

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL - MG

RAPHAEL ANTÔNIO BORGES GOMES

**AVALIAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO
NA OBTENÇÃO E DETERMINAÇÃO DE APOPROTEÍNAS**

Alfenas - MG
2016

RAPHAEL ANTÔNIO BORGES GOMES

**AVALIAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO NA
OBTENÇÃO E DETERMINAÇÃO DE APOPROTEÍNAS**

Dissertação de mestrado como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química pela
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Profa. Dra. Cristiana Schmidt de
Magalhães.

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo.

Alfenas - MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Gomes, Raphael Antônio Borges.

Avaliação de nanotubos de carbono de acesso restrito na obtenção e determinação de apoproteínas. / Raphael Antônio Borges Gomes. -- Alfenas/MG, 2016.
95 f.

Orientadora: Cristina Schmidt de Magalhães.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.
Bibliografia.

1. Adsorção. 2. Eletrostática. 3. Catalase 4. Apoproteínas. I. Magalhães, Cristina Schmidt de. II. Título.

CDD-543

Raphael Antônio Borges Gomes

**“Avaliação de nanobutos de carbono de acesso restrito na
obtenção e determinação de Apoproteínas”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 27/07/2016

Profa. Dra. Cristiana Schmidt Magalhães
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Edenír Rodrigues Pereira Filho
Instituição: UFSCAR

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por me dar força sempre.

Aos meus pais, Terezinha e Devair por sempre acreditar em mim e incentivo com muito carinho e amor. Amo vocês!

À minha noiva, Poliana, que sempre esteve ao meu lado. Pela cumplicidade, companheirismo, amizade e amor. E também pelo incentivo diário. Um dia veremos que isso valeu a pena! Amo você!

Aos meus irmãos, Pedrinho e Diego, obrigado por tudo. Amo vocês!

À minha estimada orientadora, Prof^a. Dra. Cristiana Schmidt de Magalhães, por todos os momentos de discussões. Por seus sábios conselhos profissionais e pessoais. Pelas instigações, trabalhos exaustivos, e enorme aprimoramento em minha formação acadêmica. Pelo convívio e conhecimento. Obrigado por sua amizade!

Ao prof. **Pedro Paulo Czimar** (*in memoriam*) que um dia na minha sexta série me mostrou que estudar é o melhor caminho.

Aos Professores Dr. Luciano Sindra Virtuoso, Prof. Dr. Pedro Orival Luccas e Eduardo C. de Figueiredo, que me inspiram pelo exemplo de ética, humildade, dedicação e profissionalismo docente e também pela amizade.

Ao pesquisador Dr. Jorge Rosa (EEL/USP) pela cordialidade e pronto atendimento para realização de medidas de Microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus amigos e companheiros de sempre, Nyanne C. Freire, Luciana A. Terra e Luíza Esteves e todos amigos de Alfnas, que nossa amizade seja eterna!

A todos os amigos da Química, aos amigos do LabIQ e LACFar e Limnologia, meu muito obrigado!

Aos técnicos do laboratório, Carolina Nasser, Dênis, Bernadette, pela paciência e sempre me ajudar com reagentes, empréstimos e outras coisas. Obrigado!

A todos os amigos, familiares e professores, incluindo os não citados que diretamente ou indiretamente estiveram comigo e contribuíram para minha formação e crescimento como pessoa, sempre estarão presentes em minha vida.

*“Tudo vale a pena quando a alma
não é pequena”.*

Fernando Pessoa

*“Vitorioso não é o que vence, mas
aquele que se levanta diante de
uma derrota”.*

J.Talbot

RESUMO

Neste trabalho, propomos o estudo dos mecanismos de adsorção de um novo material adsorvente capaz de extrair íons metálicos, obtido através da modificação química de nanotubos de carbono (CNT) com o emprego de agente oxidante ácido, seguido do revestimento com uma camada externa de albumina de soro bovino (BSA), resultando em nanotubos de carbono de acesso restrito revestidos com BSA (RACNT-BSA). Os materiais foram caracterizados por: análise termogravimétrica (TG/DTG) a fim de avaliar a estabilidade térmica, espectroscopia no infravermelho (IR) para confirmação dos grupos funcionais envolvidos nos processos oxidação dos CNT e recobrimento dos mesmos com BSA, análise elementar (CHN), microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a morfologia e difração de raio-X. Para facilitar a compreensão dos mecanismos de interações entre os RACNT-BSA com BSA em solução e com íons metálicos, determinaram-se os pontos isoelétricos de todos os materiais. Para o estudo dos possíveis mecanismos de interação entre os RACNT-BSA e proteínas em solução, percolou-se soluções de BSA com concentração $3 \mu\text{g. mL}^{-1}$ em tampão fosfato com pH no intervalo de 2,2 a 7,0 nos RACNT-BSA. Dessa maneira, verificou-se uma relação entre o processo adsorativo nos RACNT-BSA e o pI (ponto isoelétrico) das proteínas, ou seja, propomos um mecanismo para o funcionamento dos RACNT-BSA dependente do pH da solução e das proteínas a serem percoladas. Quando uma solução de proteínas é percolada através de um cartucho de SPE contendo RACNT-BSA e o pH da solução é maior do que o ponto isoelétrico das proteínas, ambas as proteínas solubilizadas e a camada de BSA são ionizadas negativamente. Assim, uma repulsão eletrostática impede a interação entre as proteínas da amostra e a superfície do RACNT-BSA. Verificou-se que os íons metálicos podem ser adsorvidos nos RACNT-BSA, porém os processos adsorativos são afetados quanto a variação do pH da solução e a escolha do tampão adequado. Também se estudou a extração dos íons Fe das estruturas das proteínas da catalase. Quanto à aplicação para a catalase, verificamos que ao mesmo tempo em que não há adsorção desta proteína nos RACNT-BSA, os íons Fe, ligados covalentemente à ela, são atraídos e adsorvidos nos RACNT-BSA, sendo necessário, porém a desnaturação proteica. Isto nos mostrou que o material RACNT-BSA se mostrou promissor para a formação de apoproteínas.

Palavras-chave: Mecanismo de Adsorção. Interações Eletrostáticas. Apoproteínas.

ABSTRACT

In this work, we proposed to study the adsorption mechanisms of a new adsorbent material capable of extracting metal ions, obtained by chemical modification of carbon nanotubes (CNT) with the use of oxidizing acidic agent, followed by coating with an outer layer of bovine serum albumin (BSA), resulting in restricted access of carbon nanotubes coated with BSA (RACNT-BSA). The materials were characterized by thermogravimetric analysis (TG) in order to evaluate thermal stability, infrared spectroscopy (IR) to confirm the functional groups involved in the oxidation processes of CNT and covering the same with BSA, elemental analysis (CHN), scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the morphology and powder X-ray diffraction. To facilitate the understanding of the interaction mechanisms among RACNT-BSA and BSA in solution and metal ions, the isoelectric points (I_p) (isoelectric point) of all materials were determined. To study the possible interaction mechanisms between RACNT-BSA and solubilized proteins, the BSA solutions ($3 \mu\text{g. mL}^{-1}$) in phosphate buffer with a pH in the range 2.2 to 7.0 were percolated through the RACNT-BSA. Thus, there is a relationship between the adsorptive process in the RACNT-BSA and the protein I_p 's, *i.e.*, we proposed a working mechanism for RACNT-BSA dependent on the pH solution and on the type of percolated protein. When a protein solution is percolated through a SPE cartridge containing RACNT-BSA and the pH solution is higher than the protein I_p , both solubilized protein and BSA layer (from RACNT-BSA) are negatively ionized. Therefore, an electrostatic repulsion prevents the interaction between the solubilized proteins and the surface of RACNT-BSA. It was found that metal ions can be adsorbed on RACNT-BSA, but the adsorptive processes can be affected according the changing of pH solution, and the choice of the appropriate buffer. The application to catalase protein, we found that while there is no adsorption of this protein on RACNT-BSA, the Fe ions, covalently linked to it, are attracted and adsorbed on RACNT-BSA, requiring, however, the denaturation of protein. These results showed us that the RACNT-BSA material is promising for the apoprotein's formation.

Keywords: Adsorption Mechanism. Electrostatic Interactions. Apoproteins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Velocidades de reações não catalisadas e catalisadas por enzimas	25
Tabela 2 -	Coenzimas, co-fatores e enzimas	27
Tabela 3 -	Aplicações recentes de CNT como adsorventes sólidos na extração/pré- concentração de metais em diferentes matrizes	35
Tabela 4 -	Algumas aplicações de CNT bioconjugado com proteínas	38
Tabela 5 -	Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em amostras biológicas	41
Tabela 6 -	Tabela representando a descrição das amostras e código	48
Tabela 7 -	Teores de C, H, N de todos os materiais por análise elementar	65
Tabela 8 -	Dados de concentração de BSA após a lavagem com água	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proteína típica: Diagrama de ligações peptídicas e terminais –N e –C	19
Figura 2 - Formas estruturais das proteínas	19
Figura 3 - (a) Representação do arcabouço proteico da albumina do soro bovino (BSA), Estrutura tridimensional das albuminas: (b) HSA e (c) BSA	23
Figura 4 - Estrutura tridimensional de uma subunidade da catalase	24
Figura 5 - Estrutura proteica, holoenzima, cofator e apoenzima	26
Figura 6 - Ilustração de nanotubo de parede única (SWCNT) à esquerda e de paredes múltiplas (MWCNT) à direita	28
Figura 7 - CNTs com estruturas: Quiral (A), Zigzag (B) e Armchair (C)	28
Figura 8 - Modelo estrutural dos CNTs após a oxidação ácida	30
Figura 9 - Esquema do mecanismo de sorção de íons metálicos divalentes na superfície dos CNTs	36
Figura 10 - Esquema representando a exclusão de proteínas e retenção das micromoléculas nas fases hidrofóbicas RAM-BSA	40
Figura 11 - Fluxograma geral da metodologia empregada neste trabalho	45
Figura 12 - Sequência das etapas de funcionalização do CNT p	46
Figura 13 - Representação esquemática do recobrimento dos CNTs funcionalizados	47
Figura 14 - Medidas espectrofotométricas antes e depois das percolações	52
Figura 15 - Esquema da adsorção de ferro nos materiais, CNT p, RACNT-BSA (br.), RACNT-BSA (conc.) e BSA int. com otimização dos tampões	53
Figura 16 - Reação entre a BSA imobilizada e o glutaraldeído formando bases de Schiff, e subsequente inter cruzamento de ligações	56
Figura 17 - Curvas de TG das amostras com tratamento de atmosfera de ar: (a) inerte de N ₂ e (b) sintético	57
Figura 18 - Curvas de DTG para CNT p e CNT ox. (br) com atmosfera de ar sintético ..	58
Figura 19 - Curvas de DTG para CNT p e CNT ox. (conc) com atmosfera de ar sintético	59
Figura 20 - Curvas de TG e DTG para RACNT-BSA (br) e (conc) e BSA int. com atmosfera de ar sintético	59
Figura 21 - Espectros no infravermelho dos materiais CNT p, CNT ox. (br.), CNT	

(conc.)	60
Figura 22 - Espectros no infravermelho dos materiais RACNT-BSA (br) e (conc), BSA p e BSA int	61
Figura 23 - Micrografias para as amostras CNT p, CNT ox. (br), CNT ox. (conc), RACNT-BSA (br)	62
Figura 24 - Difractogramas de raio-X das amostras	66
Figura 25 - Curva de calibração obtida a partir das soluções padrão de BSA	67
Figura 26 - Efeito do pH na exclusão de proteínas BSA do RACNT-BSA (br)	69
Figura 27 - Efeito do pH na exclusão de proteínas BSA do RACNT-BSA (conc)	69
Figura 28 - Curva potenciométrica ácido-base dos materiais titulados com solução de HCl 0,01 mol. L ⁻¹	71
Figura 29 - Representação do mecanismo da titulação potenciométrica	73
Figura 30 - Quadro representativo dos pontos isoelétricos (pI) dos materiais	74
Figura 31 - Curvas analíticas do ferro empregando FAAS em tampão: citrato, Tris-HCl e Acetato	75
Figura 32 - Gráfico de percentual de Fe adsorvido nos materiais: BSA int., CNT p, RACNT-BSA (br.) e RACNT-BSA (conc.)	75
Figura 33 - Curvas analíticas do ferro, chumbo e cádmio em tampão acetato (1,25 ppm em tampão acetato (0,01 mol. L ⁻¹ pH 6,00, determinado por FAAS	77
Figura 34 - Gráfico representando o percentual de metal adsorvido (Fe ²⁺ , Pb ²⁺ e Cd ²⁺) nos materiais estudados	77
Figura 35 - Curvas analíticas do ferro empregando FAAS para a cinética de adsorção em tampão acetato (0,01 mol.L ⁻¹), pH 6,0	79
Figura 36 - Cinética de adsorção do CNT p e RACNT-BSA (br) em tampão acetato (0,01 mol. L ⁻¹) pH 6,00 com concentração de íons Fe em 10 ppm	80
Figura 37 - Cinética de adsorção do RACNT-BSA (conc) e BSA int. em tampão acetato (0,01 mol. L ⁻¹) pH 6,00 com concentração de íons Fe em 10 ppm ...	80
Figura 38 - Curvas de calibração obtida a partir das soluções padrão de BSA para determinação de catalase	81
Figura 39 - Comparação dos tampões acetato e Tris-HCl na exclusão de catalase	82
Figura 40 - Comparação dos processos de desnaturação proteica	83
Figura 41 - Exclusão de catalase e adsorção de Fe no RACNT-BSA (br)	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNT:	Nanotubos de Carbono, do inglês <i>Carbon Nanotubes</i>
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
BSA:	Albumina de Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
HSA:	Albumina de Soro Humano, do inglês <i>Human Serum Albumin</i>
MWCNT:	Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla, do inglês <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>
SWCNT:	Nanotubos de Carbono de Parede Simples, do inglês <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>
SPE:	Extração em Fase Sólida, do inglês, <i>Solid Phase Extraction</i>
pI	Ponto Isoelétrico
CD:	Dicroísmo Circular, do inglês <i>Circular Dichroism</i>
RAM:	Meio de acesso restrito, do inglês, <i>restricted access media</i>
RAM-BSA:	Materiais de acesso restrito recoberto com albumina de soro bovino, do inglês <i>Restricted Access Material – Bovine Serum Albumin</i>
RACNT-BSA:	Nanotubos de carbono restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina, do inglês <i>Restricted access carbon nanotube capped with bovine serum albumin</i>
FAAS:	Espectrometria de absorção atômica por chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
TG:	Termogravimetria
DTG:	Derivada da curva termogravimétrica
FTIR:	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
PCZ:	Ponto de carga zero
UV-VIS:	Espectroscopia no ultravioleta visível, do inglês (<i>Ultraviolet–visible spectroscopy</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	PROTEÍNAS	18
2.1.1	Estrutura	18
2.1.2	Função	21
2.1.3	Albuminas	22
2.1.4	Catalase	23
2.1.5	Apoproteínas	25
2.2	NANOTUBOS DE CARBONOS	27
2.2.1	Funcionalização dos CNT	29
2.2.1.1	Funcionalização covalente	30
2.2.2	Adsorção	31
2.2.2.1	Equações de isotermas	32
2.2.3	Adsorção de metais em CNT	34
2.2.3.1	Mecanismo de adsorção	35
2.2.4	Adsorção de proteínas em CNT	36
2.3	MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAM)	39
2.4	NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR MEIO DE RECOBRIMENTO COM ALBUMINA (RACNT-BSA)	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	MATERIAL DE PARTIDA	44
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	44
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	44
4.3.1	Funcionalização dos CNTs	46
4.3.2	Recobrimento dos CNTs funcionalizados com BSA (RACNT-BSA)	47
4.3.3	Intercruzamento da BSA com glutaraldeído	48

4.3.4	Técnicas para caracterizações	48
4.3.4.1	Análise termogravimétrica (TGA)	49
4.3.4.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	49
4.3.4.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
4.3.4.4	Análise Elementar (CHN)	50
4.3.4.5	Difração de raio-X de pó (DRX)	50
4.4	Avaliação da exclusão de proteínas BSA percoladas pelos RACNT-BSA em relação ao pH	50
4.4.1	Preparo da solução de BSA e reagente de Bradford	50
4.4.2	Influência do pH na exclusão de BSA dos RACNT-BSA	51
4.5	Determinação do Ponto Isoelétrico (pI) das amostras	52
4.6	Otimização de tampões empregados	53
4.7	Estudo de adsorção de metais	54
4.7.1	Cinética de adsorção	54
4.8	Avaliação da exclusão da catalase	54
4.9	Emprego do RACNT-BSA (br.) na extração de íons Fe em catalase	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1	RECOBRIMENTO DOS CNTS FUNCIONALIZADOS COM BSA (RACNT-BSA)	56
5.2	TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÕES	57
5.2.1	Análise termogravimétrica (TG)	57
5.2.2	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	60
5.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	62
5.2.4	Análise Elementar (CHN)	65
5.2.5	Difração de raio-X de pó (DRX)	66
5.3	AVALIAÇÃO DA EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS BSA PERCOLADAS PELOS RACNT-BSA EM RELAÇÃO AO pH	67
5.4	DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CARGA ZERO DE (PCZ) DAS AMOSTRAS.....	71
5.5	AVALIAÇÃO DOS TAMPÕES CITRATO, TRIS-HCL E ACETATO PARA ADSORÇÃO DE FE NOS RACNT-BSA	74

5.5.1	Estudo de adsorção de metais nos RACNT-BSA	76
5.5.2	Cinética de adsorção de íons Ferro	78
5.5	DETERMINAÇÃO DE APOPROTEÍNA	81
6	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos nanotubos de carbono (CNT, do inglês *Carbon Nanotubes*) por Iijima em 1991, impulsionou a descoberta de diversos nanomateriais de carbono favorecendo o desenvolvimento acelerado da nanotecnologia (IIJIMA, 1991). Devido às propriedades únicas dos CNT, tais como alta resistência mecânica, condutividade elétrica e térmica e elevada área superficial, esses materiais possuem um grande potencial em diversas aplicações, principalmente na área biomédica (TERRONES, 2003).

As funcionalizações ou modificações químicas de superfície dos nanomateriais de carbono são de extrema importância na melhoria das propriedades físicas e químicas desses materiais, permitindo maior controle de sua pureza, facilitando a obtenção de materiais adequados à produção de dispositivos de elevada sensibilidade e seletividade, podendo assim interagir com sistemas biológicos, destacando-se na biocompatibilidade com biomoléculas (proteínas) e redução da citotoxicidade desses materiais (VIJAYARAJ et al., 2010). Os fatores mais importantes para aplicações biomédicas são a solubilidade e biocompatibilidade dos CNT, que podem ser melhoradas por vários métodos de purificação através de tratamento com ácidos, expondo determinados grupos químicos como, álcoois, lactonas, ácidos carboxílicos, carbonilas, entre outros (PORTER et al., 2009).

As interações ocorridas entre os CNT e proteínas podem resultar em nanoconjugados de CNT-proteína, tendo aplicação na fabricação de biossensores, na investigação da interação de fármacos com o DNA celular (DUKOVIC et al., 2006), na liberação controlada de fármacos e na terapia do câncer (GE et al., 2011). Destaca-se a interação dos CNT com a proteína Albumina de soro bovino (BSA). Esta resulta em um bionanocomplexo entre CNT-BSA, que é altamente solúvel em água, formando uma suspensão aquosa de coloração escura (SUN et al., 2002). Utilizando técnicas de caracterização como, microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*), análise termogravimétrica (TG), espectroscopia Raman e eletroforese em gel, mostraram que as amostras que contêm CNT-BSA permaneceram bioativas, bem como a interação entre as proteínas e os CNT. Para a aplicação de novos bionanomateriais, estudos foram realizados com o intuito de melhorar a dispersão dos CNT-proteínas em solução, como a imobilização da ferritina (JIANG et al., 2004),

albumina do soro humano (HSA, do inglês *Human Serum Albumin*) (GUO et al., 2013) e BSA (JIANG et al., 2004).

De acordo com a literatura, há um aumento de estudos sobre interação entre proteínas e CNT (MORIKAWA et al., 2012). Porém, o mecanismo mais detalhado com base em estruturas químicas das proteínas e o efeito da modificação da superfície de CNT na interação com proteínas ainda enfrenta alguns desafios a serem elucidados. Pesquisadores reportaram que a adsorção de proteínas em nanotubos de carbono com paredes múltiplas é determinada pelo domínio de interações hidrofóbicas e iônicas e essas interações podem estar relacionadas com algumas mudanças conformacionais das proteínas, afetando assim suas funções biológicas. (TAKADA et al., 2014; AHMAD et al., 2005; GUAN; ZHANG; WANG, 2014).

As excelentes propriedades adsorptivas dos CNT, principalmente, a elevada área superficial (BYSZEWSKI et al., 1997), conferem a esses materiais a propriedade de serem amplamente empregados em processos adsorptivos na extração em fase sólida de diversos analitos e como suporte no recheio de colunas cromatográficas, entretanto, todas essas aplicações são restritas a soluções aquosas. Quando os analitos são encontrados em meios com elevada concentração de macromoléculas (sangue total, plasma, soro, amostras de alimentos, ambientais e etc), o material não apresenta seletividade e pode reter superficialmente uma grande quantidade de proteínas, diminuindo sua vida útil e degradando colunas analíticas quando se emprega esses materiais em técnicas de extração em fase sólida e/ou cromatográficas.

Os materiais de acesso restrito (do inglês, *restricted access media* - RAM), expressão “meio de acesso restrito” foi introduzida por Desilets et al. em 1991, como termo geral para suportes cromatográficos que permitem a injeção direta de fluidos biológicos e limitam a interação dentro dos poros apenas para moléculas de baixo peso molecular (DESILETS; ROUNDS; REGNIER, 1991). Além disso, esses materiais têm sua superfície externa modificada com ligantes hidrofílicos a fim de inviabilizar quimicamente a ligação de macromoléculas indesejadas presentes em matrizes (sangue, plasma, soro, etc). (SADÍLEK; ŠATÍNSKÝ; SOLICH, 2007).

A fim de solucionar o problema de seletividade dos CNT em relação as macromoléculas, Barbosa e colaboradores desenvolveram os nanotubos de carbono restrito à ligação com macromoléculas por meio de recobrimento com albumina (RACNT-BSA) (BARBOSA et al., 2015). Esses materiais são capazes de extrair metais diretamente de matrizes proteicas sem a necessidade da etapa prévia de preparo de

amostras, como decomposição da matriz por procedimentos trabalhosos (micro-ondas, via seca, via úmida, etc.). Ainda há poucos relatos na literatura sobre este trabalho inovador, pois este material foi empregado como sorvente sólido na extração direta de cádmio e chumbo em soro sanguíneo humano (BARBOSA et al., 2015; BARBOSA, 2015). Sendo assim, possui um elevado potencial em adsorver outros íons metálicos em matrizes complexas.

As apoproteínas são a parte de um complexo biomolecular (proteínas), porém sem o seu grupo principal ligante ou grupo protético. Um exemplo é a ferritina que sem o hidróxido férrico se torna a apoferritina (SEGEN, 2010). Os RACNT-BSA, têm como um de seus objetivos, serem empregados na produção de apoproteínas, se baseando na extração de íons ferro a partir da catalase e também com o intuito de minimizar as etapas de preparo de amostras de matrizes complexas proteicas.

Neste trabalho, avaliou-se o emprego de ácido nítrico na modificação química na superfície dos CNT, melhorando a biocompatibilidade desses materiais com proteínas (BSA), resultando em nanotubos de carbono revestidos com albumina de soro bovino de acesso restrito (RACNT-BSA). Foi investigada a influência do pH na interação dos RACNT-BSA com macromoléculas (soluções proteicas de BSA), proporcionando uma maior compreensão do mecanismo de interação entre estes com moléculas biológicas.

Os materiais foram caracterizados por Termogravimetria (TG) e Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Análise elementar (CNH), as quais são técnicas de caracterização que permitem avaliar a pureza dos CNT e a confirmação da formação do complexo CNT-BSA. Já a Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a morfologia dos materiais e com a titulação potenciométrica foi útil para determinar o ponto isoelétrico dos materiais. Assim o objetivo deste trabalho foi o emprego de um novo material na aplicação de produção de apoproteínas e melhor compreensão da interação deste material com moléculas biológicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão bibliográfica relata sobre as proteínas e apoproteínas, CNT, processo de funcionalização, adsorção de metais e proteínas em CNT, materiais de acesso restrito (RAM) e os RACNT-BSA.

2.1 PROTEÍNAS

Será abordado sobre a estrutura e função das proteínas e destaca-se as albuminas, catalase e as apoproteínas.

2.1.1 Estrutura

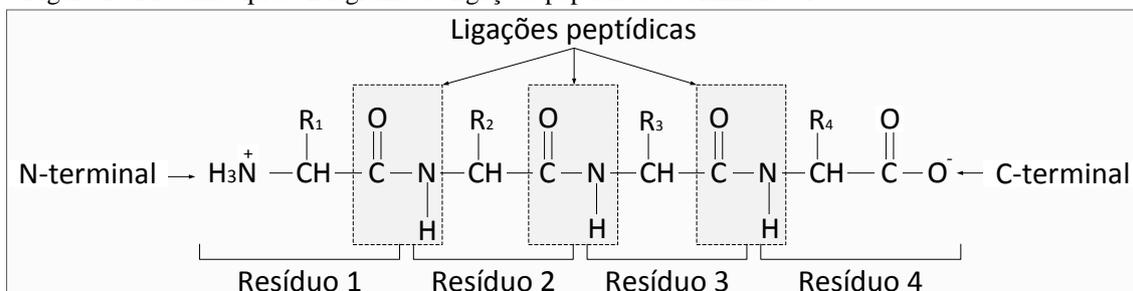
As proteínas são os principais componentes dos sólidos totais de organismos vivos e são compostas de polímeros de aminoácidos, possuindo longas cadeias. O peso molecular (MM) dessas macromoléculas varia desde centenas até milhares de Daltons ($1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-24} \text{ g}$). A maior parte das proteínas contém em torno de 20 aminoácidos principais: alanina, valina, prolina, leucina, etc, formando cadeias de até várias centenas de aminoácidos e são encontrados em proteínas de plantas e animais e estes são combinados em incontáveis maneiras para formar uma grande variedade de diferentes proteínas (NELSON; COX, 2011).

As moléculas de proteínas consistem de uma “espinha dorsal”, formada por um grande número de peptídeos, da qual se projetam cadeias laterais de resíduos de aminoácidos. A natureza destas cadeias laterais de aminoácidos é responsável pelas diferentes propriedades das proteínas, sendo que a cadeia característica lateral pode ser apolar (hidrofóbica), polar carregada (hidrofílica) ou polar não carregada.

Os aminoácidos possuem grupos carboxílicos, grupos aminos e os grupos presentes nas cadeias laterais podendo sofrer reações de ligações peptídicas e a oxidação da cisteína (formação de pontes de dissulfeto). Estas reações são de extrema importância, pois podem

afetar a estrutura das proteínas (NELSON; COX, 2011). A Figura 1 mostra a fórmula estrutural geral de um polipeptídeo (tetrapeptídeo) típico que constitui as proteínas, formação de ligações peptídicas e os grupamentos terminais.

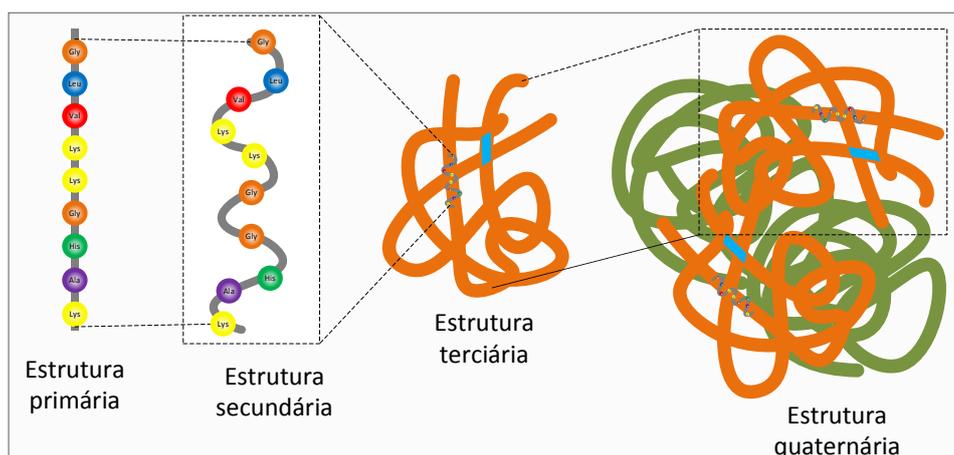
Figura 1 - Proteína típica: Diagrama de ligações peptídicas e terminais – N e – C.



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2011).

A partir da fórmula estrutural geral de um polipeptídeo são determinadas as estruturas das proteínas, sendo estas extremamente complexas e seu estudo requer o conhecimento dos vários níveis de organização, pois é dependente das interações necessárias para sua manutenção. De forma geral, há quatro níveis de organização nas proteínas: Estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 2) (NELSON; COX, 2011).

Figura 2 - Formas estruturais das proteínas.



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2011).

Estrutura primária

Os aminoácidos individuais são unidos pela ligação peptídica, que une um grupo amino a um grupo carboxila de outro aminoácido, formando uma cadeia que é denominada de estrutura primária da proteína.

Estrutura secundária

Um arranjo regular das cadeias polipeptídicas ao longo de uma dimensão espacial como uma hélice tipo α ou uma folha plissada determina a estrutura secundária da proteína.

Estrutura terciária

O enovelamento das cadeias polipeptídicas forma uma estrutura mais compacta, sendo característica das proteínas globulares. A estrutura terciária é criada pelas interações específicas entre os diferentes resíduos de aminoácidos, usualmente nas regiões das cadeias laterais, causadas por uma variedade de forças, incluindo as ligações de hidrogênio, dissulfeto e interações de Van Der Waals (hidrofóbicas), além de interações eletrostáticas.

Estrutura quaternária

O arranjo de cadeias polipeptídicas em múltiplas cadeias compostas de subunidades é provocado por interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e pontes iônicas entre os aminoácidos na superfície das subunidades de polipeptídeos. Essas estruturas quaternárias podem também ser formadas por ligações covalentes como do tipo dissulfeto.

De forma geral os aminoácidos possuem duas constantes de ionização (expressos como valores pK_a), os quais representam as constantes de ionização dos grupos 1-amino e 1-carboxílico do aminoácido livre. Entretanto, alguns têm mais do que dois valores de pK_a , devido a terem outros grupos ionizáveis nas suas cadeias. A carga líquida de uma molécula de proteína numa solução aquosa depende da constante de ionização das cadeias laterais dos aminoácidos constituintes e do pH da solução. Para pH baixos, os grupos

carboxílicos não são ionizados e os amino são protonados, tendo a proteína uma carga líquida positiva. Para pH elevados, os grupos carboxílicos são ionizados e os amino não são protonados, tendo a proteína uma carga líquida negativa. Para valores intermediários de pH somente alguns grupos da cadeia são protonados, dependendo dos valores de pK_a . Existe um pH particular para cada molécula de proteína no qual esta não tem carga líquida, isto acontece porque ela possui um número igual de grupos carregados positivo e negativamente. Este pH é chamado de ponto isoelétrico da proteína e é designado por pI. O valor de pI é característico de cada proteína. Para valores menores que o pI, a proteína tem carga líquida positiva, enquanto que para valores maiores que o pI ela terá carga negativa. Portanto, para um dado valor de pH, proteínas diferentes terão cargas líquidas diferentes por causa dos seus pI característicos (PETERS JR, 1995).

2.1.2 Função

A conformação global das proteínas é uma combinação das estruturas mencionadas na Figura 2. A diversidade de estruturas dá origem aos diversos tipos de funções, sendo alguns exemplos dados a seguir:

- a) Metabolismo: enzimas, hormônios, toxinas;
- b) Estrutura: colágeno, elastina, proteínas das membranas;
- c) Armazenamento: caseína, ovalbumina;
- d) Transporte: hemoglobina, albumina;
- e) Mobilidade: miosina, actina;
- f) Defesa: anticorpos.

A estrutura nativa das proteínas deve ser mantida sem modificação para preservar sua função biológica. Desde que proteínas são altamente sensíveis a mudanças no meio, desvios de condições fisiológicas podem afetar a conformação da proteína e causar desnaturação. Fatores como pH, temperatura, força iônica, entre outros, pode afetar a atividade das proteínas. O pH deve ser mantido tão perto quanto possível do encontrado no ambiente natural da proteína. A maioria das proteínas são praticamente estáveis a temperaturas abaixo de 40° C (NELSON; COX, 2011).

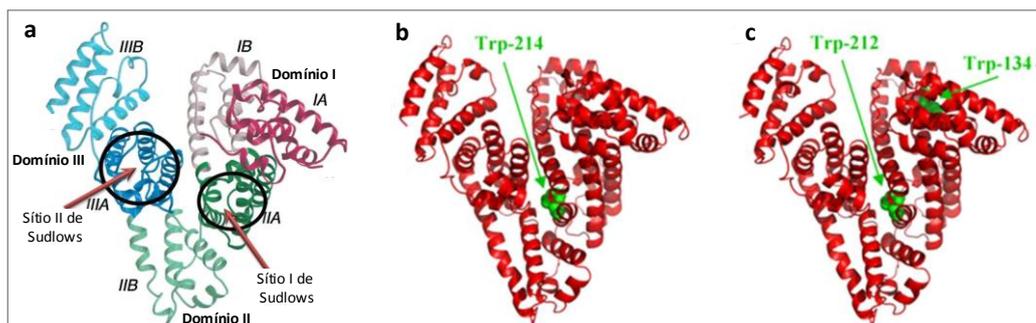
2.1.3 Albuminas

A albumina de soro é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, com concentração de aproximadamente 40 g. L^{-1} ($\sim 0,6 \text{ mM}$) (CURRY; BRICK; FRANKS, 1999). Essa proteína tem por funções: manutenção da pressão osmótica sanguínea, manutenção do pH do plasma, efeito antioxidante, marcador de nutrição e longevidade, transporte de fármacos, entre outras. Por ser isolada e purificada em grande escala e o fato de ser um excelente ligante a uma variedade de moléculas, a albumina tem sido empregada em estudos biofísicos e bioquímicos.

A albumina humana (HSA, do inglês *human serum albumin*) foi cristalizada recentemente, possibilitando pesquisas relacionadas à interação das albuminas com outras proteínas e pequenas moléculas e visando entender sua função transportadora e marcador de doenças nutricionais. Comparativamente, a BSA possui cerca de 76% de sua sequência de aminoácidos idênticos a da HSA, conferindo à BSA funções similares às da HSA (PETERS JR, 1995). Além disso, sua elevada estabilidade, disponibilidade, baixo custo e por ser uma proteína com composição e pesos bem definidos, é frequentemente usada como referência para quantificação de outras proteínas de peso desconhecido. Porém, se diferem em quantidade de resíduos de triptofano (Trp), possuindo dois resíduos denominados Trp-134 e Trp-212 na BSA, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente, enquanto a HSA contém apenas um resíduo, o Trp-214, situados no subdomínio IIA. Há também diferença na sequência de sítios N-terminais, apresentando a tríade Asp-Thr-His na BSA e Asp-Ala-His na HSA (HE; CARTER, 1992).

A albumina bovina consiste de um acoplamento flexível de domínios semi-independentes, com massa de 66 kDa, composta de 582 resíduos de aminoácidos e três grandes domínios estruturalmente similares, denominados de I, II e III. Cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B. As regiões responsáveis pelo armazenamento dos compostos nas albuminas estão localizadas nos subdomínios IIA e IIIA, conhecidos como sítios I e II de Sudlow (Figura 3). Há 17 pontes dissulfeto, que contribuem para manter sua estrutura terciária e que resulta em 9 *loops*, os quais são rearranjados similares aos da HSA (SAITO; DRESSELHAUS; DRESSELHAUS, 1998).

Figura 3 - (a) Representação do arcabouço proteico da albumina do soro bovino (BSA), estrutura tridimensional das albuminas: (b) HSA e (c) BSA.



Fonte: Adaptado de (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).

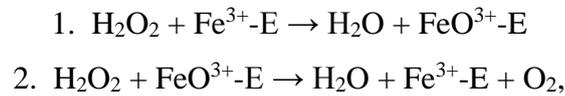
O (pI) da BSA, que indica o pH no qual a molécula possui o mesmo número de cargas positivas e negativas, está em torno de 5,1 (CARTER; HO, 1994). Entretanto, a variação de pH pode provocar mudanças nas estruturas dos aminoácidos e, consequentemente, modificações estruturais na conformação da BSA. Estas modificações ocorrem principalmente no intervalo de pH de 4 a 8. No pH próximo de 7, as albuminas são extremamente solúveis em água. Já para o valor de pH em torno de 5, próximo ao ponto isoelétrico, a solubilidade da albumina decresce sensivelmente.

2.1.4 Catalase

A catalase é uma enzima encontrada em todos os organismos vivos, sendo que, nas células eucarióticas, está presente no peroxissomo celular. Possui um grupamento heme que é responsável pela atividade catalítica da enzima, convertendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em duas moléculas, água (H_2O) e oxigênio (O_2) (MICHIELS et al., 1994).

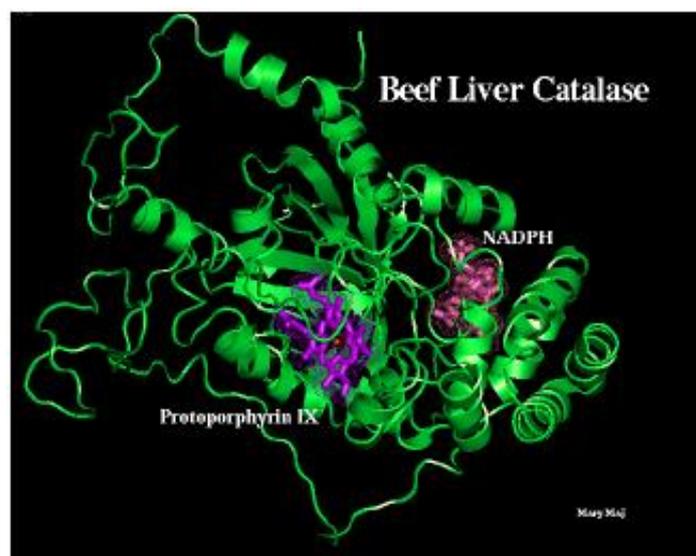
É uma das principais classes de enzimas que atuam como antioxidantes. Sendo tóxico para as células, o peróxido tem de ser rapidamente convertido numa espécie química que não cause danos ao organismo (NICHOLLS, 2012). Elas têm a capacidade de decompor até 40.000.000 de moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo, tornando-se enzimas importantes para a desintoxicação desta substância (NELSON; COX, 2011). Essas enzimas são metaloproteínas, isto é, proteínas que contém átomos ou grupo de metais que estão envolvidos em diversos processos biológicos.

O mecanismo da reação da catalase hémica, ou seja, os passos que a enzima efetua na decomposição do peróxido de hidrogênio, não é totalmente conhecido. Sabe-se que a reação química ocorre em duas etapas fundamentais: em que Fe-E representa o átomo de ferro do grupo heme ligado à enzima



Quando o H_2O_2 entra no centro ativo da catalase, interage com dois aminoácidos de sua cadeia polipeptídica: uma histidina e uma asparagina. Um dos átomos de hidrogênio do H_2O_2 (sob a forma de próton) é transferido de um oxigênio para o segundo. Isso causa uma distensão e uma quebra da ligação entre os dois átomos de oxigênio de forma heterolítica. O átomo de oxigênio restante coordenam-se (ligam-se) ao ferro (que está no estado de oxidação +3), formando a espécie FeO^{3+} , liberando uma molécula de água. A espécie FeO^{3+} é muito oxidante e reage com uma segunda molécula de H_2O_2 , retirando-lhe um átomo de oxigênio. Forma-se assim o O_2 , que se libera do ferro, e uma segunda molécula de água. O íon ferro volta ao estado de oxidação +3 (NICHOLLS, 2012).

Figura 4 - Estrutura tridimensional de uma subunidade da catalase.



Fonte: (MURTHY et al., 1982) .

Nota: o Fe está sempre sob a forma férrica e aparece na imagem a vermelho no anel de protoporfirina).

A sequência completa de aminoácidos da catalase bovina já é conhecida desde 1982 e a sua estrutura tridimensional foi determinada por M. Murthy e colaboradores em 1981 (Figura 4) (MURTHY et al., 1982). A catalase contém ainda 4 moléculas de NADPH firmemente ligadas. Este dinucleótido não é essencial para a atividade da enzima mas diminui a sua susceptibilidade à inativação quando fica exposta a altas concentrações do seu substrato tóxico, o H₂O₂ (KIRKMAN; GAETANI, 1984).

2.1.5 Apoproteínas

Por definição, apoproteínas são a parte de um complexo biomolecular sem o seu ligante ou grupo prostético. Um exemplo é a ferritina, que sem o hidróxido férrico se torna a apoferritina (SEGEN, 2010). A substituição de metais ou grupo prostético por outros sítios ativos podem proporcionar uma nova função fisiológica para a proteína, conseqüentemente, podem ser aplicadas em bioquímica e bioanalítica.

As enzimas são catalisadores biológicos, de natureza proteica, que participam de diversas reações bioquímicas. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente favorecidas, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas, e de elevada importância nos processos biotecnológicos (COELHO et al., 2008). Na Tabela 1 estão representadas algumas enzimas responsáveis por acelerar consideravelmente a velocidade das reações químicas nos sistemas biológicos.

Tabela 1 - Velocidades de reações não catalisadas e catalisadas por enzimas.

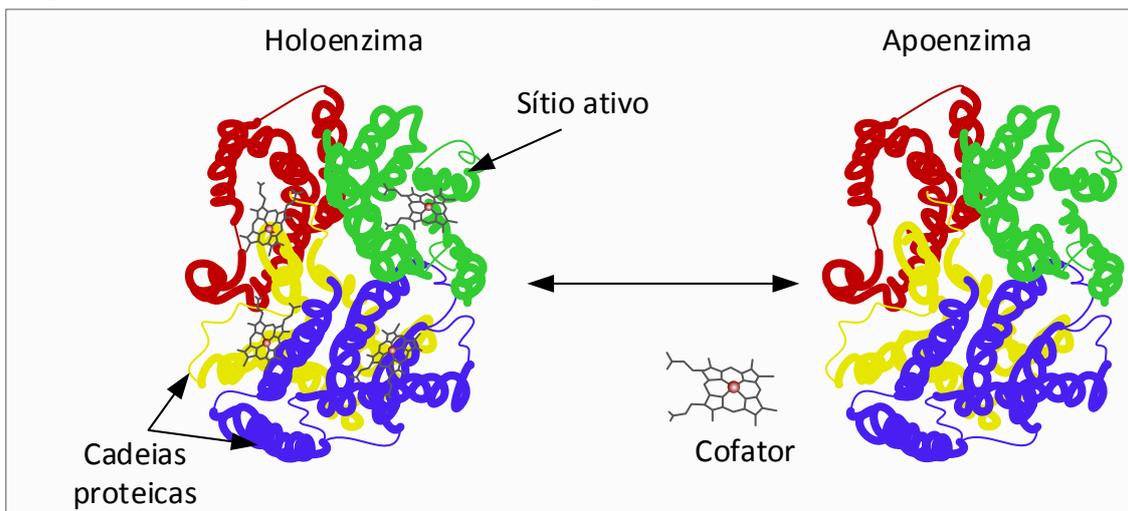
Enzima	Não catalizada (s⁻¹)	Catalizada (s⁻¹)	Aumento da velocidade
Anidrase carbônica	1,3 x 10 ⁻¹	1000000	7,7 x 10 ⁶
Adenosina-deaminase	1,8 x 10 ⁻¹⁰	370	2,1 x 10 ¹²
Nuclease estafilocócica	1,7 x 10 ⁻¹³	95	5,6 x 10 ¹⁴
Triose-fosfato-isomerase	4,3 x 10 ⁻⁶	4300	1,0 x 10 ⁹
Quimiotripsina	1,0 x 10 ⁻⁹	190	1,7 x 10 ¹¹
Orotidina-descarboxilase	2,8 x 10 ⁻¹⁶	39	1,4 x 10 ¹⁷

Fonte: (COELHO et al., 2008).

A Figura 5 ilustra as partes mais importantes de um sistema proteico. A cavidade, denominada *sítio ativo*, é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos

aminoácidos que ligam o substrato por ligações não-covalentes. Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam o sítio ativo ficam em regiões distantes, na sequência primária, mas próximos no sítio ativo, pelo enovelamento da cadeia polipeptídica (estrutura terciária). Outra região na molécula destaca-se o *sítio alostérico*, afastada do sítio ativo. No sítio alostérico moléculas pequenas específicas se ligam e causam alterações na conformação proteica que afetam o sítio ativo, aumentando ou reduzindo a atividade enzimática. Portanto, a maioria das enzimas necessitam de moléculas orgânicas ou inorgânicas pequenas, essenciais à sua atividade que são denominadas como *coenzimas* e *co-fatores* (MOTTA, 2006). A Tabela 2 apresenta algumas coenzimas, co-fatores e enzimas. A enzima é cataliticamente ativa quando forma um complexo denominado *holoenzima*, isto é, apoenzima com o cofator e o componente proteico (inativo) do complexo é designado de *apoenzima*.

Figura 5 - Estrutura proteica, holoenzima, cofator e apoenzima.



Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2011).

Tabela 2 - Coenzimas, co-fatores e enzimas.

Coenzimas e co-fatores	Enzima
Coenzimas	
Pirofosfato de timinas (TTP)	Piruvato-desidrogenase
Flavina adenosina dinucleotídeo (FAD)	Monoaminooxidase
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Lactato-desidrogenase
Piridoxal fosfato	Glicogênio-fosforilase
Coenzima A (CoA)	Acetil-CoA-carboxilase
Biotina	Piruvato-carboxilase
Tetraidrofolato	Timidilato-sintase
Co-fator metálico	
Cu ²⁺	Citocromo oxidase
Se	Glutaciona peroxidase
K ⁺	Piruvato quinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Dinitrogenase
Mg ²⁺	Hexokinase, glucose 6-fosfatase, piruvato quinase
Fe ²⁺ ou Fe ³⁺	Citocromo oxidase, catalase, peroxidase
Mn ²⁺	Arginase, ribonucleotídeo redutase
Zn ²⁺	Anidrase-carbônica, carboxipeptidase, álcool desidrogenase

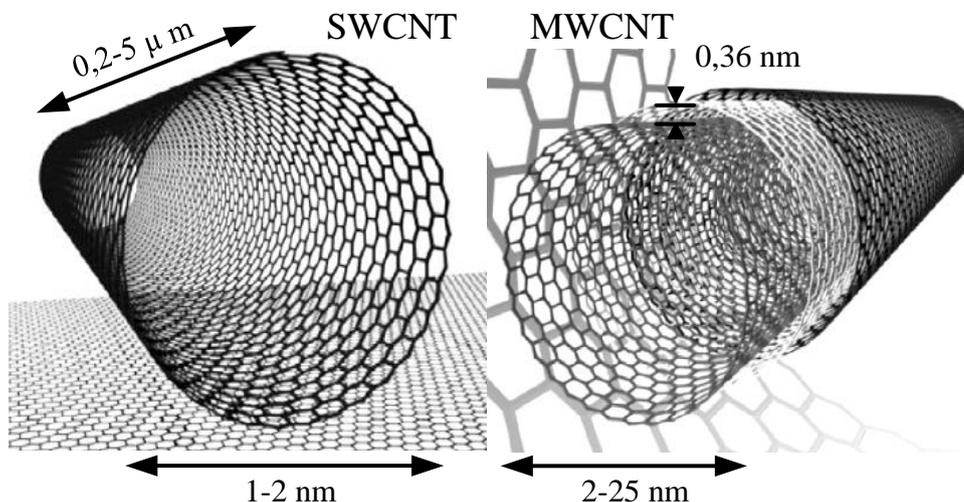
Fonte: (NELSON; COX, 2011)

2.1 NANOTUBOS DE CARBONOS

Os CNT foram descritos pela primeira vez pelo cientista japonês Sumio Iijima, podendo ser descritos como uma estrutura cilíndrica e oca feita de uma camada circular de carbonos ligados entre si em configuração sp^2 (IJIMA, 1991). Possuem várias propriedades estruturais, eletrônicas, mecânicas, térmicas e químicas, diferentes de outros materiais. O seu diâmetro é da ordem de poucos nanômetros e seu comprimento pode chegar a vários micrômetros, sendo que os extremos desses tubos ficam fechados por estruturas tipo fulereno (SAITO; DRESSELHAUS; DRESSELHAUS, 1998). Em relação ao número de camadas podem ser classificados como nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*), e de parede simples

(SWCNT, do inglês *Single-Walled Carbon Nanotubes*). (vide Figura 6) (VELOSO; DO CARMO RANGEL, 2009).

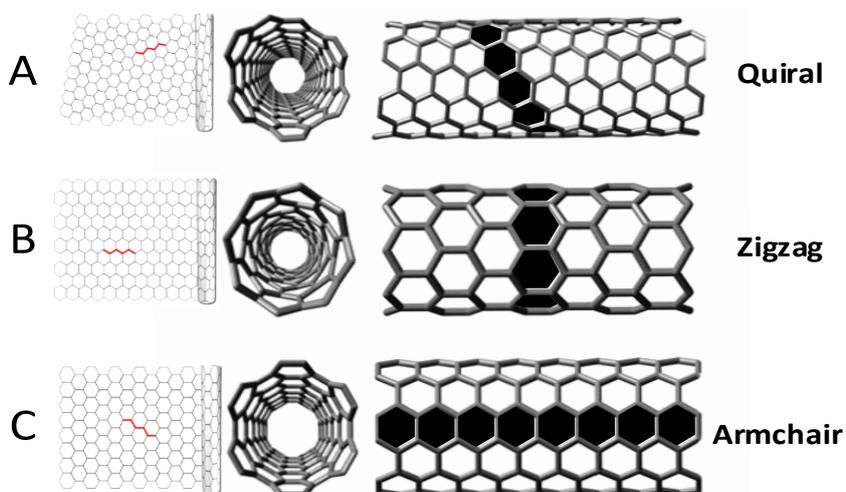
Figura 6 - Ilustração de nanotubo de parede única (SWCNT) à esquerda e de paredes múltiplas (MWCNT) à direita.



Fonte: Adaptado de (VELOSO; DO CARMO RANGEL, 2009).

Os CNT podem ser classificados de acordo com a direção de enrolamento da folha de grafeno, em poltrona ou *armchair*, *zig-zag* e *quiral*. A Figura 7 representa os diferentes tipos de estruturas em que os CNT podem assumir a partir do enrolamento das folhas de grafeno. Os MWCNT, por serem constituídos por vários nanotubos podem apresentar várias quiralidades.

Figura 7 - CNT com estruturas: Quiral (A), Zigzag (B) e Armchair (C).



Fonte: Adaptado: <https://engineering.purdue.edu/~mdasilva/Structure.shtml/>
<http://nano.mtu.edu/Nanotubes.htm>.

Muitas propriedades dos CNT dependem do ângulo *quiral*, também chamado de quiralidade ou helicidade, e do seu diâmetro. Cada nanotubo tem especificado o vetor *quiral*, que corresponde à direção de enrolamento da folha bidimensional de grafeno, sendo responsável pela determinação da estrutura destes nanotubos e suas propriedades físicas.

2.2.1 Funcionalização dos CNT

A funcionalização dos CNT através de suas paredes tem sido vista como uma forma de explorar seu potencial na nanotecnologia. Os nanotubos funcionalizados podem ter propriedades eletrônicas e mecânicas que são substancialmente diferentes dos nanotubos não funcionalizados e este fenômeno é explorado para uso em sensores, dispositivos eletrônicos e eletromecânicos em escala nanométrica, devido a sua grande resistência e flexibilidade mecânica. Essas estruturas quimicamente modificadas podem ser usadas de forma a facilitar a interação dos nanotubos com moléculas orgânicas e biológicas (HUANG et al., 2002), com outros grupos químicos como fármacos ou moléculas tóxicas (SINNOTT, 2002) e, até mesmo, com vírus e bactérias (SRIVASTAVA et al., 2004), tornando-os sensores capazes de detectar pequenos traços da espécie alvo e com alta seletividade. Certamente, o desenvolvimento de sensores utilizando CNT funcionalizados é uma das áreas mais promissoras para uso desses materiais em nanotecnologia (DE SOUZA FILHO; FAGAN, 2007).

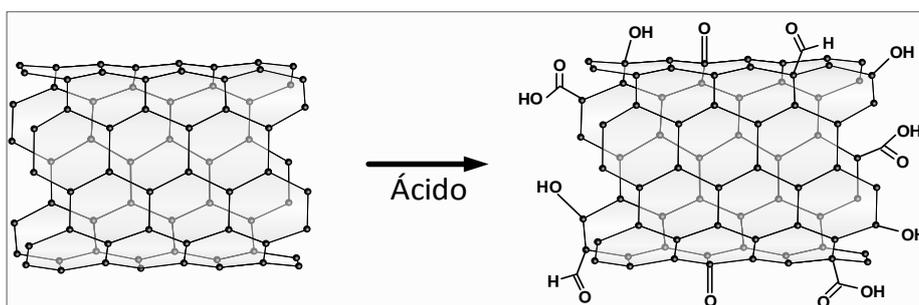
A funcionalização se baseia em modificações químicas da superfície dos CNT através de diversas metodologias. Os vários tipos de funcionalização podem ser classificados em duas categorias, uma delas consiste em utilizar métodos que fazem com que os nanotubos reajam quimicamente, criando defeitos ou adesão molecular covalente (oxidação por ataque de ácidos), denominada como funcionalização covalente. A outra categoria é usar moléculas que são aderidas em sua superfície, sem causar modificações nas ligações químicas e defeitos estruturais nos CNT, como por exemplo, os surfactantes, polímeros sintéticos e biomoléculas, denominada como funcionalização não covalente (TASIS et al., 2006). Neste trabalho foi empregada apenas a funcionalização covalente dos CNT de parede múltiplas, que será discutida no próximo item.

2.2.1.1 Funcionalização covalente

A oxidação dos CNT é o procedimento mais comum no estudo da química de modificação estrutural deste material, mas uma dificuldade inerente a este procedimento é a introdução controlada e de forma distribuída de determinados grupos contendo oxigênio, pois a oxidação pode danificar os nanotubos, resultando em defeitos estruturais, encurtamento de tubos, desaparecimento de nanotubos de diâmetros menores e perda de material (ZHANG et al., 2003).

Os processos de oxidação induzem a abertura das extremidades e a formação de buracos nas paredes laterais dos CNT e como produto final obtêm-se fragmentos de comprimento menor, cujas extremidades e paredes laterais apresentam grupos funcionais oxigenados, principalmente, carbonilas (C=O), ácidos carboxílicos (O-C=O), hidroxilas (C-OH) ou como etapa prévia para funcionalização com outros grupos (Figura 8) (ROSARIO-CASTRO et al., 2009).

Figura 8 - Modelo estrutural dos CNT após a oxidação ácida.



Fonte: Adaptado de (TASIS et al., 2006).

O oxidante mais utilizado para funcionalização é o ácido nítrico e a maioria dos trabalhos na literatura relata grupos carbonílicos e carboxílicos ligados aos CNT. Os métodos de oxidação no emprego de HNO_3 são: Tratamento com uma solução de HNO_3 diluído, normalmente em concentrações molares de $(2-3 \text{ mol.L}^{-1})$ em refluxo com tempo de 16-48 h (RINZLER et al., 1998; ZHANG et al., 2003; ZHANG et al., 2004), tratamento com uma mistura de H_2SO_4 e HNO_3 concentrados (normalmente de 3:1 v/v) em banho de ultrassom de 3-5 h (LIU et al., 1998; ZHAO; SONG; PEHRSSON, 2002; ZHANG et al., 2003; ZHU et al., 2003; ZHAO; HU; HADDON, 2004), métodos empregando solução “piranha” (misturas de H_2SO_4 96% e H_2O_2 30%) (ZIEGLER et al., 2005) também foram relatados, porém com menor frequência do que os procedimentos de ácido nítrico, ozônio

(CAI et al., 2002), H_2O_2 (MIYATA; MANIWA; KATAURA, 2006) e $KMnO_4$ (ZHANG et al., 2003).

2.2.2 Adsorção

As propriedades adsorptivas dos CNT são largamente conhecidas e serão citadas no decorrer desse trabalho. Embora ainda são pouco conhecidas e estudadas as propriedades dos RACNT-BSA. Serão abordados abaixo, conceitos relacionados aos processos de adsorção dos CNT.

Adsorção é um processo físico-químico no qual certos componentes de uma fase fluida (gás ou líquido) são transferidos (adsorvidos) para a superfície de um sólido (adsorvente). O conceito de adsorvente aplica-se, usualmente, a um sólido que mantém o soluto na sua superfície pela ação de forças físicas, e a substância adsorvida é denominada adsorvato. Desta forma acontece a transferência seletiva de componentes da fase fluida para a superfície do sólido (adsorvente), ocorrendo apenas um fenômeno físico de separação, isto é, uma transferência de massa. Quando ocorre o contato entre as duas fases, o soluto (adsorvato) desloca-se por difusão do seio da fase fluida até a interface líquido-sólido devido à diferença de concentração entre a solução e a superfície do adsorvente. Após atingir a superfície, o soluto difunde-se através dos microporos do adsorvente e finalmente é adsorvido pelos sítios ativos. A capacidade de remoção do soluto está relacionada com a área superficial disponível no material e com o tamanho da molécula do adsorvato (MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

Os processos adsorptivos podem ser classificados como adsorção química ou física, dependendo da intensidade de forças envolvidas. A *adsorção física* envolve forças do tipo não covalente, resultado da sobreposição de várias interações. Na *adsorção química*, as forças envolvidas no fenômeno são do tipo covalente, ocorrem entre adsorbato e adsorvente, e os efeitos interativos provocados por essas ligações, envolvendo os sítios ativos e os íons do adsorbato, ocorrem quase sempre na superfície do adsorvente (ADAMSON; GAST, 1967).

Para melhor entender o mecanismo de adsorção constroem-se modelos, no qual se utilizam isotermas de adsorção, onde se tem um adsorvente sólido e um soluto, podendo ser o último um gás ou estar presente em uma solução líquida (DOS REIS

COIMBRA; TEIXEIRA, 2009). Na adsorção de proteínas, alguns modelos de isotermas são mais utilizados. O modelo clássico de Langmuir descreve o equilíbrio da adsorção da maioria dos sistemas, desde que sejam respeitadas como verdadeiras algumas limitações: Adsorção reversível e limitada em apenas uma camada; superfície interna do sólido sendo homogênea; as moléculas adsorvidas não interagem entre si; não existe adsorção competitiva; cada molécula sendo adsorvida em apenas um único sítio de adsorção e os sítios são energeticamente equivalentes (LANGMUIR, 1916). Outras isotermas derivadas teórica ou empiricamente podem, frequentemente, ser representadas por equações simples que relacionam diretamente o volume adsorvido em função da pressão e/ou concentração do adsorvato e as mais utilizadas no estudo da adsorção são as seguintes: Freundlich, Brunauer, Emmett, Teller (B.E.T.), Tóth, Redlich-Peterson, Radke Prausnitz, Sips, entre outras (LIU; LIU, 2008; FOO; HAMEED, 2010; DEBRASSI; LARGURA; RODRIGUES, 2011).

2.2.2.1 Equações de isotermas

Os dados de equilíbrio de sorção de íons de metálicos são comumente correlacionados com as equações de Langmuir ou Freundlich. Muitos pesquisadores explicam que a sorção de íons metálicos nos CNT também pode ser descrita através das equações de Langmuir e Freundlich (LI et al., 2002; LU; LIU, 2006). Segundo Porpino e colaboradores, (PORPINO et al., 2011), a quantidade de íons de metais adsorvidos por unidade de massa do adsorvente pode ser calculada empregando-se a seguinte equação:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{M} \quad (1)$$

Sendo Q_e , a quantidade de íons de metais adsorvidos por unidade de massa do adsorvente; C_0 , a concentração inicial e C_e , a concentração em equilíbrio do soluto que permanece em solução; V , o volume da solução em mL e M , a massa do peso seco do adsorvente.

O percentual da massa de metal adsorvida por massa de adsorvente (% Ads) foi calculado de acordo com a equação (2):

$$\% \text{ Ads} = \frac{(C_0 - C_e) \times 100}{C_0} \quad (2)$$

Isoterma de Langmuir

O modelo estabelecido proposto por Langmuir explica a adsorção sobre uma superfície uniforme, simples, infinita e não porosa. Este modelo baseia-se na hipótese de movimento das moléculas adsorvidas pela superfície do adsorvente, de modo que, à medida que mais moléculas são adsorvidas, há uma distribuição uniforme formando uma monocamada que recobre toda a superfície. Utiliza-se do conceito dinâmico do equilíbrio de adsorção que estabelece a igualdade nas velocidades de adsorção e dessorção. A adsorção é monomolecular, a superfície é energeticamente homogênea e não existe interação entre as partículas adsorvidas (LANGMUIR, 1916).

A expressão da isoterma de Langmuir é representada pela equação (3):

$$Q_e = \frac{(K_L \cdot C_e \cdot Q_m)}{(1 + K_L \cdot C_e)} \quad (3)$$

Onde:, Q_m é a constante de Langmuir que é a capacidade de adsorção teórica na monocamada ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); K_L é está relacionada com a energia de adsorção ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$).

Os parâmetros de adsorção, Q_m e K_L , podem ser determinados transformando a equação de Langmuir para forma linear. A equação (4) representa a regressão da isoterma. Um gráfico poderá ser obtido e a partir do coeficiente angular e linear permitirão determinar a quantidade máxima adsorvida e a constante de equilíbrio. A constante de Langmuir é um indicativo da capacidade máxima de adsorção e da energia de adsorção (LANGMUIR, 1916).

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_m \cdot K_L} + \frac{1}{Q_m} C_e \quad (4)$$

O fator de equilíbrio R_L apresentado na equação (5) pode explicar a forma dos modelos de isoterma propostos por Langmuir e indicam se a adsorção é desfavorável ($R_L > 1$), favorável ($0 < R_L < 1$), linear ($R_L = 1$) e irreversível ($R_L = 0$) (PORPINO et al., 2011).

$$R_L = \frac{1}{(1 + K_L \cdot Q_m)} \quad (5)$$

Isoterma de Freundlich

O modelo de isoterma de Freundlich baseia-se na sorção sobre uma superfície heterogênea e assume a existência de uma estrutura em multicamadas, prevendo uma distribuição exponencial de vários sítios de adsorção com energias diferentes. O modelo de Freundlich pode ser explicado pela equação (6):

$$Q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (6)$$

Onde: Q_e é a quantidade de íons de metais adsorvidos por unidade de massa do adsorvente, K_f e n são constantes experimentais. K_f indica a capacidade de adsorção do adsorvente, n indica o efeito da concentração na capacidade de adsorção e representa a intensidade da adsorção.

Representando de forma linear a equação (6), pode ser representada com:

$$\ln Q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (7)$$

O gráfico de $\ln Q_e$ em função de $\ln C_e$ é uma reta com coeficiente linear igual a $\ln K_f$ e inclinação igual a $1/n$. Valores compreendidos entre $1 < n < 10$ indicam o favorecimento da adsorção (AMUDA; GIWA; BELLO, 2007).

2.2.3 Adsorção de metais em CNT

Dentre as diferentes aplicações dos CNT, destacam-se a extração de íons metálicos em distintas matrizes complexas como: amostras ambientais (água de torneira, residuais, mananciais, águas costeiras, sedimentos) e biológicas (cabelo humano, urina, fígado bovino, peixes, entre outras) (HERRERA-HERRERA et al., 2012). A Tabela 3

apresenta um resumo dos diferentes métodos analíticos utilizados empregando os CNT como reagentes sólidos na separação e/ou pré-concentração de metais.

Tabela 3 - Aplicações recentes de CNT como adsorventes sólidos na extração/pré-concentração de metais em diferentes matrizes.

ANALITO	MATRIZ	TIPO DE CNTs/ CARACTERÍSTICAS	METODOLOGIA	LODs	REF.
Cd (II), Pb (II)	CRM (cabelo humano), água de rio e de reservatório	MnO ₂ -WCNT o.d.: -	ETAAS	0.15 e 0.44 µg.L ⁻¹	40
Co (II), Cu (II), Ni (II), Pb (II), Fe (III), Mn (II)	CRM (sedimento de rio)	DWCNT o.d.: 5 nm	FAAS	0.5 e 6.9 µg.L ⁻¹	43
Cu (II), Pb (II), Fe (III)	Água de rio	PIDA-MWCNT Diâmetro: 8 nm	ICP-OES	0.15 e 0.26 µg.L ⁻¹	45
Cu (II), Cd (II), Pb (II), Zn (II), Ni (II) e Co (II) complexo de ditiocarbamato pirrolidina	Água de torneira, água do mar, molho de tomate, conservas de peixe e grão de bico	MWCNT: o.d.: 30-50 nm, i.d.: 5-15 nm, comprimento: 0.5-200 µm	FAAS	0.30 e 0.60 µg.L ⁻¹	54
Co (II), Cd (II), Pb (II), Mn (II), Cr (II) e Ni (II)	Folhas de tomate, fígado bovino, trigo cozido, chá preto, líquen, água de fonte e de torneira	MWCNT: o.d.: 30-50 nm, i.d.: 5 -15 nm, comprimento: 0,5-200 µm	FAAS	0.24 e 2.60 µg.L ⁻¹	55
Cd (II)	Urina	MWCNT: o.d.: 10 - 20 nm	ETA-AAS	0.010 e 1.03 µg.L ⁻¹	74
Cr (IV)	Solos agrícolas, flores ornamentais	MWCNT, MWCNT-o, MWCNT-NH ₂ , i.d.: ~10 nm	UV	98 e 1028.5 µg.Kg ⁻¹	89

Fonte: Adaptado de (HERRERA-HERRERA et al., 2012).

2.2.3.1 Mecanismo de adsorção

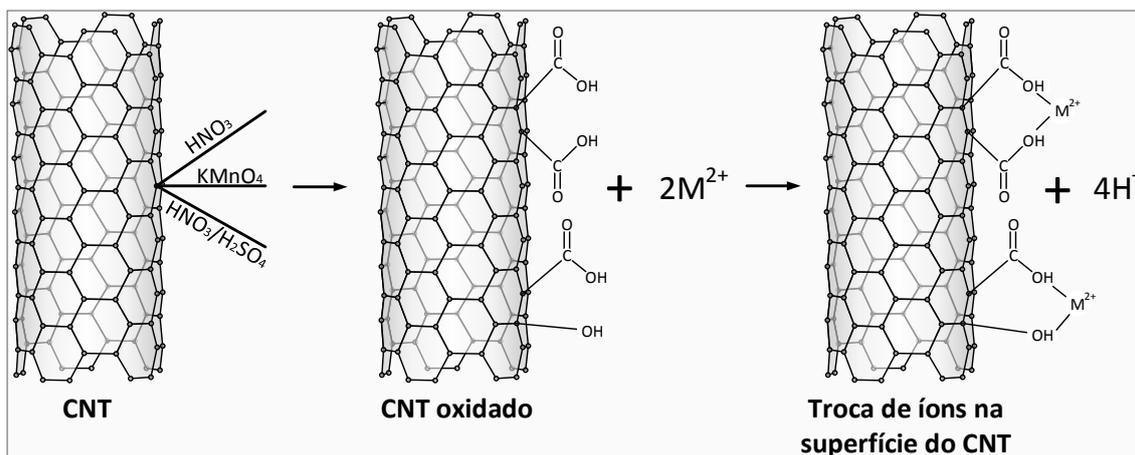
A adsorção de íons metálicos na superfície dos CNT aumenta significativamente após processos de oxidação no emprego de soluções ácidas (HNO₃, H₂SO₄, KMnO₄ ou misturas de HNO₃ / H₂SO₄), pois as extremidades dos CNT sofrem aberturas e rupturas após o processo de oxidação. Portanto, após o processo de oxidação há uma melhora na

sua dispersividade devido uma grande quantidade de grupos funcionais oxigenados na superfície dos CNT (SHIM; PARK; RYU, 2001; SRIVASTAVA, 2013).

Estes grupos são responsáveis por um aumento na carga negativa na superfície dos CNT e os átomos de oxigênio doam o par de elétrons livres para os íons metálicos, consequentemente, aumentando a sua capacidade de troca catiônica. A capacidade de adsorção de íons metálicos nos CNT depende fortemente da acidez superficial (RAO; LU; SU, 2007). A troca de prótons entre os grupos funcionais da superfície dos CNT e os íons metálicos pode ser explicado pelas interações químicas entre ambos (Figura 9).

Os principais mecanismos de adsorção dos íons metálicos sobre CNT são: atração eletrostática e interação química entre os íons do metal e os grupos funcionais de superfície do CNT.

Figura 9 - Esquema do mecanismo de sorção de íons metálicos divalentes na superfície dos CNT.



Fonte: Adaptado de (RAO; LU; SU, 2007).

2.2.4 Adsorção de proteínas em CNT

Ambos os SWCNT e MWCNT têm aplicações potenciais no desenvolvimento de novos tipos de dispositivos biológicos em miniaturas, incluindo sondas e sensores. Para se alcançar este objetivo, há a necessidade da imobilização de moléculas bioativas na superfície dos CNT através de ligações covalentes ou não covalentes (GUO et al., 2004).

Nos últimos anos a funcionalização de CNT com proteínas pode ser usada para introduzir os CNT em outros sistemas biológicos importantes. Nessa perspectiva, pesquisadores desenvolveram um trabalho sobre a aplicação de nanotubos

funcionalizados com diversos tipos de moléculas, entre as quais a proteína BSA, e perceberam que a funcionalização dos nanotubos pode permitir uma maior aplicação deste (SUN et al., 2002). Novos estudos foram realizados na tentativa de se descobrir proteínas que fossem capazes de dispensar melhor os nanotubos ou formar bionanocomplexo aplicáveis. Entre as proteínas imobilizadas destaca-se a ferritina (JIANG et al., 2004), a BSA (JIANG et al., 2004), a hemoglobina (JIA et al., 2005) e a HSA (SHEN et al., 2008).

Em 2011, pesquisadores, estudaram a adsorção da proteína BSA em CNT funcionalizados (CNT f) com amino-ciclodextrina e os difratogramas mostraram que a BSA adsorvida nos CNT f, possuía sua forma cristalina alterada. Os resultados por difratismo circular (CD) indicaram que a mudança da estrutura secundária da BSA foi causada principalmente pela interação hidrofóbica dos resíduos de BSA com as paredes dos CNT f. O aumento da dispersividade dos CNT f em água, facilitou a adsorção de BSA nos CNT f (FENG; JI, 2011).

Para entender as interações entre proteínas de HSA e SWCNT, pesquisadores utilizaram técnicas experimentais e teóricas, como microscopia de força atômica, CD e simulações de dinâmica molecular. As interações entre os SWCNT e os resíduos aromáticos (Trp, Phe, Tyr) da HSA foram de extrema importância na determinação da capacidade adsorptiva dos CNT. Os ensaios de citotoxicidade em células monolíticas e endoteliais da veia umbilical revelaram que as interações entre as proteínas do sangue e a superfície dos CNT modificaram e a diminuição da citotoxicidade dos CNT revestidos com proteínas (GE et al., 2011).

Em 2014, realizou-se um estudo de comparação sobre mecanismo de interação de duas proteínas solúveis em água, BSA e lisozima (LYS), com os MWCNT puros e funcionalizados, conseqüentemente realizaram-se estudos de adsorção antes e após o processo de modificação química da superfície dos CNT. O efeito da modificação química resultou em CNT carboxilados e elevada adsorção de proteínas às superfícies dos mesmos. Os pesquisadores propuseram que a elevada capacidade de adsorção estava relacionada com base na estrutura primária de BSA e LYS e a predominância de interações hidrofóbicas, ou seja, interação iônica entre proteínas e os MWCNT (TAKADA et al., 2014).

DU e colaboradores estudaram às mudanças conformacionais responsáveis pelas estruturas secundárias da BSA e LYZ na superfície dos CNT funcionalizados, efeitos dos grupos funcionais sobre os CNT, fornecendo uma melhor compreensão do mecanismo de

adsorção das proteínas nos CNT funcionalizados e informações úteis para a aplicação biomédica destes (DU et al., 2014).

A Tabela 4 apresenta um resumo de algumas aplicações dos CNT modificados ou puros na bioconjugação com diferentes proteínas.

Tabela 4 - Algumas aplicações de CNT bioconjugado com proteínas.

PROTEÍNA	NANOMATERIAL	APLICAÇÃO	REF.
B-Glucosidase	MWCNT-COOH	Biocatálise	163
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	MWCNT ou MWCNT-COOH	Biocatálise	164
Peroxidase de Rábano silvestre	SWCNT/Eletrodo de carbono modificado (GCE) com chitosana	Sensor bioeletroquímico	165
<i>Trameter hirsuta</i> de Lacase	MWCNT/(GCE) modificado	Célula bicombustível	166
Peroxidase, Mioglobina e Citocromo C	SWCNT/GCE modificado com líquido iônico	Célula bicombustível e biossensores	167
<i>Cerrena unicolor</i> de Lacase	CNT/modificado com eletrodo de diamante dopado com borano	Célula bicombustível e biossensores	168
Desidrogenase alcoólica	SWCNT/GCE modificado poly(cloreto de dimethildialilamonio) (PDDA)	Biossensor de etanol	169
Oxidase glucose, peroxidase	SWCNT/GCE modificado com sílica GCE	Biossensor de glucose	170
	MWCNT/GCE modificado com azul de toluidina/nafton	Biossensor de glucose	171
Citocromo C	MWCNT/GCE modificado com poly(amidoamina)/chitosana	Detecção de H ₂ O ₂	172
Peroxidase	MWCNT/GCE modificado Com chitosana/sol gel	Detecção de H ₂ O ₂	173
Citocromo C	MWCNT/GCE modificado com poly(amidoamina)/chitosana	Biossensor de nitrito	174
Hemoglobina de <i>Trametes versicolor</i>	MWCNT/chitosana	Biossensor de oxigênio e célula biocombustível	175

Fonte: Adaptado de (SAIFUDDIN; RAZIAH; JUNIZAH, 2012).

2.3 MATERIAIS DE ACESSO RESTRITO (RAM)

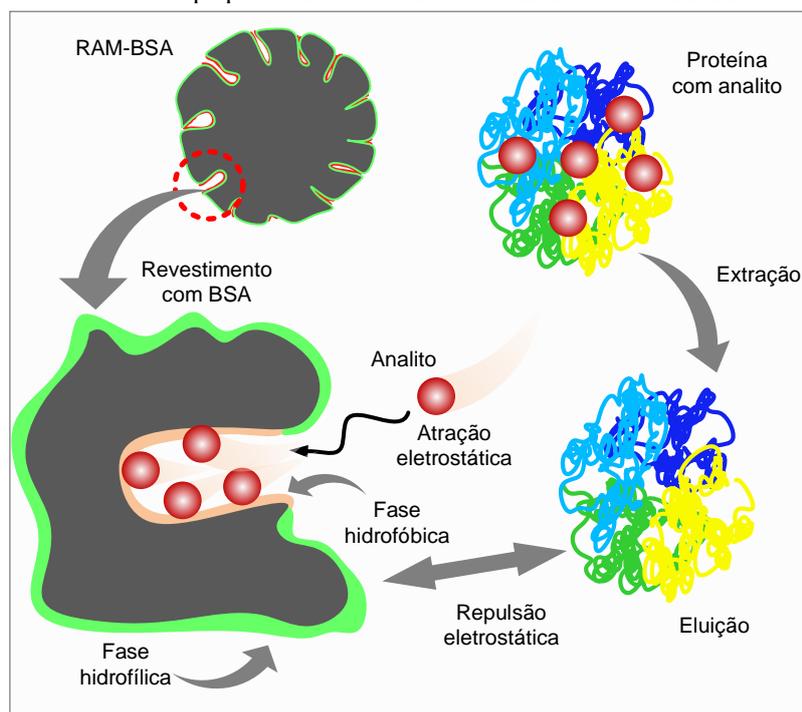
A expressão “meio de acesso restrito” (do inglês, *restricted access media* -RAM) foi introduzida por Desilets *et al.* em 1991, como termo geral para suportes cromatográficos que permitem a injeção direta de fluidos biológicos e limitam a interação dentro dos poros apenas para moléculas pequenas (DESILETS; ROUNDS; REGNIER, 1991). O uso das colunas RAM e as classificações de diversos suportes já foram revisados há alguns anos (SOVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004) e, bem recentemente, elas têm crescido em interesse com algumas novas revisões (MULLETT, 2007; SADÍLEK; ŠATÍNSKÝ; SOLICH, 2007).

Para o estudo de matrizes biológicas, as colunas RAM têm se mostrado uma boa alternativa, pois são capazes de excluir macromoléculas, como as proteínas, retendo apenas as moléculas de menor peso molecular. Em colunas do tipo RAM, a superfície externa da sílica é coberta por uma rede hidrofílica, enquanto dentro dos poros atuam as interações hidrofóbicas, iônicas ou de afinidade. Devido ao tamanho desses poros, apenas pequenas moléculas são capazes de acessar o interior dos mesmos, já que uma barreira de difusão física impede que as macromoléculas consigam adentrar nesses poros. Quando a amostra é injetada em colunas deste tipo, ocorre também uma barreira de difusão química que é responsável não só pela retenção das pequenas moléculas, mas também pela não adsorção das macromoléculas. Assim, as fases estacionárias do tipo RAM combinam os princípios de Cromatografia de Exclusão e da Cromatografia de Fase Reversa ou de Troca Iônica (SOVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

Lima *et al.*, 2006, relataram o procedimento de preparo de colunas RAM proteína-imobilizada do tipo albumina sérica bovina (RAM-BSA, do inglês *Restricted Access Media – Bovine Serum Albumin*). Neste estudo, foram preparadas e avaliadas quanto à capacidade de exclusão das proteínas do plasma e de retenção para uma série de fármacos ácidos, básicos e neutros (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

Na Figura 10 é mostrada uma representação esquemática para fases RAM. Mais especificamente, para o caso das proteínas immobilizadas do tipo BSA e um esquema simplificado do mecanismo de exclusão proteica.

Figura 10 - Esquema representando a exclusão de proteínas e retenção das pequenas moléculas nas fases hidrofóbicas RAM-BSA.



Fonte: Adaptado de (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

As colunas RAM-BSA têm como principais vantagens: facilidade para automatização, grande número de análises por tempo, possibilidade de injeção direta e repetida da amostra não tratada. As possibilidades de aplicação de colunas RAM não se restringem apenas às análises de fármacos em biofluidos, podendo, por exemplo, serem empregadas em estudos de águas (BARREIRO et al., 2010), análises de alimentos (CHICO et al., 2008) e na configuração simples ou acopladas à uma coluna analítica, funcionando como uma pré-coluna (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

Devido as importantes aplicações dos materiais RAM, a Tabela 5, apresenta resumidamente algumas aplicações na determinação de analitos orgânicos em matrizes complexas (Sangue e plasma humano, urina, água, alimentos, etc).

Tabela 5 - Algumas aplicações recentes de RAM para determinação direta de analitos orgânicos em amostras biológicas.

APLICAÇÃO	MATRIZ	ANALITOS	MATERIAL	REF.
Análise de fármacos e substância biologicamente ativas em fluidos biológicos	Sangue humano	Benzodiazepinas	LiChrospher RP-18 ADS (25 x 4 mm), Particle size 25 µm, Merck, LiChrospher 60 XDS (25 µm x 4 mm), 25 µm, Merck	66
	Plasma humano	Acetato de ciproterona	LiChrospher RP-4 ADS (25 x 2 mm), 25 µm, Merck	67
	Urina humana	Verapamil e metabolitos	LiChrospher RP - 8 ADS (25 x 4mm), 25 µm, Merck	68
Análise de alimentos	Frutas	Pesticidas	Hisep SHP (50 - 4,6 mm), 5 mm	88
	Leite	Poliaminas	LiChrosorb C18 (50 - 4,6 mm), 10 µm, Agilent	91
Monitoramento ambiental	Água potável, rio e sedimentos	Hormônios, esteróides	LiChrosorb RP - 4, RP - 8; ADS (25 x 4 mm), 25 µm, Merck	87

Fonte: Adaptado de (SADÍLEK; ŠATÍNSKÝ; SOLICH, 2007).

2.4 NANOTUBOS DE CARBONO DE ACESSO RESTRITO À LIGAÇÃO COM MACROMOLÉCULAS POR MEIO DE RECOBRIMENTO COM ALBUMINA (RACNT-BSA)

Os CNT são amplamente empregados em processos sortivos, para extração em fase sólida de diversos analitos e como recheio de colunas cromatográficas. Porém, todas as aplicações são restritas a soluções aquosas. Quando os analitos encontram-se em meios com alta concentração de macromoléculas (*e.g.* sangue total, plasma, soro, amostras de alimentos e etc.), o material não apresenta seletividade e retém grande quantidade de proteínas em sua superfície externa, causando perda de seletividade, diminuição de sua vida útil e risco de degradação de colunas analíticas.

Na síntese do RACNT-BSA desenvolvido por Barbosa e colaboradores, os CNT de paredes simples ou múltiplas podem ser recobertos diretamente ou após uma reação de funcionalização. Os CNT não modificados apresentam características apolares e são empregados principalmente para extração/pré-concentração de compostos orgânicos.

Os RACNT-BSA têm potencial para ampla utilização e comercialização em indústrias e laboratórios que trabalham com análises de metais e compostos orgânicos em

fluidos biológicos, podendo ser acondicionados em qualquer sistema de extração que utilize sorventes sólidos, com a grande vantagem de ser possível a injeção direta de fluidos proteicos sem qualquer etapa prévia de desproteinização (BARBOSA et al., 2015).

Ainda existem muitos fatos a serem elucidados sobre este material. Por exemplo: mecanismo de interação entre os CNT e a BSA; entre os RACNT-BSA e as macromoléculas; entre o material e íons metálicos, etc.

3 OBJETIVOS

Os objetivos são divididos em objetivo geral e específicos:

3.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve por objetivo o estudo e obtenção dos RACNT-BSA e, como aplicação, a obtenção de apoproteínas a partir da extração de íons Fe da catalase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Preparo dos RACNT-BSA com comparação entre dois processos de oxidação dos CNT, o primeiro com HNO_3 2,6 mol. L^{-1} e o segundo com HNO_3 65% (v / v), aproximadamente 14,44 mol. L^{-1} ;
- b) Caracterizar os materiais obtidos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG/DTG), análise elementar (CHN), Difração de raio X de pó (DRX) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- c) Estudo da influência do pH na exclusão de proteínas BSA percoladas pelos RACNT-BSA, empregando Espectroscopia de absorção óptica na região do ultravioleta-visível (UV - Vis), método de Bradford (MARION, 1976).
- d) Determinação do ponto isoelétrico (pI) das amostras por titulação potenciométrica;
- e) Estudos de adsorção (cinética de adsorção e modelos de isoterms) dos RACNT-BSA para íons Fe;
- f) Avaliar o desempenho do RACNT-BSA em termos de seletividade, separação, capacidade de eliminação de macromoléculas e determinação de ferro em catalase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir a metodologia utilizada neste trabalho é apresentada. O material de partida, reagentes e soluções e a metodologia experimental detalhada.

4.1 MATERIAL DE PARTIDA

Os CNT utilizados foram os de paredes múltiplas, adquiridos da Sigma-Aldrich®. Foram produzidos pelo método de Deposição Termoquímica de Vapor e pureza mínima de 95% em massa, diâmetro da parede exterior na faixa de 6 a 9 nm e comprimento de 5 μm .

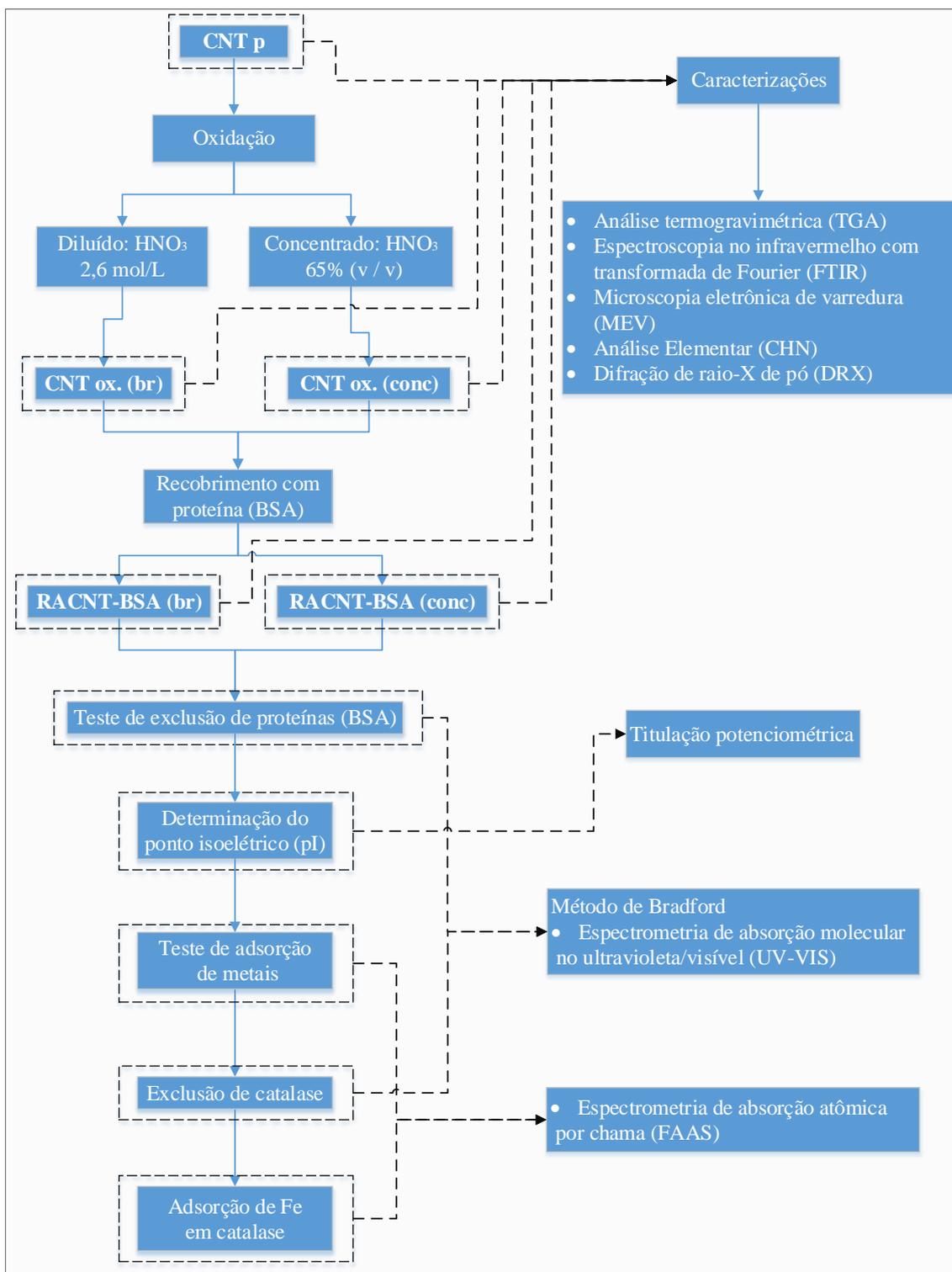
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes, ácido nítrico 65% (v/v), ácido acético glacial P.A, ácido fosfórico P.A, fosfato de sódio bibásico anidro PA, TRIS-HCl, foram utilizados para o preparo do tampão; BSA cristalina, catalase, glutaraldeído e borohidreto de sódio (todos da Sigma-Aldrich) foram usados para a funcionalização e revestimento dos CNT. Ácido clorídrico, hidróxido de sódio, carbonato de sódio e biftalato de potássio, foram utilizados no preparo e padronização das soluções empregadas na titulação potenciométrica. Os padrões utilizados no trabalho foram preparados a partir da diluição de uma solução padrão estoque de Ferro, Cádmio e Chumbo (1000 mg. L^{-1}) (todos da Sigma-Aldrich®).

4.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Como este trabalho se constituiu de várias etapas experimentais, apresenta-se a seguir na Figura 11 um fluxograma experimental geral.

Figura 11 - Fluxograma geral da metodologia empregada neste trabalho.

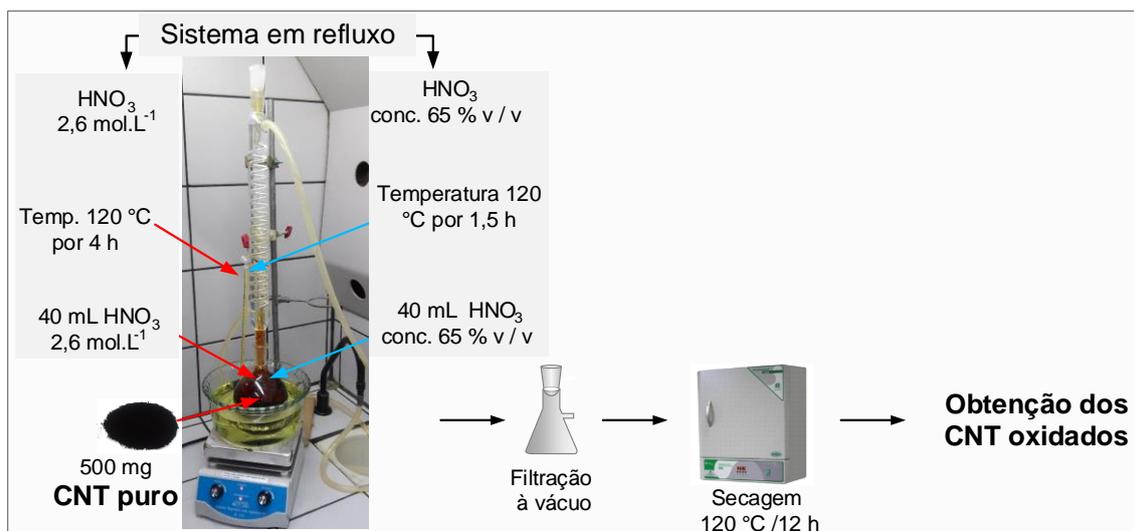


Fonte: Do autor.

4.3.1 Funcionalização dos CNT

A sequência de funcionalização pode ser esquematizada da seguinte forma, conforme a Figura 12:

Figura 12 - Sequência das etapas de funcionalização do CNT p.



Fonte: Do autor.

Foram utilizados dois procedimentos de funcionalização. O primeiro foi adaptado de (TCHOUL et al., 2007), como segue:

Para a funcionalização com HNO₃ 2,6 mol. L⁻¹, transferiram-se 500 mg dos CNT puro (CNT p) para um balão de fundo redondo preenchido com 40 mL do ácido, em seguida montou-se o sistema em refluxo, sob agitação magnética à temperatura de 120° C por 4 h. Em seguida, filtrou-se os nanotubos em membrana de PTFE com poros de 0,45 μm de diâmetro. Depois da filtração, as amostras foram lavadas com água destilada até pH neutro e, em seguida, com 10 mL de metanol e 10 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). Por fim, os CNT oxidados (CNT ox. (br)) foram vertidos em um balão de fundo redondo contendo 40 mL de DMF e deixado a mistura em banho ultrassônico (Cole Parmer -135 W, 4 KHz) por 1 h. Finalmente, secou-se o material a 120° C por 12 h.

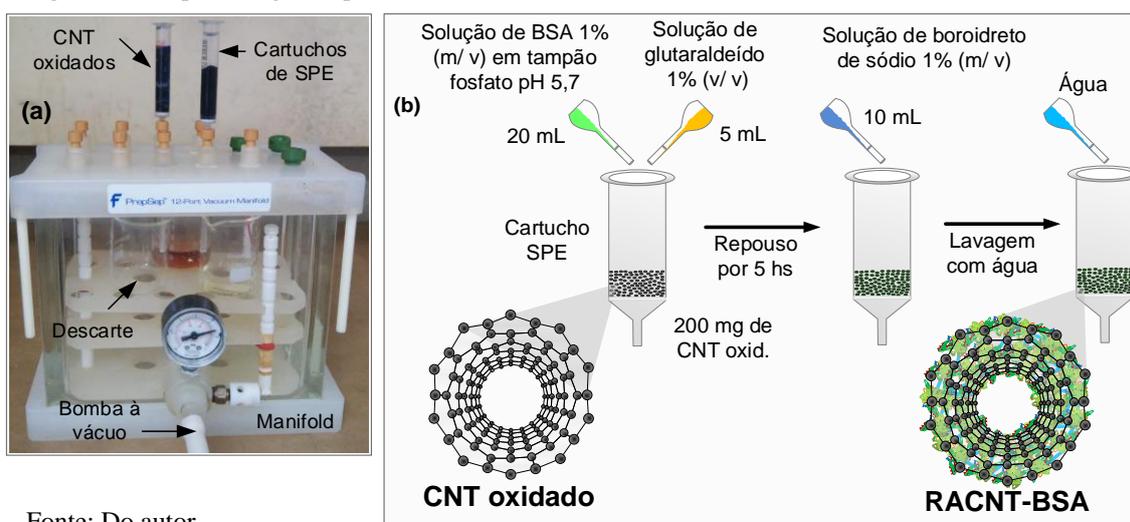
Para o procedimento de funcionalização com HNO₃ 65% (v / v), adaptado de (JIA et al., 1999). Transferiram-se 500 mg de CNT p para um balão de fundo redondo preenchido com 30 mL de ácido nítrico, em seguida, montou-se o sistema em refluxo,

sob agitação magnética à temperatura de 120° C por 90 min. Na segunda etapa, os CNT ox. (conc) foram filtrados em membrana de PTFE com poros de 0,45 µm de diâmetro. Depois da filtragem, lavou-se a amostra com água destilada até pH neutro e, em seguida, o material foi secado em estufa a 120° C por 12 h.

4.3.2 Recobrimento dos CNT funcionalizados com BSA (RACNT-BSA)

Os CNT funcionalizados (de ambos os processos descritos no item anterior) foram recobertos com BSA, segundo a metodologia descrita por (BARBOSA et al., 2015), sendo importante enfatizar que qualquer outro tipo de CNT funcionalizado pode ser submetido a esse processo de recobrimento.

Figura 13 - Representação esquemática do recobrimento dos CNT funcionalizados.



Fonte: Do autor.

Nota: Em (a) Foto da montagem utilizada empregando o Manifold e (b) Esquema geral do recobrimento com BSA.

De acordo com esquema representativo (Figura 13), percolou-se sequencialmente, 20 mL de solução de BSA 1% (m/v) em tampão fosfato 50 mmol. L⁻¹ (pH = 5,7) e 5 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído 1% (v / v) em um cartucho de SPE contendo 200 mg do CNT ox. Nessa etapa, o glutaraldeído, agente reticulante bifuncional, estabeleceu interligações entre os grupamentos amina das cadeias proteicas, fixando a camada de BSA ao redor do CNT ox. Transcorrido um período de 5 h, adicionou-se 10 mL de uma solução aquosa de borohidreto de sódio de 1% (m / v), percolados pelo cartucho com a finalidade

de reduzir as iminas (originadas da reação anterior) a aminas, que são grupamentos mais estáveis quimicamente, conferindo assim estabilidade química ao material. Finalmente o RACNT-BSA foi lavado em abundância com água para a retirada dos reagentes remanescentes do processo de recobrimento.

4.3.3 Intercruzamento da BSA com glutaraldeído

Para a obtenção da BSA intercruzada (BSA int) utilizou-se a mesma proporção de reagentes utilizadas no recobrimento dos CNT ox., porém sem a presença dos mesmos.

Para melhor entendimento, a nomenclatura dos materiais sintetizados e estudados, seguindo da metodologia anteriormente, estão apresentados na Tabela 6:

Tabela 6 - Tabela representando a descrição dos materiais e siglas.

Descrição dos materiais	Sigla
CNT puro	CNT p
CNT p oxidado com HNO ₃ 2,6 mol.L ⁻¹	CNT ox. (br)
CNT p oxidado com HNO ₃ 65% (v / v)	CNT ox. (conc.)
CNT ox. (br) revestido com BSA intercruzada	RACNT-BSA (br)
CNT ox. (conc.) revestido com BSA intercruzada	RACNT-BSA (conc.)
BSA pura	BSA
BSA intercruzada com glutaraldeído	BSA int.

Fonte: Do autor.

4.3.4 Técnicas para caracterizações

Após a preparação dos RACNT-BSA descritos acima, passou-se à caracterização dos mesmos, utilizando as técnicas a seguir:

4.3.4.1 Análise termogravimétrica

As medidas de termogravimetria (TG) foram realizadas em um equipamento de análises simultâneas TG/DTA, (DTA, do inglês *differential thermal analysis*), modelo TG/DTA7300 da SII Nanotechnology Inc.. Amostras de aproximadamente 4 mg foram analisadas seguindo o protocolo: taxa de aquecimento de $10^{\circ} \text{C. min}^{-1}$ em uma faixa de temperatura de 40 a 1300°C e sob atmosfera de ar sintético e inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL. min^{-1} em suporte de amostra de alumina. As medidas foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas de Fármacos, localizado na Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

4.3.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Para a obtenção dos espectros com espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), utilizou-se um espectrofotômetro marca IRPrestige-21, modelo FTIR-8400S Shimadzu, na região de 4000 a 750 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} , adquiridos com 64 acumulações e empregando uma mistura mássica de KBr com concentração de amostra de 1% m / m. As medidas foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Química - LabiQ, localizado na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG.

4.3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias foram realizadas por um Microscópio eletrônico de varredura LEO 1450 VP Trademark LEO Co. Ltd. A amostra foi colocada sobre a superfície do *stub* coberta com fita de carbono dupla face, sem necessidade de cobertura por ouro. As análises foram realizadas na EEL-USP (Escola de Engenharia de Lorena- Universidade de São Paulo).

4.3.4.4 Análise Elementar

As análises elementares (CHN) foram realizadas em um analisador elementar Leco Truspec, que detecta Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio, modelo CHN628. Utilizaram-se 2 mg de amostra e as análises foram realizadas em triplicata. As medidas foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Química – LabiQ, localizado na Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG.

4.3.4.5 Difração de raio-X de pó (DRX)

Os difratogramas de raios-X de pó foram obtidos utilizando-se o equipamento Rigaku, modelo Última IV, com CuK, $\alpha = 1,54051 \text{ \AA}$ entre o intervalo (2θ): $10 - 80^\circ$ com velocidade de varredura igual a $4^\circ \cdot \text{min}^{-1}$. As medidas foram realizadas no Laboratório de Cristalografia, localizado na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG.

4.4 Avaliação da exclusão de proteínas BSA percoladas pelos RACNT-BSA em relação ao pH

Para avaliar a exclusão de BSA dos RACNT-BSA em função do pH, utilizou-se o reagente de Bradford.

4.4.1 Preparo da solução de BSA e reagente de Bradford

Para a avaliação da exclusão de proteínas BSA percoladas pelos RACNT-BSA em relação ao pH, preparou-se soluções de BSA com concentração aproximada de $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em tampão fosfato (50 mM) no intervalo de pH de 2,2 a 7,0.

Baseando-se no procedimento de Bradford (MARION, 1976), foram pesados 50,0 mg do corante azul brilhante “*Comassie Brilhante Blue*” e dissolvidos em 12,5 mL de etanol 95%. Posteriormente, 50,0 mL de ácido fosfórico (85 % P.A.) foram adicionados, sob constante agitação. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água. A solução do reagente foi filtrada e estocada em frasco de vidro âmbar e guardada em geladeira (4° C).

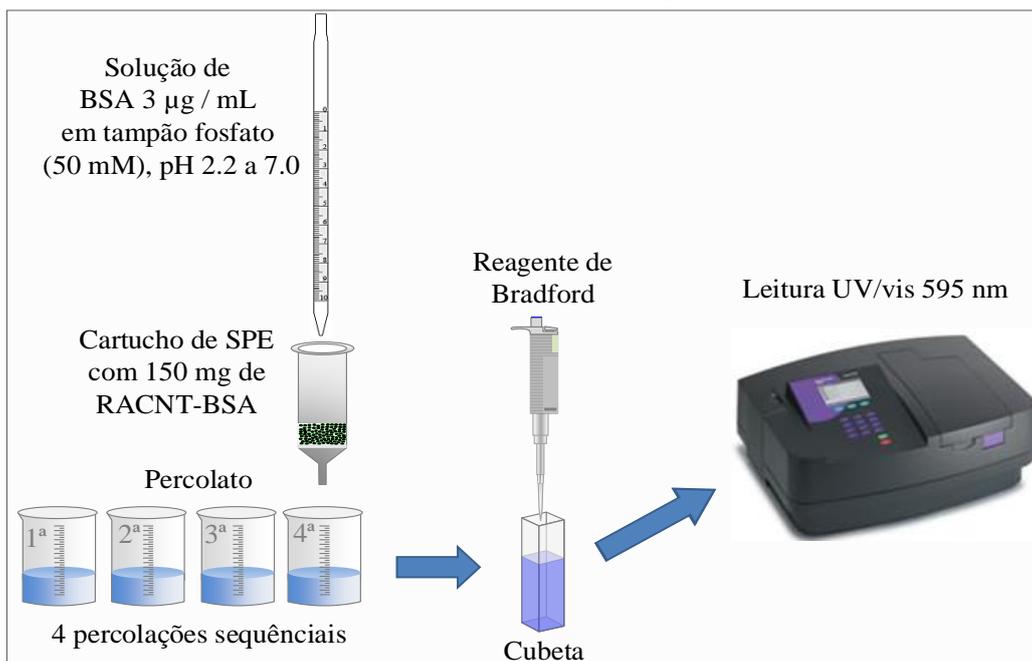
A concentração proteica (BSA) foi expressa utilizando a albumina de soro bovino como padrão. Para isso, foi feita a curva analítica de calibração na faixa de concentração entre 1 a 6 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, com o mesmo tampão usado nas diluições das amostras ou com água deionizada.

Para as medidas espectrofotométricas, pipetaram-se, em cubetas de plástico, 100 μL de solução de BSA diluído apropriadamente. Em seguida, foram adicionados 900 μL da solução denominada reagente de Bradford, esperou-se o tempo reacional de 3 min e realizaram-se as medidas de absorbância.

4.4.2 Influência do pH na exclusão de BSA dos RACNT-BSA

Para avaliar a influência do pH no recobrimento dos RACNT-BSA br. e conc., preparam-se soluções de BSA com concentração aproximada de 3 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em tampão fosfato (50 mM) no intervalo de pH de 2,2 a 7,0. Em seguida, foram realizadas quatro percolações sucessivas das soluções de BSA em cartuchos de extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction* SPE) (Chromabond® de polipropileno, C18), preenchidos com 150 mg de RACNT-BSA. Os percolados foram recolhidos e as concentrações de proteínas foram determinadas espectrofotometricamente, em triplicatas, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis (Biochrom, modelo S22) no comprimento de onda de 595 nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína-corante, empregando o método de Bradford (MARION, 1976). As concentrações de BSA foram determinadas nas soluções antes e após cada percolação (Vide Figura 14).

Figura 14 - Medidas espectrofotométricas antes e depois das percolações.



Fonte: Do autor.

Após as percolações das soluções de BSA, escolheu-se o cartucho cuja solução de BSA tinha $\text{pH} = 3,0$ (distante do valor de pI da BSA), para se verificar se após estas sucessivas percolações ocorreria o desprendimento de BSA dos RACNT-BSA ao lavá-los com água. Esse cartucho com RACNT-BSA sofreu 4 lavagens sucessivas com água destilada, as quais foram recolhidas e suas concentrações de BSA determinadas também pelo método de Bradford.

4.5 Determinação do Ponto Isoelétrico (pI) dos materiais

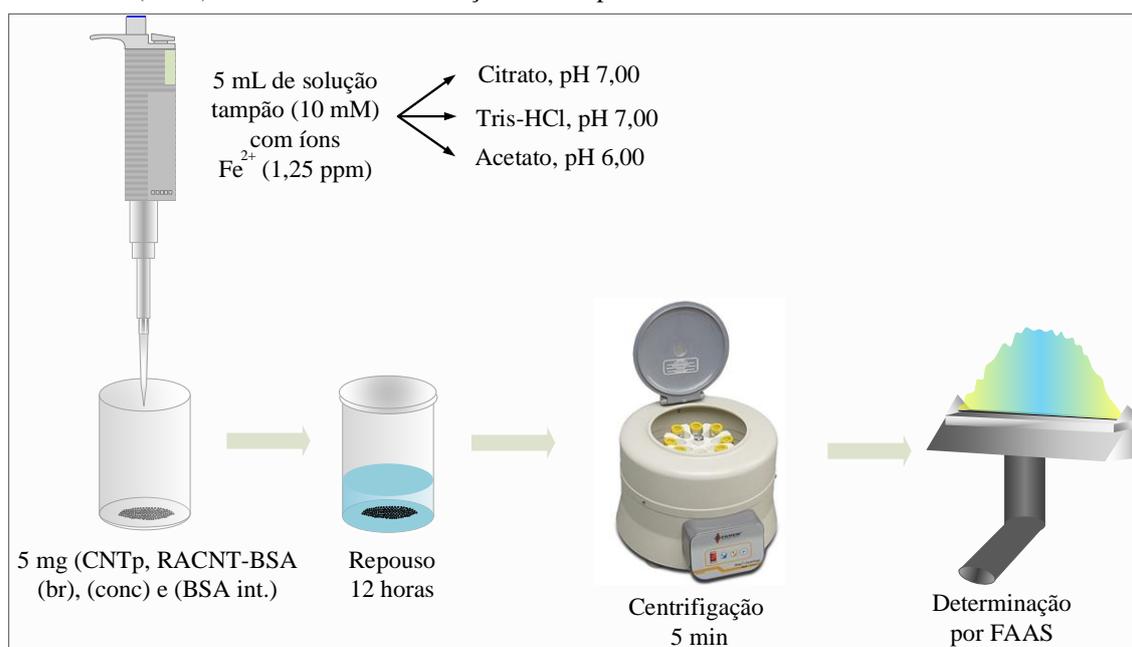
Os pI dos materiais foram determinados por titulação potenciométrica, adicionando (~ 15 mg) de material em um erlenmeyer contendo 20,00 mL de água deionizada. Cada material foi titulado utilizando uma bureta de 50,00 mL. A solução de HCl 0,1 mol. L^{-1} foi padronizada com Na_2CO_3 como padrão primário e a solução de NaOH 0,01 mol. L^{-1} foi padronizada com o sal de biftalato de potássio. Os valores de pH foram medidos, utilizando o pHmetro (MS Tecnopon Instrumentação, modelo mPA210), a cada volume adicionado do agente titulante. A segunda inflexão da curva

potenciométrica ácido-base dos materiais titulados, indicou o pH sendo igual ao pI dos materiais, o qual foi determinado a partir da segunda derivada das curvas obtidas.

4.6 Otimização de tampões empregados

Empregaram-se três soluções tampão: citrato e tris - HCl (pH 7,0) e acetato (pH 6,0), todos com concentração 0,010 mol. L⁻¹, de acordo com o esquema ilustrado na Figura 15, para avaliar a adsorção de íons ferro. Primeiramente pesaram-se 5 mg de material adsorvente CNT p, RACNT-BSA (br.) e RACNT-BSA (conc.) e 1 mg de BSA int.. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de solução tampão com concentração 1,25 mg. L⁻¹ de íons ferro preparados a partir do padrão 1000 ppm, ressaltando que o experimento foi realizado em triplicata. Em seguida, as soluções tampão com íons ferro ficaram em contato com os materiais em repouso durante 12 h, para avaliar a possível adsorção. Após o tempo decorrido, as soluções foram centrifugadas e imediatamente determinadas por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS, do inglês *Flame atomic Absorption Spectrometry*).

Figura 15 - Esquema da adsorção de ferro nos materiais, CNT p, RACNT-BSA (br.), RACNT-BSA (conc.) e BSA int. com otimização dos tampões.



Fonte: Do autor.

4.7 Estudo de adsorção de metais

Após a escolha do tampão adequado para o experimento, avaliou-se a adsorção de outros metais (chumbo e cádmio), seguindo o mesmo procedimento da Figura 15, porém, acrescentou separadamente 5 mL de solução tampão acetato com concentração 1,25 mg. L⁻¹ de íons metálicos (Fe²⁺, Pb²⁺ e Cd²⁺) nos materiais.

4.7.1 Cinética de adsorção

Foram pesados, analiticamente, para os experimentos de cinética de adsorção de Ferro, 5 mg dos materiais: CNT p, RACNT-BSA (br.), RACNT-BSA (conc.) e BSA int. Em seguida, adicionou-se 5 mL de solução padrão de Ferro com concentração inicial de 10 mg. L⁻¹. Em seguida, as soluções foram colocadas sob agitação constante utilizando uma mesa LABOR à temperatura ambiente. Após o tempo decorrido, as soluções foram centrifugadas e imediatamente determinadas por FAAS.

4.8 Avaliação da exclusão da catalase

Para avaliar a exclusão de catalase do RACNT-BSA (br), preparam-se soluções de catalase com concentração aproximada de 3 µg.mL⁻¹ em tampão acetato em pH 6,0 e tampão TRIS-HCl, ambos com 50 mM). Em seguida, foram realizadas 4 percolações sucessivas das soluções de catalase em cartuchos de extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction* SPE) (Chromabond® de polipropileno, C18), preenchidos com 15 mg de RACNT-BSA (br.). Os percolados foram recolhidos e as concentrações de proteínas foram determinadas espectrofotometricamente, em triplicatas, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis (Biochrom, modelo S22) no comprimento de onda de 595 nm, relativo à máxima absorção do complexo proteína-corante, empregando o método de Bradford (MARION, 1976). As concentrações de catalase foram determinadas nas soluções antes e após cada percolação.

4.9 Emprego do RACNT-BSA (br.) na extração de íons Fe em catalase

Preparou-se uma solução de catalase (3 mg.L^{-1}) em tampão TRIS-HCl ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$). Em seguida pesou-se 15 mg de RACNT-BSA (br) e adicionou-se o mesmo em cartucho de extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction* SPE) (Chromabond® de polipropileno, C18). Realizou-se três processos de desnaturação da solução de catalase: Desnaturação a quente (aquecimento da solução de catalase até 100°C por 5 min), adição de 1 mL de SDS (Dodecil sulfato de sódio) em 4 mL de solução de catalase e desnaturação a frio com 5 ciclos de resfriamento na geladeira e temperatura ambiente.

Após o processo de desnaturação, foram realizadas 4 percolações sucessivas de 5 mL das soluções de catalase no cartucho e imediatamente a concentração de íons Fe foram determinados por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS, do inglês *Flame atomic Absorption Spectrometry*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

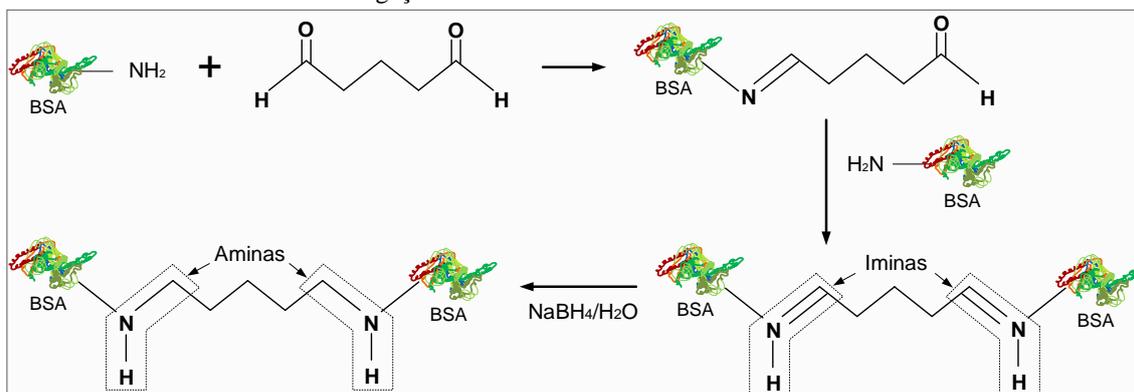
Os resultados e discussões deste trabalho são apresentados a seguir referentes ao processo de oxidação e recobrimento dos CNT, técnicas de caracterizações, avaliação da exclusão de proteínas e extração de Fe da catalase.

5.1 RECOBRIMENTO DOS CNT FUNCIONALIZADOS COM BSA (RACNT-BSA)

Na Figura 13 do procedimento experimental é apresentado um esquema referente ao preparo dos RACNT-BSA, o qual consistiu em três etapas: imobilização ou recobrimento com proteína, formação das bases de Schiff, e por fim, a redução das iminas e dos grupos aldeídos residuais.

Na primeira etapa do preparo dos RACNT-BSA destacou-se o recobrimento do CNT oxidado com BSA, na sequência, a percolação do glutaraldeído pelos CNT ox., este tem por função reagir com as proteínas BSA, formando bases de Schiff (iminas). Adicionalmente, o glutaraldeído, que é uma molécula que apresenta grupos aldeídos em ambas terminações, liga-se as proteínas pelas duas extremidades, promovendo o inter cruzamento entre as moléculas de BSA, conferindo maior estabilidade ao recobrimento e evitando perdas de proteínas na superfície dos CNT oxidados (DE LIMA; CASSIANO; CASS, 2006). Na Figura 16 constam as reações químicas pertinentes.

Figura 16 - Reação entre a BSA imobilizada e o glutaraldeído formando bases de Schiff, e subsequente inter cruzamento de ligações.



Fonte: Adaptado de (SCURTU; MOTȚ; SILAGHI-DUMITRESCU, 2013).

As bases de Schiff formadas na segunda etapa podem sofrer hidrólise, bem como os grupos aldeídos residuais podem reagir com moléculas da amostra a ser utilizada. Assim, para que isso seja evitado, o borohidreto reduz as iminas e os aldeídos, garantindo boa estabilidade e durabilidade do RACNT-BSA.

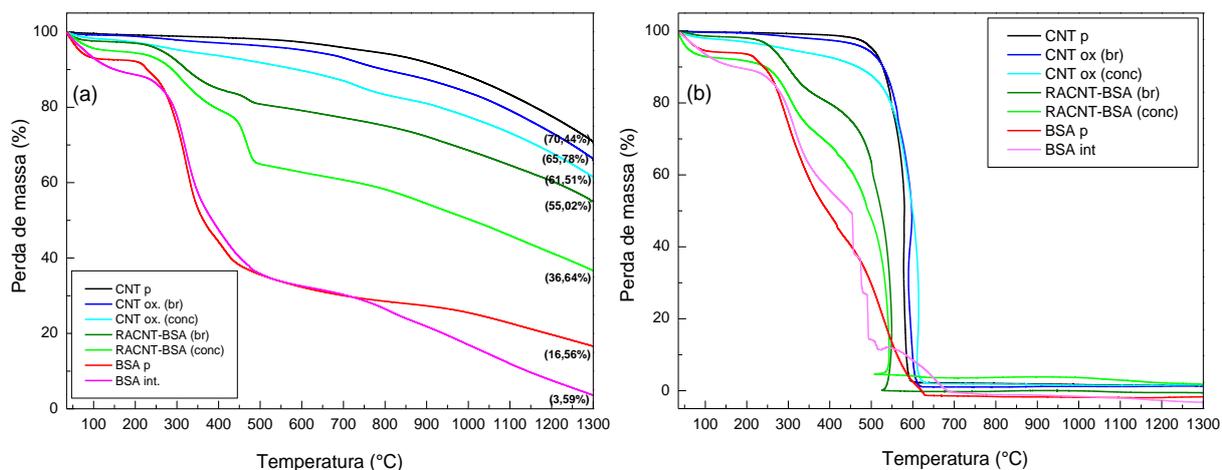
5.2 TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÕES

Após a preparação dos RACNT-BSA descritos anteriormente, passou-se à caracterização dos mesmos, utilizando as técnicas a seguir:

5.2.1 Análise termogravimétrica (TG)

A estabilidade térmica das amostras foi investigada utilizando análise termogravimétrica (TG) em atmosfera oxidante de ar sintético e inerte com nitrogênio. A Figura 17a e 17b, representa o perfil de perda de massa, fornecendo informações quanto ao processo de funcionalização ácida e o recobrimento dos CNT oxidados com BSA.

Figura 17 - Curvas de TG das amostras com tratamento de atmosfera de ar: (a) inerte de N₂ e (b) sintético.



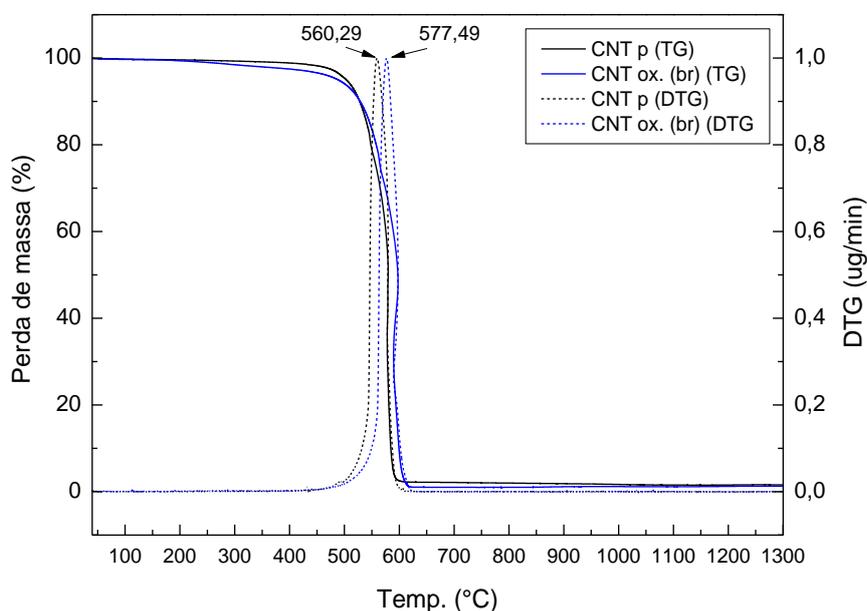
Fonte: Do autor.

A partir da DTG da Figura 18 com a atmosfera de ar sintético, há algumas observações em relação a oxidação ácida e o recobrimento com BSA.

Normalmente, as perdas de massa referem-se às impurezas em outras formas de carbono, tais como, carbono amorfo, partículas gráficas, estruturas na forma de fulereno, CNT de parede simples e impurezas metálicas decorrentes do processo de síntese (LEHMAN et al., 2011). Para a amostra do CNT, observa-se perda significativa de aproximadamente 96,46% em massa com temperatura de 560,29° C.

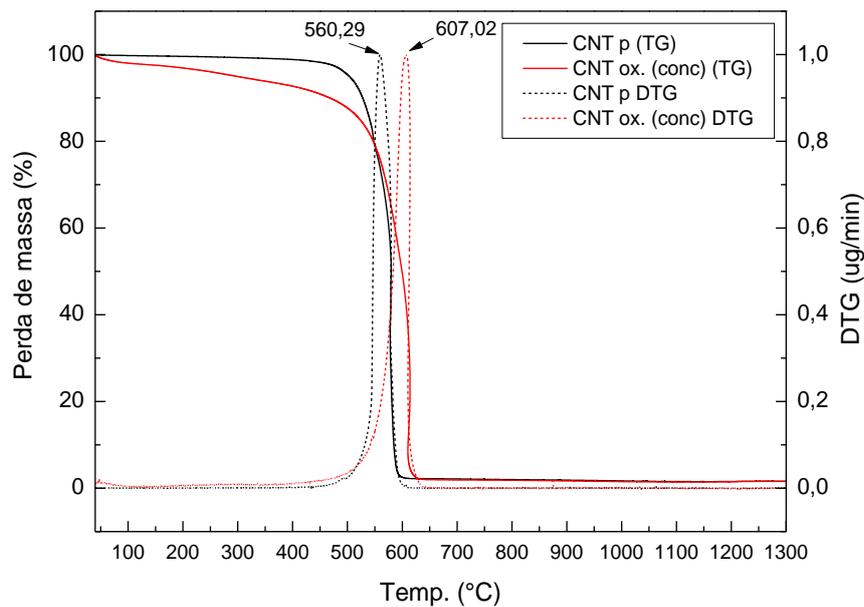
Para as amostras oxidadas (CNT ox (br) e CNT ox (conc)), Figuras 18 e 19, respectivamente, a temperatura de decomposição aumentou em relação ao CNT p, demonstrando que após o tratamento com ácido nítrico ocorreu a purificação, eliminando carbono amorfo e outras impurezas. Segundo a literatura, o número de pico da curva derivada da perda de massa e a largura do pico estão relacionados com a homogeneidade da amostra, mostrando que o processo de oxidação resultou em um pico mais estreito (amostra mais homogênea) em relação ao CNT puro (TRIGUEIRO et al., 2007).

Figura 18 - Curvas de DTG para CNT p e CNT ox. (br) com atmosfera de ar sintético.



Fonte: Do autor.

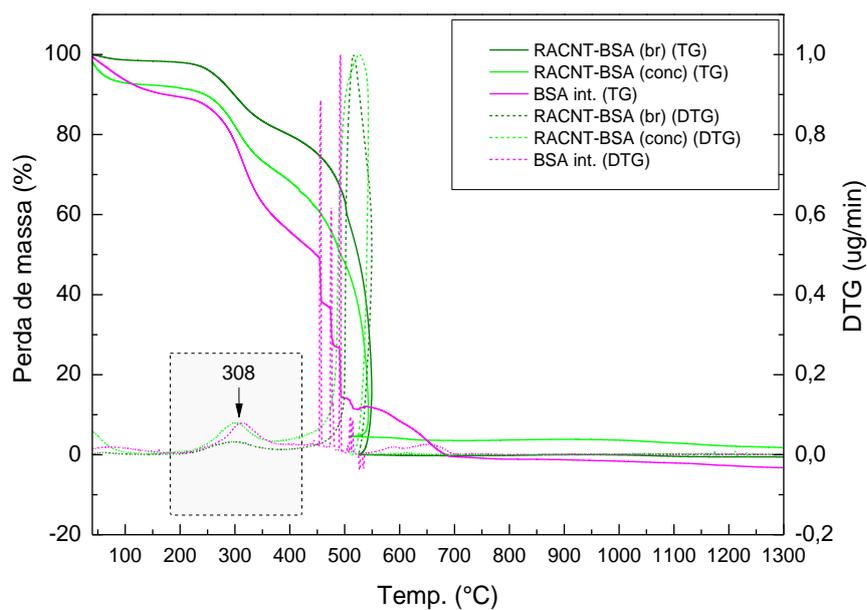
Figura 19 - Curvas de DTG para CNT p e CNT ox. (conc) com atmosfera de ar sintético.



Fonte: Do autor.

Após o recobrimento dos CNT oxidados com BSA intercruzada (Figura 20), as temperaturas de decomposição coincidiram aproximadamente em 308 °C, com isso confirma-se o processo de recobrimento com a proteína de BSA intercruzada.

Figura 20 - Curvas de TG e DTG para RACNT-BSA (br) e (conc) e BSA int. com atmosfera de ar sintético.



Fonte: Do autor.

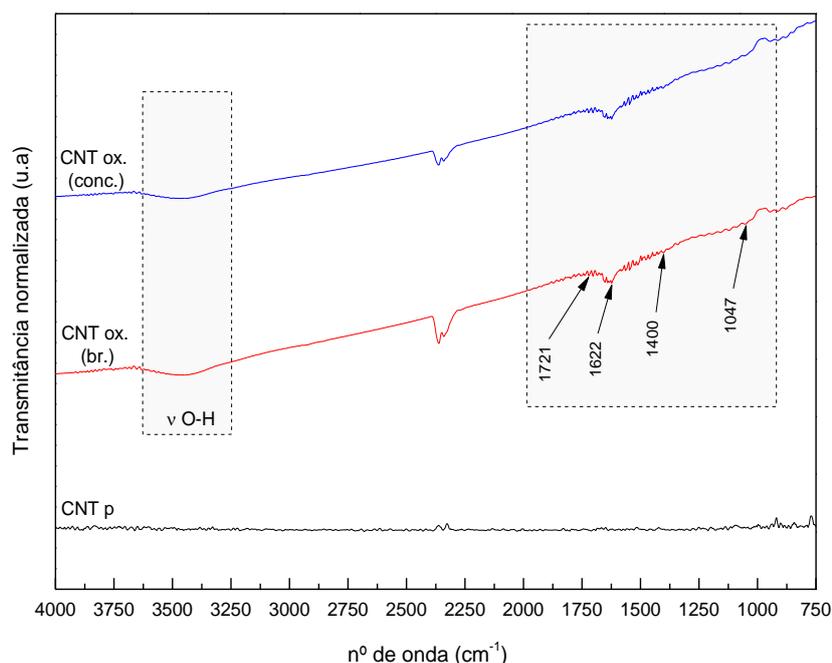
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros entre 4000 e 750 cm^{-1} dos materiais CNT p, CNT ox. (br.) e CNT ox. (conc.) estão representados na Figura 21 e RACNT-BSA (br.), RACNT-BSA (conc.), BSA p e BSA int. na Figura 22.

A análise de espectroscopia no infravermelho (IV) do material CNT p, não apresentou modos vibracionais intensos, uma vez que o momento de dipolo gerado neste tipo de material, com poucos defeitos ou modificação química, é bastante fraco ou inexistente, podendo também estar relacionado com a elevada absorção da radiação desses materiais.

Os modos vibracionais dos grupos oxigenados presentes nos espectros de CNT ox. (br) e CNT ox. (conc) são: modos vibracionais dos grupos funcionais vibrações referentes ao estiramento de ligação C=O referentes à carboxila 1721 cm^{-1} , modo normal de vibração dos CNT referentes a ligação C=C ou C=O (1622 cm^{-1}), estiramento de ligação C-H (1400 cm^{-1}) e deformação angular da ligação O-H (1047 cm^{-1}). A banda entre 3200 e 3550 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação O-H de álcool, fenol e ácido carboxílico ou água adsorvida nas amostras (KIM et al., 2005).

Figura 21 - Espectros no infravermelho dos materiais CNT p, CNT ox. (br.), CNT (conc.).

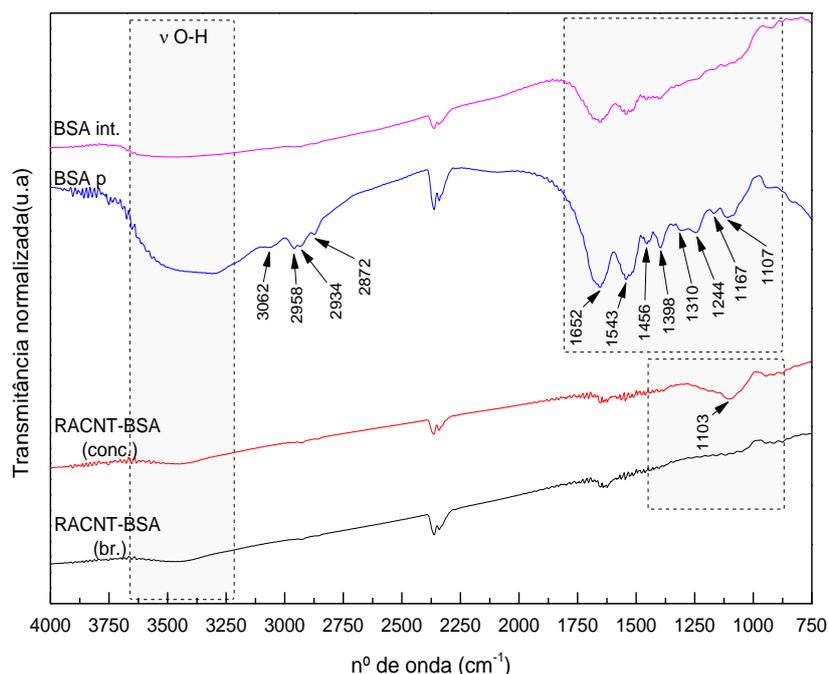


Fonte: Do autor.

O espectro da Figura 22, os RACNT-BSA (br.) e (conc.), possuem uma banda de estiramento de ligação C-N em 1102 cm^{-1} , já as outras bandas características referentes a esse material não foi possível observar. Isto sugere que a interação entre as moléculas de BSA intercruzada possuem pouca ou nenhuma interação com os CNT oxidados, sendo esses materiais encapsulados pela BSA intercruzada.

No espectro da BSA int., a banda próxima de 1650 cm^{-1} representa a banda de amida I e possui uma forte contribuição de estiramento de ligação C=O. Esta banda mostrou-se alargada em torno de 1652 cm^{-1} . Do mesmo modo, próximo de 1543 cm^{-1} , amida II (deformação angular no plano N-H e estiramento de ligação C-N), banda discreta próxima de 1310 cm^{-1} da amida III (estiramento C-N e deformação angular N-H). A região entre 1150 e 1000 cm^{-1} da BSA está associada aos grupos laterais dos aminoácidos (SILVERSTEIN et al., 2014).

Figura 22 - Espectros no infravermelho dos materiais RACNT-BSA (br) e (conc), BSA p e BSA int.



Fonte: Do autor.

Entretanto, após o intercruzamento da BSA pura pelo agente de ligação cruzada (glutaraldeído) representado pelo espectro da BSA int., observa-se a diminuição de intensidade das bandas responsáveis pelas ligações entre N-H, confirmando assim a reação intermolecular dos grupos carbonilas do glutaraldeído com os grupos aminas da

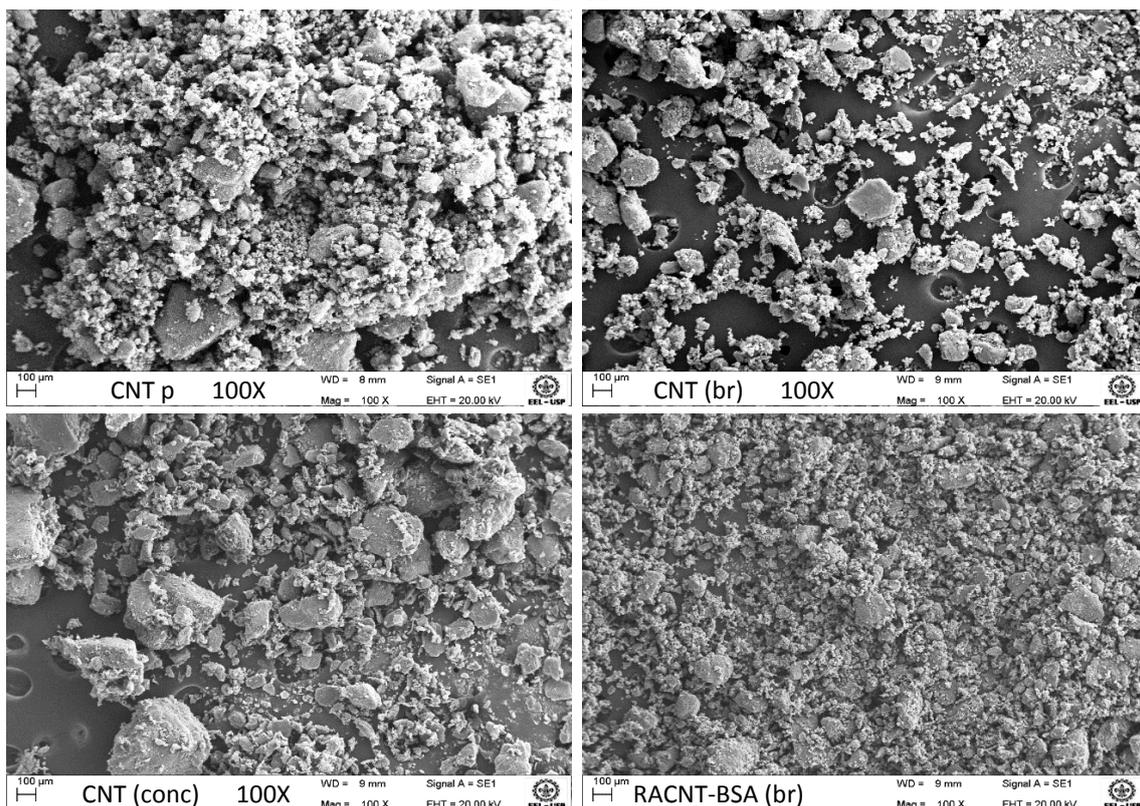
BSA e também pode ser resultado da diminuição da liberdade conformacional da BSA intercruzada em relação a BSA pura.

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

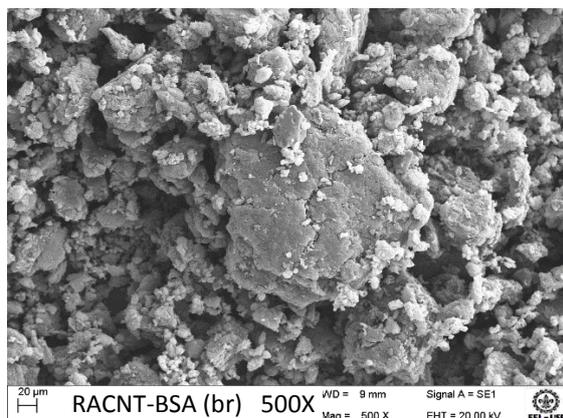
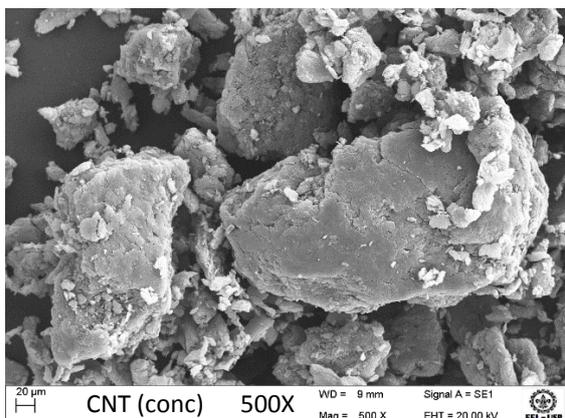
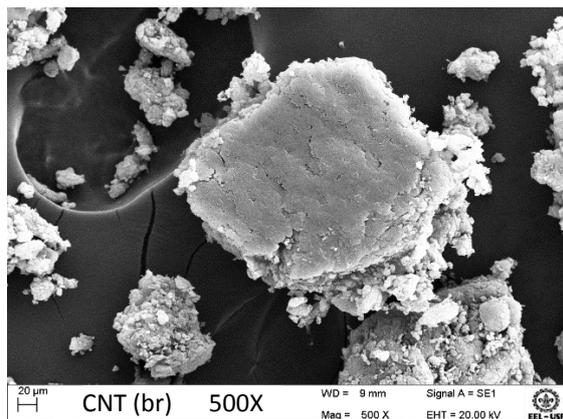
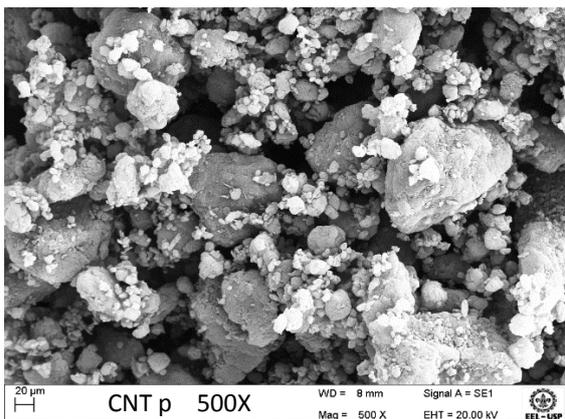
A morfologia das amostras (CNT p, CNT (br.), CNT (conc.) e RACNT-BSA (br.)) foi analisada por MEV com 100 X, 500 X, 1000 X e 5000 X de ampliação (vide a escala em μm na figura 23). É possível observar a modificação da superfície das amostras com o processo de oxidação ácida.

Figura 23 - Micrografias para as amostras CNT p, CNT ox. (br), CNT ox. (conc), RACNT-BSA (br).

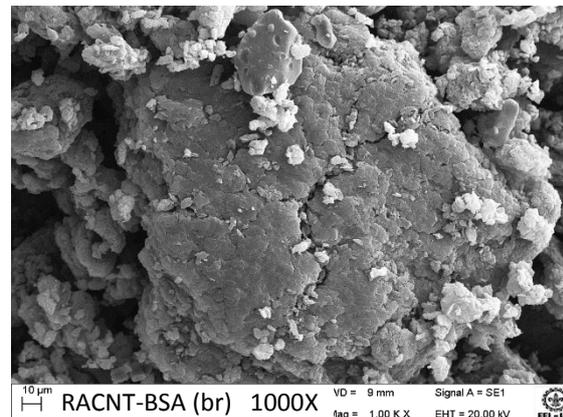
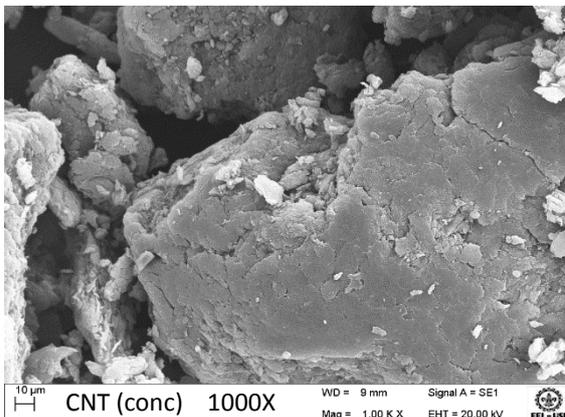
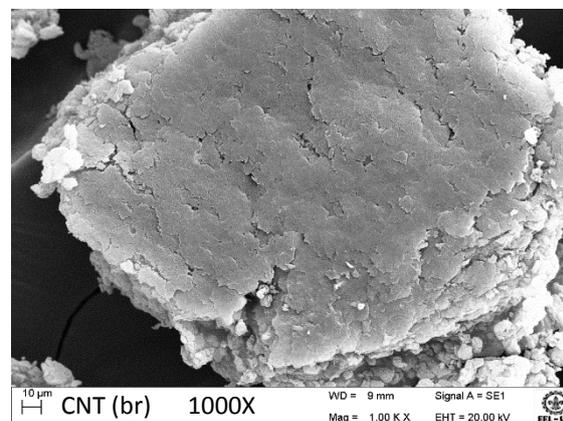
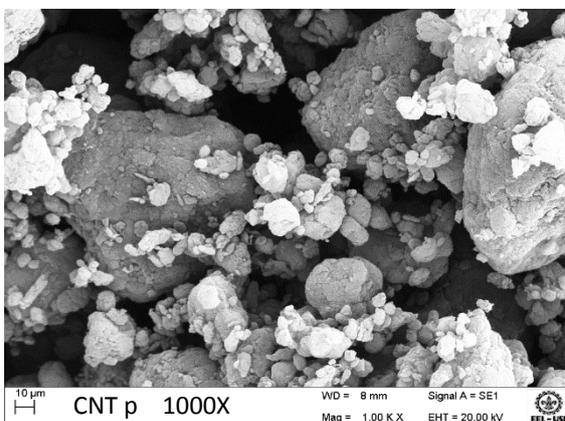
100X



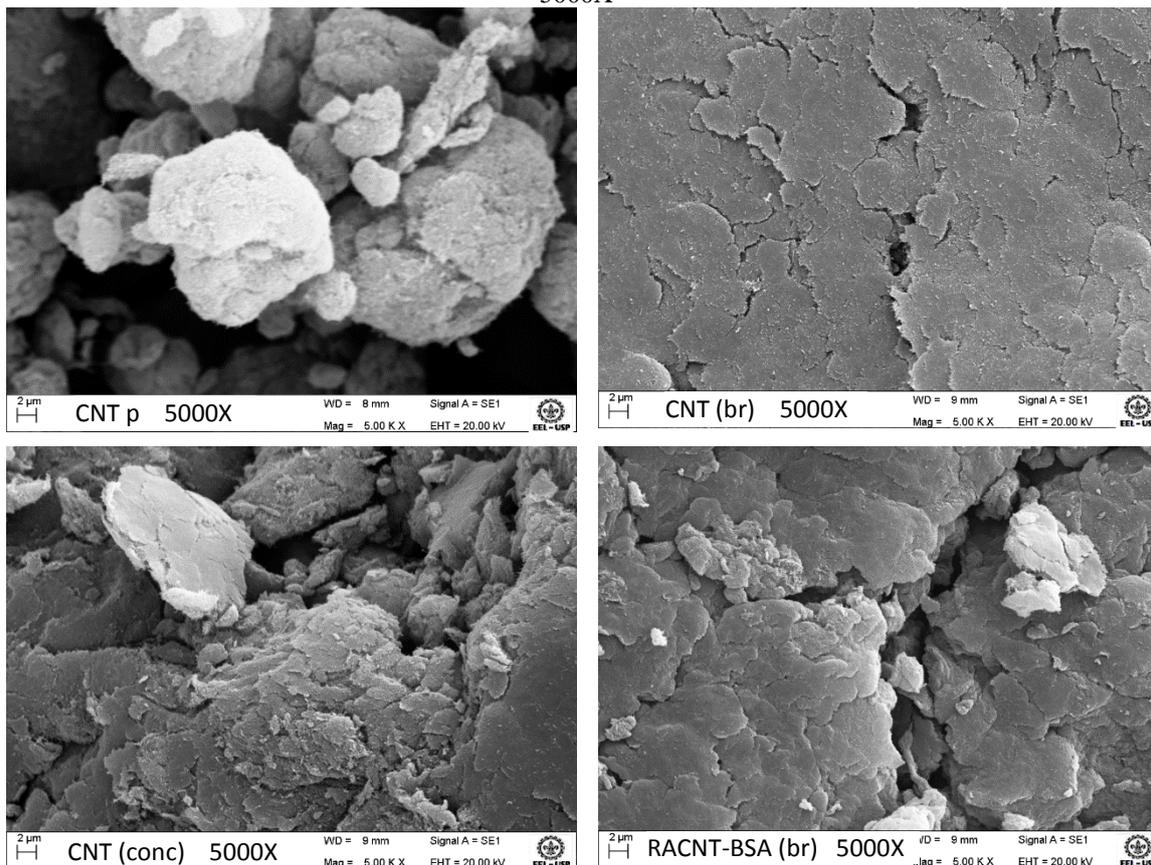
500X



1000X



5000X



Fonte: Do autor.

Nas micrografias com 100X de ampliação, a amostra bruta de CNT p se apresenta como um aglomerado compacto, em meio ao qual os CNT são dificilmente distinguidos. Alguns grânulos podem ser prováveis impurezas (partículas metálicas, gráficas e carbono amorfo) e podem ser visualizados nas ampliações maiores (500, 1000 e 5000X).

Observa-se que após o processo de oxidação do CNT p, as amostras de CNT (br) e CNT (conc) se encontram de forma mais homogênea que o CNT p. Esta possível diferença pode estar relacionada com a eliminação de impurezas da amostra bruta do CNT p, sendo confirmado pela TG. Ao aumentar a ampliação com 500, 1000 e 5000X, observa-se claramente a eliminação de impurezas.

Quanto ao processo de recobrimento da amostra de CNT ox (br) com BSA, não foi possível observar diferenças entre as amostras. Este processo pode ser confirmado por outras técnicas de caracterizações realizadas neste trabalho, como análise termogravimétrica (TG), análise elementar (CHN) e Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

5.2.4 Análise Elementar (CHN)

A Tabela 7 apresenta os teores de C, H, N de todos os materiais por análise elementar.

Tabela 7 - Teores de C, H, N de todos os materiais por análise elementar.

Material	C (%)	N (%)	H (%)	Total (%)
CNT p	94,93	0,25	2,50	97,69
CNT ox. (br)	92,58	0,45	2,38	95,41
CNT ox. (conc)	92,46	0,32	2,28	95,06
RACNT-BSA (br)	94,56	3,57	3,71	101,85
RACNT-BSA (conc.)	94,34	4,58	4,18	103,10
BSA p	45,96	14,02	6,38	66,36
BSA int.	42,19	11,98	6,04	60,21

Fonte: Do autor.

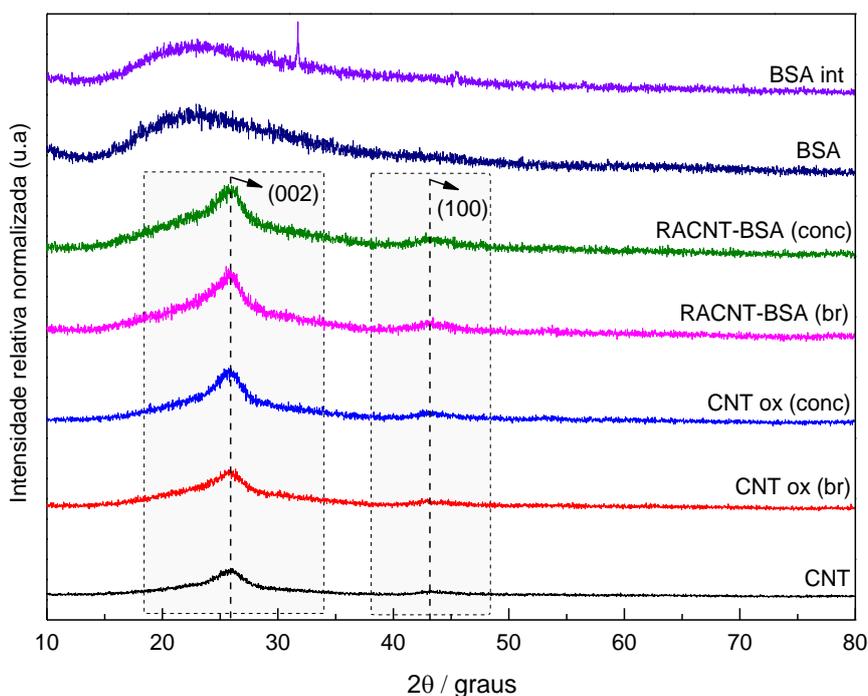
De acordo com os resultados da tabela 7, há uma diferença no percentual de nitrogênio entre os materiais revestidos com BSA (RACNT-BSA (br.) (3,57%) e RACNT-BSA (conc.) (4,58%)) e os CNT oxidados (em torno de 0,4%). Esta diferença pode ser atribuída aos grupamentos de aminas da BSA. A técnica permitiu estimar a massa percentual de BSA imobilizada na superfície dos CNT oxidados. Esta estimativa foi realizada a partir de cálculos para determinação da concentração de proteína pelo método de Kjeldahl. Este método determina a quantidade de nitrogênio total (CECCHI, 1999). De acordo com o método, a quantidade percentual de nitrogênio em alimentos, geralmente corresponde a 16% da composição de proteínas (KARAGIANNI; MONIN; SASSI, 2010). Portanto, de modo semelhante, pode-se inferir que os materiais RACNT-BSA contêm aproximadamente 35% de BSA int. e 65% de CNT oxidado.

5.2.5 Difração de raio-X de pó (DRX)

Como um método de caracterização não destrutivo, a difratometria de raios-x é empregada para a obtenção de dados sobre a presença de impurezas, tensão estrutural e o espaçamento intercamadas de CNT. A Figura 24 apresenta os difratogramas de raios X dos materiais estudados. Observa-se que, independente do tratamento químico empregando o ácido e o recobrimento com BSA, todos os difratogramas exibiram os picos referentes ao padrão de difração característico dos CNT (BELIN; EPRON, 2005).

O pico (0 0 2) e (1 0 0), característico do grafeno, está presente no padrão de difração dos CNT, sendo que a intensidade e largura desse pico estão diretamente ligados à orientação dos nanotubos quanto ao feixe incidente de raios-X, às deformações de rede, número de camadas e variações de espaçamento entre essas. Por apresentarem forma assimétrica em virtude da curvatura dos nanotubos e reflexões (h k l), os picos só podem ser visualizados nos padrões onde há empilhamento regular de camadas (BELIN; EPRON, 2005). Os difratogramas da BSA p e BSA int., demonstra em caráter mais amorfo, visto que os picos estão mais alongados, resultado esperado dos padrões de difração de proteínas.

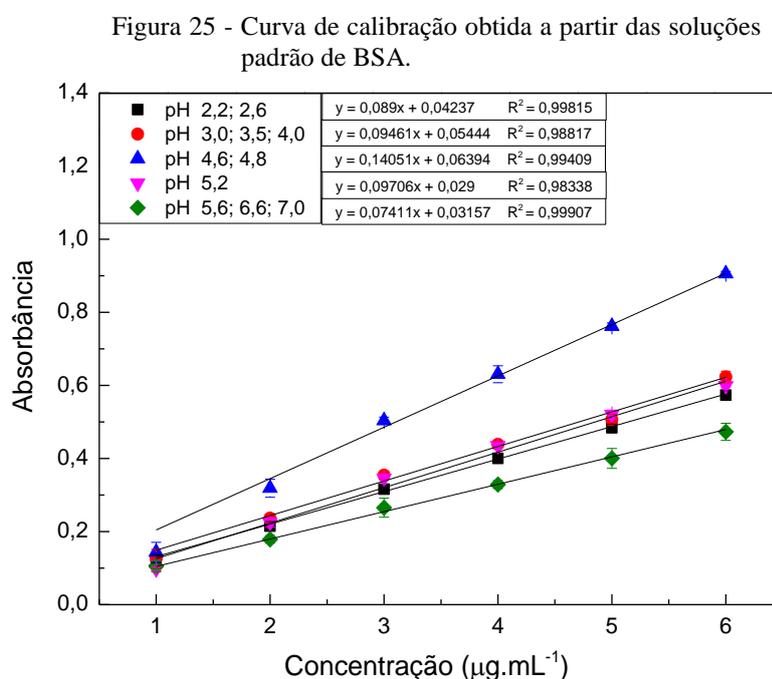
Figura 24 - Difratogramas de raio-X dos materiais.



Fonte: Do autor.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXCLUSÃO DE PROTEÍNAS BSA PERCOLADAS PELOS RACNT-BSA EM RELAÇÃO AO pH

A concentração proteica das frações dos percolados foi determinada pelo método de Bradford (MARION, 1976). Para isso, as curvas de calibração foram construídas a partir de soluções padrão de BSA em seis diferentes concentrações, sendo cada amostra preparada em replicata ($n = 3$). Seus valores de absorbância foram medidos em $\lambda = 595 \text{ nm}$. A Figura 25 ilustra as curvas de calibração para a determinação de BSA dos percolados.



Fonte: Do autor

A variação do pH nas soluções de BSA pode nos facilitar a compreensão sobre os mecanismos de interação entre as proteínas a serem percoladas e os RACNT-BSA. De fato, de acordo com resultados obtidos a partir desse estudo, vide Figura 26 e 27, o pH influenciou significativamente nas interações entre a BSA solubilizada nos tampões e os RACNT-BSA.

Nos intervalos de valores de pH entre 2,2 e 3,0, obtiveram-se altas porcentagens de recuperação da BSA (acima de 85%). Segundo Edri e Regev (2008), neste intervalo de pH, a conformação da molécula de BSA se encontra na forma expandida, com isso facilita sua solubilização. Além disso, neste intervalo a molécula de BSA se encontra

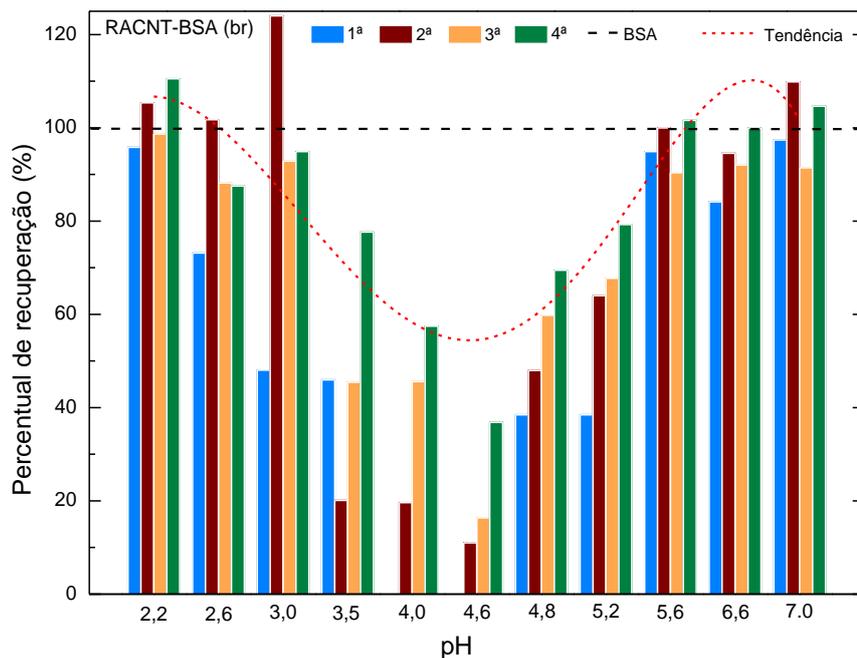
carregada positivamente, sendo assim, considera-se que houve uma maior repulsão eletrostática entre as moléculas de BSA e o RACNT-BSA (EDRI; REGEV, 2008).

O elevado percentual de recuperação de BSA (acima de 85%) também se observa no intervalo de pH entre 5,6 e 7,0. Nesse intervalo, a conformação da molécula de BSA (normal ou coração) proporciona uma menor solubilidade no meio, indicando diferenças entre a interação da BSA com os diferentes materiais (Nanotubos de carbono de parede simples, estudados por Redi e Regev (EDRI; REGEV, 2008) e recentemente RACNT-BSA).

Nos intervalos de pH entre 3,5 e 5,2, houve uma mudança no comportamento de adsorção dos RACNT-BSA, mostrando uma maior interação entre eles e as proteínas de BSA, isto é, uma recuperação de proteínas dos percolados de 20 a 45%. Este intervalo de valores de pH compreende o valor de pI da BSA, descrito na literatura (PETERS JR, 1995).

Dessa forma, ao aproximar-se do valor do pI da BSA, ocorreria um aumento da atração eletrostática entre a superfície dos RACNT-BSA e a BSA em solução. Além disso, outro fator importante a ser considerado é em relação a conformação da BSA, pois esta pode se modificar em função do pH (PETERS JR, 1995; EDRI; REGEV, 2008). Neste contexto a conformação normal ($4,0 < \text{pH} < 8,0$), fornece uma menor solubilização da BSA.

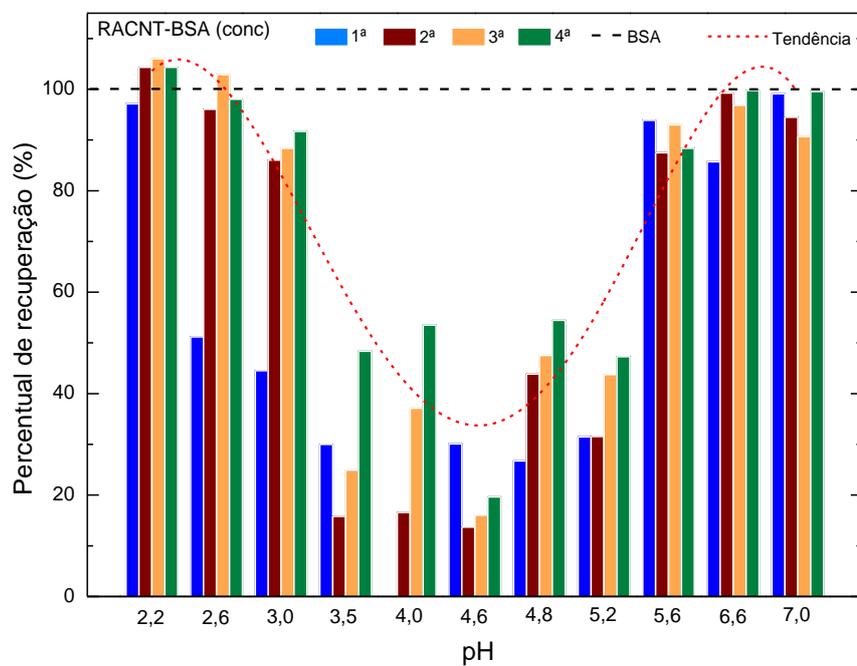
Figura 26 - Efeito do pH na exclusão de proteínas BSA do RACNT-BSA (br).



Fonte: Do autor.

Nota: Representação do percentual de recuperação do RACNT-BSA (br) em relação a solução de BSA com concentração $3 \mu\text{g. mL}^{-1}$. A linha pontilhada representa 100% de BSA em solução.

Figura 27 - Efeito do pH na exclusão de proteínas BSA do RACNT-BSA (conc).



Fonte: Do autor.

Nota: Representação do percentual de recuperação do RACNT-BSA (conc) em relação a solução de BSA com concentração $3 \mu\text{g. mL}^{-1}$. A linha pontilhada representa 100% de BSA em solução.

Observou-se, de forma geral, que para as sucessivas percolações nos intervalos de valores de pH em que ocorreram maior repulsão eletrostática (de 2,2 a 2,6 e de 5,6 a 7,0) não houve variação significativa (~10%) entre as sucessivas porcentagens de recuperação, já para o intervalo de valores de pH entre 2,6 a 5,2, notou-se que houve uma maior adsorção nas primeiras percolações. Isto sugere que a BSA solúvel no meio poderia estar sendo adsorvida aos RACNT-BSA por atração eletrostática. Assim, para se avaliar se as proteínas poderiam ser dessorvidas, lavou-se os RACNT-BSA que foram percolados pela BSA em pH = 3,0 com água por 4 vezes. Verificou-se que a concentração de BSA dos lavados estava abaixo do limite de detecção (Tabela 8). Portanto, não houve dessorção de BSA nos RACNT-BSA. Assim, em pH 2,6 e 3,0 deve-se levar consideração o efeito de condicionamento do material após a primeira percolação.

Tabela 8 - Dados de concentração de BSA após a lavagem com água.

Material	nº de lavagem	Conc. ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	\pm	SD (n=3)	
RACNT-BSA (br)	1 ^a	2,71	\pm	0,12	
	2 ^a	2,61	\pm	0,11	
	3 ^a	2,83	\pm	0,11	
	4 ^a	2,71	\pm	0,10	
	1 ^a (água)	0,08	\pm	0,06	
	2 ^a (água)			ND	
	3 ^a (água)	0,11	\pm	0,13	
	4 ^a (água)			ND	
	RACNT-BSA (conc)	1 ^a	1,63	\pm	0,18
		2 ^a	2,56	\pm	0,03
3 ^a		2,63	\pm	0,04	
4 ^a		2,94	\pm	0,30	
1 ^a (água)		0,05	\pm	0,02	
2 ^a (água)				ND	
3 ^a (água)				ND	
Solução de BSA ($3\mu\text{g. L}^{-1}$)	4 ^a (água)	0,02	\pm	0,01	
		2,73	\pm	0,14	

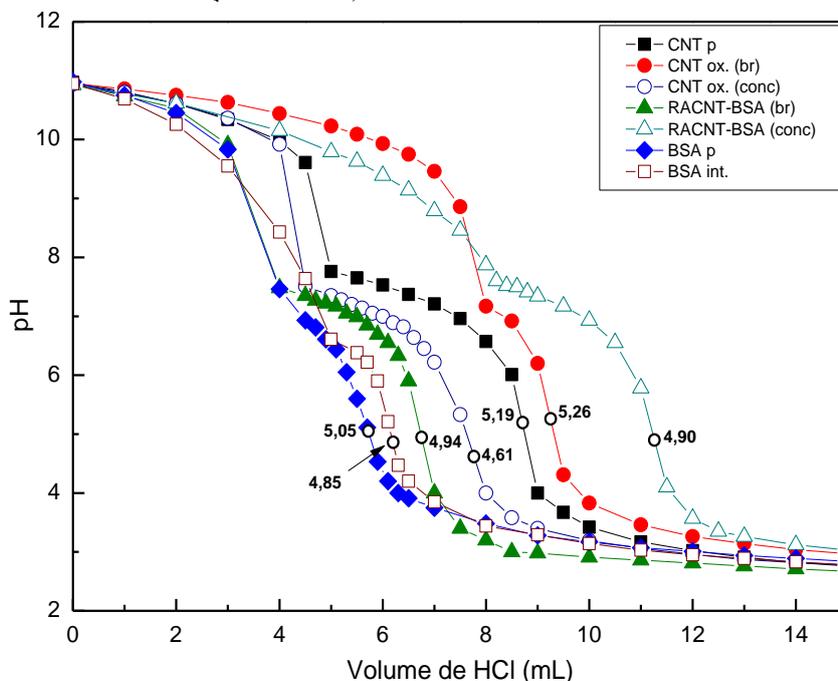
Fonte: Do autor.

Um estudo mais detalhado com relação à determinação do pI das amostras nos elucidarão os mecanismos de interação que possivelmente ocorrem em função do pH.

5.4 DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CARGA ZERO DE (PCZ) DOS MATERIAIS

O método convencional de titulometria potenciométrica ácido-base, com alguns ajustes para o tratamento dos dados, tem excelente aplicação na determinação dos sítios ácidos ionizáveis presentes na superfície das amostras estudadas, portanto fornece informações importantes no acompanhamento das reações de funcionalização (MASINI, 1993; SOLDATOV et al., 2004). O ponto de carga zero das amostras apresentado na Figura 28 foi determinado a partir da segunda derivada de cada curva de titulação, com o intuito de fornecer informações das interações de grupos funcionais ligados à superfície dos CNT, antes e após o tratamento com ácido nítrico, e interações químicas eletrostáticas entre a BSA int. com os CNT ox. Na superfície dos materiais carbonáceos podem estar presentes grupos ácidos ionizáveis de carboxílicos, anidridos, lactonas e fenóis (MESQUITA; MARTELLI; GORGULHO, 2006). Entretanto, a oxidação pelo tratamento com ácido nítrico promove a maior formação principalmente de grupos carboxílicos e fenólicos na superfície dos CNT (KIM et al., 2005).

Figura 28 - Curva potenciométrica ácido-base dos materiais titulados com solução de HCl 0,01 mol. L⁻¹.



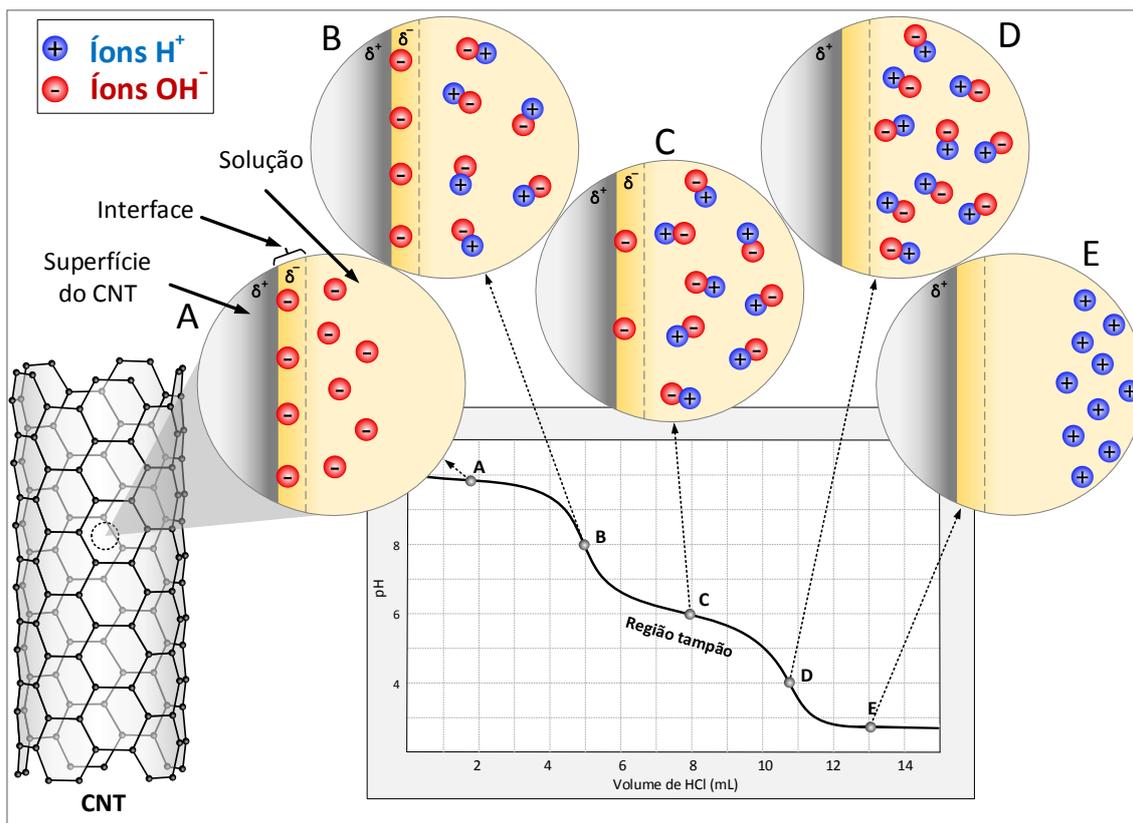
Fonte: Do autor.

De acordo com os resultados obtidos a partir das curvas de titulação, o ponto isoelétrico (pI) da amostra CNT ox. (conc.) (4,61), mostrou-se menor em relação ao CNT p (5,19), confirmando o processo de oxidação e aumento na presença de grupos ácidos na superfície dos CNT. Já a amostra de CNT ox. (br.) (5,26) se mostrou mais próxima do pI do CNT p, pois utilizou um processo de oxidação branda.

Após o tratamento empregando ácido, as amostras recobertas com BSA intercruzada, resultou nos RACNT-BSA (br.) (4,94) e RACNT-BSA (conc.) (4,90), mostrou-se pouca variação do pI em relação as amostras oxidadas, pois há interação eletrostática entre os grupamentos amins da BSA int. (4,85) e os carboxílicos dos CNT ox. O aumento do pI da BSA intercruzada em relação a BSA pura, pode ser resultado do intercruzamento entre as moléculas de BSA pura pelo glutaraldeído agente de ligação cruzada.

A Figura 29, representa o mecanismo de interação eletrostática entre íons em solução fornecidos durante a titulação potenciométrica e a superfície dos materiais estudados. Em A, há um excesso de íons hidroxilas (OH^-) em solução e na superfície do material, pois há uma diferença de dipolo ocorrendo atração eletrostática. Na região B, há um equilíbrio entre as cargas em solução, porém na superfície do material há excesso de carga negativa. Em C, destaca-se a região tampão, onde há pouca variação do pH, demonstrando o equilíbrio entre as cargas. Em D, todo o excesso de hidroxila na superfície do material e solução foram neutralizados com íons H^+ , assim o pI da amostra e da solução são iguais, demonstrando o pI da amostra. Finalizando, em E há um excesso de cargas positivas, ocorrendo assim repulsão eletrostática entre cargas positivas superfície e solução.

Figura 29 - Representação do mecanismo da titulação potenciométrica.



Fonte: Do autor.

A superfície de partículas sólidas caracteriza-se pela existência de cargas positivas e negativas, que dependendo do pH, a densidade superficial de cargas de uma ou outra será maior, resultando em uma carga superficial líquida. Assim, em pH ácido, predominam os sítios positivos, enquanto que em pH alcalino, os sítios negativos. O pH no qual o número de sítios positivos é igual ao de sítios negativos é denominado ponto de carga zero (P_{cz}), resultando em uma superfície neutra (ORTEGA et al., 1997).

A Figura 30 representa o pI dos materiais estudados, pode-se relacionar a interação atrativa ou repulsiva entre as cargas superficiais das amostras. Assim, pode-se compreender melhor a proposta do mecanismo de interação entre os CNT, a BSA int., os RACNT-BSA e as BSA solubilizadas no tampão. Verifica-se, claramente, que no intervalo de pH de 4,0 a 5,2 existirão atrações eletrostáticas entre os CNT oxidados e a BSA. Também existirão atrações entre os RACNT-BSA e a BSA solubilizada.

Figura 30 - Quadro representativo dos pontos isoelétricos (pI) dos materiais.

pH	2,2	2,6	3,0	3,5	4,0	4,6	4,8	4,9	5,0	5,2	5,4	5,6	6,6	7,0
CNT p	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,19	-	-	-	-
CNT ox. (br)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,26	-	-	-	-
CNT ox. (conc.)	+	+	+	+	+	4,61	-	-	-	-	-	-	-	-
RACNT-BSA (br)	+	+	+	+	+	+	+	4,94	-	-	-	-	-	-
RACNT-BSA (conc.)	+	+	+	+	+	+	+	4,90	-	-	-	-	-	-
BSA p	+	+	+	+	+	+	+	+	5,05	-	-	-	-	-
BSA int.	+	+	+	+	+	+	+	4,85	-	-	-	-	-	-

Carga positiva  **Carga negativa**

Fonte: Do autor.

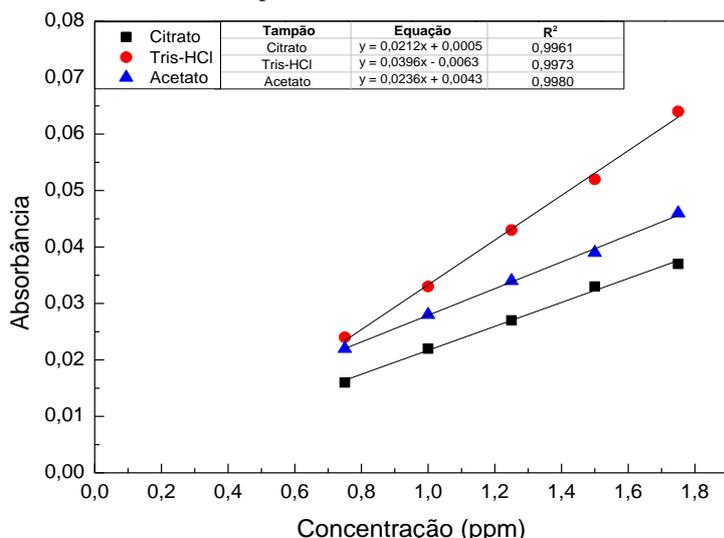
Nota: A diminuição do pH resulta em cargas positivas (coloração azul) e aumento do pH em cargas negativas (coloração laranja), a intensidade da coloração representa a quantidade de cargas e a coloração branca, a região neutra próxima ao pI das amostras.

5.5 AVALIAÇÃO DOS TAMPÕES CITRATO, TRIS-HCL E ACETATO PARA ADSORÇÃO DE FERRO NOS RACNT-BSA

A escolha do tampão pode influenciar na quantidade de íons metálicos presentes em solução, pois dependendo do tampão utilizado, este pode complexar íons metálicos. Portanto, realizou-se um estudo comparativo dos tampões utilizados a fim de escolher o que não se liga ou se complexa com os íons metálicos.

A Figura 31 representa as curvas analíticas, empregando-se FAAS, na determinação de íons ferro, em triplicata, com faixa linear entre 0,75 e 1,75 mg. L⁻¹ para os três tampões utilizados: citrato e tris-HCl (pH 7,0) e acetato (pH 6,0), todos com concentração 0,010 mol. L⁻¹. Nota-se uma boa linearidade com os coeficientes de determinação (R²).

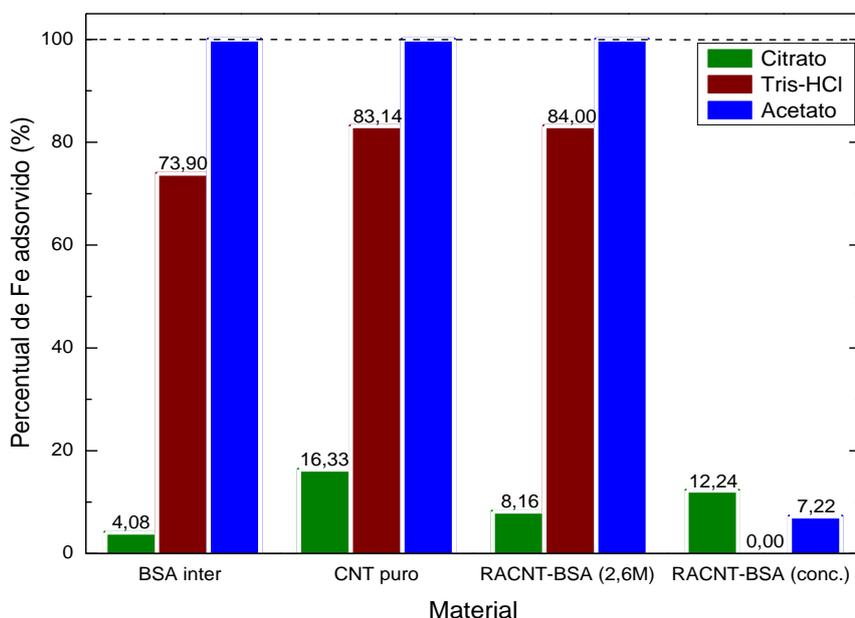
Figura 31 - Curvas analíticas do ferro empregando FAAS em tampão: Citrato, Tris-HCl e Acetato.



Fonte: Do autor.

Para uma melhor avaliação dos tampões estudados em relação à complexação de íons de ferro, apresenta-se na Figura 32, uma comparação entre os percentuais de ferro adsorvido nos materiais estudados nos tampões estudados nos pHs 6,0 e 7,0.

Figura 32 - Gráfico de percentual de Fe adsorvido nos materiais: BSA int., CNT p, RACNT-BSA (br.) e RACNT-BSA (conc.).



Fonte: Do autor.

Nota: Solução com concentração de íon ferro (1,25 ppm) em tampões: citrato (pH 7,0), Tris-HCl (pH 7,0) e Acetato (pH 6,0), com concentração 0,01 mol.L⁻¹.

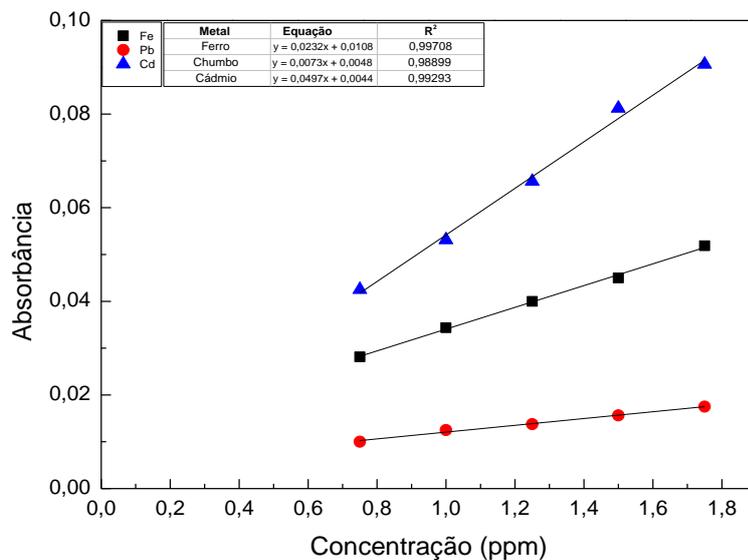
Os resultados mostraram que seria inadequado utilizar o tampão citrato em testes posteriores de adsorção de ferro pelos materiais, pois em todos estes, o percentual de ferro adsorvido foi extremamente baixo, variando de 4 a 16%. Este fato está relacionado com elevado poder complexante do citrato com o ferro. O ácido cítrico mostrou-se promissor na quelação e transporte de íons metálicos de ferro, cobre manganês e zinco, sendo estes micronutrientes essenciais no crescimento de plantas (BERTOLI et al., 2015).

O tampão Tris-HCl se mostrou melhor na adsorção do ferro pelos materiais estudados, variando-se de 73,90 a 83,14% de ferro adsorvido, porém inferior ao tampão acetato, que se destacou por não interagir com o ferro em solução no intervalo estudado, por consequência ocorreu 100% de adsorção de ferro. No material de RACNT-BSA (conc.), ocorreu pouca adsorção de íons ferro nos três tampões preparados, sendo assim, seria inviável a utilização desse material para processos adsorptivos de ferro. Também se esperava pouca adsorção no material da BSA int, porém houve um elevado percentual de ferro adsorvido. Os processos adsorptivos destes materiais devem ser estudados mais detalhadamente nos itens posteriores, principalmente o estudo da cinética de adsorção.

5.5.1 Estudo de adsorção de metais nos RACNT-BSA

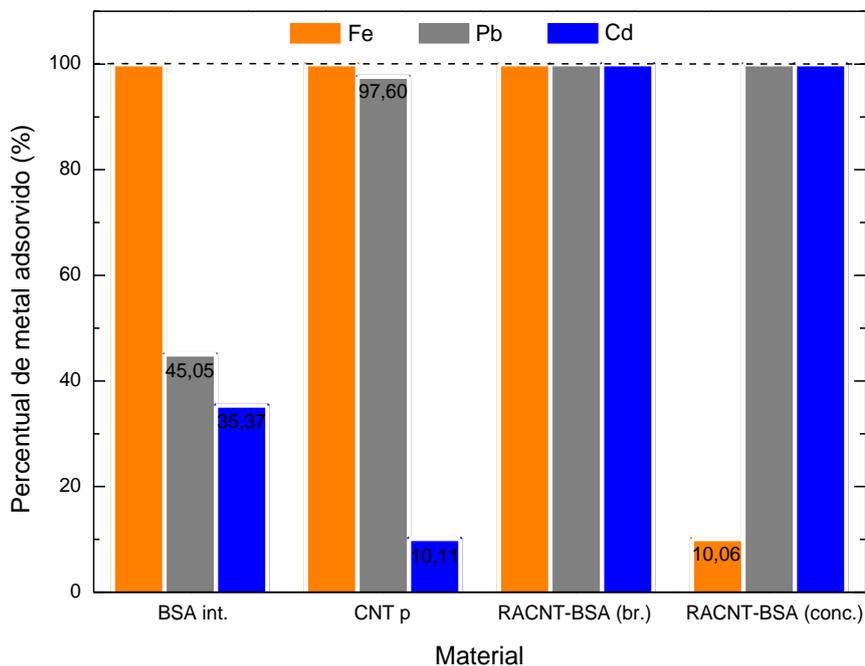
A Figura 33 representa as curvas analíticas, empregando-se FAAS na determinação dos íons metálicos (1,25 ppm), em triplicata: ferro, chumbo e cádmio, com faixa linear entre 0,75 e 1,75 ppm, em tampão acetato (pH 6,0), com concentração 0,01 mol. L⁻¹.

Figura 33 - Curvas analíticas do ferro, chumbo e cádmio em tampão acetato (1,25 ppm em tampão acetato (0,01 mol. L⁻¹ pH 6,00, determinado por FAAS.



Fonte: Do autor.

Figura 34 - Gráfico representando o percentual de metal adsorvido (Fe²⁺, Pb²⁺ e Cd²⁺) nos materiais estudados.



Fonte: Do autor.

De acordo com a determinação do percentual de íons metálicos adsorvidos nos materiais (Figura 34), verificou-se que a capacidade de adsorção do material de CNT p para os íons de Pb²⁺ e Cd²⁺ aumentou notavelmente após o processo de oxidação ácida na

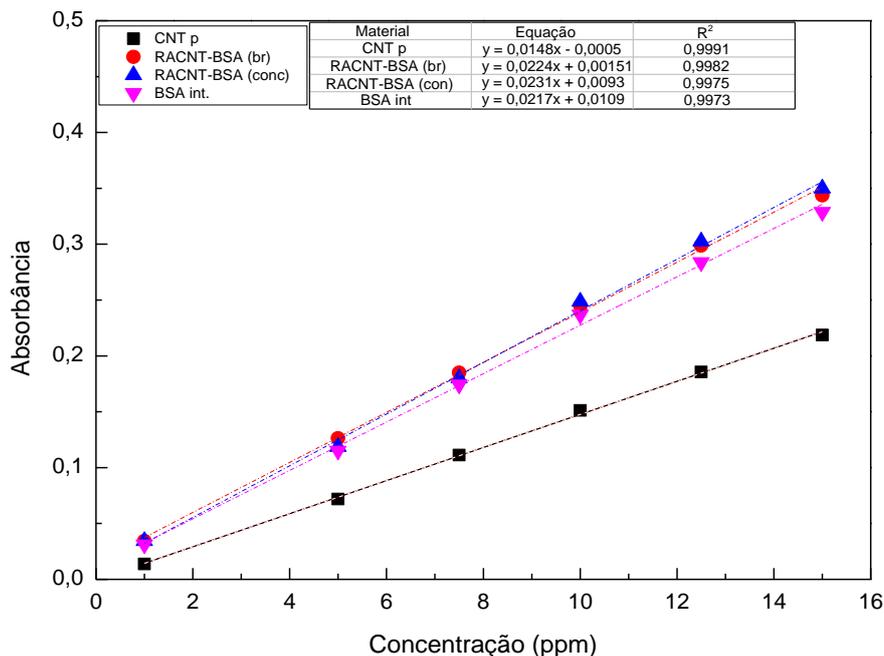
superfície. Sabe-se que após o tratamento com ácido nítrico, há um aumento na quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio como: carboxilas, lactonas e fenóis sobre a superfície dos CNT (VIEIRA et al., 2007; WORSLEY et al., 2009). Portanto, o mecanismo de adsorção pode ser atribuído por interações químicas e eletrostáticas entre os íons metálicos e os grupos funcionais da superfície dos CNT oxidados (SRIVASTAVA, 2013).

Um fato interessante é a diferença de adsorção de íons Fe na BSA int. em relação aos íons de Pb^{2+} e Cd^{2+} , destacando-se uma forte interação eletrostática entre a superfície da BSA int. e os íons Fe. Os resultados mostraram que a adsorção dos íons nos RACNT-BSA não pode ser atribuída somente a interações entre os CNT e os íons Pb^{2+} e Cd^{2+} , mas também à BSA int, pois esta adsorveu cerca de 45% e 35% para os íons de Pb^{2+} e Cd^{2+} , respectivamente. A BSA int, se destacou por possuir uma forte interação com os íons de Fe, adsorvendo 100% dos íons em solução. Assim, poderia-se até pensar em dispositivo construído com apenas a BSA int., fosse suficiente para a adsorção de íons Fe, sem a necessidade do RACNT-BSA. Entretanto, esta afirmação é prematura, uma vez que ainda não se estudou a cinética de adsorção de íons Fe para estes materiais e os resultados obtidos nesta seção foram dos materiais em contato com a solução de ferro por um período de no mínimo 12 h (*overnight*). O material que se mostrou mais efetivo na adsorção de todos os metais estudados foi o RACNT-BSA (br.) com 100% de adsorção.

5.5.2 Cinética de adsorção de íons Ferro

A Figura 35 representa as curvas analíticas, empregando-se FAAS na determinação dos íons ferro em tampão acetato ($0,01 \text{ mol. L}^{-1}$), pH 6,0, com faixa linear entre 1 e 15 mg. L^{-1} . As concentrações iniciais antes do contato com os materiais são de 10 mg. L^{-1} . Nota-se uma boa linearidade com os coeficientes de determinação (R^2).

Figura 35- Curvas analíticas do ferro empregando FAAS para a cinética de adsorção em tampão acetato ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 6,0.

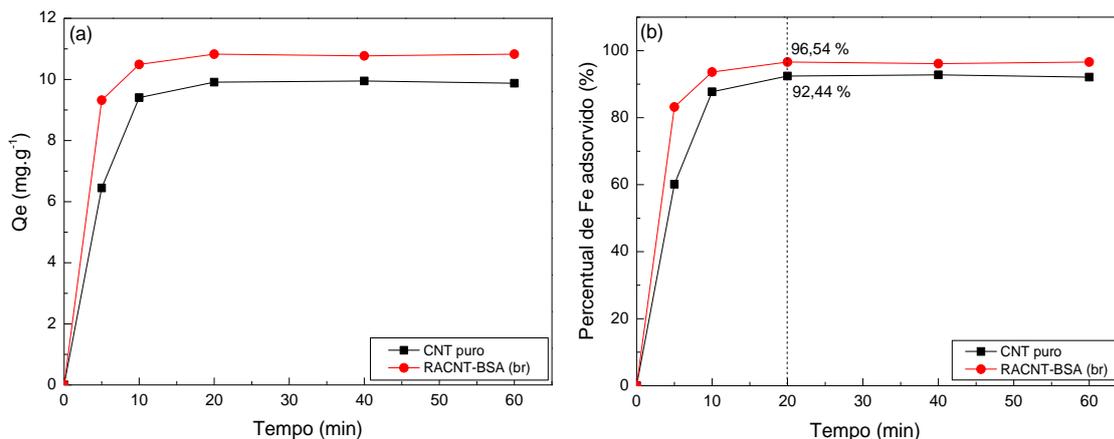


Fonte: Do autor.

Os dados obtidos na construção das curvas de cinética de adsorção para o ferro pelos materiais: CNT p, RACNT-BSA (br), RACNT-BSA (conc) e BSA int., estão representados nas Figuras 36 e 37. Observou-se que a quantidade de ferro adsorvido por grama de adsorvente aumentou com o tempo de contato da solução de ferro com os adsorventes.

De acordo com as curvas de cinética de adsorção da figura abaixo, o adsorvente RACNT-BSA (br.) alcançou 96,61% de remoção de íons ferro após o equilíbrio de adsorção aproximadamente em 20 min, se mostrando superior ao adsorvente CNT p com 92,44%.

Figura 36 - Cinética de adsorção do CNT p e RACNT-BSA (br) em tampão acetato ($0,01 \text{ mol. L}^{-1}$) pH 6,00 com concentração de íons Fe de 10 ppm.

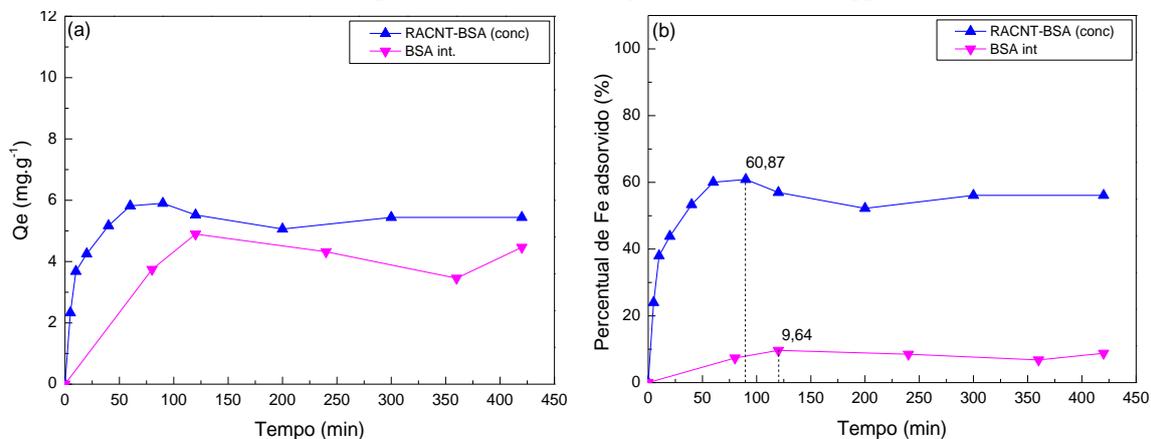


Fonte: Do autor.

Nota: Em (a) Curva cinética de ferro e (b) Eficiência de remoção de ferro em função do tempo de contato.

Na Figura 37, o adsorvente RACNT-BSA (conc) alcançou 60,87% de remoção de ferro após o equilíbrio de adsorção em 90 min e a BSA int., com 9,64% de remoção.

Figura 37 - Cinética de adsorção do RACNT-BSA (conc) e BSA int. em tampão acetato ($0,01 \text{ mol. L}^{-1}$) pH 6,00 com concentração de íons Fe de 10 ppm.



Fonte: Do autor.

Nota: Em (a) Curva cinética de ferro e (b) Eficiência de remoção de ferro em função do tempo de contato.

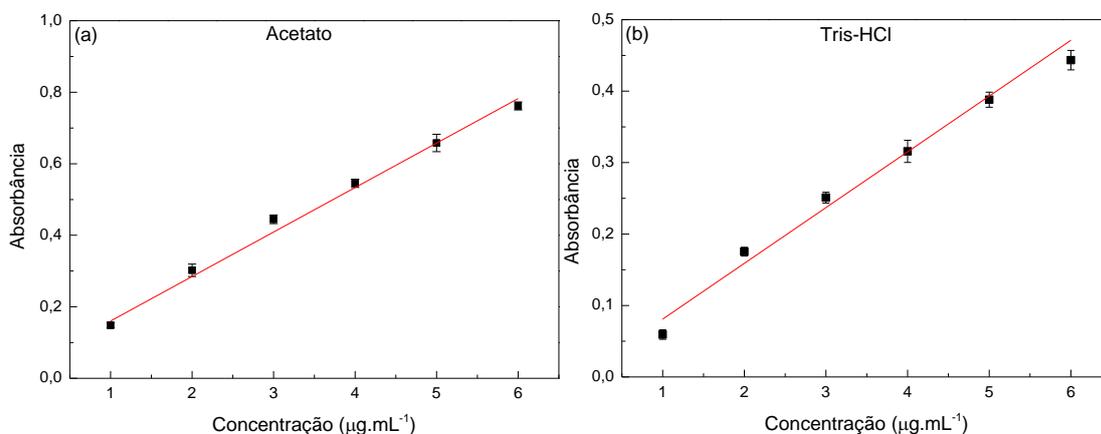
As curvas de cinética de adsorção das amostras de CNT p e RACNT-BSA (br.) se mostraram similares quanto ao tempo de contato com a solução de íons ferro. A amostra de RACNT-BSA (br.) se destacou entre as demais por possuir o maior percentual de íons ferro adsorvido em sua superfície. Este fato pode estar relacionado com o processo de oxidação realizada na superfície do CNT, por se tratar de uma oxidação mais branda com HNO_3 ($2,6 \text{ mol. L}^{-1}$). É importante salientar que, obviamente, as condições experimentais

devem ser consideradas, pois os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, podendo a temperatura influenciar nos mecanismos de adsorção dos íons metálicos nos adsorventes.

5.5 DETERMINAÇÃO DE APOPROTEÍNA

A concentração proteica de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (MARION, 1976). Para isso, as curvas de calibração nos tampões foram construídas a partir de soluções padrão de BSA em seis diferentes concentrações, sendo cada amostra preparada em replicata ($n = 3$). Seus valores de absorbância foram medidos em $\lambda = 595$ nm. A Figura 38 ilustra as curvas de calibração para a determinação de catalase dos percolados.

Figura 38 - Curvas de calibração obtida a partir das soluções padrão de BSA para determinação de catalase.



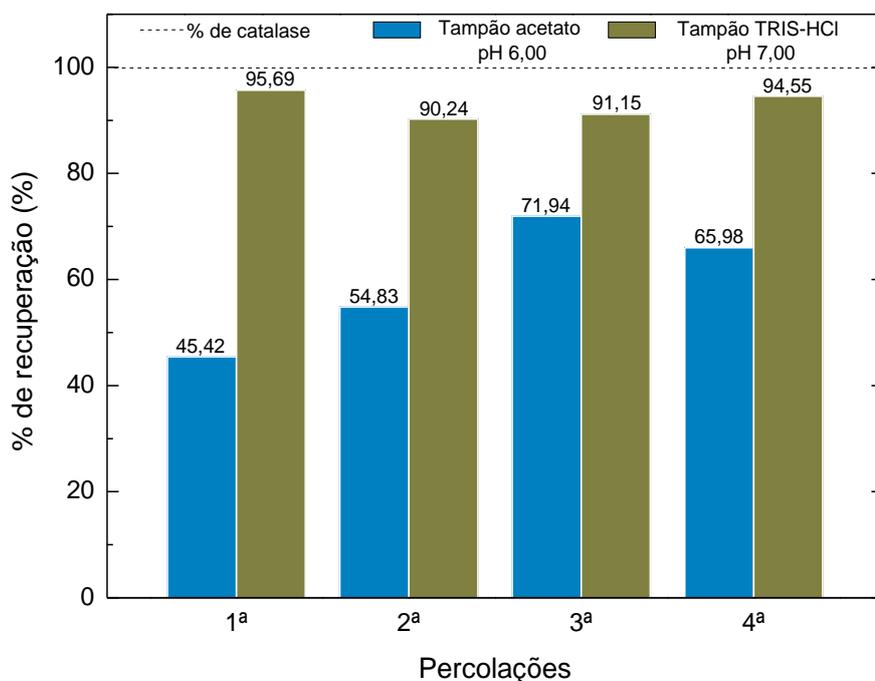
Fonte: Do autor.

Nota: Curva de calibração em tampão ($0,01 \text{ mol. L}^{-1}$) com concentração de catalase ($3 \mu\text{g. L}^{-1}$). Em (a) Acetato, pH 6,00 e (b) TRIS-HCl, pH 7,00.

Realizou-se novamente o estudo de influência do tampão, empregando o tampão Acetato em pH 6,00 e Tris-HCl em pH 7,00, ambos em concentração $0,01 \text{ mol. L}^{-1}$. O maior percentual de recuperação para o tampão Tris-HCl pode estar relacionado com pI da catalase (5,4) (SAMEJIMA; KAMATA; SHIBATA, 1962). Pois o pH do tampão Tris-HCl (7,00) em relação ao tampão acetato (6,00) se encontra mais distante do pI da catalase. Então, por esses resultados, apesar do tampão acetato ter sido o que

proporcionou melhores resultados para a disponibilidade de Fe em solução, para melhor adsorção do metal nos materiais, utilizou-se o tampão Tris-HCl, pH 7,0, que proporcionou uma menor adsorção da catalase, isto é, maior exclusão nos RACNT-BSA br. (Figura 39).

Figura 39 - Comparação dos tampões acetato e TRIS-HCl na exclusão de catalase.



Fonte: Do autor.

Nota: Tampão acetato, pH 6,00 e Tris-HCl, pH 7,00, ambos com concentração de 0,01 mol. L⁻¹, com concentração de catalase 3 mg. L⁻¹.

Na avaliação da extração do Fe presente na catalase empregando o material adsorvente RACNT-BSA (br), inicialmente foi preparado uma solução de catalase 3 mg. mL⁻¹, na ordem de 1000 vezes maior que a concentração de BSA (3 mg. L⁻¹) utilizada no teste exclusão de proteínas (BSA) no item 5.3.

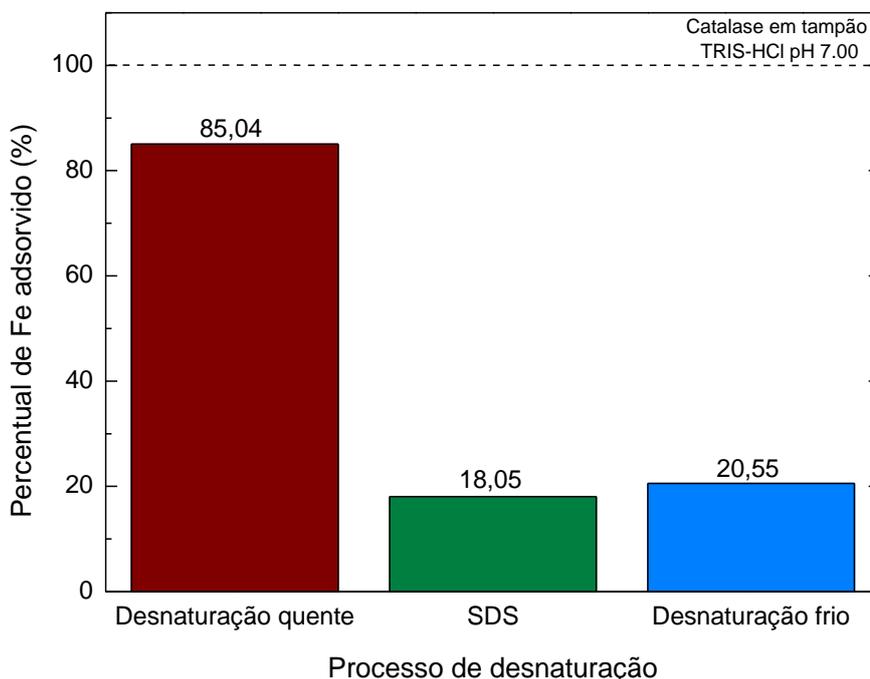
De acordo com a literatura, a concentração aproximada de Fe presente em uma solução de catalase 3 mg. L⁻¹ é na ordem de 1000 vezes menor, então a concentração de Fe seria de 3 µg. L⁻¹, sendo assim, seria impossível determinar essa concentração no FAAS. Portanto justifica-se trabalhar com concentrações de catalase de 3 mg. mL⁻¹ e consequentemente o Fe estará na ordem de 3 mg. L⁻¹ (3 ppm), sendo facilmente determinado por FAAS.

Ao se percolar a catalase solubilizada (3 mg. mL⁻¹) em tampão Tris-HCl (0,01 mol. L⁻¹) em 15 mg de material RACNT-BSA (br.) não obtivemos sucesso, pois as

medidas de determinação de Fe por FAAS não mostraram nenhuma diferença na concentração de Fe antes e após as sucessivas percolações. A princípio, houve a suspeita em relação ao tempo de contato entre a solução de catalase e o RACNT-BSA (br.), pois o tempo de percolação durou 5 min. Então, aumentou-se o tempo de contato em 20 min e também por 12 h e ainda assim não houve a extração de Fe na catalase empregando o RACNT-BSA (br.).

Diante desses resultados, realizou-se alguns processos de desnaturação, uma vez que as proteínas são altamente sensíveis a mudanças no meio e desvios de condições fisiológicas podem afetar sua conformação. Fatores como pH, temperatura, força iônica, entre outros, pode afetar a atividade das proteínas. Assim, na figura 40, apresentam-se os resultados de adsorção de Fe obtidos por FAAS, após a solução de catalase (3 mg. mL^{-1}) em tampão Tris-HCl ($0,01 \text{ mol. L}^{-1}$) sofrer os três processos de desnaturação (a quente, com adição de SDS ou ciclos intercalados de frio e quente) e ficar em contato com 15 mg de material RACNT-BSA (br.) durante 20 min.

Figura 40 - Comparação dos processos de desnaturação proteíca.

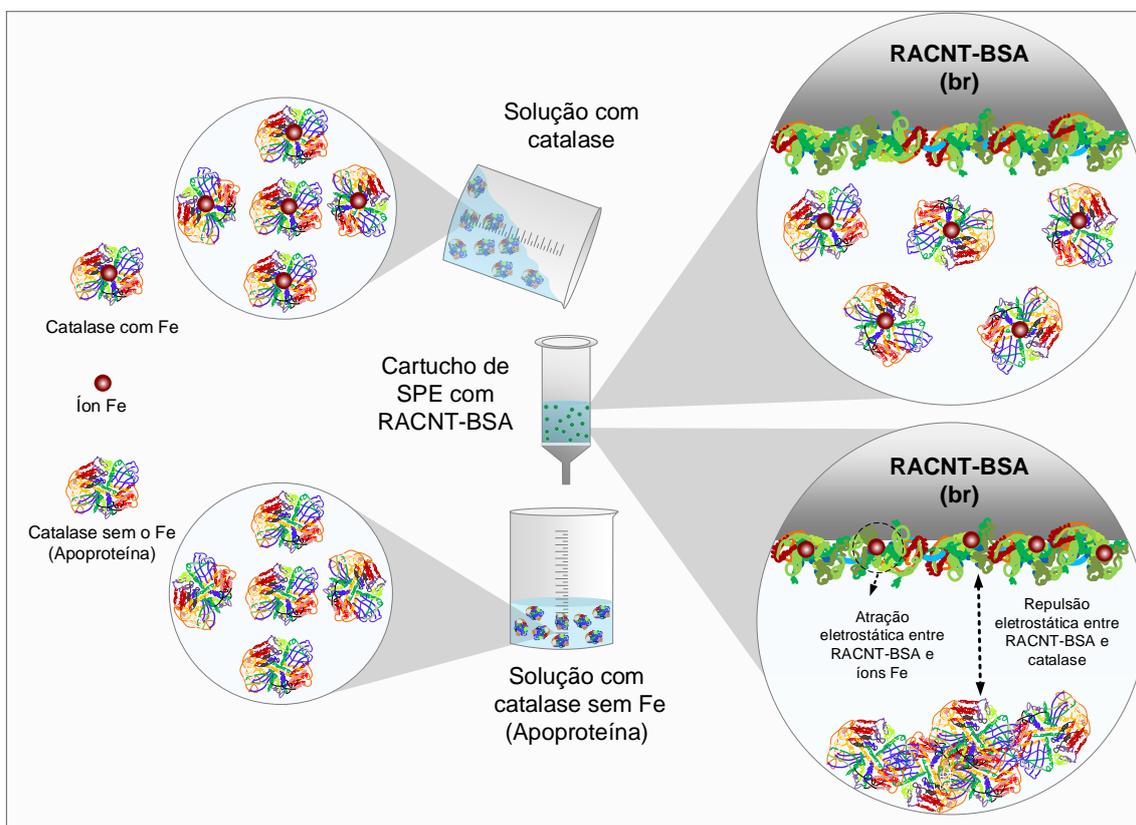


Fonte: Do autor.

De acordo com os resultados da Figura 40, o RACNT-BSA (br.) possui um elevado potencial para aplicações na produção de apoproteínas, no qual se baseia na exclusão de catalase e simultaneamente extração íons Fe na mesma. A Figura 41

representa, de forma geral, o mecanismo de atração eletrostática entre a superfície do RACNT-BSA e o Fe presente na catalase e também repulsão eletrostática da catalase em relação a superfície do material.

Figura 41 - Exclusão de catalase e adsorção de Fe no RACNT-BSA (br).



Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÃO

Os RACNT-BSA descritos nesse trabalho são interessantíssimos e possuem inúmeras aplicações bioanalíticas e ainda com várias características não estudadas, nos impulsionando à uma nova área de pesquisa. Portanto, diante dessa vasta gama de possibilidades de estudos apresentamos nossas conclusões.

O processo de oxidação dos CNT puros, empregando ácido nítrico em concentrações diferentes, se mostrou eficiente para purificação do material, sendo este utilizado para as etapas posteriores como no recobrimento com a BSA intercruzada resultando nos RACNT-BSA.

De acordo com a técnica de caracterização, empregando a espectroscopia de infravermelho, foi possível sugerir o aparecimento de alguns grupos funcionais decorrentes dos processos de oxidação da superfície dos CNT puros e após o recobrimento com BSA intercruzada com glutaraldeído. Já os termogramas dos RACNT-BSA o indicaram como um material aplicável, visto que as amostras de RACNT-BSA iniciaram as perdas de massa de degradação em torno de 308° C, ou seja, uma temperatura muito acima das utilizadas em processos bioanalíticos.

Os RACNT-BSA apresentaram um elevado potencial em adsorver íons metálicos de Pb^{2+} , Cd^{2+} e Fe^{2+} e podem excluir proteínas solúveis em água como a BSA e Catalase, porém os processos adsortivos são influenciados principalmente pela alteração do pH do meio proteico e pelo tampão utilizado. Assim, sugere-se que o mecanismo de interação entre os RACNT-BSA está relacionado com as interações eletrostáticas entre a superfície dos RACNT-BSA e as proteínas em solução.

Para melhor entendimento dos processos adsortivos em relação a íons metálicos, realizou-se um estudo mais detalhado empregando as curvas de cinética de adsorção dos materiais. O CNT p e RACNT-BSA (br.) mostraram comportamentos similares quanto ao tempo de contato com a solução de íons ferro. O RACNT-BSA (br.) se destacou entre os demais por possuir o maior percentual de íons ferro adsorvido em sua superfície. Este fato pode estar relacionado com o processo de oxidação realizada na superfície do CNT, por se tratar de uma oxidação mais branda com HNO_3 (2,6 mol. L^{-1}).

Por fim, o RACNT-BSA (br.) possui um elevado potencial para aplicações na produção de apoproteínas, uma vez que se obteve êxito na extração dos íons Fe da catalase em contato com o material, mesmo em condições de desnaturação. Entendeu-se que o

processo de produção das apoproteínas foi bastante simples, uma vez que houve um mínimo de manipulação na amostra proteica. Dessa maneira, atingimos o objetivo proposto para este trabalho, pois contribuímos para o estudo dos RACNT-BSA e, como aplicação, obtivemos apoproteínas a partir da proteína catalase.

Pode-se pensar como etapas futuras ou continuação deste trabalho, quanto aos processos de desnaturação da proteína catalase. Poderia-se realizar um estudo mais detalhado dos meios e condições da desnaturação e aplicá-los na obtenção de apoproteínas via RACNT-BSA (br.), bem como sua renaturação, além da exploração de muitas outras proteínas e aplicações dos RACNT-BSA.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical chemistry of surfaces**. 6. ed. California, 1967.

AHMAD, B. et al. Guanidine hydrochloride denaturation of human serum albumin originates by local unfolding of some stable loops in domain III. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**. v.1750, p.93-102, 2005.

AMUDA, O.; GIWA, A.; BELLO, I. Removal of heavy metal from industrial wastewater using modified activated coconut shell carbon. **Biochemical Engineering Journal**. v.36, p.174-181, 2007.

BARBOSA, A. F. et al. Restricted access carbon nanotubes for direct extraction of cadmium from human serum samples followed by atomic absorption spectrometry analysis. **Talanta**. v.131, p.213-220, 2015.

BARBOSA, V. M. P. **Emprego de Nanotubos de carbonos de acesso restrito na extração/pré-concentração direta de chumbo em amostras de soro humano seguido de análise por espectrometria de absorção atômica**. 64f. Mestrado em Química, Universidade Federal de Alfenas, 2015.

BARREIRO, J. C. et al. A column-switching method for quantification of the enantiomers of omeprazole in native matrices of waste and estuarine water samples. **Talanta**. v.82, p.384-391, 2010.

BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering: B**. v.119, p.105-118, 2005.

BERTOLI, A. C. et al. Structural determination of Cu and Fe–Citrate complexes: theoretical investigation and analysis by ESI-MS. **Journal of inorganic biochemistry**. v.144, p.31-37, 2015.

BYSZEWSKI, P. et al. Fullerene and nanotube synthesis. Plasma spectroscopy studies. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. v.58, p.1679-1683, 1997.

CAI, L. ET AL. Ozonation of single-walled carbon nanotubes and their assemblies on rigid self-assembled monolayers. **Chemistry of Materials**. v.14, p.4235-4241, 2002.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in protein chemistry**. v.45, p.153-203, 1994.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora da Unicamp. Campinas, São Paulo, 1999.

CHICO, J. et al. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography: Application to food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**. v.1181, p.1-8, 2008.

COELHO, M. A. Z. et al. **Tecnologia enzimática**. Editora EPUB. 2008.

CURRY, S.; BRICK, P.; FRANKS, N. P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**. v.1441, p.131-140, 1999.

DE LIMA, V. V.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de Colunas Cromatográficas de Meios de Acesso Restrito Proteína-Imobilizada e suas Avaliações para Análise de Fármacos com Injeção Direta de Plasma Humano. **Química nova**. v.29, p.72-78, 2006.

DE SOUZA FILHO, A. G.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química nova**. v.30, p.1695, 2007.

DEBRASSI, A.; LARGURA, M. C. T.; RODRIGUES, C. A. Adsorção do corante vermelho congo por derivados da O-Carboximetilquitosana hidrofobicamente modificados. **Química Nova**. v.34, p.764-770, 2011.

DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.544, p.25-39, 1991.

DOS REIS COIMBRA, J. S.; TEIXEIRA, J. A. **Engineering aspects of milk and dairy products**. CRC Press. 2009.

DU, P. et al. Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme on Functionalized Carbon Nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry C**. v.118, p.22249-22257, 2014.

DUKOVIC, G. et al. Racemic single-walled carbon nanotubes exhibit circular dichroism when wrapped with DNA. **Journal of the American Chemical Society**. v.128, p.9004-9005, 2006.

EDRI, E.; REGEV, O. pH effects on BSA-dispersed carbon nanotubes studied by spectroscopy-enhanced composition evaluation techniques. **Analytical Chemistry**. v.80, p.4049-4054, 2008.

FENG, W.; JI, P. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. **Biotechnology advances**. v.29, p.889-895, 2011.

FOO, K.; HAMEED, B. Detoxification of pesticide waste via activated carbon adsorption process. **Journal of Hazardous Materials**. v.175, p.1-11, 2010.

GE, C. ET et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.108, p.16968-16973, 2011.

GUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y. New insight into the binding interaction of hydroxylated carbon nanotubes with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.124, p.556-563, 2014.

GUO, M. et al. Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes. **Bioelectrochemistry**. v.62, p.29-35, 2004.

GUO, Q. et al. Synthesis, crystal structure and interaction of l-valine Schiff base divanadium (V) complex containing a V₂O₃ core with DNA and BSA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v.106, p.155-162, 2013.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. 1992.

HERRERA-HERRERA, A. V. et al. Carbon nanotubes applications in separation science: a review. **Analytica chimica acta**. v.734, p.1-30, 2012.

HUANG, W. et al. Attaching proteins to carbon nanotubes via diimide-activated amidation. **Nano Letters**. v.2, p.311-314, 2002.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **nature**. v.354, p.56-58, 1991.

JIA, N. et al. Bamboo-like CN x nanotubes for the immobilization of hemoglobin and its bioelectrochemistry. **Electrochemistry communications**. v.7, p.349-354, 2005.

JIA, Z. et al. Production of short multi-walled carbon nanotubes. **Carbon**. v.37, p.903-906, 1999.

JIANG, K. et al. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. **J. Mater. Chem**. v.14, p.37-39, 2004.

JIANG, K. et al. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. **Journal of Materials Chemistry**. v.14, p.37-39, 2004.

KARAGIANNI, K.; MONIN, V.; SASSI, J. F. Substituted Guar Protein Extracts and Production/Applications Thereof, Google Patents.(2010)

KIM, U. J. et al. Raman and IR spectroscopy of chemically processed single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**. v.127, p.15437-15445, 2005.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.81, p.4343-4347, 1984.

LANGMUIR, I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS. **Journal of the American Chemical Society**. v.38, p.2221-2295, 1916.

LEHMAN, J. H. et al. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. **Carbon**. v.49, p.2581-2602, 2011.

LI, Y.-H. et al. Lead adsorption on carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**. v.357, p.263-266, 2002.

LIU, J. et al. Fullerene pipes. **Science**. v.280, p.1253-1256, 1998.

LIU, Y.; LIU, Y.-J. Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. **Separation and Purification Technology**. v.61, p.229-242, 2008.

LU, C.; LIU, C. Removal of nickel (II) from aqueous solution by carbon nanotubes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.81, p.1932-1940, 2006.

MARION, M. B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

MASINI, J. C. Evaluation of neglecting electrostatic interactions on the determination and characterization of the ionizable sites in humic substances. **Analytica chimica acta**. v.283, p.803-810, 1993.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**. McGraw-Hill New York. 1993.

MESQUITA, J. P. D.; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, H. D. F. Characterization of copper adsorption on oxidized activated carbon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.17, p.1133-1143, 2006.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free radical Biology and medicine**. v.17, p.235-248, 1994.

MIYATA, Y.; MANIWA, Y.; KATAURA, H. Selective oxidation of semiconducting single-wall carbon nanotubes by hydrogen peroxide. **The Journal of Physical Chemistry B**. v.110, p.25-29, 2006.

MORIKAWA, M. et al. Effect of pretreatments to carbon nanotubes on protein adsorption. **Nano Biomedicine**. v.4, p.35-41, 2012.

MOTTA, V. T. Bioquímica básica. **Autolab Análises Clínicas, cap.** v.9, p.227, 2006.

MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of biochemical and biophysical methods**. v.70, p.263-273, 2007.

MURTHY, M. R. et al (1982). The Structure of Beef Liver Catalase. *The Biological Chemistry of Iron*, Springer: 439-458.

NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances–Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**. v.14, p.53-71, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. (2011). Princípios de bioquímica de Lehninger. Princípios de Bioquímica de Lehninger, Artmed.

NICHOLLS, P. Classical catalase: ancient and modern. **Archives of biochemistry and biophysics**. v.525, p.95-101, 2012.

ORTEGA, F. et al. Aspectos da reologia e da estabilidade de suspensões cerâmicas. Parte I: fundamentos. **Cerâmica**. v.43, p.5-10, 1997.

PETERS JR, T. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. Academic press. 1995.

PORPINO, K. K. P. et al. Fe (II) adsorption on *Ucides Cordatus* crab shells. **Química Nova**. v.34, p.928-932, 2011.

PORTER, A. E. et al. Uptake of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells. **Acs Nano**. v.3, p.1485-1492, 2009.

RAO, G. P.; LU, C.; SU, F. Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by carbon nanotubes: a review. **Separation and Purification Technology**. v.58, p.224-231, 2007.

RINZLER, A. G. et al. Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: process, product, and characterization. **Applied Physics A**. v.67, p.29-37, 1998.

ROSARIO-CASTRO, B. I. et al. Combined electron microscopy and spectroscopy characterization of as-received, acid purified, and oxidized HiPCO single-wall carbon nanotubes. **Materials Characterization**. v.60, p.1442-1453, 2009.

SADÍLEK, P.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. v.26, p.375-384, 2007.

SAIFUDDIN, N.; RAZIAH, A.; JUNIZAH, A. Carbon nanotubes: a review on structure and their interaction with proteins. **Journal of Chemistry**. v.2013, 2012.

SAITO, R.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S. **Physical properties of carbon nanotubes**. World Scientific. 1998.

SAMEJIMA, T.; KAMATA, M.; SHIBATA, K. Dissociation of bovine liver catalase at low pH. **Journal of biochemistry**. v.51, p.181-187, 1962.

SCURTU, V.-F.; MOȚ, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R. Protein-Based Blood Substitutes: Recent Attempts at Controlling Pro-Oxidant Reactivity with and Beyond Hemoglobin. **Pharmaceuticals**. v.6, p.867-880, 2013.

SEGEN, J. Segen's Medical Dictionary. **Concise Medical Dictionary by Dr. Joseph Segen**. 2010.

SHEN, J.-W. et al. Induced stepwise conformational change of human serum albumin on carbon nanotube surfaces. **Biomaterials**. v.29, p.3847-3855, 2008.

SHIM, J.-W.; PARK, S.-J.; RYU, S.-K. Effect of modification with HNO₃ and NaOH on metal adsorption by pitch-based activated carbon fibers. **Carbon**. v.39, p.1635-1642, 2001.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. John Wiley & Sons. 2014.

SINNOTT, S. B. Chemical functionalization of carbon nanotubes. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.2, p.113-123, 2002.

SOLDATOV, V. et al. Acid–base properties of ion exchangers. I. Optimising of potentiometric titration of ion exchangers exemplified by carboxylic acid resins. **Reactive and functional Polymers**. v.58, p.3-12, 2004.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography B**. v.801, p.141-156, 2004.

SRIVASTAVA, A. et al. Carbon nanotube filters. **Nat Mater**. v.3, p.610-614, 2004.

SRIVASTAVA, S. Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by oxidized carbon nanotubes and nanocages: A review. **Adv. Mater. Lett**. v.4, p.2-8, 2013.

SUN, Y.-P. et al. Functionalized carbon nanotubes: properties and applications. **Accounts of Chemical Research**. v.35, p.1096-1104, 2002.

TAKADA, T. et al. Interaction of multi-walled carbon nanotubes with water-soluble proteins: effect of sidewall carboxylation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.14, p.3216-3220, 2014.

TASIS, D. et al. Chemistry of carbon nanotubes. **Chemical Reviews**. v.106, p.1105-1136, 2006.

TCHOUL, M. N. et al. Effect of mild nitric acid oxidation on dispersability, size, and structure of single-walled carbon nanotubes. **Chemistry of Materials**. v.19, p.5765-5772, 2007.

TERRONES, M. Science and technology of the twenty-first century: synthesis, properties, and applications of carbon nanotubes. **Annual review of materials research**. v.33, p.419-501, 2003.

TRIGUEIRO, J. P. C. et al. Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM, and SEM methods. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.7, p.3477-3486, 2007.

VELOSO, C. M.; DO CARMO RANGEL, M. Preparação de carbonos porosos por moldagem sequencial. **Quim. Nova**. v.32, p.2133-2141, 2009.

VIEIRA, H. et al. Decarboxylation of oxidized single-wall carbon nanotubes. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.7, p.3421-3430, 2007.

VIJAYARAJ, M. et al. The influence of surface chemistry and pore size on the adsorption of proteins on nanostructured carbon materials. **Advanced Functional Materials**. v.20, p.2489-2499, 2010.

WORSLEY, K. A. et al. Functionalization and dissolution of nitric acid treated single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**. v.131, p.18153-18158, 2009.

ZHANG, J. et al. Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**. v.107, p.3712-3718, 2003.

ZHANG, X. et al. Properties and structure of nitric acid oxidized single wall carbon nanotube films. **The Journal of Physical Chemistry B**. v.108, p.16435-16440, 2004.

ZHAO, B.; HU, H.; HADDON, R. C. Synthesis and properties of a water-soluble single-walled carbon nanotube-poly (m-aminobenzene sulfonic acid) graft copolymer. **Advanced Functional Materials**. v.14, p.71-76, 2004.

ZHAO, W.; SONG, C.; PEHRSSON, P. E. Water-soluble and optically pH-sensitive single-walled carbon nanotubes from surface modification. **Journal of the American Chemical Society**. v.124, p.12418-12419, 2002.

ZHU, J. et al. Improving the dispersion and integration of single-walled carbon nanotubes in epoxy composites through functionalization. **Nano Letters**. v.3, p.1107-1113, 2003.

ZIEGLER, K. J. et al. Controlled oxidative cutting of single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**. v.127, p.1541-1547, 2005.