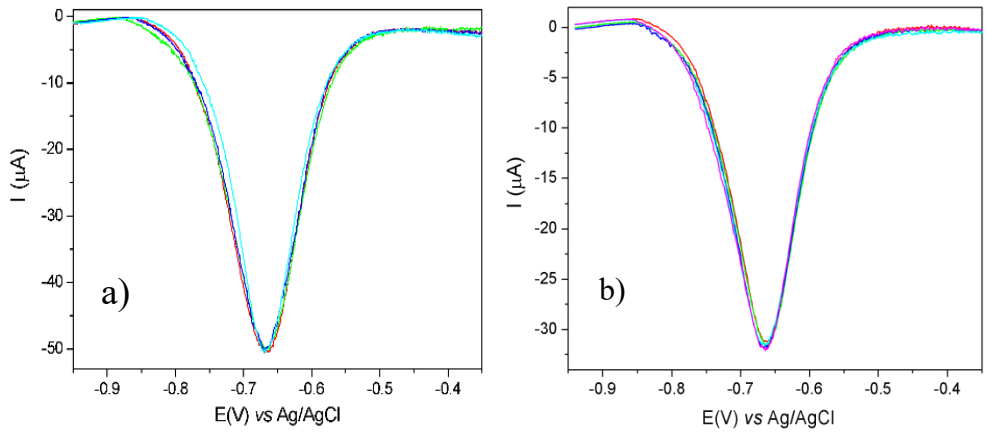

Figura 30: a) Quatro voltamogramas de pulso diferencial, obtidos com o mesmo eletrodo (MP@SiNb-CPE), em um único dia. Tampão Britton-Robinson, pH 7,0 (47,75 μmol.L^{-1} de *p*-NP); b) Voltamogramas de pulso diferencial, com o mesmo eletrodo (MP@SiNb-CPE), obtidos em cinco dias diferentes. Tampão Britton-Robinson, pH 7,0 (47,75 μmol.L^{-1} de *p*-NP).

De acordo com a Figura 30, nenhuma mudança marcada pode ser detectada, e os desvios padrão relativos das medidas de corrente de pico foram de 0,44% para os experimentos feitos em um único dia e 0,83% para os experimentos realizados em dias diferentes.

A precisão entre diferentes eletrodos MP@SiNbCPE também foi avaliada. Foram preparados quatro eletrodos da mesma forma e os voltamogramas de pulso diferencial estão mostrados na Figura 31. Um desvio padrão relativo de 1,8% foi observado para as medidas de corrente de pico. Portanto, o eletrodo MP@SiNb-CPE apresenta boas características de precisão que possibilitam sua utilização na determinação de *p*-NP.

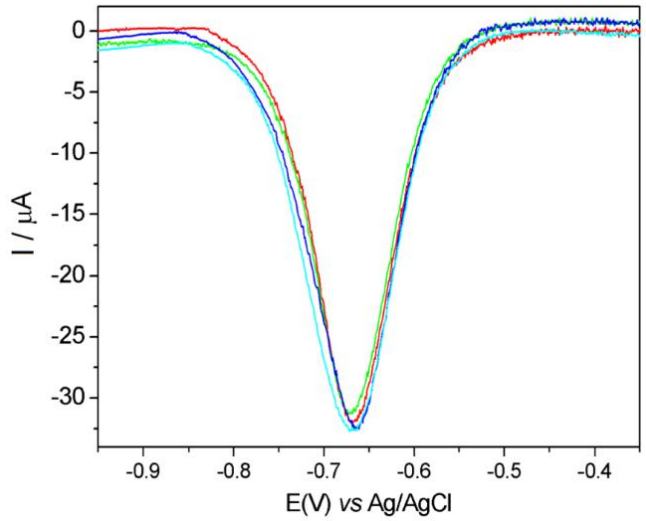

Figura 31: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em 1 dia, com a mesma célula, usando 4 eletrodos MP@SiNb-CPE preparados da mesma forma. Tampão Britton-Robinson, pH 7,0 (47,75 µmol.L^{-1} de *p*-NP).

Para aplicar o eletrodo MP@SiNb-CPE em amostras ambientais reais, a seletividade foi avaliada pela sondagem de alguns possíveis compostos fenólicos interferentes como: 2-bromofenol, 4-bromofenol, 2-aminofenol, hidroquinona e 2-nitrofenol (Figura 32), bem como os íons metálicos Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} e Mn^{2+}, na presença de *p*-NP 78,6 µmol.L^{-1}.

Os resultados indicaram que as concentrações de 2-bromofenol, 4-bromofenol, 2-aminofenol e hidroquinona (concentração 600 vezes maior do que *p*-NP) não interferem na sua determinação, uma vez que não foram observadas alterações detectáveis na corrente de pico. Entretanto, para o 2-aminofenol a concentração limite foi 100 vezes maior, considerando o limite de tolerância de interferentes como 5% na intensidade da corrente de pico.[292] A influência do 2-nitrofenol (*o*-NP) é apresentada na Figura 32b, onde nenhuma influência pode ser observada na corrente de pico do *p*-NP, em baixas concentrações de *o*-NP (<76 µmol.L^{-1}). Para íons metálicos Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} e Mn^{2+} em concentrações de até 12.000 vezes maiores não interferiram na determinação de *p*-NP.

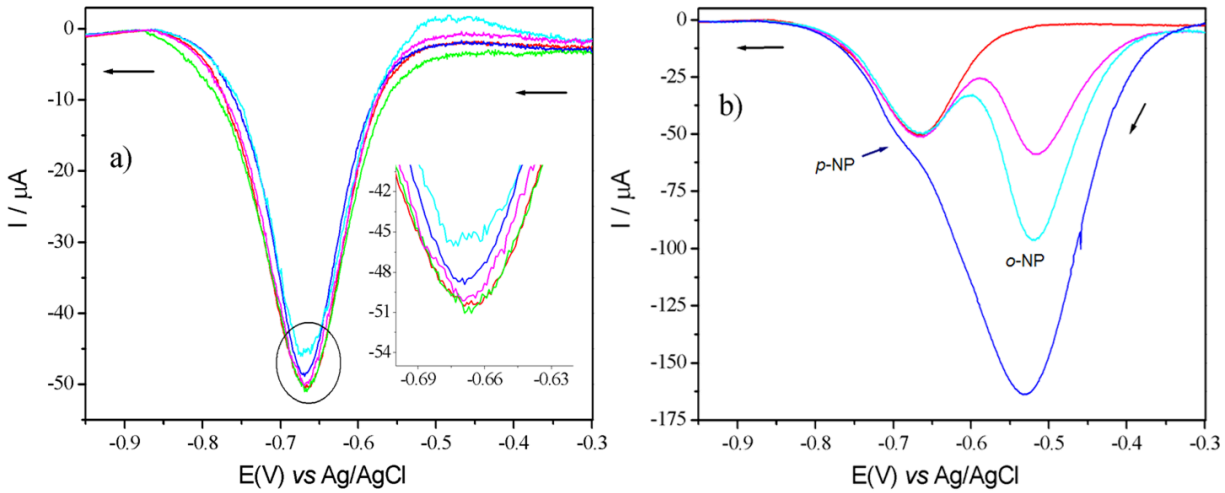

Figura 32: Voltamogramas de pulso diferencial de *p*-NP (78,6 µmol.L^{-1}) usando eletrodo MP@SiNb-CPE em tampão Britton-Robinson, pH 7,0: (a) em solução tampão, sem interferente (vermelho); 0,05 mol.L^{-1} de 4-bromofenol (verde); 0,43 mol.L^{-1} de 2-bromofenol (azul); 0,01 mol.L^{-1} de 2-aminofenol (ciano); 0,05 mol.L^{-1} de hidroquinona (magenta); (b) em solução tampão, sem interferente (vermelho); 38 µmol.L^{-1} de 2-nitrofenol (magenta); 76 µmol.L^{-1} de 2-nitrofenol (ciano); 152 µmol.L^{-1} de 2-nitrofenol (azul).

Como forma de demonstrar a viabilidade do uso do eletrodo MP@SiNb-CPE para amostras reais, a determinação de *p*-NP foi aplicada em água de torneira e também em água doce coletada no Lago Guaíba na cidade de Porto Alegre. As amostras de água foram enriquecidas com quantidades conhecidas de *p*-NP. O método de adição padrão foi empregado para estimar a recuperação. A amostra do lago foi filtrada antes da análise, enquanto que a água da torneira foi usada como coletada. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7. As excelentes recuperações para diferentes concentrações indicam que o eletrodo MP@SiNb-CPE é adequado para ser aplicado na análise de *p*-NP em amostras reais.

Tabela 7: Determinação de *p*-NP em amostras reais de água, empregando MP@SiNb-CPE (n=3).

Amostra	Adicionado (µmol.L^{-1})	Encontrado (µmol.L^{-1})	Recuperado (%)	Desvio Padrão (%)
Água da torneira	0	Não detectado	-	-
	20	20,3	101,5	1,3
	100	102	102,0	1,7
	200	198	99,0	2,1
Água do Lago	0	Não detectado	-	-
	20	20,4	102,0	1,5
	100	103,5	103,5	2,0
	200	196	98,0	2,4

5.2.3 Conclusão

Um xerogel magnético, mesoporoso, de sílica/nióbia/magnetita foi obtido com sucesso empregando o método sol-gel de síntese. Este material (MP@SiNb) apresentou propriedades texturais (poros na faixa de 20-50 nm e área superficial específica de 68 $m^2.g^{-1}$) e magnéticas importantes, que permitiram a construção de um dispositivo eletroquímico sensível e seletivo para determinação de *p*-nitrofenol, em amostras de água (sintéticas ou reais).

5.3 CATÁLISE ENZIMÁTICA

5.3.1 Estudo da imobilização de enzimas lipase no suporte Si-GPTMS

Em geral, a imobilização de enzimas em suportes contendo grupos epóxido ocorre em duas etapas: i) com a adsorção física das proteínas por interações hidrofóbicas; ii) posteriormente, os grupos nucleofílicos da enzima reagem com os grupos epóxido por ligações covalentes.[181] Neste sentido, considerando a imobilização por adsorção/ligação covalente, foram feitos testes de imobilização das enzimas lipase CalB e TLL no suporte Si-GPTMS utilizando-se tampão fosfato de sódio 0,1 $mol.L^{-1}$ pH 7 e carga de proteína de 50 mg/g de suporte. Após a imobilização, os biocatalisadores foram designados como SiGCalB-50 e SiGTLL-50. Os parâmetros de imobilização (rendimento, eficiência, atividade recuperada e atividade enzimática) são apresentados na Figura 33.

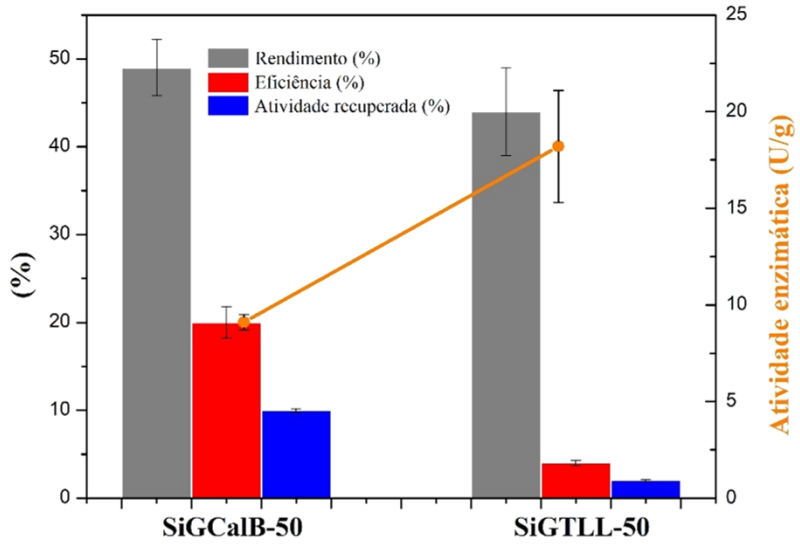

Figura 33: Parâmetros de imobilização para os biocatalisadores SiGCalB-50 e SiGTLL-50.

De acordo com a Figura 33, SiGCalB-50 apresentou um rendimento de imobilização um pouco maior do que SiGTLL-50, assim como uma maior eficiência e uma maior atividade recuperada na hidrólise do *p*-NPP. Porém, SiGTLL-50 apresentou maior atividade enzimática. A atividade da lipase imobilizada depende muito do tipo de suporte, do protocolo de imobilização, das moléculas da enzima e do meio reacional (temperatura, solvente).[293] A intensidade das interações enzima-suporte, enzima-substrato (no meio reacional) e suporte-substrato afetam a estabilidade e a especificidade dos biocatalisadores.[294] A menor atividade enzimática de SiGCalB-50 pode estar relacionada à atividade inicial específica da enzima livre de CalB, que apresenta um valor mais baixo (1,7 U/mg) em comparação ao encontrado para a enzima livre de TLL (21,3 U/mg).

5.3.2 Estudo das cargas de imobilização da enzima CalB no suporte Si-GPTMS

Após o estudo de imobilização das enzimas lipase CalB e TLL no suporte Si-GPTMS optou-se por continuar este trabalho com a enzima CalB. Assim, foram feitos testes de imobilização da enzima lipase CalB no suporte Si-GPTMS com diferentes cargas de enzima/g de suporte. Após a imobilização, o biocatalisador foi designado como SiGCalB-X, sendo X a carga de enzima (mg de proteína) por grama de suporte (X=10, 50, 75, 100 e 200). Os parâmetros de imobilização: rendimento, eficiência e atividade recuperada, atividade enzimática e quantidade de proteína imobilizada (mg) são apresentados na Figura 34.

O aumento das cargas pode influenciar na estabilidade das enzimas, melhorando sua capacidade de ligação e assim aumentando a quantidade de enzima imobilizada. Porém, também pode afetar a estrutura tridimensional das enzimas, alterando a atividade e a estabilidade enzimática, que poderão modificar propriedades físicas e químicas do catalisador, como sua estabilidade estrutural ou a capacidade de difusão dos reagentes e produtos.[189,295]

De acordo com a Figura 34, comparando-se os biocatalisadores com as diferentes cargas de enzima, a imobilização com a menor carga de proteína/g de suporte resultou em um maior rendimento de imobilização, eficiência e atividade recuperada. Este resultado pode estar relacionado à estabilidade conformacional da enzima no suporte, formando uma monocamada, que evita agregações indesejadas. As interações com as moléculas de substrato são facilitadas, devido à alta difusão no meio, resultando em uma estrutura mais adequada e estável.[182,296,297]

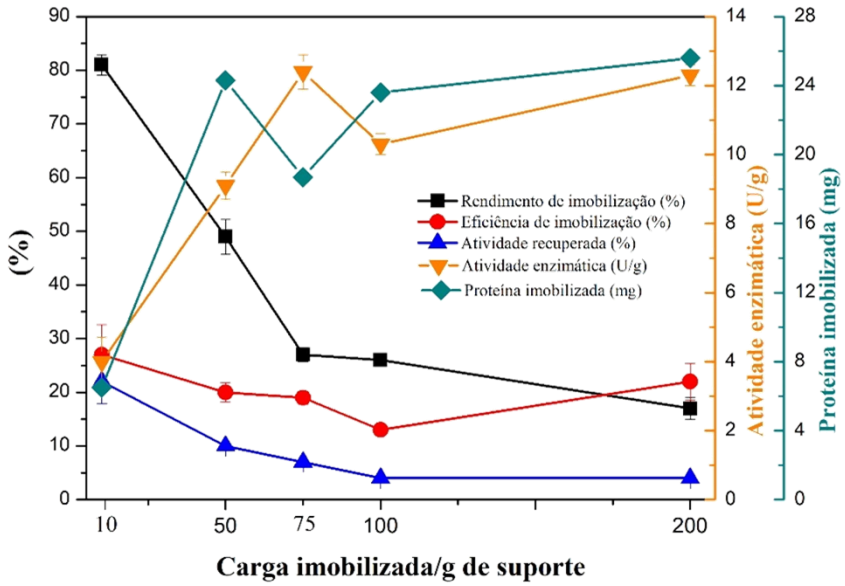

Figura 34: Parâmetros de imobilização para os biocatalisadores SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100 e 200 mg de proteína/ g de suporte).

Observa-se que os valores dos parâmetros de imobilização diminuem com o aumento da carga imobilizada por grama de suporte, embora aumente a quantidade (em massa) de enzima imobilizada. Estes resultados já foram observados anteriormente e esta diferença nos valores pode ser explicada devido ao aumento das limitações difusionais com cargas excessivas, diminuindo sua eficiência mesmo com maior número de enzima imobilizada.[192,298] Esta limitação também pode ser observada nos valores de atividade enzimática, que, embora mais baixos para a carga de 10 mg/g de suporte, não sofreu grandes alterações em cargas maiores. Este resultado pode estar relacionado à capacidade máxima de carga imobilizada, em que foi atingido o limite de imobilização, ocorrendo a saturação das enzimas imobilizadas no suporte, além da possibilidade da ocorrência de ligações entre a própria enzima imobilizada.[299,300] Este fenômeno acontece com cargas maiores de enzima e, neste caso, devido à aproximação entre elas, ou ligações enzima-enzima as ligações enzima-substrato se tornam mais difíceis, já que para permitir a reação de catálise enzimática é preciso atingir as regiões entre as enzimas agregadas e alcançar os sítios ativos, que estão bloqueados.[296,300]

5.3.3 Influência da razão volume total de solução enzimática / massa de suporte na imobilização da enzima CalB no suporte Si-GPTMS

Testes de imobilização realizados com diferentes razões volume total de solução enzimática (mL) / massa de suporte (g), empregando carga de 50 mg de proteína / g de suporte (SiGCalB-50), apresentaram diferentes valores para os parâmetros de imobilização (rendimento

e eficiência), atividade recuperada e enzimática, e massa de proteína imobilizada para a reação de hidrólise do *p*-NPP, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros de imobilização para SiGCalB-50 com diferentes razões de volume total de solução enzimática/massa de suporte.

Razão	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade Recuperada (%)	Atividade Enzimática (U/g)	Proteína Imobilizada (mg)
10	14±1,8	41±4,9	6±0,1	7,1±0,2	6,9
25	49±3,2	20±1,8	10±0,2	9,1±0,4	24,3

*Os resultados correspondem ao valor médio de duas replicatas.

Os resultados da Tabela 8 mostram que o material imobilizado na maior razão (25) apresentou um rendimento de imobilização significativamente maior, em relação à razão de 10. Este fato pode estar associado ao maior volume de solução enzimática usado na reação de imobilização. Entretanto, a eficiência do material imobilizado na razão 25 foi menor, o que pode estar relacionado às interações proteína-proteína, devido à maior quantidade (em massa) de proteína imobilizada.[189,296] Essas interações dificultam a difusão do substrato e ocorrem quando o suporte é carregado com a quantidade máxima de proteína possível e/ou quando as macromoléculas enzimáticas são imobilizadas tão rapidamente que a enzima não consegue se difundir nos poros do suporte, ficando limitadas à entrada dos poros.[189,296,301]

Cada sistema enzima-suporte depende de vários fatores e também pode influenciar o rendimento de imobilização, como as propriedades específicas do suporte, as condições de imobilização e as características da enzima em questão. Os testes com a variação de cargas de enzima, de 10 – 200 mg de enzima/g de suporte, apresentados na Figura 34 foram preparados em diferentes razões de volume total de solução enzimática/massa de suporte. A partir do estudo deste capítulo, observa-se que a razão poderia ter sido aumentada a fim de otimizar estes resultados, melhorando os parâmetros de imobilização. Para este trabalho, embora tenham sido observadas diferenças, não será feita essa otimização e a continuação do trabalho se dará com os resultados já obtidos no item 5.3.2.

5.3.4 Caracterização

A caracterização textural da sílica antes e após a funcionalização com GPTMS, assim como após a imobilização das diferentes cargas de enzima, foi avaliada através das isotermas

de adsorção e dessorção de N_2; curvas de distribuição de tamanho de poros; áreas superficiais específicas; volume e diâmetro de poros, respectivamente. Esses resultados são apresentados na Figura 35 e Tabela 9.

As isotermas da Figura 35a são classificadas como tipo IV, típicas de materiais mesoporosos, apresentando histerese em altas pressões relativas.[248] As curvas de distribuição de tamanho de diâmetro de poros da Figura 35b, mostram uma distribuição unimodal bastante simétrica para todos os materiais.

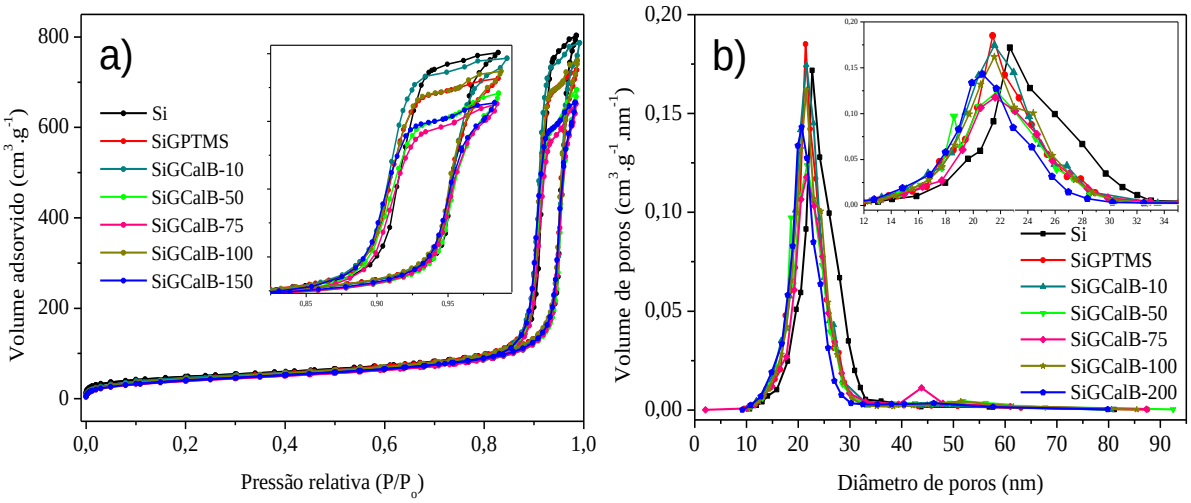

Figura 35: a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2;
b) Curvas de distribuição de tamanho de poros para os materiais: Sílica (Si), Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg de proteína/g de suporte).

A partir dos valores das medianas, apresentados na Tabela 9, se observa uma diminuição de aproximadamente 1,6 nm no diâmetro entre os materiais xerogel de sílica e Si-GPTMS. Esse resultado evidencia que a organofuncionalização ocorreu, produzindo um revestimento orgânico de aproximadamente 0,8 nm na superfície dos poros, compatível com o tamanho do grupo orgânico do GPTMS enxertado na sílica.[302] Adicionalmente, a organofuncionalização também é evidenciada pela diminuição da área superficial específica e do volume de poros, mostrados na Tabela 9.

Além da acessibilidade das enzimas ao interior do suporte, o tamanho dos poros também influencia a difusão dos substratos ao sítio ativo da enzima. Poros que sejam pequenos em relação ao tamanho da enzima, faz com que estas tenham dificuldade em se imobilizar adequadamente no suporte e então, mesmo com o aumento de cargas, a imobilização pode ser limitada. Além disso, poros menores oferecem resistência ao avanço do substrato até as enzimas, o que afeta a eficiência das reações enzimáticas e também a atividade

enzimática.[183,303,304] Enzimas CalB, possuem dimensões aproximadas de 3 nm x 4 nm x 5 nm e portanto, não teriam dificuldade em atingir o interior dos poros do suporte Si-GPTMS.[305]

Tabela 9: Área superficial específica (A_{BET}), volume de poros e diâmetro de poros para os materiais: Sílica, Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg de proteína/g de suporte).

Material	A_{BET} ($\pm$ 3$m^2.g^{-1}$)	Volume de poros ($\pm$ 0,01 $cm^3.g^{-1}$)	Diâmetro de poros (nm)[a]
Sílica	169	1,24	23,6
Si-GPTMS	159	1,11	22,0
SiGCalB-10	160	1,22	21,7
SiGCalB-50	145	1,06	21,6
SiGCalB-75	143	1,01	20,3
SiGCalB-100	157	1,16	22,1
SiGCalB-200	147	1,01	21,1

[a] obtido a partir da mediana aparente da curva de distribuição de diâmetro de poros da Figura inserida 3b

Após a imobilização das enzimas, não foram observadas variações no tamanho e diâmetros dos poros, uma vez que as medianas se mantêm praticamente constantes. Os resultados obtidos por BET também mostram uma leve diminuição da área superficial específica e do volume de poros após a imobilização das enzimas nas diferentes cargas enzimáticas. Esse resultado é um indicativo de que a imobilização da enzima não ocorreu no interior dos poros, mas predominantemente na superfície externa do suporte Si-GPTMS. O mecanismo de imobilização para suportes contendo grupos epóxi ocorre em duas etapas, na primeira ocorre a adsorção das enzimas no suporte e posteriormente a formação de ligações covalentes.[228] Na primeira etapa, de adsorção, a ligação da enzima ao suporte ocorre de forma rápida, e sabe-se que reações que ocorrem rapidamente geralmente fazem com que a ligação das enzimas seja na parte mais externa do suporte.[228,182] Além disso, pode ter ocorrido o bloqueio parcial da entrada dos poros ou ocupação do interior dos poros de uma pequena parte das enzimas, reduzindo assim, a área superficial disponível para interações e adsorção, podendo afetar a eficiência das reações enzimáticas.[306]

A cinética de imobilização do catalisador SiGCalB-100 (Figura 36) mostra que a taxa de imobilização é rápida para a enzima CalB (100 mg/g de suporte) no suporte Si-GPTMS. Embora tenha sido deixado por 24 horas sob imobilização, após 2 horas de reação, mais da metade das enzimas já estão imobilizadas.

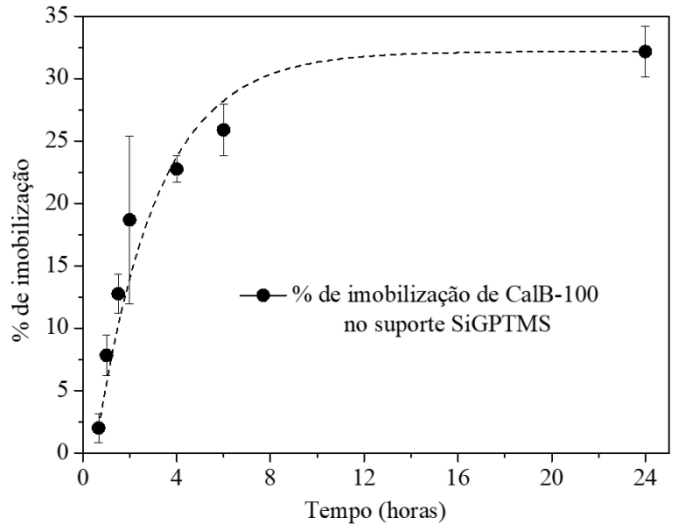

Figura 36: Cinética da imobilização de SiGCalB-100.

A análise termogravimétrica (TGA) nos dá informações sobre a funcionalização da sílica com GPTMS, bem como sobre a imobilização de enzima, através das perdas de massa durante o processo de aquecimento em atmosfera de N_2. Desta forma, todos os materiais sólidos, Sílica (Si), Si-GPTMS, SiGCalB-X (sendo X=10, 50, 75, 100, 200 mg/g de suporte), foram submetidos à análise TGA e os resultados são apresentados na Figura 37 e Tabela 10.

Pode-se observar nas curvas termogravimétricas da Figura 37 e Tabela 10 uma diferença de perda de massa entre a sílica (Si) e o material Si-GPTMS, que é devido à decomposição e dessorção de orgânicos do grupo glicidoxipropil. Para os materiais SiGCalB-X observa-se uma perda adicional de massa que é atribuída a presença da enzima imobilizada.

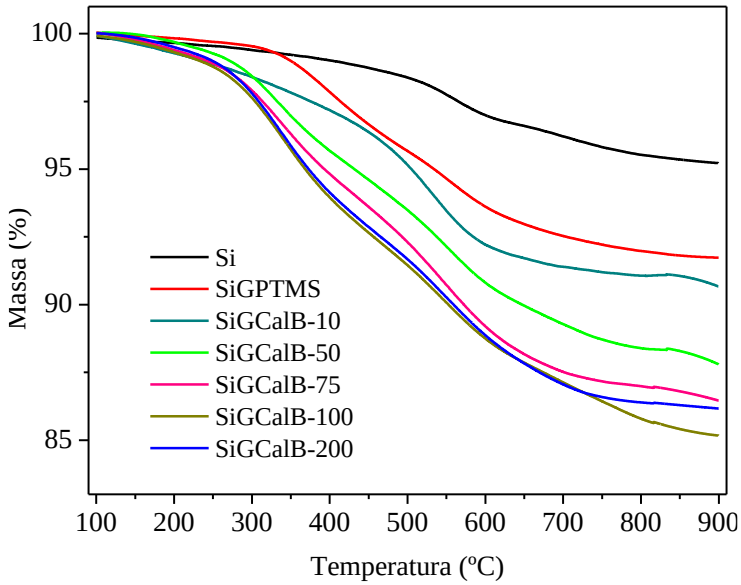

Figura 37: Curvas termogravimétricas dos materiais: Sílica (Si), Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg/g de suporte).

Tabela 10: Percentual de perda de massa para os materiais: Sílica (Si), Si-GPTMS, SiGCalB-X (X=10, 50, 75, 100, 200 mg/g de suporte).

Amostra	Perda de massa 100-150°C (%)	Perda de massa 150-600°C (%)	Perda de massa relativa (%)
Si	0,271	2,714	-
Si-GPTMS	0,103	6,309	3,595
SiGCalB-10	0,415	7,469	1,16
SiGCalB-50	0	9,149	2,84
SiGCalB-75	0,181	10,708	4,399
SiGCalB-100	0,286	11,016	4,707
SiGCalB-200	0,157	11,024	4,715

Para avaliar as características morfológicas dos materiais, antes e após a funcionalização com GPTMS, foram adquiridas imagens de MEV da sílica (Si) e Si-GPTMS (Figura 38a e b), as quais mostram uma rugosidade que é produzida pela agregação de partículas primárias esféricas. A Figura 38d exibe (em outra escala) o mapa de EDS para o elemento carbono no material Si-GPTMS (na região apresentada na Figura 38c), mostrando que este elemento está disperso em toda a extensão do material. Assim, esses resultados, juntamente com os obtidos por BET, TGA confirmam a organofuncionalização da sílica. Já a imobilização bem sucedida da enzima CalB no suporte Si-GPTMS, pode ser confirmada pelos resultados da análise textural e TGA.

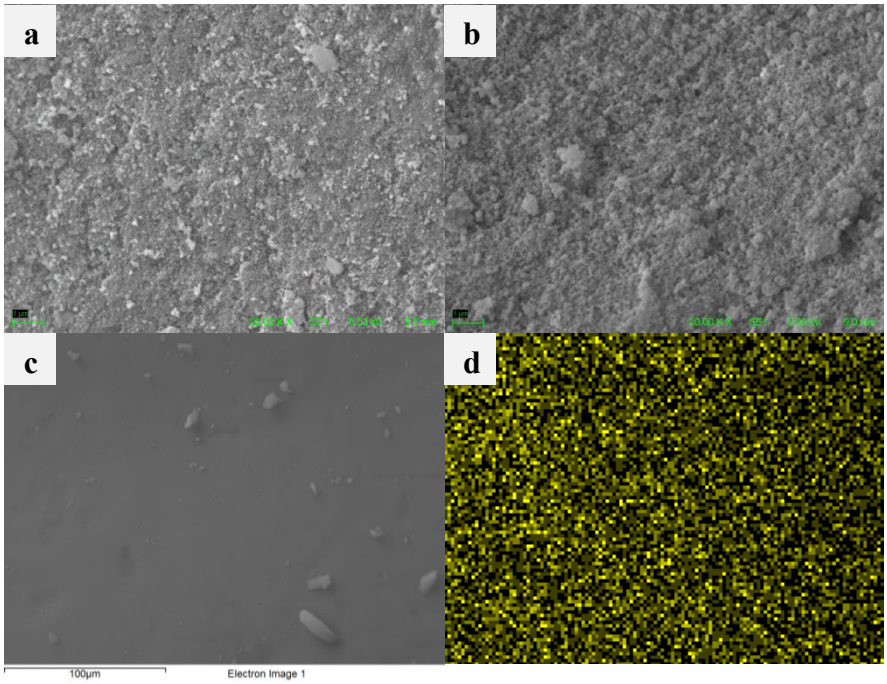

Figura 38: Imagens de MEV para os materiais: (a) Sílica, (b) SiGPTMS, (d) Mapa de EDS para o elemento C, na região da imagem (c).

5.3.5 Estabilidade térmica da enzima CalB livre e imobilizada SiGCalB-10

Dentre os catalisadores, aquele com menor carga (SiGCalB-10) mostrou melhores valores dos parâmetros de imobilização em comparação com as enzimas de maior carga. Embora este catalisador tenha sido o que apresentou menor valor de atividade catalítica, foi escolhido para a continuação do trabalho devido à possíveis diminuições de interferências difusionais do sistema e pela maior eficiência.

A estabilidade térmica da enzima livre e da enzima imobilizada SiGCalB-10, foi avaliada nas temperaturas de 50 a 80 °C em um tempo fixo de 1 h, através da reação de hidrólise do *p*-NPP. Esses resultados são apresentados na Figura 39, onde podemos observar que a enzima livre, após uma 1 h a 60 °C praticamente não apresenta mais atividade. Já, para a enzima imobilizada (SiGCalB-10), observa-se um decaimento da atividade relativa com o aumento da temperatura. SiGCalB-10 revelou-se estável termicamente, apresentando 90% de atividade inicial em 50 °C e 25% de atividade inicial em 80 °C.

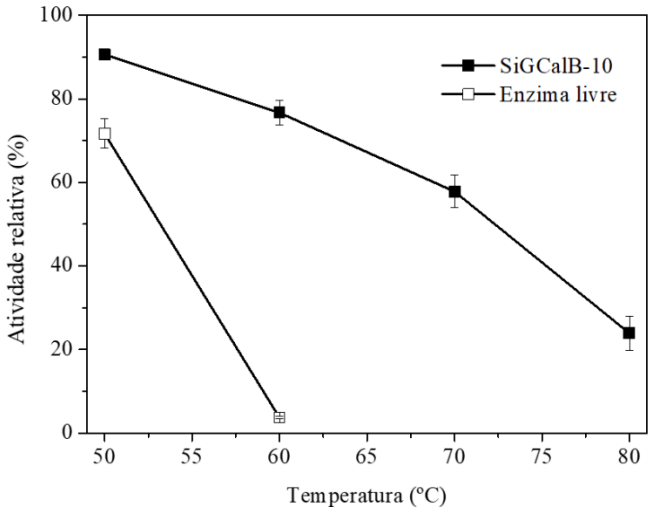

Figura 39: Estabilidade térmica da enzima CalB livre e enzima imobilizada SiGCalB-10 após 1 h e temperaturas entre 50 e 80 °C.

Quando as enzimas são expostas a altas temperaturas, ocorrem várias mudanças em sua estrutura tridimensional, como distorção ou destruição dos sítios ativos do sistema, causando a desnaturação da proteína, ou seja, a perda definitiva da sua estrutura tridimensional e atividade catalítica.[307,308,309] A imobilização oferece vantagens em relação às enzimas livres, como maior estabilidade térmica, devido à proteção contra condições como altas temperaturas. Embora haja indícios de que as enzimas se encontram imobilizadas no exterior do suporte, a ligação destas ao suporte parece ter ajudado na estabilidade térmica, já que foi possível observar atividade

enzimática mesmo na temperatura de 80 ºC.[310] A estabilidade das enzimas imobilizadas pode resultar em uma vida útil prolongada e maior reutilização em processos catalíticos. Essa característica é particularmente vantajosa em aplicações industriais, onde as enzimas imobilizadas podem ser utilizadas repetidamente, reduzindo custos e aumentando a eficiência dos processos biotecnológicos.

5.3.6 Aplicação do biocatalisador na síntese de butirato de butila e ensaios de reuso

Os resultados da conversão de butirato de butila, a partir da reação de esterificação entre ácido butírico e butanol, em diferentes tempos de reação, empregando-se o biocatalisador (SiGCalB-10 e enzima livre) são apresentados na Figura 40.

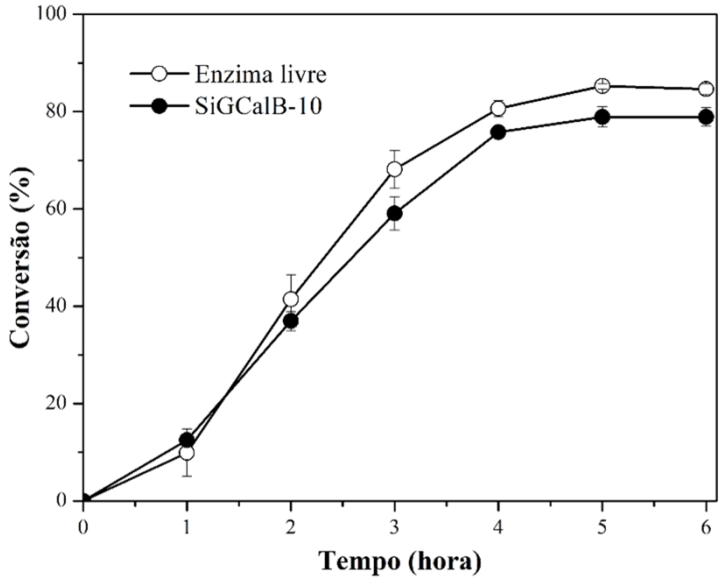

Figura 40: Conversão em butirato de butila a 50 °C, razão molar ácido butírico:butanol 1:1, 100 µL da enzima CalB livre, em tampão fosfato de sódio pH 7 0,1 mol.L-1 e 100 mg do biocatalisador SiGCalB-10.

Podemos observar que as maiores conversões foram obtidas a partir de 4 h de reação, atingindo valores próximos a 80% com o uso da enzima livre e do biocatalisador SiGCalB-10. Isto demonstra que as condições de reação favoreceram tanto a enzima livre quanto a enzima imobilizada, além de mostrar que a enzima apresenta boa eficiência catalítica na reação.

O uso da enzima livre tem a vantagem de ter a interação com o substrato em nível molecular, sem limitações de transferência de massa ou problemas de entupimento, já que devido à sua maior mobilidade, ela pode interagir de forma mais eficiente com os substratos, facilitando a reação, com vantagem significativa no que se refere à atividade enzimática e

eficiência da reação.[311,312] Porém, esta não pode ser reutilizada, o que a torna economicamente inviável. No entanto, a imobilização das enzimas oferece várias vantagens, como maior estabilidade, reutilização e facilidade de separação do produto, o que pode ser preferível em certas aplicações industriais.[213] Assim, é importante destacar que a escolha entre enzima livre e enzima imobilizada depende das necessidades específicas da aplicação e deve levar em consideração diversos fatores, como as condições de reação, o custo-benefício e a viabilidade industrial.[294,313]

Ensaios de reuso do biocatalisador, SiGCalB-10, na reação de esterificação do butirato de butila, foram realizados nas mesmas condições apresentadas acima, com 3 h de reação. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 41.

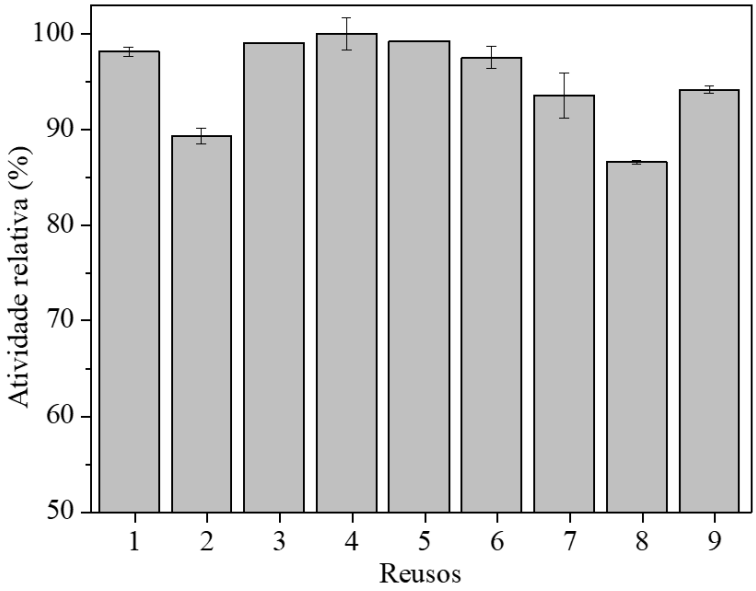

Figura 41: Reusos do biocatalisador SiGCalB-10 na reação de esterificação do butirato de butila a 50 °C, razão molar ácido butírico:butanol 1:1; 3 h e 100 mg de biocatalisador.

Os resultados de reuso indicam que o biocatalisador, após lavagem com n-hexano, mantém aproximadamente 90% de sua atividade inicial após 9 ciclos de reação. A pequena diminuição da atividade catalítica residual após cada reuso pode ser devido a danos mecânicos, inibição do produto final e desativação do biocatalisador durante ao ensaio de reciclo ou lavagem contínua com solvente.[314] A escolha de métodos adequados de recuperação e purificação da enzima ou do material após cada ciclo de reação é essencial para remover impurezas, resíduos ou produtos indesejados que possam estar presentes na reação, afetando a eficiência e a estabilidade do sistema a cada etapa.[315] Como já foi observado em outros trabalhos, a lavagem com o solvente, após cada ciclo de reação, demonstrou efeito positivo na

estabilidade da enzima, sendo necessário para recuperar a atividade enzimática inicial devido ao acúmulo de resíduos da reação (ácido e água) no sítio ativo da enzima.[316,317,318]

O reuso de enzimas é uma prática sustentável, que permite minimizar a quantidade de novas enzimas em cada ciclo, diminuindo os custos e o impacto ambiental.[308,319] Ao ser utilizada por vários processos repetidamente, aumenta-se a eficiência do processo, maximizando a conversão dos substratos e a produção de produtos desejados.[182,308,319] Se um material é estável o suficiente para suportar múltiplos ciclos de uso sem perda de atividade enzimática, então ele pode ser considerado apropriado para reutilização. Além disso, a estabilidade de um catalisador está relacionada a fatores como composição química, estrutura física e propriedades intrínsecas do material.

Cada sistema de reação tem seus requisitos específicos para a reutilização de catalisadores de forma eficiente. Neste trabalho, os resultados mostraram uma estabilidade do catalisador SiGCalB-10, que apresentou atividade após 9 ciclos de 3 h, em reações que aconteceram ao longo de 40 dias. Como o catalisador manteve sua atividade enzimática e eficiência em cada reuso, com altas taxas de conversões durante esse período, é um bom indicativo de sua estabilidade, já que o catalisador esteve armazenado em geladeira, a fim de evitar condições desfavoráveis como altas temperaturas e exposição a agentes oxidantes.

5.3.7 Conclusão

Neste trabalho, um xerogel mesoporoso de sílica foi obtido pelo método sol-gel e organofuncionalizado com 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS). Este material, denominado Si-GPTMS, apresentou características texturais adequadas para ser empregado como suporte para a imobilização de enzimas lipase. O maior rendimento e eficiência de imobilização foram obtidos com a menor carga de enzima, SiGCalB-10. Os ensaios de estabilidade térmica mostraram que a enzima livre perde sua atividade em temperatura de 60 ºC, enquanto que a enzima imobilizada apresenta atividade mesmo após 1 h de reação em temperatura de 80 ºC. A enzima imobilizada (biocatalisador heterogêneo) apresentou altas taxas de conversão para a reação de síntese do éster flavorizante butirato de butila e os ensaios de reuso mostraram a manutenção de aproximadamente 90% da atividade inicial. Estes resultados sugerem que o material pode ser promissor para aplicações industriais.

6. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, a versatilidade do método sol-gel foi utilizada para desenvolver diferentes configurações de materiais que foram aplicados em três diferentes sistemas: i) Filmes nanoestruturados antibacterianos; ii) Sensores eletroquímicos para detecção de compostos fenólicos; iii) Biocatálise heterogênea.

i) Filmes nanoestruturados antibacterianos: Neste trabalho, observou-se que a adição de APTMS na dispersão de nanopartículas de ouro, estabilizadas por quitosana, produziu uma diminuição na viscosidade dinâmica no sistema. Os filmes contendo nanopartículas de ouro e APTMS (AuNP-ch-APTMS), obtidos pela técnica *drop-casting*, mostraram através dos espectros de absorção no UV-Vis um pequeno deslocamento para comprimentos de onda maior, que foi explicado devido ao maior tamanho das nanopartículas de ouro, conforme observado nas imagens de MET. Nas imagens de MEV, perfilometria e AFM, foram observados filmes homogêneos, sem rachaduras ou fissuras. Os filmes contendo quitosana, APTMS e nanopartículas de ouro exibiram alto desempenho antimicrobiano contra a bactéria *S.* Typhimurium.

ii) Sensores eletroquímicos para detecção de compostos fenólicos: Neste trabalho foi sintetizado um xerogel magnético, mesoporoso, de sílica/nióbia, contendo partículas esféricas de magnetita (MP@SiNb). Os difratogramas de raios X mostraram que a porção de sílica-nióbia não perturbou a estrutura cristalina da magnetita e que mesmo após modificações do sistema o material permanece magnético. As imagens de MEV mostraram que o xerogel MP@SiNb foi obtido com sucesso e que as partículas de magnetita estão embutidas nele. As medidas eletroquímicas mostraram que o eletrodo de pasta de carbono modificado com o xerogel magnético (MP@SiNb-CPE) foi sensível e seletivo para determinação de *p*-nitrofenol em amostras sintéticas e amostras reais de água.

iii) Biocatálise heterogênea: Neste trabalho foi sintetizado um xerogel mesoporoso de sílica, o qual foi organofuncionalizado com GPTMS. Este material foi empregado como suporte para a imobilização de enzimas lipase. A enzima CalB quando imobilizada neste suporte mostrou os melhores resultados. Este biocatalisador heterogêneo mostrou melhor estabilidade térmica em comparação à enzima livre. Também apresentou alta conversão na síntese do éster butirato de butila, além da possibilidade de reutilização após diversos ciclos.

REFERÊNCIAS

1. Pradhan, K. K., Chakraverty, S. In *Nano Scaled Structural Problems: Static and Dynamic Behaviors*; Chakraverty, S. (Edt.); AIP Publishing: New York, 2021, p. 1-1.
2. Baig, N., Kammakakam, I., Falath, W.; Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater. Adv.*, 2021, 2, 1821.
3. Harish, V., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A.B., Swaroop, S., Bechelany, M., Barhoum, A.; Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: Bioimaging, Biosensing, Drug Delivery, Tissue Engineering, Antimicrobial, and Agro-Food Applications. *Nanomaterials*, 2022, 12, 457.
4. das Neves, M.d.S., Scandorieiro, S., Pereira, G.N., Ribeiro, J.M., Seabra, A.B., Dias, A.P., Yamashita, F., Martinez, C.B.d.R., Kobayashi, R.K.T., Nakazato, G.; Antibacterial Activity of Biodegradable Films Incorporated with Biologically-Synthesized Silver Nanoparticles and the Evaluation of Their Migration to Chicken Meat. *Antibiotics*, 2023, 12, 178.
5. Uniyal, S., Choudhary, K., Sachdev, S., Kumar, S.; Nano-bio fusion: Advancing biomedical applications and biosensing with functional nanomaterials. *Opt. Laser Technology*, 2024, 168, 109938.
6. Das, G., Patra, J.K.; Evaluation of Antibacterial Mechanism of Action, Tyrosinase Inhibition, and Photocatalytic Degradation Potential of Sericin-Based Gold Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24, 9477.
7. Hashem, A.H., Shehabeldine, A.M., Ali, O.M., Salem, S.S.; Synthesis of Chitosan-Based Gold Nanoparticles: Antimicrobial and Wound-Healing Activities. *Polymers*, 2022, 14, 2293.
8. Alterary, S.S., Amina, M., El-Tohamy, M.F.; Biogenic sunflower oil-chitosan decorated fly ash nanocomposite film using white shrimp shell waste: Antibacterial and immunomodulatory potential. *PLoS One*, 2023, 18, 4, e0282742.
9. Virgili, A.H., Luza, L., Fernandes, J.A., Costa, T.M.H., de Menezes, E.W., Benvenutti, E.V.; Self supported gold/chitosan nanocatalyst for chemoselective hydrogenation in π-conjugated C=C-C=O system. *Catal. Commun.*, 2018, 116, 32.
10. Mekuye, B., Abera, B.; Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select*, 2023, 4, 486.
11. Fathil, M.A.M., Taufeq, F.Y.F., Abdalla, S.S.I., Katas, H.; Roles of chitosan in synthesis, antibacterial and anti-biofilm properties of bionano silver and gold. *RSC Adv.*, 2022, 12, 19297.
12. Aranaz, I., Alcántara, A.R., Civera, M.C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A.H., Acosta, N.; Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 2021, 13, 3256.
13. Solano-Umaña, V., Vega-Baudrit, J.R.; Micro, Meso and Macro Porous Materials on Medicine. J. *Biomater. Nanobiotechnol.,* 2015, 6, 247.
14. Guerritore, M., Olivieri, F., Avolio, R., Castaldo, R., Cocca, M., Errico, M.E., Marino Lavorgna, Silvestri, B., Ambrogi, V., Gentile, G.; Hierarchical micro-to-macroporous silica nanoparticles obtained by their grafting with hyper-crosslinked resin. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2022, 335, 111864.
15. Deshmukh, K., Kovářík, T., Křenek, T., Docheva, D., Stich, T., Pola, J.; Recent advances and future perspectives of sol–gel derived porous bioactive glasses: a review. *RSC Adv.*, 2020, 10, 33782.
16. Baumgartner, A., Planinšek, O.; Application of commercially available mesoporous silica for drug dissolution enhancement in oral drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2021, 167, 106015.
17. Kinnari, P., Mäkilä, E., Heikkilä, T., Salonen, J., Hirvonen, J., Santos, H.A.; Comparison of mesoporous silicon and non-ordered mesoporous silica materials as drug carriers for itraconazole. *Int. J. Pharm.*, 2011, 414, 148.
18. Mahato, S.S., Mahata, D., Panda, S., Mahata, S.; In *Sol-Gel Method*; Singh, J.P., Acharya, S.S., Kumar, S., Dixit, S.K. (Edts.); IntechOpen, 2023.
19. Izadi, R., Mahinroosta, M., Mohammadzadeh, K., Ashrafizadeh, S.N.; An inclusive review on inorganic gels: classifications, synthesis methods and applications. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2023, 20, 1757.
20. Azadani, R.N., Sabbagh, M., Salehi, H., Cheshmi, A., Raza, A., Kumari, B., Erabi, G.; Sol-gel: Uncomplicated, routine, and affordable synthesis procedure for utilization of composites in drug delivery: Review. *J. Compos. Compd.*, 2021, 3, 57.
21. Kariper, I.A.; Impact of Organic Acids on the Hardness of Silica Xerogels. *Silicon*, 2019, 11, 1159.
22. Maseko, N.N., Enke, D., Iwarere, S.A., Oluwatobi Samuel Oluwafemi, O.S.; Pocock, J.; Synthesis of Low Density and High Purity Silica Xerogels from South African Sugarcane Leaves without the Usage of a Surfactant. *Sustainability*, 2023, 15, 4626.
23. Fiorati, A., Caridi, F., Paladini, G.; Editorial on the Special Issue: "Advances in Xerogels: From Design to Applications". *Gels*, 2023, 9, 446.
24. Esposito, S.; "Traditional" sol-gel chemistry as a powerful tool for the preparation of supported metal and metal oxide catalysts. *Materials*, 2019, 12, 668.
25. Akti, F., Balci, S.; Silica xerogel and iron doped silica xerogel synthesis in presence of drying control chemical aditives. *Mater. Chem. Phys.*, 2023, 297, 127347.

26. Guastaferro, M., Reverchon, E., Baldino, L.; Polysaccharide-Based Aerogel Production for Biomedical Applications: A Comparative Review. *Materials* 2021, 14, 1631.
27. Benvenuti, J., Capeletti, L.B., Gutterres, M., dos Santos, J.H.Z.; Hybrid sol–gel silica adsorbent materials synthesized by molecular imprinting for tannin removal. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2018, 85, 446.
28. Zdarta, J., Jesionowski, T.; Silica and Silica-Based Materials for Biotechnology, Polymer Composites, and Environmental Protection. *Materials*, 2022, 15, 7703.
29. Blin, J.-L., Riachy, P., Carteret, C., Lebeau, B.; Thermal and Hydrothermal Stability of Hierarchical Porous Silica Materials. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2019, 2019, 27, 3194.
30. Videira-Quintela, D., Martin, O., Montalvo, G.; Emerging opportunities of silica-based materials within the food industry. *Microchem. J.*, 2021, 167, 106318.
31. Çok, S.S., Koç, F., Balkan, F., Gizli, N.; Exploring a new preparation pathway for the synthesis of silica based xerogels as crack-free monoliths. *Ceram. Int.*, 2019, 45, 1616.
32. Gkana, E.N., Doulgeraki, A.I., Chorianopoulos, N.G., Nychas, G.-J.E.; Anti-adhesion and Anti-biofilm Potential of Organosilane Nanoparticles against Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, 1295.
33. Crucho, C.I.C.; Synthesis of Organoalkoxysilanes: Versatile Organic–Inorganic Building Blocks. *Compounds*, 2023, 3, 280.
34. Abel, M.L. In *Handbook of Adhesion Technology*; da Silva, L., Öchsner, A., Adams, R. (Edts.); Springer: Cham, 2017, 1.
35. Dawood, M., In Rehabilitation of Metallic Civil Infrastructure Using Fiber Reinforced Polymer (FRP) Composites; Karbhari, V.M. (Edt.); Woodhead Publishing: 2014, 96.
36. Shapagin, A.V., Gladkikh, N.A., Poteryaev, A.A., Stepanenko, V.Y., Nikulova, U.V., Khasbiullin, R.R.; Epoxyorganosilane Finishing Compositions for Fibrous Fillers of Thermosetting and Thermoplastic Binders. *Polymers*, 2022, 14, 59.
37. Liu, H., Zhou, T., Sun, X., Zong, G.; Organosilane-modified Wood Materials: A Review of Research and Applications. *BioResources*, 2023, 18, 3, 6561.
38. Bandl, C., Krempl, N., Berger-Weber, G., Kern, W., Friesenbichler, W.; Application of organosilane coatings for improved anti-adhesive properties enabling facilitated demolding in polymer processing. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2021, 138, e50714.
39. Guimarães, G.M.F., Bronze-Uhle, E.S, Lisboa-Filho, P.N., Fugolin, A.P.P, Borges, A.F.S., Gonzaga, C.C., Pfeifer, C.S., Furuse, A.Y.; Effect of the addition of functionalized TiO_2 nanotubes and nanoparticles on properties of experimental resin composites. *Dent. Mater.*, 2020, 36, 1544.
40. Silveira, M.L.D.C., Silva, I.M.B., Magdalena, A.G.; Synthesis and characterization of Fe_3O_4-NH_2 and Fe_3O_4-NH_2-chitosan nanoparticles. *Cerâmica*, 2021, 67, 295.
41. Pramanik, G., Mestry, S., Mhaske, S.T.; Development of silane/acrylate-based hybrid polymer coating through sol-gel technique for anti-corrosive application. *Iran. Polym. J.*, 2023, 32, 969.
42. Domaros, A., Zarzeczańska, D., Ossowski, T., Wcisło, A.; Controlled Silanization of Transparent Conductive Oxides as a Precursor of Molecular Recognition Systems. *Materials,* 2023, *16*, 309.
43. Luechinger, M., Prins, R., Pirngruber, G.D.; Functionalization of silica surfaces with mixtures of 3-aminopropyl and methyl groups. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2005, 85, 111.
44. Soe, H.M., Kumar, R., Matsuda, A., Mariatti, M.; Surface-modificationn of silver nanoparticle-based polydimethylsiloxane composite for fabrication of strain sensor. *Mater. Today Commun.*, 2023, 36, 106486.
45. Ko, H., Rhee, S.W.; Light-reflective properties of spherical TiO_2 particles coated with (3-aminopropyl)trimethoxysilane, chitosan, SiO_2, and SnO_2. *Korean J. Chem. Eng.*, 2023, 4, 1228.
46. Githens, A., Daly, S.; Patterning corrosion-susceptible metallic alloys for digital image correlation in a scanning electron microscope. *Strain*, 2017, 53.
47. Balkrishna, A., Rohela, A., Kumar, A., Mishrs, S., Arya, V., Kala, V., Thakur, N., Thakur, N., Kumari, A., Khan, N.; Elucidating the Role of Plant Extracts Mediated Gold Nanoparticles as Smart Antimicrobials: Two-Way Attack. *J. Nanomater.*, 2023, 4085090.
48. Hepperle, P., Baek, W.Y., Nettelbeck, H., Rabus, H.; Deposition of Gold Nanoparticles on a Self-Supporting Carbon Foil. *Part. Part. Syst. Charact.*, 2022, 39, 2200136.
49. Singpanna, K., Pornpitchanarong, C., Patrojanasophon, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Li, S.K., Opanasopit, P.; Chitosan capped-gold nanoparticles as skin penetration enhancer for small molecules: A study in porcine skin. *Int. J. Pharm.*, 2023, 640, 123034.
50. Huq, M.A., Ashrafudoulla, M., Parvez, M.A.K., Balusamy, S.R., Rahman, M.M., Kim, J.H., Akter, S.; Chitosan-Coated Polymeric Silver and Gold Nanoparticles: Biosynthesis, Characterization and Potential Antibacterial Applications: A Review. *Polymers*, 2022, 14, 5302.
51. Skłodowski, K., Chmielewska-Deptuła, S.J., Piktel, E., Wolak, P., Wollny, T., Bucki, R.; Metallic Nanosystems in the Development of Antimicrobial Strategies with High Antimicrobial Activity and High Biocompatibility. *Int. J. Mol. Sci.,* 2023, *24*, 2104.

52. Sahu, A.K., Das, A., Ghosh, A., Raj, S.; Understanding blue shift of the longitudinal surface plasmon resonance during growth of gold nanorods. *Nano Express*, 2021, 2, 010009.
53. Badi, S.J., Al-Shakarchi, E.K., Ahmed, S.J.; The Effect of Gold Salt Concentration in the Production of Gold Nanospheres. *J. Appl. Math. Phys.*, 2020, 8, 1487.
54. Rabiee, N., Ahmadi, S., Akhavan, O., Luque, R., Silver and Gold Nanoparticles for Antimicrobial Purposes against Multi-Drug Resistance Bacteria. *Materials*, 2022, 15, 1799.
55. Ajdari, N., Vyas, C., Bogan, S.L., Lwaleed, B.A., Cousins, B.G.; Gold nanoparticle interaction in human blood: a model evaluation. *Nanomedicine: NBM*, 2017, 13, 1531.
56. Phan, T.T.V., Phan, D.T., Cao, X.T., Huynh, T.-C., Oh, J.; Roles of Chitosan in Green Synthesis of Metal Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 2021, 11, 273.
57. Hassan, H., Sharma, P., Hasan, M.R., Singh, S., Thakur, D., Narang, J.; Gold nanomaterials – The golden approach from synthesis to applications. *Mater. Sci. Energy Technol.*, 2022, 5, 375.
58. Timoszyk, A., Grochowalska, R.; Mechanism and Antibacterial Activity of Gold Nanoparticles (AuNPs) Functionalized with Natural Compounds from Plants. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 2599.
59. Fuster, M.G., Montalbán, M.G., Carissimi, G., Lima, B., Feresin, G.E., Cano, M., Giner-Casares, J.J., López-Cascales, J.J., Enriz, R.D., Víllora, G.; Antibacterial Effect of Chitosan–Gold Nanoparticles and Computational Modeling of the Interaction between Chitosan and a Lipid Bilayer Model. *Nanomaterials*, 2020, 10, 2340.
60. Aljarrah, M.T., Alboull, A.M., Alharahsheh, M.S., Ashraf, A., Khandakar, A.; Parametric Study of Gold Nanoparticles Synthesis under Micro-Continuous Flow Conditions. *Molecules*, 2022, 27, 8651.
61. Amina, S.J., Guo, B.; A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *Int. J. Nanomedicine*, 2020, 15, 9823.
62. Mikhailova, E.O.; Gold Nanoparticles: Biosynthesis and Potential of Biomedical Application. *Funct. Biomater.*, 2021, 12, 70.
63. Ielo, I., Rando, G., Giacobello, F., Sfameni, S., Castellano, A., Galletta, M., Drommi, D., Rosace,G., Plutino, M.R.; Synthesis, Chemical–Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review. *Molecules*, 2021, 26, 5823.
64. Jacob, J., Grelier, S., Grau, M., Chorein, B.; Effect of dispersing agents on the stability of recycled paints. *Coatings*, 2022, 12, 1722.
65. Torres-Ferrer, L.R., López-Romero, J.M., Mendez-Nonell, J., Rivas-Arreola, M.J., Moreno-Ríos, M., Ávila-Dávila, E.O., Prokhorov, E., Kovalenko, Y., Zárate-Triviño, D.G., Revilla-Vazquez, J.R., *et al*. Tuning $HAuCl_4$/Sodium Citrate Stoichiometry to Fabricate Chitosan-Au Nanocomposites. *Polymers*, 2022, 14, 788.
66. Mathew, G. M., Ulaeto, S. B., Reshmy, R., Sukumaran, R. K., Binod, P., Pandey, A., Sindhu, R.; In *Polysaccharides: Properties and applications*; Inamuddin, Ahamed, M.I., Boddula, R., Altalhi, T. (Edts.); Scrivener Publishing, 2021, 135.
67. Murugesan, S., Scheibel, T.; Chitosan-based nanocomposites for medical applications. *J. Polym. Sci.*, 2021, 59, 1610.
68. Harutyunyan, L.R., Lasareva, E.V.; Chitosan and its Derivatives: A Step Towards Green Chemistry. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 2023, 13, 6, 578.
69. Frigaard, J., Jensen, J.L., Galtung, H.K., Hiorth, M.; The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles. *Front. Pharmacol.*, 2022, 13, 880377.
70. Chang, X.X., Mubarak, N.M., Mazari, S.A., Jatoi, A.S., Ahmad, A., Khalid, M., Walvekar, R., Abdullah, E.C., Karri, R.R., Siddiqui, M.T.H, Nizamuddin, S.; A review on the properties and applications of chitosan, cellulose and deep eutetic solvent in green chemistry. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2021, 104, 362.
71. Guarnieri, A., Triunfo, M., Scieuzo, C., Ianniciello, D., Tafi, E., Hahn, T., Zibek, S., Salvia, R., De Bonis, A., Falabella, P.; Antimicrobial Properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Sci. Rep.*, 2022, 12, 8084.
72. Kumari, S., Kishor, R.; In *Handbook of Chitin and Chitosan*; Gopi, S., Thomas, S., Pius, A. (Edts.); Elsevier, 2020.
73. Boominathan, T., Sivaramakrishna, A.; Recent Advances in the Synthesis, Properties, and Applications of Modified Chitosan Derivatives: Challenges and Opportunities. *Top. Curr. Chem.*, 2021, 379, 19.
74. Bounegru, A.V., Bounegru, I.; Chitosan-Based Electrochemical Sensors for Pharmaceuticals and Clinical Applications. *Polymers*, 2023, 15, 3539.
75. Wu, S., Wu, S., Zhang, X., Feng, T., Wu, L.; Chitosan-Based Hydrogels for Bioelectronic Sensing: Recent Advances and Applications in Biomedicine and Food Safety. *Biosensors*, 2023, 13, 93.
76. Franco, D., Calabrese, G., Guglielmino, S.P.P., Conoci, S.; Metal-Based Nanoparticles: Antibacterial Mechanisms and Biomedical Application. *Microorganisms*, 2022, 10, 1778.
77. Godoy-Gallardo, M., Eckhard, U., Delgado, L.M., Puente, Y.J.D.R., Hoyos-Nogués, M., Gil, F.J., Perez, R.A.; Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioact. Mater.*, 2021, 6, 4470.

78. Elsabee, M.Z., Abdou, E.S.; Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater. Sci. Eng. C*, 2013, 33, 1819.
79. Slavin, Y.N., Asnis, J., Häfeli, U.O., Bach, H.; Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnol.*, 2017, 15, 65.
80. Wang, H., Qian, J., Ding, F.; Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. *J. Agric. Food Chem.*, 2018, 66, 395.
81. Pavinatto, A., Mattos, A.V.A., Malpass, A.C.G., Okura, M.H., Balogh, D.T., Sanfelice, R.C.; Coating with chitosan-based edible films for mechanical/biological protection of strawberries. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 151, 1004.
82. Susanti, D., Haris, M.S., Taher, M., Khotib, J.; Natural Products-Based Metallic Nanoparticles as Antimicrobial Agents. *Front. Pharmacol.*, 2022, 13, 895616.
83. Nasiri, K., Masoumi, S.M., Amini, S., Goudarzi, M., Tafreshi, S.M., Bagheri, A., Yasamineh, S., Alwan, M., Arellano, M.T.C., Gholizadeh, O.; Recent advances in metal nanoparticles to treat periodontitis. *J. Nanobiotechnol.*, 2023, 21, 283.
84. Sikorski, D., Bauer, M., Fraczyk, J., Draczynski, Z.; Antibacterial and Antifungal Properties of Modified Chitosan Nonwovens. Polymers 2022, 14, 1690.
85. Fernandes, S.C.M., Sadocco, P., Alonso-Varona, A., Palomares, T., Eceiza, A., Silvestre, A.J.D., Mondragon, I., Freire, C.S.R.; Bioinspired Antimicrobial and Biocompatible Bacterial Cellulose Membranes Obtained by Surface Functionalization with Aminoalkyl Groups. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, 5, 3290.
86. Darpentigny, C., Sillard, C., Menneteau, M., Martinez, E., Marcoux, P.R., Bras, J., Jean, B., Nonglaton, G.; Antibacterial cellulose nanopapers via aminosilane grafting in supercritical carbon dioxide. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2020, 3, 12, 8402.
87. Hongrattanavichit, I., Aht-Ong, D.; Antibacterial and water-repellent cotton fabric coated with organosilane-modified cellulose nanofibers. *Ind. Crops Prod.*, 2021, 171, 113858.
88. Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Chen, C., Ma, L., Li, S., Che, Z., in, H.; Chitosan-Based Coating with Antimicrobial Agents: Preparation, Property, Mechanism, and Application Effectiveness on Fruits and Vegetables. *Int. J. Polym. Sci.*, 2016, 4851730.
89. Bai, Q., Zheng, C., Chen, W., Sun, N., Gao, Q., Liu, J., Hu, F., Pimpi, S., Yan, X., Zhang, Y., Lu, T.; Current challenges and future applications of antibacterial nanomaterials and chitosan hydrogel in burn wound healing. *Mater. Adv.*, 2022, 3, 6707.
90. Hochvaldová, L., Večeřová, R., Kolář, M., Prucek, R., Kvítek, L., Lapčík, L., Panáček, A.; Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnol. Rev.*, 2022, 11, 1, 1115.
91. Zuo, C., Scully, A.D., Gao, M.; Drop-Casting Method to Screen Ruddlesden−Popper Perovskite Formulations for Use in Solar Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, 13, 56217.
92. Yunus, Y., Mahadzir, N.A., Mohamed Ansari, M.N., Tg Abd Aziz, T.H., Mohd Afdzaluddin, A., Anwar, H., Wang, M., Ismail, A.G.; Review of the Common Deposition Methods of Thin-Film Pentacene, Its Derivatives, and Their Performance. *Polymers*, 2022, 14, 1112.
93. Qdemat, A., Kentzinger, E., Buitenhuis, J., Rücker, U., Ganeva, M., Brückel, T.; Self assembled monolayer of silica nanoparticles with improved order by drop casting. *RSC Adv.*, 2020, 10, 18339.
94. Eslamian, M., Soltani-Kordshuli, F.; Development of multiple-droplet drop-casting method for the fabrication of coatings and thin solid films. *J. Coat. Technol. Res.*, 2018, 15, 2, 271.
95. Budida, J., Srinivasan, K.; Review of thin film deposition and techniques. *Mater. Today: Proc.*, 2023.
96. Kumar, A.K.S., Zhang, Y., Li, D., Compton, R.G.; A mini-review: How reliable is the drop casting technique?. *Electrochem. Commun.*, 2020, 121, 106867.
97. Mbam, S.O., Nwonu, S.E., Orelaja, O.A., Nwigwe, U.S., Gou, X.-F.; Thin-film coating; historical evolution, conventional deposition technologies, stress-state micro/nano-level measurement/models and prospects projection: a critical review. *Mater. Res. Express*, 2019, 6, 122001.
98. Chaudhari, M.N., Ahirrao, R.B., Bagul, S.D.; Thin film Deposition Methods: A Critical Review. *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol.*, 2021, 9, 5215.
99. Oke, J.A., Jen, T.-C.; Atomic layer deposition and other thin film deposition techniques: from principles to film Properties. *J. Mater. Res. Technol.*, 2022, 21, 2481.
100. Kumar, A., Yadav, S., Pramanik, J., Sivamaruthi, B.S., Jayeoye, T.J., Prajapati, B.G., Chaiyasut, C.; Chitosan-Based Composites: Development and Perspective in Food Preservation and Biomedical Applications. *Polymers*, 2023, 15, 3150.
101. Muñoz-Tebar, N., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M.; Chitosan Edible Films and Coatings with Added Bioactive Compounds: Antibacterial and Antioxidant Properties and Their Application to Food Products: A Review. *Polymers*, 2023, 15, 396.
102. Zhang, X., Ismail, B.B., Cheng, H., Jin, T.Z., Qian, M., Arabi, S.A., Liu, D., Guo, M.; Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation - A review of advances and applications. *Carbohydr. Polym.*, 2021, 273, 118616.

103. Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T.J., Phillips, R., Hsieh, J.; Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 2015, 47, 264.
104. Teklemariam, A.D., Al-Hindi, R.R., Albiheyri, R.S., Alharbi, M.G., Alghamdi, M.A., Filimban, A.A.R., Al Mutiri, A.S., Al-Alyani, A.M., Alseghayer, M.S., Almaneea, A.M.; et al. Human Salmonellosis: A Continuous Global Threat in the Farm-to-Fork Food Safety Continuum. *Foods*, 2023, 12,1756.
105. Das, P.K., Mandal, A., Rahman, M.M., Sarkar, S.L., Jahid, I.K, Hossain, M.A., Alam, A.S.M.R.U., Roy, P.C.; *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium and Enteritidis Isolated from Raw Shrimp in Bangladesh: An Investigation Based on Molecular Characteristics, Survival, Virulence, Antibiotic Resistance, and Biofilm Formation Attributes. *J. Food Qual.*, 2022, 3420364.
106. Tsai, K., Nonnenmann, M.W., Rohlman, D., Baler, K.K.; Development of Shortened Enrichment Methods for Detection of *Salmonella* Typhimurium Spiked in Milk. ACS Food Sci. Technol., 2023, 3, 831.
107. Chatterjee, R., Chowdhury, A.R., Mukherjee, D., Chakravortty, D.; From *Eberthella typhi* to *Salmonella* Typhi: The Fascinating Journey of the Virulence and Pathogenicity of *Salmonella* Typhi. *ACS Omega*, 2023, 8, 25674.
108. Peruzy, M.F., Proroga, Y.T.R., Capuano, F., Mancusi, A., Montone, A.M.I., Cristiano, D., Balestrieri, A., Murru, N.; Occurrence and distribution of *Salmonella* serovars in carcasses and foods in southern Italy: Eleven-year monitoring (2011–2021). *Front. Microbiol.*, 2022, 13, 1005035.
109. Galán, J.E.; *Salmonella* Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, 19, 11, 716.
110. Fulgione, A., Cimafonte, M., Della Ventura, B., Iannaccone, M., Ambrosino, C., Capuano, F., Proroga, Y.T.R., Velotta, R., Capparelli, R.; QCM-based immunosensor for rapid detection of *Salmonella* Typhimurium in food. *Sci. Rep.*, 2018, 8, 16137.
111. Nie, X., Deng, P., Wang, H., Tang, Y.; An Electrochemical Sensor Based on a Nitrogen-Doped Carbon Material and PEI Composites for Sensitive Detection of 4-Nitrophenol. *Nanomaterials*, 2022, 12, 86.
112. Hashim, H.S., Fen, Y.W., Omar, N.A.S., Fauzi, N.I.M.; Sensing Methods for Hazardous Phenolic Compounds Based on Graphene and Conducting Polymers-Based Materials. *Chemosensors*, 2021, 9, 291.
113. Prabakaran, E., Pillay, K.; Electrochemical Detection of 4-Nitrophenol by Using Graphene Based Nanocomposite Modified Glassy Carbon Electrodes: A Mini Review. *Nanoarchitectonics*, 2021, 2, 61.
114. Ramalingam, M., Ponnusamy, V.K., Sangilimuthu, S.N.; Electrochemical determination of 4-nitrophenol in environmental water samples using porous graphitic carbon nitride-coated screen-printed electrode. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2020, 27, 17481.
115. Sajjan, V.A., Aralekallu, S., Nemakal, M., Palanna, M., Prabhu, C.P.K., Sannegowda, L.K.; Nanomolar detection of 4-nitrophenol using Schiff-base phthalocyanine. *Microchem. J.*, 2021, 164, 105980.
116. Monisha, Kant, T., Tikeshwari, Shrivas, K., Kumar, A., Dewangan, K.; Graphene-silver nano-ink for inkjet printing of paper electrode for electrochemical sensing of 4-nitrophenol. *Mater. Chem. Phys.*, 2023, 307, 128161.
117. Faisal, M., Alam, M.M., Ahmed, J., Asiri, A.M., Jalalah, M., Alruwais, R.S., Rahman, M.M., Harraz, F.A.; Sensitive Electrochemical Detection of 4-Nitrophenol with PEDOT:PSS Modified Pt NPs-Embedded PPy-CB@ZnO Nanocomposites. *Biosensors*, 2022, 12, 990.
118. Mitra, C.K., Prasad, M.N.V.; In *Electrokinetic Remediation for Environmental Security and Sustainability*; Ribeiro, A.B., Prasad, M.N.V (Edts.); John Wiley & Sons, 2021, 35.
119. Clarke, W., D'Orazio, P.; In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*; Clarke, W., Marzinke, M.A. (Edts.); Academic Press, 2020, 159.
120. Fu, L., Yu, A., Lai, G.; Conductive Hydrogel-Based Electrochemical Sensor: A Soft Platform for Capturing Analyte. *Chemosensors*, 2021, 9, 282.
121. Baranwal, J., Barse, B., Gatto, G., Broncova, G., Kumar, A.; Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. *Chemosensors*, 2022, 10, 363.
122. Namuduri, S., Narayanan, B.N., Davuluru, V.S.P., Burton, L., Bhansali, S.; Review - Deep Learning Methods for Sensor Based Predictive Maintenance and Future Perspectives for Electrochemical Sensors. *J. Electrochem. Soc.*, 2020, 167, 037552.
123. Periasamy, V., Elumalai, P.N.N., Talebi, SS., Subramaniam, R.T., Kasi, R., Iwamoto, M., Kumar, G.G.; Novel same-metal three electrode system for cyclic voltammetry studies. *RSC Adv.*, 2023, 13, 5744.
124. Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T., Dempsey, J.L.; A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.*, 2018, 95, 197.
125. Umapathi, R., Ghoreishian, S.M., Sonwal, S., Rani, G.M., Huh, Y.S.; Portable electrochemical sensing methodologies for on-site detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Coord. Chem. Rev.*, 2022, 453, 214305.
126. Motshakeri, M., Sharma, M., Phillips, A.R.J., Kilmartin, P.A.; Electrochemical Methods for the Analysis of Milk. *J. Agric. Food Chem.*, 2022, 70, 2427.

127. Saha, C., Bhushan, M., Singh, L.R.; Pesticide sensing using electrochemical techniques: a comprehensive review. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2023, 20, 243.
128. Du, H., Xie, Y., Wang, J.; Nanomaterial-sensors for herbicides detection using electrochemical techniques and prospect applications. *Trends Anal. Chem.*, 2021, 135, 116178.
129. Walcarius, A.; Mesoporous Materials-Based Electrochemical Sensors. *Electroanalysis*, 2015, 27, 1303.
130. Zhang, Y., Zhu, L., Wu, G., Wang, X., Jin, Q., Qi, X., Zhang, H.; Design of amino-functionalized hollow mesoporous silica cube for enzyme immobilization and its application in synthesis of phosphatidylserine. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2021, 202, 111668.
131. Costantini, A., Califano, V.; Lipase Immobilization in Mesoporous Silica Nanoparticles for Biofuel Production. *Catalysts*, 2021, 11, 629.
132. Michalkiewicz, S., Skorupa, A., Jakubczyk; Carbon Materials in Electroanalysis of Preservatives: A Review. *Materials*, 2021, 14, 7630.
133. Vytřas, K., Švancara, I., Metelka, R.; Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2009, 74, 1021.
134. Apetrei, C., Apetrei, I.M., de Saja, J.A., Rodriguez-Mendez, M.L.; Carbon Paste Electrodes Made from Different Carbonaceous Materials: Application in the Study of Antioxidants. *Sensors*, 2011, 11, 1328.
135. Fares, N.V., Medhat, P.M., El Maraghy, C.M., Okeil, S., Ayad, M.F.; Influence of Nitrogen-Doped Carbon Dot and Silver Nanoparticle Modified Carbon Paste Electrodes on the Potentiometric Determination of Tobramycin Sulfate: A Comparative Study. *Chemosensors*, 2021, 9, 52.
136. Kalambate, P.K., Gadhari, N.S., Rao, Z., Navale, S.T., Shen, Y., Patil, V.R., Huang, Y.; Recent advances in MXene-based electrochemical sensors and biosensors. *Trends Anal. Chem.*, 2019, 120, 115643.
137. Ashrafi, A.M., Richtera, L.; Preparation and Characterization of Carbon Paste Electrode Bulk-Modified with Multiwalled Carbon Nanotubes and Its Application in a Sensitive Assay of Antihyperlipidemic Simvastatin in Biological Samples. *Molecules*, 2019, 24, 2215.
138. Walcarius, A.; Mesoporous materials and electrochemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 4098.
139. Walcarius, A.; Electroanalysis with pure, chemically modified, and sol-gel-derived silica-based materials. *Electroanalysis*, 2001, 13, 701.
140. Caldas, E.M., de Menezes, E.W., Pizzolato, T.M., Dias, S.L.P., Costa, T.M.H., Arenas, L.T., Benvenutti, E.V.; Ionic silsesquioxane film immobilized on silica applied in the development of carbon paste electrode for determination of methyl parathion. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2014, 72, 282.
141. Deon, M., Caldas, E.M., Rosa, D.S., de Menezes, E.W., Dias, S.L.P., Pereira, M.B., Costa, T.M.H., Arenas, L.T., Benvenutti, 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.
142. Arenas, L.T., Gay, D.S. F., Moro, C.C., Dias, S.L.P., Azambuja, D.S., Costa, T.M.H., Benvenutti, E.V., Gushikem, Y.; Brilliant yellow dye immobilized on silica and silica/titania based hybrid xerogels containing bridged positively charged 1,4-diazoniabicycle[2.2.2]octane: Preparation, characterization and electrochemical properties study. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2008, 112, 273.
143. de Souza, L.V., Tkachenko, O., Cardoso, B.N., Pizzolato, T.M., Dias, S.L.P., Vasconcellos, M.A.Z., Arenas, L.T., Costa, T.M.H., Moro, C.C., Benvenutti, E.V.; Strategy to control the amount of titania dispersed on SBA-15 surface preserving its porosity, aiming to develop a sensor for electrochemical evaluation of antibiotics.*Microporous Mesoporous Mater.*, 2019, 287, 203.
144. Francisco, M.S.P., Cardoso, W.S., Gushikem, Y.; Carbon paste electrodes of the mixed oxide SiO_2/Nb_2O_5 prepared by the sol–gel method: dissolved dioxygen sensor. *J. Electroanal. Chem.*, 2005, 574, 291.
145. Francisco, M.S.P., Cardoso, W.S., Kubota, L.T., Gushikem, Y.; Electrocatalytic oxidation of phenolic compounds using an electrode modified with Ni(II) porphyrin adsorbed on SiO_2/Nb_2O_5-phosphate synthesized by the sol–gel method. *J. Electroanal. Chem.*, 2007, 602, 29.
146. Rosatto, S.S., Sotomayor, P.T., Kubota, L.T., Gushikem, Y.; SiO_2/Nb_2O_5 sol–gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for phenol detection. *Electrochim. Acta*, 2002, 47, 4451.
147. Silveira, G., de Morais, A., Villis, P.C.M., Maroneze, C.M., Gushikem, Y., Lucho, A.M.S., Pissetti, F.L.; Electrooxidation of nitrite on a silica–cerium mixed oxide carbon paste electrode. *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, 369, 302.
148. Morawski, F.M., Deon, M., Nicolodi, S., de Menezes, E.W., Costa, T.M.H., Dias, S.L.P., Benvenutti, E.V., Arenas, L.T.; Magnetic silica/titania xerogel applied as electrochemical biosensor for catechol and catecholamines. *Electrochim. Acta*, 2018, 264, 319.
149. Hasanzadeh, M., Shadjou, N., Pournaghi-Azar, M.H., Jouyban, A.; Magnetic mesoporous silica: a novel nano-material towards electrochemical sensing. *J. Electroceram.*, 2016, 37, 85.

150. Schneid, A.C.; Quevedo, A.B.; Pereira, M.B.; Araújo, P.F.; Franco, N.; Machado, G.; Moro, C.C.; de Menezes, E.W.; Costa, T.M.H.; Benvenutti, E.V.; New strategy to obtain high surface area anatase nanotube/AuNP photocatalyst. *Nanotechnology*, 2019, 30, 065604.
151. Park, H., Lee, D., Song, T.; High capacity monoclinic Nb_2O_5 and semiconducting NbO_2 composite as high-power anode material for Li-Ion batteries. *J. Power Sources*, 2019, 414, 377.
152. Jayakumar, G., Irudayaraj, A.A., Raj, A.D.; A comprehensive investigation on the properties of nanostructured cerium oxide. *Opt. Quantum Electron.*, 2019, 51, 312.
153. Kershi, R.M., Ali, F.M., Sayed, M.A.; Influence of rare earth ion substitutions on the structural, optical, transport, dielectric, and magnetic properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Adv. Ceram.*, 2018, 7, 218.
154. Laranjo, M.T.; Morawski, F.M.; Dias, S.L.P.; Benvenutti, E.V.; Arenas, L.T.; Costa, M.H.; Silica/titania graphite composite modified with chitosan and tyrosinase employed as a sensitive biosensor for phenolic compounds. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2019, 30, 2660.
155. Kreissl, H.T., Li, M.M.J., Peng, Y.-K., Nakagawa, K., Hooper, T.J.N., Hanna, J.V., Shepherd, A., Wu, T.-S., Soo, Y.-L., Tsang, S.C.E.; Structural studies of bulk to nanosize niobium oxides with correlation to their acidity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139, 12670.
156. Zaki, M.I., Hasan, M.A., Al-Sagheer, F.A., Pasupulety, L.; In situ FTIR spectra of pyridine adsorbed on SiO_2-Al_2O_3, TiO_2, ZrO_2 and CeO_2: General considerations for the identification of acid sites on surfaces of finely divided metal oxides. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 2001, 190, 261.
157. Araújo, E.S., Pereira, M.F.G., da Silva, G.M.G., Tavares, G.F., Oliveira, C.Y.B., Faia, P.M.; A Review on the Use of Metal Oxide-Based Nanocomposites for the Remediation of Organics-Contaminated Water via Photocatalysis: Fundamentals, Bibliometric Study and Recent Advances. *Toxics*, 2023, 11, 658.
158. Albarakati, A.J., Matter, I.A.; N-Type Metal Oxide Semiconductor: Materials and Their Environmental Applications. *Biointerface Res. App. Chem.*, 2023, 13, 6, 519.
159. Emeji, I.C., Ama, O.M., Aigbe, U.O., Khoele, K., Osifo, P.O., Ray, S.S.; In Nanostructured Metal-Oxide Electrode Materials for Water Purification; Ama, O., Ray, S. (Edts.); Springer Nature: Switzerland, 2020, 85.
160. Manjunathan, P., Prasanna, V., Shanbhag, G.V.; Exploring tailor-made Brønsted acid sites in mesopores of tin oxide catalyst for β-alkoxy alcohol and amino alcohol syntheses. *Sci. Rep.*, 2021, 11, 15718.
161. Marikutsa, A., Rumyantseva, M., Konstantinova, E.A., Gaskov, A.; The Key Role of Active Sites in the Development of Selective Metal Oxide Sensor Materials. *Sensors*, 2021, 21, 2554.
162. Abdelgaid, M., Mpourmpakis, G.; Structure−Activity Relationships in Lewis Acid−Base Heterogeneous Catalysis. *ACS Catal.*, 2022, 12, 4268.
163. Védrine, J.; Heterogeneous Partial (amm) Oxidation and Oxidative Dehydrogenation Catalysis on Mixed Metal Oxides. *Catalysts*, 2016, 6, 22.
164. Amakawa, K., Wang, Y., Kröhnert, J., Schlögl, R., Trunschke, A.; Acid sites on silica-supported molybdenum oxides probed by ammonia adsorption: Experiment and theory. *Mol. Catal.*, 2019, 478, 110580.
165. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., Kim, W.-S.; Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2015, 16, 023501.
166. Song, Y., Li, Y., Teng, Z., Huang, Y., Chen, X., Wang, Q.; Size-Controlled Synthesis of Carboxyl-Functionalized Magnetite Particles: Effects of Molecular Weight of the Polymer and Aging. *ACS Omega*, 2018, 3, 17904.
167. Shahid, M.K., Choi, M.; Characterization and application of magnetite particles, synthesized by reverse coprecipitation method in open air from mill scale. *J. Magn. Magn. Mater.*, 2020, 495, 16583.
168. Can, M.M., Coşkun, M., Fırat, T.; A comparative study of nanosized iron oxide particles; magnetite (Fe_3O_4), maghemite (γ-Fe_2O_3) and hematite (α-Fe_2O_3), using ferromagnetic resonance. *J. Alloys Compd.*, 2012, 542, 241.
169. Bondarenko, L., Terekhova, V., Kahru, A., Dzhardimalieva, G., Kelbysheva, E., Tropskaya, N., Kydralieva, N.; Sample preparation considerations for surface and crystalline properties and ecotoxicity of bare and silica-coated magnetite nanoparticles. *RSC Adv.*, 2021, 11, 32227.
170. Spoială, A., Ilie, C.-I., Crăciun, L.N., Ficai, D., Ficai, A., Andronescu, E.; Magnetite-Silica Core/Shell Nanostructures: From Surface Functionalization towards Biomedical Applications—A Review. *Appl. Sci.,* 2021, *11*, 11075.
171. Salman, D., Juzsakova, T., Al-Mayyahi, M.A., Ákos, R., Mohsen, S., Ibrahim, R.I., Mohammed, H.D., Abdullah, T.A., Domokos, E., Korim, T.; Synthesis, Surface Modification and Characterization of Magnetic Fe_3O_4@SiO_2 Core-Shell Nanoparticles. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2021, 1773, 012039.
172. Niculescu, A.-G., Chircov, C., Grumezescu, A.M.; Magnetite nanoparticles: Synthesis methods - A comparative review. *Methods*, 2022, 199, 16.
173. Yang, G., Zhao, X., Liao, F., Cheng, Q., Mao, L., Fa, H., Chen, L.; Recent progress and applications of niobium-based nanomaterials and their composites for supercapacitors and hybrid ion capacitors. *Sustain. Energy Fuels*, 2021, 5, 3039.

174. Oliveira, L., Pereira, M., Heitman, A.P., Filho, J., Oliveira, C., Ziolek, M.; Niobium: The Focus on Catalytic Application in the Conversion of Biomass and Biomass Derivatives. *Molecules*, 2023, 28, 1527.
175. Lopes, O.F., de Mendonça, V.R., Silva, F.B.F., Paris, E.C., Ribeiro, C.; Óxidos de nióbio: Uma visão sobre a síntese do Nb_2O_5 e sua aplicação em fotocatálise heterogênea. *Quim. Nova*, 2015, 38, 106.
176. Ücker, C.L., Goetzke, V., Riemke, F.C., Oliveira, M.E., Carreno, N.L.V., Morisso, F.D.P., Teodoro, M.D., Mastelaro, V.R., Moreira, M.L., Raubach, C.W., Cava, S.S.; The photocatalytic performance of Fe inserted in Nb_2O_5 obtained by microwave-assisted hydrothermal synthesis: Factorial design of experiments. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2023, 435, 114294.
177. Asencios, Y.J.O., Machado, V.A.; Photodegradation of Organic Pollutants in Seawater and Hydrogen Production via Methanol Photoreforming with Hydrated Niobium Pentoxide Catalysts. *Sustain. Chem.*, 2022, 3, 172.
178. Su, K., Liu, H., Gao, Z., Fornasiero, PP., Wang, F.; Nb_2O_5-Based Photocatalysts. *Adv. Sci.*, 2021, 8, 2003156.
179. Umpierres, C.S., Prola, L.D.T., Adebayo, M.A., Lima, E.C., dos Reis, G.S., Kunzler, D.D.F., Dotto, G.L., Arenas, L.T., Benvenutti, E.V.; Mesoporous Nb_2O_5/SiO_2 material obtained by sol–gel method and applied as adsorbent of crystal violet dye. *Environ. Technol.*, 2017, 38, 566.
180. Souza, L.V., Virgili, A.H., Teixeira, G.O., Hinrichs, R., Bianchini, D., Costa, T.M.H., Arenas, L.T., Benvenutti, E.V., de Menezes, E.W.; Mesoporous structured silica modified with niobium oxide and cobalt hematoporphyrin applied to the simultaneous electrochemical evaluation of oxalic and uric acids. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2022, 102, 18.
181. Alnoch, R.C., dos Santos, L.A., de Almeida, J.M., Krieger, N., Mateo, C.; Recent Trends in Biomaterials for Immobilization of Lipases for Application in Non-Conventional Media. *Catalysts*, 2020, 10, 697.
182. Bié, J., Sepodes, B., Fernandes, P.C.B., Ribeiro, M.H.L.; Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications. *Processes,* 2022, *10*, 494.
183. Yuan, Y., Shen, J., Salmon, S.; Developing Enzyme Immobilization with Fibrous Membranes: Longevity and Characterization Considerations. *Membranes,* 2023, 13, 532.
184. Patti, A., Sanfilippo, C.; Stereoselective Promiscuous Reactions Catalyzed by Lipases. *J. Mol. Sci.*, 2022, 23, 2675.
185. Homaci, A.A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R.; Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.*, 2013, 6, 185.
186. Sheldon, R.A., Basso, A., Brady, D.; New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. *Chem. Soc. Rev.*, 2021, 50, 5850.
187. Andreescu, S., Njagi, J., Ispas, C.; In *The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology*; Erokhin, V., Ram, M.K., Yavuz, O. (Edts.); Elsevier, 2008, 355.
188. Moosavi, F., Ahrari, F., Ahmadian, G., Mohammadi, M.; Sortase-mediated immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB) on graphene oxide; comparison with chemical approach. *Biotechnol. Rep.*, 2022, 34, e00733.
189. Rodrigues, R.C., Berenguer-Murcia, A., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., Fernandez-Lafuente, R.; Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnol. Adv.*, 2021, 52, 10781.
190. Maghraby, Y.R., El-Shabasy, R.M., Ibrahim, A.H., Azzazy, H.M.E.-S.; Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 2023, 8, 5184.
191. Nazarian, Z., Arab, S.S.; Solvent-dependent activity of *Candida antarctica* lipase B and its correlation with a regioselective mono aza-Michael addition - experimental and molecular dynamics simulation studies. *Heliyon*, 2022, 8, e10336.
192. Bayramoglu, G., Celikbicak, O., Kilic, M., Yakup Aric, M.Y.; Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. *Food Chem.*, 2022, 366, 130699.
193. Yu, D., Zhang, X., Wang, T., Geng, H., Wang, L., Jiang, L., Elfalleh, W.; Immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) on functionalized MCM-41: Stability and catalysis of transesterification of soybean oil and phytosterol. *Food Biosci.*, 2021, 40, 100906.
194. Moguei, M.R.S., Habibi, Z., Shahedi, M., Yousefi, M., Alimoradi, A., Mobini, S., Mohammadi, M.; Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase through isocyanide-based multi component reaction on multi-walled carbon nanotube: application for kinetic resolution of rac-ibuprofen. *Biotechnol. Rep.*, 2022, 35, e00759.
195. Khan, F.I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., Wang, Y.; The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2017, 5, 16.
196. Höck, H., Engel, S., Weingarten, S., Keul, H., Schwaneberg, U., Möller, M., Bocola, M.; Comparison of *Candida antarctica* Lipase B variants for conversion of ε-caprolactone in aqueous medium—Part 2. *Polymers*, 2018, 10, 524.
197. Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A.; The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, 1994, 2, 293.

198. Jang, W.Y., Sohn, J.H., Chang, J.H.; Thermally Stable and Reusable Silica and Nano-Fructosome Encapsulated CalB Enzyme Particles for Rapid Enzymatic Hydrolysis and Acylation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24, 9838.
199. de Souza, M.C.M., dos Santos, K.P., Freire, R.M., Barreto, A.C.H., Fechine, P.B.A., Gonçalves, L.R.B.; Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. *Braz. J. Chem. Eng.*, 2017, 34, 681.
200. Noh, H.J., Lee, S.Y., Jang, Y.-S.; Microbial production of butyl butyrate, a flavor and fragrance compound. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 103, 2079.
201. Mihailović, M., Stojanović, M., Banjanac, K., Carević, M., Prlainović, N., Milosavić, N., Bezbradica, D.; Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite®A109 and its post-immobilization stabilization. *Process Biochem.*, 2014, 49, 637.
202. Chandra, P., Enespa, Singh, R., Arora, P.K.; Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb. Cell Fact.*, 2020, 19, 169.
203. Contesini, F.J., Davanço, M.G., Borin, G.P., Vanegas, K.G., Cirino, J.P.G., de Melo, R.R., Mortensen, U.H., Hildén, K., Campos, D.R., Carvalho, P.O.; Advances in recombinant lipases: production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry. *Catalysts*, 2020, 10, 1032.
204. Decarpigny, C., Ponchel, A., Monflier, E., Bleta, R.; Effect of Functional Group on the Catalytic Activity of Lipase B from *Candida antarctica* Immobilized in a Silica-Reinforced Pluronic F127/α-Cyclodextrin Hydrogel. *Gels*, 2022, 8, 3.
205. Xu, R., Chen, Z., Chen, Y., Wang, X., Zhang, Y., Li, X., Wang, F.; Multiple strategies for high-efficiency expression of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* and production of biodiesel in solvent-free system. *Fuel*, 2023, 333, 126246.
206. Silva, J.M.F., dos Santos, K.P., dos Santos, E.S., Rios, N.S., Gonçalves, L.R.B.; Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on a new hydrophobic support (Streamline phenyl™): Strategies to improve stability and reusability. *Enzyme Microb. Technol.*, 2023, 163, 110166.
207. Qu, P., Li, D., Lazim, R., Xu, R., Xiao, D., Wang, F., Li, X., Zhang, Y.; Improved thermostability of *Thermomyces lanuginosus* lipase by molecular dynamics simulation and in silico mutation prediction and its application in biodiesel production. *Fuel*, 2022, 327, 125039.
208. Wunschik, D.S., Lorenz, A., Ingenbosch, K.N., Gutmann, J.S., Hoffmann-Jacobsen, K.; Activation and Stabilization of Lipase B from *Candida antarctica* by Immobilization on Polymer Brushes with Optimized Surface Structure. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2022, 194, 3384.
209. Reis, C.L.B., de Sousa, E.Y.A., Serpa, J.F., Oliveira, R.C., dos Santos, J.C.S.; Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. *Quim. Nova*, 2019, 42, 7, 768.
210. Sigurdardóttir, S. B., Lehmann, J., Ovtar, S., Grivel, J.-C., Negra, M. D., Kaiser, A., Pinelo, M.; Enzyme immobilization on inorganic surfaces for membrane reactor applications: Mass transfer challenges, enzyme leakage and reuse of materials. *Adv. Synth. Catal.*, 2018, 360, 2578.
211. Sebai, W., Ahmad, S., Belleville, M.-P., Boccheciampe, A., Chaurand, P., Levard, C., Brun N., Galarneau, A., Sanchez-Marcano, J.; Biocatalytic Elimination of Pharmaceutics Found in Water With Hierarchical Silica Monoliths in Continuous Flow. *Front. Chem. Eng.*, 2022, 4, 823877.
212. Kuo, P.-C., Lin, Z.-X., Wu, T.-Y., Hsu, C.-H., Lin H.-P., Wu T.-S.; Effects of morphology and pore size of mesoporous silicas on the efficiency of an immobilized enzyme. *RSC Adv.*, 2021, 11, 10010.
213. Pietricola, G., Dosa, M., Ottone, C., Fino, D., Piumetti, M., Tommasi, T.; Covalent Immobilization of Aldehyde and Alcohol Dehydrogenases on Ordered Mesoporous Silicas. *Waste Biomass Valorization*, 2022, 13, 4043.
214. Carlsson, N., Gustafsson, H., Thörn, C., Olsson, L., Holmberg, K., Akerman, B.; Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014, 205, 339.
215. Hiroyasu, T., Hiroyuki, O., Shusaku, I., Yutaka, A., Yusuke, Y.; Enhanced catalytic stability of acid phosphatase immobilized in the mesospaces of a SiO_2-nanoparticles assembly for catalytic hydrolysis of organophosphates. *Mol. Catal.*, 2021, 510, 111669.
216. Afshari, R., Shaabani, A.; Materials Functionalization with Multicomponent Reactions: State of the Art. *ACS Comb. Sci.*, 2018, 20, 499.
217. Collinson, M.M., Higgins, D.A.; Organosilane Chemical Gradients: Progress, Properties, and Promise. *Langmuir*, 2017, 33, 13719.
218. Lima, E.T.L., Rodrigues, M.V., do Nascimento, L.A.S., Zamian, J.R., da Costa, C.E.F., Pastore, H.O., Filho, G.N.R.; Effect of water on the organofunctionalization of SAPO-5 to form an efficient oleic acid esterification catalyst. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2022, 334, 111774.
219. Souza, K.G.S., Cotting, F., Aoki, I.V., Amado, F.D.R., Capelossi, V.R.; Study of the wettability and the corrosion protection of the hybrid silane (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and (3-glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GPTMS) film on galvannealed steel. *Revista Matéria*, 2020, 25, 2.

220. Innocenzi, P., Figus, C., Kidchob, T., Valentini, M., Alonso, B., Takahashi, M.; Sol-gel reactions of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane in a highly basic aqueous solution. *Dalton Trans.*, 2009, 9146.
221. Vasilescu, C., Paul, C., Marc,S., Hulka, I., Péter, F.; Development of a Tailored Sol-Gel Immobilized Biocatalyst for Sustainable Synthesis of the Food Aroma Ester n-Amyl Caproate in Continuous Solventless System. *Foods*, 2022, 11, 2485.
222. Schönherr, P., Seifert, A., Lungwitz, R., Simon, F., Moszner, N., Burtscher, P., Spange, S.; Modification of solid particles with epoxysilanes and characterization by the Preussmann-test. *Prog. Org. Coat.*, 2012, 75, 335.
223. Galeano-Duque, Y., Poveda-Jaramillo, J.C., Mesa, M.; Considerations about 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane reactivity in function of the complexity of aqueous and plasma gel media. *J. Mol. Struct.*, 2023, 1284, 135334.
224. Sfameni, S., Lawnick, T., Rando, G., Visco, A., Textor, T., Plutino, M.R.; Functional Silane-Based Nanohybrid Materials for the Development of Hydrophobic and Water-Based Stain Resistant Cotton Fabrics Coatings. *Nanomaterials*, 2022,12, 3404.
225. Miao, H., Li, M., Wang, F., Li, J., Lin, Y.-W., Xu, J.; Surface Functionalization of SBA-15 for Immobilization of Myoglobin. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10, 907855.
226. Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., Ćorović, M., Carević, M., Marinković, A., Bezbradica, D.; Epoxy-silanization – tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2016, 91, 2654.
227. Mateo, C., Grazú, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M.; Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, 35, 6.
228. Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J.M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M.; Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nat. Protoc.*, 2007, 2, 5, 1022.
229. Matte, C.R., Bordinhão, C., Poppe, J.K., Benvenutti, E.V., Costa, T.M.H., Rodrigues, R.C., Hertz, P.F., Ayub, M.A.Z.; Physical-Chemical Properties of the Support Immobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2017, 28, 8, 1430.
230. Jia, D.-X., Xu, H.-P., Sun, C.-Y., Peng, C., Li, J.-L., Jin, L.-Q., Cheng, F., Liu, Z.-Q., Xue, Y.-P., Zheng, Y.-G.; Covalent immobilization of recombinant *Citrobacter koseri* transaminase onto epoxy resins for consecutive asymmetric synthesis of L-phosphinothricin. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2020, 43, 1599.
231. Mateo, C., Grazu, V., Guisan, J.M.; In *Immobilization of Enzymes and Cells, Methods in Molecular Biology*; Guisan, J.M. (Edt.); Humana Totowa: NJ, 2013, 1051, 43.
232. Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pessela, B.C.C., Grazu, V., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.; In *Immobilization of Enzymes and Cells, Methods in Molecular Biology*; Guisan, J., Bolivar, J., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J. (Edts.); Humana: New York, 2020, 2100, 109.
233. Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Cortés, E., Garcia, J.L., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M.; One-step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of Poly-His-Tagged Proteins Using Novel Heterofunctional Chelate-Epoxy Supports. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 76, 3, 269.
234. Gonçalves, G.R.F., Gandolfi, O.R.R., Brito, M.J.P., Bonomo, R.C.F., Fontan, R.C.I., Veloso, C.M.; Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. *Process Biochem.*, 2021, 111, 114.
235. Muniandy, M., Lasekan, O., Ghazali, H.M., Rahman, M.B.A.; Lipase - catalyzed formation of pentyl nonanoate using screened immobilized lipase from *Rhizomucor meihei*. *Braz. J. Chem. Eng.*, 2019, 36, 3, 1089.
236. Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, E.M.; Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol. Adv.*, 2013, 31, 1846.
237. Elias, N., Wahab, R.A., Chandren, S., Razak, F.I.A., Jamalis, J.; Effect of operative variables and kinetic study of butyl butyrate synthesis by *Candida rugosa* lipase activated by chitosan-reinforced nanocellulose derived from raw oil palm leaves. *Enzyme Microb. Technol.*, 2019, 130, 109367.
238. Kaur, P., Jana, A.K.; Amino functionalization of magnetic multiwalled carbon nanotubes with flexible hydrophobic spacer for immobilization of Candida rugosa lipase and application in biocatalytic production of fruit flavour esters ethyl butyrate and butyl butyrate. *Appl. Nanosci.*, 2023, 13, 4291.
239. Costa-Silva, T.A., Carvalho, A.K.F., Souza, C.R.F., De Castro, H.F., Bachmann, L., Said, S., Oliveira, W.P.; Immobilized enzyme-driven value enhancement of lignocellulosic-based agricultural byproducts: Application in aroma synthesis. *J. Clean. Prod.*, 2021, 284, 124728.
240. KR, R., Gopi, S., Balakrishnan, P.; In; *Flavors and Fragrances in Food Processing: Preparation and Characterization Methods*; Balakrishnan, P., Gopi,S.; American Chemical Society: Washington, DC, 2022, 1.
241. Sinumvayo, J.P., Zhao, C., Liu, G., Li, Y., Zhang, Y.; One-pot production of butyl butyrate from glucose using a cognate “diamond-shaped” *E. coli* consortium. *Bioresour. Bioprocess.*, 2021, 8, 18.
242. Guo, X., Zhang, H., Feng, J., Yang, L., Luo, K., Fu, H., Wang, J.; De novo biosynthesis of butyl butyrate in engineered *Clostridium tyrobutyricum*. *Metab. Eng.*, 2023, 77, 64.

243. Sinumvayo, J.P., Li, Y., Zhang, Y.; Microbial production of butyl butyrate: from single strain to cognate consortium. *Bioresour. Bioprocess*, 2021, 8, 50.
244. Stolarska, O., Soto, A., Rodríguez, H., Smiglak, M.; Properties modification by eutectic formation in mixtures of ionic liquids. *RSC Adv.*, 2015, 5, 22178.
245. Vilela, M.M., Salvador, S.L., Teixeira, I.G.L., Del Arco, M.C.G., de Rossi, A.; Efficacy of green tea and its extract, epigallocatechin-3-gallate, in the reduction of cariogenic microbiota in children: a randomized clinical trial. *Arch. Oral Biol.*, 2020, 114, 104727.
246. Dal Magro, L., de Moura, K.S., Backes, B.E., de Menezes, E.W., Benvenutti, E.V., Nicolodi, S., Klein, M.P., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C.; Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnol. Rep.*, 2019, 24, e00373.
247. Deon, M., de Andrade, R.C., Nicolodi, S., da Cunha, J.B.M., Costa, T.M.H., Rodembusch, F.S., de Menezes, E.W., Benvenutti, E.V.; Magnetically Responsive Silica Hollow Spheres: Straightforward Synthesis of Accessible Micro-Sized Containers. *Part. Part. Syst. Charact.*, 2018, 35, 1800160.
248. Gregg, S. J., Sing, K. S. W.; *Adsorption, Surface Area and Porosity*; Academic Press: London, 1982.
249. Bradford, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.
250. Helal, S.E., Abdelhady, H.M., Abou-Taleb, K.A., Hassan, M.G., Amer, M.M.; Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2021, 19, 1.
251. de Oliveira, U.M.F., Lima de Matos, L.J.B., de Souza, M.C.M., Pinheiro, B.B., dos Santos, J.C.S., Gonçalves, L.R.B.; Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Mol. Biol. Rep.*, 2019, 46, 597.
252. Sun, C., Qu, R., Chen, H., Ji, C., Wang, C., Sun, Y., Wang, B.; Degradation behavior of chitosan chains in the 'green' synthesis of gold nanoparticles. *Carbohydr. Res.*, 2008, 343, 15, 2595.
253. Zhang, J.Z., Noguez, C.; Plamonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures. *Plasmonics*, 2008, 3 127.
254. Shah, M., Badwaik, V., Kherde, Y., Waghwani, H.K., Modi, T., Aguilar, Z.P., Rodgers, H., Hamilton, W., Marutharaj, T., Webb, C., Lawrenz, M.B., Dakshinamurthy, R.; Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Front. Biosci.*, 2014, 19, 1320.
255. Su, K.-H., Wei, Q.-H., Zhang, X., Mock, J.J., Smith, D.R., Schultz, S.; Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Narticles. *Nano Lett.*, 2003, 1087.
256. Lin, B., Luo, Y., Teng, Z., Zhang, B., Zhou, B., Wang, Q.; Development of silver/ titanium dioxide/chitosan adipate nanocomposite as an antibacterial coating for fruit storage. *LWT- Food Sci. Technol.*, 2015, 63, 1206.
257. Habibiyan, A., Ramezanzadeh, B., Mahdavian, M., Kasaeian, M.; Facile size and chemistry-controlled synthesis of mussel-inspired biopolymers based on polydopamine nanospheres: application as ecofriendly corrosion inhibitors for mild steel against aqueous acidic solution. *J. Mol. Liq.*, 2020, 298, 111974.
258. Laranjo, M.T., Kist, T.B.L., Benvenutti, E.V., Gallas, M.R., Costa, T.M.H.; Gold nanoparticles enclosed in silica xerogels by high-pressure processing. *J. Nanopart. Res.*, 2011, 13, 4987.
259. Fernandes, S.C.M., Sadocco, P., Causio, J., Silvestre, A.J.D., Mondragon, I., Freire, C.S.R.; Antimicrobial pullulan derivative prepared by grafting with 3-aminopropyltrimethoxysilane: Characterization and ability to form transparent films. *Food Hydrocoll.*, 2014, 35, 247.
260. Priyadarshi, R., Rhim, J.-W.; Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2020, 62, 102346.
261. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J.; Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.*, 2010, 144, 51.
262. Mandapalli, P.K., Labala, S., Chawla, S., Janupally, R., Sriram, D., Venuganti, V.V.K.; Polymer–gold nanoparticle composite films for topical application: evaluation of physical properties and antibacterial activity. *Polym. Compos.*, 2017, 38, 2829.
263. Sudarshan, N., Hoover, D., Knorr, D.; Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.*, 1992, 6, 257.
264. Belbekhouche, S., Bousserrhine, N., Alphonse, V., Le Floch, F., Mechiche, Y.C., Menidjel, I. Carbonnier, B.; Chitosan based self-assembled nanocapsules as antibacterial agent. *Colloids Surf. B*, 2019, 181, 158.
265. Kravanja, G., Primozic, M., Knez, Z., Leitgeb, M.; Chitosan-based (nano)materials for novel biomedical applications. *Molecules*, 2019, 24, 1960.
266. Zhao, Y., Tian, Y., Cui, Y., Liu, W., Ma, W., Jiang, X.; Small molecule-capped gold nanoparticles as potent antibacterial agents that target gram-negative bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 12349.
267. Payne, J.N., Waghwani, H.K., Connor, M.G., Hamilton, W., Tockstein, S., Moolani, H., Chavda, F., Badwaik, V., Lawrenz, M.B., Dakshinamurthy, R.; Novel synthesis of kanamycin conjugated gold nanoparticles with potent antibacterial activity. *Front. Microbiol.*, 2016, 7, 607.

268. Shaikh, S., Nazam, N., Rizvi, S.M.D., Ahmad, K., Baig, M.H., Lee, E.J., Choi, I.; Mechanistic insights into the antimicrobial actions of metallic nanoparticles and their implications for multidrug resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20, 2468.
269. 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.
270. Zhang, W., Li, Y., Niu, J., Chen, Y.; Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. *Langmuir*, 2013, 29, 4647.
271. Deon, M., Morawski, F.M., Passaia, C., Dalmás, M., Laranja, D.C., Malheiros, P.S., Nicolodi, S., Arenas, L.T., Costa, T.M.H., de Menezes, E.W., Benvenutti, E.V.; Chitosan-stabilized gold nanoparticles supported on silica/titania magnetic xerogel applied as antibacterial system. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2019, 89, 333.
272. Morawski, F.M., Deon, M., Nicolodi, S., de Menezes, E.W., Costa, T.M.H., Dias, S.L.P., Benvenutti, E.V., Arenas, L.T.; Magnetic silica/titania xerogel applied as electrochemical biosensor for catechol and catecholamines. *Electrochim. Acta*, 2018, 264, 319.
273. de Souza, L.V., da Rosa, D.S., Tkachenko, O.S., Gomes, A.A., Costa, T.M.H., Arenas, L.T., Benvenutti, E.V.; The role silica pore structure plays in the performance of modified carbon paste electrodes. *Ionics*, 2019, 25, 3259.
274. Kondo, J. N., Hiyoshi, Y., Osuga, R., Ishikawa, A., Wang, Y.-H., Yokoi, T.; Thin (single–triple) niobium oxide layers on mesoporous silica substrate. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2018, 262, 191.
275. Canevari, T.C., Arenas, L.T., Landers, R., Custodio, R., Gushikem, Y.; Simultaneous electroanalytical determination of hydroquinone and catechol in the presence of resorcinol at an SiO_2/C electrode spin-coated with a thin film of Nb_2O_5. *Analyst*, 2013, 138, 315.
276. Wiench, P., Grzyb, B., González, Z., Menéndez, R., Handke, B., Gryglewicz, G.; pH robust electrochemical detection of 4-nitrophenol on a reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 2017, 787, 80.
277. Noor, A.M., Rmeshkumar, P., Yusoff, N., Ming, H.N., Sajab, M.S.; Microwave synthesis of reduced graphene oxide decorated with silver nanoparticles for electrochemical determination of 4-nitrophenol. *Ceram. Int.*, 2016, 42, 18813.
278. Asadpour-Zeynali, K., Delnavaz, E.; Electrochemical synthesis of nickel–cobalt oxide nanoparticles on the glassy carbon electrode and its application for the voltammetric determination of 4-nitrophenol. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2017, 14, 2229.
279. Kumar, V., Singh, K., Panwar, S., Mehta, S. K.; Green synthesis of manganese oxide nanoparticles for the electrochemical sensing of *p*-nitrophenol. *Int. Nano Lett.*, 2017, 7, 123.
280. Chen, P., Shi, Y., Li, X., Wang, T., Zhou, M., Tian, E., Wang, W., Jiang, H., Shu, H.; Highly effective detection of 4-nitrophenol by tremella-like indium silver sulfide modified GCE. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2018, 13, 6158.
281. Saadati, F., Ghahramani, F., Shayani-jam, H., Piri, F., Yaftian, M. R.; Synthesis and characterization of nanostructure molecularly imprinted polyaniline/graphene oxide composite as highly selective electrochemical sensor for detection of *p*-nitrophenol. J. *Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 2018, 86, 213.
282. Mulaba-Bafubiandi, A.F., Karimi-Maleh, H., Karimi, F., Rezapour, M., A voltammetric carbon paste sensor modified with NiO nanoparticle and ionic liquid for fast analysis of *p*-nitrophenol in water samples. *J. Mol. Liq.*, 2019, 285, 430.
283. Ahmad, K., Mobin, S. M.; Construction of polyanilne/ITO electrode for electrochemical sensor applications. *Mater. Res. Express*, 2019, 6, 085508.
284. Nuñez, R.N., Betancourth, J.M., Ortiz, P.I., Pfaffen,V.; Voltammetric quantification of 4-nitrophenol using a multivariate optimized plated bismuth film electrode. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2019, 58, 12411.
285. Havranova, P., Ligmajer, F., Danhel, A.; Electrodeposition of silver amalgam on thin gold film electrodes for voltammetric detection of 4-nitrophenol and DNA labeled with osmium tetroxide-bipyridine complex. *Electroanalysis*, 2019, 31, 1952.
286. Zhang, Y., Xie, Q., Xia, Z., Gui, G., Deng, F.; Fulvic acid reduced GO and phthalocyanine nanorods as reaction platform for simultaneous determination of catechol, hydroquinone, phenol and *p*-nitrophenol. *J. Electrochem. Soc.*, 2019, 166, B1293.
287. Ahmad, N., Alam, M., Wahab, R., Ahmad, J., Ubaidullah, M., Ansari, A. A., Alotaibi, N. M.; Synthesis of NiO–CeO_2 nanocomposite for electrochemical sensing of perilous 4-nitrophenol. *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.*, 2019, 30, 17643.
288. Sebest, P., Fojt, L., Ostatna, V., Fojta, M., Danhel, A.; Electrodeposited silver amalgam particles on pyrolytic graphite in (spectro)electrochemical detection of 4-nitrophenol, DNA and green fluorescent protein. *Bioelectrochemistry*, 2019, 132, 107436.
289. Vinoth, S., Sampathkumar, P., Giribabu, K., Pandikumar, A.; Ultrasonically assisted synthesis of barium stannate incorporated graphitic carbon nitride nanocomposite and its analytical performance in electrochemical sensing of 4-nitrophenol. *Ultrason. Sonochem.*, 2020, 62, 104855.

290. Zhang, Y., Xie, Q., Xia, Z., Gui, G. F., Deng, F.; Graphdiyne oxides as new modifier for the simultaneous electrochemical detection of phenolic compounds. *J. Electroanal. Chem.*, 2020, 863, 114058.
291. Peters, F. T., Drummer, O. H., Musshoff, F.; Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.*, 2007, 165, 216.
292. Zeng, Y., Zhou, Y., Zhou, T., Shi, G.; A novel composite of reduced graphene oxide and molecularly imprinted polymer for electrochemical sensing 4-nitrophenol. *Electrochim. Acta*, 2014, 130, 505.
293. Mokhtar, N.F., Abd. Rahman, R.N.Z.R., Muhd Noor, N.D., Mohd Shariff, F., Mohamad Ali, M.S.; The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. *Catalysts,* 2020, 10, 744.
294. Siódmiak, T., G. Haraldsson, G., Dulęba, J., Ziegler-Borowska, M., Siódmiak, J., Marszałł, M.P.; Evaluation of Designed Immobilized Catalytic Systems: Activity Enhancement of Lipase B from *Candida antarctica*. *Catalysts,* 2020, 10, 876.
295. Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S.G., Lopez-Carrobles, N., Gorines, B.C., Virgen-Ortíz, J.J., Fernandez-Lafuente , R.; *Enzyme Microb. Technol.*, 2017, 98, 18.
296. Arana-Peña, S., Rios, N.S., Carballares, D., Mendez-Sanchez, C., Lokha, Y., Gonçalvez, L.R.B., Fernandez-Lafuente, R.; Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, 8, 36.
297. Bolivar, J.M., Woodley, J.M., Fernandez-Lafuente, R.; Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, 2022, 51, 6251.
298. Okura, N.S., Sabi, G.J., Crivellenti, M.S., Gomes, R.A.B., Fernandez-Lafuente, R., Mendes, A.A.; Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 163, 550.
299. Rios, N.S., Arana-Peña, S., Mendez-Sanchez, C., Lokha, Y., Cortes-Corberan, V., Gonçalves, L.R.B., Fernandez-Lafuente, R.; Increasing the Enzyme Loading Capacity of Porous Supports by a Layer-by-Layer Immobilization Strategy Using PEI as Glue. *Catalysts*, 2019, 9, 576.
300. Porto, M.D.A., dos Santos, J.P., Hackbart, H., Bruni, G.P., Fonseca, L.M., Zavareze, E.R., Dias, A.R.G.; Immobilization of α-amylase in ultrafine polyvinyl alcohol (PVA) fibers via electrospinning and their stability on different substrates. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 126, 834.
301. Souza, P.M.P., Carballares, D., Lopez-Carrobles, N., Gonçalves, L.R.B., Lopez-Gallego, F., Rodrigues, S., Fernandez-Lafuente, R.; Enzyme-support interactions and inactivation conditions determine *Thermomyces lanuginosus* lipase inactivation pathways: Functional and florescence studies. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, 191, 79.
302. Worthen, A.J., Tran, V., Cornell, K.A., Truskett, T.M., Johnston, K.P.; Steric stabilization of nanoparticles with grafted low molecular weight ligands in highly concentrated brines including divalent ions. *Soft Matter*, 2016, 12, 2025.
303. Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A.; An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2015, 29, 2, 205.
304. Miao, H., Li, M., Sun, X., Xia, J., Li, Y., Li, J., Wang, F., Xu, J.; Effects of Pore Size and Crosslinking Methods on the Immobilization of Myoglobin in SBA-15. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 9, 827552.
305. Decarpigny, C., Bleta, R., Ponchel, A., Monflier, E.; Oxidation of 2,5-diformfylfuran to 2,5-furandicarboxylic acid catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B immobilized in a cyclodextrin-templated mesoporous silica. The critical role of pore characteristics on the catalytic performance. *Colloids Surf. B*, 2021, 200, 111606.
306. Bayne, L., Ulijin, R.V., Halling, P.J.; Effect of pore size on the performance of immobilised enzymes. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 9000.
307. Siódmiak, T., Duleba, J., Haraldsson, G.G., Siódmiak, J., Marszałł, M.P.; The Studies of Sepharose-Immobilized Lipases: Combining Techniques for the Enhancement of Activity and Thermal Stability. *Catalysts*, 2023, 13, 887.
308. Yaashikaa, P.R., Keerthana Devi, M., Senthil Kumar, P.; Advances in the application of immobilized enzyme for the remediation of hazardous pollutant: A review. *Chemosphere*, 2022, 29, 134390.
309. da Rocha, T.N., Carballares, D., Guimarães, J.R., Rocha-Martin, J., Tardioli, P.W., Gonçalves, L.R.B., Roberto Fernandez-Lafuente, R.; Determination of immobilized lipase stability depends on the substrate and activity determination condition: Stress inactivations and optimal temperature as biocatalysts stability indicators. *Sustain. Chem. Pharm.*, 2022, 29, 100823.
310. Aghabeigi, F., Nikkhah, H., Zilouei, H., Bazarganipour, M.; Immobilization of lipase on the graphene oxides magnetized with $NiFe_2O_4$ nanoparticles for biodiesel production from microalgae lipids. *Process Biochem.*, 2023, 126, 171.

311. Al-Zuhair, S., Jayaraman, K.V., Krishnan, S., Chan, W.-H.; The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochem. Eng. J.*, 2006, 30, 212.
312. Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., Daminati, M.; Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2006, 39, 83.
313. Rabbani, G., Ahmad, E., Ahmad, A., Khan, R.H.; Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2023, 225, 822.
314. Tomke, P.D., Rathod, V.K.; A novel step towards immobilization of biocatalyst using agro waste and its application for ester synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 117, 366.
315. Silva, T.A., Keijok, W.J., Guimarães, M.C.C, Cassini, S.T.A., de Oliveira, J.P.; Impact of immobilization strategies on the activity and recyclability of lipases in nanomagnetic supports. *Sci. Rep.*, 2022, 12, 6815.
316. Aljawish, A., Heuson, E., Bigan, M., Froidevaux, R.; Lipase catalyzed esterification of formic acid in solvent and solvent-free systems. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2019, 20, 101221.
317. da Silva, J.R., de Souza, C.E.C., Valoni, E., de Castro, A.M., Coelho, M.A.Z., Ribeiro, B.D., Henriques, C.A., Langone, M.A.P.; Biocatalytic esterification of fatty acids using a low-cost fermented solid from solid-state fermentation with *Yarrowia lipolytica*. *3 Biotech*, 2019, 9, 38.
318. Vassiliadi, E., Xenakis, A., Zoumpanioti, M.; Chitosan hydrogels: A new and simple matrix for lipase catalysed biosyntheses. *Mol. Catal.*, 2018, 445, 206.
319. Zdarta, J., Jankowska, K., Bachosz, K., Degórska, O., Kaźmierczak, K., Nguyen, LN., Nghiem, L.D., Jesionowski, T.; Enhanced Wastewater Treatment by Immobilized Enzymes. *Curr. Pollut. Rep.*, 2021, 7, 167.