



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Prospecção e análises de superfícies para imobilização de
biomoléculas**

EDUARDO FERNANDES BARBOSA

Brasília,

2014



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Prospecção e análises de superfícies para imobilização de biomoléculas

Candidato: Eduardo Fernandes Barbosa

Orientador: Dr. Luciano Paulino da Silva

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Animal.

Brasília,

2014

Prefácio do exame de qualificação de doutorado (12/09/2011)

...“Sofia, por que é que as peças do *Lego* são o brinquedo mais genial do mundo?”...

(Jostein Gaarder, O Mundo de Sofia)

Revivendo Demócrito e alguns outros grandes pensadores contemporâneos a ele, Jostein, nesse trecho do livro, instigou a jovem Sofia (que poderia estar representando a qualquer um de nós) a refletir de maneira um pouco mais profunda sobre a incrível dinâmica dos blocos fundamentais da matéria na natureza. Esse mesmo tema, decorridos milênios do início de suas discussões e reflexões, ainda inspira a muitos no mundo científico e filosófico (ou seria científico-filosófico?). Átomos e moléculas se combinam e desarranjam numa dança infinitamente contraditória, que consegue ser simultaneamente afim ao caos, porém elegantemente ordenada. Independente das “leis ou forças” que pré-vêm ou regem a essa dança, já há alguns séculos, alguns homens de curiosidade e vontade privilegiada (chamados por alguns de cientistas) foram contemplados com a dádiva de apreciar alguns resultados dessa coreografia. Dentre inúmeras obras-primas concebidas pela natureza, as composições conhecidas como enzimas ocupam uma posição de destaque. Elas possuem eficácia e seletividade superiores a qualquer máquina já produzida ou idealizada por simples seres humanos. Conseguindo atuar em condições absurdamente sutis, elas são responsáveis por executar e guiar o famoso e até então misterioso balé “*Le maintien de la vie*”. E abençoado foi Louis Pasteur, no século XIX, que sonhou que essas mini-entidades poderiam atuar fora de suas casas (células ou organelas). (...) “Se elas também trabalham fora de casa, por que não fazê-las sucumbir aos nossos propósitos?” Imaginaram Nelson e Griffin, abrindo em 1916 as portas das incontáveis possibilidades referentes ao fantástico mundo da imobilização de enzimas. E elas tanto aceitaram essa escravidão, que algumas até chegaram a trabalhar mais caridosamente ainda.

É justamente esse evento que me inspirou a querer olhar esse balé mais detalhadamente. E observando o inevitável e natural monta e desmonta cíclico de todas as estruturas que conhecemos, surgiu a idéia de se tentar modestamente compreender um pouco mais sobre algumas “peças desse *Lego*”, olhando-as atenta e atenciosamente bem de perto.

Porém, a meu ver, somos ainda apenas crianças tentando aprender a brincar com as “peças de *Lego*”, tentando manuseá-las para montar formas bonitas e interessantes somente para nossos olhos e a nós mesmos...

Eduardo Fernandes Barbosa, 2011.

Prefácio da Tese de doutorado (14/02/2014)

“A única constante é a mudança.”

Heráclito de Efeso

Quando se descobre que tudo o que você cuidadosamente cultivou e acumulou na sua memória pode não representar absolutamente nada sobre a estrutura da realidade, uma tremenda quantidade de energia se faz necessária para que você não caia em um surto psicótico ou em uma descrença desilusória. A Física (representando todas as ciências ditas naturais) não é capaz de interpretar a si mesma, e pouco se pensa a respeito disso (Raphael D. M. de Paola). É interessante notar que ao longo da história da humanidade, nem sempre houve esse “descaso” na relação entre o mundo científico-filosófico e a estrutura da realidade. Essa confusão ou ilusão se tornou mais evidente com a propagação das ideias de René Descartes e Isaac Newton. Até então, a estrutura da realidade era baseada na relação de reconhecimento de um objeto corpóreo observado pelo indivíduo espectador. Na visão cartesiana da realidade, somos incapazes de acessar qualquer dimensão da realidade externa material, e a matéria tem como característica básica o fato de ser extensa (*res extensa*, ou seja, aquilo que pode ser medido). Dando sequência e perpetuidade a essa visão, Newton tenta descrever cartesianamente e mecanisticamente os eventos que ocorrem no mundo corpóreo, simplificando os objetos corpóreos a entes “estáveis”, que representariam meros aglomerados de partículas. O equívoco quase imperceptível que se impregnou na consciência coletiva moderna foi que essas medidas obtidas a partir de análises de objetos corpóreos descrevem de alguma forma a realidade.

O advento da física quântica e de demais possibilidades de investigações no nível microscópico e subatômico fez ruir os aparentes sólidos pilares do cartesianismo e newtonianismo. A exatidão oriunda da simplificação cartesiana foi obrigada a ceder lugar à probabilidade e incerteza quântica, não por pertencerem a reinos ou mundos distintos, mas sim por causa da excessiva simplificação e necessidade de exatidão da corrente cartesiana.

Ao longo da jornada do doutorado, como resultado das experiências pessoais, científicas e filosóficas vividas nesse período, adquirimos uma visão mais ampla sobre a importância e significação da ciência. Portanto, esse prefácio tem como objetivo

esclarecer a visão que adquirimos acerca da ciência moderna: conhecemos sua importância em relação ao desenvolvimento técnico e tecnológico, porém reconhecemos, contraditoriamente, que ela é incapaz de descrever a realidade, devido ao seu *modus operandis*. Reconhecemos a importância técnica e tecnológica do trabalho realizado, e sua impotência de descrever a realidade: mostramos aqui apenas os rabiscos obtidos de fragmentos de imagens distorcidas da realidade, os quais a ciência atual nos permitiu acompanhar.

Reconhecemos ainda que o mundo corpóreo (ou realidade física) somente pode ser percebido e acessado a partir do estabelecimento de uma relação e interação entre o objeto corpóreo e o indivíduo espectador. Assim, sabemos que além do mundo da ciência, existe uma realidade onde os principais experimentos e resultados mais importantes são aqueles oriundos dos reflexos das relações humanas, que é inconstante, inexato e imprevisível, e somente nele podemos encontrar alegrias, sentimentos e emoções.

Eduardo Fernandes Barbosa, 2013.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, meio e veículo pelo qual todas as coisas se manifestam e acontecem. Agradeço a minha família (incluindo a Luciane) pelo apoio incondicional. Agradeço aos meus amigos, pelos momentos agradáveis de apoio, descontração e incentivos. Agradeço aos meus Mestres, pelos exemplos de conduta pessoal, científica, filosófica e profissional (não poderia deixar de destacar a paciência “inesgotável” do meu orientador Luciano Paulino).

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa da EMBRAPA/CENARGEN (Professor Carlos Bloch Jr. e demais pesquisadores e técnicos), pelo aporte instrumental e infraestrutura, aporte técnico e aporte intelectual (microscópio de força atômica; espectrômetros de massa; sistemas cromatográficos; sistemas espectrofotométricos e reagentes).

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília (Professora Sônia Nair Bão) pelas Microscopias Eletrônicas de Varredura e Transmissão.

Ao Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Brasília (Professora Sônia de Freitas) pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Ao Laboratório de Química Analítica e Ambiental da Universidade de Brasília (Professor Jez Willian Braga) pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho e fluorescência em fase sólida.

Lista de figuras

Figura 1 – Representação esquemática da amostragem ao longo de cada microtubo de polipropileno28

Figura 1.1 – Análises topográficas obtidas por meio de MFA a partir das três marcas de microtubos A, B e C. Representação em 3D das imagens adquiridas em modo dinâmico em áreas de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ e mantendo para fins de comparação a amplitude de altura em até 325 nm.....42

Figura 1.2 – Esquema ilustrativo de determinação do parâmetro de rugosidade Rz43

Figura 1.3 – Análise das rugosidades (R_a , R_q e R_z) observadas em imagens obtidas por MFA operada em modo dinâmico para diferentes regiões das três marcas de microtubos.....45

Figura 1.4 – Análise das médias das rugosidades das áreas ao longo de cada microtubo, considerando-se os parâmetros estruturais referentes às três marcas testadas46

Figura 1.5 – Análise por espectrometria de massa MALDI-TOF das três marcas de microtubos, na busca de possíveis componentes moleculares liberados frente à exposição aos seguintes solventes/soluções: acetonitrila (P.A.), bicarbonato de amônio ($1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$), ácido trifluoroacético (0,1%) e água ultrapura, com tempos de exposição de 0 e 24 horas47

Figura 1.6 – Análise de componentes principais dos 28 componentes moleculares mais intensos, detectados por espectrometria de massa MALDI-TOF nos microtubos de polipropileno expostos por 0 (A, C e E) e 24 horas (B, D e F) a diferentes solventes/soluções.....48

Figura 2.1 – Análises de MFA da superfície interna dos microtubos de PP não modificados ou controle (A, B e C) e modificados (D, E e F). Representação em 3D das imagens adquiridas em modo dinâmico em áreas de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ 53

Figura 2.2 – Imagens topográficas obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies internas dos microtubos de PP não modificados ou controle (A) e modificados (B).....54

Figura 2.3 – Resultados de nanorugosidade dos microtubos não modificados (ou controle) e modificados, obtidos por microscopia de força atômica (MFA) operando em modo dinâmico.....55

Figura 2.4 – Esquema exemplificando uma curva de força <i>versus</i> distância obtida por meio de MFA. Estão indicadas na figura as linhas relativas à aproximação (linha preta) e à retração ou distanciamento da ponteira do MFA em relação à superfície da amostra (linha vermelha).	56
Figura 2.5 – Resultados dos parâmetros de espectroscopia de força obtidos por microscopia de força atômica (MFA) a partir das superfícies internas dos microtubos controle (A) e modificados (B), operando em modo contato	58
Figura 2.6 – Análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da superfície interna dos microtubos de PP controle e modificados	59
Figura 2.7 – Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da superfície interna dos microtubos de PP controle e modificados	59
Figura 3.1 – Imagens topográficas obtidas por MFA, em modo dinâmico com áreas de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, das diferentes membranas poliméricas porosas antes (A, B, C e D) e após (E, F, G e H) o teste de eficiência de filtração	65
Figura 3.2 – Imagens obtidas por MEV das diferentes membranas poliméricas porosas antes (A, B, C e D) e após (E, F, G e H) os testes de eficiência de filtração	67
Figura 3.3 – Eficiência de filtração da solução de albumina	68
Figura 3.4 – Resultados dos parâmetros de rugosidade das membranas poliméricas porosas obtidos por MFA operada em modo dinâmico	69
Figura 3.5 – Análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para as membranas novas e usadas	70
Figura 3.6 – Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) das membranas poliméricas porosas novas e usadas, representando os percentuais de átomos presente em cada material	72
Figura 3.7 – Resultados obtidos a partir de análises por espectroscopia de força utilizando-se MFA para as partes superiores (colunas brancas) e inferiores (colunas pretas) das diferentes membranas testadas	73
Figura 4.1 – Imagens topográficas obtidas em análise por microscopia eletrônica de varredura das superfícies de sílica controle (A, B, C e D) e silanizada (E, F, G e H), em ordem crescente de magnificações	79

Figura 4.2 – Imagens tridimensionais da topografia da sílica controle e silanizada obtidas por análise de microscopia de força atômica em modo dinâmico	80
Figura 4.3 – Representação gráfica dos valores dos parâmetros de rugosidade (Ra, Rz, Rzjis, Rq, Rp e Rv) referentes à sílica controle e silanizada, obtidos por MFA	81
Figura 4.4 – Resultados obtidos por meio de análises de espectroscopia de força a partir de curvas de força <i>versus</i> deslocamento em microscópio de força atômica operado em modo contato.....	83
Figura 4.5 – Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) das superfícies das esferas de sílica controle e silanizadas, representando os percentuais de átomos detectados em cada material.....	83
Figura 4.6 – Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da superfície das esferas de sílica controle e silanizadas	84
Figura 4.7 – Análise termogravimétrica (TG) das amostras de sílica controle e quimicamente modificadas por APTS	85
Figura 4.8 – Cromatogramas obtidos por FAST-HPLC com diferentes concentrações de solução de tripsina, variando-se de 52 μM (considerada 100%) a 1,3 μM (representando 2,5%), conforme ilustrado na escala de cores.....	87
Figura 4.9 – Curva padrão obtida pela integração da área sob os picos referentes à fração correspondente à tripsina nos cromatogramas obtidos e apresentados na figura 4.9.....	88
Figura 4.10 – Gráfico da superfície de resposta referente à eficiência de imobilização da tripsina em sílica controle. Eixo “x” representa o pH, “y” o tempo e “z” a eficiência de imobilização	89
Figura 4.11 – Gráfico da superfície de resposta referente à eficiência de imobilização da tripsina em sílica silanizada com APTS. Eixo “x” representa o pH, “y” o tempo e “z” a eficiência de imobilização	90
Figura 4.12 – Análise por cromatografia líquida ultrarrápida das amostras de albumina sérica bovina 1 mg \times mL⁻¹ hidrolisadas por tripsina imobilizada em sílica modificada.....	90
Figura 4.13 – Espectro de massa (MALDI-TOF) das amostras de albumina sérica bovina a 1 mg \times mL⁻¹ hidrolisadas por tripsina imobilizada em sílica controle.....	91

Figura 4.14 – Espectro de massa (MALDI-TOF) das amostras de albumina sérica bovina a $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ hidrolisadas por tripsina imobilizada em sílica silanizada.....	92
Figura 4.15 – Sequenciamento do componente molecular de massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1567,7 \text{ Da}$ obtido pela hidrólise de albumina sérica bovina em uma solução a $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ utilizando a tripsina imobilizada em sílica modificada.....	92
Figura 4.16 – Representação tridimensional da molécula monomérica de albumina sérica bovina, evidenciando em representação <i>spacefill</i> as regiões na molécula que foram preferencialmente clivadas pela tripsina imobilizada em sílica silanizada.....	93
Figura 5.1 – Representação da distribuição de frequência do ganho de massa dos microtubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade após quatro ciclos de polimerização <i>in situ</i> da anilina.....	100
Figura 5.2 – Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da superfície interna dos microtubos de PP funcionalizados com ciclos de polimerização da anilina.....	101
Figura 5.3 – Representação dos resultados quantitativos relativos aos parâmetros de rugosidade (R_a, R_q, R_z, R_{zj}, R_p e R_v) referentes às superfícies internas dos microtubos de PP controle (ciclo 0) e funcionalizados (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato.....	102
Figura 5.4 – Representação dos resultados quantitativos relativos aos parâmetros de rugosidade (R_a, R_q, R_z, R_{zj}, R_p e R_v) referentes às superfícies internas das ponteiros de PP de micropipetas (ciclo 0) e funcionalizadas (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato.....	102
Figura 5.5 – Representação dos resultados quantitativos relativos ao parâmetro de espectroscopia de força “<i>Snap in force</i>”, “<i>Detachment force</i>”, “<i>Maximum Load force</i>” e módulo de Young referentes às superfícies internas dos microtubos controle (ciclo 0) e funcionalizados (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato.....	103
Figura 5.6 – Representação dos resultados quantitativos relativos aos parâmetros de espectroscopia de força: “<i>snap in force</i>”; “<i>detachment force</i>”; “<i>Maximum Load force</i>” e Módulo de Young referentes às superfícies internas das ponteiros de PP controle (ciclo 0) e funcionalizados (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato.....	104

Figura 5.7 – Retenção de atividade da enzima tripsina imobilizada covalentemente via ligação cruzada com glutaraldeído, após até 20 ciclos de reutilização do sistema	105
Figura 5.8 – Resultados de retenção de atividade da enzima tripsina imobilizada por adsorção. A quantificação da atividade sobre o substrato BApNA.....	106
Figura 5.9 – Valores padrão de condutividade elétrica de diversas concentrações de soluções de cloreto férrico (FeCl₃), juntamente com os resultados observados após 1 e 24 horas de incubação no microtubo de polipropileno funcionalizado com PANI	107
Figura 5.10 – Representação dos valores de raio hidrodinâmico das nanopartículas de prata obtidas por 24 horas de incubação de nitrato de prata 20 mmol × L⁻¹ nos microtubos funcionalizados com PANI	108
Figura 5.11 – Valores de raio hidrodinâmico das nanopartículas de prata obtidas por 12 e 24 horas de incubação nos microtubos funcionalizados com PANI contendo extrato de levedura, Fermipan[®] e levedo de cerveja imobilizados por adsorção e covalentemente.....	111

Lista de tabelas

Tabela 1 - Matriz de planejamento experimental, codificada e não codificada, para o planejamento do tipo composto central (PCC) para as variáveis pH e tempo de imobilização.....	39
Tabela 2.1 Caracterização nanomecânica da superfície interna dos microtubos controle e modificados	58
Tabela 3.1 Bandas de FTIR características para as membranas de nitrocelulose, nylon, PTFE e PVDF	71
Tabela 4.1 Resultados da análise das curvas obtidas por TG e DTG para as amostras de sílica controle e modificada	85
Tabela 4.2 Resultados da análise das curvas obtidas por TG e DTG para as amostras de sílica controle e modificada por análise termogravimétrica diferencial (DTA)	86

Lista de abreviaturas

ANOVA = análise de variância

APTS = 3-aminopropil-trietoxisilano

BApNA = N-Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida

DTG = derivada da análise termogravimétrica

E.C. = número do código da enzima (*Enzyme Commission Number*)

EDS = espectroscopia de energia dispersiva

FAST-HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência ultrarrápida

FTIR = espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

m/z = razão massa/carga

MALDI-TOF MS = espectrometria de massa por ionização/ dessorção da matriz assistida por laser com separação por tempo de voo

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MFA = microscopia de força atômica

P.A. = para análise

PANI = polianilina

PCC = planejamento composto central

PP = polipropileno

PTFE = politetrafluoretileno

PVDF = fluoreto de polivinilideno

Ra = rugosidade média

Rp = rugosidade relacionada à altura máxima dos picos

Rq = rugosidade quadrática média

Rv = rugosidade relacionada à profundidade máxima dos vales

Rz = rugosidade de profundidade média

Rzjis = padrão industrial japonês para Rz

SPM = microscopia de varredura por sonda

TGA = Análise termogravimétrica

Zi = rugosidade parcial

Resumo

A escolha de um suporte adequado representa uma etapa primordial e essencial para investigações em imobilização de biomoléculas. Para tanto, é necessário o conhecimento detalhado da estrutura e propriedades dos suportes. Nesse estudo, foram escolhidos três tipos de suportes: superfícies de polipropileno (PP), membranas poliméricas porosas (nitrocelulose, *nylon*, PVDF e PTFE) e esferas de sílica, com o objetivo de caracterizar suas superfícies, qualitativa e quantitativamente em nível nanométrico, para posterior imobilização de biomoléculas. Dentre esses materiais, as superfícies de sílica modificada pelo processo de silanização, e as superfícies de PP modificadas com polianilina apresentaram maior potencial de aplicações no desenvolvimento de dispositivos para processos biotecnológicos. As membranas poliméricas porosas, além de terem sido caracterizadas quimicamente por meio de análises de FTIR e EDS, foram caracterizadas por meio da técnica de espectroscopia de força para verificação de suas propriedades mecânicas, atrativas, adesivas e elásticas. Essas membranas não foram utilizadas como suportes para imobilização de enzimas e biomoléculas devido à algumas propriedades indesejáveis, tais como propriedades atrativas muito baixas e dificuldade no manuseio desses materiais. As esferas de sílica foram modificadas quimicamente por silanização com APTS (3-aminopropil-trietoxissilano), o que resultou em um aumento significativo da rugosidade desse sistema. Partículas de sílica normal e silanizada foram testadas, com o uso de planejamento experimental do tipo composto central (PCC), em ensaios de imobilização de tripsina. A imobilização de tripsina em sílica normal e silanizada, que foi quantificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, possibilitou a observação de uma elevada eficiência de imobilização de tripsina nas sílicas testadas (entre 80 e 98 %). Ambas apresentaram regiões de elevada eficiência de imobilização nos extremos de tempo, porém, foi observado uma restrição da faixa de valores de pH das zonas de maior eficiência de imobilização para a sílica silanizada. Os microtubos de PP funcionalizados com polianilina (PANI) foram aplicados para a imobilização de biomoléculas, sendo que para a tripsina imobilizada covalentemente, foi possível a reutilização em até 20 ciclos com retenção e manutenção de aproximadamente 60% da atividade inicial. Na imobilização por adsorção foi possível a reutilização do sistema contendo a enzima imobilizada por adsorção por 9 ciclos com manutenção acima de 60% de retenção da atividade inicial. A superfície de PP funcionalizada com PANI foi capaz de reduzir íons prata em solução, resultando na síntese de nanopartículas de prata com raio hidrodinâmico menor que 50 nm. Esse sistema foi capaz de atuar na captura/remoção de íons ferro em solução. A exposição de uma solução de nitrato de prata ao ambiente químico gerado pela funcionalização do microtubo de PP com PANI contendo biomoléculas imobilizadas por adsorção ou covalentemente (extrato de levedura, Fermipan[®] ou levedo de cerveja), propiciou a produção de nanopartículas de prata com raio hidrodinâmico menor que 100 nm e polidispersividades (PDI) mais baixas. A caracterização em nanoescala utilizando as abordagens descritas nessa Tese pode então ser apontada como uma ferramenta essencial na elucidação das propriedades do microambiente gerado pela imobilização de biomoléculas.

Palavras-chave: Imobilização de biomoléculas, polipropileno funcionalizado com polianilina, membranas poliméricas porosas, partículas de sílica silanizadas, nanorugosidade e espectroscopia de força.

Abstract

The choice of a suitable support is a primary and essential step for investigations concerning biomolecules immobilization. It requires a deep knowledge about the supports structure and properties. In this study, were selected three kinds of supports: polypropylene (PP) surfaces, polymeric porous membranes (nitrocellulose, nylon, PVDF and PTFE) and silica spheres, aiming the characterization of their surfaces qualitatively and quantitatively at the nanometer level, to subsequent immobilization of biomolecules. Among the tested materials, silica spheres chemically modified by silanization with APTS (3-aminopropyl-trietoxisilane) and PP surfaces modified with polyaniline (PANI) presented great potential for applications in the development of new devices for use in biotechnological processes. Polymeric porous membranes were chemically characterized by FTIR and EDS analyses. They were also characterized by single point force spectroscopy technique for verification of their attractive, adhesive, and elastic physical properties. These membranes were not used as supports for immobilization of enzymes and biomolecules due to some undesirable properties such as very low attractive tendencies and difficulties on handling these materials. Chemically modified silica spheres resulted in an increased roughness. Normal and APTS-modified silica particles were tested for trypsin immobilization, after applying the central composite experimental design (PCC). Trypsin immobilization onto normal and silanized silica, measured by high performance liquid chromatography, showed out a high efficiency of enzyme immobilization (between 80 and 98%). Both systems showed high efficiency of immobilization in extreme pH conditions. However, it was observed a restriction of the range of pH values of the regions with high immobilization efficiency for silanized silica. PP surface functionalized with PANI was capable of reducing silver ions in solution, resulting in the synthesis of silver nanoparticles smaller than 50 nm in hydrodynamic radius. This system was capable of acting in the capture/removal of iron ions in solution. Exposure of a silver nitrate solution to the chemical environment generated by functionalization of PP microtube functionalized with PANI containing immobilized biomolecules by adsorption or covalently (yeast extract, Fermipan[®]), enable to the production of silver nanoparticles with radius hydrodynamic less than 100 nm and lower polydispersities (PDI). The nanoscale characterization using the approaches described in this PhD Thesis can then be identified as an essential tool in the elucidation of the microenvironment properties generated by immobilization of biomolecules.

Keywords: Biomolecules immobilization, polypropylene microtubes functionalized with polyaniline, polymeric porous membranes, silanized silica particles, nanoroughness, force spectroscopy.

Sumário

Agradecimentos	vi
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
Introdução	19
Objetivos	26
Objetivo Geral	26
Objetivos Específicos	26
Material e Métodos	28
<i>Obtenção dos suportes e biomoléculas</i>	28
- <i>Microtubos de polipropileno para caracterização de superfície</i>	28
- <i>Modificação da superfície interna dos microtubos de polipropileno com polianilina</i>	28
- <i>Membranas poliméricas porosas</i>	29
- <i>Sílica</i>	29
- <i>Sílica silanizada com aminopropiltriétoxissilano (APTS)</i>	29
- <i>Tripsina pancreática bovina</i>	30
- <i>Levedura Saccharomyces cerevisiae</i>	30
<i>Análises de superfícies por microscopia de força atômica (MFA)</i>	30
<i>Espectroscopia de força</i>	31
<i>Espectrometria de massa</i>	31
- <i>Análises para determinação das massas moleculares (MS) e para o sequenciamento de peptídeos (MS/MS)</i>	31
<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)</i>	32
<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	32
<i>Difração de raios-X (DRX)</i>	33
<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	33
<i>Imobilização de tripsina em sílica normal e silanizada</i>	33

<i>Imobilização de tripsina nos microtubos de polipropileno funcionalizados</i>	33
<i>Quantificação da eficiência de imobilização por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa ultra-rápida (FAST/HPLC)</i>	34
<i>Imobilização de biomoléculas em microtubos de PP modificados para síntese de nanopartículas de prata</i>	35
<i>Síntese de nanopartículas de prata utilizando os microtubos de PP funcionalizados como reatores</i>	35
<i>Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície das nanopartículas de prata sintetizadas</i>	35
<i>Determinação da condutividade elétrica de soluções de cloreto de ferro (FeCl₃)</i>	36
<i>Teste colorimétrico de atividade da tripsina livre</i>	36
<i>Teste colorimétrico de atividade da tripsina imobilizada</i>	36
<i>Teste de hidrólise da albumina sérica bovina utilizando a tripsina imobilizada em microtubos de polipropileno modificados</i>	37
<i>Análises estatísticas e planejamento experimental</i>	38
Capítulo I - Análise da superfície interna de microtubos de polipropileno	40
<i>Introdução</i>	40
<i>Resultados e Discussão</i>	42
- <i>Verificação do efeito dos solventes (acetonitrila, bicarbonato de amônio, ácido trifluoroacético e água) sobre a superfície interna dos microtubos de polipropileno</i>	46
<i>Conclusões</i>	49
<i>Referências Bibliográficas</i>	49
Capítulo II - Análise em nanoescala das superfícies internas de microtubos de polipropileno normais e modificados: uma abordagem considerando parâmetros de espectroscopia de força	51
<i>Introdução</i>	51
<i>Resultados e Discussão</i>	53
<i>Conclusões</i>	60
<i>Referências Bibliográficas</i>	61

Capítulo III - Análise das superfícies de membranas poliméricas porosas	63
<i>Introdução</i>	63
<i>Resultados e Discussão</i>	65
<i>Conclusões</i>	74
<i>Referências Bibliográficas</i>	75
Capítulo IV - Caracterização estrutural e química de esferas de sílica antes e após a modificação por silanização para imobilização de tripsina	77
<i>Introdução</i>	77
<i>Resultados e Discussão</i>	79
<i>Conclusões</i>	93
<i>Referências Bibliográficas</i>	94
Capítulo V - Processo de funcionalização de superfícies de polipropileno baseado na polimerização de anilina para imobilização de enzimas e outras biomoléculas	97
<i>Introdução</i>	97
<i>Resultados e Discussão</i>	100
<i>Aplicações dos microtubos de PP funcionalizados com PANI</i>	104
- <i>Imobilização de tripsina</i>	104
- <i>Uso dos microtubos de PP funcionalizados com PANI como sistemas de remoção de ions em solução</i>	107
- <i>Uso dos microtubos de PP funcionalizados com PANI como reatores para síntese de nanopartículas de prata</i>	108
- <i>Uso dos microtubos de PP funcionalizados com PANI para imobilização de extrato de levedura para posterior síntese de nanopartículas de prata</i>	110
<i>Conclusões</i>	111
<i>Referências Bibliográficas</i>	112
Considerações finais	117
Perspectivas	119
Anexos	120

Introdução

A imobilização de biomoléculas reúne um cabedal de técnicas com a finalidade comum de reter ou confiná-las em uma região definida do espaço, preservando suas propriedades e atividades, de modo a possibilitar seu uso de forma repetida e/ou continuada (Silva, 2000). A imobilização reduz o custo operacional do uso de biomoléculas, uma vez que elas podem ser reutilizadas em vários ciclos. Além disso, possibilita a interrupção do curso de reação pela remoção do conjunto biomolécula/suporte do ambiente reacional, por meio de procedimentos simples como centrifugação, filtração ou por remoção física direta. Com isso, pode-se garantir maior controle de qualidade sobre o processo de hidrólise, além de prevenir ou minimizar a contaminação pela presença da biomolécula no produto final, caso isso seja indesejado (Soumanou e Bornscheueur, 2003).

Dentre as biomoléculas que são mais amplamente imobilizadas em suportes para o desenvolvimento de biorreatores, podem ser destacadas as enzimas. De modo geral, enzimas imobilizadas tornam-se mais estáveis (com aumento da estabilidade operacional e termoestabilidade); apresentam reprodutibilidade catalítica aumentada; sofrem menos interferência de inibidores/ativadores e também de condições adversas do meio reacional (Betancor e Luckarift, 2008).

Existem diversos métodos conhecidos para imobilização de enzimas. De acordo com o tipo de forças envolvidas no processo de imobilização esses métodos podem ser divididos em três classes gerais: *i*) ligações químicas, onde ligações covalentes são formadas com a enzima (Cetinus e Oztop, 2003); *ii*) adsorção física, com a existência de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Livage et al, 2001); *iii*) aprisionamento físico, como por exemplo em sistemas tipo sol-gel ou polieletrólitos com múltiplas camadas (Wang e Caruso, 2005). A escolha do método de imobilização dependerá das vantagens apresentadas, como tempo de preparo, custo, estabilidade da ligação e a durabilidade do sistema (Lopes, 2003).

Além da influência do método de imobilização, as características fisicoquímicas da enzima e do suporte escolhidos também devem ser consideradas. Nesse contexto, a imobilização de tripsina (E.C. 3.4.21.4) em diversas matrizes poliméricas tem sido amplamente investigada (Wu et al, 2011, Wang et al, 2000; Sakai-Kato et al, 2002). A tripsina é uma enzima proteolítica pertencente a um extenso grupo de proteínas cuja

função comum é promover a degradação de outras proteínas ou peptídeos pela clivagem hidrolítica de ligações peptídicas em sítios específicos, em geral após resíduos de aminoácidos básicos (Watanabe, 2004). Essa enzima pertence à classe chamada de serinoproteinases, apresentando um resíduo de serina no sítio ativo, que intermedeia o ataque nucleofílico responsável pela clivagem da ligação peptídica (Bode e Huber, 1992). Outra característica comum às serinoproteinases é a existência da tríade catalítica no sítio ativo da enzima, formada pelos resíduos de: histidina 57, ácido aspártico 102 e serina 195 (Bode e Huber, 1992). O mecanismo de ação envolve a acomodação dos resíduos de aminoácidos do substrato os quais são carregados positivamente (lisina e arginina) que interagem por meio de forças eletrostáticas com grupos carboxila da enzima em uma região conhecida como bolso de ligação. Esse fato resulta na clivagem de ligações peptídicas adjacentes aos resíduos de lisina e arginina (Krieger et al, 1974).

A tripsina livre (não imobilizada) apresenta atividade ótima em faixas alcalinas de pH (em torno de 8) e temperatura próxima a 37°C, o que dificulta o armazenamento da tripsina em solução, quando não acidificada, e em condições ambientes de temperatura, devido à ocorrência de hidrólise de uma molécula enzimática sobre outra (autólise). Assim sendo, a técnica de imobilização apresenta o benefício de evitar ou pelo menos minimizar a autólise da enzima, que é um fator limitante para a sua utilização na forma livre. A tripsina constitui um alvo de interesse central nos estudos em proteômica, os quais correspondem atualmente a um dos campos mais promissores na pesquisa bioquímica de proteínas (Liu et al, 2007; Renella et al, 2014).

Sistemas elaborados contendo enzimas imobilizadas têm sido amplamente investigados no intuito de minimizar tempo, custos e quantidade de amostra requerida para ensaios de hidrólise proteica: tanto em sistemas que aplicam reatores contendo enzimas imobilizadas acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência (Girelli e Mattei, 2005); quanto em reatores enzimáticos microfluídicos associados a métodos sensíveis de detecção, como a espectrometria de massa (Krenková e Foret, 2004).

Assim sendo, a escolha adequada do suporte a ser utilizado para a imobilização de biomoléculas é tão importante quanto a escolha correta do método de imobilização. Atualmente, uma variedade de suportes tem sido utilizada para a imobilização de enzimas. Classificando-os de acordo com sua natureza química, podem ser descritas duas classes: suportes orgânicos e inorgânicos.

Os suportes orgânicos, que podem ser naturais ou sintéticos, têm sido amplamente propostos para a imobilização de enzimas, seja por meio da formação de superfícies planas ou filmes, ou sistemas particulados. Sua principal vantagem constitui da sua versatilidade por participarem em um grande número de diferentes reações químicas, o que favorece sua ativação. Por exemplo, Liddy e colaboradores investigaram em 1975 a insolubilização de tripsina pela imobilização em co-polímeros de polipropileno (PP) modificados por radiação eletromagnética. Complementarmente a esse trabalho pioneiro e a outros que iniciaram a investigação microscópica dos suportes poliméricos (Caramori e Fernandes, 2004; 2008), a presente Tese propõe uma abordagem sobre a investigação da organização nanométrica de superfícies de diversos materiais para posteriores testes de imobilização enzimática. As superfícies de PP escolhidas correspondem à face interna de microtubos. Esse material apresenta grande potencial para imobilização de enzimas proteolíticas na sua superfície interna pela praticidade de uso ou quando se almeja, por exemplo, a obtenção de um sistema de hidrólise proteica multienzimática.

Massolini e Calleri (2004) apontaram diversos outros materiais poliméricos sintéticos como promissores para imobilização de tripsina acoplada a métodos “*on-line*” de separação e análise molecular. Nesse contexto, membranas poliméricas porosas representam sistemas com elevado potencial para a imobilização de enzimas e obtenção de reatores proteolíticos microfluídicos. Essas membranas representam uma classe de materiais com constituição química diferente (*nylon*, nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno - PVDF- e politetrafluoretileno – PTFE, por exemplo), possibilitando uma diversidade de propriedades e de interações com outros sistemas moleculares. Na presente Tese foi realizada também a caracterização da organização nanométrica desses materiais, bem como a elucidação de algumas das suas propriedades físicas e químicas.

Os suportes inorgânicos, diferentemente dos orgânicos, apresentam em geral vantagens como maior durabilidade, densidade, estabilidade e controle de porosidade (Nagashima, 1984, Yiu et al 2001, Takahashi et al 2000). Outra vantagem apresentada por essa classe de suportes é a facilidade de sua esterilização e limpeza (Mouddeb et al, 1996). Partículas de sílica são sistemas amplamente investigados como suportes inorgânicos para imobilização de enzimas, devido às propriedades atrativas, como por exemplo, a capacidade elevada de adsorção de diversos peptídeos e enzimas, como a lisozima, peroxidase, catalase e tripsina, já testada extensivamente anteriormente

(Vertegel et al, 2004). Várias modificações podem ser aplicadas a esse suporte com o objetivo de aperfeiçoar o sistema e obter materiais com taxas de retenção de enzimas ativas altas. A modificação de superfícies por acoplamento químico de reagentes, como por exemplo, o 3-aminopropil-trietoxisilano (APTS), altera a hidrofobicidade e nanorrugosidade da superfície, podendo torná-la mais propensa para imobilização de enzimas por adsorção (Narkiewicz et al, 2010).

Além da imobilização de enzimas, a imobilização de células e seus componentes biomoleculares representam uma estratégia promissora na construção de “microfábricas” e de sistemas de sensoriamento (Weibel et al, 2007). Nesse contexto, foram adicionalmente imobilizadas células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em superfícies de PP funcionalizadas com polianilina (PANI) para se explorar suas potencialidades bionanotecnológicas.

As aplicações das técnicas de caracterização em nanoescala dos diversos materiais desenvolvidas ao longo dessa Tese são uma consequência do desejo de pesquisar e compreender características do microambiente gerado pelo processo de imobilização. De maneira geral, os pesquisadores relacionam a melhora na atividade catalítica e de estabilização em condições adversas de meio reacional a esse microambiente gerado pela imobilização. Tentou-se esclarecer essas possíveis influências considerando-se as propriedades em nanoescala sobre os processos de imobilização de enzimas e o perfil catalítico dessas biomoléculas imobilizadas.

Referências Bibliográficas

Betancor, L.; Luckarift, H.R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis, *Trends in Biotechnology*, v. 26, pp. 566–572. 2008.

Bode W.; Huber R. Natural protein proteinase-inhibitor and their interaction with proteinases, *European Journal of Biochemistry*, v. 204, pp. 433–451. 1992.

Caramori, S.S.; Fernandes, K.F. Covalent immobilisation of horseradish peroxidase onto poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite. *Process Biochemistry*, v. 39, pp. 883–888. 2004.

Caramori, S.S.; Fernandes, K.F. The use of poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite for trypsin immobilisation. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, pp. 1159–1163. 2008.

Cetinus, S.A.; Oztop, H.N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, pp. 889–894. 2003.

Girelli, A.M.; Mattei, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, v. 819, pp. 877–882. 2005.

Krenkova, J.; Foret, F. Immobilized microfluidic enzymatic reactors, *Electrophoresis*, v. 25, pp. 3550–3563. 2004.

Krieger, M. et al. Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivative and a model for substrate binding, *Journal of Molecular Biology*, v. 83, pp. 209–230. 1974.

Liu, J. et al. On-chip enzymatic microreactor using trypsin-immobilized superparamagnetic nanoparticles for highly efficient proteolysis, *Journal of Chromatography A*, v. 1176, pp. 169–177. 2007.

Livage, J. et al. Encapsulation of biomolecules in silica gels, *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 13, pp. 673–691. 2001.

Lopes, F.M. Biossensor espectrofotométrico para determinação de glicose. 2003. 51f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

Massolini, G.; Calleri, E. Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: Recent developments and analytical applications, *Journal of Separation Science*, v. 28, pp. 7–21. 2004.

Mouddeb, H. et al. Membrane reactor for acid latic production, *Journal of Membrane Science*, v. 114, pp. 59–71. 1996.

Nagashima, M. Continuous methanol fermentation using immobilized yeast cells, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 21, pp. 49–58. 1984.

Narkiewicz, U. et al. Preparation and characterization of magnetic carbon nanomaterials bearing APTS–silica on their surface, *Journal of Materials Science*, v. 45, pp. 1100–1106. 2010.

Renella, G. et al. Environmental proteomics: A long march in the pedosphere, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 69, pp. 34–37. 2014.

Sakai-kato, K. et al. On-line trypsin-encapsulated reactor by the sol-gel method integrated into capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 74, pp. 2943–2949. 2002.

Silva, K.F.F. Imobilização de horseradish peroxidase em diferentes polianilinas. 2000.139f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Universidade Estadual de Campinas. 2000.

Soumanou, M.M.; Bornscheueur, U.T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil, *Enzyme Microbiology Technology*, v. 33, pp. 97–103. 2003.

Takahashi, H. et al. Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica, *Chemistry of Materials*, v. 12, p. 3301–3305. 2000.

Vertegel, A.A. et al. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir*, v. 20, pp. 6800–6807. 2004.

Wang, C., Oleschuk, R., Ouchen, F., et al. Integration of immobilized trypsin bead beds for protein digestion within a microfluidic chip incorporating capillary electrophoresis separations and an electrospray mass spectrometry interface, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 14, pp. 1377–1383. 2000.

Wang, Y.; Caruso, F. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation, *Chemistry of Materials*, v. 17, pp. 953–961. 2005.

Watanabe, E.O. Estudo da precipitação de tripsina com o uso de sais voláteis. 2004.139f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. 2004.

Weibel, D.B. et al. Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, pp. 209–218. 2007.

Wu, S. et al. A novel organic-inorganic hybrid monolith for trypsin immobilization. *Science China: Life Sciences*, v. 54, pp., 54–59. 2011.

Yiu, H.H.P. et al. Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces, *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymology*, v. 15, p. 81–92. 2001.

Objetivos

Objetivo Geral

Caracterizar a estrutura e propriedades fisicoquímicas de suportes (superfícies de polipropileno (PP) normal, modificado (*Maxymum Recovery*[®]) e funcionalizada com polianilina (PANI), membranas poliméricas porosas e partículas de sílica) para determinar seus padrões de organização e homogeneidade; imobilizar biomoléculas; e realizar testes de atividade biológica das estruturas imobilizadas.

Objetivos específicos:

- Avaliar a morfologia e a nanorrugosidade das superfícies escolhidas como possíveis suportes para imobilização de biomoléculas – polipropileno (PP) normal e modificado (*Maxymum Recovery*[®]) (Capítulos I e II); membranas de nitrocelulose, nylon, politetrafluoretileno –PTFE – e fluoreto de polivinilideno – PVDF (Capítulo III); sílica (Capítulo IV) e polipropileno modificado com polianilina (PP/PANI) (Capítulo V);
- Avaliar as propriedades mecânicas das superfícies de PP normal e modificado (*Maxymum Recovery*[®]) (Capítulos I e II); membranas de nitrocelulose, nylon, politetrafluoretileno –PTFE – e fluoreto de polivinilideno – PVDF (Capítulo III); sílica (Capítulo IV) e polipropileno modificado com polianilina (PP/PANI) (Capítulo V), frente aos padrões de atração e adesão com a ponteira de nitreto de silício;
- Testar as propriedades de interações químicas das superfícies de polipropileno com solventes específicos (água, acetonitrila, bicarbonato de amônio e ácido trifluoroacético) (Capítulo I), e das superfícies das membranas poliméricas porosas com uma solução proteica (albumina) (Capítulo III);
- Avaliar a estrutura química e testar a composição elementar das membranas poliméricas porosas de PVDF; PTFE; “nylon” e nitrocelulose (Capítulo III);
- Desenvolver uma metodologia precisa para quantificação indireta da imobilização de tripsina (Capítulo IV);

- Modificar ou funcionalizar superfícies de polipropileno (PP) por meio da adsorção de camadas de cadeias de polianilina (PANI) (Capítulo V);
- Testar a atividade do sistema PP/PANI como possíveis agentes sequestradores de íons (Capítulo V);
- Imobilizar tripsina nas superfícies de PP funcionalizadas com PANI (ativadas e não ativadas com glutaraldeído) (Capítulo V);
- Testar a atividade da enzima tripsina imobilizada nas superfícies de PP/PANI sobre substratos colorimétrico (BApNA) e proteico (albumina) (Capítulo V);
- Imobilizar células e biomoléculas nas superfícies de PP/PANI e aplicar esses sistemas como reatores para a síntese de nanopartículas de prata (Capítulo V).

Material e Métodos

Obtenção dos suportes e biomoléculas

- Microtubos de polipropileno para caracterização de superfície:

Para as análises comparativas das propriedades das superfícies internas de microtubos de polipropileno (PP) com capacidade de 1,5 mL, foram utilizadas amostras fabricadas pela Axygen (Califórnia, Estados Unidos); Perfecta (Brasil) e por outro fabricante não identificado. Os microtubos foram segmentados conforme o esquema a seguir:

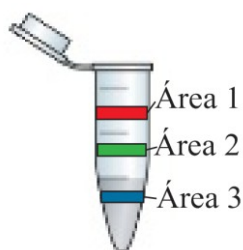


Figura 1 – Representação esquemática da amostragem ao longo de cada microtubo de polipropileno.

Das áreas segmentadas foram retirados pequenos quadrados (aproximadamente 6 mm^2), os quais foram fixados, com auxílio de uma fita dupla-face, nos suportes metálicos para as análises microscópicas.

- Modificação da superfície interna dos microtubos de polipropileno com polianilina:

Os microtubos que foram submetidos ao procedimento de funcionalização, com capacidade de 1,5 mL, foram fabricados por Axygen (Califórnia, Estados Unidos). Antes da funcionalização, cada superfície foi lavada com excesso de H_2O ultrapura Milli-Q (três ciclos de lavagens com $1000 \mu\text{L}$), seguido de um ciclo de lavagem com $1000 \mu\text{L}$ de etanol 70% (v/v) e secagem a 40°C . Após a secagem, os microtubos foram pesados em balança analítica (AX200, Shimadzu, Filipinas) para o registro das massas iniciais (pré-funcionalização). Cada ciclo de funcionalização das superfícies dos microtubos de PP consistiu no contato e exposição a $200 \mu\text{L}$ de uma solução ácida (HCl $10 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) de anilina $0,44 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ por 10 min a 25°C , seguido do adição de $200 \mu\text{L}$ da solução aquosa de persulfato de amônio $0,61 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ por 60 min. Seguiu-se com a retirada da solução de polianilina não aderida à superfície e quatro ciclos de lavagens com 1,5 mL de solução aquosa de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ pH 7,6 para

remoção completa dos reagentes utilizados não adsorvidos. Após a secagem dos microtubos a 40°C seguiu-se com a pesagem e registro da massa. Após quatro ciclos completos de funcionalização das superfícies internas dos microtubos de PP e registros dos ganhos de massa, esses foram lavados com H₂O ultrapura Milli-Q, secos, tampados e armazenados a temperatura ambiente. Alguns microtubos funcionalizados com PANI foram submetidos à reação de ativação pelo tratamento com 500 µL de uma solução de glutaraldeído 2% (v/v), por um intervalo de 1 h, sob agitação constante de 80 rpm a 25°C.

- Membranas poliméricas porosas:

As membranas poliméricas testadas (nitrocelulose, nylon, politetrafluoretileno – PTFE – e fluoreto de polivinilideno – PVDF) foram fabricadas pela Millipore (Irlanda), com poros de 0,45 µm. Após a remoção dos suportes plásticos, as membranas foram cortadas em formato circular com cerca de 5 mm de diâmetro e foram fixadas aos suportes metálicos para as análises por meio de microscopia de força atômica (MFA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com a disposição da membrana na embalagem, foi possível diferenciar a parte superior (aquela que primeiro entra em contato com a solução filtrada) e a parte oposta, inferior.

Foram realizadas análises das amostras antes e após a realização de testes de filtração de uma solução de albumina 1 mg × mL⁻¹ para cada amostra. Os testes de eficiência de filtração foram realizados após a leitura espectrofotométrica da solução original em um comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro da marca QUIMIS, modelo Q798 U (Brasil). Considerou-se a solução inicial ou controle como 100% e as demais medidas após a filtração foram calculadas relativamente a essa.

- Sílica:

As partículas de sílica (Sílica gel Branca, Reagen), comumente utilizadas como agentes dessecantes, apresentavam diâmetro médio aproximado de 1 a 4 mm.

- Sílica silanizada com aminopropiltriétoxissilano (APTS):

Para a silanização das partículas de sílica, pesou-se 8 g de sílica seca. Tratou-se com 5,2 g de APTS, dissolvido em 115 mL de tolueno, sob agitação constante de 80 rpm, por 4 h, à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). A sílica tratada foi filtrada a vácuo e lavada por três vezes com excesso de tolueno. Após a filtração, secou-

se o material em estufa a 150°C por um tempo de 4 h. O material foi armazenado em frasco de plástico vedado, ao abrigo da luz.

- *Tripsina pancreática bovina:*

A enzima utilizada nos ensaios de imobilização e verificação de atividade foi a tripsina pancreática bovina (E.C. 3.4.21.4) fabricada pela empresa Sigma (tipo I, duplamente cristalizada, Suíça).

- *Levedura Saccharomyces cerevisiae:*

Foram utilizadas nos testes de imobilização de biomoléculas nas superfícies internas de microtubos de PP modificados com PANI: extrato de levedura (Vetec), fermento comercial à base de levedura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada (Fermipan[®]) e levedo de cerveja comercial.

Análises de superfícies por microscopia de força atômica (MFA)

As análises das superfícies dos microtubos de polipropileno; das membranas poliméricas porosas; e das esferas de sílica foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica modelo SPM-9600 (Shimadzu, Japão). Foram adquiridas imagens em modo contato ou dinâmico, sendo que as dimensões das áreas varridas variaram de 25 a 2500 μm^2 , dependendo das características das superfícies de cada material analisado. Para análises no modo contato foram utilizados cantilevers com 200 μm de comprimento, integrados com ponteiros piramidais de nitreto de silício com constante de mola de $\sim 0,15 \text{ N} \times \text{m}^{-1}$ e raio de curvatura $< 20 \text{ nm}$ (Olympus, Japão). Para aquisição de imagens no modo dinâmico foram utilizados cantilevers retangulares de alumínio, com 125 μm de comprimento, integrados com ponteiros piramidais de silício com constante de mola de $\sim 42 \text{ N} \times \text{m}^{-1}$ e frequência de ressonância de $\sim 320 \text{ kHz}$, e raio de curvatura $< 10 \text{ nm}$ (Nanosensors PPP-NCHR-20). A área máxima do escâner utilizado é de $125 \times 125 \times 7 \mu\text{m}$ nas direções x, y e z, respectivamente. As imagens foram obtidas em 512×512 pixels com uma frequência de varredura de 1 Hz, em diferentes posições na amostra, obtendo-se informações topográficas.

As imagens obtidas foram processadas utilizando o software SPM-9600 off-line, por meio de um nivelamento no plano horizontal e por um nivelamento automático da superfície no plano bidimensional, seguidos por um ajuste de plano de fundo no eixo x.

Para análise de superfícies das amostras utilizou-se a função de análise de superfície, possibilitando a mensuração de diversas variáveis de rugosidade.

Espectroscopia de força

Para avaliação das forças de interação entre as superfícies e a ponteira de nitreto de silício, utilizou-se a MFA em modo contato, por meio do mesmo microscópio SPM-9600. Para tanto, utilizou-se cantilever com 200 μm de comprimento (constante de mola de $\sim 0,15 \text{ N} \times \text{m}^{-1}$ e frequência de ressonância de $\sim 24 \text{ kHz}$), integrados com ponteiros piramidais de nitreto de silício (raio de curvatura $< 20 \text{ nm}$). A frequência de varredura utilizada foi de 1 Hz e a amplitude de 20 V, com o ponto de amplitude inicial de 3 V. As curvas de força obtidas foram processadas utilizando o software SPIP V.5.1.11 (Image Metrology, Dinamarca), com as seguintes condições para obtenção dos parâmetros referentes às curvas de força: temperatura de 23°C, ajuste da curva de força pela média entre as curvas de aproximação e retração, ponto zero automático e curva de aproximação como linha de base. Foram obtidas pelo menos dez curvas de força conclusivas para cada amostra, sendo que as curvas de aproximação e retração as quais foram inconclusivas (que não foi possível calcular alguns dos parâmetros) foram excluídas das análises de dados.

Espectrometria de massa

- Análises para determinação das massas moleculares (MS) e para o sequenciamento de peptídeos (MS/MS)

Nos ensaios de verificação dos possíveis efeitos de solventes sobre as superfícies de polipropileno de microtubos, foram utilizados: água ultrapura Milli-Q; bicarbonato de amônio $1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ (em água); acetonitrila P.A. e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). As superfícies internas dos microtubos foram expostas a cada solvente por diferentes tempos (0, 6, 12, 18 e 24 h). Após o término de cada intervalo de tempo, uma alíquota era retirada (10 μL), a qual era utilizada para as análises por meio de espectrometria de massa.

As análises foram conduzidas em espectrômetro de massa com ionização/dessorção à laser assistida por matriz e separação por tempo de voo (MALDI-TOF MS) (UltraFlex III, Bruker Daltonics, Alemanha) controlado pelo software FlexControl 3.0. As amostras foram misturadas com uma solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3) e aplicadas (0,5 μL) em duplicata em uma placa tipo MTP

AnchorChip var/384. A faixa de massas moleculares analisada variou de m/z 600 a 2500, utilizando o modo refletido positivo. Os espectros de massa foram obtidos em modo automático, com 200 disparos do laser e uma intensidade relativa fixada em 34%. Os resultados foram analisados utilizando o software FlexAnalysis 3.0.

Os espectros de fragmentação dos íons referentes aos peptídeos obtidos mediante hidrólise enzimática foram adquiridos utilizando-se o método LIFT[®]. Utilizou-se 19 kV como valor do parâmetro de tensão da célula, e uma aceleração final de 29 kV. A pressão na célula LIFT foi ajustada para valores em torno de 4×10^{-7} mbar. O íon precursor foi selecionado pelo seletor de íon (TIS) e em algumas situações utilizou-se o supressor de íons metaestáveis (PLMS). Os espectros MS/MS foram adquiridos com aproximadamente 2000 disparos de laser. Foram utilizados os programas FlexAnalysis 2.4 ou 3.0 (Bruker Daltonics) para interpretar manualmente espectros de massa.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As análises foram conduzidas em equipamento JSM 700-1F (JEOL, Japão), no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília. As amostras foram acondicionadas em suportes de latão (*stubs*) e revestidas com ouro em metalizador Balzers - SCD 050 (Baltec, Áustria), a 21°C, em aproximadamente $2,6 \times 10^{-7}$ Pa, por 180 segundos. Após o revestimento com ouro, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura operado a 15 kV. As aquisições das imagens de MEV foram realizadas sob atmosfera de pressão reduzida ($1,9 \times 10^{-4}$ Pa), e as magnificações variaram de 20 a 30.000 vezes de aumento. As análises de EDS foram realizadas após a aquisição de cada imagem de MEV, sendo que os valores de “*probe current*” foram ajustados de modo que o “*dead time*” atingisse valores em torno de 20%.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em equipamento FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer) - 4100 (Jasco, Estados Unidos) no Laboratório de Química Analítica Ambiental – LQAA - da Universidade de Brasília. O número de onda foi variado de 4000 a 500 cm^{-1} (infravermelho próximo). As amostras foram utilizadas em estado sólido, sendo que pequenos fragmentos de cada amostra intacta, ou a amostra

pulverizada, foram acoplados ao sistema responsável pela atenuação total da reflectância (ATR), para posterior aquisição dos espectros. As análises foram realizadas em triplicata.

Difração de raios-X (DRX)

Os difratogramas das amostras foram obtidos em um difratômetro de pó da marca Bruker (Alemanha), modelo D8 Focus, com radiação $\text{CuK}\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$ a 40 kV e 30 mA. A varredura foi realizada a $0,5^\circ \text{ min}^{-1}$ e os valores de 2θ foram analisados na região de 20 a 80° .

Análise termogravimétrica (TGA)

Os materiais foram caracterizados por TG/DTG e DTA, em um analisador simultâneo termogravimétrico e termodiferencial DTG-60H/Shimadzu (Japão), utilizando cerca de 5 mg da amostra em cadinho de platina, com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$, de 25°C a 750°C , em atmosfera inerte ($30 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$). As temperaturas em que a velocidade de decomposição da amostra é máxima (Td) foram obtidas das curvas DTG.

Imobilização de tripsina em sílica normal e silanizada

As esferas de sílica foram incubadas em uma solução de $52 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ de tripsina com sílica, de forma a se manter a proporção $0,25 \text{ g de suporte} \times 5 \text{ mL}^{-1}$ de solução de enzima. A temperatura de reação foi de 4°C . As combinações de valores de pH (entre 5,6 e 9,2; com o uso de: tampão acetato de sódio; fosfato de sódio; Tris-HCl e bicarbonato de sódio $0,1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$) e tempo de reação (entre 10 e 110 min) foram determinadas por planejamento experimental do tipo PCC, posteriormente descrito. A eficiência de imobilização foi determinada de modo indireto (fração não imobilizada) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa ultra-rápida (FAST/HPLC).

Imobilização de tripsina nos microtubos de polipropileno funcionalizados

Para imobilização de tripsina por adsorção, incubou-se $250 \mu\text{L}$ uma solução de $52 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ de tripsina nos microtubos de PP funcionalizados com PANI, em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ pH 7,6. A temperatura de reação foi de 4°C , sob agitação

constante de 10 rpm. A eficiência de imobilização foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa ultra-rápida (FAST-HPLC).

Na imobilização de tripsina por meio de formação de ligação química covalente, cada superfície de PP funcionalizada foi ativada pela reação com uma solução aquosa de glutaraldeído 2% (v/v), por 60 min, a 25°C. Após a ativação das superfícies, lavagens com excesso de água ultrapura Milli-Q e secagem, seguiu-se o protocolo descrito para a imobilização por adsorção.

Quantificação da eficiência de imobilização por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa ultra-rápida (FAST/HPLC)

Inicialmente realizou-se a separação cromatográfica da tripsina $52 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ em solução aquosa; e coletou-se a fração correspondente à tripsina, a qual teve sua identidade confirmada por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS). Para a elaboração de uma curva padrão para determinação da concentração de tripsina livre foram preparadas soluções com concentrações relativas à solução inicial ($52 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$), que foi considerada como 100%. As concentrações preparadas foram de 90%; 80%; 70%; 60%; 50%; 40%; 30%; 20%; 10%; 5% e 2,5% em relação à solução inicial. Em cada separação cromatográfica, o volume de injeção foi de 50 μL de amostra, e a absorbância foi monitorada nos comprimentos de onda 216 e 280 nm (Detector UV/Vis SPD-20^a, Shimadzu, Japão). Realizou-se a separação e purificação das amostras em cromatografia líquida de alta eficiência ultra-rápida (FAST-HPLC) utilizando um equipamento da Shimadzu (modelo LC-20AD, Japão), com uma coluna Shim-pack XR-ODS 2,0 mm \times 50 mm. O gradiente de concentração do solvente apolar escolhido (solvente B, acetonitrila em 0,1 % de TFA) foi de 5% até os 3 min (condição isocrática), seguindo do aumento linear em duas faixas: até 65% aos 18 min; e de 65% até 95% aos 20 min, permanecendo nessa condição até os 23 min. O solvente A refere-se a uma solução aquosa de 0,1% de TFA. O fluxo foi de 0,5 mL \times min⁻¹. As separações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente.

Após a aquisição dos cromatogramas calculou-se as áreas sob os picos referentes à tripsina, utilizando-se o software *LC Solution* (Shimadzu), sendo que cada valor absoluto de área sob a curva foi utilizado na elaboração das curvas-padrão.

A cromatografia líquida de alta eficiência ultra-rápida (FAST-HPLC) foi também utilizada na separação de peptídeos resultantes da hidrólise de albumina sérica bovina (BSA) clivada pela tripsina imobilizada nos diversos suportes. Nessas análises

foram utilizadas as mesmas condições e ajustes descritos anteriormente para a quantificação da eficiência de imobilização.

Imobilização de biomoléculas em microtubos de PP modificados para síntese de nanopartículas de prata

As seguintes soluções, na concentração de $6 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$, foram utilizadas nos testes de imobilização de biomoléculas nas superfícies internas de microtubos de PP modificados com PANI: extrato de levedura (Vetec), fermento comercial à base de levedura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada (Fermipan[®]) e levedo de cerveja comercial. As soluções foram submetidas à ultrassonicação por 29 minutos, na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ pH 7. O tempo de imobilização foi de 1 h, à temperatura de 25°C. Na imobilização por adsorção, cada solução foi incubada nos microtubos funcionalizados com PANI (sem a ativação com glutaraldeído), enquanto que na imobilização covalente incubou-se naqueles previamente ativados pela reação com uma solução aquosa de glutaraldeído 2% (v/v), por 60 min, a 25°C.

Síntese de nanopartículas de prata utilizando os microtubos de PP funcionalizados como reatores

Os microtubos funcionalizados com PANI; aqueles ativados com glutaraldeído; e aqueles contendo extrato de levedura, Fermipan[®] e levedo de cerveja comercial imobilizados por adsorção e covalentemente foram testados como reatores para síntese de nanopartículas de prata. Para tanto, incubou-se cada microtubo com uma solução de nitrato de prata $20 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$, sob agitação circular constante de 80 rpm, a 25°C. Os tempos de reação foram de 12 e 24 h.

Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta de superfície das nanopartículas de prata sintetizadas

As análises por espalhamento de luz dinâmico para estimação das dimensões das nanopartículas de prata (diâmetro hidrodinâmico) e das cargas superficiais (potencial Zeta) foram realizadas em equipamento ZetaSizer (Malvern, Reino Unido) no Laboratório de Biofísica da Universidade de Brasília. As amostras foram diluídas em água de forma a se obter uma função de correlação com intercepção entre 0,85 e 1, juntamente com uma contagem de fótons e índice de polidispersividade (PDI) adequados para a realização das aquisições. O ângulo de detecção do espalhamento de luz utilizado

nas análises foi de 173°, sendo realizadas em cubetas descartáveis de poliestireno, com os seguintes ajustes nas medições: poliestireno/látex como modelo de material; modelo geral de análise; água como dispersante; duração de medida e análise multimodal automáticos; temperatura de 25°C e número de medidas igual a três. As análises foram realizadas em triplicata, considerando-se a relação do número de partículas por tamanho.

Determinação da condutividade elétrica de soluções de cloreto de ferro (FeCl₃)

Foi utilizado 1 mL de solução antes e após a incubação nos microtubos funcionalizados com PANI, para a avaliação da possível remoção/captação de íons da solução. As soluções selecionadas foram de FeCl₃.6H₂O, com concentrações variando entre 5 mg × mL⁻¹ a 0,25 mg × mL⁻¹. Os tempos de incubação foram de 1 h ou 24 h, e as leituras foram realizadas a 18,2°C, após 30 segundos de estabilização do valor de condutividade em condutivímetro microprocessado de bancada modelo Q795M2 (Quimis, Brasil).

Teste colorimétrico de atividade da tripsina livre

Testou-se a atividade da tripsina livre incubando-se 40 µL de tampão Tris-HCl 50 mmol × L⁻¹ contendo CaCl₂ 20 mmol × L⁻¹ (pH 8,2), com 40 µL de solução de tripsina 5,2 µmol × L⁻¹ por um intervalo de tempo de 10 minutos. Seguiu-se com o acréscimo de 400 µL de substrato BApNA 100 µmol × L⁻¹ em tampão Tris-HCl 50 mmol × L⁻¹ contendo CaCl₂ 20 mmol × L⁻¹, sob agitação circular de 80 rpm, por um tempo de 10 minutos de reação a 37°C. Para finalizar a reação, adicionou-se 30 µL de solução de ácido acético 30% (v/v). A quantificação foi realizada espectrofotometricamente em equipamento UV mini-1240 (Shimadzu, Japão), com leitura em comprimento de onda de 410 nm.

Teste colorimétrico de atividade da tripsina imobilizada

Nos testes de atividade da tripsina imobilizada em sílica, na hidrólise do substrato BApNA, incubou-se as partículas de sílica contendo tripsina imobilizada em microtubos de PP de 1,5 mL certo volume de tampão Tris-HCl 50 mmol × L⁻¹ contendo CaCl₂ 20 mmol × L⁻¹ (pH 8,2), para se manter a proporção de 40 µL de tampão para cada 208 mmol de tripsina imobilizada. O tempo de incubação foi de 10 min. Seguiu-se com a adição de substrato BApNA 100 µmol × L⁻¹ em tampão Tris-HCl 50 mmol × L⁻¹

contendo $20 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ de CaCl_2 (na proporção de 1:5 em relação ao volume inicial de tampão), sob agitação circular de 80 rpm, por um tempo de 10 min de reação à 37°C . O término da reação foi determinado pela separação do sobrenadante contendo o substrato hidrolisado da partícula de sílica contendo a enzima imobilizada (por adsorção ou covalentemente). A quantificação foi realizada espectrofotometricamente em equipamento UV mini-1240 (Shimadzu, Japão), com leitura em 410 nm de comprimento de onda.

Nos testes colorimétricos de atividade da tripsina imobilizada na superfície interna de microtubos de PP funcionalizados com PANI, incubou-se em cada microtubo modificado certo volume de tampão Tris-HCl $50 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ contendo CaCl_2 $20 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ (pH 8,2), para se manter a proporção de 40 μL de tampão para cada 208 mmol de tripsina imobilizada. O tempo de incubação foi de 10 min. Seguiu-se com o acréscimo de substrato BApNA $100 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl $50 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ contendo $20 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ de CaCl_2 (na proporção de 1:5 em relação ao volume inicial de tampão), sob agitação circular de 80 rpm, por um tempo de 10 min de reação à 37°C . O término da reação foi determinado pela separação do sobrenadante contendo o substrato hidrolisado, da superfície de PP modificada com PANI contendo a enzima imobilizada (por adsorção ou covalentemente). A quantificação foi realizada espectrofotometricamente em equipamento UV mini-1240 (Shimadzu, Japão), com leitura em 410 nm de comprimento de onda.

Teste de hidrólise da albumina sérica bovina utilizando a tripsina imobilizada em microtubos de polipropileno modificados

Nos testes de atividade da tripsina imobilizada em sílica sobre o substrato proteico albumina, utilizou-se uma solução de albumina $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ em tampão bicarbonato de amônio $50 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$, com um volume que mantém a proporção de 1:10 entre a quantidade de substrato e aquela de enzima imobilizada, respectivamente. O tempo de reação foi de 24 h à temperatura de 37°C . O perfil catalítico foi determinado por análise de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF com procedimentos idênticos aos descritos previamente.

Nos testes de verificação do perfil catalítico da tripsina imobilizada por adsorção e via ligação covalente nas superfícies internas de microtubos de PP modificados com PANI, utilizou-se como substrato proteico uma solução de albumina $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ em tampão bicarbonato de amônio $50 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$, em um volume que mantivesse a

proporção de 1:10 entre a quantidade de substrato e aquela de enzima imobilizada, respectivamente. O tempo de reação foi de 24 h à temperatura de 37°C. Como controle (teste da atividade da enzima livre sobre a albumina), foram utilizadas as mesmas condições de reação descritas para a enzima imobilizada. O perfil catalítico foi determinado por análise de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF com procedimentos idênticos aos descritos previamente.

Análises estatísticas e planejamento experimental

A análise de variância (ANOVA) e os testes estatísticos (teste t e Tukey) foram realizados utilizando-se o software Origin 8.0. Os dados exibidos nos gráficos são referentes às médias e seus respectivos erros-padrão, com nível de significância (p) < 0,05. Nos testes de verificação da normalidade da distribuição dos dados (aplicados aos resultados de ganho de massa dos microtubos de PP após os ciclos de funcionalização com PANI), utilizaram-se os valores da diferença de massa entre os microtubos pré- e pós-funcionalização. Aos valores obtidos para cada microtubo, aplicou-se o cálculo de contagem de frequência, ajustando o número de pontos para oito; com quatro graus de liberdade e R-quadrado igual a 0,9.

Os testes de estatística multivariada, particularmente as análises de componentes principais referentes às análises por meio de espectrometria de massa de possíveis componentes de PP liberados frente à exposição a diversos solventes, foram realizados utilizando-se o software PAST (Hammer; Harper, 2001). Para tanto, os íons foram inicialmente ranqueados em ordem decrescente de valores de intensidade. Seguiu-se com a normalização dos dados para valores entre 0 e 1. Somente então foi aplicada a análise estatística multivariada do tipo componentes principais, com o ajuste do nível de confiança de 95% nas elipses obtidas.

O planejamento experimental escolhido foi do tipo Planejamento Composto Central (PCC), realizado com o uso do software Statistica 8.0. O planejamento composto central é um planejamento fatorial clássico em dois níveis (2^k), acrescido de alguns pontos experimentais (pontos estrela) para a estimação dos coeficientes de uma superfície de 2ª ordem (Kaminari, 2002). As vantagens referentes ao uso desse tipo de planejamento incluem a diminuição do número de pontos experimentais, com economia de tempo e reagentes, e a possibilidade de se avaliar o efeito de duas ou mais variáveis simultaneamente sobre a resposta.

No presente trabalho, utilizou-se o PCC no planejamento experimental de verificação da influência das variáveis pH e tempo da reação de imobilização. A faixa de variação do pH do meio reacional variou entre 5,8 e 9,2, enquanto os valores de tempo ficaram entre 21,9 e 98 min, conforme mostrado na tabela 1. Os ajustes utilizados no desenho experimental foram: modelo $2^{xx(2)}$ cubo + estrela; número de fatores igual a 2; número de blocos igual a 1; número de corridas igual a 10; número central (nc) igual a 4; número estrela (ns) igual a 4 e número zero (n0) igual a 2. O valor de rotatividade de α foi igual a 1,4142 e o valor de ortogonalidade de α foi igual a 1,0781.

Tabela 1 - Matriz de planejamento experimental, codificada e não codificada, para o planejamento do tipo composto central (PCC) para as variáveis pH e tempo de imobilização

Número do experimento	pH	Tempo (min)
1	6,0 (-1)	30 (-1)
2	6,0 (-1)	90 (+1)
3	8,6 (+1)	30 (-1)
4	8,6 (+1)	90 (+1)
5	5,8 (-1,26)	60 (0)
6	9,24 (+1,26)	60 (0)
7	7,6 (0)	21,98 (-1,26)
8	7,6 (0)	98,01 (+1,26)
9 (C)	7,6 (0)	60 (0)
10 (C)	7,6 (0)	60 (0)
11 (C)	7,6 (0)	60 (0)
12 (C)	7,6 (0)	60 (0)
13 (C)	7,6 (0)	60 (0)

Observação: os valores codificados encontram-se entre parênteses.

Capítulo I

Análise da superfície interna de microtubos de polipropileno

Introdução

A caracterização da estrutura de superfícies poliméricas pode revelar propriedades importantes desses materiais (Magonov e Reneker, 1997). Com isso, surgem inúmeras possibilidades de novas aplicações desses produtos, bem como novas vias para o seu controle de qualidade (Merrett et al, 2002; Cunningham, et al, 2000). Essa caracterização pode fornecer informações acerca da propensão do material em possibilitar a imobilização de moléculas, incluindo enzimas, uma vez que estudos prévios demonstram que a rugosidade de superfícies apresenta relação direta com a tendência de adsorção de materiais (Benz et al, 2001). Além disso, existem diversos estudos apontando tubos plásticos como uma fonte potencial de contaminação de amostras e de interferência em experimentos laboratoriais analíticos. Isso pode acontecer tanto pela liberação de conteúdo polimérico, quanto pela adsorção de componentes do experimento na superfície do tubo (Li et al, 2010; McDonald et al, 2008; Reingrubera et al, 2010).

Nesse contexto, a microscopia de força atômica (MFA) apresenta-se como uma ferramenta com elevado potencial de aplicação na investigação da organização em nanoescala da superfície desses materiais. Comparada com outras técnicas, a MFA apresenta diversas vantagens, tais como: preparo da amostra simples; não requer vácuo; possibilidade de análise em ambiente aquoso, o que permite a análise em condições próximas ao ambiente natural, minimizando artefatos; e pode-se ainda obter dados quantitativos de rugosidade de superfície. Além desses benefícios, a MFA oferece informações sobre propriedades mecânicas como a viscoelasticidade e dureza das amostras. Para tanto, basta se selecionar e utilizar um modo de operação adequado.

Considerando tais características da MFA, foram elaboradas as seguintes hipóteses, as quais nortearam o delineamento desse primeiro capítulo da Tese: *a)* A MFA pode ser considerada como uma ferramenta adequada para verificação de padrões de homogeneidade ao longo da superfície interna de microtubos de PP? *b)* Os padrões

de organização das superfícies poliméricas de PP apresentam alguma relação com suas tendências de liberação de componentes moleculares?

Para se testar tais hipóteses, esse capítulo teve como objetivos aplicar a MFA como potencial ferramenta de caracterização de superfícies internas de microtubos de polipropileno (PP), buscando-se por marcadores de controle de qualidade nos parâmetros de nanorrugosidade; analisar a superfície de microtubos de diferentes marcas e diferentes áreas ao longo de um mesmo microtubo; e investigar o efeito da exposição a diversos solventes frente à possível liberação de componentes da superfície polimérica, por meio de análises por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

Resultados e Discussão

Para a realização da caracterização e investigações das superfícies de PP, iniciou-se com a análise de superfícies internas de microtubos plásticos com capacidade para 1,5 mL de três diferentes marcas, por meio de MFA. Na figura 1.1 estão representadas imagens referentes às diferentes regiões dos microtubos (de acordo com o esquema representado na figura 1, seção Material e Métodos. Qualitativamente, pode-se observar heterogeneidade topográfica alta quando se compara tanto entre as diferentes marcas ou até mesmo entre regiões distintas ao longo dos microtubos. Por exemplo, nas áreas 1 e 2 referentes ao microtubo A podem-se observar a formação de estruturas em forma de blocos, enquanto na área 3 podem-se observar irregularidades em formas de ondas na superfície. Nos microtubos B e C, observam-se a ocorrência de ranhuras retilíneas de dimensões diversas.

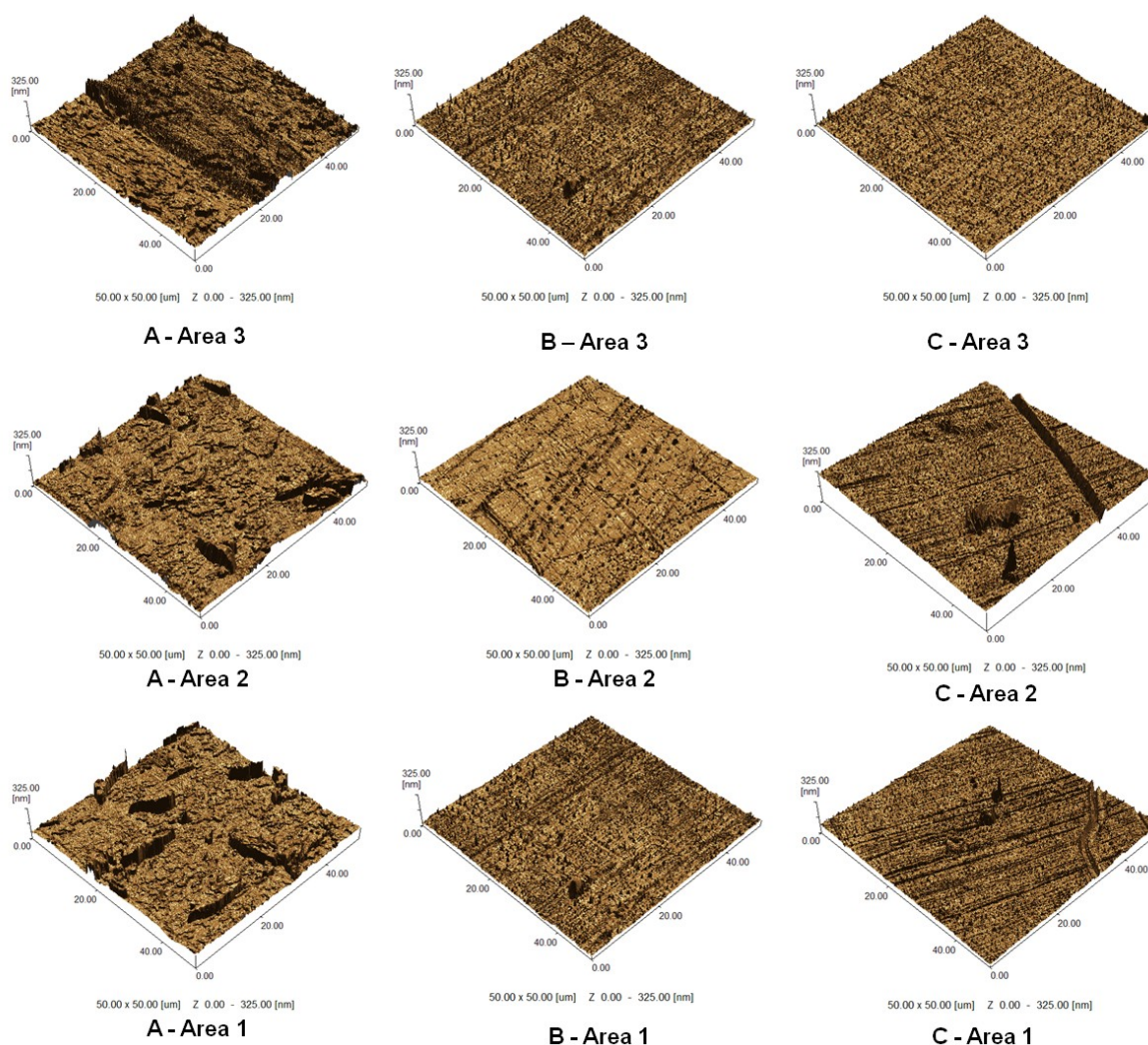


Figura 1.1 – Análises topográficas obtidas por meio de MFA a partir das três marcas de microtubos A, B e C. Representação em 3D das imagens adquiridas em modo dinâmico em áreas de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ e mantendo para fins de comparação a amplitude de altura em até 325 nm.

Adicionalmente à análise qualitativa, foram calculados alguns parâmetros quantitativos acerca da rugosidade das superfícies dos microtubos investigados: *i*) rugosidade média em valores absolutos (Ra); *ii*) rugosidade quadrática média (Rq); e *iii*) rugosidade referente à distância média entre os principais picos e vales ao longo da imagem da amostra (Rz).

O parâmetro Ra é a média aritmética dos valores absolutos das ordenadas dos afastamentos dos pontos do perfil de rugosidade, em relação à linha média, dentro do percurso de medição. Ra pode ser calculada pela equação:

$$Ra = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|$$

(equação 1.1)

Rq é um parâmetro correspondente ao Ra . É o desvio médio quadrático. É denominado RMS (*Root Mean Square*) em países de língua inglesa. A elevação ao quadrado aumenta o efeito das irregularidades que se afastam da média. Rq pode ser definido pela equação:

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2}$$

(equação 1.2)

O parâmetro Rz é a média aritmética dos cinco maiores valores da rugosidade parcial (Z_i). A rugosidade parcial Z_i é definida como a soma dos valores absolutos das ordenadas dos pontos de maiores afastamentos (acima e abaixo da linha média) existentes dentro de um comprimento de amostragem. Graficamente, este valor representa a altura entre os pontos máximo e mínimo do perfil, dentro do comprimento de amostragem, conforme ilustrado na figura 1.2:

$$Rz = \frac{Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5}{5}$$

Figura 1.2 – Esquema ilustrativo de determinação do parâmetro de rugosidade Rz (Adaptado de Marcelo Lima, 2002).

Os parâmetros de rugosidade R_p e R_v correspondem aos perfis de altura dos picos e de profundidade dos vales (ou depressões), respectivamente. São calculados pelas seguintes fórmulas:

$$R_p = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_{(p)i}|$$

(equação 1.3)

$$R_v = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_{(v)i}|$$

(equação 1.4)

O parâmetro R_{zjis} é obtido a partir do valor médio dos cinco maiores picos (y_p) e dos cinco maiores vales (y_v) em relação à distância da linha média, em um intervalo de comprimento de referência “ l ”, conforme demonstrado na equação 1.5:

$$R_{zjis} = \frac{\sum_p^{n=5} |y_{(p)}| + \sum_v^{n=5} |y_{(v)}|}{5}$$

(equação 1.5)

Na figura 1.3, pode-se observar a considerável heterogeneidade dos valores de rugosidade apresentada pelas superfícies nas diferentes áreas ao longo dos microtubos de polipropileno das três diferentes marcas. A marca “A” apresentou diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para todos os parâmetros, R_a , R_q e R_z , revelando sua alta heterogeneidade morfológica. É interessante notar que o parâmetro R_q apontou diferenças estatísticas significativas entre pelo menos duas áreas para cada microtubo. Esse parâmetro é comumente considerado como sendo o mais apropriado para descrever variação dos perfis topográficos (Barnard et al, 2010).

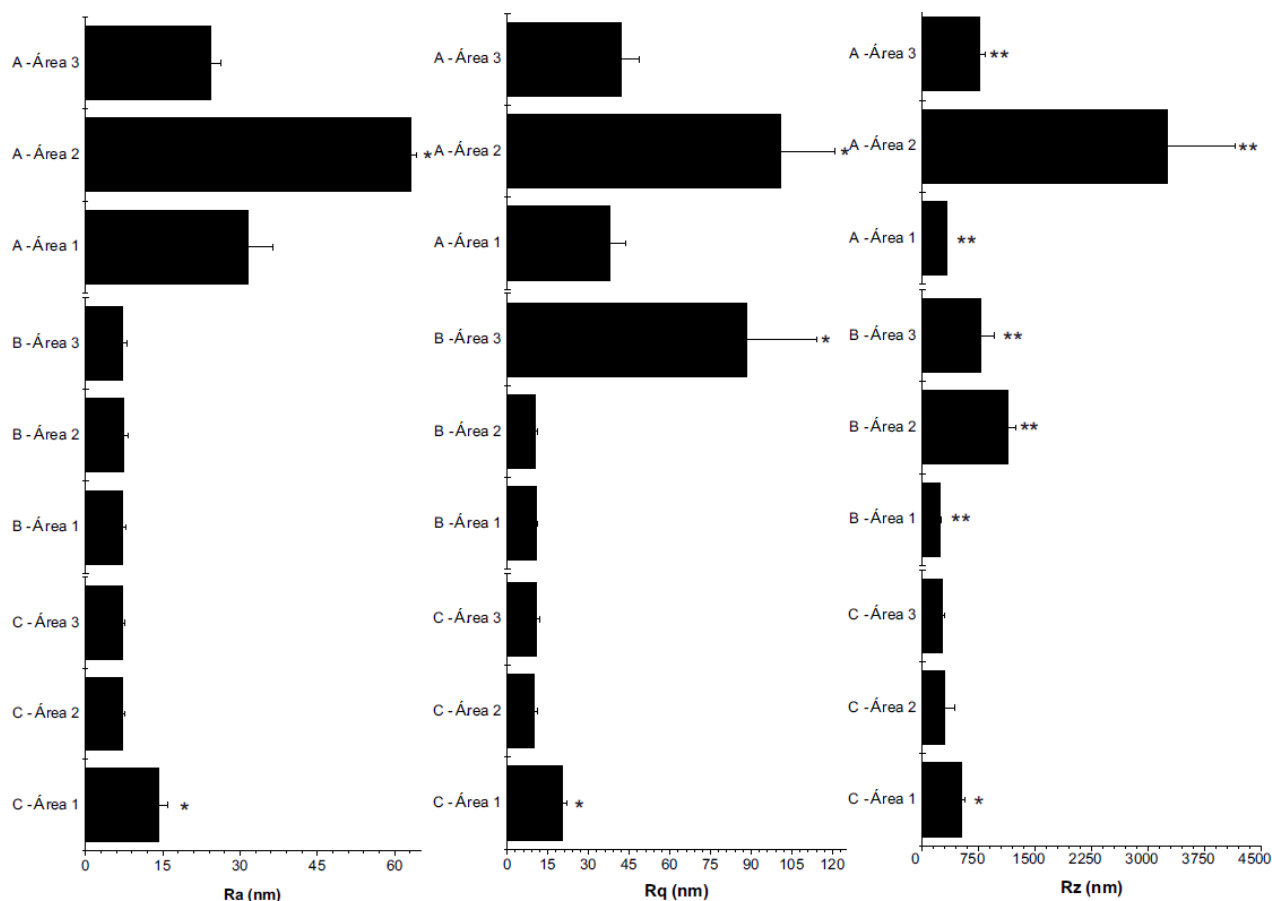


Figura 1.3 – Análise das rugosidades (Ra, Rq e Rz) observadas em imagens obtidas por MFA operada em modo dinâmico para diferentes regiões das três marcas de microtubos. O nível de significância estatística para os testes de análise de variância (testes Tukey e Fisher de comparação de médias) foi de $p < 0,05$. A presença do símbolo (*) indica diferença significativa entre o termo assinalado e os demais, enquanto o símbolo (**) indica diferença estatística significativa entre os termos marcados com esse símbolo.

Pode-se ainda reforçar a constatação da heterogeneidade de valores de rugosidade observada para a marca “A” quando se considera as médias das áreas de cada marca (figura 1.4).

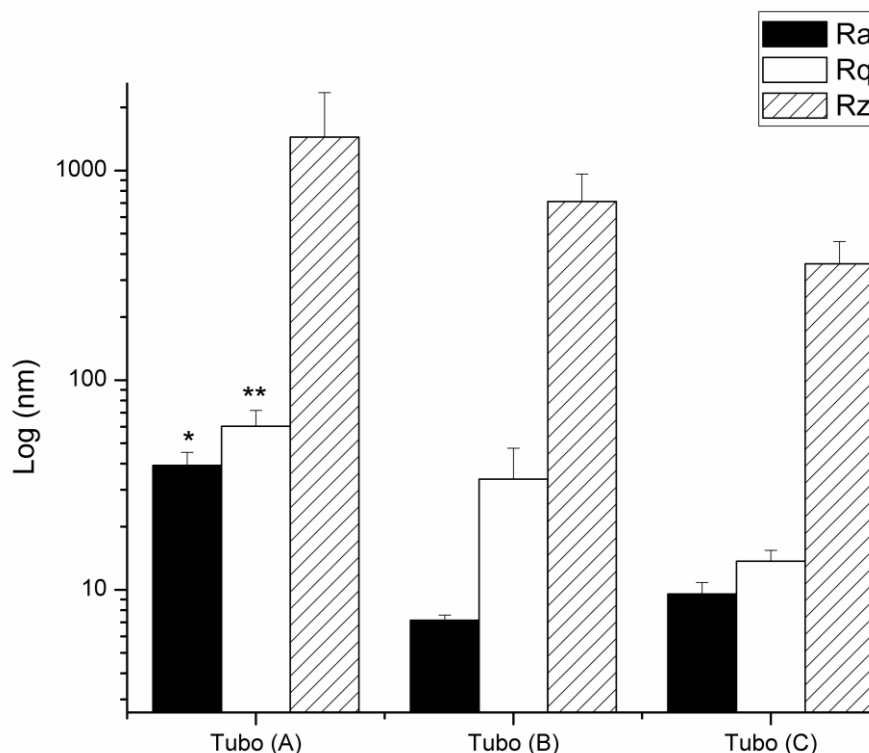


Figura 1.4 – Análise das médias das rugosidades das áreas ao longo de cada microtubo, considerando-se os parâmetros estruturais referentes às três marcas testadas. A presença do símbolo (*) indica que A é significativamente diferente entre de B e C, enquanto o símbolo (**) indica diferença estatística significativa entre A e C (testes Tukey e Fisher de comparação de médias; $p < 0,05$).

A elevada heterogeneidade da rugosidade, apresentada principalmente pelo microtubo da marca A, pode ser considerada como um indício de falta de um controle de qualidade de produção adequado, uma vez que se espera um produto com homogeneidade ao longo de sua superfície. Esse fato também pode estar relacionado ao tipo de processamento utilizado na produção desse termoplástico, que pode envolver etapas de moldagem por injeção ou extrusão (Vlachopoulos et al, 2003). Assim sendo, vislumbrou-se que a nanorrugosidade pode apresentar informações suficientes para atuar como um marcador no controle de qualidade desses microtubos.

Verificação do efeito dos solventes (acetonitrila, bicarbonato de amônio, ácido trifluoroacético e água) sobre a superfície interna dos microtubos de polipropileno

O uso de microtubos de PP pode acarretar alguns problemas relacionados à liberação de polímeros, contaminando amostras e comprometendo experimentos. Para verificar essa possibilidade, foi testada a possível liberação de fragmentos dos polímeros por meio de análises por espectrometria de massa, buscando-se possíveis componentes moleculares liberados. Para tanto, os tubos foram incubados com soluções

contendo solventes comumente utilizados na atividade laboratorial (acetonitrila, bicarbonato de amônio, ácido trifluoroacético e água). Incubou-se em diferentes intervalos de tempo para se testar quanto à possível liberação de polímeros, conforme apresentado na figura 1.5.

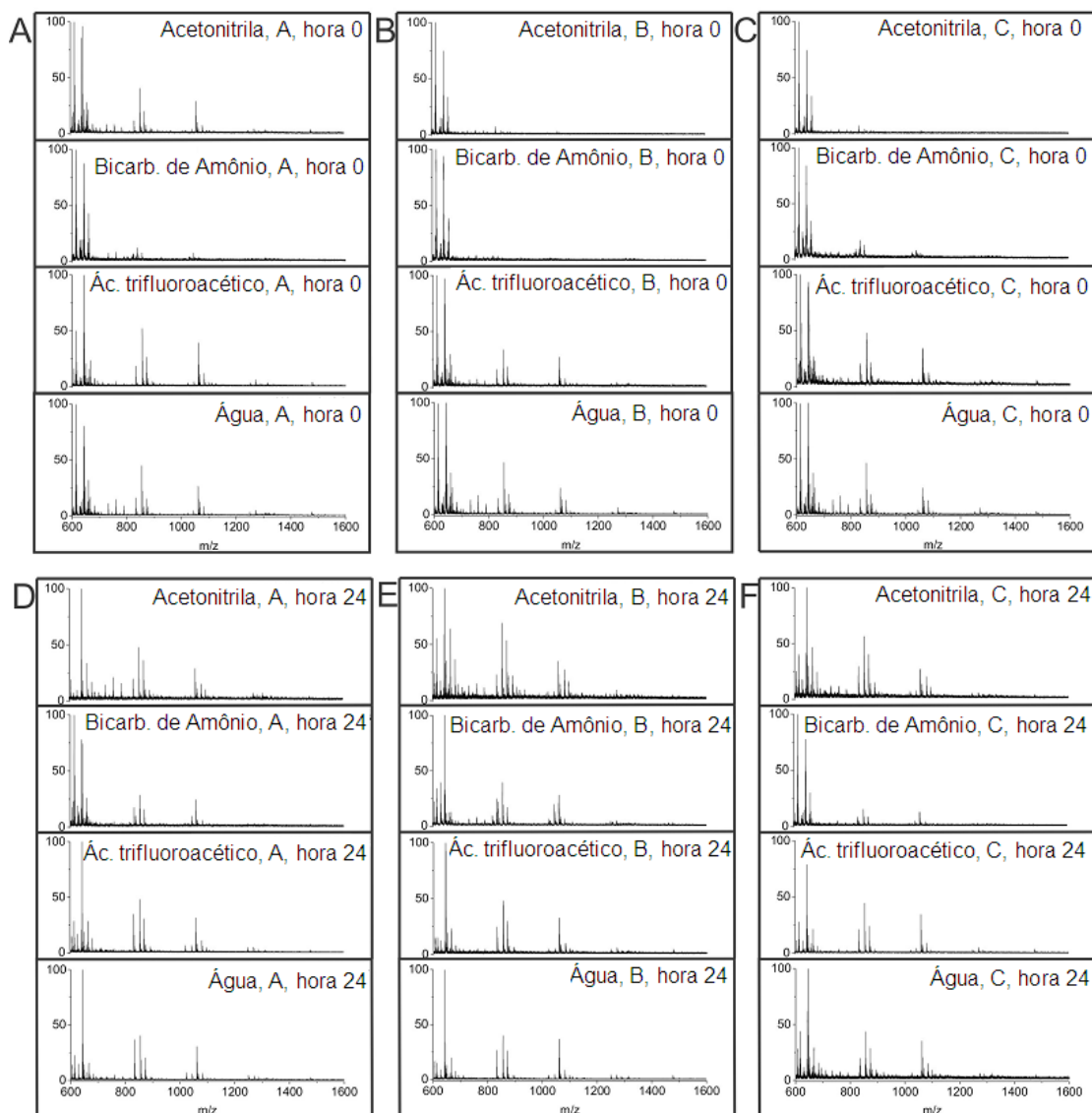


Figura 1.5 – Análise por espectrometria de massa MALDI-TOF das três marcas de microtubos, na busca de possíveis componentes moleculares liberados frente à exposição aos seguintes solventes/soluções: acetonitrila (P.A.), bicarbonato de amônio ($1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$), ácido trifluoroacético (0,1%) e água ultrapura, com tempos de exposição de 0 e 24 horas. A faixa de massas moleculares analisada variou de m/z 600 a 1600, utilizando o modo refletido positivo.

Não foi observada a liberação característica de polímeros (múltiplas repetições sucessivas de íons correspondentes a monômeros) pelos microtubos em nenhuma das condições testadas. Os componentes moleculares detectados são oriundos da ionização da própria matriz (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) utilizada nos ensaios de espectrometria

por MALDI-TOF. Entretanto, observa-se notória supressão de alguns íons na faixa de m/z 800 a 1600 nas soluções dos microtubos contendo bicarbonato de amônio $1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ no tempo de zero hora (figura 1.5 A, B e C), o que foi confirmado pelo perfil apresentado na análise de componentes principais (figura 1.6 A, C e E). Observa-se a distinção desse grupo de íons, comparando-os aos demais. É interessante observar que após 24 horas de exposição, as amostras compartilham perfis de componentes moleculares similares (figura 1.6 B, D e F), provavelmente devido à volatilidade dos solventes utilizados. Assim sendo, durante os períodos de incubação mais longos, os solventes poderiam progressivamente se volatilizar e dissipar pelo volume interno não ocupado do microtubo, passando então a não interferir nos perfis de ionização dos componentes moleculares da matriz.

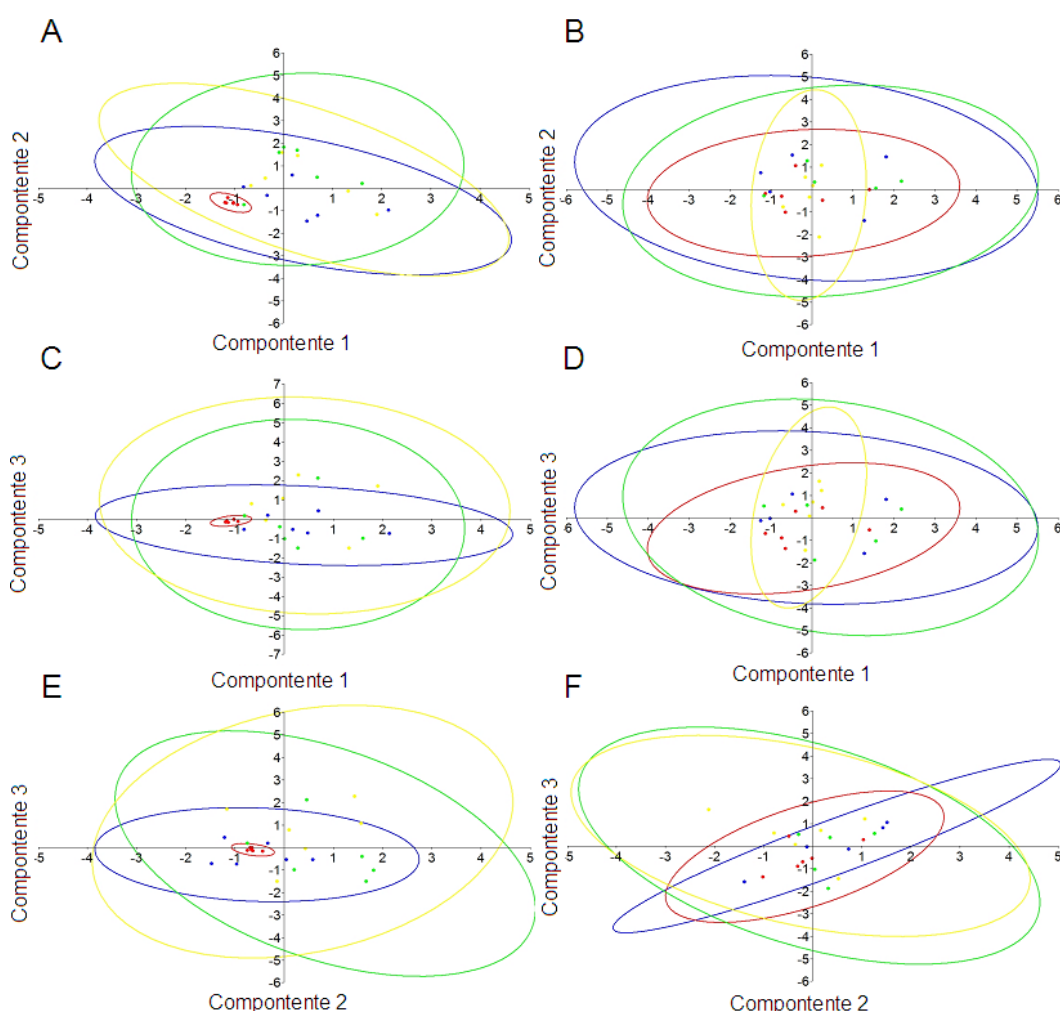


Figura 1.6 – Análise de componentes principais dos 28 componentes moleculares mais intensos, detectados por espectrometria de massa MALDI-TOF nos microtubos de polipropileno expostos por 0 (A, C e E) e 24 horas (B, D e F) a diferentes solventes/soluções. Relações entre solventes/soluções e as cores: água (azul); bicarbonato de amônio (vermelho); acetonitrila (verde) e ácido trifluoroacético. As elipses foram ajustadas com nível de confiança de 95%.

Conclusões

O estudo realizado pode ser considerado como uma abordagem alternativa para investigação qualitativa e quantitativa de superfícies constituídas por PP. A análise da organização nanométrica da superfície interna dos microtubos aponta-se como uma forma potencial de controle de qualidade dos microtubos, em relação à heterogeneidade e liberação de polímeros constituintes dos microtubos. As propriedades observadas podem também fornecer informações úteis para futuros testes de imobilização de moléculas, incluindo enzimas, nessas superfícies.

→ O trabalho realizado resultou na publicação do artigo intitulado “**Qualitative and quantitative topographical surface investigation and solvent effects on internal surface of polypropylene tubes**”, na revista internacional *Surface and Interface Analysis* (SIA) DOI 10.1002/sia.3812.

Referências Bibliográficas

Baranard, S.; Bennet, S.E.; Oliver, R.A. et al. The role of rough surfaces in quantitative ADF imaging of gallium nitride-based materials, *Journal of Physics: Conference Series*, v. 209, pp. 2010.

Benz, M.; Euler, W.B.; Gregory, O.J. The influence of preparation conditions on the surface morphology of poly(vinylidene fluoride) films, *Langmuir*, v. 17, p. 239. 2001.

Cunningham, T. et al. Atomic force profilometry and long scan atomic force microscopy: new techniques for characterisation of surfaces. *Surface Engineering*, v. 16, pp. 295–298. 2000.

Li, X.; Wang, X.; Ye, G. et al. Polystyrene-based diazonium salt as adhesive: A new approach for enzyme immobilization on polymeric supports, *Polymer*, v. 51, pp. 860–867. 2010.

Magonov, S.N.; Reneker, D.H. Characterization of polymer surfaces with atomic force microscopy, *Annual Review of Materials Science*, v. 27, pp. 175–222. 1997.

McDonald, G.R. et al. Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware, *Science*, v. 322, p. 7. 2008.

Merrett, K. et al. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials, *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition*, v. 13, pp. 593–621. 2002.

Reingrubera, E.; Himmelsbach, M.; Sauer, C. et al. Identification of degradation products of antioxidants in polyolefins by liquid chromatography combined with atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry, *Polymer Degradation Stabilization*, v. 95, pp. 740–745. 2010.

Vlachopoulos, J.; Strutt, D. Polymer processing, *Journal of Materials Science and Technology*, v. 19, p. 1161. 2003.

Capítulo II

Análise em nanoescala das superfícies internas de microtubos de polipropileno normais e modificados: uma abordagem considerando parâmetros de espectroscopia de força

Introdução

Dispositivos de polipropileno (PP) têm sido amplamente utilizados em laboratórios industriais e acadêmicos (McDonald et al, 2008; 2009). Após a primeira concepção dos microtubos de PP, no início dos anos 80, seu uso se tornou ubíquo em laboratórios no mundo todo (McDonald et al, 2008). No entanto, de acordo com alguns relatos, este material parece não ser tão inerte quanto se acreditava. No capítulo I dessa Tese foi descrito que após a exposição de microtubos incolores a diversos solventes, não foi observada a liberação de nenhum fragmento ou componente polimérico nas condições testadas. Porém, McDonald et al (2008) descreveu que dispositivos de plástico, principalmente aqueles coloridos, podem ser uma fonte potencial de contaminantes bioativos, tais como di-(2-hidroxietil) metildodecilamônio (DiHEMDA) e 9-octadecenamida (oleamida) (McDonald et al, 2008; 2009). Nesse contexto, alguns fabricantes têm procurado estratégias para desenvolver modificações em resinas de PP e etapas de processamento para superar esses inconvenientes, maximizando características desejáveis, tais como materiais com baixa energia superficial e tendências de adesão reduzida. Um exemplo deste tipo de material são os microtubos do tipo *Maxymum Recovery*[®] os quais são descritos pelo fabricante (Axygen) como não apresentando nenhum potencial de contaminação, além de exibirem características de ligação ou adesão de outras substâncias diminuída, levando a consequentes minimizações de perdas de amostras (Axygen, 2012).

Efeitos da estrutura química e das propriedades das superfícies desses materiais poliméricos sobre a adsorção de proteínas são descritos como sendo diretamente relacionados com a rugosidade da superfície (Wang et al, 2004). Superfícies com baixa rugosidade são descritas como apresentando menor contribuição de forças de *van der Waals* nos processos de adesão, com consequente diminuição destes eventos (Podczek, 1999). No capítulo I investigou-se a superfície interna de microtubos de PP com o

objetivo de verificar a possível presença de padrões de homogeneidade, relacionando essa informação com a nanorrugosidade, no qual se buscou por marcadores de controle de qualidade. Foram descritas diferenças de rugosidade significativas tanto entre as marcas diferentes quanto entre áreas ao longo de um mesmo tubo (Barbosa e Silva, 2012).

Esse capítulo II apresenta como objetivo investigar a superfície interna de microtubos modificados pelo fabricante, comparando-os aos não modificados da mesma marca. A morfologia, nanorrugosidade, propriedades de elasticidade e rigidez, tendências de atração e adesão, e o ambiente químico nas superfícies poliméricas foram investigados. A pergunta científica ou hipótese testada nesse trabalho foi: “Os resultados relativos à caracterização das superfícies de PP modificados corroboram as afirmações do fabricante sobre este produto?” Para tanto, foram utilizadas a microscopia de força atômica (MFA); microscopia eletrônica de varredura (MEV); espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS) como ferramentas de investigação.

Resultados e Discussão

As topografias das superfícies internas dos microtubos modificados e não modificados (controle) avaliadas por MFA está apresentada na figura 2.1. Ambos os grupos mostraram um arranjo similar em suas superfícies internas, com estruturas em forma de cristas que atravessavam as áreas varridas. De acordo com Thomann et al (1996) o aparecimento destas estruturas em forma de cristas estão relacionadas à formação de esferulitas abertas que ocorrem em materiais contendo polipropileno α -isostático (Thomann et al, 1996; Lim; Lloyd, 1993).

Em uma observação qualitativa, as aparentes discrepâncias relacionadas às alturas das cristas em diferentes áreas de uma mesma amostra sugerem a existência de diferenças significativas entre as mesmas (figura 2.1). Entretanto, quando se considerou quantitativamente os resultados obtidos para nanorrugosidade, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre as diferentes áreas em um mesmo tipo de microtubo ($p < 0,05$) (dados não apresentados).

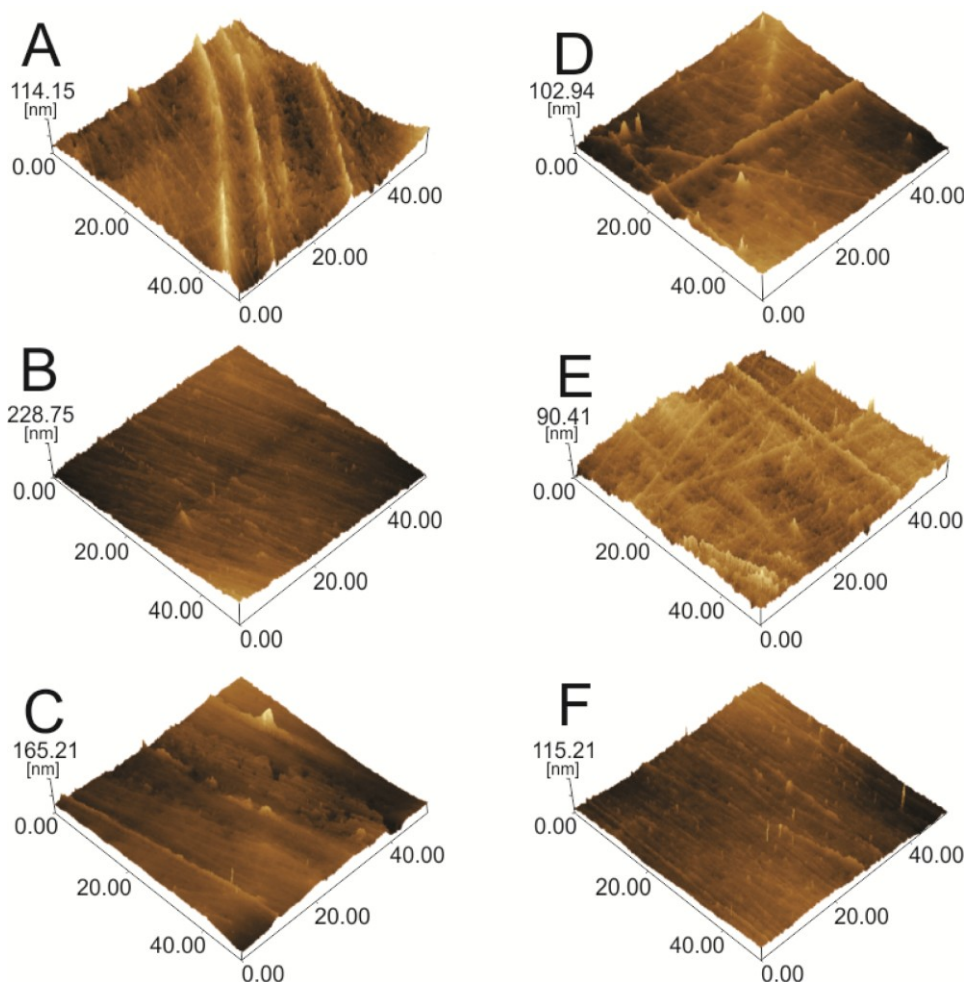


Figura 2.1 – Análises de MFA da superfície interna dos microtubos de PP não modificados ou controle (A, B e C) e modificados (D, E e F). Representação em 3D das imagens adquiridas em modo dinâmico em áreas de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. Os microtubos apresentavam capacidade máxima de 0,6 mL.

As análises por meio de MFA apresentam limitações relacionadas às dimensões máximas de varredura nos eixos X e Y. Nesse sentido, visando a superar tais limitações e corroborar ou refutar os resultados obtidos por MFA, foram realizadas análises por meio de MEV. A figura 2.2 apresenta as imagens das superfícies internas dos microtubos controle e modificados, obtidas por MEV. Tais resultados corroboram as informações qualitativas obtidas por MFA. Os mesmos padrões de arranjo superficial (linhas atravessando as áreas analisadas) foram observados, os quais provavelmente se referem às cristas descritas nas análises de MFA (figura 2.1).

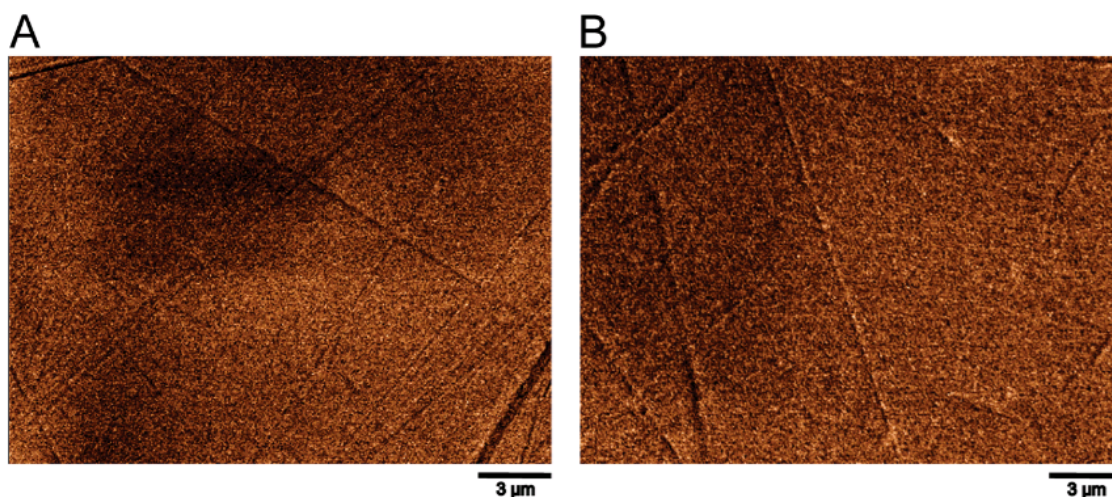


Figura 2.2 – Imagens topográficas obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies internas dos microtubos de PP não modificados ou controle (A) e modificados (B). Os microtubos apresentavam capacidade máxima de 0,6 mL.

Desde que nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre as áreas de um mesmo microtubo, os resultados quantitativos apresentados na figura 2.3 referem-se à média aritmética das áreas de cada tipo de microtubo. Os resultados obtidos mostram valores diminuídos de rugosidades referentes aos parâmetros Ra e Rq nos microtubos modificados, em comparação ao controle, enquanto que o valor de rugosidade relativo ao parâmetro Rp foi cerca de 20% maior nos microtubos modificados ($p < 0,05$). Tais resultados indicam que as superfícies do microtubo modificado são mais lisas e homogêneas que o controle. De acordo com Schönherr et al (1998), valores baixos de Ra para superfícies de PP modificadas implicam em uma redução na energia livre de superfície (Schönherr et al, 1998). Eles ainda descrevem que as variações na rugosidade representam uma função central em medidas de força (Schönherr et al, 1998). Os parâmetros Rz, Rzjis e Rv não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

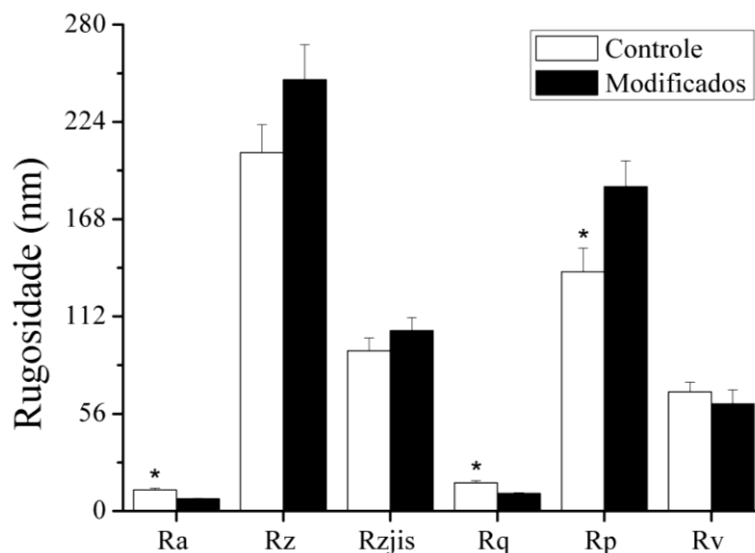


Figura 2.3 – Resultados de nanorugosidade dos microtubos não modificados (ou controle) e modificados, obtidos por microscopia de força atômica (MFA) operando em modo dinâmico. A capacidade máxima em volume dos microtubos de PP era de 0,6 mL. A presença do símbolo (*) indica existência de diferença estatística significativa entre as superfícies dos microtubos controle e modificados ($p < 0,05$).

A figura 2.5 apresenta os resultados de espectroscopia de força. Nesse ponto da Tese é relevante esclarecer alguns aspectos teóricos relacionados à obtenção e análises de curvas de força. Primeiramente, convém ressaltar que curvas de força (curvas de força *versus* distância) mostram a deflexão do cantilever de MFA durante a aproximação e retração verticais, em relação à superfície da amostra (Hinterdorfer; Dufrene, 2006; Meyer; Amer, 1988; Alexander et al, 1989). A deflexão é convertida em medidas de forças de interação (atração ou repulsão) sobre o cantilever, quando se considera a deflexão conjuntamente à constante de mola do cantilever. “*Snap-in force*” é o primeiro evento medido em uma curva de força (figura 2.4). Este parâmetro é relacionado com a magnitude das forças de atração, envolvendo interações entre a superfície da amostra e a ponteira. As interações podem ser do tipo *van der Waals* e de capilaridade, por exemplo. O parâmetro “*Max Load Force*” é a força máxima de carregamento aplicada (figura 2.4). Normalmente aparece na extremidade esquerda superior da curva de força, e refere-se às propriedades de dureza de cada material. “*Detach force*” é a força que ocorre antes do último evento na curva de retração, que corresponde ao ponto no qual a ponteira se desprende da superfície da amostra. Relaciona-se com interações adesivas entre a superfície da amostra e a ponteira. “*Max pull force*” é a força máxima de tração. Este parâmetro muitas vezes apresenta valores semelhantes àqueles obtidos pelo parâmetro “*Detach force*”. O módulo de Young é o módulo de elasticidade, que é calculado aplicando-se um dos possíveis modelos de

ajuste de indentação na curva de força *versus* distância (Butt et al, 2005). Por fim, o parâmetro energia dissipada relaciona-se com uma medida de trabalho em um ciclo de aproximação e retração da ponteira do microscópio, se relacionando à trajetória dinâmica da ponta ponteira, à histerese posicional e processos locais específicos (Gauthier; Tsukada, 2000).

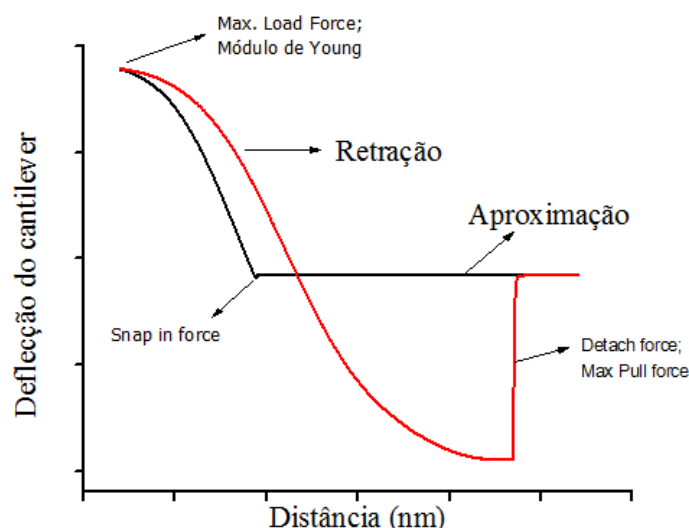


Figura 2.4 – Esquema exemplificando uma curva de força *versus* distância obtida por meio de MFA. Estão indicadas na figura as linhas relativas à aproximação (linha preta) e à retração ou distanciamento da ponteira do MFA em relação à superfície da amostra (linha vermelha). Os principais parâmetros avaliados em espectroscopia de força estão indicados na figura, sendo que uma seta relaciona-os às regiões da curva aos quais são consideradas nos cálculos de seus valores.

Após a apresentação dos diversos parâmetros oriundos de uma curva de força, segue-se com uma breve abordagem sobre os aspectos teóricos que são considerados para a medida desses parâmetros. De acordo com Domke e Radmacher (1998), a lei de Hooke conecta a deflexão do cantilever (d) com a força aplicada (F), utilizando-se a constante de mola do cantilever (k). A força aplicada pode ser definida pela seguinte equação (Domke e Radmacher, 1998):

$$F = kd = k(z - \delta) \quad (\text{equação 2.1})$$

Onde z representa o deslocamento da cerâmica piezoelétrica e δ representa a indentação. Hertz descreveu teoricamente a deformação de duas superfícies esféricas durante o contato em aproximação (Hertz, 1982). Sneddon expandiu tais cálculos para outras geometrias, tais como a indentação de um cone em uma superfície plana, exatamente da mesma forma que são utilizadas nas presentes análises (Sneddon, 1965). Esse modelo estabelece a seguinte relação entre a indentação e a força de carregamento aplicada (F):

$$F = (2/\pi)[E/(1-\nu^2)]\delta^2 \tan(\alpha) \quad (\text{equação 2.2})$$

Onde E representa o módulo de Young (ou módulo de elasticidade); ν é a medida do raio de Poisson da amostra; e α é a metade do ângulo de abertura na indentação do cone. Para o cálculo do valor do módulo de Young foi utilizado o ajuste do modelo de Hertz (indentação cônica) à curva. Combinando-se as equações 2.1 e 2.2, obtém:

$$z - z_0 = d - d_0 + \sqrt{\frac{k(d - d_0)}{(2/\pi)[E(1-\nu^2)]\tan(\alpha)}} \quad (\text{equação 2.3})$$

O ponto zero de deflexão (d_0) é determinado na região de não contato da curva de força e assume-se 0,5 como valor do raio de Poisson. Ajustando o modelo de retração a cada evento detectado, desdobra-se na seguinte fórmula:

$$F_{WLC}(s) = \frac{k_B T}{l_p} \left[\frac{1}{4(1-s/L_c)} + \frac{s}{L_c} - \frac{1}{4} \right] \quad (\text{equação 2.4})$$

Onde $F_{WLC}(s)$ descreve a força em função da separação s ; K_B é a constante de Boltzmann; T é a temperatura em Kelvin; l_p representa o comprimento de persistência; e L_c o comprimento de contorno. Adicionalmente, a força máxima de carregamento e a taxa de aproximação e separação foram consideradas.

Em relação aos resultados obtidos referentes aos parâmetros de espectroscopia de força, ambos os grupos mostraram diferenças significativas entre as áreas de um mesmo microtubo. A modificação do PP resultou em uma diminuição significativa dos valores referentes aos parâmetros “*snap in force*”, enquanto os resultados referentes aos parâmetros “*max load force*, *max pull force* e *detachment force*” foram aumentados, em comparação ao controle ($p < 0,05$). Esses resultados revelaram que os microtubos modificados apresentam propriedades únicas, tais como: maior rigidez e menor comportamento adesivo, que podem estar relacionados à sua menor rugosidade.

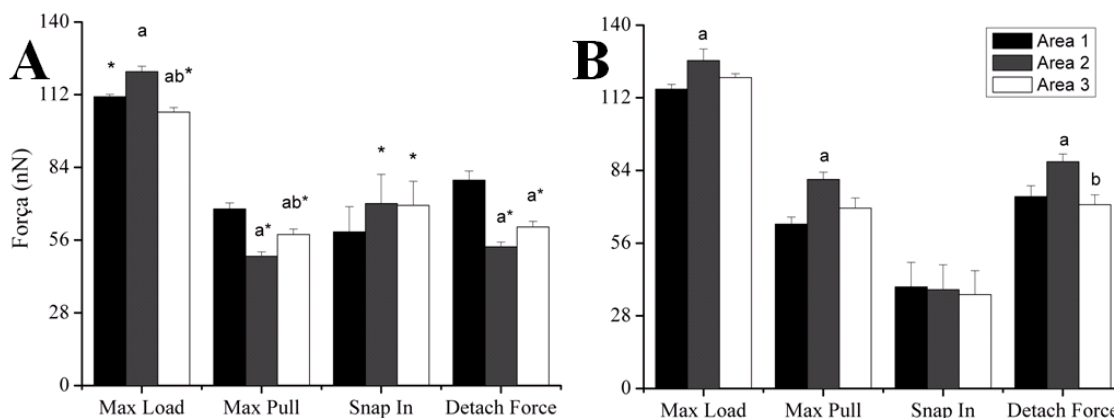


Figura 2.5 – Resultados dos parâmetros de espectroscopia de força obtidos por microscopia de força atômica (MFA) a partir das superfícies internas dos microtubos controle (A) e modificados (B), operando em modo contato. A capacidade máxima em volume dos microtubos foi de 0,6 mL. A presença do símbolo (*) indica existência de diferença estatística significativa entre as superfícies dos microtubos controle e modificados ($p < 0,05$). A presença do símbolo “a” indica existência de diferença estatística significativa com a área 1, enquanto “b” indica existência de diferença estatística significativa com a área 2.

A tabela 2.1 mostra os resultados referentes aos parâmetros energia dissipada e módulo de elasticidade (Young). Os microtubos modificados apresentaram valor do módulo de Young aproximadamente 3,4 vezes maior que os do controle, enquanto a energia dissipada foi cerca de 1,5 vezes maior. Os valores aumentados de módulo de Young evidenciaram que nos materiais mais homogêneos apresentaram uma maior capacidade de retornar à sua forma original após sofrer as distorções causadas pela ponteira do MFA durante a aquisição de curvas de força. Os resultados de energia dissipada sugerem que a superfície mais lisa expõe algumas irregularidades as quais podem ser ocultadas em superfícies com maior rugosidade (Schönherr et al, 1998). Isso resulta numa maior probabilidade de ocorrência de interações secundárias entre a superfície e a ponteira do MFA, aumentando os processos de dissipação de energia.

Tabela 2.1 – Caracterização nanomecânica da superfície interna dos microtubos controle e modificados

	Módulo de Young (MPa)	Energia dissipada (fJ)
Controle	$6,9 \pm 2,0$	$8,5 \pm 0,8$
Modificado	$23,7 \pm 7,5$	$13,0 \pm 1,1$

Outras técnicas espectroscópicas foram utilizadas na caracterização química dessas superfícies de PP, com o objetivo de verificar possíveis diferenças nas propriedades químicas que justificassem as descrições dos microtubos modificados

atestadas pelos fabricantes. As figuras 2.6 e 2.7 apresentam o ambiente químico das superfícies por meio de análises de EDS e FTIR, respectivamente. Nenhuma diferença considerável foi encontrada entre os resultados de FTIR ou entre os resultados de EDS: controle ($91,0 \% \pm 5,7$ de carbono) e modificados ($93,1 \% \pm 2,7$ de carbono).

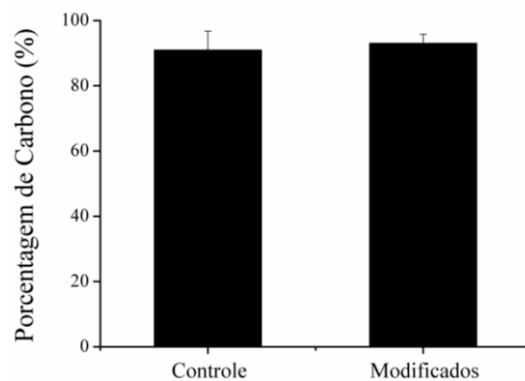


Figura 2.6 – Análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da superfície interna dos microtubos de PP controle e modificados. As medidas foram adquiridas concomitantemente às aquisições de imagens por meio de MEV. A capacidade máxima dos microtubos de PP era de 0,6 mL.

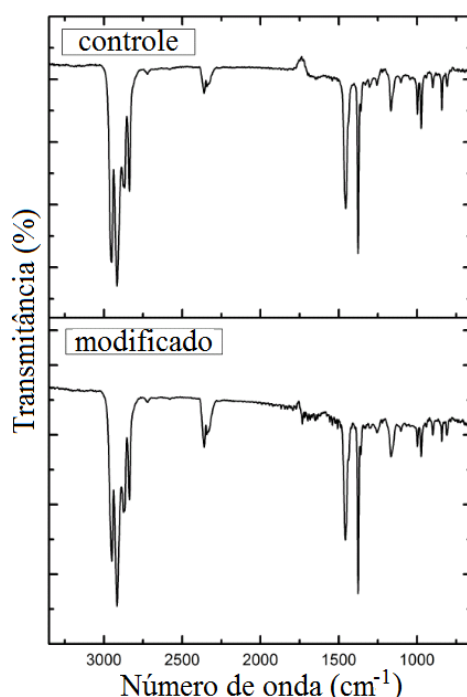


Figura 2.7 – Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da superfície interna dos microtubos de PP controle e modificados. As medidas foram adquiridas utilizando um adaptador de reflectância total atenuada (ATR). A capacidade máxima dos microtubos de PP foi de 0,6 mL.

Os grupos de microtubos controle e modificados apresentaram ambientes químicos similares, característicos de materiais de PP cristalinos. As bandas referentes às frequências 805, 840, 898, 940, 972, 995, 1100 e 1166 cm^{-1} relacionam ao movimento de *rocking* (estiramento simétrico) do grupamento CH_2 ; estiramento C-C; e CH_3 nos modos *rocking* e *wagging* (estiramento antissimétrico). Em 1255 cm^{-1} ,

observa-se a banda que se refere ao *twisting* (torção) do CH₂ e deformação do grupamento CH; 1455 cm⁻¹ refere-se à deformação do grupamento CH₂ e estiramento antissimétrico do grupo CH₃; 2836 cm⁻¹ refere-se ao estiramento do grupo CH₂; 2867 e 2915 cm⁻¹ referem-se ao estiramento simétrico do grupamento CH₃, ao estiramento antissimétrico do grupo CH₂ e estiramento do grupo CH; e a banda em 2960 cm⁻¹ refere-se ao estiramento antissimétrico do CH₃ (Liang e Pearson, 1960). Esta ausência de diferença entre as amostras analisadas, considerando-se as análises espectroscópicas na região do infravermelho ou de energia dispersiva, sugere fortemente que a modificação dos microtubos está relacionada somente a etapas de processamento do polipropileno, as quais interferiram diretamente nos processos de polimerização e conseqüentemente nas propriedades estruturais, sem alterar propriedades químicas.

Conclusões

Os resultados obtidos a partir das análises das superfícies internas de microtubos de PP modificados mostraram melhoramentos significativos em suas propriedades superficiais. Uma combinação de baixa energia superficial e forças atrativas reduzidas sugerem que este tipo de material de fato apresenta-se mais eficiente, considerando suas diversas aplicações e seu uso contínuo em laboratórios de pesquisa. Pode-se então afirmar que tais materiais conduzem a uma minimização de perdas de amostras por adsorção/adesão indesejadas. Os resultados de nanorrugosidade e de espectroscopia de força mostraram-se como técnicas sensíveis e de alta resolução, as quais são primordiais para determinação das propriedades de superfícies em nanoescala. A abordagem ou investigação apresentada nesse capítulo II representa uma ferramenta promissora e potencial para a avaliação de outros sistemas, tais como aqueles contendo enzimas ou outras biomoléculas imobilizadas, principalmente quando se deseja considerar suas propriedades em nanoescala, suas modificações físicas ou químicas, e ainda em testes de controle de qualidade.

→ O trabalho desenvolvido nesse capítulo resultou na publicação do artigo intitulado: **“Nanoscale analyses of modified polypropylene microtubes internal surface: an approach covering topographical and force spectroscopic parameters”** na revista internacional *Surface and Interface Analysis*, em junho de 2013: DOI 10.1002/sia.531.

→ O trabalho desenvolvido nesse capítulo também resultou na publicação do capítulo intitulado: “**Nanoscale Approaches Over Polypropylene Plastic Surfaces: An Alternative Tool for Quality Control Check**”, no livro “**Polypropylene Synthesis, Applications and Environmental Concerns**”, pela editora *Nova Science Publishers*, em 2014. ISBN: 978-1-62417-152-9.

Referências Bibliográficas

Alexander, S., et al. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever, *Journal of Applied Physics*, v. 65, pp. 164–168. 1989.

Axygen (Catálogo: *Proteomics, Drug Discovery: Microtubes*). Endereço: www.biocomdirect.com/pdfs/Axygen_Catalogue_MCTsect.pdf. Acesso em 20 Novembro. 2012.

Barbosa, E.F.; Silva, L.P. Qualitative and quantitative topographical surface investigation and solvent effects on internal surface of polypropylene tubes, *Surface and Interface Analyses*. v. 44, pp. 389–394. 2012.

Butt, H.J. et al. Force measurements with the atomic force microscope: technique, interpretation and applications, *Surface Science Reports*, v. 59, pp. 1–152. 2005.

Domke, J.; Radmacher, M. Measuring the elastic properties of thin polymer films, *Langmuir*, v. 14, pp. 3320–3325. 1998.

Gauthier, M.; Tsukada, M. Damping mechanism in dynamic force spectroscopy, *Physical Review Letters*, v. 85, pp. 5348–5351. 2000.

Hertz, H.J. In touching solid elastic body, *Journal of Reine Angew Mathematik*, v. 92, pp. 156–171. 1882.

Hinterdorfer, P.; Dufrêne, Y. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy, *Nature Methods*, v. 3, pp. 347–355. 2006.

Liang, C.Y.; Pearson, F.G., Infrared spectra of crystalline and stereoregular polymers: Part I. Polypropylene, *Journal of Molecular Spectroscopy*, v. 5, pp. 290–306. 1960.

Lim, G.B.A.; Lloyd, D.R. Isothermal crystallization of isotactic polypropylene in dotriacontane. II: Effect of nucleating agent addition on growth rate, *Polymer Engineering and Science*, v. 33, pp. 513–521. 1993.

McDonald, G.R. et al. Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware, *Science*, v. 322, p. 7. 2008.

McDonald, G. R. et al. Bioactive leachates from lab plastics, *G.I.T. Laboratory Journal*, v. 9, pp. 2–4. 2009.

Meyer, G.; Amer, N.M. Novel optical approach to atomic force microscopy, *Applied Physics Letters*, v. 53, pp. 2400–2403. 1988.

Podczek, F. Particle-particle adhesion in pharmaceutical powder handling, *Imperial College*, London, pp 16–34. 1999.

Schönherr, H. et al. Polypropylene Surface Modification by Entrapment Functionalization, *Macromolecules*; v. 31, pp. 3679–3685. 1998.

Sneddon, I.N. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, v. 3, pp. 47–57. 1965.

Thomann, R. et al. On the γ -Phase of Isotactic Polypropylene, *Macromolecules*. v. 29, pp. 8425–8434. 1996.

Wang, Y. X. et al. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility, *Pharmaceutical Research*, v. 21, pp. 1362–1373. 2004.

Capítulo III

Análise das superfícies de membranas poliméricas porosas

Introdução

Membranas poliméricas porosas representam uma classe de materiais amplamente utilizados tanto em laboratórios de pesquisa científica, quanto em ambientes industriais (Shirazi et al, 2013; Naim et al, 2013; Li et al, 2013; Kolahdoozan, 2014). Além de suas aplicações em diversas áreas, como na filtração e/ou transferência de biomoléculas (Li et al, 2013), apresentam grande potencial para aplicação em processos de imobilização de enzimas.

As propriedades superficiais das membranas poliméricas porosas influenciam diretamente seus desempenhos (Wong et al, 2009). Park et al (2005) verificaram que valores de rugosidade altos em membranas poliméricas resultam em valores aumentados de área superficial, o que frequentemente resulta em maior adesão ou incrustação de substâncias e conseqüentemente perdas durante filtrações.

Além das características superficiais, a composição polimérica de cada membrana também influencia diretamente no modo como esses materiais interagem com outros sistemas moleculares. Membranas de nitrocelulose são conhecidas por apresentarem alta qualidade para ensaios de transferência de proteínas e ácidos nucleicos, apresentando uma solvabilidade uniforme e fácil (Ahmad et al, 2009). Membranas de *nylon* apresentam grupos químicos carregados positivamente, o que conferem altas taxas de ligação de moléculas carregadas negativamente, como, por exemplo, os lipídeos (Zaluzec et al, 1994). Membranas de politetrafluoretileno (PTFE) apresentam a propriedade de alterar sua hidrofobicidade por um pré-tratamento com alcoóis. Membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) são sistemas naturalmente hidrofóbicos (Bessieres et al, 1996).

Durante a realização de um experimento de filtração, a superfície da membrana interage diretamente com os componentes do sistema a ser filtrado. Essa interação pode resultar em uma adesão ou adsorção e conseqüentemente à alteração da topografia da membrana. Esse capítulo III apresenta como objetivo caracterizar as superfícies de membranas porosas de nitrocelulose, nylon, PTFE e PVDF, antes e após um ensaio de filtração de uma solução de albumina sérica bovina. Para tanto, foram utilizadas as

técnicas de microscopia de força atômica (MFA); microscopia eletrônica de varredura (MEV); espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Resultados e Discussão

Para investigação das características morfológicas das membranas poliméricas porosas antes e após a realização dos testes de eficiência de filtração, foram obtidas imagens topográficas por meio de MFA. A face das membranas utilizadas para as análises de MFA foram as superiores (figura 3.1).

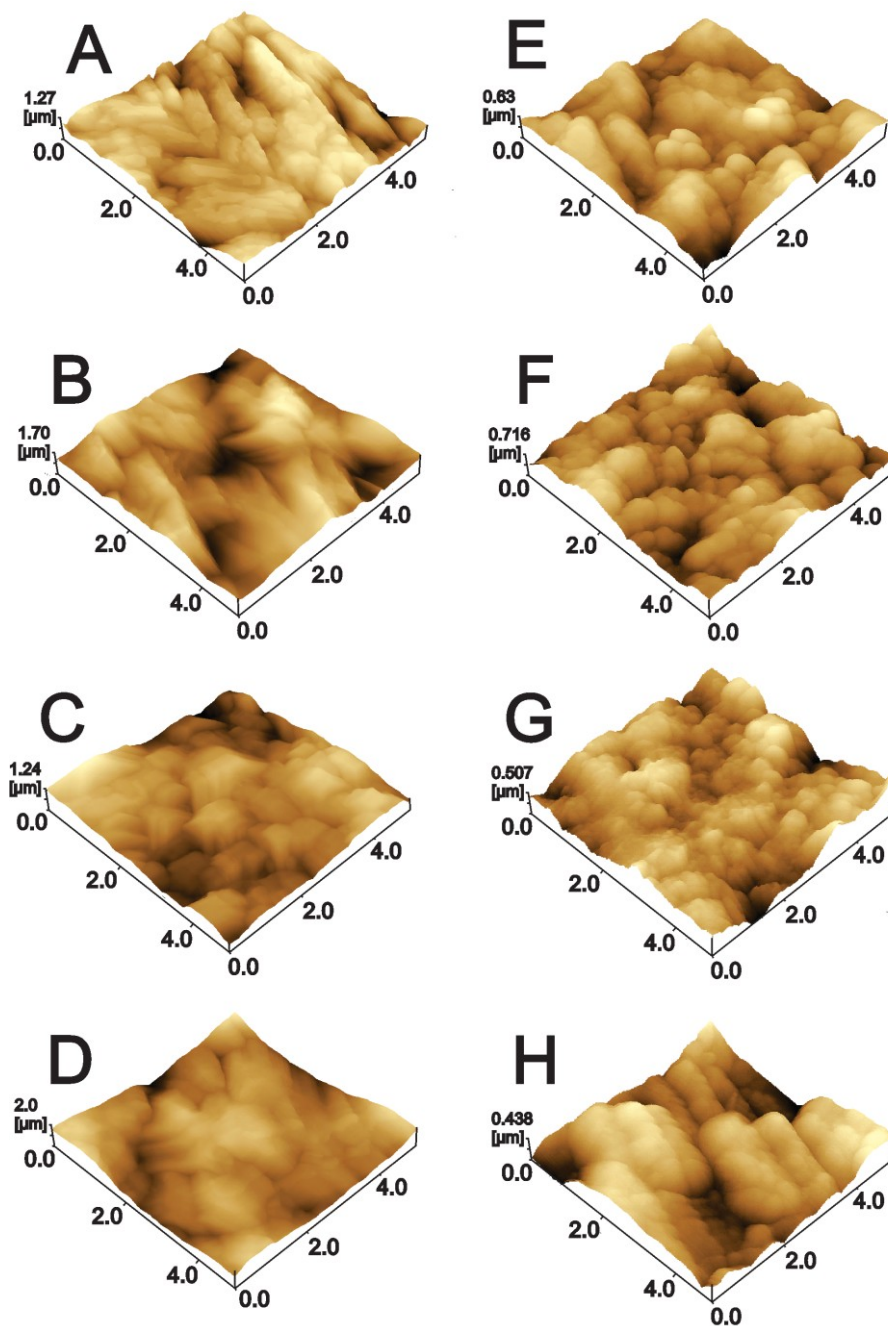


Figura 3.1 – Imagens topográficas obtidas por MFA, em modo dinâmico com áreas de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, das diferentes membranas poliméricas porosas antes (A, B, C e D) e após (E, F, G e H) o teste de eficiência de filtração. Onde: “A e E” representam a topografia das membranas de nitrocelulose, “B e F” nylon, “C e G” PTFE e “D e H” PVDF.

A figura 3.1 possibilita a visualização de diferenças topográficas entre as membranas antes dos testes de eficiência de filtração (figura 3.1 A, B, C e D), e também quando se compara antes e após os testes de filtração (figura 3.1 A e E; B e F; C e G; D e H). As diferenças entre as membranas antes de submetidas aos testes de eficiência de filtração são possivelmente causadas pelos padrões específicos de organização de seus componentes poliméricos. A membrana de nitrocelulose (figura 3.1 A) apresentou na sua superfície a formação de estruturas em forma de “V”, enquanto as membranas de nylon e PVDF apresentaram a formação de blocos irregulares (figura 3.1 B e D, respectivamente). A membrana de PTFE apresentou formas regulares que lembram trapézios (figura 3.1 C).

Também são observadas diferenças nas superfícies das membranas poliméricas porosas entre os resultados obtidos pré- e pós-testes de eficiência de filtração. Tais eventos podem ser resultantes da adesão de moléculas nas superfícies das membranas, ou mesmo pelas condições físicas aplicadas a esses sistemas durante os testes de filtração.

As análises de escaneamento por MFA apresentam como limitação a dimensão reduzida da área percorrida. A amplitude dessa área está relacionada com as irregularidades apresentadas pelas superfícies analisadas. Para conferir suporte e validade aos resultados topográficos obtidos por MFA utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que abrange regiões maiores da amostra. As análises dessas superfícies por meio de MEV estão apresentadas na figura 3.2.

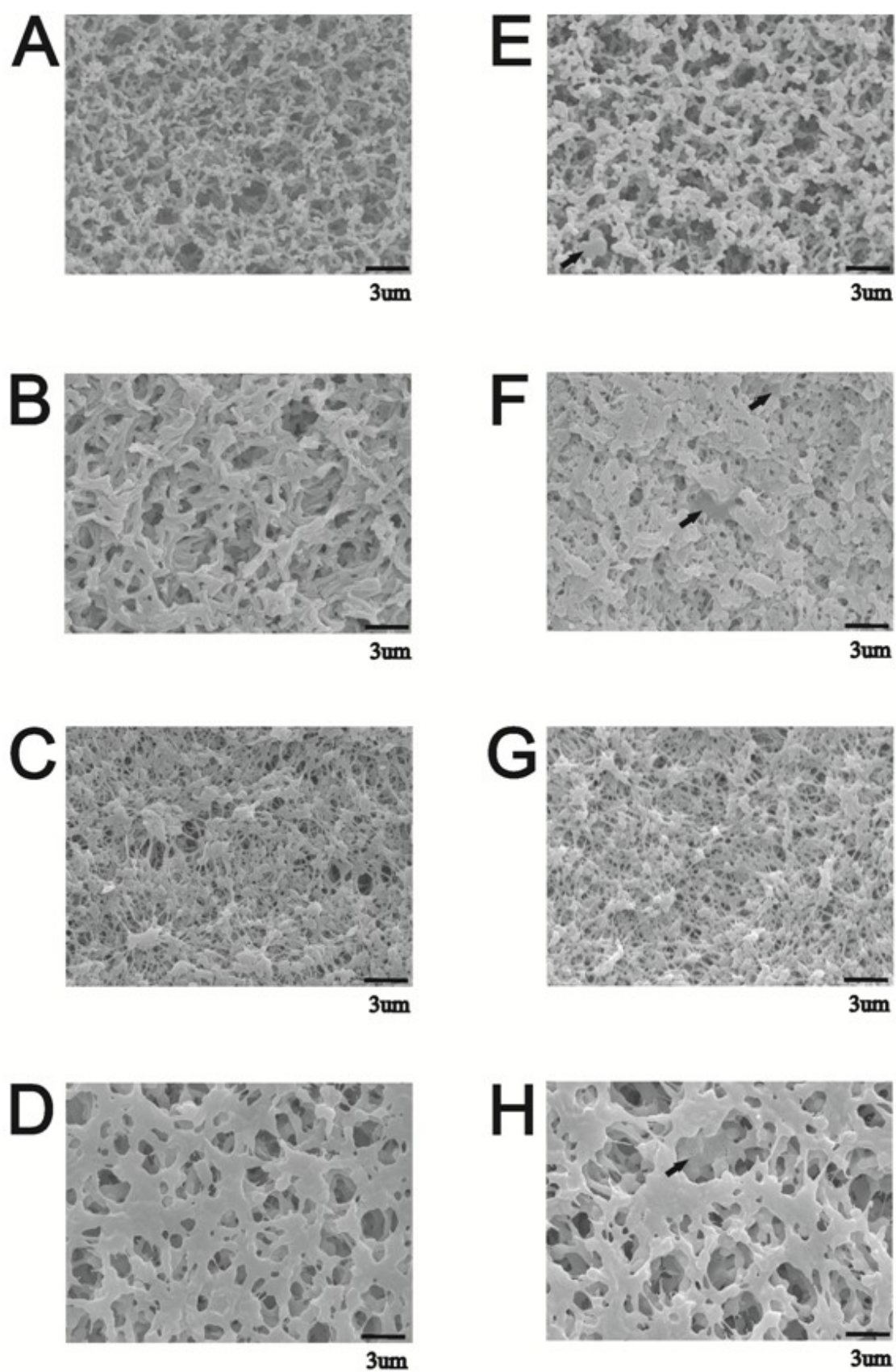


Figura 3.2 – Imagens obtidas por MEV das diferentes membranas poliméricas porosas antes (A, B, C e D) e após (E, F, G e H) os testes de eficiência de filtração. Tem-se: “A e E” representam as superfícies das membranas de nitrocelulose, “B e F” nylon, “C e G” PTFE e “D e H” PVDF.

Observando-se as disposições das diferentes malhas poliméricas na figura 3.2, podem-se sugerir relações que corroboram as informações topográficas obtidas por MFA. Por exemplo, as formas em “V” observadas por MFA na membrana de nitrocelulose (figura 3.1 A) podem ser resultantes do efeito da organização da malha constituída por fibras finas (figura 3.2 A e E) sobre a ponteira de nitreto de silício durante a varredura (constituindo um artefato). Da mesma maneira, os arranjos das fibras das membranas de nylon e PVDF (figura 3.2 B e D), que são fibras visivelmente mais espessas, podem ter causado o efeito de formação de blocos irregulares, observados por MFA (figura 3.1 B e D). Os blocos em forma trapezoide observados para a membrana de PTFE (figura 3.1 C) podem ter sido gerados pelo efeito das finas fibras ligadas a grumos circulares (figura 3.2 C) sobre a ponteira do microscópio de força atômica.

Em termos quantitativos, duas situações referentes ao comportamento das membranas analisadas foram discutidas: *i*) nos testes de eficiência de filtração (figura 3.3) não se observou diferenças significativas entre os grupos testados e o controle; e *ii*) em todos os valores dos parâmetros de rugosidade avaliados, comparando-se principalmente entre as membranas antes e após os testes de filtração, observaram-se diferenças estatísticas significativas (figura 3.4).

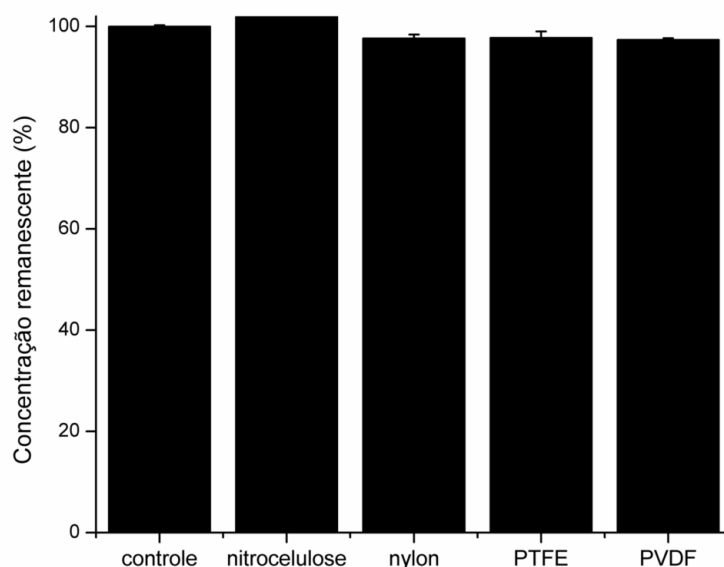


Figura 3.3 – Eficiência de filtração da solução de albumina. Os resultados são apresentados em relação à concentração inicial da solução de albumina, medida espectrofotometricamente. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada por ANOVA e teste de Tukey (considerando-se $p < 0,05$).

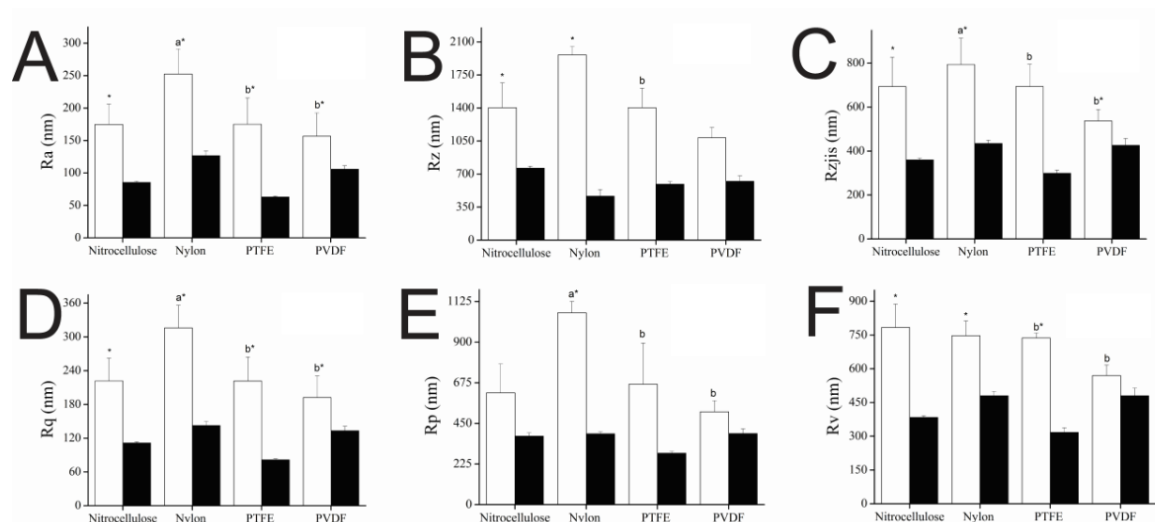


Figura 3.4 – Resultados dos parâmetros de rugosidade das membranas poliméricas porosas obtidos por MFA operada em modo dinâmico. As colunas brancas representam as membranas antes dos testes de eficiência de filtração, enquanto as pretas, após os testes. O símbolo “a” representa diferença estatística significativa quando comparado a membrana de nitrocelulose, e o símbolo “b” representa diferença estatística significativa quando comparado à membrana de *nylon* ($p < 0,05$). Asterisco representa diferença significativa quando comparado a todas outras membranas ($p < 0,05$).

Observando-se os resultados obtidos nos testes de eficiência de filtração (figura 3.3), nota-se que por meio da avaliação espectrofotométrica, não se obteve sensibilidade suficiente para se verificar diferenças significativas, tanto entre as membranas testadas entre si, quanto entre as membranas e o controle. Porém isso não significa a não ocorrência de eventos de adesão molecular ou alterações topográficas relacionadas ao processo de filtração. Os resultados dos valores de rugosidade (figura 3.4) demonstraram diferenças topográficas significativas entre os grupos de membranas e também entre as membranas antes e após os testes de eficiência de filtração. As diferenças topográficas, juntamente à constituição molecular, podem interferir diretamente nas propriedades de adesão de outras moléculas à membrana, assim como na eficiência da atividade filtrante das mesmas (Riedl et al, 1998; Park et al, 2005).

Embora as análises topográficas quantitativas apresentadas na figura 3.4 apontem diferenças na organização superficial das membranas utilizadas quando comparadas às novas, as informações estruturais obtidas por FTIR para as membranas novas e usadas não possibilitam a constatação de qualquer diferença química entre ambas (figura 3.5). Nessa análise foram observadas somente as bandas referentes às deformações e estiramentos específicos de cada tipo de polímero.

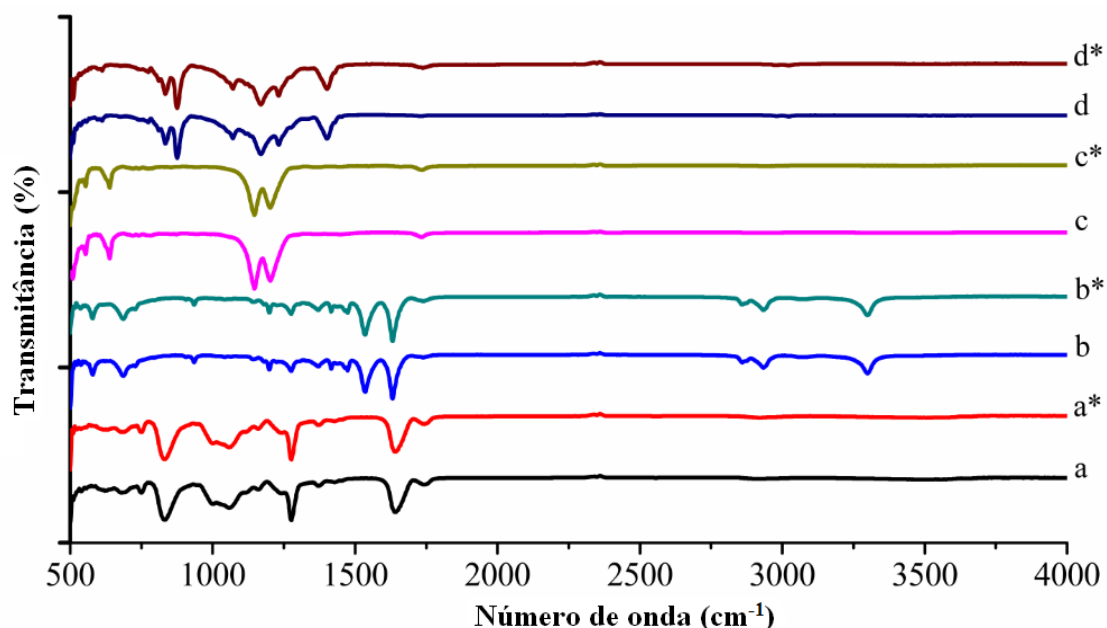


Figura 3.5 – Análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para as membranas novas e usadas. O esquema de cores representa: preto (membrana de nitrocelulose nova); vermelho (membrana de nitrocelulose usada); azul (membrana de nylon nova); verde (membrana de nylon usada); magenta (membrana de PTFE nova); amarelo escuro (membrana de PTFE usada); azul escuro (membrana de PVDF nova) e vinho (membrana de PVDF usada). O símbolo * refere-se às membranas após o teste de eficiência de filtração.

Conforme apresentado na tabela 3.1, a membrana de nitrocelulose apresentou em seu espectro de FTIR a presença da banda característica de estiramento referente as ligações do grupamento nitro (em aproximadamente $1660_{LF} \text{ cm}^{-1}$), presente na estrutura do monômero dessa membrana. Também apresentou as bandas referentes ao grupamento piranose (543_f , 688_m e $1208_{LF} \text{ cm}^{-1}$). A membrana de *nylon* apresentou como bandas características aquelas em torno de $1650 - 1634_{MF} \text{ cm}^{-1}$, referentes ao estiramento das ligações da carbonila, juntamente com a deformação em torno de 3000_L cm^{-1} , relacionada à deformações do grupo amida. As bandas típicas dos fluoropolímeros PVDF e PTFE são aquelas mais fortes, entre 1400 e 1500 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento da ligação (CF). PVDF, por ser menos substituído que o PTFE, apresenta uma banda mais deslocada para região de menor frequência (1279 cm^{-1}), juntamente com uma banda evidente entre 778 e 840 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação do (CH_2).

Tabela 3.1 – Bandas de FTIR características para as membranas de nitrocelulose, nylon, PTFE e PVDF

Deformações e estiramentos ^a	Nitrocelulose	Nylon	PTFE	PVDF
piranose	543 f			
(CF ₂) δ			553 m	530 f, 615 f
γ _r (NO ₂)	625 f, 638 f			
δ (CF)			630 – 640 m	
δ (CF ₂)			720-774 f, 715 mf, o	
piranose	688 m			
δ (NO ₂)	747 m			
γ _r (CH ₂)				778 f, 840 MF
ν (NO)	843 L, F			
δ (CH)	915 f, 947 f			
ν (CO)	1000 f, 1020 f	1650–1634 MF		
ν _a (CF ₂)			1199 MF	
ν _a (CO)	1073 m, 1117 m, 1162m			
piranose	1208 L, F			
δ (CF)				1279 F
ν _a (CF ₂)			1299 mf	
δ (CH ₂)	1382 f			
δ (C–OH)	1426 f			
γ _w (CH ₂)	1454 f			812 F
δ (N–H)		1550 – 1541 MF		
ν _a (NO ₂)	1660 L, F			
ν (CO)	1719 m			
ν (CH)		2900 – 3000 L		
(N–H) δ		3100–3400 L		

Intensidades relativas: mf, muito fraca; f, fraca; m, média; F, forte; MF, muito forte; L, larga; o, ombro. ^a Notação: ν, estiramento; δ, *scissoring*; γ_r, *rock*; γ_w, *wag*; s sobrescrito, simétrico; a sobrescrito, assimétrico.

Análises por EDS (figura 3.6) evidenciaram a constituição elementar de cada membrana. Altos índices de carbono foram observados para as membranas de nitrocelulose e nylon, que possuem os monômeros C₆H₇(NO₂)₃O₅ e (NH-[CH₂]_n-CO-)_x, respectivamente. Os fluoropolímeros apresentaram conteúdos altos de flúor, conforme previsto. Isso pode ser explicado pelo tipo de monômero de cada polímero: PTFE apresenta como monômero [-CF₂-CF₂-]_n, enquanto PVDF tem [-CH₂-CF₂-]_n como unidade monomérica. Outra informação secundária observada foi a deposição diferencial de ouro nas superfícies das membranas novas e usadas. As membranas de

nitrocelulose e PVDF usadas apresentaram os menores índices de deposição desse metal, possivelmente devido à diminuição da rugosidade nessas membranas. É importante ressaltar que os níveis de átomos de cobre e zinco detectados referem-se ao material que constitui o suporte metálico (“*stub*”) no qual as amostras são fixadas para metalização com ouro e subsequente análise dos materiais por MEV/EDS. Esses níveis permanecem proporcionalmente constantes em todas as análises.

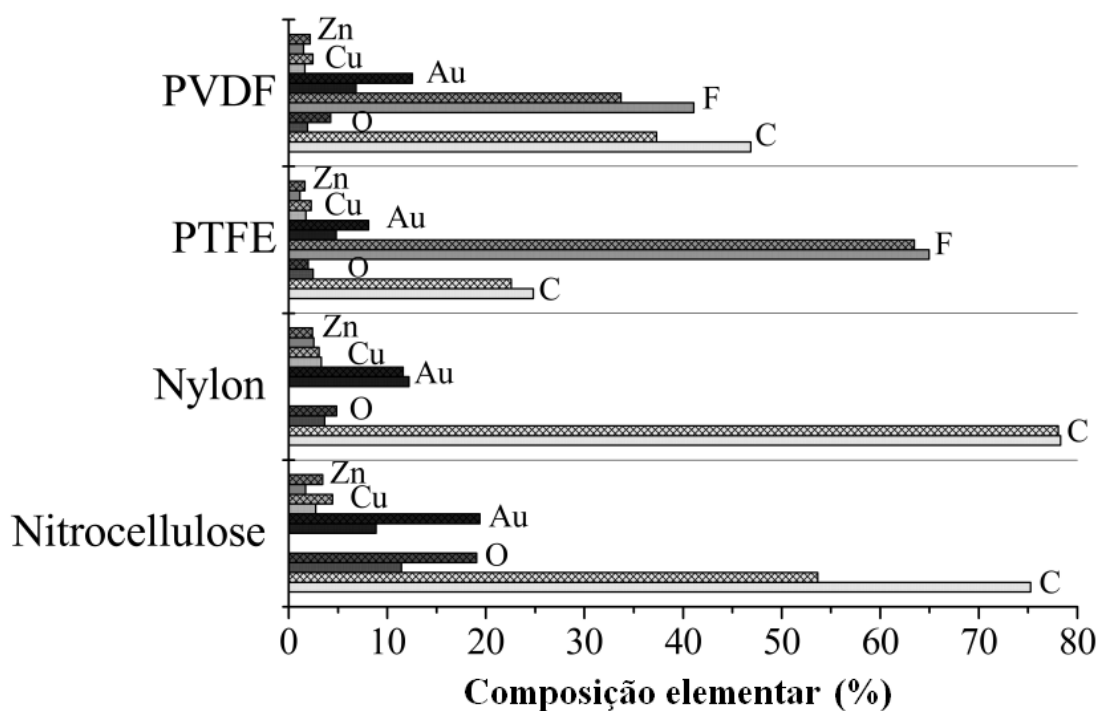


Figura 3.6 – Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) das membranas poliméricas porosas novas e usadas, representando os percentuais de átomos presente em cada material. As barras lisas referem-se às membranas novas, enquanto as hachuradas referem-se às membranas usadas.

Para verificação de propriedades relacionadas às interações atrativas e adesivas, bem como com propriedades de elasticidade de cada membrana, foram realizados testes de espectroscopia de força (figura 3.7).

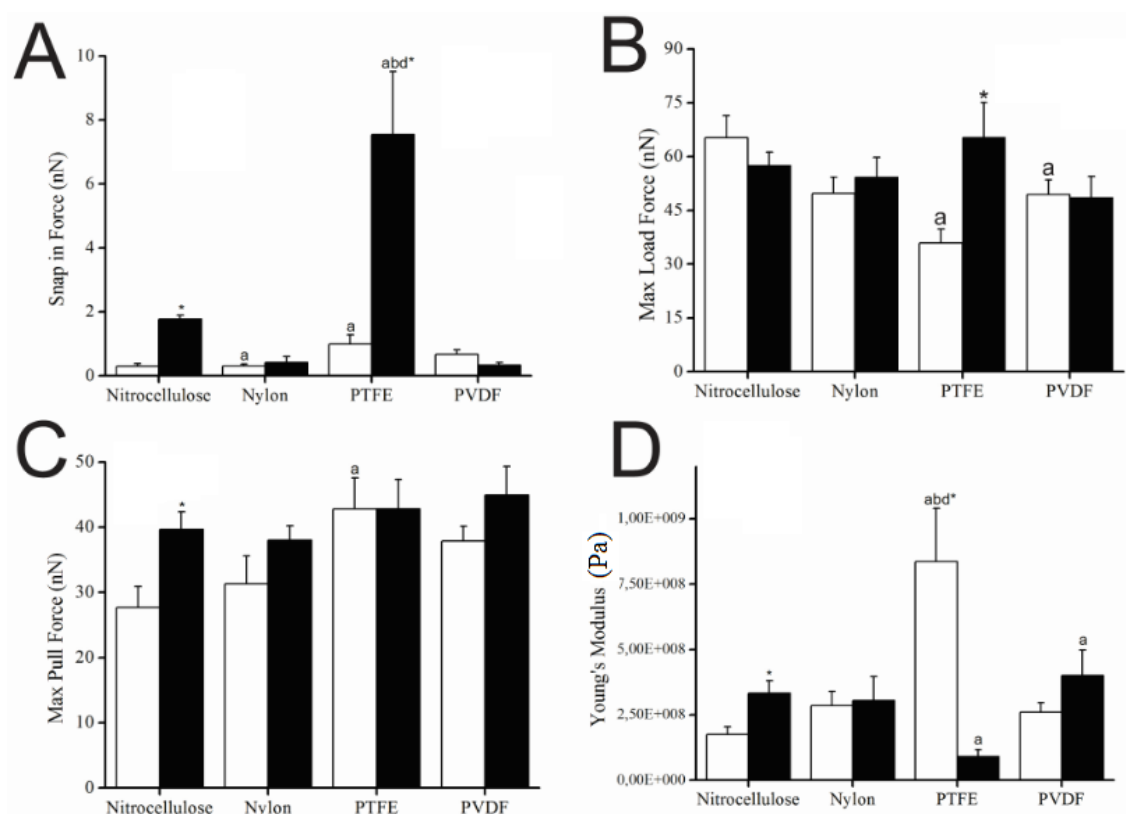


Figura 3.7 – Resultados obtidos a partir de análises por espectroscopia de força utilizando-se MFA para as partes superiores (colunas brancas) e inferiores (colunas pretas) das diferentes membranas testadas. A presença do símbolo “a” indica diferença estatística significativa para a membrana de nitrocelulose, “b” para *nylon*, “c” para PTFE e “d” para PVDF, ($p < 0,05$). Diferenças entre as partes superior e inferior estão assinaladas por um asterisco (*).

A figura 3.7 representa os resultados obtidos por espectroscopia de força dos parâmetros “*Snap in*, *Maximum Load Force*, *Maximum Pull Force* e *Young’s Modulus*”, já apresentados e explicados no capítulo II. Nessa parte do estudo, inicialmente foi verificada a possível existência de diferenças entre as partes superiores e inferiores de cada membrana, uma vez que alguns dos fabricantes não descreviam a existência de um lado específico ou correto para aplicação das amostras nas membranas.

Conforme representado na figura 3.7, as membranas de PTFE e nitrocelulose apresentaram diferenças significativas entre as partes superiores e inferiores. O resultado para o parâmetro de força *Snap in* para a parte superior da membrana de PTFE foi cerca de sete vezes maior que o valor da parte inferior da membrana. A parte superior da membrana de nitrocelulose apresentou valor de *Snap in* cerca de seis vezes maior que a parte inferior. Esses resultados sugerem a existência de diferenças acentuadas entre as partes superiores e inferiores dessas membranas. Essa discrepância possivelmente relaciona-se com etapas de produção de cada membrana polimérica.

Para esse mesmo parâmetro de espectroscopia de força, que envolve os padrões de interações atrativas entre a ponteira e as superfícies dos materiais foram observadas diferenças significativas entre os grupos de materiais testados. Por exemplo, a membrana de PTFE, material classificado como fluoropolímero, foi significativamente diferente ($p < 0,05$) de todos os outros tipos de materiais, incluindo a membrana de PVDF, que também pertence à mesma classe polimérica. Para os outros parâmetros medidos por espectroscopia de força, como *Maximum load force* e *Maximum pull force*, a membrana de PTFE também diferiu das outras membranas ($p < 0,05$).

O último parâmetro analisado foi o “*Young’s modulus*”, que representa o módulo de elasticidade de cada material. A parte superior da membrana de PTFE apresentou diferença significativa em relação à sua parte inferior e a todas outras membranas, revelando esse material como o mais elástico, comparando-se aos demais ($p < 0,05$).

A caracterização de membranas poliméricas porosas por meio de técnicas que envolvem a observação em escala nanométrica pode ser reconhecida como uma atividade recente na literatura científica. Os primeiros relatos encontrados são de Chen et al (1994) e Bessières et al (1996) os quais apontam o uso de microscopias de varredura por sonda como potenciais ferramentas para descrever as propriedades superficiais de rugosidade e textura. Desde então, até o ano de 2012, os estudos utilizando essa ferramenta se referiam basicamente à análise dos aspectos de morfologia topográfica, determinação da rugosidade e medida de tamanho dos poros (Rajesh et al. 2011). Nesse ano, a partir da abordagem apresentada nesse capítulo III, Barbosa e Silva (2012) propuseram a inclusão de parâmetros de espectroscopia de força obtida por meio de análises de MFA como uma forma mais abrangente de caracterização em nanoescala de superfícies de membranas poliméricas porosas.

Conclusões

A abordagem experimental realizada nesse estudo possibilitou a obtenção de informações relevantes sobre as características topográficas, mecânicas e químicas das membranas poliméricas porosas de nitrocelulose, *nylon*, PTFE e PVDF. Verificou-se a existência de diferenças significativas entre as faces superior e inferior das membranas; a existência de diferenças significativas de rugosidade entre as membranas; constatou-se que a realização de um experimento de filtração pode alterar significativamente a

rugosidade das membranas; e observou-se que as membranas apresentaram tendências atrativas reduzidas.

As propriedades observadas forneceram informações úteis para caracterização em nanoescala de superfícies de membranas poliméricas porosas. Na presente Tese, a partir dessa caracterização, escolheu-se por não prosseguir com experimentos de funcionalização e imobilização de biomoléculas nessas membranas devido às forças de atração reduzida, juntamente com a dificuldade de manuseio desses materiais.

→ O artigo referente a esse capítulo foi publicado na revista internacional “*Journal of Membrane Science*”, intitulado: “**Synthetic polymeric porous membranes characterization: an approach to scrutinize their stiffness, roughness, and chemical composition**”, em julho de 2012. DOI: 10.1016/j.memsci.2012.03.025.

→ Uma perspectiva para futura continuação dessa abordagem experimental será a realização de um estudo investigando sobre possíveis relações entre as massas moleculares de proteínas imobilizadas nessas membranas com parâmetros de rugosidade e espectroscopia de força obtidos por MFA.

Referências Bibliográficas

Ahmad, A.L. et al. Morphological and thermal-mechanical stretching properties on polymeric lateral flow nitrocellulose membrane, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, pp. 3417–3424. 2009.

Bessièrès, A. et al. Investigations of surface properties of polymeric membranes by near field microscopy. *Journal of Membrane Science*, v. 109, pp. 271–284. 1996.

Bessieres, A.; Meireles, M.; Coratger, R. et al. Investigations of surface properties of polymeric membranes by near field microscopy, *Journal of Membrane Science*, v. 109, pp. 271–284. 1996.

Chen, R.T. et al. Structural characterization of Celgard microporous membrane precursors: melt-extruded polyethylene films. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 53, pp. 471–483. 1994.

Kolahdoozan, M. et al. A novel model for the effect of geometric properties of micro/nanoscale asperities on surface adhesion. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, v. 48, pp. 280–287. 2014.

Li, Q. et al. A novel ultrafiltration (UF) membrane with controllable selectivity for protein separation. *Journal of Membrane Science*, v. 427, pp. 155–167. 2013.

Naim, R. et al. Characterization of PVDF hollow fiber membrane for CO₂ stripping by atomic force microscopy analysis. *Separation and Purification Technology*, v. 109, pp. 98–106. 2013.

Park, N.; Kwon, B.; Kim, I.S.; Cho, J.W. Biofouling potential of various NF membranes with respect to bacteria and their soluble microbial products (SMP): characterizations, flux decline, and transport parameters, *Journal of Membrane Science*, v. 258, pp. 43–54. 2005.

Rajesh, S. et al. Preparation and characterisation of poly (amide-imide) incorporated cellulose acetate membranes for polymer enhanced ultrafiltration of metal ions. *Chemical Engineering Journal*, v. 171, pp. 33–44, 2011.

Riedl, K.; Girard, B.; Lencki, R.W. Influence of membrane structure on fouling layer morphology during apple juice clarification, *Journal of Membrane Science*, v. 139, pp. 155–166. 1998.

Shirazi, M.J.A. et al. Coalescing filtration of oily wastewaters: Characterization and application of thermal treated, electrospun polystyrene filters. *Desalination and Water Treatment*, v. 51, pp. 5974–5986. 2013.

Wong, P.C.Y. et al. Use of atomic force microscopy and fractal geometry to characterize the roughness of nano, micro, and ultrafiltration membranes, *Journal of Membrane Science*, v. 340, pp. 117–132. 2009.

Zaluzec, E.J. et al. Direct matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometric analysis of proteins immobilized on nylon-based membranes, *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, v. 5, pp. 230–237. 1994.

Capítulo IV

Caracterização estrutural e química de esferas de sílica antes e após a modificação por silanização para imobilização de tripsina

Introdução

As investigações no campo da proteômica podem ser vistas como uma das áreas da pesquisa científica na área de biologia, mais especificamente química de proteínas, que cresceram mais notável e rapidamente (Aebersold et al, 2003; Ho et al, 2002; Renella et al, 2014). A caracterização de proteínas e peptídeos normalmente requer etapas de hidrólise enzimática. Entretanto, o uso de uma enzima proteolítica, como a tripsina, por exemplo, representa um fator crítico de elevação de custos desses ensaios. Nesse contexto, a imobilização enzimática representa uma tentativa de reduzir os custos, pois possibilita sua reutilização em vários ciclos, além de minimizar os eventos de autólise, podendo ainda melhorar padrões cinéticos da enzima imobilizada, devido ao microambiente gerado pelo processo de imobilização (Purcena et al, 2009; Talbert e Goddard, 2012).

Uma dificuldade inerente à imobilização de enzimas refere-se à quantificação precisa da eficiência de imobilização enzimática. As técnicas espectrofotométricas ou colorimétricas apresentam, em geral, precisão e reprodutibilidade baixas. Nesse capítulo, aponta-se a utilização da cromatografia líquida ultrarrápida como uma ferramenta vantajosa na análise de quantificação indireta da eficiência de imobilização. Essa técnica apresenta alta reprodutibilidade e precisão na determinação da concentração de proteínas, enzimas e outras biomoléculas, pois permite a análise da absorção na região do ultravioleta individualizada dessas moléculas após sua separação em uma coluna cromatográfica.

Nesse capítulo a tripsina pancreática bovina foi imobilizada em superfície de partículas de sílica não modificadas (controle) e modificadas por reação de silanização com aminopropil-trietoxisilano (APTS). O planejamento experimental aplicado foi do tipo composto central (PCC) para a otimização das condições de imobilização testadas. As microscopias eletrônica de varredura (MEV) e de força atômica (MFA) foram utilizadas a para a caracterização microestrutural, nanométrica e nanomecânica. As sílicas controle e silanizada foram caracterizadas quimicamente por meio de

espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); espectroscopia de energia dispersiva (EDS); e análise termogravimétrica/diferencial (TGA/DTA). A quantificação indireta da imobilização da enzima foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência ultrarrápida. Os principais fragmentos peptídicos gerados após a hidrólise de albumina sérica bovina (BSA) pela tripsina imobilizada foram separados cromatograficamente, coletados e identificados por meio de espectrometria de massa com ionização a laser assistida por matriz e com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS e MS/MS). A hipótese testada nesse capítulo foi: “A modificação química da sílica com APTS pode modificar a nanorrugosidade e nanomecânica da superfície desse material, assim como as propriedades de imobilização de tripsina e a atividade da tripsina imobilizada?”.

Resultados e Discussão

Na figura 4.1 estão apresentadas as imagens referentes às superfícies das partículas de sílica controle (sem modificação por silanização) e silanizada obtidas por MEV. Pode-se observar claramente, nas diversas ampliações, que a silanização alterou drasticamente as características topográficas da superfície das partículas de sílica (E, F, G e H).

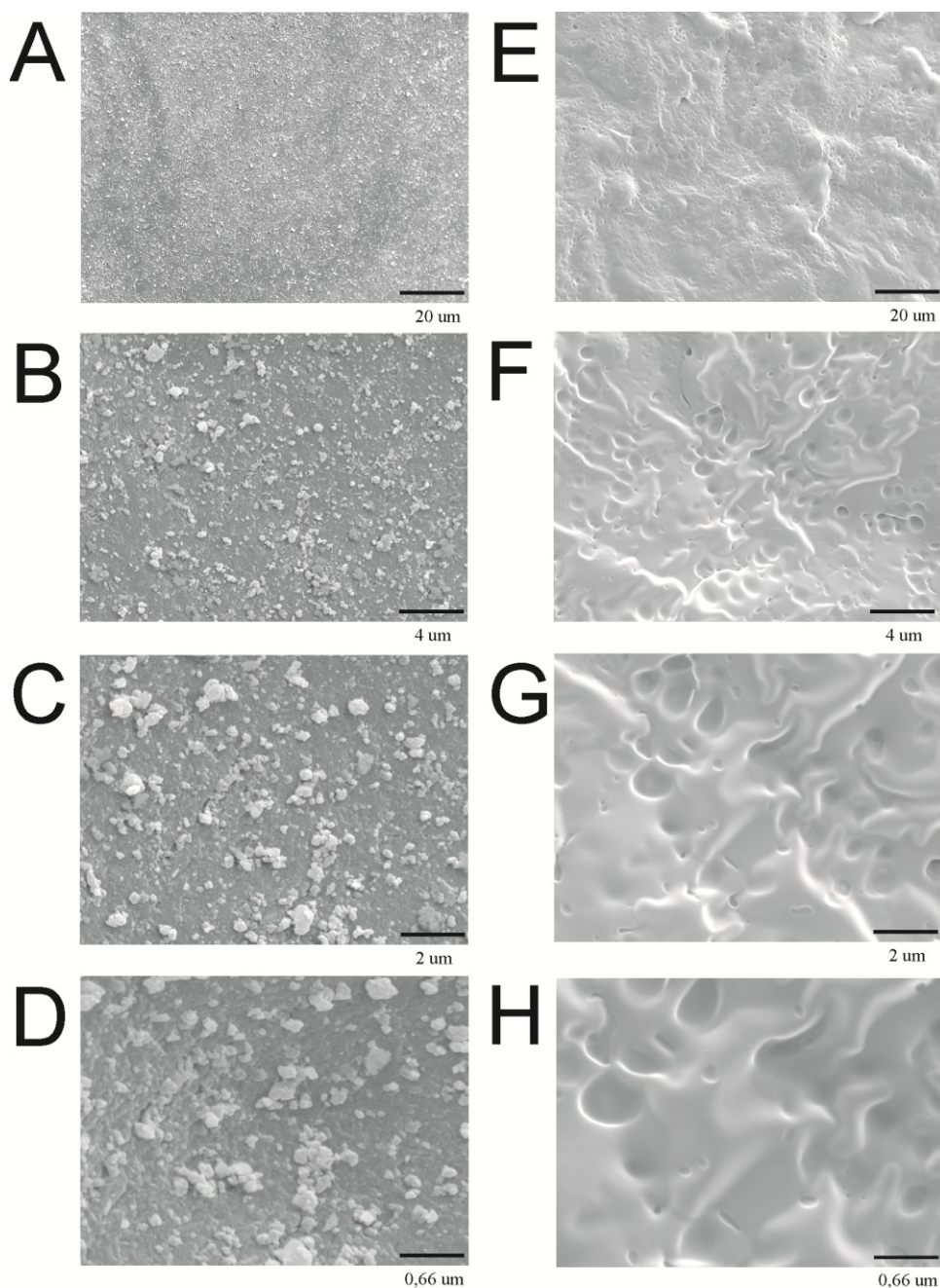


Figura 4.1 – Imagens topográficas obtidas em análise por microscopia eletrônica de varredura das superfícies de sílica controle (A, B, C e D) e silanizada (E, F, G e H), em ordem crescente de ampliações.

As imagens obtidas por meio de análise de MFA também evidenciam as alterações morfológicas causadas pelo processo de silanização (figura 4.2).

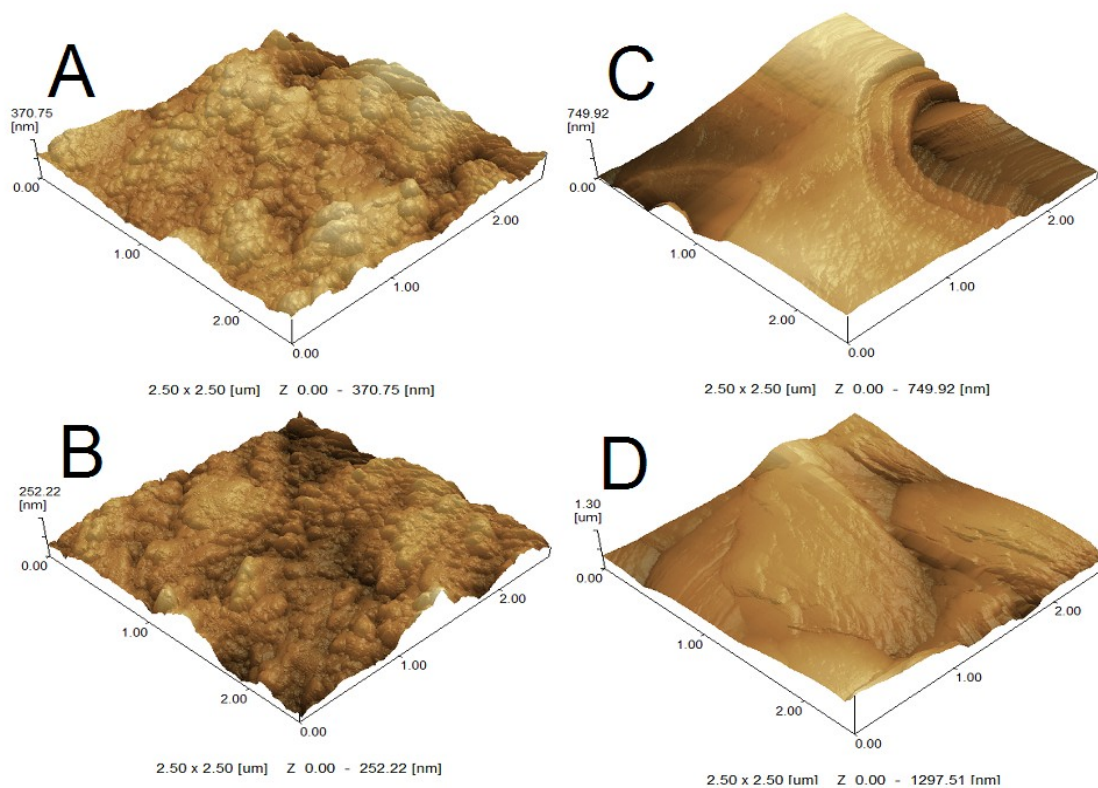


Figura 4.2 – imagens tridimensionais da topografia da sílica controle e silanizada obtidas por análise de microscopia de força atômica em modo dinâmico. (A e B) referem-se à sílica controle, enquanto (C e D) referem-se à sílica silanizada.

Os valores dos resultados referentes aos parâmetros de rugosidade (R_a , R_z , R_{zjls} , R_q , R_p e R_v) estão representados na figura 4.3. As médias dos resultados de rugosidades referentes à sílica modificada foram em torno de 3,5 vezes maiores que aquelas observadas para os controles, sendo que todos os parâmetros analisados apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Os valores dos parâmetros R_a , R_q , R_z e R_v foram cerca de 2 vezes maiores na sílica modificada; R_{zjls} foi 6,5 vezes maior e R_p foi aproximadamente 7 vezes maior.

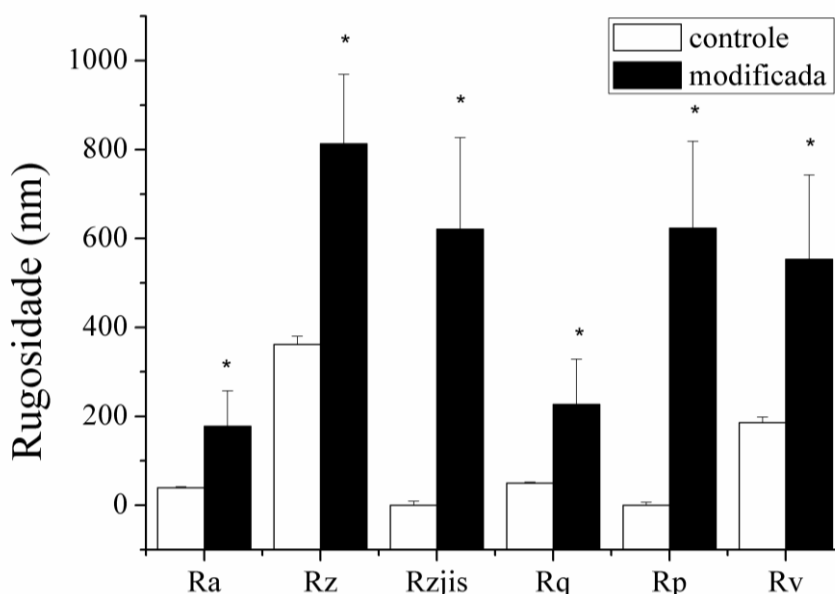


Figura 4.3 – Representação gráfica dos valores dos parâmetros de rugosidade (Ra, Rz, Rzjis, Rq, Rp e Rv) referentes à sílica controle e silanizada, obtidos por MFA. A presença do símbolo (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

As imagens topográficas (figuras 4.1 e 4.2) podem sugerir que a sílica silanizada apresenta em sua superfície trechos com platôs mais planos, quando comparadas com as superfícies não silanizadas, as quais aparentemente apresentam maior quantidade de irregularidades. Porém, considerando o nano-ambiente analisado nas varreduras, foi verificado que o processo de silanização na realidade aumentou significativamente o valor de todos os parâmetros de rugosidade, além de aumentar claramente a heterogeneidade dos valores de rugosidade das superfícies, como pode ser observado pelo aumento dos valores dos erros padrão associado à cada parâmetro de rugosidade na sílica modificada.

A partir da década de 60, pode-se encontrar na literatura inúmeros estudos envolvendo a silanização de partículas de sílica (Snyder e Ward, 1966; Karger e Sibley, 1973; de Venne et al, 1980; Porsch, 1991; Weetall, 1993). A principal área de aplicação desses materiais funcionalizados relacionava-se até pouco tempo atrás ao uso em colunas de separação de sistemas cromatográficos líquidos e gasosos, considerando-se suas propriedades de hidrofobicidade, rugosidade e área superficial (Snyder e Ward, 1966; Karger e Sibley, 1973; Pellizzari, 1974; de Venne et al, 1980; Khalil, 1981; Chen e Brauer, 1982; Schomburg, G., et al, 1984; Pesek e Cash, 1989; Porsch, 1991; Weetall, 1993).

Outro campo no qual os materiais de sílica silanizados receberam uma atenção especial mais recentemente foi na área de materiais odontológicos (Xu, 1999; Xu et al, 2000; Rinastiti et al, 2010; Han et al, 2013). Nessas investigações, os únicos estudos

que não observaram um aumento significativo na rugosidade foram Xu (1999) e Xu et al (2000). Eles utilizaram compósitos contendo partículas de sílica silanizada para melhorar as propriedades mecânicas e químicas de resinas utilizadas em restaurações dentárias. Nesses estudos, não foram observadas diferenças de rugosidade significativas entre os materiais silanizados e os não silanizados (Xu, 1999; Xu et al, 2000).

Os demais estudos relacionados apresentaram resultados referentes à rugosidade similares aos apresentados nesse capítulo, com aumento significativo de rugosidade considerando partículas de sílica silanizadas em comparação às não silanizadas. Tsai et al (2006) formaram um filme automontado a partir da deposição de partículas de sílica silanizadas para a obtenção de uma superfície com propriedades hidrofóbicas. Eles demonstraram que a silanização aumentou significativamente (em torno de 1,9 vezes) a rugosidade dos filmes em comparação aqueles não silanizados (Tsai et al, 2006). Li et al (2008) descreveram a obtenção de uma superfície ultra-hidrofóbica e com maior rugosidade pela utilização de partículas de sílica silanizadas. Rinastiti et al (2010) obtiveram resinas dentárias a partir de compósitos contendo partículas de sílica silanizada com rugosidade várias vezes maior em relação àquelas não modificadas. D'Acunzi et al (2010) apontaram o uso de partículas de sílica silanizadas como forma de obtenção de superfícies super-hidrofóbicas com rugosidades ajustadas pelo processo de secagem. Finalmente, Han et al (2013) compararam três sistemas de resinas para reparo dentário, sendo que aquele obtido a partir de sílica silanizada apresentou rugosidade significativamente maior.

A figura 4.4 mostra os resultados de medidas mecânicas obtidas por meio de espectroscopia força das partículas de sílica controle e modificada. Em contraste com os resultados quantitativos de rugosidade, todos os resultados da espectroscopia de força foram em média cerca de 20% menores que o controle, sendo portanto significativamente diminuídos ($p < 0,05$). Isso implica que a superfície de sílica modificada apresentou menor dureza (considerando o parâmetro *Max Load force*, que foi 29% menor em relação a superfície de sílica controle), menores tendências de adesão (considerando o parâmetro *Max Pull force* e *Detachment force*, que foram 15 e 10% menores em relação a superfície de sílica controle) e forças atrativas reduzidas (considerando o parâmetro *Snap in force*, que foi 10% menor em relação a superfície de sílica controle).

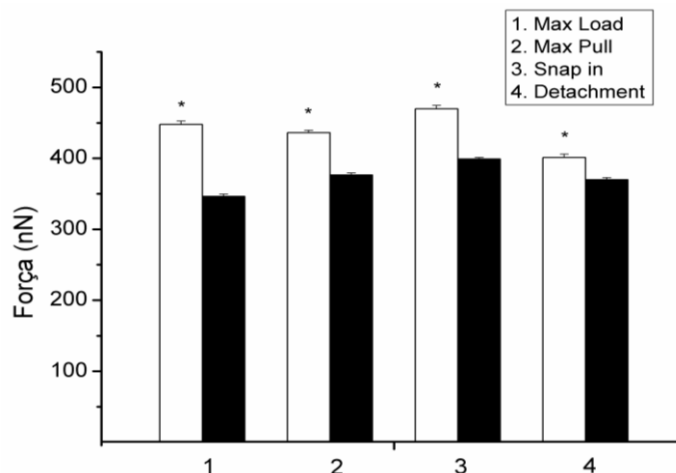


Figure 4.4 – Resultados obtidos por meio de análises de espectroscopia de força a partir de curvas de força *versus* deslocamento em microscópio de força atômica operado em modo contato. A presença do símbolo (*) indica diferença estatística significativa entre sílica controle e modificada ($p < 0,05$).

Considerando-se as aplicações médicas/odontológicas de compósitos contendo partículas de sílica silanizadas, pode-se dizer que em geral, foram relatados maiores valores de força de cisalhamento obtidos após a silanização (Özcan et al, 2006; Rinastiti et al. 2011; Stawarczyk et al, 2013;). Esses resultados não corroboram aqueles obtidos e apresentados no presente capítulo IV, principalmente quando se considera o parâmetro *Max Load Force*, que foi significativamente menor para a sílica silanizada ($p < 0,05$). Tal fato pode estar relacionado às diferenças nos métodos de aferição, juntamente às complexas composições das partículas avaliadas nos estudos médicos/odontológicos descritos.

Na figura 4.5 estão representados os resultados de EDS mostrando os percentuais de composição elementar da sílica antes e após a silanização. Observa-se que os níveis de silício se mantêm praticamente inalterados, com um aumento notório na composição de carbono na superfície das partículas de sílica.

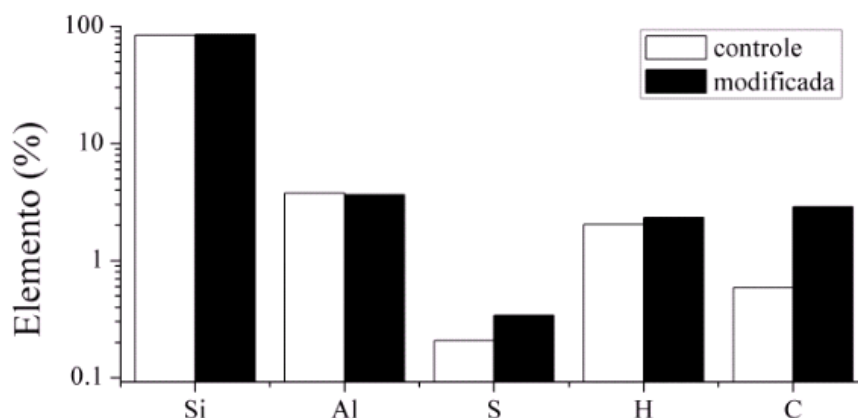


Figure 4.5 – Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) das superfícies das esferas de sílica controle e silanizadas, representando os percentuais de átomos detectados em cada material. As medidas de EDS foram adquiridas concomitantemente às análises de MEV.

Na figura 4.6 pode-se observar o ambiente químico nas superfícies das sílicas controle e silanizada, obtidas por meio de análises de FTIR. Em uma primeira visão geral, observa-se que a sílica modificada apresenta bandas de transmitância com maiores intensidades quando se compara ao controle. As bandas entre 1100 e 960 cm^{-1} são referentes à sílica gel e podem ser encontradas em ambos espectros (relacionam aos estiramentos das ligações entre Si–O–Si e Si–O–H, respectivamente). As bandas com transmitância por volta de 3455, 3010, 2969 e 2940 cm^{-1} aparecem somente na amostra de sílica modificada, sendo resultantes do processo de modificação química por APTS, similarmente aos resultados obtidos por Ramos et al (1998). A presença de água adsorvida foi evidenciada pela banda observada em aproximadamente 3455 cm^{-1} , principalmente na amostra de sílica modificada. Nessa mesma amostra foram observadas bandas características da presença do grupamento amino (ligação NH, por volta de 1560 cm^{-1}).

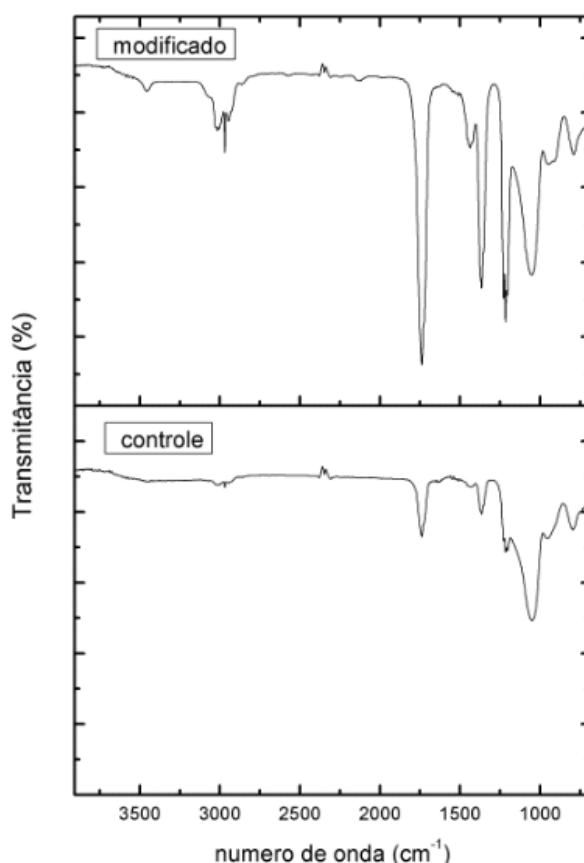


Figura 4.6 – Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da superfície das esferas de sílica controle e silanizadas. As medidas foram adquiridas utilizando um adaptador de reflectância total atenuada (ATR).

Na figura 4.7 estão representados os resultados obtidos por meio de análise termogravimétrica, com variação de temperatura entre 25 a 850° C para as amostras de

sílica controle e silanizada. Nessa faixa de temperatura foi possível observar duas etapas de decomposição, sendo que ambas amostras apresentaram um processo de perda de massa similares na primeira etapa de perda de massa (tabela 4.1).

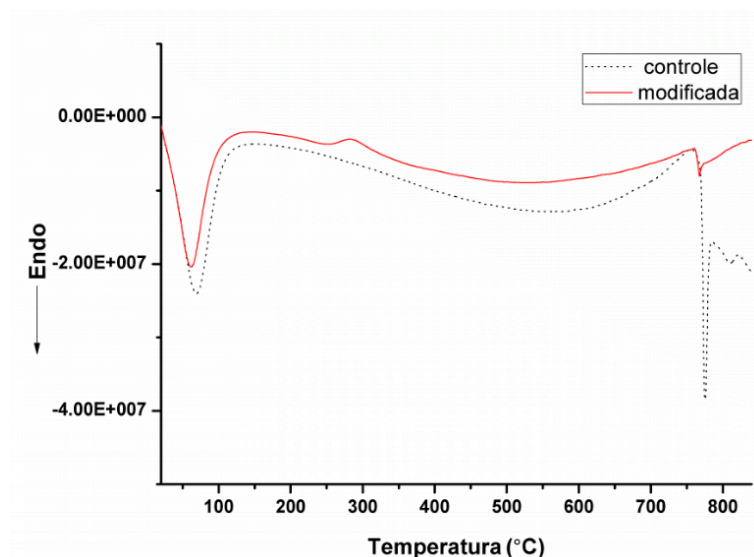


Figure 4.7 – Análise termogravimétrica (TG) das amostras de sílica controle e quimicamente modificadas por APTS. A faixa de variação da temperatura foi de 25 a 850°C.

Tabela 4.1. Resultados da análise das curvas obtidas por TG e DTG para as amostras de sílica controle e modificada

Amostra	Temperatura de decomposição T_d (°C)	Perda de massa (%)
1ª etapa		
Sílica controle	63,35	19,7
Sílica modificada	58,21	21,3

Na tabela 4.2 estão representadas as perdas de calor referentes às amostras de sílica controle e silanizada. Pode-se considerar o pico exotérmico da amostra sílica modificada, na segunda etapa, como sendo um evento diferencial e referente à silanização, pois a amostra sílica controle não apresenta esse evento.

Tabela 4.2 – Resultados da análise das curvas obtidas por TG e DTG para as amostras de sílica controle e modificada por análise termogravimétrica diferencial (DTA).

Amostra	Calor (J/g)
1ª etapa	
Sílica controle	-897,37
Sílica modificada	-930,25
2ª etapa	
Sílica controle	
Sílica modificada	37,86
3ª etapa	
Sílica controle	-125,05
Sílica modificada	-117,14
4ª etapa	
Sílica controle	-29,43
Sílica modificada	

Resultados semelhantes relacionados às caracterizações por EDS, FTIR e TGA de partículas de sílica silanizadas e não silanizadas foram observados por Kursunlu et al (2009). Eles relataram o aumento de carbono na superfície de sílica silanizada por meio de análises de EDS, assim como o aparecimento das bandas características da presença de APTS na superfície das partículas de sílica silanizada (por meio de análises de FTIR), assim como a ocorrência de duas etapas de decomposição na análise por TGA. Os mesmos autores descreveram que o primeiro pico ocorreu em temperaturas menores que 100°C, sendo relacionado à perda de água adsorvida, e o segundo pico, entre 397-807°C, sendo atribuído à condensação dos silanois, para produzir grupos siloxano, que resultam na perda de água. Resultados semelhantes de TGA foram obtidos por Prado et al (2002) e Sales et al (2004).

A quantificação da eficiência de imobilização, assim como da própria concentração de soluções contendo enzimas, constitui um fator de imprecisão, pois os métodos tradicionais, geralmente colorimétricos, apresentam altos índices de erro experimental associado. Nesse sentido, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência, devido à sua elevada precisão e reprodutibilidade. Em seguida, foi elaborada

uma curva padrão, a partir de concentrações relativas à concentração enzimática utilizada no ensaio de imobilização. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na figura 4.8, sendo que as concentrações de solução de tripsina variaram de 52 μM (100%) a 1,3 μM (2,5%).

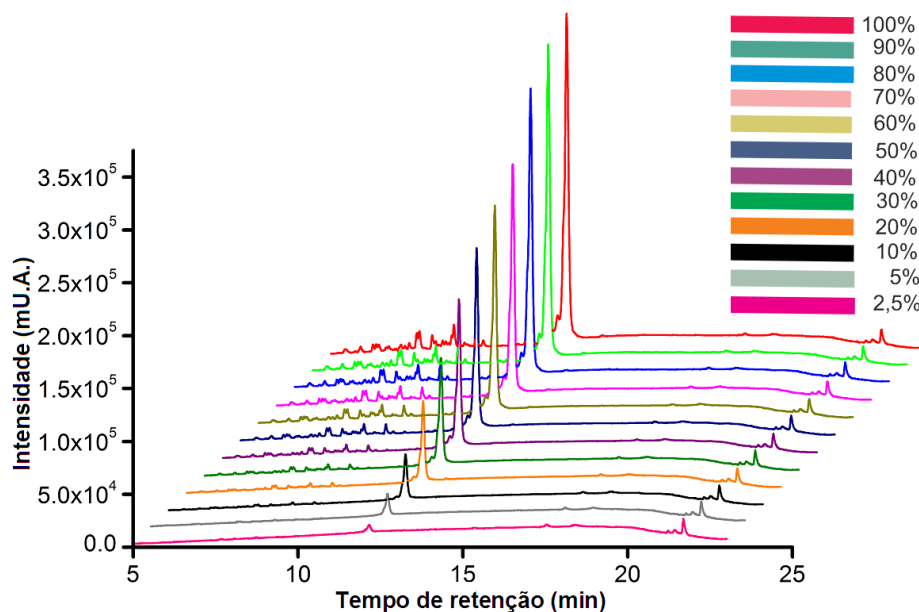


Figura 4.8 – Cromatogramas obtidos por FAST-HPLC com diferentes concentrações de solução de tripsina, variando-se de 52 μM (considerada 100%) a 1,3 μM (representando 2,5%), conforme ilustrado na escala de cores. O gradiente de concentração de acetonitrila variou linearmente de 5 a 65 % em 15 minutos.

As áreas sob as curvas, referentes em cada concentração ao pico correspondente à fração contendo a enzima, foram integradas (o tempo de retenção foi de aproximadamente 12 minutos, com concentração de acetonitrila em torno de 42%). Os valores das integrações das áreas foram representados graficamente relacionando-os às concentrações relativas. Uma alta linearidade entre os valores integrados das áreas e as concentrações relativas foi observada ($R^2 = 0,9974$), conforme representado na figura 4.9.

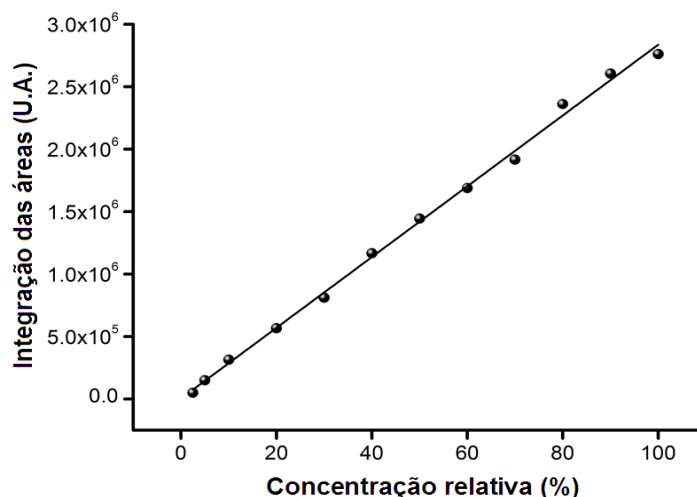


Figura 4.9 – Curva padrão obtida pela integração da área sob os picos referentes à fração correspondente à tripsina nos cromatogramas obtidos e apresentados na figura 4.8.

O próximo passo foi a realização dos ensaios de imobilização de tripsina nas partículas de sílica controle e silanizada. O experimento foi planejado segundo a metodologia de Planejamento Composto Central (PCC), utilizando-se o *software Statistica 8.0*. Esse planejamento possibilitou a verificação simultânea dos efeitos do pH e tempo de imobilização sobre a eficiência de imobilização, conforme mostrado na figuras 4.10 e 4.11. A tabela 1 (seção Material e Métodos) representa as matrizes de planejamento com as variáveis não codificadas e codificadas, respectivamente. Cada linha da matriz de planejamento corresponde a uma combinação de variáveis que representam um ponto experimental.

A partir dos pontos experimentais obtidos pelo planejamento experimental, foram realizados os testes de imobilização para sílica normal e silanizada, para cada combinação de variáveis (pH e tempo de imobilização). Pelos resultados obtidos (eficiência de imobilização), foram elaborados os gráficos de superfície de resposta, apresentados nas figuras 4.10 e 4.11.

Observa-se uma eficiência de imobilização de tripsina alta nos sistemas testados (entre 80 e 98%). Ambos apresentaram picos de eficiência de imobilização nos extremos de tempo, porém, analisando a superfície de resposta para a sílica controle (figura 4.10), pode ser observada uma faixa mais ampla de valores de pH das zonas de maior eficiência de imobilização. Após a silanização observa-se que a região máxima de imobilização de tripsina foi limitada àquela com valores de pH menores, associada a tempos menores de imobilização. Esse efeito pode ter sido causado pela presença do

APTS na superfície da sílica, criando um ambiente com propriedades hidrofóbicas mais significativas, que podem ter desestabilizado o processo de imobilização em condições de valores de pH maiores.

Diáz e Balkus Jr (1996) imobilizaram a tripsina e outras proteínas em sílica mesoporosa por adsorção física e obtiveram resultados similares aos apresentados nesse capítulo. Eles concluíram que a imobilização era dependente do pH, sendo favorecida em condições de valores de pH do meio menores que 7. Eles ainda modificaram a sílica pelo processo de silanização, porém o fizeram após o processo de imobilização de tripsina, com o objetivo de aumentar o aprisionamento de enzima e diminuir perdas por lixiviação.

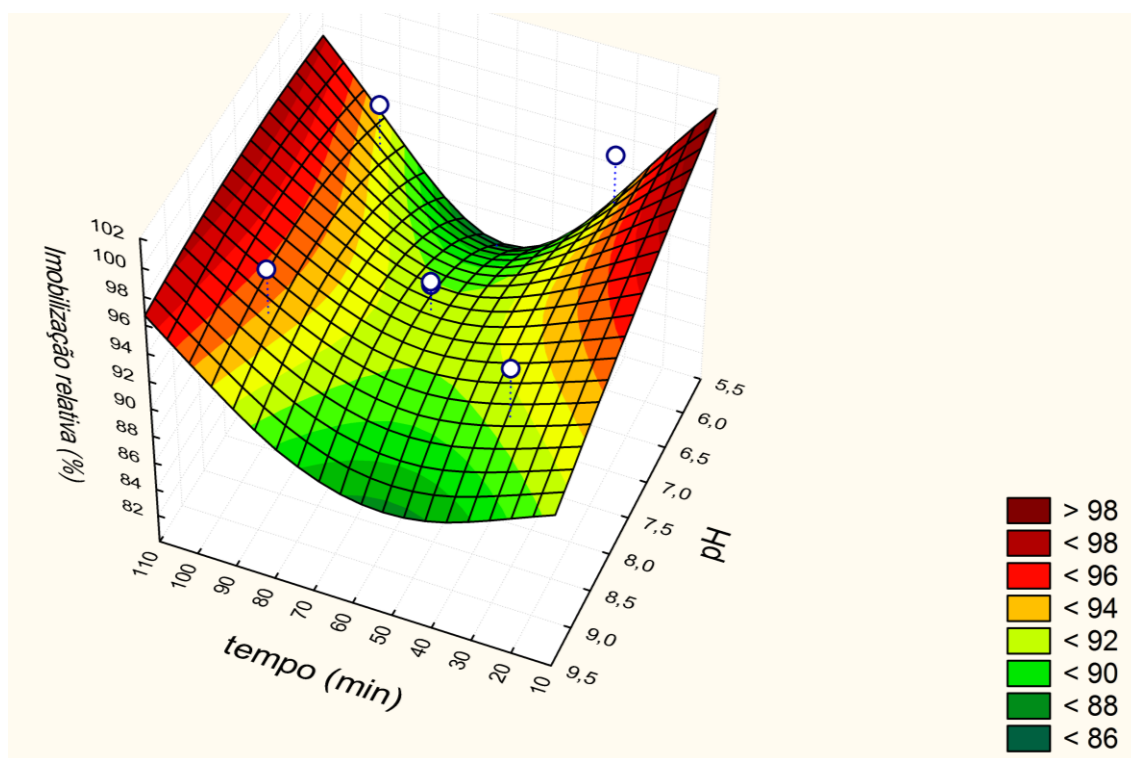


Figura 4.10 – Gráfico da superfície de resposta referente à eficiência de imobilização da tripsina em sílica controle. Eixo “x” representa o pH, “y” o tempo e “z” a eficiência de imobilização. Os pontos brancos indicam os pontos experimentais testados, cujos resultados se encontram acima da superfície de resposta.

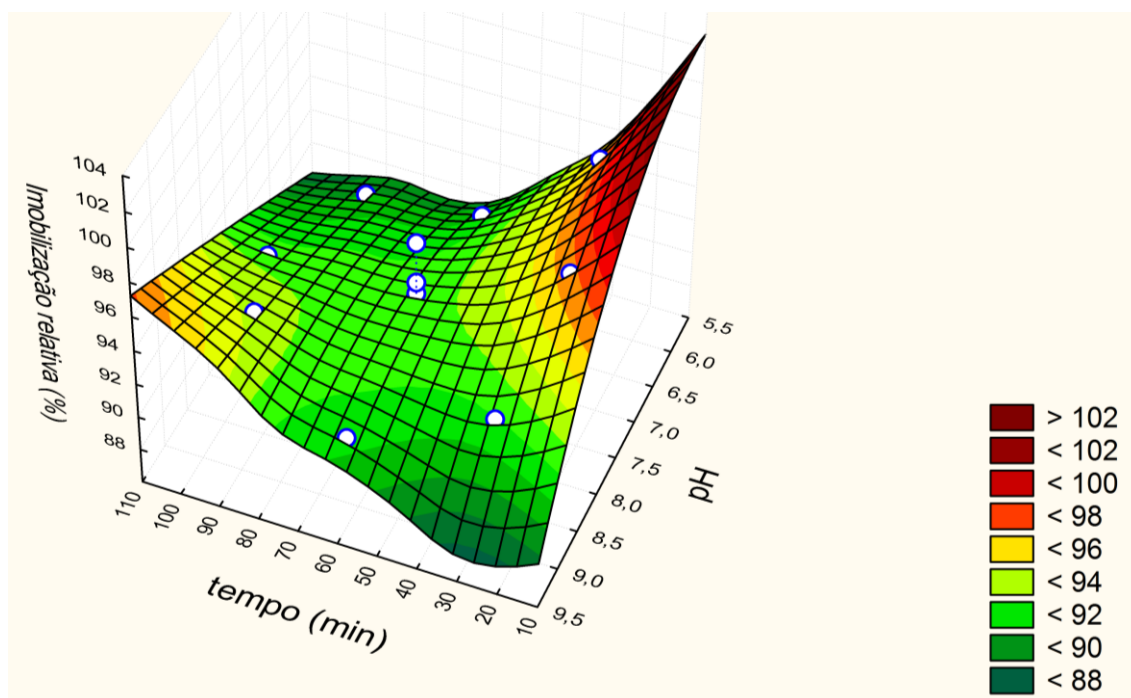


Figura 4.11 – Gráfico da superfície de resposta referente à eficiência de imobilização da tripsina em sílica silanizada com APTS. Eixo “x” representa o pH, “y” o tempo e “z” a eficiência de imobilização. Os pontos brancos indicam os pontos experimentais testados, cujos resultados se encontram acima da superfície de resposta.

Os sistemas contendo a tripsina imobilizada foram utilizados em testes de hidrólise de uma solução de albumina sérica bovina $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$. Os produtos das hidrólises foram separados por cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa (figura 4.12) e cada fração foi analisada por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF.

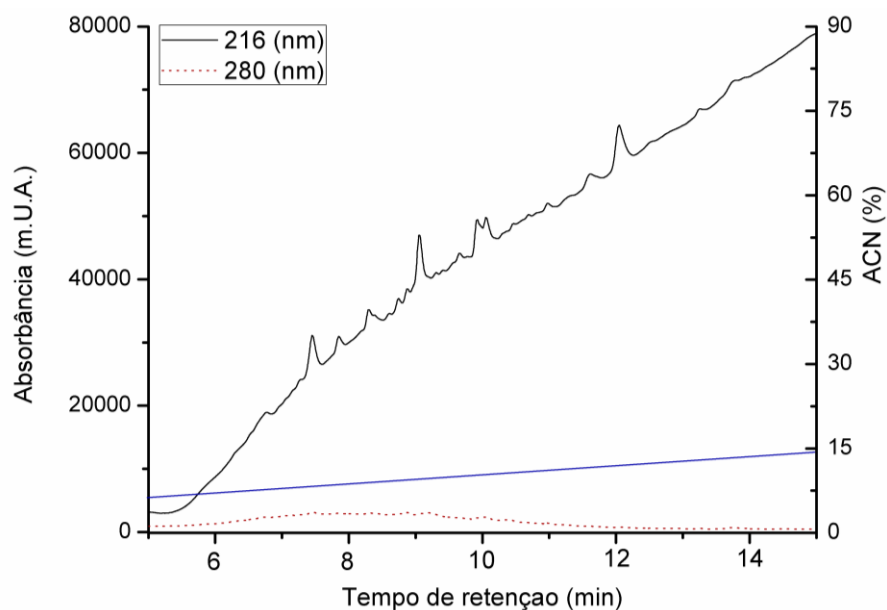


Figura 4.12 – Análise por cromatografia líquida ultrarrápida das amostras de albumina sérica bovina $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ hidrolisadas por tripsina imobilizada em sílica modificada por silanização.

Nas figuras 4.13 e 4.14 estão representados os espectros de massa referentes às hidrólises de albumina sérica bovina realizadas por tripsina immobilizada em sílica controle e silanizada, respectivamente. O perfil de massas moleculares dos íons resultantes dos peptídeos obtidos a partir das hidrólises é similar, sendo que a tripsina immobilizada na sílica não modificada (controle) produziu alguns íons que não foram observados nas hidrólises pela tripsina immobilizada em sílica modificada com APTS (silanizada). A figura 4.15 exemplifica o procedimento de sequenciamento dos peptídeos obtidos após a hidrólise enzimática.

A figura 4.16 evidencia os principais fragmentos peptídicos gerados pela hidrólise da albumina sérica bovina pela tripsina immobilizada em sílica modificada, indicando sua atividade preferencial de clivagem por algumas regiões específicas do substrato albumina, o que pode ter sido resultante da alteração da hidrofobicidade da superfície da sílica modificada, causada pela presença do APTS.

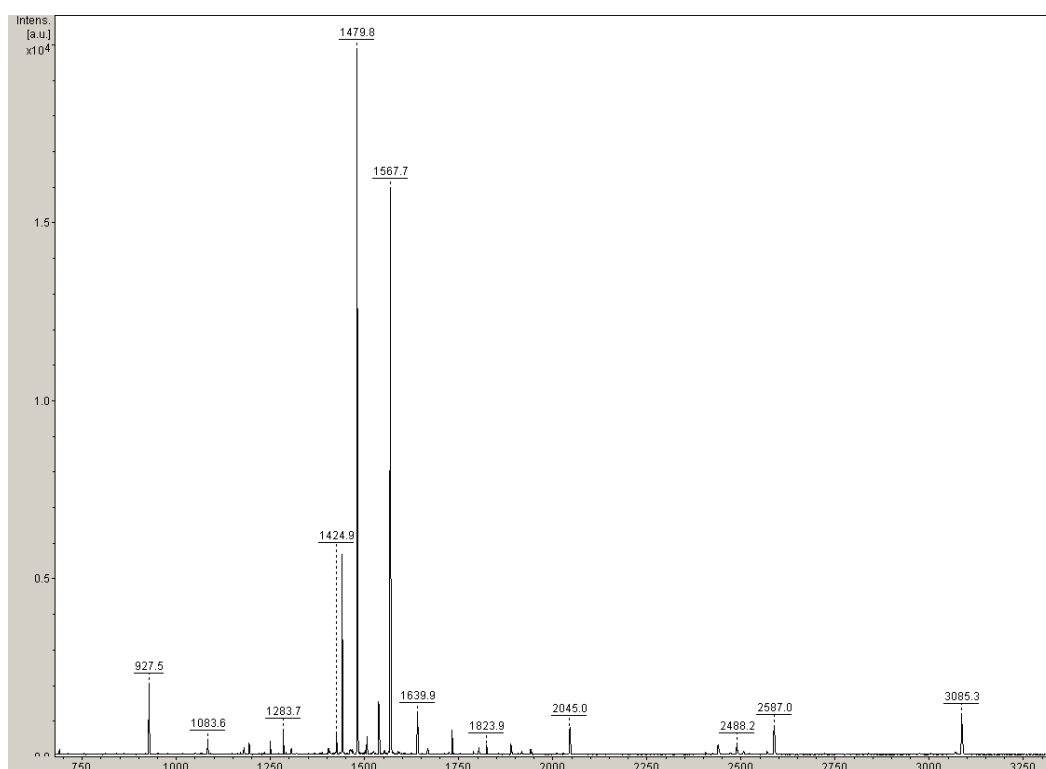


Figura 4.13 – Espectro de massa (MALDI-TOF) das amostras de albumina sérica bovina a $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ hidrolisadas por tripsina immobilizada em sílica controle. A faixa de massa analisada variou de (m/z) 600 a 3500, utilizando o modo refletido positivo.

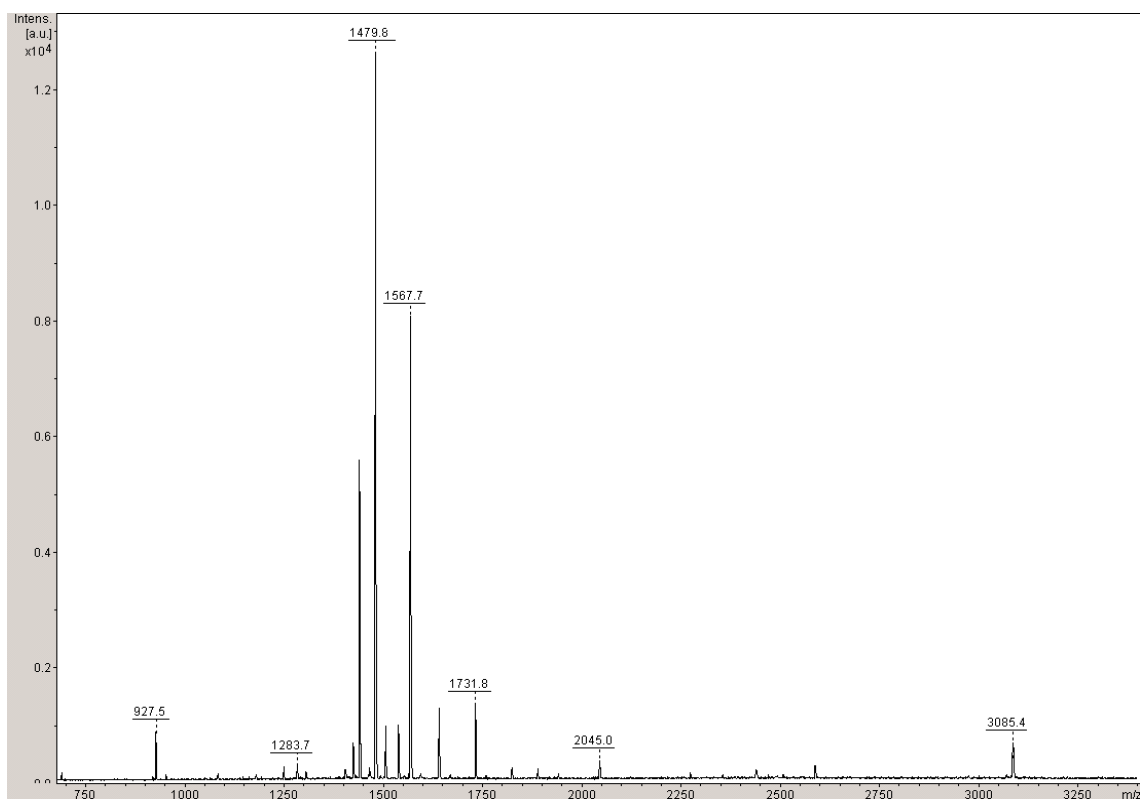


Figura 4.14 – Espectro de massa (MALDI-TOF) das amostras de albumina sérica bovina a $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ hidrolisadas por tripsina imobilizada em sílica silanizada. A faixa de massa analisada variou de (m/z) 600 a 3500, utilizando o modo refletido positivo.

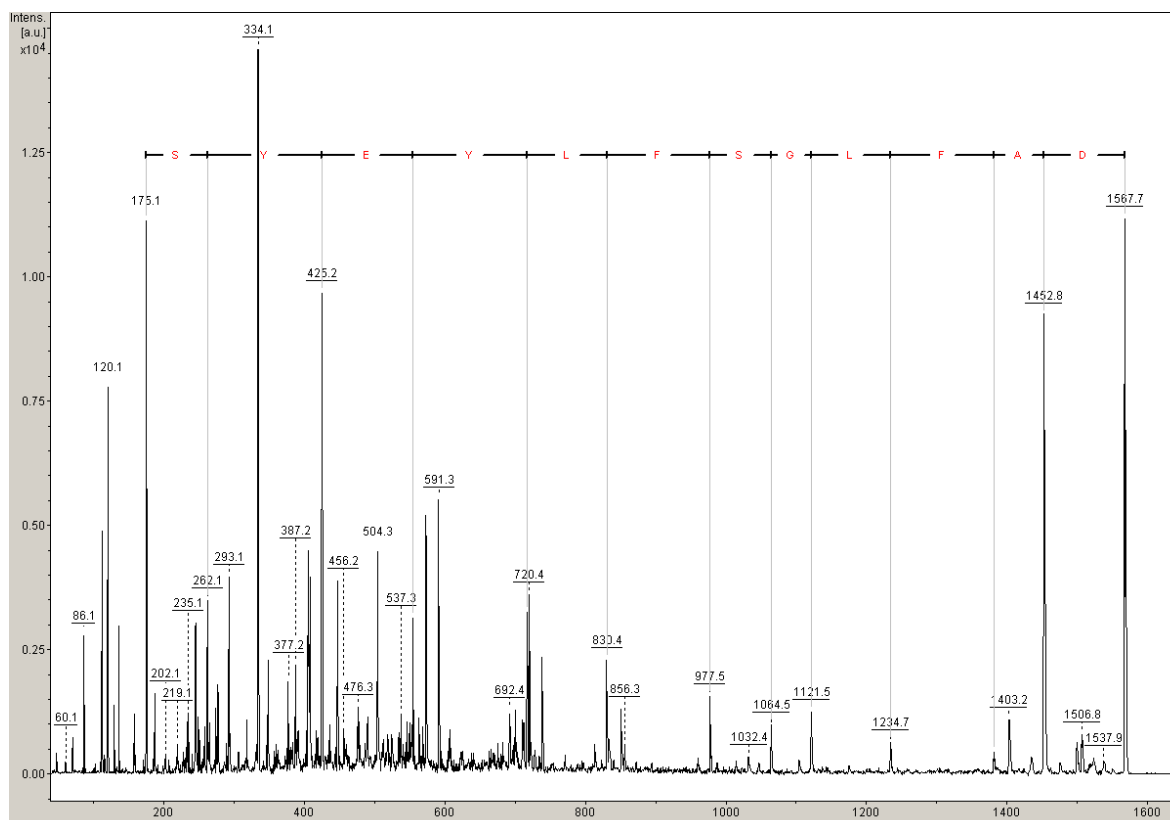


Figura 4.15 – Sequenciamento do componente molecular de massa $[M+H]^+ = 1567,7 \text{ Da}$ obtido pela hidrólise de albumina sérica bovina em uma solução a $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ utilizando a tripsina imobilizada em sílica modificada. Os íons de série y estão assinalados na sequência obtida.

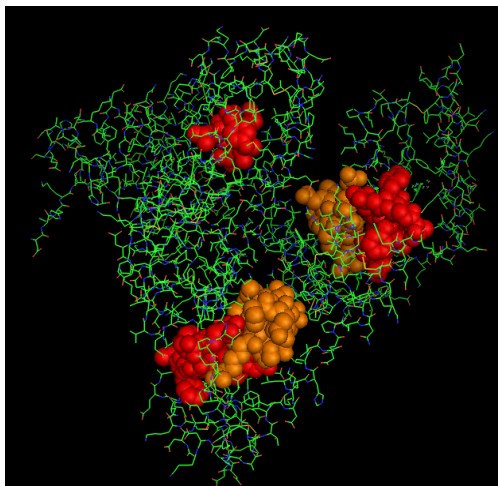


Figura 4.16 – Representação tridimensional da molécula monomérica de albumina sérica bovina, evidenciando em representação *spacefill* as regiões na molécula que foram preferencialmente clivadas pela tripsina imobilizada em sílica silanizada. Utilizou-se o código PDB ID: 1E7I e a ferramenta gráfica molecular PyMOL para produção da imagem.

Wang et al (2000) imobilizaram tripsina a uma lamínula de vidro, em um dispositivo microfluídico integrado a um espectrômetro de massa e obtiveram um perfil de massas moleculares similares aos encontrados no grupo controle do presente estudo. Tal fato aponta uma possível seleção de sítios de clivagem para a tripsina imobilizada em sílica modificada, possivelmente criada pelo ambiente mais hidrofóbico da superfície silanizada.

Conclusões

Observou-se que a modificação química da sílica por meio de reação com APTS resultou em alterações morfológicas significativas na superfície das esferas de sílica. A caracterização química evidenciou as alterações na composição elementar, ambiente químico e degradação térmica diferencial para as amostras de sílica silanizadas. Tais superfícies foram utilizadas como suporte para a imobilização de tripsina, sendo que se observou maior eficiência em tempos menores de imobilização, e em condições mais ácidas para a sílica modificada. A quantificação indireta da imobilização por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa mostrou-se como uma técnica apropriada, devido às altas linearidade e sensibilidade observadas. As atividades da tripsina imobilizada em sílica normal e modificada com APTS apresentaram potencial para aplicações em estudos de elucidação da estrutura primária de proteínas, sendo que no sistema contendo sílica modificada observou-se uma restrição no número de peptídeos gerados, provavelmente devido ao microambiente com maior hidrofobicidade condicionado pela modificação por silanização.

Referências Bibliográficas

- Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, v. 422, pp. 198-207. 2003.
- Chen, T.M.; Brauer, G.M. Solvent effects on bonding organo-silane to silica surfaces, *Journal of Dental Research*, v. 61, pp. 1439–1443. 1982.
- D'Acunzi, M., et al. Superhydrophobic surfaces by hybrid raspberry-like particles, *Faraday Discussions*, v. 146, pp. 35–48. 2010.
- de Venne, J.L.M. et al. Synthesis of a nonpolar, chemically bonded stationary phase with low residual hydroxyl group content, *Chromatographia*, v. 11, pp. 13–17. 1980.
- Diáz, J.F.; Balkus Jr, K.J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 2, pp. 115–126. 1996.
- Han, I.H. et al. Effect of various intraoral repair systems on the shear bond strength of composite resin to zirconia, *Journal of Advanced Prosthodontics*, v. 5, pp. 248–255. 2013.
- Ho, Y. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry, *Nature*, v. 415, pp. 180-183. 2002.
- Karger, B.L.; Sibley, E. Study of chemically bonded supports in gas chromatography, *Analytical Chemistry*, v. 45, pp. 740–748. 1973.
- Khalil, A.M. Development of surface porosity by trimethylchlorosilane treatment: Nitrogen adsorption measurements on aerosil 200 silica, *Surface Technology*, v. 14, pp. 373–382. 1981.
- Kursunlu, A.N. et al. Chemical modification of silica gel with synthesized new Schiff base derivatives and sorption studies of cobalt (II) and nickel (II), *Applied Surface Science*, v. 255, pp. 8798–8803. 2009.
- Li, X. et al. Conversion of a metastable superhydrophobic surface to an ultraphobic surface *Langmuir*, v. 24, pp. 8008–8012. 2008.

- Özcan, M. et al. Bond strength of resin composite to differently conditioned amalgam, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, pp. 7–13. 2006.
- Pellizzari, E.D. High-resolution electron capture gas-liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, v. 92, pp. 299–308. 1974.
- Pesek, J.; Cash, T. A chemically bonded liquid crystal as a stationary phase for high performance liquid chromatography. Synthesis on silica via an organochlorosilane pathway, *Chromatographia*, v. 27, pp. 559–564. 1989.
- Porsch, B. Silica based aminopropyl-bonded phase trimethylsilylated with N-trimethylsilylimidazole, *Journal of Liquid Chromatography*, v. 14, pp. 71–78. 1991.
- Prado, A.G.S. et al. The increased thermal stability associated with humic acid anchored onto silica gel, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 70, pp. 191–197. 2002.
- Purcena, L.L.A. et al. The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. *Material Science and Engineering C*, v. 29, pp. 1077–1081. 2009.
- Ramos, M.A. et al. Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives, *Powder Technology*, v. 99, pp. 79–85. 1998.
- Renella, G. et al. Environmental proteomics: A long march in the pedosphere, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 69, pp. 34–37. 2014.
- Rinastiti, M. et al. Effects of surface conditioning on repair bond strengths of non-aged and aged microhybrid, nanohybrid, and nanofilled composite resins, *Clinical Oral Investigations*, v. 15, pp. 625–633. 2011.
- Rinastiti, M. et al. Immediate repair bond strengths of microhybrid, nanohybrid and nanofilled composites after different surface treatments, *Journal of Dentistry*, v. 38, pp. 29–38. 2010.
- Sales, J.A.A. et al. Attachment of 2-aminomethylpyridine molecule onto grafted silica gel surface and its ability in chelating cations, *Polyhedron*, v. 23, pp. 719–725. 2004.
- Schomburg, G., et al. Immobilization of stationary liquids on silica particles by γ -radiation, *Chromatographia*, v. 18, pp. 265–274. 1984.

Snyder, L.R., Ward, J.W. The surface structure of porous silicas, *Journal of Physical Chemistry*, v. 70, pp. 3941–3951. 1966.

Stawarczyk, B. et al. Adhesion of veneering resins to polymethylmethacrylate-based CAD/CAM polymers after various surface conditioning methods, *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 71, pp. 1142–1148. 2013.

Talbert, J.N.; Goddard, J.M. Enzymes on Material Surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 93, pp. 8-19. 2012.

Tsai, P.S. et al. Fabrication of hydrophobic surfaces by coupling of Langmuir-Blodgett deposition and a self-assembled monolayer, *Langmuir*, v. 22, pp. 5660–5665. 2006.

Wang, C. et al. Integration of immobilized trypsin bead beds for protein digestion within a microfluidic chip incorporating capillary electrophoresis separations and an electrospray mass spectrometry interface, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, v. 14, pp. 1377–1383. 2000.

Weetall, H.H. Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 41, pp. 157–188. 1993.

Xu, H.H.K. Dental composite resins containing silica-fused ceramic single-crystalline whiskers with various filler levels, *Journal of Dental Research*, v. 78, pp. 1304–1311. 1999.

Xu, H.H.K. et al. Dental resin composites containing ceramic whiskers and precured glass ionomer particles, *Dental Materials*, v. 16, pp. 356–363. 2000.

Capítulo V

Processo de funcionalização de superfícies de polipropileno baseado na polimerização de anilina para imobilização de enzimas e outras biomoléculas

Introdução

O polipropileno (PP) é um polímero semicristalino, derivado da polimerização do gás propeno ou propileno (C_3H_6), insolúvel em água, com ponto de fusão na faixa de 165 a 175°C. Podem ser destacadas as seguintes propriedades desse material: densidade na ordem de $0,905 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$; alta rigidez, superior à da maioria dos plásticos comerciais; elevada resistência ao impacto à temperatura ambiente; equilíbrio entre resistência ao impacto (tração) e rigidez; alta dureza superficial; alta resistência química; baixa absorção de água; baixa permeabilidade ao vapor de água; e baixa condutividade elétrica (Salomon, 2010). O principal método de processamento do PP é por meio da extrusão, que consiste no tratamento de resinas precursoras por meio de fricção e calor (Ashland et al, 2001).

O PP, assim como vários outros polímeros plásticos (Caramori e Fernandes, 2004; 2008), podem ter suas superfícies modificadas ou funcionalizadas com polianilina (PANI). A polianilina (PANI) compreende uma família de polímeros constituídos por 1000 ou mais unidades repetitivas de *p*-fenilenoimina, existindo em vários estados de oxidação e com diferentes valores de condutividade elétrica (Nalwa, 1997). A PANI sintetizada quimicamente tem sido utilizada como suporte para imobilização de vários tipos de moléculas devido às suas propriedades como estabilidade de armazenamento; condutividade elétrica; significativa reatividade química; capacidade de retenção elevada; e estabilização de biomoléculas (Fernandes, 2005).

Tais características propiciaram a aplicação da PANI como suporte na imobilização de inúmeras enzimas: peroxidase (Barbosa et al, 2012; Morrin et al, 2005; Kathleen et al, 2006; Mathebe et al, 2004); glicose oxidase (Parente et al, 1992; Bayramoğlu et al, 2010); tripsina (Wang et al, 2008; Purcena et al, 2009); lipase (Gowoun et al, 2007; Datta et al, 2013); urease (Lakard et al, 2011; Laska et al, 1999); invertase (Barbosa, 2009; Gülay et al, 2009); xantina dismutase e superóxido dismutase (Nadruz et al, 1996); colina oxidase (Ding et al, 2009); lactato desidrogenase (Gerard et al, 1999; Halliwell et al, 2002) e quitinases (Silva et al, 2011). Além dessas enzimas,

várias outras biomoléculas têm sido imobilizadas em PANI no intuito de obter biossensores, como por exemplo: ácido desoxirribonucleico (Hu et al, 2013), anticorpos (Sai et al, 2006) e peptídeos (Yemini et al, 2006).

A funcionalização de superfícies de PP representa uma área de interesse industrial crescente pois possibilita a obtenção de materiais com propriedades estruturais únicas e híbridas ou intermediárias àquelas apresentadas pelos componentes individuais (Ruggeri et al, 1983). Grande parte das modificações ou funcionalizações aplicáveis às superfícies de PP refere-se a modificações nas resinas ou materiais de partida para síntese do material polimérico (Evans et al, 1998). Tais reações têm sido realizadas em solução, no estado fundido e no estado sólido (Sônia et al, 1995).

As modificações realizadas em solução ou em estado fundido podem comprometer as propriedades físicoquímicas requeridas pelo processo de extrusão, o que representa limitações dessas modificações, uma vez que a extrusão constitui a técnica mais amplamente aplicada no processamento de polímeros plásticos (Mohanty et al, 2001). As modificações realizadas em estado sólido apresentam como característica comum o requerimento da aplicação de técnicas altamente energéticas, como ataque com plasma ou ultrassom, para romper a barreira de estabilidade química do PP (Galimbert et al, 1998).

Nesse contexto, o presente capítulo propõe a via alternativa de funcionalização em estado sólido de superfícies de PP com PANI, pelo processo de oxidação/polimerização da anilina e adesão das cadeias de PANI às cadeias de PP das superfícies internas de microtubos e ponteiras de micropipetas. Uma vez que essa funcionalização ocorre posteriormente ao processamento do PP, as limitações relacionadas às alterações químicas que comprometem a extrusão da resina de PP são superadas. A superfície de PP funcionalizada com PANI pode também ser considerada como quimicamente ativada, uma vez que a PANI apresenta reatividade química superior ao PP, sendo susceptível às inúmeras reações químicas características dos grupos amino-benzeno. A presença da PANI possibilita que a superfície de PP se torne um material com condutividade elétrica, ampliando as potencialidades de aplicações dessa blenda polimérica. A funcionalização do PP por meio de ciclos de polimerização da anilina pode permitir ainda a obtenção de superfícies com nanorrugosidade e propriedades nanomecânicas controladas, que podem ser monitoradas por meio de análises de microscopia de força atômica (MFA), dependendo do número de ciclos de polimerização/funcionalização aplicados.

O presente capítulo V apresenta como objetivo investigar a superfície interna microtubos funcionalizados com PANI, comparando as propriedades obtidas após cada ciclo de polimerização. A morfologia, nanorrugosidade, propriedades de elasticidade e rigidez, tendências de atração/adesão e o ambiente químico nas superfícies poliméricas foram investigados. A hipótese testada nesse capítulo foi: “A polimerização da anilina sobre o PP altera a nanorrugosidade e as propriedades nanomecânicas dessas superfícies, possibilitando aplicações diversas, como em sistemas de captura de íons; suporte para imobilização de enzimas e biomoléculas para obtenção de reatores para síntese de nanopartículas?”. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de microscopia de força atômica (MFA) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para análise das nanopartículas produzidas a partir desses sistemas, foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A atividade da tripsina livre e imobilizada foi determinada espectrofotometricamente.

Resultados e Discussão

A figura 5.1 mostra que os ganhos de massa de 120 microtubos de PP funcionalizados com PANI, após quatro ciclos de polimerização, apresentaram uma distribuição normal, com ajuste para curva gaussiana apresentando $R^2 = 0,9$ e variação de ganho de massa entre 0,5 e 4,0 mg. As maiores frequências de ganho de massa estão situadas na faixa de valores entre 2,0 e 3,0 mg.

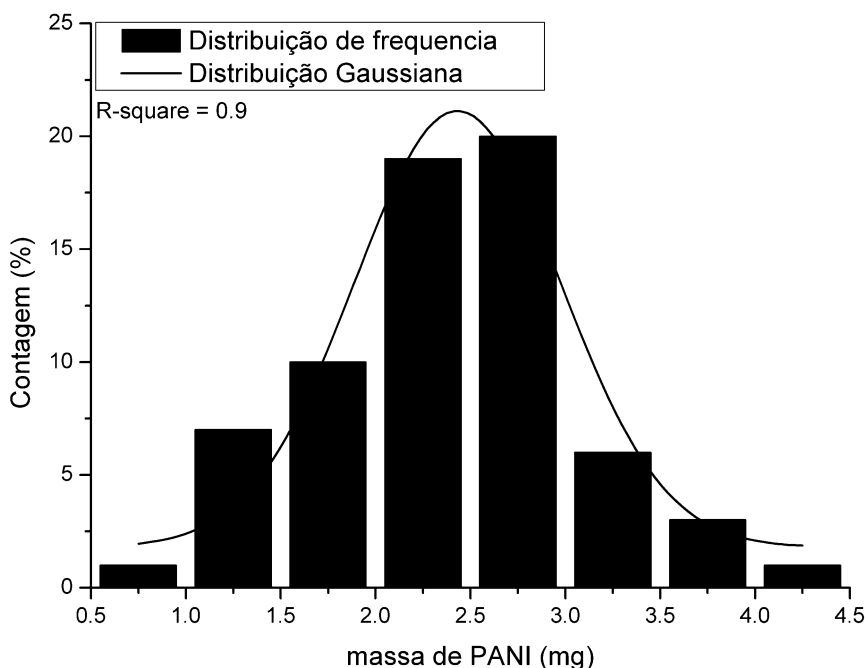


Figura 5.1 – Representação da distribuição de frequência do ganho de massa dos microtubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade após quatro ciclos de polimerização *in situ* da anilina.

Na figura 5.2 estão representados os espectros de FTIR referentes às superfícies de PP após cada ciclo de funcionalização. Pode-se observar que após o primeiro ciclo as bandas apresentaram maior intensidade de transmitância e conseqüentemente uma maior resolução dos espectros, permitindo a confirmação da presença de PANI nas superfícies de PP após a funcionalização. A banda com transmitância por volta de 1500 cm^{-1} refere-se ao grupamento NH presente no anel benzóide, enquanto a banda em torno de 1600 cm^{-1} refere-se à presença do mesmo grupamento NH no anel quinoide. A banda em 1100 cm^{-1} relaciona-se com o grau de dopagem da PANI, enquanto a banda em 2740 cm^{-1} relaciona-se ao estiramento do carbono presente nos grupamentos CH_2 (Sherman; Waite, 1985; Azevedo et al 1999).

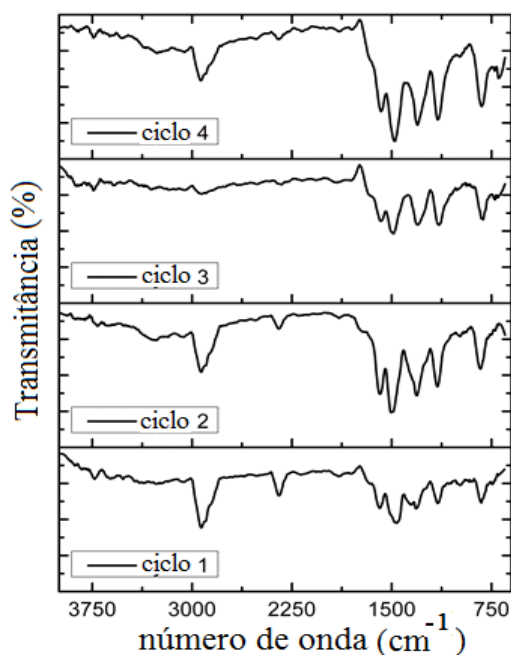


Figura 5.2 – Análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da superfície interna dos microtubos de PP funcionalizados com ciclos de polimerização da anilina. As medidas foram adquiridas utilizando um adaptador de reflectância total atenuada (ATR). O volume dos microtubos era de 1,5 mL.

Na figura 5.3 estão representados os resultados dos valores de nanorugosidade dos microtubos de PP após cada ciclo de polimerização. Nota-se uma clara tendência de aumento dos valores de rugosidade para os parâmetros Ra e Rq nos ciclos 1, 2 e 3; seguindo de uma tendência de estabilização do aumento no quarto ciclo. Para os demais parâmetros de rugosidade (Rz, Rzjis, Rp e Rv), pode-se observar uma tendência de aumento após cada ciclo. Quando análises semelhantes foram realizadas para as ponteiros de micropipetas de PP, estas apresentaram um aumento similar àquele observado nos microtubos de PP, considerando-se os parâmetros relacionados à nanorugosidade Ra e Rq (figura 5.4). Porém, para os demais parâmetros de nanorugosidade (exceto Rzjis) observa-se para as ponteiros uma tendência de estabilização de aumento no valor observado após o terceiro ciclo de funcionalização, o que sugere que a superfície atingiu um máximo de rugosidade. Tal fato provavelmente está relacionado à geometria da superfície internas das ponteiros de PP, as quais apresentam diâmetro reduzido devido ao ângulo de curvatura característico, que é diferente do ângulo de curvatura apresentado pelos microtubos de polipropileno.

Semelhantemente aos resultados obtidos na funcionalização das ponteiros de PP, Buckley et al (1994) e Xie et al (1994) verificaram que após três ciclos de polimerização da anilina, utilizando o mesmo agente oxidante utilizado na

funcionalização dos microtubos e ponteiros de PP (persulfato de amônio em HCl), ocorreu a estabilização dos valores de rugosidade avaliados por meio de MFA.

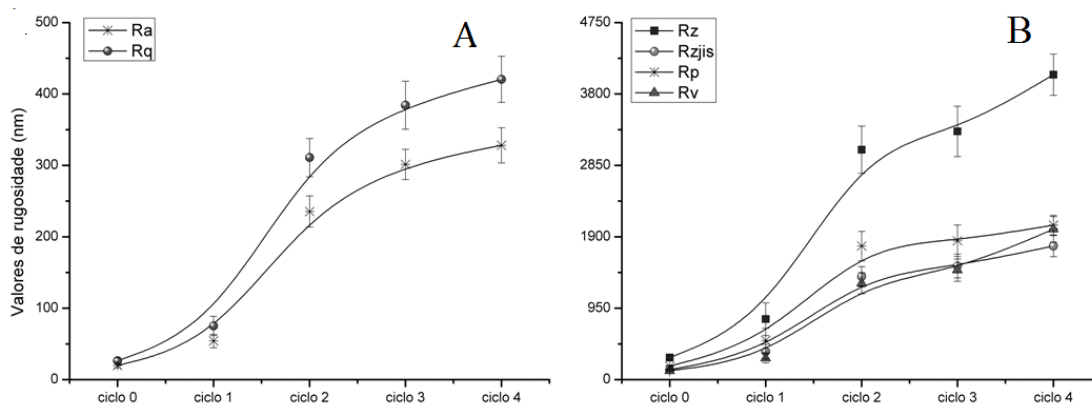


Figura 5.3 – Representa os resultados quantitativos relativos aos parâmetros de rugosidade em A (Ra e Rq) e B (Rz, Rzjis, Rp e Rv) referentes às superfícies internas dos microtubos de PP controle (ciclo 0) e funcionalizados (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato. Os microtubos utilizados apresentavam capacidade máxima de 1,5 mL.

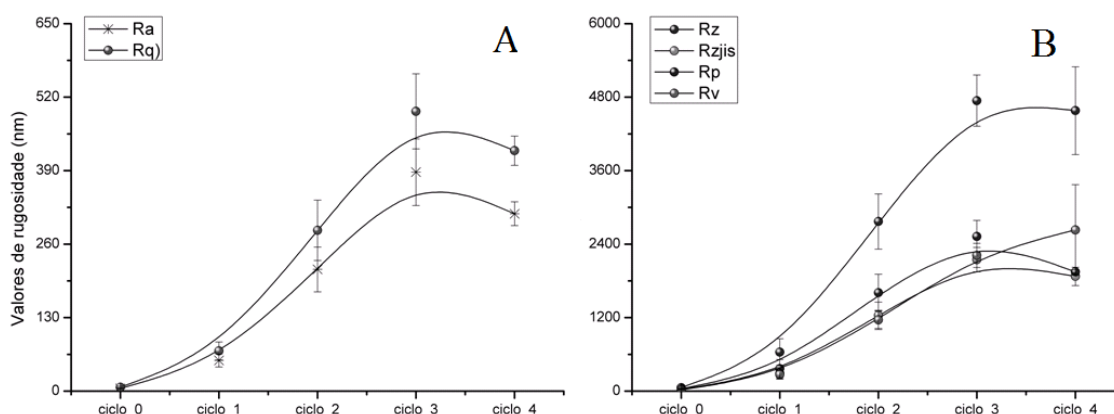


Figura 5.4 – Representa os resultados quantitativos relativos aos parâmetros de rugosidade (em A (Ra e Rq) e B (Rz, Rzjis, Rp e Rv) referentes às superfícies internas das ponteiros de PP de micropipetas (ciclo 0) e funcionalizadas (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato. As micropipetas utilizadas apresentavam capacidade de 200 μ L.

Os resultados de espectroscopia de força demonstraram que os ciclos de funcionalização causaram uma tendência de diminuição das forças atrativas entre os microtubos e a ponteira do microscópio de força atômica (figura 5.5). A mesma tendência foi observada nas ponteiros de PP de micropipetas, exceto para o quarto ciclo (figura 5.6). Para o parâmetro que reflete as propriedades adesivas da superfície (*Detach force*) observa-se uma tendência de aumento nos microtubos de PP após cada ciclo de funcionalização (figura 5.6). Considerando os resultados referentes aos aspectos nanomecânicos relacionados a alterações na dureza da superfície dos microtubos de PP

funcionalizados, observa-se uma tendência de diminuição após cada ciclo de funcionalização, com uma pequena amplitude de variação total dos valores obtidos para esse parâmetro. O parâmetro módulo de Young representa o módulo de elasticidade de cada superfície. Observa-se que os resultados para esse parâmetro apontaram um valor máximo encontrado no segundo ciclo de funcionalização (figura 5.5).

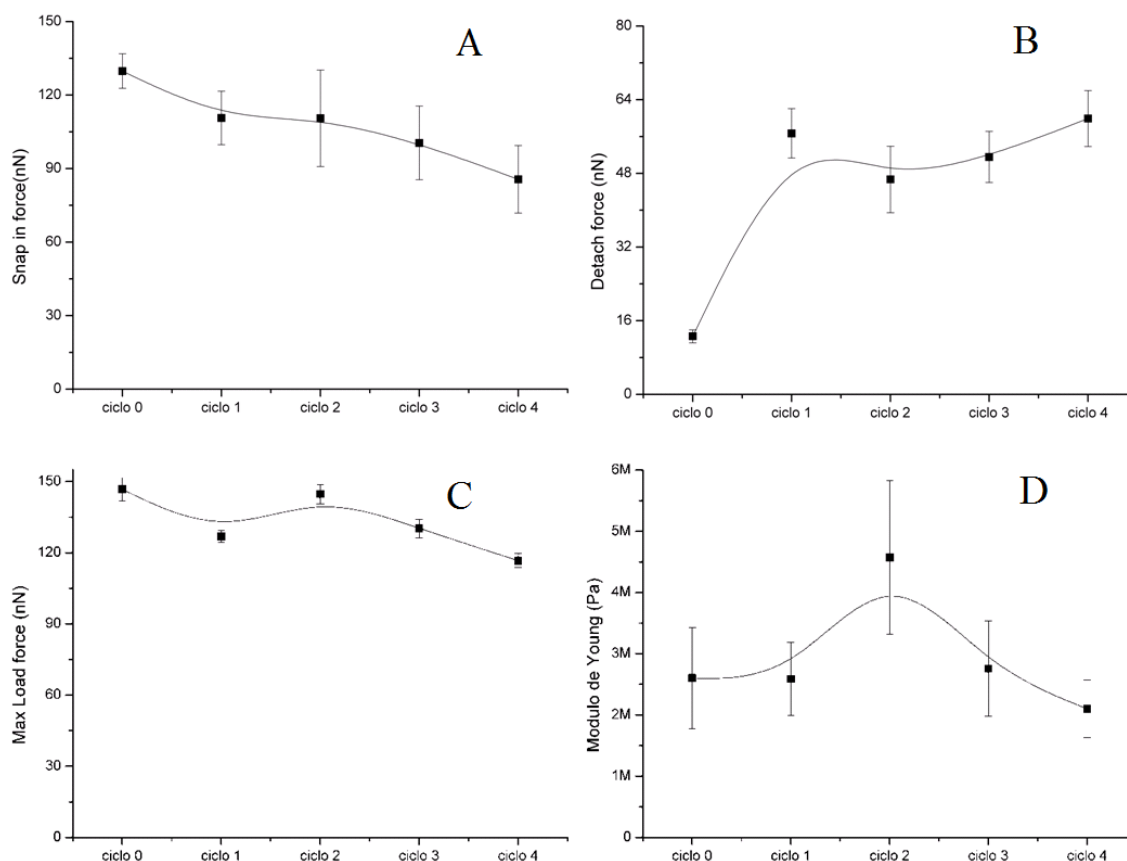


Figura 5.5 – Representação dos resultados quantitativos relativos ao parâmetro de espectroscopia de força “*Snap in force*” (A); “*Detachment force*” (B); “*Maximum Load force*” (C) e módulo de Young (D), referentes às superfícies internas dos microtubos controle (ciclo 0) e funcionalizados (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato. A unidade dos gráficos A, B e C é nano Newton, e a do gráfico D está em mega Pascal. Os microtubos utilizados apresentavam capacidade máxima de 1,5 mL.

Nas ponteiros de PP de micropipetas funcionalizadas foi observada uma diminuição nas forças adesivas (*Detach force*) após o primeiro ciclo de cobertura com PANI, seguindo com aumento relativo ao primeiro ciclo nos ciclos seguintes (figura 5.6). Observa-se uma diminuição no valor da força máxima (*Max load force*) aplicada à superfície com apenas um ciclo de funcionalização, em comparação ao controle. Os valores observados para os outros ciclos apresentaram pequena amplitude de variação entre si, porém foram maiores que os resultados referentes ao primeiro ciclo de

funcionalização. Observou-se um valor máximo para o parâmetro módulo de Young no terceiro ciclo de funcionalização, conforme mostra a figura 5.6.

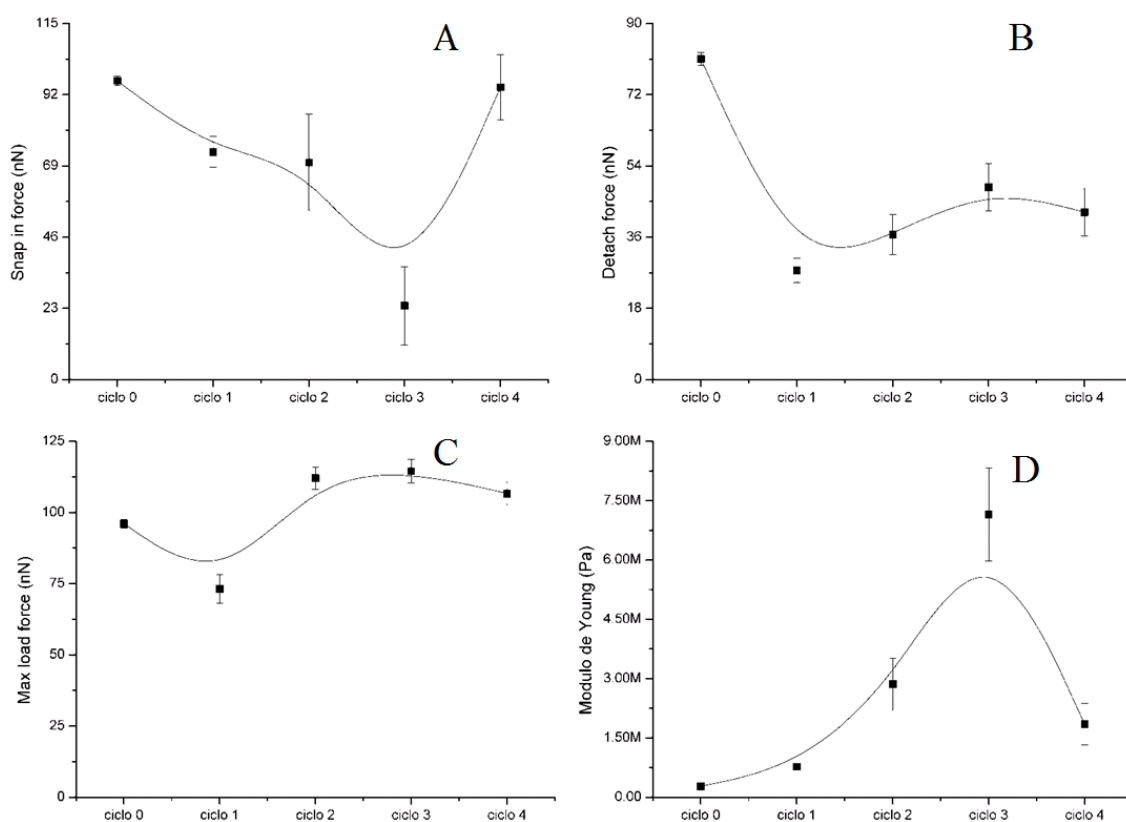


Figura 5.6 – Representação dos resultados quantitativos relativos aos parâmetros de espectroscopia de força: “*snap in force*” (A); “*detachment force*” (B); “*Maximum Load force*” (C) e Módulo de Young (D) referentes às superfícies internas das ponteiros de PP controle (ciclo 0) e funcionalizados (ciclos 1 ao 4), obtidos por MFA operada em modo contato. A unidade dos gráficos A, B e C é nano Newton, e a do gráfico D está em mega Pascal. As micropipetas utilizadas apresentavam capacidade de 200 μL .

Aplicações dos microtubos de PP funcionalizados com PANI

Imobilização de tripsina

Imobilizou-se covalentemente a tripsina nas superfícies de microtubos de PP modificadas por PANI e ativadas por glutaraldeído. A imobilização de tripsina em uma solução $52 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio $100 \text{mmol} \times \text{L}^{-1}$, pH 7,6 em uma superfície previamente ativada com glutaraldeído 2% (v/v) possibilitou a reutilização do sistema contendo a enzima imobilizada covalentemente por até vinte ciclos com retenção e manutenção de aproximadamente 60% da atividade inicial, conforme mostra a figura 5.7.

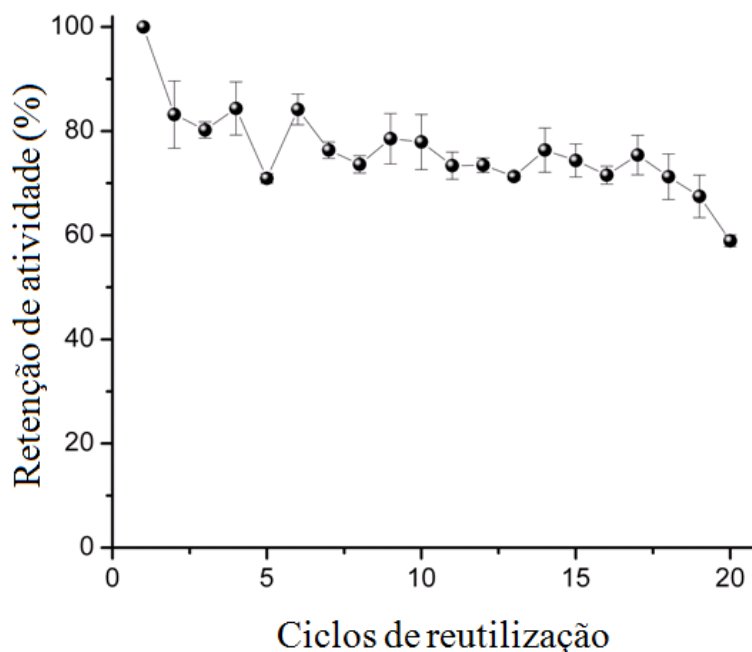


Figura 5.7 – Retenção de atividade da enzima tripsina imobilizada covalentemente via ligação cruzada com glutaraldeído, após até 20 ciclos de reutilização do sistema. A quantificação da atividade sobre o substrato BApNA ($100 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl $50 \text{ m} \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ contendo CaCl_2 $20 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) foi realizada espectrofotometricamente com leitura em comprimento de onda de 410 nm.

A enzima tripsina também foi imobilizada na superfície de microtubos de PP modificada por meio de adsorção. A imobilização de uma solução $52 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ de tripsina em tampão fosfato de sódio $100 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ pH 7,6 possibilitou a reutilização do sistema contendo a enzima imobilizada por adsorção por 9 ciclos com manutenção acima de 60% de retenção da atividade inicial, conforme mostra a figura 5.8. A maior retenção de atividade observada no sistema contendo tripsina imobilizada por meio de ligação covalente está possivelmente relacionada com a maior estabilidade da ligação formada entre a molécula da enzima e a PANI, via ligação cruzada com o glutaraldeído como já observado em estudos anteriores (Oliveira et al, 2008; Barbosa, 2009). Na imobilização por adsorção, os eventos de maior perda de enzimas possivelmente estão relacionados aos processos de lavagens pelos quais os microtubos de PP devem ser submetidos, antes de um novo ciclo de catálise enzimática.

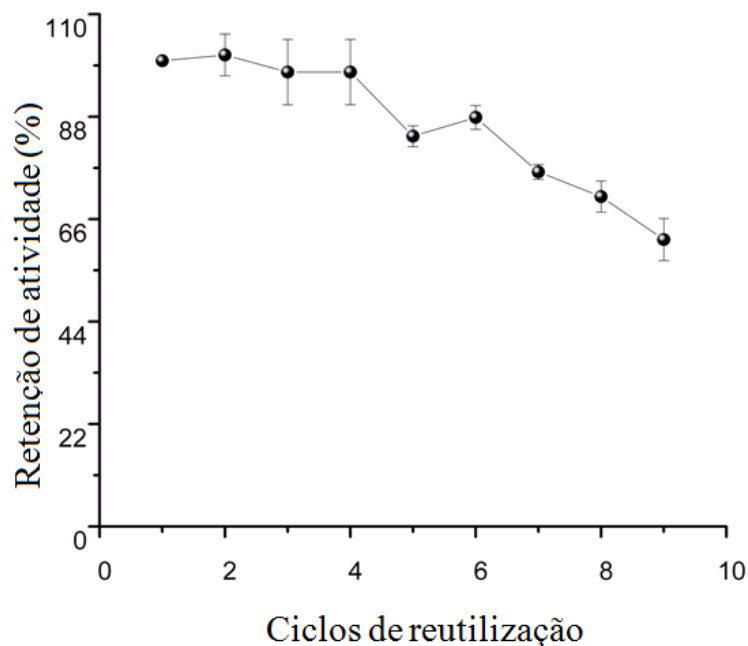


Figura 5.8 – Resultados de retenção de atividade da enzima tripsina immobilizada por adsorção. A quantificação da atividade sobre o substrato BApNA ($100 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl $50 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ contendo CaCl_2 $20 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$) foi realizada espectrofotometricamente com leitura em comprimento de onda de 410 nm.

Reatores baseados em PANI têm sido amplamente utilizados como sistemas catalíticos os quais podem ser reaproveitados em vários ciclos. Singh et al (2013) immobilizaram alfa-amilase covalentemente (via glutaraldeído) em um filme baseado em PANI, no qual resultou em retenção de aproximadamente 60% de atividade após 30 ciclos de reutilização. Pascoal et al (2011) immobilizaram essa mesma enzima em partículas de PANI ativadas com glutaraldeído, obtendo valores de retenção de atividade catalítica elevados após 15 ciclos em um reator de batelada. Rawal et al (2011) immobilizaram a enzima lacase em um eletrodo contendo nanopartículas de prata associadas a nanotubos de carbono e PANI para a produção de um detector de polifenol. O biossensor foi reutilizado 200 vezes ao longo de quatro meses quando armazenado a 4°C . Caramori e Fernandes (2007) immobilizaram tripsina em tiras de polietileno tereftalato (PET) funcionalizadas com PANI e ativadas com glutaraldeído, sendo que a enzima apresentou 100% de retenção enzimática após 4 ciclos de reutilização. Caramori e Fernandes (2004) também immobilizaram a enzima peroxidase, obtendo uma retenção de 70% de atividade após 5 ciclos de reutilização. Barbosa et al (2012) immobilizaram essa mesma enzima em partículas de PANI recobertas com magnetita e ativadas com glutaraldeído, apresentando em torno de 50% de retenção de sua atividade inicial após 13 ciclos de reutilização.

Uso dos microtubos de PP funcionalizados com PANI como sistemas de remoção de íons em solução

Os microtubos de PP funcionalizados com PANI também foram utilizados como possíveis sistemas de remoção de íons em solução. Após a incubação de soluções de cloreto férrico em diferentes concentrações por 1 hora e 24 horas, observou-se uma diminuição significativa da condutividade elétrica da solução após 24 horas de incubação, indicando que o sistema atuou ativamente como sequestrador de íons, conforme mostra a figura 5.9.

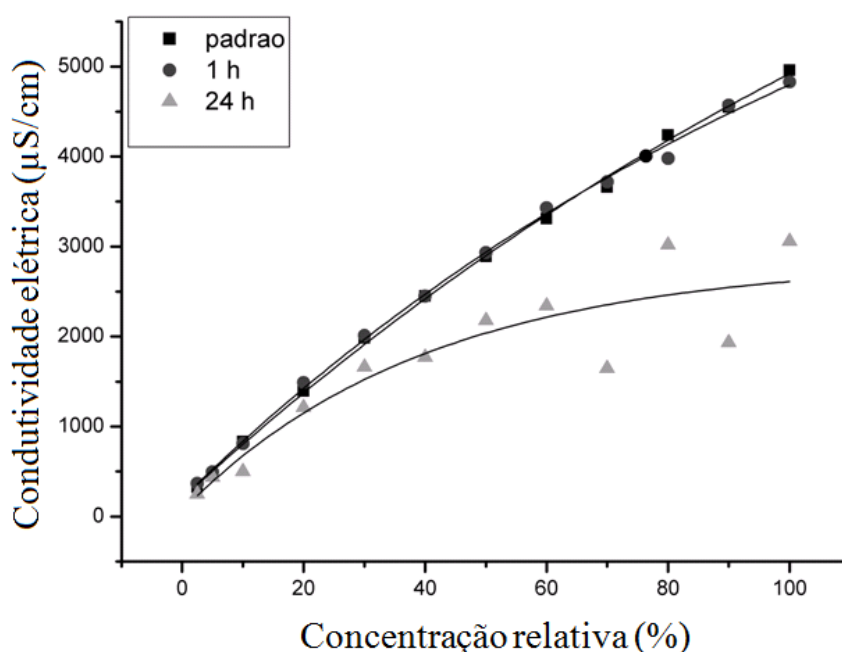


Figura 5.9 – Valores padrão de condutividade elétrica de diversas concentrações de soluções de cloreto férrico (FeCl_3), juntamente com os resultados observados após 1 e 24 horas de incubação no microtubo de polipropileno funcionalizado com PANI.

Pode-se encontrar na literatura alguns outros estudos relatando a aplicação de sistemas contendo PANI como agente quelante de diversos íons. Querner et al (2004) utilizaram as propriedades quelantes da PANI para a funcionalização de nanocristais de seleneto de cádmio (conhecidos como *quantum dots*), resultando na extinção completa da fluorescência dos constituintes desse sistema. Singh e Contractor (2005) desenvolveram um sensor baseado em PANI para o monitoramento dos níveis do íon mercúrio em diversos meios. Sowa et al. (2012) funcionalizaram partículas de sílica com uma camada de PANI para produção de um sistema quelante ou sequestrador de diversos íons metálicos, que pode ser reutilizado em vários ciclos. Recentemente, Rashidzadeh e Olad (2013) produziram um sistema contendo PANI para a remoção de

corantes presentes em soluções aquosas. No presente estudo utilizou-se os íons ferro como um protótipo para testar as propriedades sequestradoras e/ou quelantes dos sistemas representados pelas superfícies de PP funcionalizadas com PANI. De acordo com as propriedades na literatura e com os resultados obtidos, sugere-se expandir os testes de aplicação dos microtubos funcionalizados para vários outros íons ou metais pesados, como por exemplo na captura de mercúrio, chumbo e cádmio, na remediação de solos e águas.

Uso dos microtubos de PP funcionalizados com PANI como reatores para síntese de nanopartículas de prata

Os microtubos funcionalizados com PANI também foram testados em ensaios de avaliação do potencial de redução de íons prata para síntese de nanopartículas metálicas. A exposição de uma solução de nitrato de prata ao ambiente químico gerado pela funcionalização do microtubo de PP com PANI desencadeou a produção de nanopartículas de prata com raio hidrodinâmico menor que 50 nm, conforme mostra a figura 5.10.

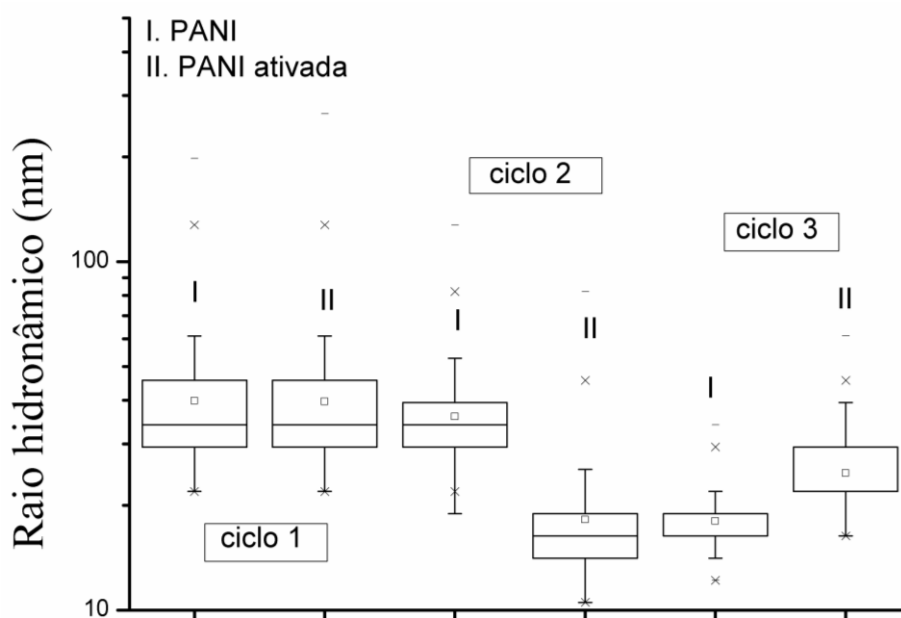


Figura 5.10 – Representação dos valores de raio hidrodinâmico das nanopartículas de prata obtidas por 24 horas de incubação de nitrato de prata $20 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$ nos microtubos de PP funcionalizados com PANI. O primeiro representante de cada ciclo refere-se à síntese realizada em microtubos de PP funcionalizados com PANI, enquanto o segundo representante refere-se à síntese realizada em microtubos de PP funcionalizados com PANI e ativados com glutaraldeído. Nessa forma de representação gráfica o índice de polidispersividade (PDI) está relacionado às barras de desvios dos valores médios.

As classes mais estudadas de suspensões de nanopartículas metálicas são aquelas constituídas de ouro, cobre e prata. A prata coloidal é de interesse particular por causa de propriedades distintivas, tais como sua condutividade elétrica e térmica, estabilidade química, atividades catalítica e antibacteriana (Kearns et al, 2006).

Grande parte dos novos métodos de síntese de nanopartículas é baseada no uso de reagentes químicos, que na maioria das vezes apresentam toxicidade ao homem e ao meio ambiente. Devido às crescentes demandas de síntese e produção de nanomateriais, são necessárias vias produtivas alternativas. Essas novas vias devem apresentar dejetos ou restos químicos de síntese que apresentem toxicidade reduzida e menor impacto ambiental. Nesse contexto surgiu a chamada “química verde” ou “síntese verde”, cujo objetivo principal é minimizar os impactos gerados pelos dejetos tóxicos resultantes da síntese química tradicional. A síntese verde geralmente envolve três etapas principais: (1) seleção do solvente, (2) seleção do agente redutor ambientalmente compatível, e (3) seleção de substâncias não tóxicas para a estabilização das nanopartículas de prata (Raveendran et al, 2003). No presente capítulo, o solvente utilizado foi a água e o agente redutor das nanopartículas foram as superfícies de PP interna dos microtubos funcionalizadas com PANI.

Embora o mecanismo pelo qual os microtubos de PP funcionalizados com PANI reduziram os íons Ag^+ em solução não tenha sido ainda elucidado, esses resultados apontam para essa aplicação alternativa desses sistemas reacionais na síntese de nanopartículas de prata. Provavelmente as nanopartículas obtidas não apresentam nenhum recobrimento em suas superfícies, o que pode levá-las a possuir propriedades e aplicações diferentes daquelas obtidas pelas rotas clássicas de síntese.

Estudos adicionais são requeridos para verificação dos parâmetros que podem influenciar nessas condições de síntese, o que pode inclusive conduzir a uma elucidação de aspectos relacionados aos mecanismos de redução dos íons de prata e formação de nanopartículas.

Uso dos microtubos de PP funcionalizados com PANI para imobilização de extrato de levedura para posterior síntese de nanopartículas de prata

Esse mesmo sistema de microtubos de PP funcionalizados com PANI foi utilizado para imobilização de células intactas e extrato de levedura com o objetivo de otimizar a redução de íons prata na tentativa de sintetizar nanopartículas de prata por meio de rota de síntese biológica. Esta tem sido uma rota sintética alternativa à síntese

química, sendo estudada e desenvolvida por diversos grupos de pesquisa (Raveendran et al, 2004). Ela representa uma das vertentes da chamada química verde, na qual se utiliza do poder redutor de algumas biomoléculas presentes em extratos de células para a redução de íons livres em solução, seguido da estabilização dessas nanopartículas pelo recobrimento com as biomoléculas presentes, resultando na síntese de nanopartículas funcionalizadas e estabilizadas, que podem apresentar diversas atividades. As principais biomoléculas relatadas como agentes ativos na redução de íons de prata em solução são as proteínas (Sharma et al, 2009; Raveendran et al, 2004).

A exposição de uma solução de nitrato de prata ao ambiente químico gerado pela funcionalização do microtubo de PP com PANI contendo biomoléculas, imobilizadas por adsorção ou covalentemente (extrato de levedura, Fermipan[®] ou levedo de cerveja), propiciou a produção de nanopartículas de prata com raio hidrodinâmico menor que 50 nm; e polidispersividades (PDI) menores do que as observadas para as nanopartículas sintetizadas nos sistemas com ausência de biomoléculas imobilizadas (figura 5.10), conforme mostra a figura 5.11.

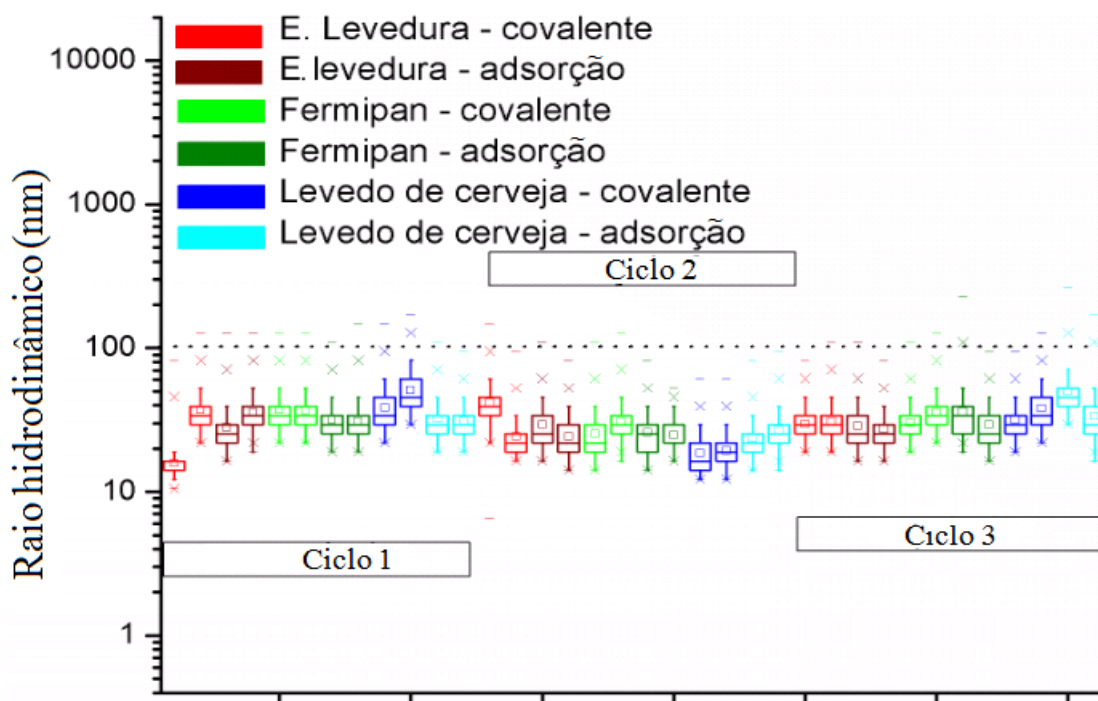


Figura 5.11 – Valores de raio hidrodinâmico das nanopartículas de prata obtidas por 12 e 24 horas de incubação nos microtubos funcionalizados com PANI contendo extrato de levedura, Fermipan[®] e levedo de cerveja imobilizados por adsorção e covalentemente. O primeiro representante de cada cor, em cada ciclo, refere-se ao tempo de 12 h de síntese, enquanto o segundo representante dessa mesma cor refere-se ao tempo de 24 h. Nessa forma de representação gráfica o índice de polidispersividade (PDI) está relacionado às barras de desvios dos valores médios.

Considerando as diversas aplicações na área médica, as nanopartículas ocupam uma posição de destaque, tanto pelo seu uso em exames diagnósticos, participando da composição de biossensores ou em exames de obtenção de imagens, quanto no tratamento de diversas patologias (Kearns et al, 2006).

Esse tipo de abordagem representa uma inovação tecnológica e metodológica na nova área do conhecimento chamada de nanotecnologia verde pelo fato de ser pioneira no uso de microorganismos/biomoléculas imobilizadas como sistemas recicláveis de produção de nanopartículas.

Conclusões

A abordagem experimental sugerida nesse capítulo descreve a modificação ou funcionalização de superfícies de polipropileno (PP) por meio da adsorção de camadas de cadeias de polianilina (PANI). Essa funcionalização decorre por meio de ciclos de tratamento das superfícies com soluções contendo os monômeros de anilina e o agente oxidante persulfato de amônio. Após cada ciclo de deposição, obtêm-se superfícies modificadas com propriedades nanomecânicas e de nanorrugosidade específicas. Esses sistemas podem ser aplicados para a imobilização de inúmeras biomoléculas com aplicações laboratoriais e industriais, como por exemplo, para a imobilização covalente de enzimas; como sistema de captura/remoção de íons e como reatores reutilizáveis para síntese de nanopartículas.

→ O trabalho realizado resultou na redação do pedido de registro de patente intitulado: **Processo de funcionalização e aplicações de superfícies de polipropileno baseado na polimerização de anilina**, que está em fase final de elaboração de relatório de patenteabilidade com vistas a depósito junto ao INPI pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e pela Universidade de Brasília.

Referências Bibliográficas

Ashland, K.B. et al. Methods and apparatus for microcellular polypropylene extrusion and polypropylene articles produced thereby. Patente No: US 6, 231,942 B1. Estados Unidos. 15 de maio de 2001.

Barbosa, E.F. Avaliação da atividade da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em polianilina sobre o caldo de cana. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás. 62 p. Goiânia. 2009.

Barbosa, E.F. et al. Immobilization of Peroxidase onto Magnetite Modified Polyaniline, *The Scientific World Journal*, v. 5, pp. 1–5. 2012.

Bayramoğlu, G. et al. Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 880–885. 2009.

Bayramoğlu, G. et al. Reversible immobilization of glucose oxidase on polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite membrane. *Bioresource Technology*, v. 101, pp. 6881–6887. 2010.

Buckley, L.J. et al. Polyaniline surface morphology during the doping process using atomic force microscopy, *Materials Research Society Symposium Proceedings*, v. 60, pp. 233–237. 1994.

Caramori, S.S.; Fernandes, K.F. Covalent immobilisation of horseradish peroxidase onto poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite. *Process Biochemistry*, v. 39, pp. 883–888. 2004.

Caramori, S.S.; Fernandes, K.F. The use of poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite for trypsin immobilisation. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, pp. 1159–1163. 2008.

Datta, S. et al. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnology*, v. 3, pp. 1–9. 2013.

De Azevedo, W.M. et al. Semi-interpenetrating polymer networks based on polyaniline and polyvinyl alcohol-glutaraldehyde, *Synthetic Metals*, v. 100, pp. 241–248. 1999.

Ding, S.N. et al. Bioelectrochemical response of a choline biosensor fabricated by using polyaniline. *Science in China Series B: Chemistry*, v. 52, pp. 2275–2280. 2009.

Evans, R.K. Et al. Polypropylene amine modification of polypropylene. Patente: No 5,721,315. Estados Unidos. 24 de fevereiro de 1998.

Fernandes, K.F. et al. Immobilization of *Aspergillus Níger* glucoamilase onto polyaniline polymer. *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 1155–1159. 2005.

Galimberti, M. et al. Ethene/propene copolymerization with high product of reactivity ratios from a single center, metallocene-based catalytic system. *Macromolecules*, v. 31, pp. 3409–3416. 1998.

Gerard, M. et al. Immobilization of Lactate Dehydrogenase on Electrochemically Prepared Polyaniline Films. *Electroanalysis*, v. 11, pp. 450–452. 1999.

Halliwell, C.M. et al. Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly-(vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor. *Analytica Chimica Acta*, v. 453, pp. 191–200. 2002.

Hu, Y. et al. Conjugated self-doped polyaniline-DNA hybrid as trigger for highly sensitive reagentless and electrochemical self-signal amplifying DNA hybridization sensing. *Analyst*, v. 138, pp. 1067–1074. 2013.

Kathleen, G. et al. Optimisation and characterisation of biosensors based on polyaniline. *Talanta*, v. 68, pp. 1591–1600. 2006.

Kearns, G.J. et al. Substrates for direct imaging of chemically functionalized SiO₂ surfaces by transmission electron microscopy. *Analytical Chemistry*, v. 78, pp. 298–303. 2006.

Lakard, B. et al. Urea potentiometric enzymatic biosensor based on charged biopolymers and electrodeposited polyaniline. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, pp. 4139–4145. 2011.

Laska J. et al. Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 6, pp. 549–553. 1999.

Lee, G. et al. The use of polyaniline nanofibre as a support for lipase mediated reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, pp. 116–121. 2008.

Mathebe, N.G.R. et al. Electrochemistry and scanning electron microscopy of polyaniline/peroxidase-based biosensor. *Talanta*. v. 64, pp. 115–120. 2004.

Mohanty, A.K. et al. Surface modifications of natural fibers and performance of the resulting biocomposites: An overview. *Composite Interfaces*, v. 8, pp. 313–343. 2001.

Morrin, A. et al. Novel biosensor fabrication methodology based on processable conducting polyaniline nanoparticles. *Electrochemistry Communication*, v. 7, pp. 317–322. 2005.

Nachtigall, S.M.B. et al. Funcionalização do polipropileno com viniltriétoxissilano em solução e no estado fundido. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 1998.

Nadruz Jr, W. et al. Immobilization of xanthine oxidase on a polyaniline silicone support. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, v. 29; pp. 347–350. 1996.

Nalwa, H.S. Handbook of organic conductive molecules and polymers. New York: John Wiley, 505 p. 1997.

Oliveira, G.B. et al. Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites, *Reactive and Functional Polymers*, v. 68, pp. 27–32. 2008.

Parente, A.H. et al. Glucose biosensor using glucose oxidase immobilized in polyaniline. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 37, pp. 267–273. 1992.

Pascoal, A.M. et al. Immobilisation of α -amylase from *Aspergillus niger* onto polyaniline. *Food and Bioproducts Processing*, v. 89, pp. 300–306. 2011.

Purcena, L.L.A. et al. The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. *Material Science and Engineering C*, v. 29, pp. 1077–1081. 2009.

Querner, C. et al. Chelating ligands for nanocrystals' surface functionalization. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, pp. 11574–11582. 2004.

Rashidzadeh, A.; Olad, A. Novel polyaniline/poly (vinyl alcohol)/clinoptilolite nanocomposite: Dye removal, kinetic, and isotherm studies. *Desalination and Water Treatment*, v. 51, pp. 7057–7066. 2013.

- Raveendran, P. et al. Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of American Chemistry Society*, v.125, pp.139408–13941. 2003.
- Rawal, R. Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode. *Analytical Biochemistry*, v. 419, pp. 196–204. 2011.
- Ruggeri, G. et al. Some aspects of polypropylene functionalization by free radical reactions. *European Polymer Journal*, v. 19, pp. 863–866. 1983.
- Sai, V.V. et al. Immobilization of antibodies on polyaniline films and its application in a piezoelectric immunosensor. *Analytical Chemistry*, v. 78, pp. 8368–8373. 2006.
- Salomon, A.L. Produção de resina de polipropileno do tipo homopolímero através do processo Sheripol®. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Engenharia Química. Universidade Regional de Blumenau. Blumenau. 2010.
- Sharma, V.K. et al. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 145, pp. 3–96. 2009.
- Sherman D.M.; Waite, T.D. Electronic spectra of Fe³⁺ oxides and oxide hydroxides in the near IR to near UV, *American Mineralogist*, v. 70, pp. 1262–1269, 1985.
- Silva, B.D.S. Potential Fungal Inhibition by Immobilized Hydrolytic Enzymes from *Trichoderma asperellum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, pp. 8148–8154. 2011.
- Singh, P.R.; Contractor, A.Q. Conductometric Hg sensor based on polyaniline as transducer. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 85, pp. 831–835. 2005.
- Singh, S. et al. A novel reusable PAni-PVA-Amylase film: Activity and analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 106, pp. 46–50. 2013.
- Sowa, I., et al. Properties of Chelating Sorbent Prepared by Modification of Silica Gel with Polyaniline and Acid Alizarin Violet N. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, v. 47, pp. 1194–1198. 2012.

Wang, S. et al. Immobilization of trypsin in polyaniline-coated nano-Fe₃O₄/carbon nanotube composite for protein digestion. *Analytica Chimica Acta*, v. 612, pp. 182–189. 2008.

Xie, L. et al. Observations of polyaniline surface morphology modification during doping and de-doping using atomic force microscopy, *Journal of Materials Science*, v. 29, pp. 42004204. 1994.

Yemini, M. et al. Collagen-Like Peptide as a Matrix for Enzyme Immobilization in Electrochemical Biosensors. *Electroanalysis*, v. 18, pp. 2049–2054. 2006.

Considerações finais

Na busca pela compreensão das características da organização das diversas superfícies analisadas, e dos microambientes gerados pelo processo de imobilização de biomoléculas, foram aplicadas as várias técnicas de caracterização em nanoescala nos diversos materiais apresentados nessa Tese. O estudo realizado nas superfícies de PP pode ser considerado como uma abordagem alternativa para investigação qualitativa e quantitativa dessas superfícies, com potencial aplicação no controle de qualidade em indústrias de processamento de polímeros. A análise da organização nanométrica da superfície interna dos microtubos aponta-se como uma forma potencial de controle de qualidade dos microtubos, em relação à heterogeneidade, propensão à ligação ou adesão de moléculas e liberação de polímeros constituintes dos microtubos.

A abordagem experimental realizada nas membranas poliméricas porosas possibilitou a obtenção de inúmeras informações inéditas e relevantes sobre as características topográficas, mecânicas e químicas das membranas poliméricas porosas de nitrocelulose, *nylon*, PTFE e PVDF. Esses sistemas não foram utilizados como suportes para imobilização de enzimas e biomoléculas devido a algumas propriedades indesejáveis, tais como forças atrativas reduzidas e dificuldade no seu manuseamento.

Em relação às partículas de sílica silanizadas e não silanizadas, observou-se que a modificação química da sílica por meio de reação com APTS resultou em alterações morfológicas significativas na superfície das esferas de sílica. A caracterização química evidenciou as alterações na composição elementar, ambiente químico e degradação térmica diferencial para as amostras de sílica silanizadas. Tais superfícies foram utilizadas como suporte para a imobilização de tripsina, sendo que se observou maior eficiência em tempos menores de imobilização, e em condições mais ácidas para a sílica modificada. A quantificação indireta da imobilização por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa ultrarrápida mostrou-se como uma técnica apropriada, devido às altas linearidade e sensibilidade observadas. As atividades da tripsina imobilizada em sílica normal e modificada com APTS apresentaram potencial para aplicações em estudos de elucidação da estrutura primária de proteínas, sendo que no sistema contendo sílica modificada observou-se uma restrição no número de peptídeos gerados, provavelmente devido ao microambiente com maior hidrofobicidade condicionado pela modificação por silanização.

A abordagem experimental apresentada no último capítulo reúne todo o conjunto de conhecimentos técnicos e metodológicos adquiridos ao longo dos demais estudos, culminando com a descrição da modificação ou funcionalização de superfícies de polipropileno (PP) por meio da adsorção de camadas de cadeias de polianilina (PANI), resultando na obtenção de sistemas reacionais com potenciais aplicações para imobilização de inúmeras biomoléculas com aplicações laboratoriais e industriais, como por exemplo, para a imobilização covalente de enzimas; como sistema de captura/remoção de íons e como reatores reutilizáveis para síntese de nanopartículas.

Perspectivas

A partir das abordagens experimentais aplicadas e dos sistemas desenvolvidos nessa Tese, pode-se apontar os seguintes desafios ou perspectivas:

- Escalonar a utilização da técnica de microscopia de força atômica, considerando a análise dos parâmetros de nanorugosidade e de espectroscopia de força, para testes de controle de qualidade de superfícies poliméricas em indústrias de processamento de resinas termoplásticas;

- Imobilizar diferentes enzimas hidrolíticas nas superfícies de sílica silanizada e em microtubos de PP funcionalizados com PANI para a obtenção de reatores que possibilitem uma digestão mais completa de proteínas e peptídeos, visando aplicações em proteômica e química de proteínas;

- Testar os sistemas constituídos dos microtubos de PP funcionalizados com PANI na desalinização de biomoléculas e na remediação de águas;

- Testar os sistemas constituídos dos microtubos de PP funcionalizados com PANI em hidrólises enzimáticas com tampões incompatíveis com análises de espectrometria de massa do tipo MALDI, com o intuito de remoção desses sais da solução e consequente diminuir sua interferência nesses ensaios;

- Verificar quais parâmetros podem influenciar nas condições de síntese de nanopartículas de prata obtidas a partir de reatores baseados em superfícies de PP funcionalizadas com PANI e superfícies de PP funcionalizadas com PANI contendo células e/ou biomoléculas imobilizadas.

Anexos

Publicações realizadas e eventos participados durante o período do doutoramento:

Research article

SURFACE and
INTERFACE
ANALYSIS

Received: 30 March 2011

Revised: 18 May 2011

Accepted: 22 June 2011

Published online in Wiley Online Library: 16 August 2011

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/sia.3812

Qualitative and quantitative topographical surface investigation and solvent effects on internal surface of polypropylene tubes

Eduardo F. Barbosa^{a,b} and Luciano P. Silva^{a,b*}

An alternative way for plastic tubes surface analysis was presented, and the time course of the effects of solvent exposure was evaluated. Atomic force microscopy was used to qualitatively and quantitatively analyze internal tubes topography. Differences in nanoroughness parameters were shown as potential markers for quality control check to detect differences among brands and areas along each tube. Mass spectrometry analysis was carried out to evaluate the effects of some solvents after the intrinsic contact with the polymer. The obtained spectra did not allow the visualization of any leaching component, suggesting a low rate of some possible reaction or dissociative interaction caused by polymer and tested solvent interactions that were in concordance with principal component analysis. The use of these techniques as tools for quality control evaluation, or search for new support to biomolecules immobilization can be seen as important innovations and can be applied in several other investigative and developmental approaches. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: atomic force microscopy; quality control; plastic contamination; solvent effects; tubes internal surface roughness

Introduction

Advanced technological tools allow researchers to analyze and scrutinize polymeric surfaces, being largely used on applied research and quality control processes.^[1] Polymers surface can reveal interesting features and point out a lot of possibilities regarding such materials applications.^[2,3] Enzyme immobilization technologies have been developed and can be achieved onto several polymeric surfaces, being applied in a range of fields from basic proteomics research to food industry and bioremediation.^[4–7] In this background, synthetic polymers like polypropylene have been mainly used as a solid support for protein immobilization, as well as in enzyme-linked immunosorbent assay and cell culture.^[8] A remarkable number of immobilization methods have been developed to allow proteins to be attached on a variety of solid supports while retaining their activity.^[9–13]

Detailed investigations of physical and chemical features of polymeric surfaces increase the control of its potential reactivity according to specific interests, optimizing investigations and applications using these materials. Atomic force microscopy (AFM) has been used to study topographic alterations of chemically modified plastic surfaces.^[12] Evaluation of supramolecular organization can be performed through analysis of topographical parameters of polymers surface, enabling their association with material synthesis and quality. In this sense, AFM analysis in addition to allowing an exploration of the potential application of nanodevices on such surfaces, also contributes to the quality control check of materials.

Compared with other techniques, AFM analysis presents several advantages; as easy and simple sample preparation, scanning does not require vacuum condition, allows analyses in liquid environment, and allows the acquisition of quantitative roughness values. Beyond these benefits, AFM offers information about viscoelasticity or hardness of the sample, as well as specific interaction forces.

Applications of AFM methods to elucidate surface and near-surface structure of polymeric solids are widely used and well described.^[14] However, the investigation of internal surface of polypropylene tubes as a tool for quality control check or potential biotechnology applications of this material still remains unexplored.

Currently, some reports of contents leaching from disposable plasticware have drawn attention to plastics as potential sources of contaminants.^[15] Plastics are broadly used in almost all fields of scientific research. Accordingly, there are several studies that have investigated the plastic contamination problem.^[12,15,16] Analytical methods like matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) have been used to show the leaching of polymeric compounds from laboratory plastic test tubes into the standard solvents used for sample preparation.^[16,17]

The present study conducted a close observation of different brands of polypropylene tubes investigating the topography obtained by AFM analysis and verifying the effect of some solvents on these surface components by MALDI-TOF MS. We aimed to observe some quality parameters by these approaches and the potential applications of such polymeric surface for enzyme immobilization.

* Correspondence to: Luciano P. Silva, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa, Núcleo Temático de Biotecnologia, (NTBio), Parque Estação Biológica Final W5 Norte, Brasília, DF, 70770-917, Brazil.

E-mail: paulinol@cenargen.embrapa.br, lucianopaulinosilva@gmail.com

a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa, Núcleo Temático de Biotecnologia (NTBio), Parque Estação Biológica Final W5 Norte, Brasília, DF, 70770-917, Brazil

b Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, Brazil



Nanoscale characterization of synthetic polymeric porous membranes: Scrutinizing their stiffness, roughness, and chemical composition

Eduardo F. Barbosa^{a,b}, Luciano P. Silva^{a,b,*}

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa, Núcleo Temático de Biotecnologia (NTBio), Parque Estação Biológica Final W5 Norte, Brasília, DF 70770-917, Brazil

^b Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2011

Received in revised form 7 February 2012

Accepted 10 March 2012

Available online 17 March 2012

Keywords:

Synthetic polymeric porous membranes

Roughness

Stiffness

Filtration efficiency

ABSTRACT

Synthetic polymeric porous membranes (PPMs) have been widely used in several areas. Here, PPMs were scrutinized in a systematic approach over their mechanostructural features, chemical composition and filtration efficiency. Four types of PPMs (nitrocellulose, nylon, PTFE, and PVDF) were analyzed by single point force spectroscopy (FS), atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). PTFE membrane showed discrepancy between top and bottom parts related to FS parameters. The most irregular topography assessed by AFM was presented by nylon membrane showing out values for roughness parameters (R_a , R_z , and R_p) higher than all other membranes. Determination of filtration efficiency by spectrophotometric measurements did not allow us to visualize tendencies for incrustation of compounds. Nevertheless, AFM and SEM images of PPMs before and after filtration tests showed significant topographical differences. FTIR and EDS analyses also evidenced PPMs chemical and elemental composition, respectively. The use of these approaches focusing on nanometric aspects of each membrane can reveal new possibilities concerning their characterization and applications. It arises as an alternative tool for quality control evaluation, or search for support for biomolecules immobilization.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polymeric porous membranes (PPMs) are largely used in several fields ranging from physical–chemical processes of water desalination [1] to molecular biology and biochemistry researches, like in transference/immobilization of RNA or northern blot [2], DNA or southern blot [3], lipids or eastern blot [4], and protein or western-blot [5]. We can still point out the extensive use of polymeric synthetic porous membranes as filters for molecular separation, like in separation processes for liquid and gaseous mixtures (gas separation, reverse osmosis, pervaporation, micro-filtration, nanofiltration, and ultrafiltration) [6]. Such materials have also been applied in biosensors development and enzyme immobilization processes [7] and catalysis including fuel cell systems [8].

Membrane surface properties have been described as a direct influencing factor on their performance [9]. For example, an increased surface roughness commonly exhibits an increased surface area and consequently it fouls more easily [10]. In fact,

according to the membrane applications, different behaviors and properties are required.

Membrane filtering features are mainly determined by their polymeric composition. Nitrocellulose membranes are high quality membranes for blotting of proteins and nucleic acids displaying a uniform and easy wettability [11]. Nylon membranes present positively charged groups that confer to it an enhanced binding of negatively charged molecules like lipids [12], and it is also hydrophilic and has high surface area [6]. Polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes have an interesting property of change its hydrophobic surface into hydrophilic by a simple alcohol surface pre-treatment. Poly(vinylidene fluoride) (PVDF) forms naturally hydrophobic membranes [13].

There are lots of research studies using scanning electron microscopy (SEM) and mainly atomic force microscopy (AFM) analyses to describe surface features and some changes caused by chemical or physical modifications [14–19]. AFM is a scanning probe microscopy technique that allows to investigate surface properties and features by measuring atomic interactions between a surface and a small tip while a scanning process occurs, creating a high-resolution image. Another important application of AFM is force spectroscopy, the direct measurement of tip-sample interaction forces as a function of the gap between the tip and sample in a vertical displacement. For this method, the AFM tip is extended

* Corresponding author. Tel.: +55 61 34484794; fax: +55 61 33403658.

E-mail addresses: lucianopaulinosilva@gmail.com, paulinol@cenargen.embrapa.br (L.P. Silva).

Research article

Received: 23 April 2013

Revised: 21 June 2013

Accepted: 21 June 2013

Published online in Wiley Online Library: 12 July 2013

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/sia.5313

Nanoscale analyses of modified polypropylene microtubes internal surface: an approach covering topographical and force spectroscopic parameters

Eduardo F. Barbosa^{a,b} and Luciano P. Silva^{a,b*}

A nanoscale characterization of modified and unmodified polypropylene (PP) microtubes internal surface was performed to investigate their structural, chemical, and physical properties. Nanoroughness, stiffness, elasticity, attraction behavior, adhesion forces, and chemical environment were investigated to test some manufacturer statements regarding Axygen MAXYMum Recovery[®] products. They announced that this class of material presented special features, originated from a modification to the original PP resin and by using a diamond polished mould, providing lower retention and minor interference on laboratorial tests, such as low roughness and little interaction tendency. Then, in this study, modified and control internal surfaces of PP microtubes were compared by atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy. Nanoroughness and force spectroscopy parameters assessed by atomic force microscopy showed out as a sensible and high-resolution technique, crucial to discriminate differences between the surfaces. This type of investigation can be considered as a promising approach that can be applied to other polymeric systems, considering nanoscale properties, physical/chemical modifications, and as an alternative route for quality control checking concerning polymeric surfaces. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information can be found in on line version of this article.

Keywords: polypropylene modification; microtube; atomic force microscopy; force spectroscopy; nanoroughness

Introduction

Polypropylene (PP) devices have been widely applied in world-wide industrial and academic laboratories.^{1,2} After microtubes and pipette tips first conception, in the early 80s, their use became ubiquitous in laboratories worldwide.³ Nevertheless, this material is not as inert as once thought. McDonald *et al.* (2008) described plasticware, mainly the colorful ones, as a potential source of bioactive contaminants, such as di (2-hydroxyethyl) methyl dodecyl ammonium and 9-octadecanamide (oleamide).^{1,2} Then, some manufacturers have been looking for strategies to develop modifications on PP resins and processing steps to overcome these drawbacks: increasing desirable features such as low surface energy and reduced adhesion behavior. Axygen MAXYMum Recovery[®] microtubes are described by manufacturer as without any potential contaminating coating, by presenting a special polymeric internal surface, which creates low binding features.⁴

Chemical structure effects and surface properties of polymeric materials concerning protein adsorption were described as been strongly related to surface roughness.⁵ Lower surface roughness means smaller van der Waals contribution to the adhesion force and consequent decreasing of these events.⁶ Considering this aspect, Barbosa and Silva investigated PP microtubes internal surface aiming to verify the possible presence of any homogeneity patterns and to relate such information with roughness, adhesion features, and quality control markers.^{3,7} They described significant roughness differences both among brands and among the areas along each tube (equal sizes).⁷ When comparing tubes with

different sizes, the bigger ones presented more heterogeneous surface morphology, which could be related to the adhesion events on polymer surface, since the contact surface area can predicts some reactivity or leaching tendencies considering other materials.³

The present study aimed to investigate modified microtubes internal surface, compared to unmodified ones. Morphologies, roughness, stiffness, elasticity, attraction, adhesion, and chemical environment were investigated to test the following hypothesis: 'Would PP modified microtubes characterization outcomes corroborate the manufacturer statements about this product (Axygen MAXYMum Recovery[®])?' Atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to assess these properties.

* Correspondence to: Luciano P. Silva, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa, Prédio da Biotecnologia (PBI), Parque Estação Biológica Final WS Norte, Brasília, DF, 70770-917, Brazil
E-mail: luciano.paulino@embrapa.br, lucianopaulinosilva@gmail.com

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Espectrometria de Massa, Prédio da Biotecnologia (PBI), Parque Estação Biológica Final WS Norte, Brasília, DF, 70770-917, Brazil

^b Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil

Published in IET Nanobiotechnology
 Received on 14th June 2013
 Revised on 11th October 2013
 Accepted on 17th October 2013
 doi: 10.1049/iet-nbt.2013.0042



Protein characterisation of *Brosimum gaudichaudii* Trécul latex and study of nanostructured latex film formation

Eduardo F. Barbosa^{1,2}, Victoria Monge-Fuentes², Natiela B. Oliveira², Rebecca Tavares², Mary-Ann E. Xavier², Marcelo Porto Bemquerer¹, Luciano P. Silva^{1,2}

¹Laboratory of Mass Spectrometry, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil

²Postgraduate Program in Animal Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, UnB, Brasília, Brazil
 E-mail: lucianopaulinosilva@gmail.com

[†]These authors contributed equally to this work.

Abstract: *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) is a common Brazilian Cerrado plant known by its pharmaceutical industry relevance. The authors investigated the latex protein components and potential biotechnological applications. Some protein fragments had their sequences elucidated, presenting similarities to jacalin and Kunitz-type trypsin inhibitors. Amino acid residue modifications were found, such as glutamine *N*-terminal residue cyclisation into pyroglutamic acid residue, and mass differences corresponding to hexoses and *N*-acetylhexosamine presence. The latex was used to produce a nanoscale structured film, which presented an increased attraction and reduced adhesion behaviours. The film presented high homogeneity, as observed by low nanoroughness values, probably because of its intrinsic components, such as the jacalin-like protein that has known agglutination properties. The immobilised Kunitz-type trypsin inhibitor presence in the latex film allow us to point out to applications related to this inhibition, as in active food packaging, since these peptidase inhibitors are able to inhibit pests and microorganism proliferation.

1 Introduction

Brosimum gaudichaudii Tréc. (Moraceae) occurs in the Atlantic and Amazon forests [1] and it is the only occurring species of the genus *Brosimum* in the Brazilian Cerrado [2]. This plant species has been largely employed by the pharmaceutical industry because of its considerable accumulation of furocoumarins derivatives [3] such as: xanthyletine, psoralen, bergapten (or 5-methoxypsoralen), luvangentine and the gaudichaudione, present in the bark of trunks and subterranean system. These furocoumarin derivatives have been isolated and used for the treatment of skin disorders such as vitiligo [4–7] because of their photosensitising and photochemotherapeutic properties [8, 9].

Even though some of the biomedical uses of *Brosimum* vegetal structures have been elucidated, there is no study related to plant secretions, such as latex extracted from *B. gaudichaudii*, much less concerning their protein content. Latex can be defined as a stable milky suspension or emulsion of polymer particles in an aqueous fluid, usually held under pressure in living plant cells known as laticifers. This plant secretion exudes upon damage from specialised canals in about 10% of flowering plants and has no known metabolic function related to plant resource acquisition and allocation; however, it has been strongly implicated in defense against herbivorous insects [10, 11]. Latex from various plant species contain bioactive

compounds including alkaloids such as: morphine in *Papaver* spp. (Papaveraceae); cardiac glycosides in *Asclepias* spp. (Apocynaceae); terpenes such as the sesquiterpene lactone, lactucin from lettuce (*Lactuca* spp. Asteraceae); and digestive cysteine proteases in *Carica* genus (Caricaceae) and *Ficus* spp. (Moraceae) [12, 13]. Phenolic compounds and proteins have also been detected in latex from other species [14, 15]. The fact that latex is often highly rich in secondary metabolites, carbohydrates and enzymes suggests that it is not a waste product and can be considered a potential candidate for biotechnological applications [12].

Romaniuc Neto and Wanderley [16] emphasised the presence of abundant laticifers in specimens belonging to Moraceae family. According to Lewinsohn [17], laticifer plants are common in the Brazilian Cerrado vegetation, where the presence of latex provides resistance to herbivores via toxicity or anti-nutritional effects, and also through its stickiness, which can mire insect herbivores. Agrawal and Konno [12] pointed out that all plant parts can contain latex; however, the most commonly examined tissues of latex-bearing plants are stem and leaf tissues. In the case of *B. gaudichaudii*, latex is abundant in the bark of the subterranean system. In stems, latex is only abundant in the bark and pith of young stems and branches. Latex is scarce in both bark and pith of older stem parts and not present in *B. gaudichaudii* wood [18].

Co-editor de livro:

POLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY

**POLYPROPYLENE
SYNTHESIS, APPLICATIONS
AND ENVIRONMENTAL CONCERNS**

**LUCIANO PAULINO SILVA
AND
EDUARDO FERNANDES BARBOSA
EDITORS**

 **nova**
publishers
New York

Nova Science Publishers, Inc.

Publicação de capítulos de livros:*Chapter 15***NANOSCALE APPROACHES OVER POLYPROPYLENE
PLASTIC SURFACES: AN ALTERNATIVE TOOL FOR
QUALITY CONTROL CHECKING***Eduardo F. Barbosa and Luciano P. Silva**University of Brasília (UnB), Embrapa Genetic Resources
and Biotechnology (EMBRAPA), Brasília, Brazil**ABSTRACT**

Materials and composites containing polypropylene (PP) can be considered as the most widely applied in industrial laboratories and also in scientific research labware. This wide range of uses is sometimes hindered by the drawbacks of plastic contamination or sample adhesion to the plastic surfaces. In this context, investigative approaches of this type of polymeric surface can reveal important information concerning the drawbacks. In this chapter, some surface properties of PP materials using atomic force microscopy (AFM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were tested. These tools allowed the acquisition of information about morphology, nanoroughness, interaction forces and chemical environment of the tested materials (plastic tips and microtubes internal surface). PP tips with different sizes were tested revealing considerably low nanoroughness values (Ra and Rq). However, statistically significant differences were found among the sample values for these parameters that can be related to manufacturing steps. Force spectroscopy (FS) results demonstrated an increased homogeneity between the two smaller samples, while the biggest plastic tip presented different patterns of interaction with the AFM probe, mainly related to adhesion forces. FTIR results showed a typical PP crystalline form in all evaluated samples. PP microtubes with different volume capacities were also analyzed, revealing high homogeneity (Ra and Rq). The largest microtube also presented discrepancies compared to the smaller ones (Rz, Rzjis, and Rv). FS results suggested a different scenario, highlighting a heterogeneous behavior of the plastic microtubes considering their patterns of interaction with the AFM probe. These experimental approaches can be seen as a potential route for quality control checking, applicable to materials derived from PP and this information can be largely

* E-mail address: luciano.paulino@embrapa.br, lucianopaulinosilva@gmail.com.

ISBN: 978-1-62618-332-2

Chapter 10

**APPLICATIONS OF OLEIC ACID
ON NANOTECHNOLOGY CONCERNING ENZYME
IMMOBILIZATION TECHNIQUES**

Eduardo F. Barbosa^{*} and José L. Cardozo Filho

Institute of Biology, University of Brasilia, Brazil
Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia, Brazil

ABSTRACT

This chapter describes a review about oleic acid applications in magnetic systems structured at billionth part of matter, related to enzymes immobilization. Basically, it is shown the oleic acid stabilizing effects over magnetic nanoparticles, mainly those derived from iron. Some oleic acid properties are discussed specifically concerning the reducing effects in magnetic nanoparticles magnetization saturation, as well as size control improvements. Protocols for nanostructures production were gathered to provide compact information about different routes to obtain controllably nanostructured systems, allowing the reader to compare some synthesis strategies. A compilation of studies related to enzyme immobilization (mainly lipases from different organisms) using oleic acid based materials was presented, highlighting the benefits obtained from this technique, such as a better tolerance against adverse catalysis conditions and kinetic parameters. Other oleic acid based materials applications were described, showing the high versatility of these materials. Finally, this chapter points out the use of nanostructured oleic acid based systems as support for enzyme immobilization like an opened research field, which requires extensive investigations to whole clarify its application and potentialities on biotechnology.

* E-mail address: barbosaeduardofernandes@gmail.com

Participações e apresentações em eventos

- São Paulo School of Advanced Science (ESPCA). Characterization of different colored eggshells as a potential model for natural nanofilters. 2013.
- 10th International Congress on Cell Biology. Identification of crude extract molecules from beans involved in skin cancer prevention. 2012.
- XI Brazilian MRS Meeting. Nanoscale features of a modified polypropylene microtube internal surface assessed by atomic force microscopy. 2012.
- XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) . Self-Assembly Investigation Of Ultra-Short Amphiphilic Tetrapeptides (Ac-Leu-Leu-Leu-Lys-NH₂ And Ac-Lys-Leu-Leu-Leu-NH₂). Foz do Iguaçu, Paraná, 2011.
- III Simpósio em Biologia Animal. Quantificação analítica por cromatografia líquida ultra-rápida da imobilização de tripsina pancreática bovina em partículas de sílica modificadas quimicamente. Brasília, Distrito Federal, 2011.
- II Simpósio em Biologia Animal. Análise da organização nanométrica de superfícies para imobilização de enzimas. Brasília, Distrito Federal, 2010.

Participação em escolas ou cursos sobre nanotecnologia pelo CBAN (Centro Brasileiro Argentino de Nanotecnologia):

- Escola itinerante de materiais. Rio de Janeiro, 2010.
- Escola PaCOS (Pilhas a combustível de óxido sólido). Aplicações nanotecnológicas em PaCOS. Rio de Janeiro, 2010.
- Escola CBAN de materiais nanoestruturados. Avaliação de materiais para construção de PaCOS. Rio de Janeiro, 2010.
- Primeira Escuela de Nanoquímica. Tópicos básicos e avançados sobre nanoquímica. Rio Cuarto, Cordoba, Argentina, 2010.