



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA – CCEN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

SANDRO VAGNER DE LIMA

**INVESTIGAÇÃO DE SISTEMAS E PROCESSOS BIOLÓGICOS PELA TÉCNICA
DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA**

Recife
2015

SANDRO VAGNER DE LIMA

**INVESTIGAÇÃO DE SISTEMAS E PROCESSOS BIOLÓGICOS PELA
TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Física.

Orientador:
Prof. Dr. Celso Pinto de Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Co-Orientador:
Prof. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Recife

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB 4-572

L732i Lima, Sandro Vagner de.
Investigação de sistemas e processos biológicos pela técnica de espectroscopia de impedância elétrica / Sandro Vagner de Lima. – Recife: O Autor, 2015.
136 f.: fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Física, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Matéria condensada. 2. Proteínas globulares. 3. Impedância (Eletricidade). 4. Ácido desoxirribonucleico – Análise. I. Melo, Celso Pinto de (Orientador). II. Título.

530.41

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2015-48

SANDRO VAGNER DE LIMA

**INVESTIGAÇÃO DE SISTEMAS E PROCESSOS BIOLÓGICOS PELA
TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Física.

Aprovada em: 08/10/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo
Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Flávio Menezes de Aguiar
Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mauro Copelli Lopes da Silva
Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mario Engelsberg
Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães
Examinador Externo
Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial

Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo
Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

*Este trabalho é dedicado a minha família:
minha mãe Maria de Lourdes, meu pai Luís,
minha avó Teresinha e meu avô Valdomiro pelo
carinho, valores e ensinamentos.*

Agradecimentos

A Deus pela vida, pelos desafios que proporcionam oportunidades de crescimento e aprendizados.

Aos meus pais pela simplicidade, honestidade, e valores transmitidos ao longo dos anos.

Às minhas irmãs Carla e Luana pelo carinho.

Aos meus avós Terezinha e Valdomiro pelo cuidado e preocupação de sempre.

A Ana Fabrícia pelo amor, cuidado, dedicação, paciência e a força durante os momentos de dificuldades.

A Maria de Fátima pelo cuidado de sempre.

Ao professor Celso pela oportunidade, orientação, disponibilidade e pelos ensinamentos durante a realização desta tese.

Ao professor Helinando pela simplicidade, paciência, amizade, incentivos e seu entusiasmo em tudo que faz.

Aos colegas Rodrigo e Javier pelas ajudas nas intermináveis listas dos cursos.

Aos colegas Alicia, Juan, Isaac, Etelino, Hugo, Renata, Manuela, pela paciência e o ombro amigo nos momentos de alegrias e dificuldade.

Aos colegas do grupo Polímeros Não – Convencionais pela troca de ideias e experiências ao longo do doutorado.

Ao Henrique, Jarib, Javier e Macário pelas benéficas discussões sobre ciência, e outros assuntos durante o doutorado.

À dona Edna pelos conselhos e sinceridade.

Ao programa de pós-graduação em Física pela oportunidade.

Ao CNPQ e CAPES pelo financiamento desta tese.

“O otimista é um tolo. O pessimista, um chato. Bom mesmo é ser um realista esperançoso.”.

Ariano Suassuna

Resumo

Esta tese de doutorado foi dedicada à investigação do modo como a técnica de espectroscopia de impedância elétrica (EIE) poderia ser usada para acompanhar os processos de mudanças conformacionais de macromoléculas biológicas, como proteínas e DNA. Para isso, usamos como sistemas modelos a proteína albumina do soro bovino (BSA), e a formação do complexo polianilina/DNA (PANI/DNA). Com a caracterização de soluções de DNA e BSA por EIE e sua modelagem elétrica convenientemente descrita pelo circuito de Randles (e sua variante), foram determinados os parâmetros relevantes para descrição dos fenômenos de desnaturação e de agregação da proteína e da precipitação do complexo PANI/DNA. As informações obtidas sobre a solubilidade desses últimos complexos são de grande utilidade para o entendimento dos mecanismos de interação entre cadeias de DNA e de polímeros condutores. Do mesmo ponto de vista da EIE, as sucessivas mudanças da conformação da proteína e os detalhes da cinética de sua agregação na interação com surfactantes foram adequadamente correlacionados com a característica elétrica do circuito de Randles das soluções correspondentes. Finalmente, estudos iniciais foram estendidos para a análise dos processos de fibrilação de proteínas. Para todos os problemas abordados, o uso da resistência de transferência de carga elétrica (R_{CT}) (um parâmetro do circuito de Randles) nos permite sugerir ser a técnica de EIE apropriada para caracterizar as diferentes mudanças conformacionais envolvidas em fenômenos que resultam da interação de biomoléculas com moléculas de prova. Assim, ela se confirma como um método competitivo quando comparado ao uso da fluorescência e da absorção UV-Vis (técnicas rotineiramente adotadas para a análise desses problemas).

Palavras-chave: *Proteína. DNA. Mudanças conformacionais. Fibrilação, Espectroscopia de impedância elétrica.*

Abstract

This doctoral thesis was devoted to the investigation of the technique of electrical impedance spectroscopy as an alternative method to assess conformational changes of biological macromolecules, such as proteins and DNA. For this, we used protein bovine serum albumin (BSA), and the formation of polyaniline (PANI)/DNA complexes as model systems. With the characterization of DNA and BSA solutions by Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) and their electrical modeling conveniently described by the Randles circuit (and its variant), we determined the relevant characteristics of phenomena such as the denaturation and aggregation of proteins (BSA), and polymer/DNA complex formation (PANI/DNA). As a result of this approach we identified the existence of different interaction regimes between the chains of polyaniline and DNA molecules that are dependent on the concentration of PANI/DNA and the existence of equilibrium conditions which separate regions of precipitation/stability the PANI/DNA complex. Also from this point of view, the modes of interaction BSA / surfactants involved in the conformation changes well as typical stages associated with fibrillation kinetics were adequately correlated with the electric characteristic of the Randles circuit. In all studies carry out in this thesis, the analysis of the electric charge transfer resistance behavior (R_{CT}) (a parameter of the Randles circuit) when confronted with the results obtained by standard techniques showed that the EIS presents reliable and some comparative advantages. These results allow us to provide an adequate and competitive alternative to conventional methods such as UV-Visible absorption, fluorescence and the use of probe molecules.

Keywords: *Protein. DNA. Unfolding. Fibrillation. Electrical impedance spectroscopy.*

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Estrutura dos 20 aminoácidos.....	21
Figura 2.2 - Diferentes níveis de organização molecular de uma proteína.....	22
Figura 2.3 - (A) Formação da estrutura primária de uma proteína. (B) Recorte da cadeia de um polipeptídeo mostrando as rotações permitidas e restrições da estrutura primária; em azul, as ligações que são livres para rotacionar; em verde, os átomos e ligações restritos a um mesmo plano.	23
Figura 2.4 - Principais estruturas secundárias.....	24
Figura 2.5 - Principais interações envolvendo cadeias laterais de aminoácidos responsáveis pela formação da estrutura terciária..	26
Figura 2.6 - Esquema da cinética de fibrilação de uma proteína caracterizada pelos estágio lento, de crescimento das fibrilas e a fase de equilíbrio.....	29
Figura 2.7 - Moléculas constituintes da unidade monomérica do DNA. Grupo fosfato em azul escuro, desoxirribose em laranja, adenina em vermelho, guanina em azul claro, timina em verde e citosina em violeta.....	30
Figura 2.8 - (a) Dupla hélice do DNA. (b) Orientação antiparalela das fitas de DNA..	31
Figura 3.1 - Número de publicações e citações de trabalhos relacionados a espectroscopia de impedância elétrica nos últimos vinte anos	34
Figura 3.2 - Efeito do campo elétrico nos portadores de carga elétrica..	36
Figura 3.3 - Dependência da polarização elétrica com frequência.....	38
Figura 3.4 - Função corrente e potencial com função tempo e o ângulo de fase.	40
Figura 3.5 - Circuito RC em paralelo.	46
Figura 3.6 - Diagramas de Bode (A) e de Nyquist (B) para um circuito RC em paralelo, representando sistemas com um único tempo característico.....	47
Figura 3.7 - Circuito de Randles.....	47
Figura 3.8 - A) Diagrama de Bode e B) Diagrama de Nyquist para um circuito de Randles.....	48
Figura 3.9 - Distribuição de íons na proximidade da interface eletrodo/solução, mostrando a camada de hidratação (CH), a camada de Helmholtz (CHMZ) e a camada de Gouy-Chapman (CGCH)..	49
Figura 3.10 - Comparação entre o comportamento ideal e real da dupla camada elétrica.	50
Figura 4.1 - Esquema de protonação da PANI-EB com DBSA levando a formação do complexo PANI-ES.	55
Figura 4.2 - Montagem experimental das medidas de impedância elétrica.....	57
Figura 4.3 - Micrografias de PANI pura e dos complexos PANI/DBSA, DNA/CTAB e PANI/DNA.....	58
Figura 4.4 - Espectros de infravermelho de DNA puro, PANI puro e do complexo PANI/DNA.	59
Figura 4.5 - Espectros dos sobrenadantes das misturas dos complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB em diferentes razões estequiométricas do $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. No detalhe, o espectro UV-Vis da solução PANI/DBSA com suas bandas características.....	62
Figura 4.6 - Mapa 3D da parte real da impedância da soluções sobrenadantes que caracterizam a formação de complexos PANI/DNA como função da frequência aplicada e razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$	64
Figura 4.7 - Diagrama de Nyquist das soluções sobrenadantes que caracterizam a formação de complexos PANI/DNA como função da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$ e, no detalhe, o circuito de Randles usado como modelo	

<i>equivalente dos dados experimentais. As linhas correspondem aos resultados dos ajustes feitos usando circuito modelo.</i>	65
<i>Figura 4.8 - Comparação de como a absorbância (em 790nm) e a resistência de transferência de carga elétrica das soluções sobrenadante varia como função da razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. As linhas são apenas guias para olhos.</i>	67
<i>Figura 4.9 - Representação esquemática para os mecanismos de formação do complexo PANI/DNA.</i>	70
<i>Figura 5.1- Espectro de absorção UV-Vis do complexo PANI-Au/DBSA, onde se destaca seus picos característicos (linhas tracejadas).</i>	77
<i>Figura 5.2 – Espectros característicos de absorção UV-Vis das soluções sobrenadante em diferentes razões estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$.</i>	78
<i>Figura 5.3 - Espectro de emissão de fluorescência da solução sobrenadante resultante da mistura dos complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB para diferentes razões estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$.</i>	79
<i>Figura 5.4 - Diagrama de Nyquist da solução sobrenadante resultante da mistura dos complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB em função da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$. As linhas correspondem aos ajustes feitos usando o circuito equivalente apresentado no detalhe.</i>	80
<i>Figura 5.5 - Comparação entre a resposta de absorbância em 318 nm, intensidade de fluorescência em 440 nm e a resistência de transferência de carga da solução sobrenadante resultante da mistura dos complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB em função da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$. As linhas são apenas guias para os olhos.</i>	82
<i>Figura 5.6 – A) Estrutura química geral da polianilina. B) Conversão da base esmeraldina para sal esmeraldina através da protonação por ácidos. C) Conversão da base leucoesmeraldina para sal leucoesmeraldina através da protonação por ácidos.</i>	84
<i>Figura 6.1 - Espectros de emissão de fluorescência das soluções de BSA em diferentes concentrações dos surfactantes SDS(aniônico), DTAB (catiônico) e Triton X-100 (não-iônico).</i>	92
<i>Figura 6.2 - Diagrama de Nyquist das soluções de BSA em diferentes concentrações dos surfactantes SDS (aniônico), DTAB (catiônico) e Triton X-100 (não-iônico).As linhas correspondem aos ajustes feitos usando o circuito elétrico equivalente apresentado na Figura 6.3.</i>	93
<i>Figura 6.3 - Circuito elétrico equivalente usado para ajustar o comportamento de soluções de BSA em diferentes concentrações dos surfactantes SDS (aniônico), DTAB (catiônico) e Triton X-100 (não-iônico).</i>	94
<i>Figura 6.4 - Representação esquemática das sucessivas etapas do processo de desnaturação de proteína induzido por surfactantes.</i>	96
<i>Figura 6.5 - Comparação entre a metodologia padrão (fluorescência) e a alternativa aqui proposta (EIE) no estudo do processo de desnaturação da BSA induzido pelo surfactante SDS.</i>	97
<i>Figura 6.6 - Comparação entre a metodologia padrão (fluorescência) e a alternativa aqui proposta (EIE) no estudo do processo de desnaturação da BSA induzido pelo surfactante DTAB.</i>	98
<i>Figura 6.7 - Comparação entre a metodologia padrão (fluorescência) e a alternativa aqui proposta (EIE) no estudo do processo de desnaturação da BSA induzido pelo surfactante Triton X-100.</i>	99
<i>Figura 7.1 - Montagem experimental para realização de cinética de fibrilação de BSA.</i>	103
<i>Figura 7.2 - Estrutura química do vermelho do Congo e os modos de interação com as fibrilas. Em A,) um recorte de fibrila, em B), a estrutura química do vermelho do Congo e, em C), os possíveis modelos de ligação</i>	

<i>da molécula de vermelho do Congo com as fibrilas; em paralelo (i) ou perpendicular(ii) à direção das fibrilas.</i>	105
<i>Figura 7.3 - Método padrão: espectro de absorção do corante vermelho do Congo como função do tempo de incubação de BSA na temperatura de 70°C.</i>	106
<i>Figura 7.4 - Cinética de fibrilação da BSA acompanhada por absorção no UV-Vis (método padrão).</i>	107
<i>Figura 7.5 - Espectros de impedância das soluções de BSA na ausência do vermelho do Congo ao longo da cinética de fibrilação. Os pontos representam os dados da medição enquanto que as linhas são ajustes feitos usando o circuito elétrico equivalente mostrado na Figura 6.3.</i>	108
<i>Figura 7.6 - Parâmetros resistência de transferência de cargas (RCT) e a capacitância (C) em diferentes tempo da cinética apontam que a EIE fornece informações adequadas sobre o processo de fibrilação da BSA.</i>	109
<i>Figura 7.7 - Comparação entre EIE (método alternativo) e absorbância (método padrão) para acompanhar a cinética de fibrilação da proteína BSA.</i>	110
<i>Figura 7.8 - Processo de desnaturação da BSA acompanhada por EIE.</i>	111
<i>Figura 7.9 – Ajuste exponencial para cinética de fibrilação da BSA acompanhado pelo método padrão (azul) e o alternativo (preto).</i>	112
<i>Figura 8.1 - Comparação das estruturas química do vermelho do Congo e a leucoesmeraldina.</i>	117

Lista de Equações

(3. 1).....	39
(3. 2).....	39
(3. 3).....	41
(3. 4).....	42
(3. 5).....	42
(3. 6).....	42
(3. 7).....	42
(3. 8).....	42
(3. 9).....	42
(3. 10).....	42
(3. 11).....	43
(3. 12).....	43
(3. 13).....	43
(3. 14).....	43
(3. 15).....	44
(3. 16).....	44
(3. 17).....	44
(3. 18).....	46
(3. 19).....	46
(3. 20).....	46
(3. 21).....	46
(3. 22).....	48
(3. 23).....	51
(6. 1).....	94
(6. 2).....	95
(6. 3).....	96
(6. 4).....	97
(7. 1).....	106

Lista de Abreviações

- A
adenina, 32
- BSA
albumina do soro bovino, 19, 25, 29, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 99, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116
- C
citosina, 32
- C_{DL}
capacitância de dupla camada elétrica, 48, 49
- CGCH
camada de Gouy-Chapman, 49
- CH
camada de hidratação, 48, 49
- CHMZ
camada de Helmholtz, 49
- C-N
ligação peptídica, 22, 25
- CPE
elemento de fase constante, 35, 50, 51, 94
- CTAB
brometo de cetiltrimetilamônio, 53, 54, 55, 56, 58, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 75
- DBSA
ácido dodecilbenzeno sulfônico, 53, 54, 55, 56, 58, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 82, 85, 116
- DNA
ácido desoxirribonucleico, 17, 19, 30, 31, 32, 33, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 69, 70, 72, 73, 76, 78, 80, 81, 84, 85, 86, 87
- DTAB
brometo de dodeciltrimetilamônio, 74, 75, 76, 79, 80, 82, 85, 89, 90, 91, 93, 94, 98
- EIE
espectroscopia de impedância elétrica, 17, 18, 19, 28, 35, 39, 45, 63, 68, 70, 71, 80, 81, 86, 89, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 104, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 118
- FTIR
espectroscopia no infravermelho, 17, 57, 59, 61
- G
guanina, 32
- HCl
ácido clorídrico, 53, 54, 75
- N
Nitrogênio, 54
- PANI
polianilina, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 78, 82, 83, 84, 85, 86, 115
- R_{CT}
resistência de transferência de cargas, 48, 49, 66, 68, 81, 85, 101, 108, 109, 116
- R_S
resistência elétrica de volume, 47, 49, 66
- S
Enxofre, 54
- SDS
dodecil sulfato de sódio, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 98
- T
timina, 32
- UV-Vis
ultravioleta-visível, 18, 62, 74, 76, 77, 80, 102, 103, 104, 107, 109, 115

Sumário

Capítulo 1 - Introdução	17
Objetivo Geral:	18
Objetivos Específicos:	19
Capítulo 2 – Biomoléculas: Proteínas e seus processos de auto-organização;DNA e sua estrutura	20
2.1 - Proteínas: Composição	20
2.2 - Estrutura primária de uma proteína	22
2.3 - Estruturas secundárias de uma proteína	23
2.4 - Estrutura terciária de uma proteína	26
2.5 - Estrutura quaternária de uma proteína	27
2.6 - Processos de desnaturação e agregação das proteínas	28
2.7 - A molécula de DNA e sua estrutura	30
Capítulo 3 - Espectroscopia de impedância elétrica	34
3.1 - Breve Histórico	34
3.2 - Comportamento elétrico/dielétrico de materiais	36
3.3 - Fundamentos físico-matemáticos da EIE	39
3.4 - Representação e análise da espectroscopia de impedância elétrica	44
Capítulo 4 - O uso da espectroscopia de impedância elétrica como método alternativo para estudar a formação de complexos polianilina/DNA	52
4.1 - Materiais e Métodos	53
4.1.2 - Materiais	53
4.1.3 - Métodos	54
4.2 - Resultados	58
4.2.1 - Análise MEV	58
4.2.2 - Análise de infravermelho	59
4.2.3 - Análise de UV-Vis	62

4.2.4 - Análise de EIE.....	63
4.3 - Discussão.....	68
4.3 - Conclusão.....	70
Capítulo 5 - A formação de complexo DNA/nanocompósito polianilina/(nanopartículas de ouro) estudada por espectroscopia de impedância elétrica.....	72
5.1 - Materiais e Métodos.....	74
5.1.1 - Materiais.....	74
5.1.2 - Métodos.....	74
5.2 - Resultados.....	76
5.2.1 - Análise UV-Vis.....	76
5.2.2 - Análise de fluorescência.....	78
5.2.3 - Análise de EIE.....	80
5.3 - Discussão.....	83
5.4 - Conclusão.....	86
Capítulo 6 – Uso da espectroscopia de impedância elétrica para análise das mudanças conformacionais em proteínas, induzidas por surfactantes.....	88
6.1 - Materiais e Métodos.....	89
6.1.1 - Materiais.....	89
6.1.2 - Métodos.....	89
6.2 - Resultados.....	90
6.2.1 - Análise de fluorescência.....	90
6.2.2 – Análise de impedância elétrica.....	92
6.3 - Discussão.....	95
6.4 – Conclusão.....	100
Capítulo 7 - Cinética de fibrilação da proteína BSA acompanhada por EIE.....	102
7.1 - Materiais e Métodos.....	102
7.1.1 - Materiais.....	102
7.1.2 - Métodos.....	103

7.2 - Resultado.....	104
7.3 - Discussão.....	110
7.4 - Conclusão.....	113
Capítulo 8 - Conclusões e Perspectivas	115
Referências	120
Anexo	135

Capítulo 1 - Introdução

Esta tese é dedicada à implementação da espectroscopia de impedância elétrica (EIE) como técnica regular para o estudo de fenômenos biológicos resultantes de interações entre biomoléculas como proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), com polímeros condutores e moléculas anfífilas (surfactantes). Para tanto, dois importantes fenômenos biológicos foram escolhidos para serem estudados através do uso da EIE: i) mecanismos de interação entre moléculas de DNA e cadeias de polímeros condutores, e ii) processos de desdobramento e fibrilação de proteínas. O mecanismo de interação de moléculas de DNA com cadeias poliméricas é um importante problema a ser abordado, uma vez que materiais híbridos do tipo (polímero condutor)/(nanopartículas metálicas) têm sido usados no grupo de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco como plataformas para o diagnóstico e identificação de doenças contagiosas. Nesse sentido, é importante buscar as condições que otimizam as interações entre esses materiais híbridos. Já o processo de desdobramento de proteínas é outro importante fenômeno ligado às mudanças na organização molecular (ou conformação) de proteínas que trazem consigo relação direta com as funções biológicas desempenhadas pela proteína, o que confirma a relevância desse estudo. Da mesma forma, o processo de fibrilação de proteínas, também resultante de mudanças conformacionais específicas dessas moléculas, é de interesse por conta de sua estreita relação com doenças conhecidas por amiloidoses, como, por exemplo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, diabetes tipo II e catarata, entre outras (SELKOE, 2003). Além disso, as conformações adotadas pela macromolécula durante esses processos resultam em ótimos moldes 3-D para a formação e organização de nanoestruturas com grandes possibilidades para aplicações em diferentes áreas, desde biosensores a células solares (BOLISSETTY et al., 2012; MEIER; LIFINCEV; WELLAND, 2015; WANG; LI; ZHONG, 2015a;2015b). Portanto, entender, aperfeiçoar e propor novos métodos e técnicas de identificação são passos importantes na direção de uma investigação mais completa desses problemas de interesse.

Nesse sentido, a proposta desta tese é aplicar a espectroscopia de impedância elétrica (EIE) como uma técnica de caracterização alternativa e/ou complementar às metodologias tradicionalmente usadas para o estudo desses problemas, como dicroísmo circular, espectroscopia no infravermelho (FTIR), espectroscopia Raman, e as espectroscopias no

ultravioleta-visível (UV-Vis) e de fluorescência. A EIE se baseia na medida da resposta elétrica da amostra de interesse (corrente elétrica) no domínio da frequência quando um pequeno estímulo (potencial elétrico oscilante no tempo) é aplicado sobre ela. Com essa metodologia, a EIE é uma técnica versátil tanto em física do estado sólido quanto em física da matéria mole, uma vez que diferentes características de uma amostra (tais como transporte de carga elétrica (iônico e eletrônico), dupla camada elétrica e processos de relaxação e de difusão de massa) podem ser identificados por meio de analogias entre a resposta observada e aquela oferecida por circuitos elétricos equivalentes. Em física da matéria mole (como é o caso deste trabalho), a EIE é uma técnica conveniente para investigar os mecanismos de agregação em moléculas anfifílicas¹ (tais como, concentração micelar crítica, ponto de névoa, ponto de Krafft em surfactantes, concentração de agregação crítica em corantes) (ARAÚJO et al., 2010; DE LIMA, S. V.; DE OLIVEIRA, 2010; DE OLIVEIRA, H. P.; OLIVEIRA; DE MELO, 2006; LIMA; OLIVEIRA, 2010). Propriedades anfifílicas são também características das proteínas e como tal estão envolvidas na ocorrência de processos de agregação em muitos processos biológicos. Sendo assim, naturalmente esta tese se propõe estender o uso de EIE para a descrição de fenômenos biológicos e mostrar sua capacidade para fornecer importantes contribuições para o entendimento dos problemas biológicos estudados.

Então os objetivos desta tese são:

Objetivo Geral:

- 1) Examinar o uso da espectroscopia de impedância elétrica como técnica alternativa e/ou complementar para o estudo de processos biológicos relacionados à formação de complexos polímeros condutores/DNA, a fibrilação e mudanças conformacionais de proteínas.

¹ As moléculas anfifílicas consistem tipicamente de uma porção hidrofílica polar com afinidade com moléculas de água (iônica ou não iônica), conhecida como cabeça polar, ligada a uma cadeia hidrofóbica que não apresenta interação com moléculas de água (formada por hidrocarbonetos).

Objetivos Específicos:

- 1) Utilizar a técnica de EIE para estudar os mecanismos de interação entre moléculas de DNA (consideradas como poliânion) e de polianilina (policátion) com diferentes estados de oxidação, tanto na ausência quanto na presença de nanopartículas de ouro.
- 2) Estudar por meio da EIE as mudanças na organização molecular de uma proteína modelo (BSA) induzidas pelo aumento progressivo da concentração de um surfactante seja ele de natureza catiônica, aniônica ou não iônica.
- 3) Caracterizar a cinética de fibrilação da proteína BSA induzida pela temperatura, usando a EIE como uma alternativa viável e competitiva às técnicas já estabelecidas.

Como acima explicitado, os objetos de estudo desta tese são: proteínas, DNA e a espectroscopia de impedância elétrica. Por essa razão, no Capítulo 2 é apresentada uma descrição dos diferentes níveis possíveis de organização molecular das proteínas e de seus processos de auto-organização e agregação, bem como examinar a estrutura e organização das cadeias de DNA. Já no Capítulo 3 é apresentada a técnica de espectroscopia de impedância elétrica, com enfoque nos seus princípios e fundamentos físico-matemáticos que tornam esta técnica versátil para caracterizar a natureza microscópica da auto agregação de biomoléculas. Nos Capítulos 4 e 5 os resultados e conclusões relacionados a formação dos complexos de polianilina/DNA foram abordados com enfoque na caracterização por EIE. Já os Capítulos 6 e 7 foram dedicados aos estudos dos processos de desnaturação e fibrilação relacionados à proteína BSA. Por fim, o capítulo 8 traz as conclusões finais e perspectivas deste trabalho de tese.

Capítulo 2 – Biomoléculas: Proteínas e seus processos de auto-organização; DNA e sua estrutura

Proteínas são biomoléculas responsáveis por uma quantidade inumerável de tarefas, tais como, controle de metabolismo, transporte de outras moléculas, construção de tecidos, divisão celular, entre outras (KRATZ, 2009; NELSON; COX, 2013). Para desempenhar essa diversidade de funções, as proteínas guardam uma estreita especificidade na relação entre a função a ser desempenhada e a correspondente conformação adotada. O termo conformação diz respeito à organização 3-D de uma proteína resultante de um delicado balanço entre diferentes tipos de interações intramoleculares. Quando essa organização é alcançada, dizemos que a proteína está na sua estrutura *nativa* e quimicamente ativa para exercer uma função biológica específica. Do contrário, a organização mesmo que perfeita pode trazer uma série de problemas, alguns dos quais podem ser relacionados à diferentes doenças. Portanto, estudar a natureza das interações que levam à má formação ou mesmo ao rompimento da estrutura 3-D das proteínas é fundamental para o entendimento da origem de problemas ocasionados pela perda da conformação de uma proteína. Para isso, antes de qualquer coisa é preciso ter em conta a composição e as interações que promovem à auto-organização de uma proteína.

2.1 - Proteínas: Composição

Do ponto de vista de sua composição, proteínas são constituídas de unidades básicas (aminoácidos) dispostas ao longo da cadeia polimérica proteica, chamada de polipeptídio (SNEPPEN; ZOCCHI, 2005). Os aminoácidos (Figura 2.1) são moléculas orgânicas com uma estrutura básica composta por uma cadeia principal formada por um átomo de carbono central (denotado por C_{α}) ligado a um grupo amina, a um grupo carboxila e a um átomo de hidrogênio e por uma cadeia lateral, que especifica cada um dos vinte aminoácidos conhecidos e que lhes conferem características de polaridade por conta da presença de grupos hidrofóbicos, hidrofílicos e eletricamente carregados (FINKELSTEIN; PTITSYN, 2002; SNEPPEN; ZOCCHI, 2005).

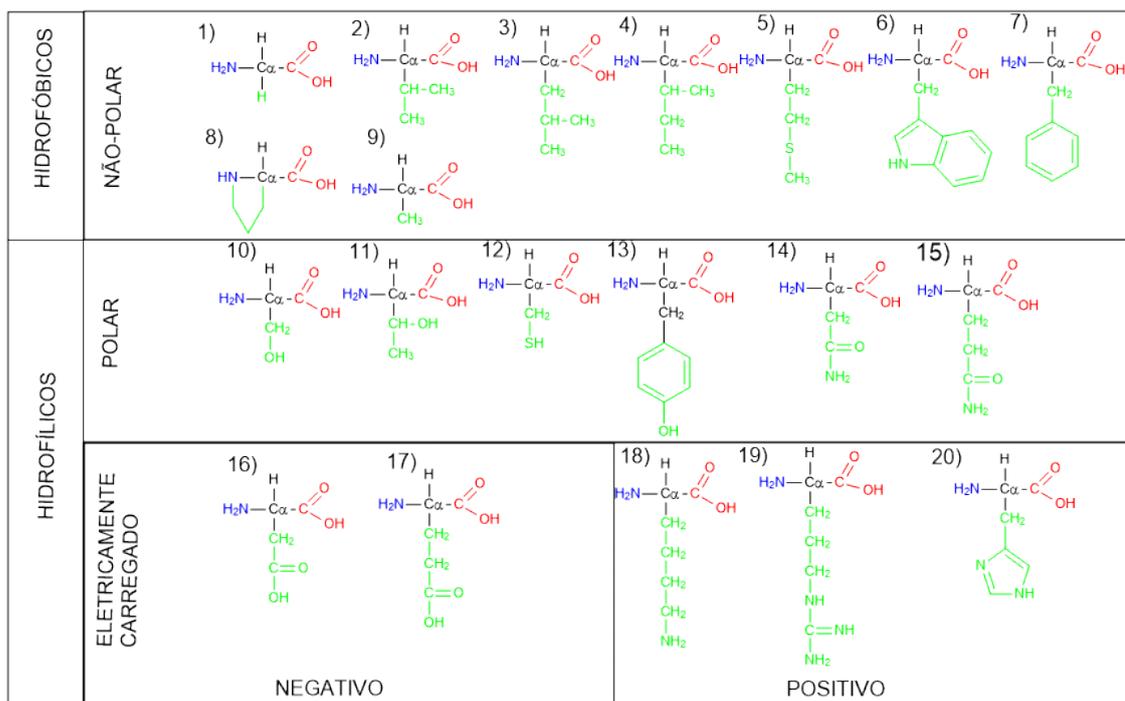


Figura 2.1 - Estrutura dos 20 aminoácidos. Em azul, o grupo amina, em vermelho, o grupo carboxila, e em verde, a cadeia lateral de: 1) Glicina, 2) Valina, 3) Leucina, 4) Isoleucina, 5) Metionina, 6) Triptofano, 7) Fenilalanina, 8) Prolina, 9) Alanina, 10) Serina, 11) treonina, 12) Cisteína, 13) Tirosina, 14) Asparagina, 15) Glutamina, 16) Ácido Aspártico, 17) Ácido Glutâmico, 18) Lisina, 19) Arginina, 20) Histidina.

Tipicamente, os aminoácidos polares e eletricamente carregados são hidrofílicos, ou seja, têm afinidade por moléculas de água devido a interações do tipo dipolo-dipolo e dipolo-carga, estabelecidas entre as moléculas de água e a cadeia lateral do aminoácido (BARRETT; ELMORE, 1998). Já os aminoácidos não polares são, por natureza, hidrofóbicos e tendem a se agregar por meio de interações ditas como hidrofóbicas, formando aglomerados que minimizam o contato entre a cadeia lateral e as moléculas de água (BARRETT; ELMORE, 1998).

Os aminoácidos da categoria dos eletricamente carregados possuem grupos nas cadeias laterais que são ionizáveis, conforme as condições de pH do meio ao qual estes estiverem expostos (BARRETT; ELMORE, 1998). Em outras palavras, isto significa dizer que a carga elétrica líquida de uma proteína depende do número de grupo ionizáveis, a um dado valor de pH. Para cada proteína existe um valor característico de pH, conhecido como ponto isoelétrico, para o qual sua carga global é nula. Assim para valores de pH abaixo do

ponto isoelétrico, a proteína tem carga efetiva positiva, enquanto que em pHs acima do ponto isoelétrico, a carga global da proteína é negativa. Dessa forma, a carga elétrica global de uma proteína está associada à diferença entre o valor de pH no meio e o ponto isoelétrico da proteína (PACE; GRIMSLEY; SCHOLTZ, 2009).

Graças às distintas características dos aminoácidos, uma proteína tem a capacidade de se auto-organizar de forma a criar seções quimicamente responsáveis por certa função. Esse processo de auto-organização da macromolécula, conhecido como dobramento da proteína, (ou enovelamento proteico) é razoavelmente complexo. Portanto é conveniente separar esse processo em quatro diferentes níveis de estruturação como detalhado abaixo: estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. A Figura 2.2 resume estes níveis de organização, que serão descritos em detalhe nas seções 2.2- 2.5 com enfoque nas diferentes interações que levam à formação dessas estruturas.

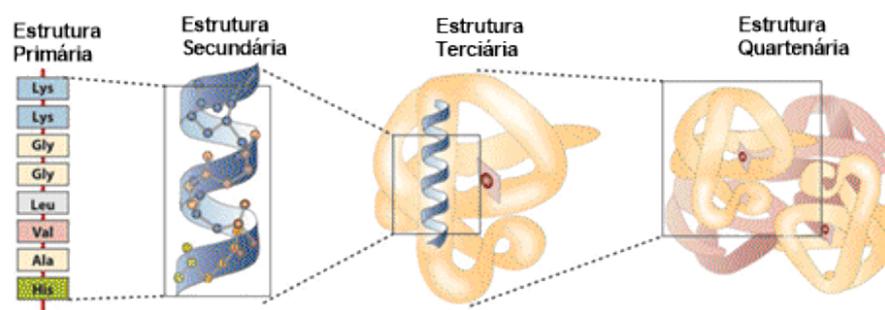


Figura 2.2 - Diferentes níveis de organização molecular de uma proteína. Adaptada de (Amino Acids, Proteins, and Enzymes, 2015).

2.2 - Estrutura primária de uma proteína

A estrutura primária, que é única e exclusiva para cada proteína, corresponde à sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica formada como resultado de reações de condensação entre os aminoácidos. Nessas reações, uma molécula de água é perdida para cada par de aminoácidos, devido à interação do grupo carboxila do aminoácido com o grupo amina do outro aminoácido, e uma subsequente ligação covalente C-N (conhecida como ligação peptídica) é formada na cadeia principal (Figura 2.3(A)). Pela razão de ocorrer a perda de moléculas de água, se diz que na estrutura primária existem apenas resíduos de aminoácidos, sendo a sequência destes resíduos ao longo da cadeia polipeptídica

um elemento determinante para a formação da estrutura secundária, uma vez que essa estrutura envolve apenas interações entre grupos presentes na cadeia principal de cada resíduo.

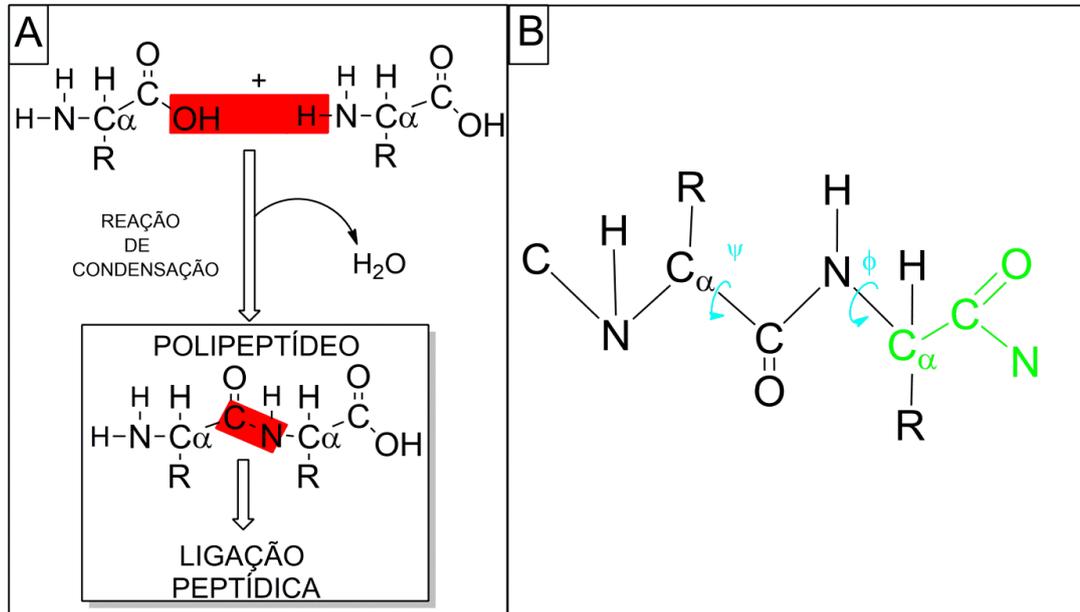


Figura 2.3 - (A) Formação da estrutura primária de uma proteína. (B) Recorte da cadeia de um polipeptídeo mostrando as rotações permitidas e restrições da estrutura primária; em azul, as ligações que são livres para rotacionar; em verde, os átomos e ligações restritos a um mesmo plano.

Em geral, a estrutura primária da proteína consiste de uma sequência determinada pelo código genético do organismo, contendo cerca de 100 a 1000 resíduos de aminoácidos (FINKELSTEIN; PTITSYN, 2002). Essa sequência se caracteriza por ter 2 graus de liberdade, o que lhe permite ter uma boa flexibilidade graças às rotações ψ e ϕ em torno das ligações C_{α} -C e N- C_{α} , respectivamente (ver Figura 2.3(B)) (FINKELSTEIN; PTITSYN, 2002; KRATZ, 2009; SNEPPEN; ZOCCHI, 2005). Em contrapartida, as ligações mostradas em verde na Figura 2.3 (B) são restritas ao mesmo plano, o que faz com que somente certas combinações de ψ e ϕ possam ocorrer em uma conformação da proteína.

2.3 - Estruturas secundárias de uma proteína

Tipicamente, essas estruturas são arranjos espaciais com formas bem definidas (alfa-hélice, folha-beta, etc., como mostrado na Figura 2.4) mantidas por ligações de hidrogênio

entre os átomos de oxigênio do grupo carboxila e hidrogênio do grupo amina da cadeia principal (KRATZ, 2009; SNEPPEN; ZOCCHI, 2005).

A estrutura alfa-hélice forma uma espiral regular com orientação para a direita e se caracteriza por ter os ângulos ψ e ϕ (definidos na Figura 2.3(B)) com valores aproximadamente iguais a -60° e 50° , respectivamente (PETSKO; RINGE, 2004). Esses ângulos são resultados das duas ligações de hidrogênio (pontos pontilhados na Figura 2.4) estabelecida entre um resíduo e o quarto resíduo subsequente da estrutura primária, de maneira que em uma volta da hélice corresponde a cerca de 3,6 resíduos de aminoácidos. Outra propriedade importante é o fato de que a cadeia lateral dos aminoácidos se projeta para fora do eixo da hélice. Como ao longo da alfa-hélice existem tanto cadeias laterais hidrofóbicas quanto hidrofílicas, em geral um conjunto de alfa-hélices se auto-agrega por meio de interações hidrofóbicas, de forma a expulsar moléculas de água dos contatos hidrofóbicos e manter as cadeias laterais hidrofílicas expostas à água.

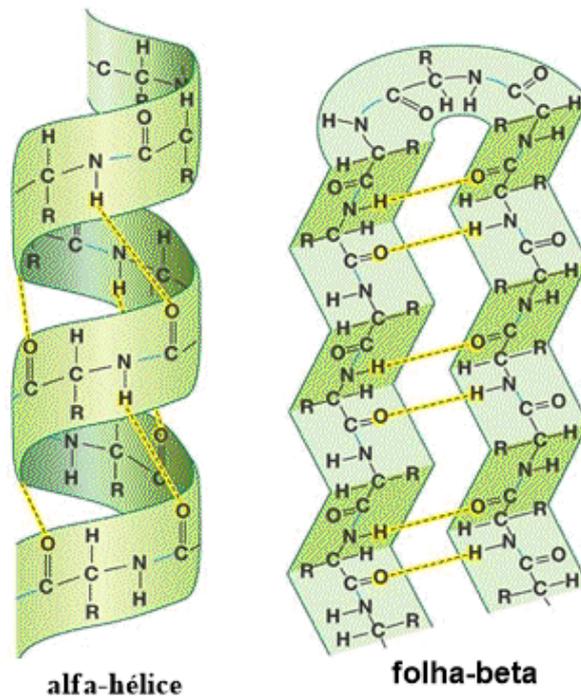


Figura 2.4 - Principais estruturas secundárias. Adaptada de (Module 3: Basic Science, Biology Core, 2015).

Por sua vez, as folhas-beta são formadas por extensos segmentos da cadeia do polipeptídeo (cerca de 3-10 resíduos) dispostos paralelamente ou antiparalelamente (ou,

ocasionalmente, de forma misturada (PETSKO; RINGE, 2004)), e que são mantidos ligados entre si por meio de pontes de hidrogênio. Ao contrário da alfa-hélice, as ligações de hidrogênios na folha-beta envolvem resíduos distantes um do outro na sequência primária, como mostra a Figura 2.4. Os extensos segmentos da cadeia polipeptídica, conhecidos como fitas β , têm sua disposição definida pela orientação das ligações peptídicas (C-N) (PETSKO; RINGE, 2004). Por exemplo, na folha-beta da Figura 2.4, o segmento da esquerda (fita- β esquerda) tem as ligações C-N em sentido contrário à fita- β da direita e, portanto, tais fitas são antiparalelas entre si. Além disso, as cadeias laterais são projetadas na mesma direção, mas em sentidos opostos. Para a configuração paralela, todas as ligações C-N são paralelas entre si e as cadeias laterais estão dispostas no mesmo sentido. As fitas se distanciam uma da outra por cerca de 4,8 Å e os ângulos ψ e ϕ têm valores iguais a 150° e -135° para a configuração antiparalela e 135° e -120° para a paralela (NELSON; COX, 2013; SNEPPEN; ZOCCHI, 2005). Uma importante informação relacionada à folha-beta é o fato de que doenças relacionadas a mudanças na conformação de proteínas (conhecidas como amiloidoses) apresentam como consequência agregados intermoleculares com alto percentual dessa estrutura secundária (RAMBARAN; SERPELL, 2008).

Outras estruturas incomuns, consideradas como secundárias, são voltas (do inglês *turn*) e espirais randômicas, que são formas distorcidas que a cadeia polipeptídica pode apresentar, especialmente quando perdem sua capacidade de exercer uma dada função. Enquanto as voltas são fundamentais para unir pares de fita-beta, as espirais randômicas representam a principal forma encontrada por uma proteína que perde sua estrutura nativa original.

É importante ter em conta que o percentual de cada uma das estruturas secundárias em uma proteína varia conforme a função a ser por ela exercida e as condições ambientais, tais como pH, temperatura, entre outras. Técnicas experimentais, como o dicróismo circular (WHITMORE; WALLACE, 2008), espectroscopia de infravermelho (GOORMAGHTIGH; RUYSSCHAERT; RAUSSENS, 2006; NAVEA et al., 2006), ressonância magnética nuclear (WÜTHRICH et al., 1991), são normalmente usadas para identificar o percentual de estrutura secundária das proteínas. Por exemplo, em pH 7,4, a albumina do soro bovino (BSA), proteína usada ao longo desta tese, apresenta 68% de alfa-hélice, 18% de folha-beta e 14% de dobras e espirais randômicas (REED et al., 1975).

2.4 - Estrutura terciária de uma proteína

Essa organização espacial representa a conformação da proteína como um todo, resultante do empacotamento de alfa-hélices e folhas-beta devido somente a interações entre cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, como pode ser visto na Figura 2.5. Como dito na Seção 2.1, cada aminoácido tem uma cadeia lateral com polaridade bem definida, o que obriga a estrutura secundária a se organizar em solução, de forma a minimizar o número de possibilidades de contatos entre seções hidrofóbicas da cadeia peptídica com as moléculas de água. Nesse processo de se auto-organizar, a cadeia polipeptídica alcança níveis de estruturação compacta conhecidos como estruturas terciárias.

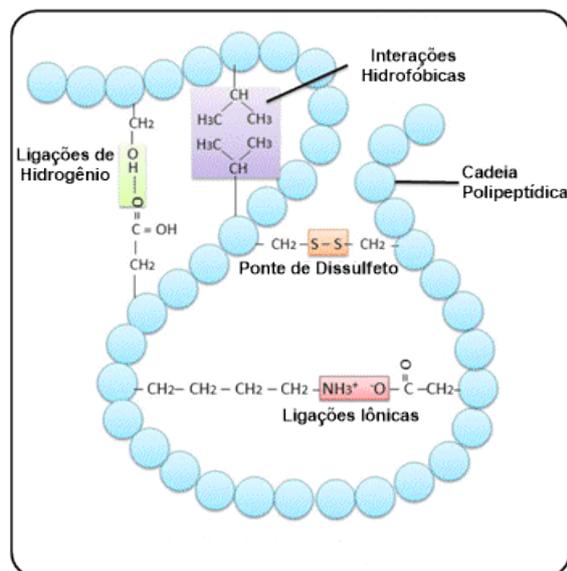


Figura 2.5 - Principais interações envolvendo cadeias laterais de aminoácidos responsáveis pela formação da estrutura terciária. Adaptada de (B for Biology: Biomolecules of the Cell - Proteins, 2015).

Em muitos casos, a estrutura terciária é o último estágio em três dimensões (3-D) do dobramento da cadeia polipeptídica. Duas categorias baseadas na forma 3-D da estrutura terciária são encontradas: as globulares e as fibrilares. Enquanto as proteínas globulares se organizam em formas arredondadas, as fibrilares adotam formas cilíndricas (KRATZ, 2009). Por desempenhar tarefas diferentes, essas duas estruturas terciárias se diferenciam uma da outra pelo percentual de estruturas secundárias presentes em cada uma delas, uma vez que, como já foi dito, existe uma estreita relação entre conformação e atividade de uma proteína.

Como mostrado na Figura 2.5, as estruturas terciárias são mantidas por interações entre átomos das cadeias laterais próximas uma da outra, que podem ser do tipo:

- **Ponte de dissulfeto:** Os aminoácidos cisteína contêm um grupo tiol (-SH) na cadeia lateral e, quando dois destes grupos estão próximos entre si, ocorre uma ligação covalente entre os dois átomos de enxofre (-S-S-), a qual é mantida mesmo quando a proteína é desnaturada².
- **Ligações iônicas:** Numa cadeia polipeptídica existem aminoácidos cujos grupos laterais se encontram ionizados em meio aquoso, podendo, portanto, interagir entre si quando estão próximos um do outro. A natureza dessa interação é eletrostática e, por serem de fraca intensidade, essas ligações são perdidas quando a proteína passa pelo processo de desnaturação da sua estrutura.
- **Ligações de Hidrogênio:** Na estrutura terciária, diferentemente da estrutura secundária, as ligações de hidrogênio ocorrem entre grupos laterais dos aminoácidos envolvendo os átomos de oxigênio ou nitrogênio com hidrogênio. Esse tipo de ligação também é de fraca intensidade, e por isso elas são rompidas quando a proteína perde sua estrutura nativa.
- **Interações hidrofóbicas:** Nestas interações, grupos não-polares da cadeia lateral tendem a se aproximar para minimizar o contato com a água. Dessa forma, em meio aquoso, a proteína forma uma estrutura compacta com aminoácidos hidrofóbicos localizados no interior dessas estruturas. Esse tipo de interação é considerado como a principal força que conduz a proteína a colapsar em uma dada estrutura terciária. No entanto, como a natureza dessa força é de fraca intensidade, essas interações são perdidas quando uma mudança ambiental provoca a desnaturação da proteína.

2.5 - Estrutura quaternária de uma proteína

Este nível de organização é caracterizado por uma aglomeração segundo o qual as subunidades são formadas por estruturas terciárias. Isto significa dizer que este tipo de arranjo molecular é restrito apenas a proteínas constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas que formem distintas estruturas terciárias. Um exemplo clássico deste tipo de estrutura é a

² A palavra desnaturada diz respeito ao processo em que diferentes agentes químicos e ambientais levam a proteína a perder sua estrutura nativa e é um dos objetos desta tese, sendo visto com mais detalhes na Seção 2.6 e no Capítulo 6.

hemoglobina, uma importante proteína responsável pelo transporte de oxigênio na corrente sanguínea e que é composta por quatro subunidades semelhantes de mioglobina.

2.6 - Processos de desnaturação e agregação das proteínas

A organização estrutural de uma proteína, que é caracterizada por sua estrutura quaternária em umas, e pela estrutura terciária em outras, representa sua conformação final ou nativa, no jargão da Biologia. Portanto, o fenômeno de desnaturação envolve a transformação de estruturas bem definidas, resultantes do balanço de diferentes tipos de interações (mostradas nas Seções 2.2 - 2.5), para um estado desnaturado desordenado 3-D da proteína. As principais causas para esta transformação são mudanças nas condições ambientais, tais como mudança de temperatura, ou de pH, ou a presença de moléculas como ureia e surfactantes. O efeito de surfactantes sobre a estrutura de uma proteína é detalhado no Capítulo 6, onde é mostrado como a EIE pode fornecer as informações relevantes desta interação.

Já os processos de agregação de uma proteína podem ser descritos como sendo de dois tipos: formação de agregados amorfos e desordenados, ou de agregados ordenados, na forma de fibrilas (DOBSON, 2003). Agregados desordenados normalmente resultam de um rápido processo de desnaturação, com posterior crescimento de forma randômica de grandes agregados, que tendem a precipitar da solução. Em condições normais, a formação de agregados amorfos não chega a ser problema do ponto de vista da saúde, uma vez que o sistema de defesa celular tem a capacidade de detectar e descartar este tipo de agregado (DOBSON, 2003; DOBSON; ŠALI; KARPLUS, 1998).

Por sua vez, a formação de agregados ordenados de fibrilas é um processo lento, uma vez que a cinética correspondente envolve uma sucessão de etapas como a desnaturação parcial da proteína, nucleação, formação de agregados filamentosos chamados de protofibrilas e, finalmente, a formação de fibrilas, como mostrado na Figura 2.6. Inicialmente, moléculas de proteína parcialmente desnaturada se associam para formar núcleos estáveis, os quais por sua vez atuam como moldes para que outras moléculas parcialmente desnaturadas se organizem, formando longos filamentos de proteínas conhecidos como protofibrilas. Finalmente, outras moléculas de proteínas parcialmente desnaturadas se associam às protofibrilas para formar as fibrilas (LEE et al., 2007).

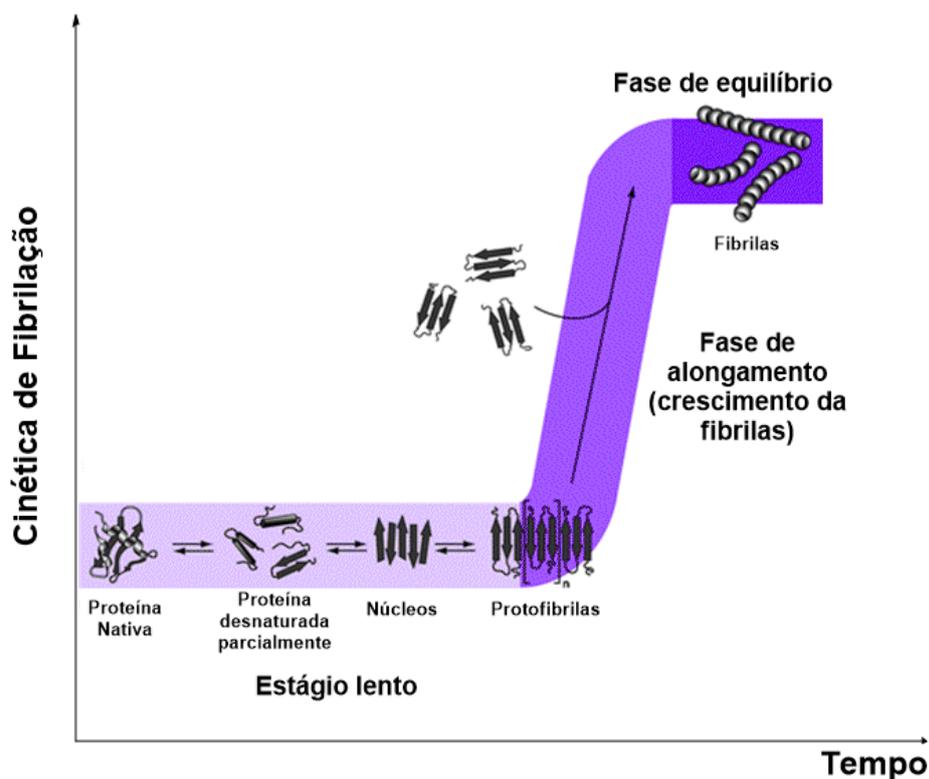


Figura 2.6 - Esquema da cinética de fibrilação de uma proteína caracterizada pelos estágio lento, de crescimento das fibrilas e a fase de equilíbrio. Adaptada de (WILSON; YERBURY; POON, 2008).

Uma característica peculiar às fibrilas é o alto conteúdo de arranjos de folha-beta que são mantidos por meio de ligações de hidrogênio entre grupos amina e o grupo carboxila da cadeia principal dos resíduos de aminoácidos. Em termos de cinética de fibrilação, usualmente existe um estágio lento, uma fase de alongamento das fibrilas até que seja atingido um equilíbrio de fase, no qual todas as fibrilas estão enfim formadas. Diferentemente dos agregados amorfos de proteínas, a formação de fibrilas *in vivo* está associada com inúmeras doenças, tais como mal de Alzheimer, mal de Parkinson, diabetes tipo II e catarata, que têm diferentes origens (SELKOE, 2003). *In vitro*, o processo de fibrilação ocorre quando a proteína é exposta a mudanças provocadas por baixos valores de pH, ou elevadas temperatura, ou pela adição de desnaturantes (NILSSON, M. R., 2004).

Nesta tese, nossa principal contribuição foi termos sido capazes de mostrar que a espectroscopia de impedância elétrica pode ser também usada como um método capaz de mapear mudanças na conformação de uma proteína BSA induzidas por surfactantes, ao

mesmo tempo em que é possível acompanhar a cinética de formação de fibrilas induzidas por temperatura, como será visto no Capítulo 6.

2.7 - A molécula de DNA e sua estrutura

A molécula de DNA pode ser considerada como um polímero de cadeia longa, cuja unidade monomérica é o chamada nucleotídeo. O nucleotídeo é constituído de três unidades básicas, como mostrado na Figura 2.7: um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada (CALLADINE et al., 2004). Os nucleotídeos podem ser de quatro tipos, a depender da natureza da base nitrogenada (citosina, guanina, timina e adenina) ligada ao grupo açúcar (desoxirribose).

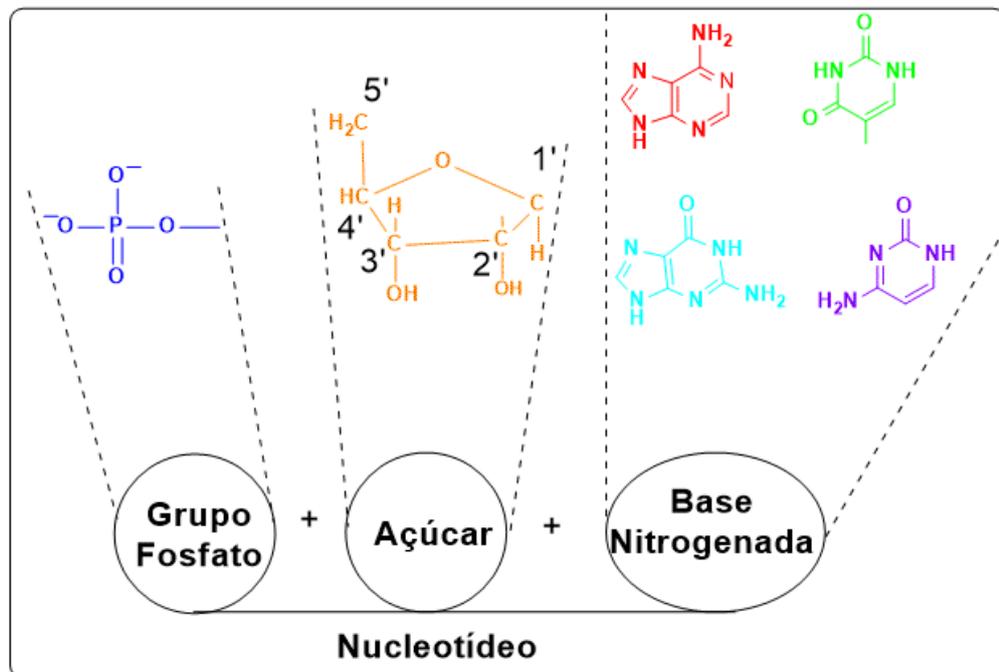


Figura 2.7 - Moléculas constituintes da unidade monomérica do DNA. Grupo fosfato em azul escuro, desoxirribose em laranja, adenina em vermelho, guanina em azul claro, timina em verde e citosina em violeta.

Do ponto de vista da organização molecular, o DNA possui dois níveis de conformação na sua estrutura: a estrutura primária, formada pela ligação entre os nucleotídeos que levam à geração de cadeia polimérica conhecida com fita simples de DNA, e a estrutura

secundária, que por sua vez representa a união de duas fitas simples de DNA através de pontes de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas que se organizam na conformação 3-D de uma dupla-hélice (Figura 2.8 (a)).

A formação da fita simples de DNA (estrutura primária) é o resultado de reações de condensação entre os nucleotídeos. Nessas reações, como discutido na Seção 2.2, uma molécula de água é perdida para cada par de nucleotídeos, devido à interação do grupo fosfato de um nucleotídeo com o carbono 3' (ver Figura 2.7) da desoxirribose de outro nucleotídeo, com posterior formação de uma ligação covalente conhecida como ligação fosfodiéster (Figura 2.8 (b)). Devido a esta característica, a arquitetura molecular da estrutura primária tem como peculiaridades o fato de que os carbonos 5' e 3' do desoxirribose indicam o início e o fim da cadeia simples de DNA, e a alternância de fosfatos e açúcares ao longo da mesma (KRATZ, 2009), como mostrado na Figura 2.8 (b). Essa forma de organização da estrutura primária é fundamental para padronização da sequência do código genético do DNA.

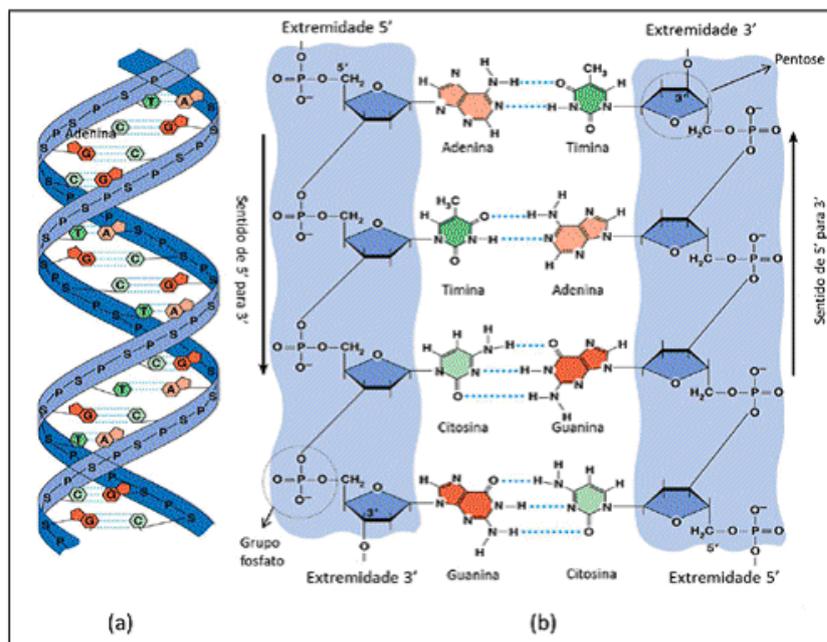


Figura 2.8 - (a) Dupla hélice do DNA. (b) Orientação antiparalela das fitas de DNA. Adaptada de (STAVELEY, 2015).

Por sua vez, a estrutura secundária corresponde às ligações entre as fitas simples de DNA, que são mantidas por meio de pontes de hidrogênio (linhas pontilhadas azuis na Figura 2.8) entre as bases nitrogenadas. Essas pontes são estabelecidas de forma específica, que pode

ser descrita por um mecanismo tipo chave - fechadura, o que significa dizer que uma dada base nitrogenada só interage, de forma exclusiva, via ponte de hidrogênio com outra base nitrogenada bem definida, como em um quebra-cabeça. Assim, a base nitrogenada adenina (A) só se liga com a base nitrogenada timina (T), formando duas pontes de hidrogênio. Da mesma forma a guanina (G) só se liga à citosina (C), por meio de três pontes de hidrogênio. É importante notar que na estrutura secundária as duas cadeias simples são antiparalelas entre si (ver Figura 2.8 (b)), e têm a estabilidade dependente da temperatura, de tal forma que quando uma solução de DNA é, por exemplo, aquecida, ocorre um processo conhecido como sua desnaturação, que corresponde ao rompimento das pontes de hidrogênio e, por consequência, à separação das duas fitas de DNA. A temperatura em que esse processo ocorre é dependente de diversos fatores, tais como comprimento da cadeia de DNA (quanto mais curta, menor será a temperatura de desnaturação), composição dos pares de base na sequência de DNA (como os pares de base CG e AT formam três e duas de pontes de hidrogênio, respectivamente, um percentual maior de CG dificulta a desnaturação), concentração de sais (uma alta concentração de sais estabiliza as cadeias de DNA, o que torna mais difícil separar as duas fitas e aumenta a temperatura de desnaturação), etc. (KHANDELWAL; BHYRAVABHOTLA, 2010).

O processo que leva à formação da estrutura secundária do DNA é a base para o fenômeno conhecido como hibridização, que serve de princípio para muitas metodologias em biologia molecular, especialmente na identificação de doenças contagiosas. A essência para desenvolvimento de biossensores para reconhecimento de doenças é a complementaridade estabelecida entre as bases nitrogenadas das fitas isoladas. Em outras palavras, vários biossensores partem do princípio de que duas fitas de DNA com sequências complementares tendem a formar uma fita dupla e, por isso, lançam mão de alguma propriedade físico-química (como a reação de polimerase ou a ocorrência de fluorescência, por exemplo) para identificar a ocorrência do processo de hibridização. Em geral, como protocolo para biossensores, um segmento de fita simples do DNA (sonda) do agente contagioso é ancorado em um substrato e, posteriormente, exposto a uma solução contendo DNA desnaturado (ou seja, aquecida de modo a exibir fitas simples) de um paciente. Assim, se o material genômico extraído do paciente apresentar uma seção complementar à sonda, ocorrerá a hibridização, o que significa dizer que paciente está contaminado pela presença do DNA do agente infeccioso da doença. Do contrário, não haveria complementaridade, e, portanto, o paciente estaria livre

da doença. Assim, a especificidade na interação entre as bases nitrogenadas é uma informação essencial para transcrever todas as informações de contágio de um indivíduo, sendo a chave para a moderna biologia molecular (O'DONNELL, 2012).

Do ponto de vista de propriedades físico-químicas, a presença dos grupos fosfatos ao longo da sua cadeia faz com que a molécula de DNA seja um polieletrólito de carga negativa (MANNING, 1978). Assim, o DNA se comporta como uma molécula adequada para interagir eletrostaticamente com moléculas com excesso de cargas positivas (como surfactantes) ou mesmo com polycations, como a forma protonada de polianilina (DE LIMA, SANDRO V. et al., 2015; HAGEN et al., 2006; LIANG et al., 2012; OUCHEN et al., 2012), de modo que essas interações podem ser usadas para indicar a hibridização de cadeias simples. Além disso, este tipo de interação traz consigo novos fenômenos como mudanças na estabilidade das cadeias de DNA, como será mostrado nos Capítulos 4 e 5, onde o efeito da concentração relativa poliânion (DNA)/polycation(polianilina) é fator fundamental para manter as cadeias de DNA estáveis em solução.

Capítulo 3 - Espectroscopia de impedância elétrica

3.1 - Breve Histórico

Ao longo da história, a técnica de espectroscopia de impedância elétrica tem sido usada para a caracterização de soluções iônicas, semicondutores, e materiais dielétricos, e no estudo de processos eletroquímicos, entre outros (BARTON; DAVIS; HIGSON, 2008; BAYFORD, 2006; BOGOMOLOVA et al., 2009; CHINAGLIA, D. L. et al., 2008; KASSANOS et al., 2008; OH et al., 2008; TSEKENIS; GARIFALLOU; DAVIS; MILLNER; GIBSON; et al., 2008; TSEKENIS; GARIFALLOU; DAVIS; MILLNER; PINACHO; et al., 2008). Recentemente, o número crescente de publicações (como mostrado na Figura 3.1) voltadas para descrição de propriedades de materiais por meio da espectroscopia de impedância elétrica indica o considerável interesse e a progressiva consolidação dessa técnica na comunidade acadêmica.

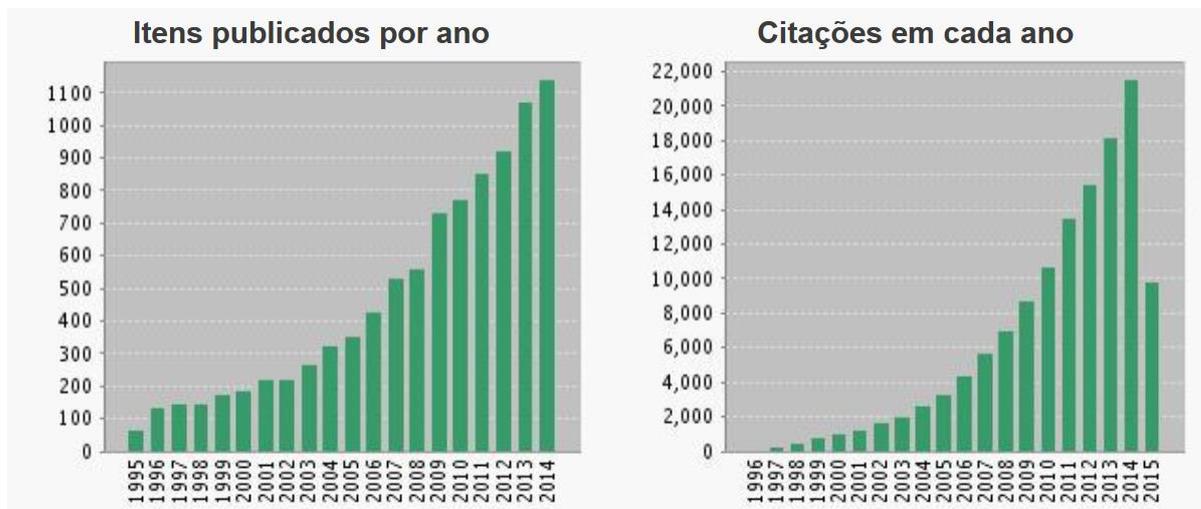


Figura 3.1 - Número de publicações e citações de trabalhos relacionados a espectroscopia de impedância elétrica nos últimos vinte anos (Web of Science, 2015).

A espectroscopia de impedância elétrica foi usada pela primeira vez no final do século XIX por Oliver Heaviside em seus estudos de desenvolvimento do telégrafo e da teoria de circuitos elétricos (ORAZEM; TRIBOLLET, 2011). Com a introdução de inovadores recursos matemáticos, como transformada de Laplace, Heaviside foi capaz de resolver equações

diferenciais integrais, consideradas na época um problema de difícil resolução (DE LIMA, S. V., 2010). Tais equações são recorrentes em problemas relacionados a circuitos elétricos e exigem tratamentos matemáticos nem sempre triviais. Em 1872, ao introduzir as transformadas de Laplace e Fourier em problemas desse tipo, Heaviside conseguiu simplificar a resolução destes problemas ao transformar equações diferenciais-integrais em equações algébricas de mais fácil resolução (MACDONALD, J. R., 1992). Uma peculiaridade nesta transformação é o fato de que equações diferenciais-integrais no domínio do tempo mudam para equações algébricas no domínio da frequência (s) de Laplace. Isto é extremamente importante na espectroscopia de impedância elétrica, onde todas as análises são realizadas no domínio da frequência.

Do ponto de vista da caracterização de materiais, os primeiros trabalhos que aplicaram a espectroscopia de impedância foram realizados em 1894, por Nernst, na medição das constantes dielétricas de soluções eletrolíticas e de fluidos orgânicos, e em 1902, por Finkelstein, no estudo da resposta dielétrica de óxidos (ORAZEM; TRIBOLLET, 2011).

Os trabalhos de Emil Gabriel Warburg (realizados em 1899), sobre a impedância em processos de difusão e a introdução de circuitos elétricos equivalentes para descrever o comportamento de materiais, representaram outro passo importante no entendimento de diferentes sistemas (MACDONALD, D. D., 2006). Da mesma forma, os irmãos R. S. Cole e K. S. Cole também contribuíram para melhor compreensão das propriedades de materiais, ao introduzirem em 1941 a representação complexa da constante dielétrica (relações de Cole-Cole) (ORAZEM; TRIBOLLET, 2011) e o elemento de fase constante (CPE) para estudar o desvio no comportamento capacitivo de sistemas reais. Relações como as de Kramers-Kronig, Maxwell-Wagner e Burgeman-Hanai, que são usadas para validar medidas em dielétricos, também contribuíram para o estabelecimento da espectroscopia elétrica ao longo dos anos (MACDONALD, D. D., 2006; MACDONALD, J. R., 1992; ORAZEM; TRIBOLLET, 2011).

Atualmente, a EIE se tornou uma ferramenta versátil de caracterização em diversas áreas de pesquisas, tais como estudo de membranas, suspensão sanguínea, tecidos biológicos, reações eletroquímicas em interfaces, corrosões, sistemas coloidais, entre outros (BARSOUKOV; MACDONALD, 2005; DEAN et al., 2008). Nesta tese, cujos objetos de

estudos são as interações de moléculas biológicas com polímeros e surfactantes, novas possibilidades e perspectivas nessa direção serão analisadas.

3.2 - Comportamento elétrico/dielétrico de materiais

Em geral, do ponto de vista elétrico os materiais são constituídos tanto de portadores de cargas livres, como elétrons e íons, quanto de portadores de cargas ligadas, como dipolos. As propriedades elétricas observadas são resultantes da contribuição de cada um destes portadores. Assim, se um campo elétrico é aplicado a um material, os portadores de carga livres irão se mover na direção desse campo, enquanto que os dipolos serão parcialmente orientados também nessa direção. Estes dois eventos levam ao fluxo de portadores de cargas livres conhecido como densidade de corrente elétrica, e à polarização elétrica para portadores de cargas ligadas, como mostrado na Figura 3.2.

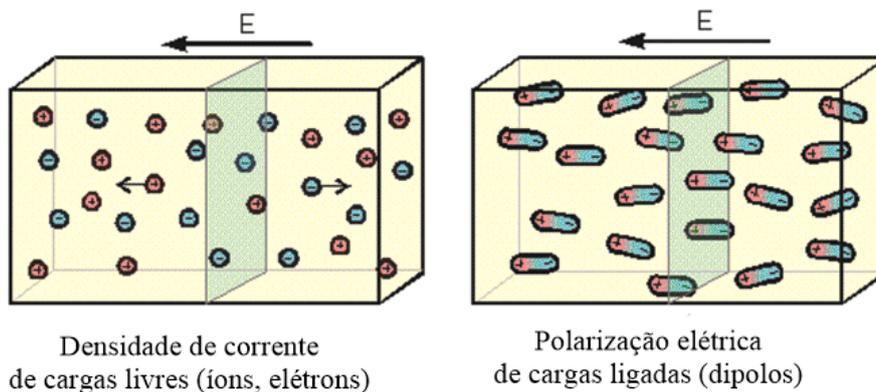


Figura 3.2 - Efeito do campo elétrico nos portadores de carga elétrica. Adaptada de (*Dielectric and Impedance Spectroscopy*, 2015).

A polarização elétrica resultante do deslocamento translacional e rotacional de dipolos pode ser de diferentes naturezas, de acordo com o fenômeno estudado. Assim, podemos ter :

Polarização eletrônica: Neste tipo de polarização, momentos de dipolos são induzidos, como resultado do deslocamento de elétrons de suas posições de equilíbrio em relação ao núcleo atômico, o que é causado pelo campo elétrico aplicado (KAO, 2004).

Polarização atômica: É também uma polarização induzida encontrada em moléculas formadas por dois átomos diferentes na molécula. Neste caso, o deslocamento mútuo entre os

átomos presentes em uma molécula se deve à ação do campo elétrico externo, o que promove o aparecimento do dipolo induzido (KIM; TADOKORO, 2007).

Polarização dipolar: Diferentemente dos dois tipos de polarização anteriores, a polarização dipolar resulta da rotação de dipolos moleculares permanentes ou de segmentos das moléculas, por efeito da ação do campo elétrico (FULAY; LEE, 2013; MOLITON, 2007).

Polarização iônica: Essa polarização resulta do deslocamento relativo de ânions e cátions (de origem intrínseca ou extrínseca) sob o efeito de um campo elétrico aplicado (MITCHELL, 2004).

Polarização interfacial: Esse tipo de polarização resulta do acúmulo de íons na interface solução-eletrodo, devido à alta condutividade do meio ou da interface entre duas fases de uma dada amostra que exiba contorno de grão ou regiões distintas com propriedades elétricas diferentes (KREMER; SCHÖNHALS, 2003). Nos experimentos realizados para o estudo da mudança de conformação de proteínas induzidas por surfactantes, esse tipo de polarização foi recorrente.

Quando um potencial alternado é aplicado (este é o caso da espectroscopia de impedância elétrica), uma inversão periódica no sentido da polarização elétrica ocorre por conta da constante mudança no sentido do campo elétrico, o que leva os dipolos (induzidos ou permanentes) a se reorientarem para uma nova posição de equilíbrio. Essa reorientação exige um tempo mínimo (t_{\min}) que é dependente da massa dos portadores de cargas. Assim, para as polarizações atômica e eletrônica, esta reorientação é rápida, sendo quase instantânea (10^{-13} - 10^{-15} s) por conta da pequena massa dos elétrons e átomos. Por outro lado, as polarizações dipolares e iônicas apresentam reorientações bem mais lentas (10^{-4} - 10^{-9} s), uma vez que envolvem movimentos cooperativos de dipolos ou de segmentos das moléculas, que possuem massas muito maiores que a eletrônica e são sujeitos à fricção de moléculas circundantes.

O processo de reorientação é chamado de relaxação dielétrica, enquanto que o tempo mínimo necessário para o novo realinhamento, que é dependente da estrutura molecular, é conhecido como tempo de relaxação, ou tempo característico (τ). Assim, se a frequência angular (ω) do potencial aplicado for maior que a frequência angular de relaxação ($\omega_{rel} = \frac{1}{\tau}$), ou seja, se o tempo em que o campo elétrico muda de sentido é menor que τ , os dipolos não se

reorientam com a mudança do campo elétrico, o que causa uma diminuição da polarização para frequências maiores que ω_{rel} .

Em geral, os materiais não exibem um único tempo de relaxação, mas um conjunto de tempos característicos para cada uma das polarizações envolvidas. Assim, as polarizações eletrônicas possuem tempos de relaxação extremamente curtos, com frequências de relaxação características na faixa da radiação do visível 10^{15} - 10^{16} Hz (BOOß-BAVNBEK et al., 2011; KAR, 2013). Já as polarizações atômicas e iônicas têm relaxações que predominam na região do infravermelho (10^{11} - 10^{13} Hz) (CHANDA; ROY, 2006; KAR, 2013). Por outro lado, as polarizações dipolares têm sua relaxação ocorrendo normalmente em frequências intermediárias (10^4 - 10^9 Hz), uma vez que dependem de fatores tais como organização molecular, segmento da molécula responsável pelo dipolo, complexidade molecular, interação entre moléculas e da viscosidade do meio (BOOß-BAVNBEK et al., 2011; CHANDA; ROY, 2006). Por fim, para a polarização interfacial, a relaxação ocorre em baixas frequências (inferiores a 10^2 Hz) (BARTNIKAS, 1994; KAR, 2013).

A Figura 3.3 mostra a dependência da polarização com a frequência, com as setas indicando a faixa de relaxações para cada uma das polarizações descritas nesta Seção.

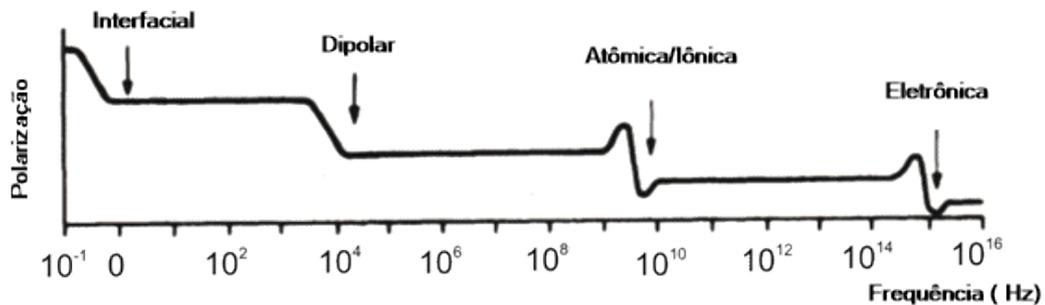


Figura 3.3 - Dependência da polarização elétrica com frequência. Adaptada de (ANDERSON et al., 2004).

O intervalo de frequência usado nos experimentos desta tese foi de $(1-10^6)$ Hz, o que significa dizer que, em termos de relaxações, poderão ser observadas polarizações dipolar e interfacial.

O transporte de carga livre representa outro fator que deve ser levado em conta quando propriedades elétricas de materiais são caracterizadas. Sob a influência do campo elétrico, cargas iônicas e eletrônicas irão se mover em direção aos eletrodos. No caminho, essas cargas

dissipam energia sob a forma de calor, devido a diferentes mecanismos de colisões com o meio. Por conta destas colisões, cada material tem uma resistência inerente que também contribui para sua impedância elétrica.

Resumindo, de um ponto de vista energético, ao se incidir sobre um material o campo elétrico oscilante causa dois efeitos principais: energia é dissipada, devido tanto a colisões quanto ao atrito viscoso que os dipolos moleculares e espécies iônicas sofrem ao se orientarem e migrarem sob influência do campo elétrico, e também pode ser armazenada, devido ao acúmulo de cargas no material, em uma magnitude que é dependente do número de cargas elétricas e da capacidade dos dipolos do material se orientarem com o campo elétrico oscilante na faixa de frequência utilizada na medida.

Como será visto na próxima seção, estas duas contribuições podem ser facilmente separadas na espectroscopia de impedância elétrica pelo uso das ferramentas matemáticas adequadas.

3.3 - Fundamentos físico-matemáticos da EIE

Do ponto de vista experimental, a essência da espectroscopia de impedância elétrica se baseia na medida da resposta elétrica (a corrente elétrica, que por conveniência é escrita na forma da Eq. (3.1)) que uma amostra oferece ao ser estimulada por uma perturbação elétrica oscilante no tempo (o potencial elétrico, convenientemente escrito na forma da Eq. (3.2)) (DE OLIVEIRA, HELINANDO P, 2004). Essa perturbação é de pequena amplitude, de forma que a amostra é estimulada na proximidade de seu estado de equilíbrio. Nessas condições, os fenômenos investigados podem ser considerados como lineares, ou seja, o estímulo e a resposta são proporcionais entre si, respeitam o princípio da superposição e são caracterizados por um atraso da resposta em relação ao estímulo (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004; KUBO, 1957).

$$i(t) = i_0 e^{j(\omega t + \theta)} \quad (3.1)$$

$$e \quad V(t) = V_0 e^{j\omega t} \quad , \quad (3.2)$$

onde V_0 , i_0 , ω , θ , t e j correspondem à amplitude do potencial elétrico, à amplitude da corrente elétrica, à frequência angular de oscilação, ao ângulo de fase entre a resposta e o estímulo ao tempo e $j = \sqrt{-1}$, respectivamente.

Como foi mencionado na seção anterior, o conceito de impedância elétrica leva em consideração a dissipação de energia, a capacidade de polarização do meio e a o atraso entre perturbação (potencial) e a resposta (corrente) na forma de ângulo de fase θ , como mostra a Figura 3.4. Assim, as informações que caracterizam um material são completamente fornecidas pelos valores da impedância e pelo ângulo de fase, de forma similar a um circuito de corrente alternada. Então, é necessário o entendimento das características dos elementos que compõem um circuito elétrico.

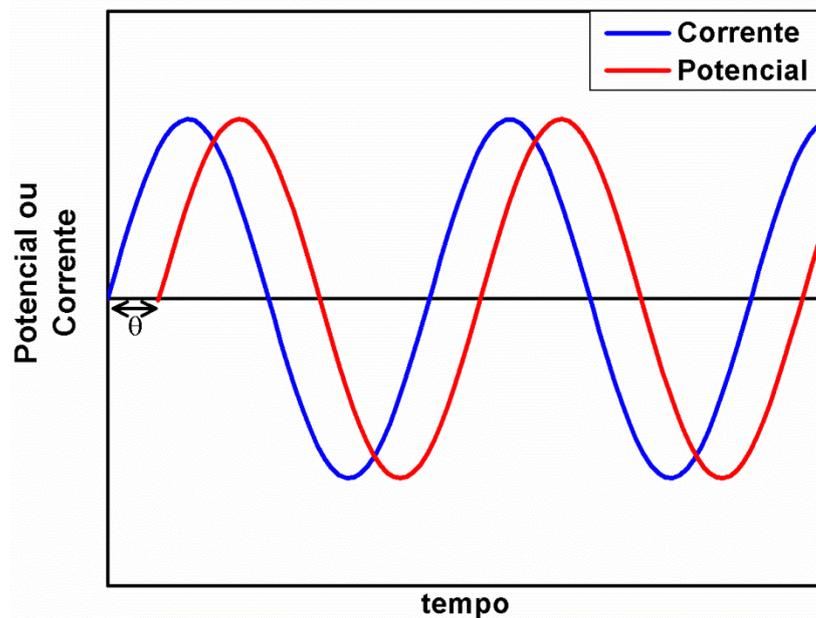


Figura 3.4 - Função corrente e potencial com função tempo e o ângulo de fase.

Em um circuito elétrico, cada elemento (resistor, capacitor, indutor e outros) possui características próprias relacionadas a determinado fenômeno físico, as quais podem ser descritas a partir da energia total no circuito. O resistor descreve processos de dissipação de energia relacionados ao efeito Joule em um dado meio e, portanto, a impedância corresponde à resistência que o resistor oferece ao transporte de carga elétrica. Um capacitor é um elemento que armazena energia no campo elétrico devido ao acúmulo de cargas em uma dada região do sistema. Assim, no regime de corrente contínua, um capacitor funciona como um

circuito aberto, isto é, não deixa passar a corrente elétrica; no entanto, quando o capacitor está sujeito a um potencial elétrico que depende do tempo, as cargas elétricas passam de uma placa para outra, conforme a frequência do potencial aplicado e, neste contexto, aparece a corrente alternada. Então se a frequência aumentar, mais cargas atravessam as placas em um dado tempo, ou seja, ocorre um fluxo maior de corrente, o que faz com que o impedimento à passagem de corrente (impedância elétrica) diminua. Portanto, a impedância de um capacitor é dependente da frequência. Já um indutor é composto um fio condutor, disposto em uma dada geometria, que armazena a energia em campo magnético, devido a variações temporais da corrente elétrica neste fio (CHINAGLIA, D. et al., 2008). Sabemos que, segundo a lei de Faraday, a tensão induzida em um indutor é proporcional ao módulo da variação de corrente. Mas, segundo a lei de Lenz, a tensão induzida tem sempre polaridade contrária à variação de corrente. Assim, quando uma fonte de alimentação submete os terminais do indutor a um potencial alternado, a variação de corrente é proporcional a este potencial, mas o potencial induzido no indutor tem sentido contrário ao potencial da fonte. Quando a variação da corrente da fonte está aumentando, o potencial induzido contribui para o movimento dos elétrons no sentido contrário da corrente, de forma a se opor a essa variação. Já quando a variação da corrente diminui, o potencial induzido empurra mais elétrons no sentido da corrente, de modo a resistir à variação de corrente. Esta oposição à mudança na corrente é que define a impedância do indutor, a qual também é dependente da frequência, como veremos a seguir.

Matematicamente, a impedância elétrica é definida em termos do potencial elétrico e da corrente elétrica no domínio do tempo na forma (LVOVICH, 2012):

$$Z(t) = \frac{V(t)}{i(t)} \quad , \quad (3.3)$$

onde $Z(t)$ é a impedância elétrica, $V(t)$ o potencial elétrico $i(t)$ a corrente elétrica e t é o tempo.

Assim, das definições dos potenciais elétricos (descritos no conjunto de Eqs. (3.4)-(6)) para um resistor, um capacitor e um indutor, é possível encontrar a impedância correspondente a cada um desses elementos, ou seja,

$$V_C(t) = \frac{Q(t)}{C} = \frac{\int i(t)dt}{C} = Z_C(t)i(t) \text{ (potencial em um capacitor)} \quad (3.4)$$

$$V_R(t) = R \cdot i(t) = Z_R(t)i(t) \quad \text{(potencial em um resistor)} \quad (3.5)$$

$$V_L(t) = L \frac{di(t)}{dt} = Z_L(t)i(t) \quad \text{(potencial em um indutor)} , \quad (3.6)$$

onde $Q(t)$, C , $Z_C(t)$, R , $Z_R(t)$, L e $Z_L(t)$ descrevem, no tempo t , a carga elétrica, a capacitância, a impedância do capacitor, a resistência, a impedância do resistor, a indutância e a impedância do indutor, respectivamente.

Outra forma de análise da impedância elétrica é descrever seu resultado no domínio da frequência (nesta tese todos os dados são descritos neste domínio), sendo então necessária uma mudança da variável tempo para frequência nas Eqs. (3.4)-(6). Uma forma conveniente de fazer isso é aplicar a transformada de Laplace, definindo a impedância como uma função de um parâmetro s (escrito em termos da frequência), ou seja;

$$Z(s) = \frac{V(s)}{i(s)} , \quad (3.7)$$

com $V(s)$ e a $i(s)$ sendo, respectivamente, o potencial e a corrente no domínio s escritos em termos da transformada de Laplace, como

$$V(s) = L[V(t)] = \int_0^{\infty} V(t)e^{-st} dt \quad (3.8)$$

$$\text{e } i(s) = L[i(t)] = \int_0^{\infty} i(t)e^{-st} dt , \quad (3.9)$$

onde $L[]$ corresponde à transformada de Laplace, e s é um número complexo.

Aplicando a transformada de Laplace ao conjunto das Eqs. (3.4)-(3.6), é possível determinar a impedância no domínio s . Para tanto, o uso das seguintes propriedades da transformada de Laplace de uma função $f(t)$ e sua derivada, descritas pela Eqs. (3.10)-(3.11), se faz necessário:

$$L \left[\frac{df}{dt}(t) \right] = \int_0^{\infty} \frac{df}{dt}(t)e^{-st} dt = sF(s) - f(0) \quad (3.10)$$

$$L\left[\int f(t)dt\right] = \int_0^{\infty} \left(\int f(t)dt\right) e^{-st} dt = \frac{F(s)}{s}, \quad (3.11)$$

com a frequência complexa de Laplace descrita na forma $s = \sigma + j\omega$, sendo que a parte real σ está relacionada ao termo de amortecimento da perturbação aplicada, enquanto que a parte imaginária ω descreve a periodicidade desta perturbação (GHOSH, S. P. C., A. K., 2010).

Tendo em conta essas propriedades e considerando que $i(0) = 0$, é possível escrever os potenciais de cada elemento como uma função da frequência s . Além disso, como mostrado nas Eqs. (3.1)-(3.2), a perturbação é tipicamente uma função periódica sem termo de amortecimento, de forma que a frequência s assume a forma $s = j\omega$. Assim, podemos escrever os potenciais para cada elemento com uma função da frequência ω do potencial aplicado em termos das Eqs. (3.12)-(3.14);

$$V_C(s) = \frac{i(s)}{sC} = \frac{-ji(j\omega)}{\omega C}, \quad (3.12)$$

$$V_R(s) = Ri(s) = Ri(j\omega) \quad (3.13)$$

$$\text{e } V_L(s) = i(s)sL = j\omega Li(j\omega). \quad (3.14)$$

Com as informações anteriores, e o conjunto de Eqs. (3.12)-(3.14), a impedância elétrica associada a cada elemento como função da frequência ω adota a forma mostrada na Tabela 3.1.

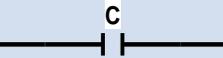
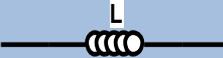
Elemento	Representação	Impedância no domínio ω	Ângulo de fase (θ)
Resistor		R	0
Capacitor		$-\frac{j}{\omega C}$	$\frac{\pi}{2}$
Indutor		$j\omega L$	$-\frac{\pi}{2}$

Tabela 3.1 - Elementos de circuito com suas respectivas impedâncias.

Como pode ser visto, a impedância no domínio da frequência para os três elementos pode ser convenientemente tratada com base no formalismo de números complexos, com a parte real descrevendo propriedades elétricas de resistores, e a parte imaginária o comportamento de capacitores e indutores. Em sistemas reais, é natural pensar em uma generalização que considere a combinação entre estes elementos, na qual a parte real da

impedância esteja relacionada com a dissipação de energia na forma de calor e a parte imaginária da impedância associada ao armazenamento de energia no campo elétrico e/ou magnético.

Essa generalização da impedância no domínio da frequência pode ser facilmente determinada pela aplicação da transformada de Laplace³ nas Eqs. (3.1)-(3.2), ou seja,

$$Z(s) = \frac{V(s)}{i(s)} = \frac{L[V_0 e^{j\omega t}]}{L[I_0 e^{j(\omega t + \theta)}]} = \frac{V_0}{I_0} e^{-j\theta}. \quad (3.15)$$

Manipulando a Eq. (3.15), é possível escrever $Z(\omega)$ na forma;

$$Z(\omega) = Z' - jZ'' \quad , \quad (3.16)$$

onde $Z' = \frac{V_0}{I_0} \cos \theta$ e $Z'' = -\frac{V_0}{I_0} \sin \theta$ são, respectivamente, as partes real e imaginária da impedância elétrica.

Assim, o ângulo de fase relacionado à defasagem entre a corrente e o potencial é dado por

$$\theta = \tan^{-1} \frac{Z''}{Z'}. \quad (3.17)$$

O ângulo de fase para os elementos de circuitos resistor, capacitor e indutor é apresentado na Tabela 3.1.

3.4 - Representação e análise da espectroscopia de impedância elétrica

Em geral, em termos de visualização gráfica, tanto representações cartesianas quanto polares são usadas para apresentar o resultado de uma medida da espectroscopia de impedância elétrica. Na representação cartesiana, conhecida como diagrama de Bode, parâmetros como $|Z|$, Z' , Z'' , θ são plotados em função da frequência em escala logarítmica (como exemplo, ver a Figura 3.6 A) (CHINAGLIA, D. L. et al., 2008). Já a representação polar (mais conhecida como diagrama de Nyquist) descreve a relação entre Z'' e Z' (Z'' x Z') (ver Figura 3.6 B), como exemplo) com a frequência de forma implícita, já que cada ponto no diagrama de Nyquist representa a impedância em uma dada frequência (CHINAGLIA, D. L.

³ $L[e^{at}] = \frac{1}{s-a}$

et al., 2008). Ambas as apresentações são necessárias para descrever diferentes aspectos de uma mesma medição. O diagrama de Nyquist permite possíveis informações sobre os elementos elétricos que caracterizam uma amostra, sendo, portanto, uma forma direta de estabelecer analogias com circuitos elétricos equivalentes. Por sua vez, o diagrama de Bode fornece informações sobre processos de relaxação que ocorrem em uma amostra de interesse.

A análise da EIE pode ser feita de duas formas: usando distribuição de tempo de relaxação ou fazendo analogia com circuitos elétricos equivalentes. A primeira forma considera relações de dispersão, usando a permissividade elétrica complexa como parâmetro e as funções de distribuição, tais como Cole-Cole, Davidson-Cole, Havriliak-Negami e Maxwell-Wagner para avaliar a fenomenologia em um meio (ASAMI, 2002; KOHN; SCHRÖTER; THURN-ALBRECHT, 2009). Por outro lado, a abordagem por circuito elétrico equivalente consiste em traçar analogias entre a resposta de uma dada amostra com a resposta de um circuito elétrico conhecido. Essa maneira de analisar os resultados tem a vantagem de mapear propriedades que podem ser associadas: a) ao material em si (propriedades do volume), tais como condutividade, constante dielétrica, mobilidade de cargas, concentração de equilíbrio de cargas (BONANOS; PISSIS; MACDONALD, 2002), taxa de geração/recombinação de cargas em células solares (FABREGAT-SANTIAGO et al., 2011) e b) à interface entre o material e o eletrodo (propriedades interfaciais), tais como capacitância da região interfacial, coeficiente de difusão, injeção e acumulação de carga (CHINAGLIA, D. L. et al., 2008; DAMOS et al., 2004). Nesse caso, é essencial levar em conta o processo físico-químico dominante para encontrar o circuito elétrico mais adequado que ajuste os dados experimentais e, portanto, torne possível caracterizar tanto as propriedades de volume quanto as interfaciais.

Nesta tese, todas as análises dos resultados são feitas através da comparação da resposta de circuitos elétricos equivalentes, tendo por base os resultados obtidos em cada experimento realizado. Assim, se faz necessário desde já descrever alguns circuitos que serão importantes para o entendimento dos processos estudados nesta tese.

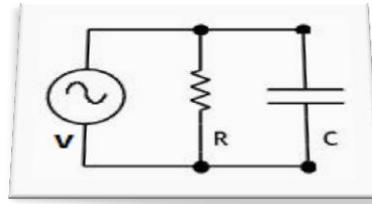


Figura 3.5 - Circuito RC em paralelo.

Um circuito fundamental neste sentido é o circuito RC em paralelo (Figura 3.5), devido à sua relevância para a descrição de processos de relaxação. Na verdade, cada uma das distintas polarizações existentes em um material pode ser identificada com a resposta total de um conjunto de circuito RC paralelo que representa a associação em série de diversos circuitos RC paralelo. Portanto, analisar o comportamento de um circuito RC paralelo é fundamental para compreender os diferentes mecanismos de polarização e transporte. Neste circuito modelo, a capacitância C descreve o acúmulo de cargas na interface eletrodo/eletrólito enquanto que R caracteriza a resistência ao fluxo de cargas nesta mesma interface.

Considerando a conservação da carga e da energia em um circuito elétrico descrito pelas leis de Kirchhoff, e tendo em conta as informações contidas na Tabela 3.1, a impedância equivalente do circuito RC paralelo é dada por

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{Z_R} + \frac{1}{Z_C} = \frac{1}{R} + \frac{1}{j\omega C} \quad (3.18)$$

Rescrevendo a Eq. (3.18) tem-se,

$$Z = \frac{R}{1 + \omega^2 \tau^2} - \frac{j\omega R\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad , \quad (3.19)$$

$$\text{com } Z' = \frac{R}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad , \quad (3.20)$$

$$\text{e } Z'' = -\frac{\omega R\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad , \quad (3.21)$$

onde $\tau = RC$ é o tempo característico do circuito definido pela condição $\frac{d(-Z'')}{d\omega} = 0$ e relacionado com a frequência de relaxação $\omega_{rel} = \frac{1}{RC}$ de uma dada polarização. Como condições limites, tem-se que em $\omega \rightarrow 0$, a impedância equivalente é $Z \rightarrow R$, enquanto que para $\omega \rightarrow \infty$, $Z \rightarrow 0$. Na Figura 3.6 são apresentados os diagramas de Bode e Nyquist para o circuito RC paralelo com esses limites.

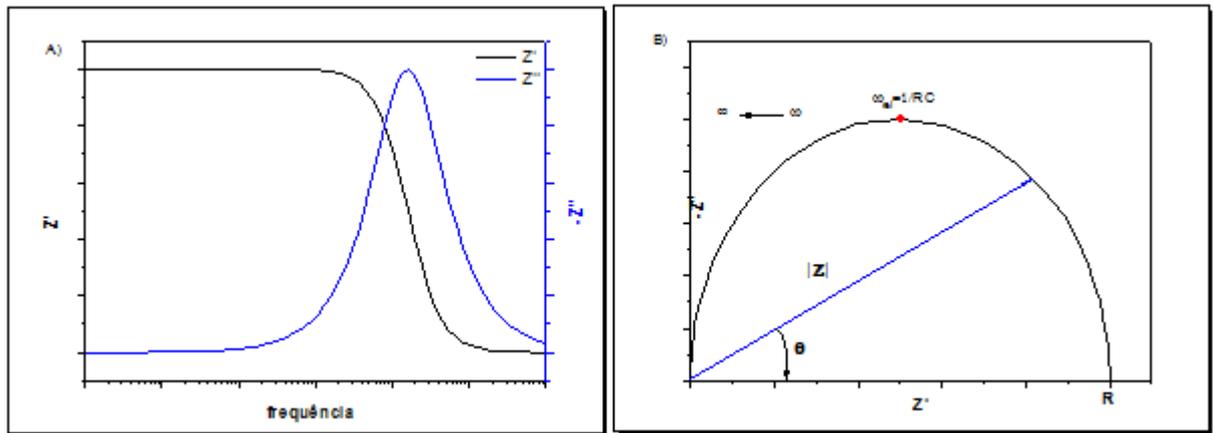


Figura 3.6 - Diagramas de Bode (A) e de Nyquist (B) para um circuito RC em paralelo, representando sistemas com um único tempo característico.

O circuito de Randles (DE LIMA, SANDRO V. et al., 2015) (Figura 3.7) é outro importante circuito elétrico equivalente, dada a sua capacidade de caracterizar o comportamento de soluções iônicas, coloidais, sólidos e de processos do tipo oxidação e difusão.

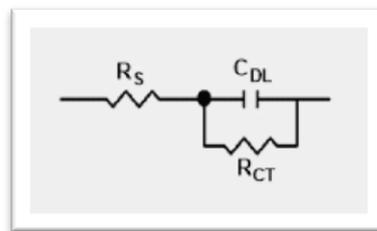


Figura 3.7 - Circuito de Randles.

No circuito de Randles, as propriedades do volume normalmente são descritas por uma resistência elétrica de volume (R_S) associada a condutividade eletrônica ou iônica no meio. Já as interações que ocorrem na interface eletrodo/solução (tais como acúmulo e

correntes faradáticas) são mapeadas pela resistência de transferência de carga (R_{CT}) e pela capacitância de dupla camada elétrica (C_{DL}).

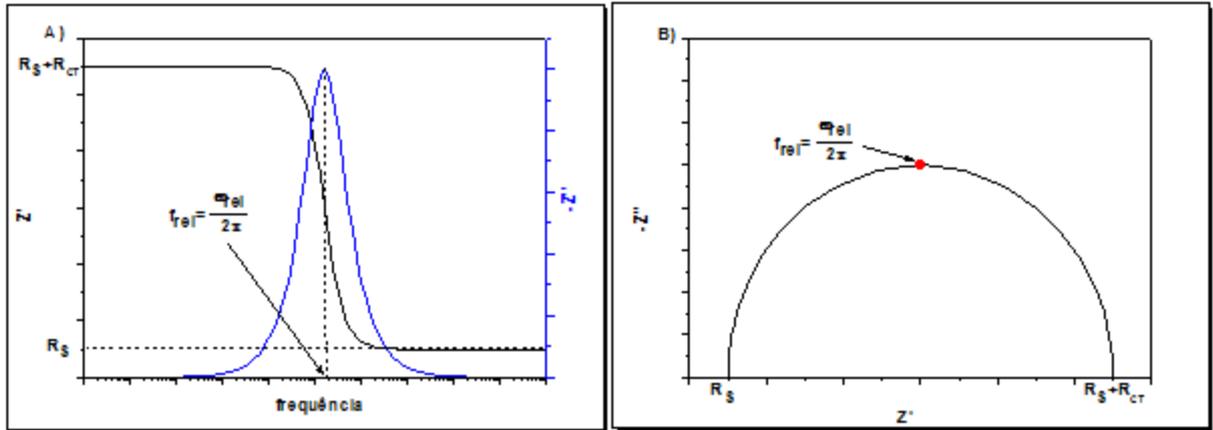


Figura 3.8 - A) Diagrama de Bode e B) Diagrama de Nyquist para um circuito de Randles.

A impedância deste circuito é descrito pela Eq. (3.22) (DE OLIVEIRA, HELINANDO P.; DE MELO, 2011).

$$Z = R_S + \frac{R_{CT}}{1 + \omega^2 \tau^2} - \frac{j\omega \tau R_{CT}}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (3.22)$$

Na Figura 3.8 são mostrados os diagramas de Bode e Nyquist do circuito de Randles, bem como seu comportamento elétrico, nos limites quando $\omega \rightarrow \infty$ ($Z \rightarrow R_S$) e quando $\omega \rightarrow 0$ ($Z \rightarrow R_S + R_{CT}$).

Para entender as características do circuito de Randles, é preciso analisar o comportamento dos íons e das moléculas de água em uma solução, na ausência e na presença de um campo elétrico externo. Na ausência de um campo elétrico externo, os íons e as moléculas de água se encontram em equilíbrio térmico e sujeitos a forças cuja média temporal independe da direção e da localização na solução. Em outras palavras, os íons positivos e negativos estão distribuídos de maneira uniforme na solução e os dipolos permanentes das moléculas de água orientados aleatoriamente. Já quando um campo elétrico é aplicado, íons e dipolos se organizam ao longo da proximidade da interface eletrodo/solução, formando camadas de distribuição, como mostrado na Figura 3.9. Nas proximidades dos eletrodos, uma monocamada, denominada de camada de hidratação (CH), se forma devido à orientação dos dipolos da água pelo campo elétrico. Já os íons atraídos pelos eletrodos se depositam sob a

camada de hidratação, do que resulta uma segunda camada, chamada de camada de Helmholtz (CHMZ) (COSGROVE, 2010). Essas duas camadas de cargas são denominadas de dupla camada elétrica e se comportam de maneira equivalente a um capacitor de placas paralelas (capacitância de dupla camada elétrica (C_{DL})). Em regiões mais distantes da interface, os íons estão semiligados e distribuídos de forma difusa na chamada camada de Gouy-Chapman (CGCH) (COSGROVE, 2010). Assim a capacitância total da solução corresponde à associação em série das capacitâncias da dupla camada elétrica e a da camada de Gouy-Chapman. Em termos do transporte de carga, o movimento de portadores de cargas na região de Gouy-Chapman é limitado pela resistência de transferência de cargas (R_{CT}), enquanto que os íons livres distribuídos no volume da solução estão sujeitos a uma resistência elétrica de volume (R_S) que caracteriza a condutividade iônica da solução.

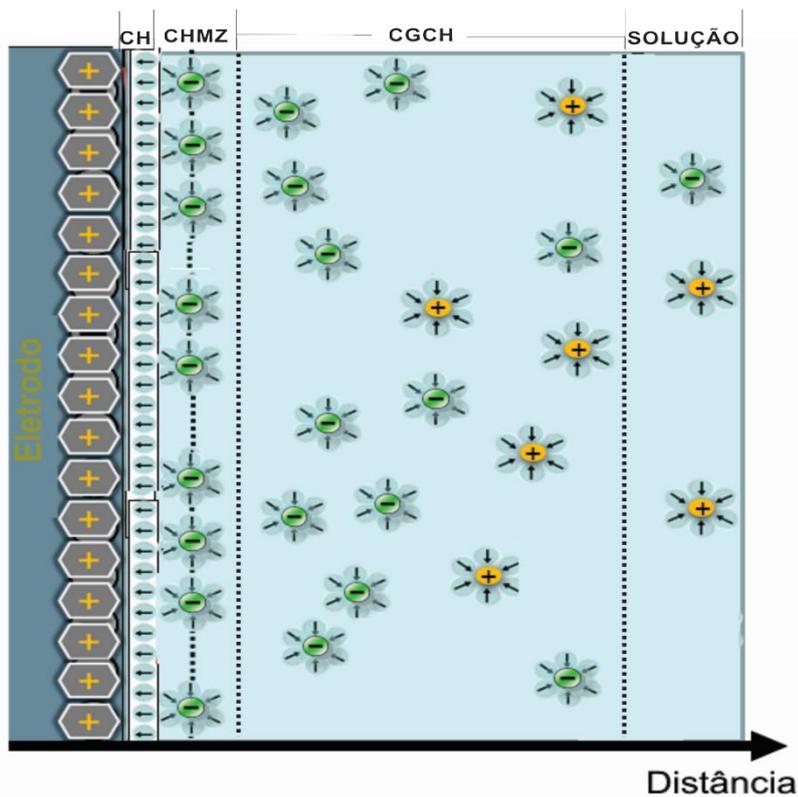


Figura 3.9 - Distribuição de íons na proximidade da interface eletrodo/solução, mostrando a camada de hidratação (CH), a camada de Helmholtz (CHMZ) e a camada de Gouy-Chapman (CGCH). Adaptada de (Double layer (interfacial) - Wikipedia, the free encyclopedia, 2015).

A camada de Helmholtz é mais pronunciada no regime de baixa agitação térmica, onde as cargas estão sob a ação do potencial do eletrodo e uniformemente distribuídas na interface, formando um típico capacitor de placas paralelas (PERELMAN; GINOSAR, 2008). Sob o efeito da agitação térmica, as cargas passam a se posicionar na camada de Gouy-Chapman conforme a distribuição de Boltzmann, e os efeitos da temperatura passam a ser relevantes.

Em diversas situações, a dupla camada elétrica não se comporta como um capacitor ideal devido a efeitos da rugosidade ou da não uniformidade das propriedades interfaciais eletrodo-solução, tais como nos casos em que exista saliências, subcamadas, ou não-homogeneidade de cargas elétricas, e ainda quando da presença de espécies absorvidas, entre outros (BARSOUKOV; MACDONALD, 2005). Devido a esse desvio do comportamento de um capacitor ideal, a impedância da amostra pode apresentar como característica uma depressão na parte imaginária nos diagramas de Nyquist, como mostrado na Figura 3.10.

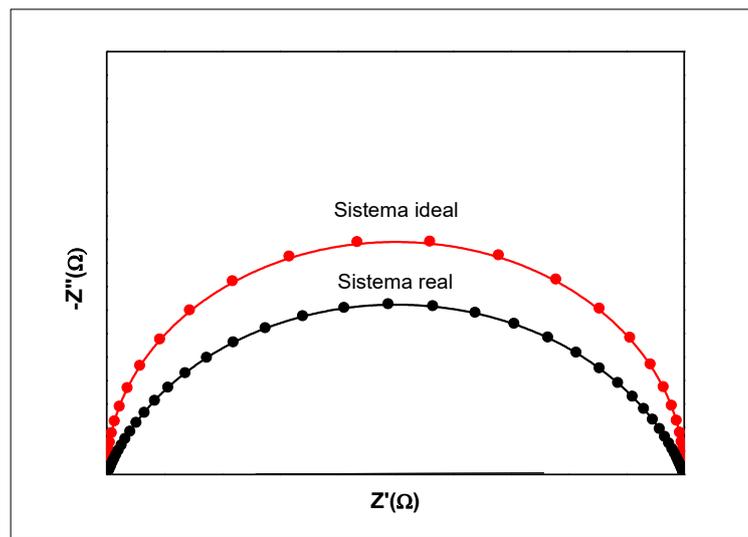


Figura 3.10 - Comparação entre o comportamento ideal e real da dupla camada elétrica.

Nenhum dos elementos de circuito conhecidos é capaz de ajustar bem este fenômeno. Um recurso puramente matemático, conhecido como elemento de fase constante (CPE), foi implementado pelos irmãos Cole para lidar com este desvio no comportamento de capacitor, e vem sendo usado aos longos dos anos como importante ferramenta de análise (BARSOUKOV; MACDONALD, 2005; MACDONALD, J. R., 1992). A impedância do CPE, definida pela Eq. (3.23), tem como peculiaridade o fato de que o expoente n está

relacionado ao ângulo de fase na forma $\theta = n\frac{\pi}{2}$; podendo assumir valores no intervalo $-1 \leq n \leq 1$. Outra peculiaridade importante é que, para certos valores de n , a impedância de CPE expressa, exatamente, a impedância dos elementos de circuitos mostrados na Tabela 3.1.

$$Z_{CPE} = \frac{A_o}{(j\omega)^n}, \quad (3.23)$$

onde A_o é uma constante de proporcionalidade e ω a frequência angular.

Este fato é esperado, tendo em conta a relação que o expoente n guarda com o ângulo de fase. Assim considerando os valores de ângulos de fase apresentados na Tabela 3.1 e o significado da constante A_o , é possível estabelecer, em cada caso, para quais valores n deve assumir para descrever determinado fenômeno físico. A Tabela 3.2 traz um resumo de alguns fenômenos físicos e os respectivos assumidos por n .

Valores de n	Propriedade elétrica	Constante A_o	Fenômeno
0	Resistência (R)	R	Dissipação de energia na forma de calor
1	Capacitância (C)	$\frac{1}{C}$	Energia armazenada no campo elétrico
-1	Indutância (L)	L	Energia armazenada no campo magnético
$0 \pm \varepsilon$	Resistência /Indutância	R/L	Resistência distorcida associada à condutância da nuvem iônica ou relacionada com energia magnética/ eletrostática
$1 - \varepsilon$	Capacitância	$\frac{1}{C}$	Desvio da capacitância devido distribuição e acúmulo de cargas ou rugosidade na superfície do eletrodo.
$-1 + \varepsilon$	Indutância	L	Distorção da indutância

Tabela 3.2 - Comportamento do elemento de fase constante (CPE) para diferentes valores de n com $\varepsilon=0.2$, adaptada de (YUAN et al., 2009).

Capítulo 4 - O uso da espectroscopia de impedância elétrica como método alternativo para estudar a formação de complexos polianilina/DNA

Avanços recentes na área de nanobiotecnologia voltados para teste de diagnóstico de doenças têm sido acompanhados por desenvolvimentos de plataformas miniaturizadas para a identificação de macromoléculas, tais como DNA, com alta sensibilidade e especificidade (GIAVAZZI et al., 2014; RODRIGO et al., 2014). Do ponto de vista químico, uma molécula de DNA pode ser considerada como um poliânion, podendo se ligar com outras moléculas via interações eletrostáticas via grupos fosfatos e/ou ligações de hidrogênio via base nitrogenadas (YU, S. et al., 2008) (BHATTACHARYA, S.; MANDAL, 1997; CAO, W. et al., 2006). Nesse sentido, o desenvolvimento de novos protocolos para a determinação e quantificação de DNA baseados na reação entre DNA e moléculas catiônicas, tais como surfactantes e/ou polímeros, são alternativas promissoras aos testes de diagnósticos comerciais disponíveis (HONG et al., 2006; MEDINA LLAMAS et al., 2014). Além disso, é importante considerar que devido à carga negativa dos grupos fosfatos, as moléculas de DNA podem ser consideradas um semicondutor tipo-n que, com uma subsequente interação com um semicondutor tipo-p (como polianilina protonada em meio ácido) levam à formação de complexos com potencial para uso no desenvolvimento de novos diodos orgânicos de emissão de luz (OLED) (LEONES et al., 2012).

A depender do estado de oxidação (leucoemeraldina, esmeraldina, pernigranilina) e do grau de dopagem (sal ou base) (protonação no jargão da química), a polianilina (PANI) pode se apresentar como uma molécula de cadeias longas carregadas positivamente (DE ALBUQUERQUE et al., 2004). Por essa razão, a polianilina tem sido repetidas vezes usada como alternativa para o estudo de interação com macromoléculas como o DNA (ARORA et al., 2007; HU et al., 2013; WANG, XINXING et al., 2015; ZHANG et al., 2007). Um fator importante para este tipo de interação é a estabilidade de ambas as moléculas em um dado solvente. A solubilidade da PANI depende das condições ambientais, como a polaridade do solvente. Por exemplo, PANI no estado sal de esmeraldina tem limitada solubilidade em água. Nessa direção, diversos trabalhos mostram que a dopagem dos grupos iminas presentes na

base de esmeraldina por ácidos orgânicos, resulta em cadeias carregadas positivamente e com solubilidade razoável em solventes de baixa polaridade (BHADRA et al., 2009; PETROVA et al., 2011; YOON; YOON; KIM, 2011). Por outro lado, as moléculas de DNA se caracterizam por terem solubilidade limitada em solventes orgânicos, especialmente aqueles de baixa polaridade. Portanto, a aplicabilidade de métodos de diagnósticos baseados em polianilina demanda em primeiro lugar uma boa escolha do solvente, e em segundo lugar o entendimento dos mecanismos de interação das cadeias de PANI com as fitas de DNA. Comumente, para elucidar os mecanismos de interação de moléculas desse tipo, técnicas convencionais de espectroscopia óticas, tais como absorção e fluorescência na região do ultravioleta ao visível, são usadas. Neste capítulo, a espectroscopia de impedância elétrica é aplicada como um método alternativo para investigar a formação de complexos PANI/DNA em soluções de clorofórmio (um solvente de baixa polaridade) contendo os complexos DNA/ brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (um surfactante eficaz para estabilizar as moléculas de DNA no clorofórmio) e PANI/ ácido dodecilbenzeno sulfônico (DBSA) (um molécula que atua como dopante e com um surfactante que estabiliza a cadeia de PANI no clorofórmio). Ao longo do capítulo são apresentados argumentos em favor deste método alternativo usando circuitos elétricos equivalentes.

4.1 - Materiais e Métodos

4.1.2 - Materiais

Em todos os experimentos realizados, a anilina, o persulfato de amônio, o hidróxido de amônio, o ácido clorídrico (HCl), o DNA do timo do bezerro tipo XV, com peso molecular de 8418000 g/mol (PORSCH et al., 2009), (aproximadamente 13000 pares de bases), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), o ácido dodecilbenzeno sulfônico (DBSA) e o clorofórmio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Com exceção da anilina, todos os reagentes foram usados como recebidos. Neste caso, antes da síntese da polianilina, a anilina foi destilada a vácuo para sua completa purificação.

4.1.3 - Métodos

Síntese de sal e base esmeraldina.

Para a síntese de polianilina, 0,2 mL de anilina destilada foi dissolvido em 50 mL de HCl (1,0 M em água) à temperatura ambiente. Em seguida, o oxidante persulfato de amônio (2,85 g) foi dissolvido em 50 mL de água deionizada e cuidadosamente gotejado na solução contendo anilina. A mistura foi mantida em agitação magnética durante 24 horas para completar a reação de polimerização, o que leva à formação de precipitados de sal de esmeraldina, facilmente averiguada pela coloração esverdeada característica deste estado. O precipitado formado na reação foi então lavado com HCl (0,2 M) e com uma solução acetona/água na proporção 1:1 em volume. Posteriormente, o sal de esmeraldina foi submetido a um processo de secagem à vácuo a uma temperatura de 60 °C. Finalmente, o sal de esmeraldina foi convertido na base esmeraldina com auxílio de uma solução de hidróxido de amônio (0,1 M) usado como agente desdopante. Visualmente ocorre uma mudança de cor na solução, de verde para azul, o que é um indicativo da conversão do sal para a base esmeraldina. A solução de base de esmeraldina foi filtrada para coletar o precipitado, que foi posteriormente lavado com água e acetona e seco a vácuo em 60 °C.

Síntese dos complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB

Para preparar complexos de PANI/DBSA com razoável estabilidade no clorofórmio as referências (CAO, Y.; QIU; SMITH, 1995a; CAO, Y.; SMITH; HEEGER, 1992; LOKSHIN et al., 2003; SERGEEV et al., 2003) foram usadas como roteiro da síntese. Segundo essas referências, a condição que promove a melhor estabilidade do complexo em clorofórmio é aquela cuja mistura de PANI e DBSA tem uma razão estequiométrica entre átomo de Enxofre (S) do DBSA e o do átomo de Nitrogênio (N) da PANI igual a 0,75 ($[S]/[N]=0,75$), o que significa dizer que a razão molar $[PANI]/[DBSA]=1:160$. Levando em conta estas considerações, 5 mg de PANI com estado de oxidação base esmeraldina foi misturado com 14,2 mg de DBSA em 20 mL de clorofórmio e agitado vagarosamente durante 24 horas. A solução resultante é caracterizada pela mudança da cor de azul para verde, como resultado de

reação de protonação (dopagem), que converte PANI base esmeraldina para PANI sal de esmeraldina, como mostra a Figura 4.1. Essa solução foi usada como solução-mãe nos experimentos que nos permitiram avaliar quais os mecanismos de interação dominantes entre PANI e DNA.

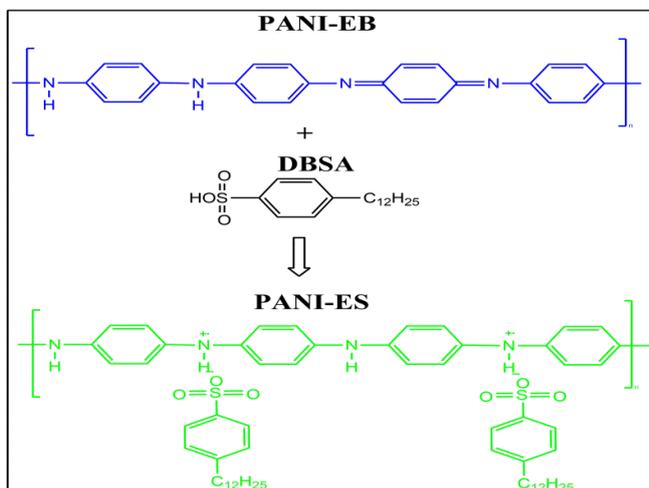


Figura 4.1 - Esquema de protonação da PANI-EB com DBSA levando a formação do complexo PANI-ES.

O complexo resultante PANI/DBSA é solúvel em solventes de baixa polaridade, tais como clorofórmio, devido à molécula de DBSA atuar tanto como dopante quanto como surfactante, e assim, graças à sua cauda hidrofóbica, que tem afinidade por grupos não polares presentes na molécula do solvente, as cadeias de PANI se tornam estáveis no meio (AFZAL et al., 2010).

Para preparar o complexo DNA/CTAB com uma boa estabilidade em solventes de baixa polaridade, como o clorofórmio, a relação estequiométrica de uma molécula de surfactante (ou um átomo de N de CTAB) por cada grupo fosfato (P) do DNA (isto é, [N]/[P]=1) foi usada conforme procedimentos já estabelecido (BHATTACHARYA, S.; MANDAL, 1997; IJIRO; OKAHATA, 1992; PYSHKINA, O. A.; SERGEYEV, V. G., 2012). Tendo em vista esta condição, o complexo DNA/CTAB foi preparado por uma reação de precipitação em água. Para isso, CTAB e DNA foram dissolvidos, em separado, em um volume de 5 mL de água deionizada. Posteriormente, a solução de DNA foi gotejada vagorosamente dentro da solução de CTAB, levando à formação de complexos DNA/CTAB, com subsequente precipitação devido à pouca estabilidade deste complexo em água uma vez

que a cabeça hidrofílica do CTAB interage com os grupos fosfato de DNA, neutralizando as cadeias deste, e a cauda hidrofóbica por não tem afinidade com moléculas de água induz a perda da estabilidade das fitas de DNA (SERGEEV et al., 2003). O complexo DNA/CTAB foi então completamente separado da solução através de centrifugação e posterior retirada do sobrenadante. Por fim, o aglomerado de DNA/CTAB resultante da centrifugação foi seco a vácuo durante três dias. Após este período, o pó de DNA/CTAB foi dissolvido em clorofórmio para preparar a solução-mãe a ser usada nos experimentos essenciais deste capítulo.

De maneira similar ao complexo PANI/DBSA, a solubilidade do complexo DNA/CTAB em clorofórmio é favorecida pela interação das moléculas do surfactante com cada um dos grupos fosfatos do DNA e também pelo caráter hidrofóbico da cauda do surfactante, que providencia a estabilidade necessária do complexo no meio (BHATTACHARYA, S.; MANDAL, 1997; IJIRO; OKAHATA, 1992).

Procedimentos

Para realizar os experimentos, uma alíquota fixa da solução-mãe do complexo PANI/DBSA foi misturada a alíquotas crescentes da solução-mãe do complexo DNA/CTAB em diferentes razões estequiométricas de $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}$ (de 0 a 2,75), o que corresponde a uma razão molar de 0 to 1:1350 para $[\text{DNA}]/[\text{PANI}]$. Após a mistura, as soluções foram centrifugadas em uma rotação 4000 rpm durante 4 min em todos os experimentos, para retirar o precipitado formado e o sobrenadante usado para análises por diferentes técnicas discutidas neste capítulo.

Técnicas experimentais

Para a análise ótica, 1 mL das soluções sobrenadante com diferentes razão estequiométricas foi colocado em uma cubeta de quartzo (com caminho ótico de 1 cm) para a medida da absorvância na faixa de 250 nm a 900 nm, usando o espectrômetro DR 5000 (Hach, EUA).

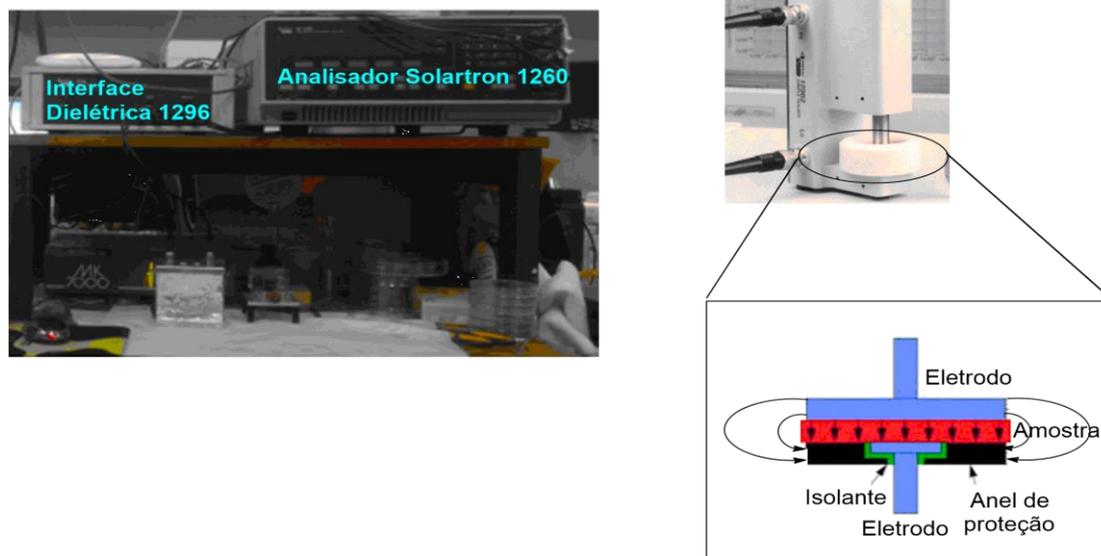


Figura 4.2 - Montagem experimental das medidas de impedância elétrica.

Um procedimento similar foi adotado nas medidas de espectroscopia de impedância elétrica. Para isso, 1 ml de sobrenadante foi colocado no porta amostra 12962A (Hampshire, Reino Unido) com disposição de eletrodo na forma de placas paralelas conectadas ao conjunto analisador de impedância 1260 dotado de uma interface dielétrica 1296 (Hampshire, Reino Unido), como mostra a Figura 4.2. Uma tensão AC com amplitude de 10 mV foi aplicada entre os terminais dos eletrodos e a medida de impedância elétrica foi realizada no intervalo de frequência de 1Hz a 1MHz.

Para medidas de infravermelho (FTIR) realizadas no espectrômetro Prestige-2 (Shimadzu, Japão), foi usada uma pastilha de brometo de potássio (KBr) contendo 1 mg de precipitado na razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}=1$. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram coletadas no microscópio TM1000 (Hitachi, Japão) com tensão de operação igual a 20 kV no Instituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

4.2 - Resultados

4.2.1 - Análise MEV

As micrografias de MEV fornecem informações qualitativas sobre o grau de porosidade e rugosidade da superfície dos complexos analisados. Assim, na Figura 4.3 são mostradas as micrografias da PANI pura (descrita como PANI na Figura 4.3), dos complexos PANI/DBSA, DNA/CTAB e do complexo PANI/DNA formado na razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}=1$. Claramente, a PANI apresenta uma morfologia de agregados com um alto grau de porosidade. Por outro lado, ao atuar como um agente dopante da PANI (HABA et al., 1999), o DBSA promove uma plasticidade maior na matriz polimérica e melhora a rugosidade da PANI (ver micrografia PANI/DBSA na Figura 4.3).

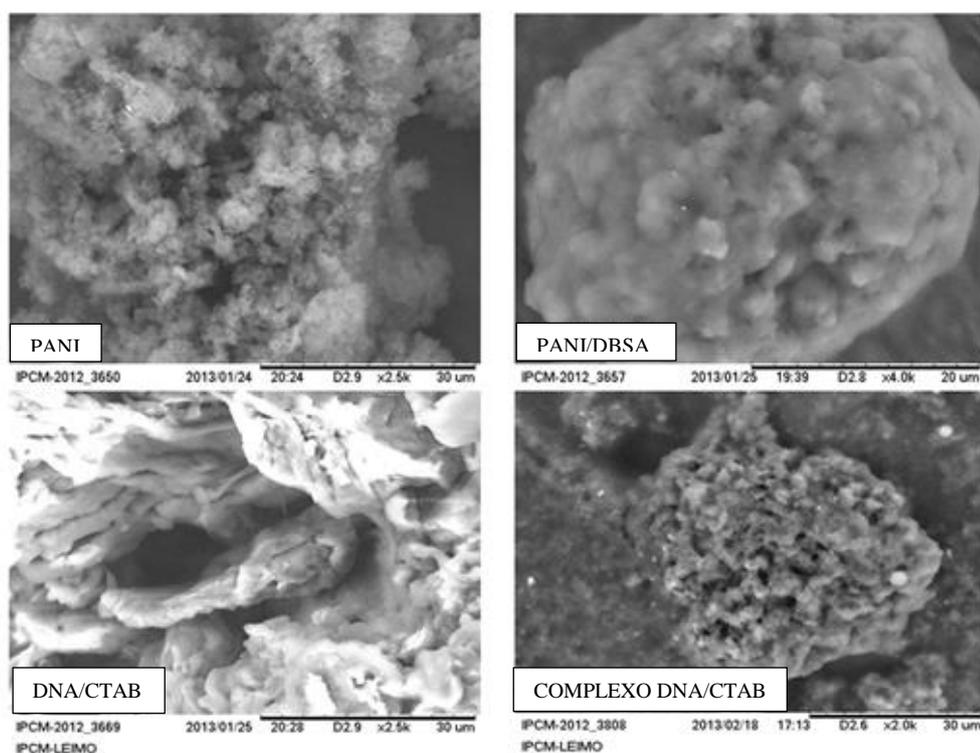


Figura 4.3 - Micrografias de PANI pura e dos complexos PANI/DBSA, DNA/CTAB e PANI/DNA.

O complexo DNA/CTAB apresenta uma morfologia compacta mutilamelar, que é característica deste tipo de complexo (PYSHKINA, O.; SERGEYEV, V., 2012). Do ponto

qualitativo a micrografia do complexo PANI/DNA, se faz evidente que tal complexo conserva muitos aspectos da morfologia da polianilina pura (ver comparação nas microscopias da Figura 4.3), ou seja, neste caso não há a formação de uma estrutura multilamelar (característica típica no complexo DNA/CTAB) e sobressai o aspecto da polianilina. Um nível intermediário de rugosidade entre a PANI pura e o complexo PANI/DBSA é observado no complexo PANI/DNA, o que pode ser atribuído à presença de DBSA residual neste complexo, que foi confirmado pela análise de FTIR da seção 4.2.2.

4.2.2 - Análise de infravermelho

Uma técnica importante para oferecer informações relevantes sobre o nível de interação entre as cadeias de PANI e as fitas da DNA é a espectroscopia na região do infravermelho. Assim, na Figura 4.4 é mostrado um espectro típico de FTIR para DNA puro, PANI puro e do precipitado resultante da mistura dos complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB na razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}=1$. As bandas de FTIR de cada composto com suas respectivas vibrações são mostrados na Tabela 4.1.

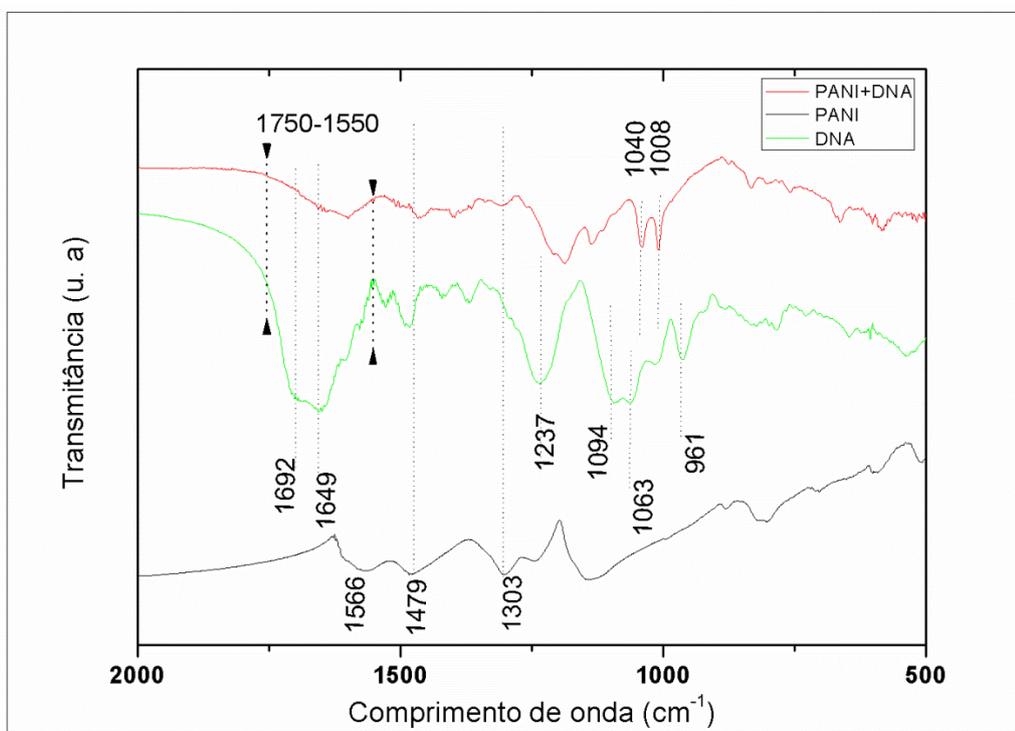


Figura 4.4 - Espectros de infravermelho de DNA puro, PANI puro e do complexo PANI/DNA.

k(cm⁻¹)	DNA⁴	k(cm⁻¹)	PANI⁵	k(cm⁻¹)	PANI/DNA⁶
961	Estiramento C-C da desoxirribose	820	Flexão fora do plano no C-H aromático	832	Flexão fora do plano no C-H aromático
1016	Estiramento C-O da desoxirribose	1143	Modo de Vibração de B-NH ⁺ =Q ou B-NH ⁺ -B	1008	Estiramento -S=O do DBSA
1063	Estiramento P-O/C-desoxirribose	1245	Estiramento C-N ⁺ na estrutura de pólaron	1040	Estiramento -S=O do DBSA
1094	Estiramento simétrico PO ₂ ⁻	1303	Estiramento C-N amina aromática secundária.	1137	Modo de vibração de B-NH ⁺ =Q ou B-NH ⁺ -B; Estiramento C-O da desoxirribose
1237	Estiramento assimétrico PO ₂ ⁻	1479	Estiramento do anel benzenóide	1187	Flexão no plano (B) C-H
1371	Estiramento C-N da citosina e guanina	1566	Estiramento do anel quinóide	1208	Estiramento assimétrico PO ₂ ⁻ ; Estiramento C-N ⁺ na estrutura de pólaron
1416	Deformação C-H, N-H; estiramento C-N			1306	Estiramento C-N amina aromática secundária.
1483	Vibração do anel da citosina/guanina			1400	Deformação C-H, N-H; estiramento C-N
1532	Vibração no plano na guanina e citosina			1464	Vibração do anel da citosina/guanina; Estiramento do anel benzenoide
1604	Vibração no plano da adenina			1599	Estiramento C=O citosina/timina; vibração no plano da timina
1649	Estiramento C=O citosina/timina; vibração no plano da timina			1642	Estiramento C=O da guanina/timina; N-H timina
1692	Estiramento C=O da guanina/timina; N-H timina				

Tabela 4.1 - Assinaturas características de infravermelho do DNA puro, PANI pura do complexo PANI/DNA.

⁴ (ALEX; DUPUIS, 1989; ARAKAWA et al., 2000; DOVBESHKO et al., 2000; GUO et al., 2009; MOHAMED et al., 2012; OUAMEUR; TAJMIR-RIahi, 2004; SARKAR; MANDAL, 2012; SUN et al., 2007; WATSON et al., 2013).

⁵ (AMARNATH; PALANIAPPAN, 2005; BOYER et al., 2000; CHO et al., 2004; KANG, E.; NEOH; TAN, 1998; SANCHES et al., 2011; TANG et al., 1988; TRCHOVÁ; STEJSKAL, 2011; ZENG; KO, 1998)

⁶ (ALEX; DUPUIS, 1989; AMARNATH; PALANIAPPAN, 2005; ARAKAWA et al., 2000; BOYER et al., 2000; CHO et al., 2004; DOVBESHKO et al., 2000; GALIANI et al., 2007; GUO et al., 2009; KANG, E. et al., 1998; MOHAMED et al., 2012; OUAMEUR; TAJMIR-RIahi, 2004; SANCHES et al., 2011; SARKAR; MANDAL, 2012; SUN et al., 2007; TANG et al., 1988; TRCHOVÁ; STEJSKAL, 2011; WATSON et al., 2013; ZENG; KO, 1998).

Da análise dos dados da Tabela 4.1 e dos espectros apresentados na Figura 4.4, é possível concluir que as bandas características da PANI em 1303 cm^{-1} (banda do estiramento C-N) (ANSARI; MOHAMMAD, 2012; HAN, D. X. et al., 2005), em 1566 cm^{-1} (estiramento do anel quinóide) e em 1479 cm^{-1} (estiramento do anel benzenóide) estão presentes tanto na PANI pura quanto no precipitado. Em outras palavras, isto indica que o precipitado, resultante da mistura dos complexos DNA/CTAB e PANI/DBSA, contém PANI, ou seja as cadeias de DNA promovem a perda da estabilidade das moléculas de polianilina e leva a sua precipitação na forma do complexo PANI/DNA. Outro fato que pode ser constatado é que a formação do complexo PANI/DNA não altera o estado de oxidação de polianilina, uma vez que tanto no caso puro quanto no complexo os espectros de infravermelho apresentam bandas características do sal de esmeraldina.

Para buscar entender melhor quais seriam as interações fundamentais para precipitação, é necessário também examinar as características do espectro do DNA puro. No espectro do DNA puro, os picos em 961 cm^{-1} e 1063 cm^{-1} correspondem aos estiramentos de C-C e P-O/C-O da desoxirribose, enquanto que os picos em 1094 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} são as assinaturas características do estiramento simétrico e assimétrico do PO_2^- presentes no grupo fosfato (JANGIR et al., 2011; JANGIR et al., 2010). Além disso, na faixa ampla de 1550 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} tem-se os picos característicos das bases nitrogenadas guanina, timina, adenina e citosina.

Comparando os espectros de infravermelho da Figura 4.4 com os dados contidos na Tabela 4.1, verifica-se que no complexo PANI/DNA a existência dos picos em 1008 e 1040 cm^{-1} (estiramento $-\text{S}=\text{O}$) indica a presença de DBSA residual no complexo PANI/DNA, o que confirma a hipótese adiantada na seção anterior sobre a existência do nível intermediário na rugosidade do complexo PANI/DNA (Figura 4.3). É possível verificar que a assinatura vibracional dos grupos quinóides da PANI se sobrepõe em uma larga faixa ao espectro FTIR do DNA puro. Mesmo assim, se for tomada a faixa de 1550 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} , é possível obter evidências de que existe uma interação entre as cadeias de PANI e as fitas do DNA. Neste intervalo, os picos em 1649 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{O}$ da citosina/timina e vibração no plano da timina) (MOHAMED et al., 2012) e 1692 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{O}$ da guanina/timina e estiramento N-H da timina) (WATSON et al., 2013) no DNA puro são deslocados respectivamente para 1599 cm^{-1} e 1642 cm^{-1} , no complexo PANI/DNA. Isso pode ser tomado

como uma evidência que o fenômeno de precipitação da PANI em solução é de fato induzido pela interação do polycation PANI com o poliânion DNA.

4.2.3 - Análise de UV-Vis

Na busca do entendimento e de um melhor detalhamento do nível de interação entre as fitas de DNA e as cadeias de PANI, o conhecimento do espectro de absorção no UV-Vis é fundamental para uma análise quantitativa do problema. Tendo em conta este fato, os espectros UV-Vis (mostrados na Figura 4.5) da solução sobrenadante em diferentes razões estequiométricas $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$ oferecem informações sobre a estabilidade de PANI em solução. Em outras palavras, as mudanças observadas na intensidade da absorbância UV-Vis indicam como a interação entre DNA/CTAB e PANI/DBSA, bem como a razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$, afeta a concentração de moléculas de PANI estáveis em solução.

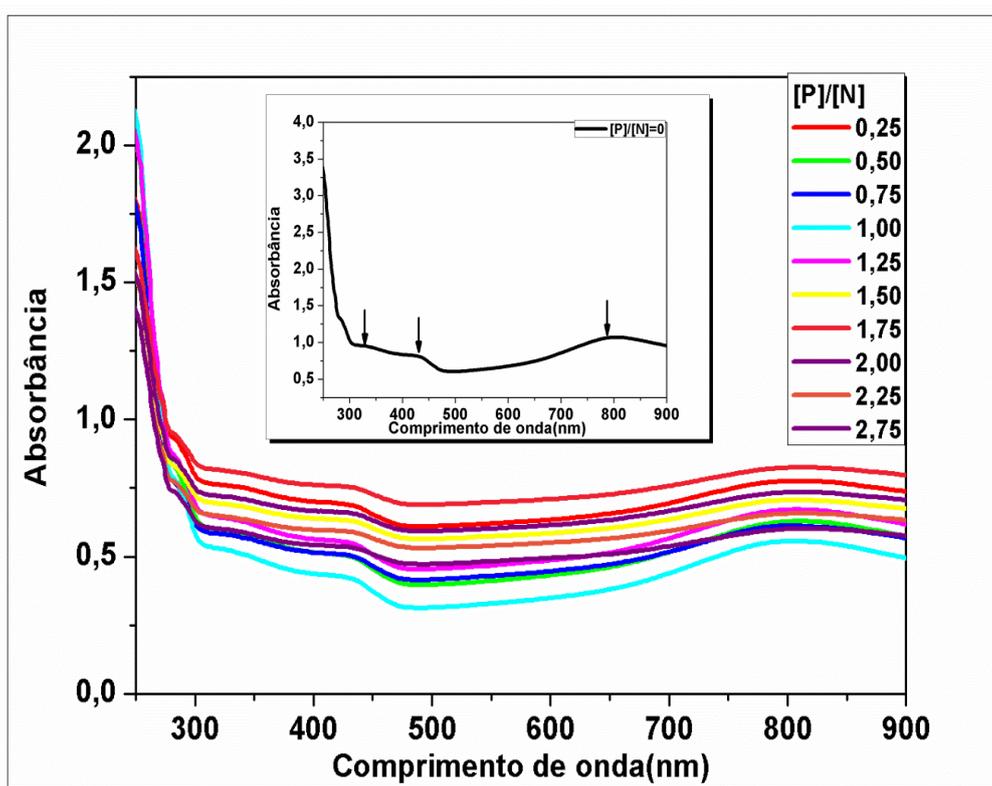


Figura 4.5 - Espectros dos sobrenadantes das misturas dos complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB em diferentes razões estequiométricas do $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. No detalhe, o espectro UV-Vis da solução PANI/DBSA com suas bandas características.

O típico espectro UV-Vis da solução PANI/DBSA mostrado no detalhe da Figura 4.5 apresenta uma banda de absorção em 330 nm, um ombro em 430 nm e outra banda de 790 nm, correspondendo, respectivamente, a transições $\pi-\pi^*$ do anel benzenóide, transições pólaron- π^* e transições π -pólaron. Essas bandas confirmam que, no presente trabalho, a PANI se apresenta no estado de oxidação de sal de esmeraldina. Portanto, uma simples observação de um dos picos da PANI traz informações importantes sobre como a interação PANI/DNA influencia na estabilidade das cadeias de PANI, uma vez que a medida da absorvância fornece informações quantitativas da presença de moléculas de PANI em solução. Uma discussão sobre como a presença das moléculas de PANI em solução é afetada pela razão $[P]_{DNA}/[N]$ é feita com maior riqueza de detalhes na Seção 4.3.

4.2.4 - Análise de EIE

O uso da EIE para investigar processos microscópicos em física da matéria frágil, tais como concentração micelar crítica (CMC) em surfactantes, concentração de agregação crítica (CAC) em corantes e transições em surfactantes induzidas por temperatura (ARAUJO et al., 2010; DE LIMA, S. V.; DE OLIVEIRA, 2010; DE OLIVEIRA, HELINANDO P.; DE MELO, 2011; DE OLIVEIRA, H. P. et al., 2006) é um tema bem estabelecido no grupo de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

No sentido de ampliar os limites de aplicabilidade dessa técnica, o tema central deste capítulo é verificar a possibilidade de uso da EIE para acompanhar a formação de complexos DNA/polímeros, tendo em conta que tanto os mecanismos de transporte de carga, bem como a polarização de dipolos serão afetados durante a formação dos complexos. Em termos da magnitude da impedância, é possível delimitar dois extremos no estudo do complexo PANI/DNA: um nível alto de impedância que caracteriza a resposta tipicamente do solvente (clorofórmio), como resultado do alto grau de precipitação do complexo PANI/DNA e um baixo nível de impedância associado à PANI estável em solução. Em outras palavras, isso significa dizer que podemos associar um regime baixo de impedância à dispersão do complexo PANI/DBSA em solução, enquanto que um alto valor de impedância caracteriza a

resposta de PANI/DBSA residual ainda presente em solução quando o complexo PANI/DNA é formado.

Para exemplificar o exposto acima, apresentamos na Figura 4.6, um mapa 3-D onde pode ser observado como a mudança na razão estequiométrica $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}$, causada pela introdução de DNA/CTAB na solução de PANI/DBSA, e variação no valor da frequência do potencial aplicado, influenciam a parte real da impedância da solução sobrenadante. Ao analisar o espectro de impedância ($Z' \times \log(f)$ na Figura 4.6) é possível verificar duas regiões distintas: uma, em baixa frequência, que se deve à resposta de cargas livres, e outra, em alta frequência, cuja principal contribuição vem da resposta de cargas ligadas (dipolos).

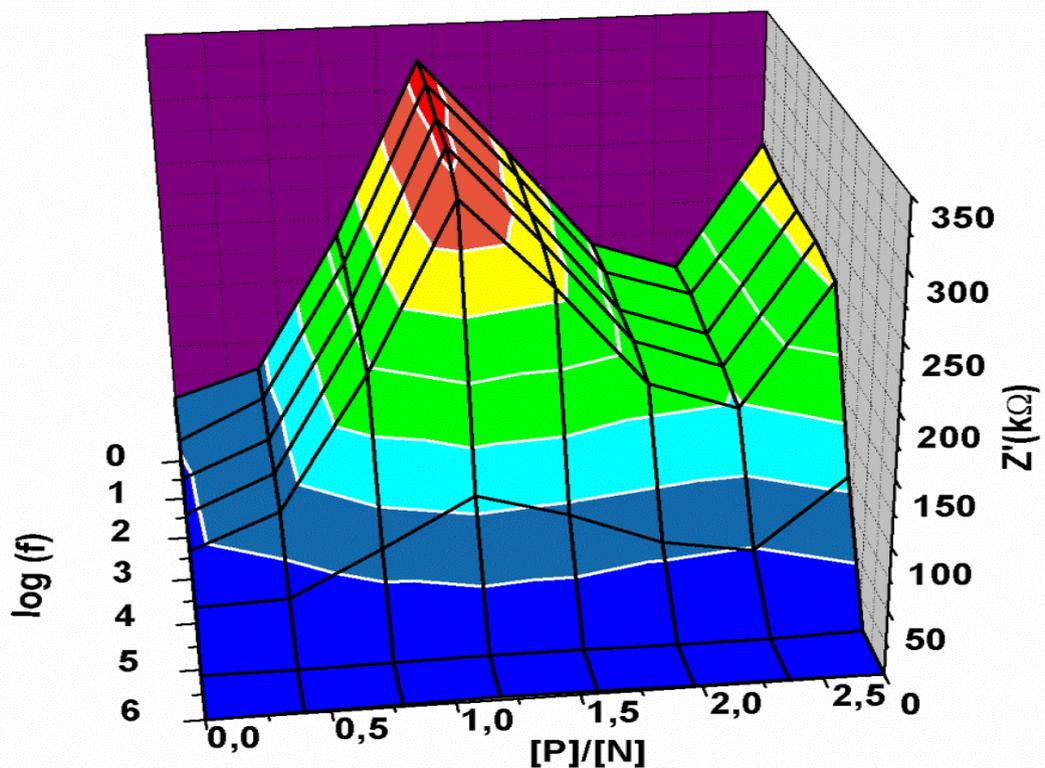


Figura 4.6 - Mapa 3D da parte real da impedância das soluções sobrenadantes que caracterizam a formação de complexos PANI/DNA como função da frequência aplicada e razão $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}$.

Neste caso, a região do espectro de impedância elétrica mais adequada para avaliar a resposta dielétrica do complexo é aquela referente à resposta de cargas livres, pois a alta condutividade da PANI/DBSA (como indicado pelo mínimo valor da resposta Z' em $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}=0$ na Figura 4.6) contribui para o transporte de carga induzido pelo campo elétrico

aplicado. Como esperado, quando o complexo PANI/DNA é formado, uma quantidade menor de moléculas de PANI permanece em solução e, portanto, um aumento na resposta de impedância deve ocorrer. Nesse regime, a parte real da impedância progressivamente aumenta com o aumento da concentração de DNA/CTAB introduzida em solução, até que seja alcançado um máximo bem definido em $[P]_{DNA}/[N]_{PANI} = 1$ (ver resposta $Z' \times [P]/[N]$ na Figura 4.6). Acima desse limite, a introdução de mais DNA/CTAB é acompanhada pela redução no nível de impedância da solução, devido ao fato que nesta condição ocorre um aumento na quantidade dos complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB (como pode ser confirmado pela comparação com as medidas óticas da Seção 4.2.4) disperso na solução, o que naturalmente torna a solução mais condutora.

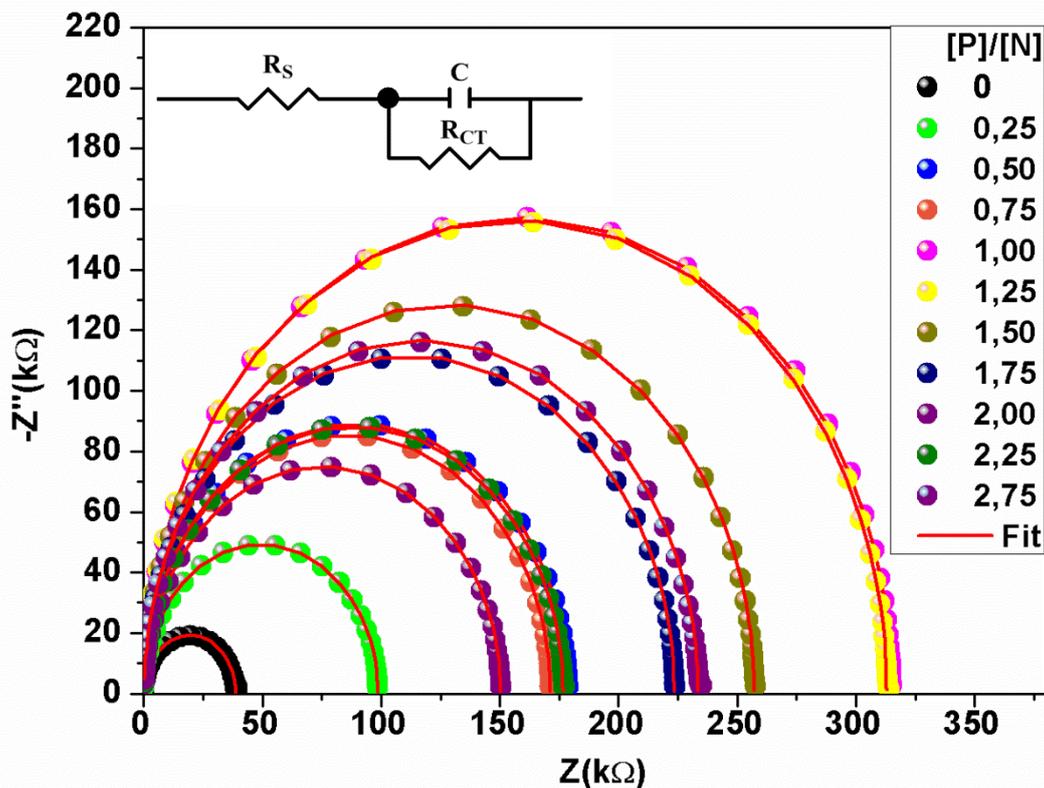


Figura 4.7 - Diagrama de Nyquist das soluções sobrenadantes que caracterizam a formação de complexos PANI/DNA como função da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$ e, no detalhe, o circuito de Randles usado como modelo equivalente dos dados experimentais. As linhas correspondem aos resultados dos ajustes feitos usando circuito modelo.

Analisando este problema do ponto de vista do diagrama de Nyquist mostrado na Figura 4.7, é evidente que o processo de relaxação na faixa de frequência examinada possui

apenas um semicírculo, o que indica que nesse intervalo de frequência existe apenas um único tempo característico de relaxação, que é associado aos dipolos presentes na solução, uma vez que a frequência de relaxação se encontra na faixa de 10^3 - 10^6 Hz. Além disso, é nítido que o diâmetro do diagrama de Nyquist varia conforme a razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. Isto aponta para a hipótese de que a análise dos resultados, a partir da modelagem de circuito elétrico equivalente, oferece algum parâmetro que, assim como a absorvância, é também dependente dos mecanismos de interação entre os complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB, responsável pela formação do complexo PANI/DNA. Em outras palavras, isto significa dizer que ao usar a abordagem de circuito elétrico equivalente para modelar a resposta elétrica da solução sobrenadante, é possível caracterizar os mecanismos de interação PANI/DNA.

Como pode ser visto, o circuito elétrico que melhor ajusta aos dados experimentais (como mostra a linha em vermelho da Figura 4.7) é o circuito de Randles, para o qual a impedância equivalente é dada pela Eq. 3.22 e os valores determinados a partir do ajuste são apresentados na Tabela 4.2. Portanto, é de esperar que algum parâmetro desse circuito (resistência de solução- R_S , resistência de transferência de cargas- R_{CT} ou capacitância - C^7) possa ser usado para caracterizar a dependência da solubilidade das cadeias de PANI com a razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$.

$[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$	R_S (Ω)	R_{CT} (Ω)	C (pF)
0,00	38,30 \pm 4,73	38486 \pm 57	128,00 \pm 0,20
0,25	114,60 \pm 3,51	98502 \pm 56	71,50 \pm 0,05
0,5	272,20 \pm 6,80	178290 \pm 103	39,60 \pm 0,03
0,75	124,20 \pm 6,63	171060 \pm 100	41,80 \pm 0,03
1,00	271,40 \pm 8,12	314800 \pm 134	24,70 \pm 0,02
1,25	133,90 \pm 10,02	312850 \pm 157	24,20 \pm 0,02
1,50	169,20 \pm 9,01	257010 \pm 142	29,50 \pm 0,02
1,75	231,90 \pm 8,37	223250 \pm 121	31,40 \pm 0,02
2,00	273,10 \pm 5,14	150060 \pm 81	50,50 \pm 0,03
2,25	109,00 \pm 6,18	176600 \pm 94	41,7 \pm 0,03
2,75	154,40 \pm 9,31	233360 \pm 154	34,1 \pm 0,03

Tabela 4.2 – Valores dos parâmetros do circuito de Randles usado para modelar os dados experimentais em diferentes razões de $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$.

⁷ Aqui a capacitância total representa a associação em série das capacitâncias da dupla camada elétrica e da camada de Gouy-Chapman como descrito na seção 3.4.

Como esperado, o parâmetro que melhor transmite a ideia explicitada no parágrafo anterior é a resistência de transferência de carga, R_{CT} , uma vez que essa está diretamente relacionada ao diâmetro do semicírculo dos diagramas de Nyquist. Para ilustrar isto, na Figura 4.8 é mostrada uma comparação entre a dependência da R_{CT} e a absorbância (em 790 nm) do sobrenadante com a razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. Na Figura 4.8 é fácil observar que tanto a R_{CT} quanto a absorbância mostram uma forte dependência em função da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. Com a progressiva adição de complexo DNA/CTAB na solução do complexo PANI/DBSA, a R_{CT} [absorbância] da solução sobrenadante nitidamente aumenta [diminui], no regime de baixa razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$, o que significa dizer que a quantidade de PANI estável em solução está sendo progressivamente reduzida.

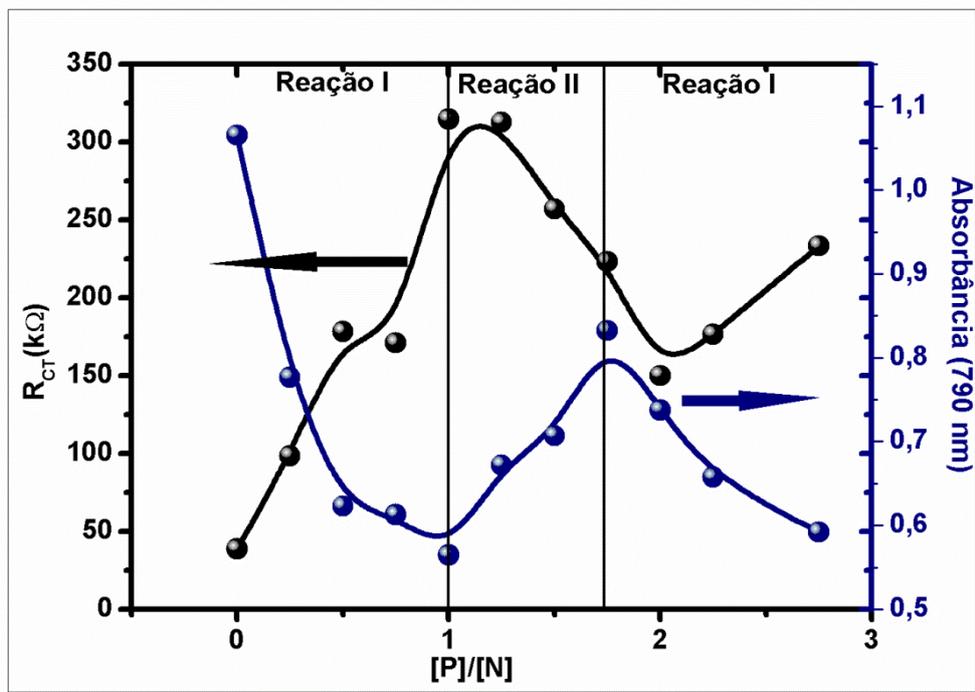


Figura 4.8 - Comparação de como a absorbância (em 790nm) e a resistência de transferência de carga elétrica das soluções sobrenadante varia como função da razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. As linhas são apenas guias para olhos.

A explicação para esse fenômeno, na faixa de razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$ analisada, tem base no fato que devido à forte interação eletrostática de cargas opostas do DNA e PANI, o complexo PANI/DNA é progressivamente formado. Por sua vez, o complexo PANI/DNA tem estabilidade limitada em solução devido à falta de afinidade do DNA e da PANI com o

clorofórmio, e isto explica a ocorrência da precipitação do complexo PANI/DNA que leva a uma redução drástica da concentração de moléculas estáveis de PANI no meio líquido. Este processo ocorre até a condição $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}=1$ ser alcançada (ver Figura 4.8), o que significa dizer que o máximo de precipitação ocorre nessa condição. Surpreendentemente, a adição do complexo DNA/CTAB na condição acima de $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}=1$ na solução do complexo PANI/DBSA resulta na diminuição da R_{CT} (ou aumento da absorbância) da solução sobrenadante, o que significa dizer que a PANI se resolubiliza, indicando que passa a ocorrer uma conversão parcial do complexo PANI/DNA nos complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB, já que estes apresentam uma melhor estabilidade em clorofórmio. Uma nova inversão volta a ocorrer, com um mínimo [máximo] na resistência de transferência de carga [absorbância] sendo observado. Isso permite definir uma nova condição de equilíbrio, caracterizada pelo aumento da agregação do complexo PANI/DNA. Portanto, é evidente que a absorbância e a R_{CT} exibem uma complementaridade entre si (mas com derivada oposta), e, então, podemos concluir que essas duas grandezas físicas fornecem informações análogas sobre os processos envolvendo a formação de complexos polímeros/biomoléculas.

4.3 - Discussão

Desde o início, nossa proposta foi de avaliar a EIE como uma técnica conveniente para investigar interações eletrostáticas entre macromoléculas, que poderia ser vista como um método complementar e/ou alternativo à espectroscopia de absorção UV-Vis. Na Seção 4.2.4 foi mostrado que realmente isso acontece, de modo que EIE tem potencial de ser aplicado em estudos relacionados a macromoléculas.

Neste estudo, do ponto de vista do uso da EIE é preciso considerar que a redução (aumento) na concentração relativa de PANI/DBSA em solução afeta a resistência de transferência de carga e estabelece pontos de máximos e mínimos nas curvas de R_{CT} e absorbância (ver Figura 4.8), que representam claras condições de equilíbrio e separam, uma da outra, regiões com transporte de carga bem diferente. Assim, antes de alcançar o primeiro extremo (máximo em R_{CT} e mínimo na absorbância) o transporte de cargas elétrica através da solução se torna progressivamente restrito, devido ao decréscimo na concentração livre de moléculas da PANI em solução, conduzindo assim a um mais alto valor de R_{CT} . Já após o primeiro extremo, quando o número de moléculas de PANI em solução aumenta (o que pode

ser comprovado pelo aumento da absorbância), claramente o transporte de carga elétrica é facilitado, o que leva a uma diminuição na R_{CT} . Uma nova inversão nas curvas da Figura 4.8 resulta no aumento da R_{CT} , o que indica que menos cadeias de PANI estão dispersas em solução como resultado do processo de precipitação, que mais uma vez volta ser o processo dominante. Portanto, a partir de cada extremo nas curvas da Figura 4.8 fica definido um tipo de reação (reação 1 ou 2, conforme o esquema apresentado na Figura 4.9) que passa a dominar na solução a cada ciclo. Isto significa dizer que a adição de DNA a cada novo ciclo de reação influencia de maneira menos significativa nas propriedades óticas e dielétricas das soluções de sobrenadante, ou seja, a cada novo ciclo fica mais difícil converter os complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB em PANI/DNA, e vice-versa.

O esquema mostrado na Figura 4.9 leva em conta reações de troca iônica que ocorrem na interação entre os complexos DNA/CTAB e PANI/DBSA em determinadas condições da razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. A reação do Tipo 1 domina enquanto a condição $[P]_{DNA}/[N]_{PANI} < 1$ é satisfeita, já que nesse caso a interação entre os complexos PANI/DBSA e DNA/CTAB se dá por reações de troca iônica envolvendo os ânions DNA e DBSA com os cátions PANI e CTAB, que contribuem para maximizar a formação do complexo PANI/DNA, e com sua consequente precipitação em solução. Para a condição $1 < [P]_{DNA}/[N]_{PANI} < 1,75$ ocorre uma redução da precipitação da PANI da solução, o que pode ser caracterizado por uma nova reação, definida como Tipo 2, na qual a conversão parcial do complexo PANI/DNA para PANI/DBSA (que é mais estável em solução) prevalece sobre a reação do Tipo 1. Neste caso, há uma preferência da PANI em complexar com DBSA, ou seja, ocorrem reações parciais de troca iônica entre o poliânion DNA e o ânion DBSA, que levam à conversão parcial do complexo PANI/DNA nos outros dois complexos (PANI/DBSA e DNA/CTAB). Para valores de $[P]_{DNA}/[N]_{PANI} > 1,75$, a reação de precipitação prevalece sobre a reação de conversão, o que caracteriza novamente a reação do Tipo 1. Em resumo, a cada ciclo o aumento progressivo na razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$ conduz à substituição da reação do Tipo 1 pela reação do Tipo 2 e vice-versa, o que provoca processo de precipitação (reação do Tipo 1) ou conversão (reação do Tipo 2), a depender da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$.

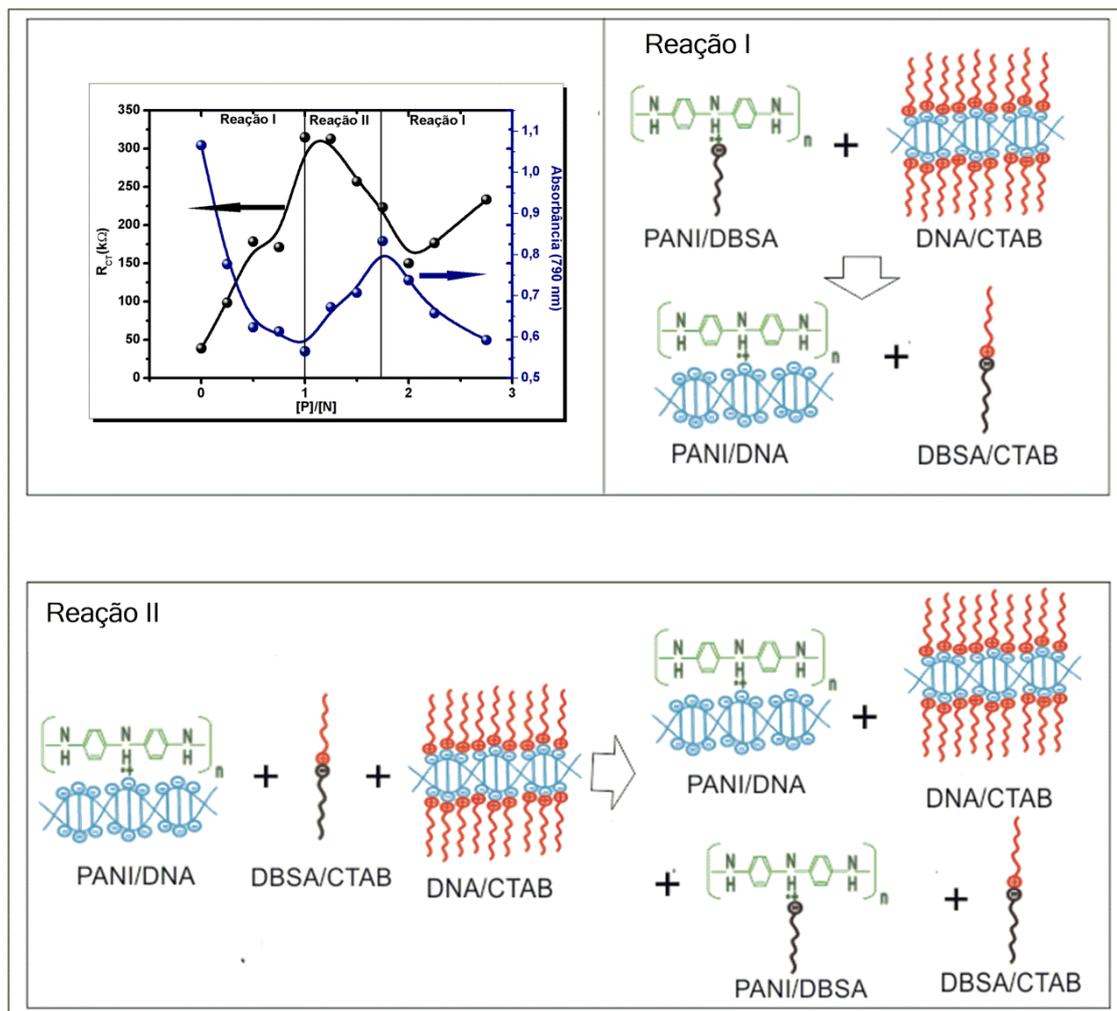


Figura 4.9 - Representação esquemática para os mecanismos de formação do complexo PANI/DNA.

4.3 - Conclusão

Neste capítulo, os aspectos relevantes para a formação do complexo PANI/DNA em solventes de baixa polaridade foram investigados do ponto de vista não convencional do uso da EIE. Dentre aspectos, a forte interação entre as cadeias de PANI e as moléculas de DNA conduz à formação do complexo de PANI/DNA, cuja solubilidade no clorofórmio é altamente sensível aos valores da razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$. Em outras palavras, a concentração do polímero condutor dispersa em solução varia de forma tão peculiar que as propriedades óticas e elétricas do meio são afetadas. Dessa maneira, a resposta elétrica da solução sobrenadante depende do grau de complexação de PANI/DNA, uma vez que essa

solução apresenta diferenças nos níveis de impedância conforme a ocorrência ou não da precipitação desse complexo como processo dominante. Nesse sentido, as informações peculiares à reação de complexação fornecidas pelo uso de espectroscopia de impedância eléctrica mostram uma clara complementaridade com a espectroscopia de absorção UV-Vis. Portanto, essa complementaridade é uma evidência a favor da metodologia proposta neste capítulo, o que significa dizer que de fato, a EIE se constitui em uma forma adequada para estudar esse importante fenômeno da física da matéria frágil.

Capítulo 5 - A formação de complexo DNA/nanocompósito polianilina/(nanopartículas de ouro) estudada por espectroscopia de impedância elétrica⁸

Diante dos resultados animadores apresentados no capítulo anterior, o problema da formação de complexos DNA/polímero catiônico foi estendido ao caso dos nanocompósitos fluorescentes polianilina/(nanopartícula metálica) sintetizados nos últimos anos no grupo Polímeros Não-Convencionais. O interesse neste problema é entender a natureza das interações envolvidas nos testes de diagnósticos de doenças infecciosas realizado no grupo. A compreensão da natureza das interações é um passo fundamental em direção à otimização desses testes de modo a torná-los viáveis frente aos testes comerciais já estabelecidos.

O compósito polianilina/(nanopartículas de ouro) (PANI-Au) preparados no grupo apresenta uma fluorescência exacerbada quando comparado com a polianilina pura (De Melo et al., 2012; Santos et al., 2013), o que o torna viável para novas aplicações. Dentre elas, os resultados desenvolvidos até o momento mostram que esses materiais são promissores como marcadores de biomoléculas como DNA, devido a sua capacidade de se ligar eletrostaticamente a moléculas aniônicas em certas regiões de pH. Dada essa característica, esses materiais têm se mostrado promissores para o desenvolvimento dos testes de diagnóstico rápido de doenças conhecidos como Teste ELINOR. Como ponto de partida, sabe-se que as interações coulombianas, de natureza não específica, estabelecidas entre PANI-Au e o DNA são pontos chave para a otimização desses testes.

Para fundamentar essa hipótese, é preciso ter em conta as etapas fundamentais do Teste ELINOR. De maneira simplificada, o teste Elinor é baseado no seguinte protocolo:

a) um segmento curto, conhecido como sonda, de fita simples do DNA do agente infeccioso a ser determinado é ancorado sobre um substrato sólido,

⁸ O tema deste capítulo é extensão do capítulo anterior, que por questões de organização é apresentado como um capítulo à parte.

- b) um volume pequeno de uma solução contendo o material genético do paciente é aquecido (para induzir a separação das fitas do DNA) e, posteriormente, gotejado sobre o substrato contendo a sonda,
- c) duas possibilidades podem ocorrer quando as fitas simples do DNA do paciente encontram com a sonda ancorada no substrato: um segmento do DNA do paciente é complementar à sonda e ocorrerá à hibridização (neste caso, o teste será positivo) ou não existe nenhum segmento complementar e o DNA do paciente não será capturado pela sonda (teste negativo),
- d) um pequeno volume do nanocompósito PANI-Au (com cadeias carregadas positivamente) é gotejado sob o substrato e se liga eletrostaticamente às fitas de DNA do paciente e à sonda,
- e) ao ser lavado o substrato com água corrente, as cadeias de nanocompósito ligadas às fitas de DNA do paciente com nenhum segmento complementar à sonda serão retiradas do substrato. Se o DNA do paciente possui uma seção complementar à sonda, uma quantidade relativamente bem maior do nanocompósito permanecerá no substrato, devido à ligação entre as fitas de DNA e a sonda.
- f) finalmente o substrato é submetido à excitação em 350 nm com emissão em 480 nm. A diferença na intensidade de emissão de fluorescência na região do verde entre o resultado positivo e negativo será visualmente observada e, portanto, indicará se o paciente está ou não infectado.

Como pode ser visto, os passos e) e f) são fundamentais para o teste, uma vez que os mecanismos de interação entre o DNA o nanocompósito PANI-Au podem levar à formação de complexos que não se ligam fortemente à sonda ou ao substrato e que, por isso, serão arrastados para fora do substrato durante o processo de lavagem. A ocorrência desse fenômeno comprometeria a leitura por fluorescência e levaria o usuário a concluir que o teste, embora verdadeiramente positivo, teria um resultado falso negativo, ou seja, mesmo o paciente estando infectado, o resultado do teste seria como negativo. Portanto, entender os mecanismos de interação entre nanocompósito e DNA e identificar seus parâmetros determinantes é uma importante contribuição para o desenvolvimento do procedimento mais adequado a ser adotado no teste ELINOR. Portanto, o objetivo principal deste capítulo é examinar a influência da variação da concentração relativa do DNA/nanocompósito na interação eletrostática estabelecida em solução. Para esse estudo, as propriedades óticas e elétricas das soluções de PANI-Au/DNA, determinadas através da espectroscopia de

fluorescência, UV-Vis e de impedância elétrica, foram examinadas e usadas como parâmetros de interação.

5.1 - Materiais e Métodos

5.1.1 - Materiais

Anilina, ácido tetracloroaurico (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), desoxirribonucleico (DNA) do timo do bezerro tipo XV, brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), ácido dodecil benzeno sulfônico (DBSA), e clorofórmio foram adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA) e o ácido clorídrico obtido junto a Dinâmica (Brasil). Com exceção da anilina, todos os reagentes foram usados como recebidos. A anilina usada para a síntese do nanocompósito foi destilada pela adoção do mesmo procedimento discutido na Seção 4.1.2.

5.1.2 - Métodos

Síntese do nanocompósito PANI-Au

Para realizar a síntese do nanocompósito, anilina (0.030 mol/L), MPTS (6.46×10^{-2} mol/L) e ácido tetracloroáurico (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (0.81 mmol/L) foram misturados em etanol. Para completa polimerização da anilina na presença do ácido tetracloroáurico como agente oxidante e consequente formação do nanocompósito PANI-Au, a mistura foi deixada sob agitação magnética durante 48 horas (DE MELO; DE ANDRADE; DOS SANTOS, 2012). Posteriormente, a solução com o nanocompósito foi centrifugada durante 10 minutos em 12.000 RPM para remover MPTS em excesso.

Dispersão do nanocompósito PANI-Au em clorofórmio.

Por conta da baixa solubilidade do DNA em etanol (que é o solvente usual do nanocompósito), foi necessário escolher um solvente para o qual tanto o DNA quanto o nanocompósito tivessem uma boa estabilidade. No capítulo anterior vimos que, quando complexado com surfactantes catiônicos, o DNA possui uma boa dispersão em clorofórmio. Por isso, o clorofórmio foi usado como solvente comum, o que exige a solubilização do nanocompósito nesse mesmo solvente. Dessa forma o nanocompósito PANI-Au foi solubilizado no clorofórmio de maneira similar ao que foi originalmente reportado por Sergeev (LOKSHIN et al., 2003; SERGEEV et al., 2003). Uma alíquota do nanocompósito PANI-Au em etanol foi colocado em um béquer para total evaporação do solvente e obtenção do nanocompósito em pó. Posteriormente, clorofórmio em pH ácido (pH = 2.5 ajustado com alíquotas de HCl) foi adicionado ao béquer contendo o nanocompósito para tornar as cadeias de polianilina positivamente carregadas. Finalmente, o DBSA foi adicionado na solução de PANI-Au, em uma razão estequiométrica de $[S]_{DBSA}/[N]_{PANI-Au}=0.75$, para promover a completa solubilização do nanocompósito PANI-Au em clorofórmio. Essa solução foi usada como solução estoque em todos os experimentos realizados no presente capítulo.

Síntese do complexo DNA/DTAB

De maneira similar ao complexo DNA/CTAB do Capítulo 4, a síntese do complexo DNA/DTAB foi realizada gotejando uma solução aquosa de DNA em uma solução aquosa de DTAB na razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{DTAB}= 1,0$. Como resultado da mistura, ocorre a precipitação do complexo DNA/DTAB, que foi então separado da solução por centrifugação, coletado e então seco sob vácuo durante três dias. O complexo DNA/DTAB foi finalmente completamente solubilizado em clorofórmio e usado como solução estoque em todos os experimentos realizados.

Procedimentos

Para realizar as medidas deste capítulo, uma alíquota fixa da solução-mãe do complexo PANI-Au/DBSA foi misturada à alíquotas crescentes da solução estoque do complexo DNA/DTAB segundo diferentes razões estequiométricas $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI-Au}}$ (de 0 a 3,33). Para ter apenas o nanocompósito disperso em solução, todas as misturas foram centrifugadas e então um volume de 1mL do sobrenadante foi usado em todas as medidas óticas e elétricas.

Técnicas experimentais

As medidas de absorvância no UV-Vis no intervalo de comprimento de onda de 250 nm a 800 nm foram realizadas colocando a solução sobrenadante em uma cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm, posteriormente posicionada em um espectrômetro CIRRUS 80 MB (Femto, BRASIL). Já as medidas de fluorescência foram executadas no espectrofluorímetro modelo PC1 (ISS, EUA) excitando a solução no comprimento de onda 350 nm e com emissão no intervalo de comprimento de onda de 370 nm a 550 nm. Para caracterização elétrica, o analisador de impedância Solartron1260 (Hampshire, Reino Unido) conectado à interface dielétrica 1296 e ao sistema de eletrodo porta amostra 1262 (Hampshire, Reino Unido) foi usado. Uma tensão AC com amplitude de 10 mV, operando no intervalo de frequência de 1 Hz a 1 MHz, foi aplicada nos eletrodos paralelamente dispostos para caracterizar eletricamente a solução sobrenadante.

5.2 - Resultados

5.2.1 - Análise UV-Vis

O espectro de absorvância do nanocompósito PANI-Au/DBSA mostrado na Figura 5.1 revela a presença de duas bandas de absorção. A banda centrada em 318 nm corresponde a assinatura da transição $\pi-\pi^*$ no benzenóide (GUPTA; JANA; MEIKAP, 2010; HUANG;

LIN, 2009; SUBRAMANIAN; PADIYAN, 2008). Já a banda em 365 nm corresponde à protonação da cadeia da polianilina (SAHARAN; DHAWAN, 2014), o que indica que as cadeias da PANI estão positivamente carregadas. As duas bandas centradas nos picos de 318 nm e 365 nm mostram que a polianilina presente no nanocompósito está no estado de oxidação correspondente à forma de sal de leucoemeraldina.

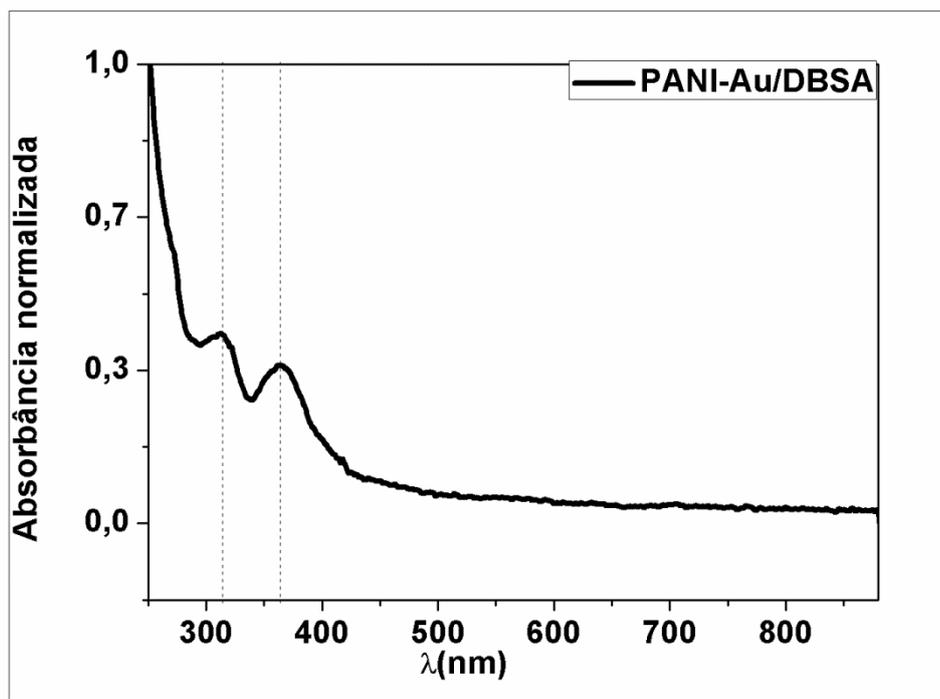


Figura 5.1- Espectro de absorção UV-Vis do complexo PANI-Au/DBSA, onde se destaca seus picos característicos (linhas tracejadas).

Com relação às nanopartículas de ouro, a não existência de uma banda característica de plásmons (em geral, presente em torno do intervalo de comprimento de onda de 500 nm a 600 nm) no espectro UV-Vis do nanocompósito PANI-Au está diretamente ligada ao diâmetro das partículas de ouro presentes em solução. De acordo com trabalhos realizados no grupo de Polímeros Não-Convencionais (SANTOS, R. F. et al., 2013), o diâmetro médio das partículas de ouro está na faixa de 2-3 nm. É conhecido que a banda de plásmons apresenta uma dependência com o tamanho de partículas, sendo as oscilações desta banda fortemente amortecidas para tamanhos de partículas menores que 5 nm, desaparecendo completamente para partículas em torno de 2 nm (KLIMOV, 2003). Assim, a não existência da banda de

plásmons no espectro do nanocompósito pode ser explicada pelo tamanho de partículas de ouro encontradas na matriz polimérica, como mostrado pelos resultados encontrados.

Outro fato que pode ser notado, nos espectros mostrados na Figura 5.2, é a dependência da absorção do nanocompósito PANI-Au com a razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$, em uma maneira similar ao que fora discutido no Capítulo 4. Isto indica que a interação entre as fitas de DNA e PANI-Au promove uma progressiva complexação entre as cadeias da polianilina e as moléculas de DNA, o que induz mudanças na estabilidade das cadeias de PANI leucoemeraldina, da mesma forma do que foi observado para as cadeias de PANI sal esmeraldina examinadas no Capítulo 4. A seção 5.3 detalha as similaridades e diferenças entre os resultados encontrados ao longo dos dois capítulos.

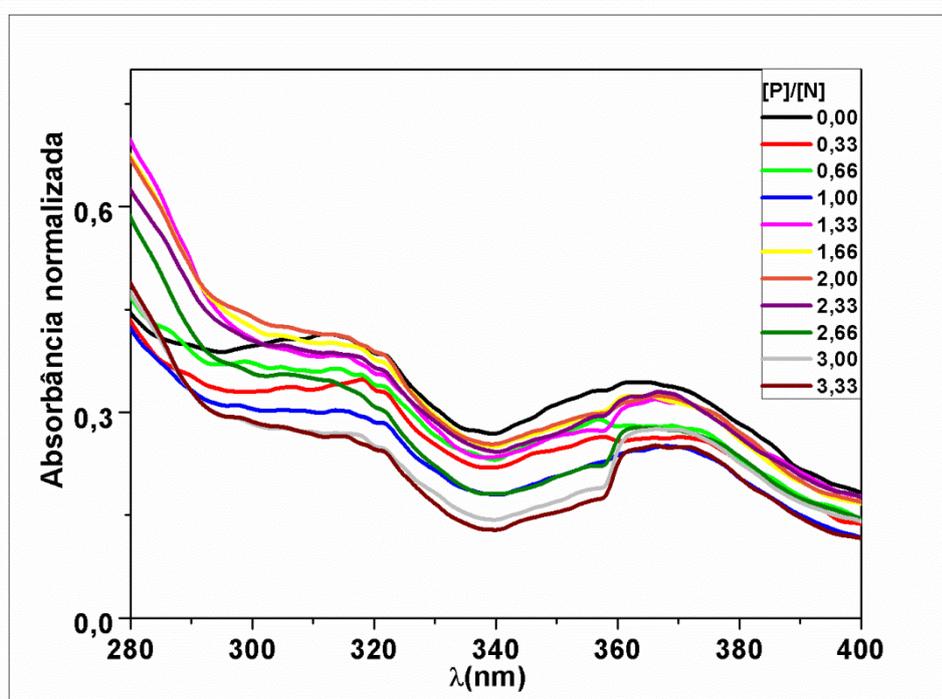


Figura 5.2 – Espectros característicos de absorção UV-Vis das soluções sobrenadante em diferentes razões estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$.

5.2.2 - Análise de fluorescência

Como mostrado na Figura 5.3, um típico pico de alta intensidade de emissão aparece em 440 nm quando a solução do complexo PANI-Au/DBSA é excitada em 350 nm. Esse pico

se deve à excitação dos elétrons π dos anéis benzenóides presentes na polianilina, que é seguida da emissão de fluorescência, como resultado do decaimento dos elétrons do estado excitado (conhecido como orbital π^*) para o estado fundamental (orbital π). Na verdade, a intensidade de emissão de fluorescência da polianilina pode ser explicada através da proporção entre os grupos benzenóide/amina (C_6H_4NH) e os grupos quinóide/imina (C_6H_4N) na sua estrutura molecular. Enquanto os grupos benzenóides são unidades fluorescentes, graças à transição $\pi-\pi^*$, os grupos quinóides são unidades que tendem a extinguir a emissão de fluorescência causada pelos grupos benzenóides, já que favorecem a dissipação de energia intramolecular (AMRITESH et al., 2008a; SHIMANO; MACDIARMID, 2001). Se for levado em conta o espectro de absorção do nanocompósito PANI-Au apresentado na Figura 5.1, tem-se com clareza que a única assinatura relacionada aos grupos mencionados acima é aquela correspondente à unidade benzenóide/amina, o que significa dizer que o estado leucoesmeraldina presente no nanocompósito é responsável pela intensidade exacerbada de emissão de fluorescência (AMRITESH et al., 2008a;2008b; GUPTA et al., 2010; SHIMANO; MACDIARMID, 2001).

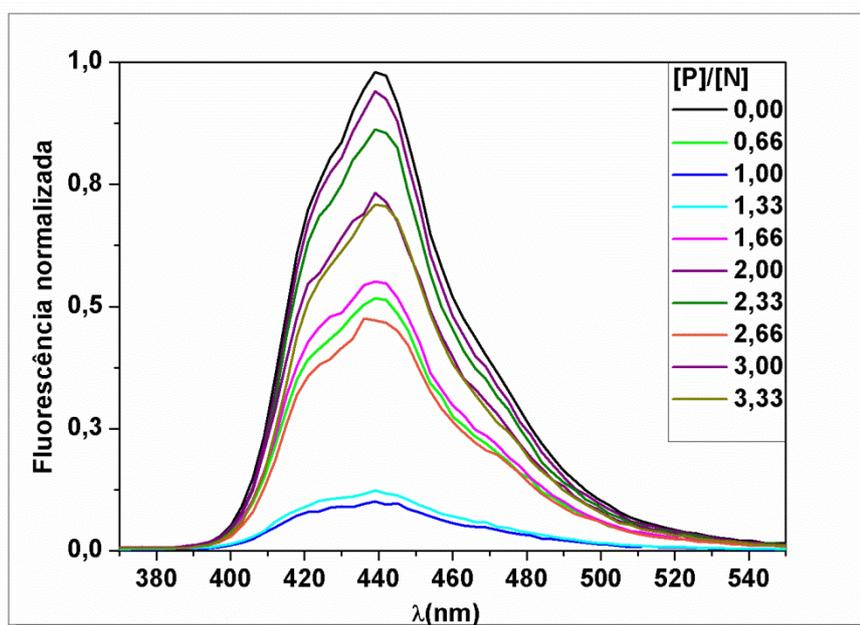


Figura 5.3 - Espectro de emissão de fluorescência da solução sobrenadante resultante da mistura dos complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB para diferentes razões estequiométrica $[P]DNA/[N]PANI-Au$.

É evidente na Figura 5.3 que a adição do complexo DNA/DTAB na solução do complexo PANI-Au/DBSA promove uma mudança na resposta de fluorescência da solução sobrenadante (o que é consistente com a análise de UV-Vis) e mostra que a interação entre o DNA e o nanocompósito PANI-Au resulta na mudança da estabilidade das cadeias de PANI leucoesmeraldina em solução.

5.2.3 - Análise de EIE

Do ponto de vista elétrico, na Figura 5.4 é mostrado o diagrama de Nyquist da solução sobrenadante em diferentes razões estequiométricas $[P]$ DNA/[N]PANI-Au. Claramente, a existência de um único semicírculo indica um simples processo de relaxação para a faixa de frequências analisada, que, como dito na Seção 3.2, está relacionada à polarização dos dipolos presentes em solução.

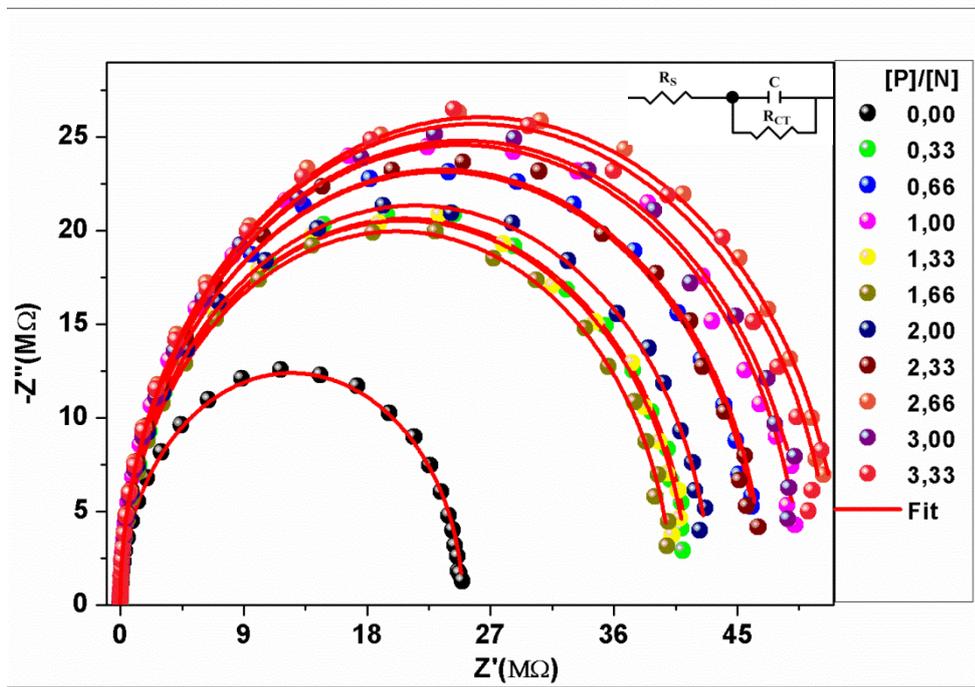


Figura 5.4 - Diagrama de Nyquist da solução sobrenadante resultante da mistura dos complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB em função da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$. As linhas correspondem aos ajustes feitos usando o circuito equivalente apresentado no detalhe.

É importante notar que a mudança do diâmetro do semicírculo com a variação da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$ indiretamente indica que o parâmetro resistência de transferência de carga (R_{CT}) é dependente dessa razão. Tendo em conta essa informação, é natural pensar que o melhor ajuste para os dados experimentais é o uso do circuito de Randles como circuito elétrico equivalente, o que pode ser confirmado pela comparação (ver Figura 5.4) entre os dados experimentais (pontos) e as linhas vermelhas (resposta do circuito Randles cujos valores dos parâmetros são mostrados na Tabela 5.1). Assim, a identificação da resistência de transferência de carga elétrica como um parâmetro importante para a descrição da interação entre DNA e o nanocompósito PANI-Au possibilita o uso da espectroscopia de impedância elétrica como uma ferramenta adequada para examinar os mecanismos microscópicos dominantes nessa interação.

$[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$	$R_S (\Omega)$	$R_{CT} (M\Omega)$	$C (pF)$
0,00	9357 ± 150	24,80 ± 0,04	4,320 ± 0,005
0,33	11494 ± 173	41,50 ± 0,09	4,100 ± 0,005
0,66	7131 ± 165	47,10 ± 0,10	4,320 ± 0,006
1,00	6676 ± 196	49,20 ± 0,10	4,210 ± 0,006
1,33	7976 ± 145	41,40 ± 0,08	4,300 ± 0,005
1,66	8106 ± 110	40,30 ± 0,06	4,340 ± 0,003
2,00	7027 ± 465	43,00 ± 0,10	4,030 ± 0,010
2,33	6928 ± 269	46,00 ± 0,13	4,040 ± 0,008
2,66	7081 ± 166	50,60 ± 0,12	4,220 ± 0,005
3,00	7074 ± 159	49,40 ± 0,09	4,230 ± 0,005
3,33	7627 ± 184	51,80 ± 0,13	4,190 ± 0,006

Tabela 5.1 – Valores dos parâmetros do circuito de Randles usado para modelar os dados experimentais em diferentes razões de $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$.

Para mostrar a validade dessa hipótese, na Figura 5.5 é apresentada uma comparação entre os resultados obtidos usando a espectroscopia de impedância elétrica (técnica alternativa), a espectroscopia de absorção no UV-Vis e a espectroscopia de fluorescência (ambas consideradas aqui como técnicas padrão). Nessa comparação, a resistência de transferência de carga (EIE), a intensidade de absorbância em 318 nm (correspondente à transição $\pi-\pi^*$ do anel benzenóide) e a intensidade de emissão de fluorescência em 440 nm

da solução sobrenadante, resultante da mistura dos complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB apresentam uma delicada dependência com a variação da concentração relativa dos grupos fosfatos do DNA/átomos de nitrogênio da PANI leucoesmeraldina. Isto indica que as condições de equilíbrio das cadeias de leucoesmeraldina em solução, definidas pelos pontos de máximos e mínimos nos gráficos da Figura 5.5, são bem próximas umas das outras, de forma que o aumento na concentração de DNA na solução do nanocompósito PANI-Au promove mudanças drásticas na estabilidade das cadeias de PANI.

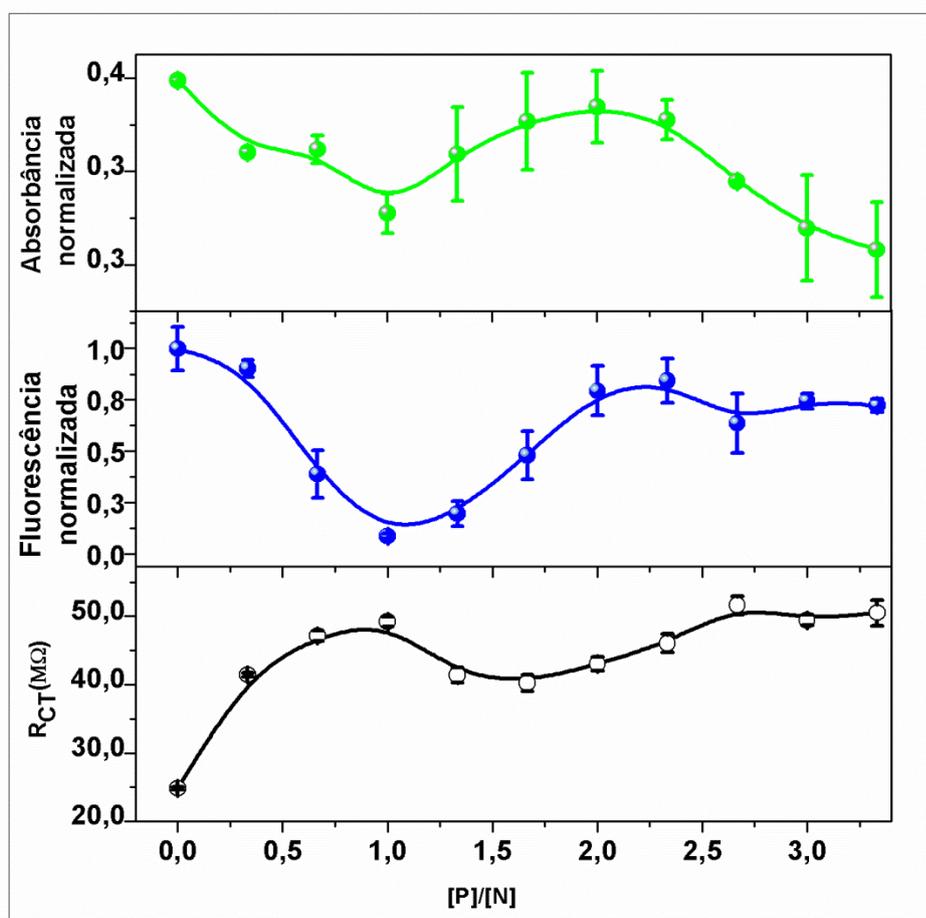


Figura 5.5 - Comparação entre a resposta de absorvância em 318 nm, intensidade de fluorescência em 440 nm e a resistência de transferência de carga da solução sobrenadante resultante da mistura dos complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB em função da razão $[P]/[N]$ PANI-Au. As linhas são apenas guias para os olhos.

5.3 - Discussão

Apesar da similaridade entre o comportamento do nanocompósito PANI-Au examinado neste capítulo e o estudo feito no Capítulo 4, é preciso levar em conta o estado da PANI em cada caso: a polianilina do Capítulo 4 tem estado de oxidação sal de esmeraldina, enquanto que neste capítulo está na forma leucoesmeraldina. Isso significa dizer que o fenômeno de protonação que torna as cadeias polianilina positivamente carregadas envolve partes distintas da molécula em cada caso. Para entender isto, é preciso considerar a estrutura química geral da molécula da polianilina e examinar as diferenças no processo de protonação que levam à conversão de polianilina base esmeraldina para sal de esmeraldina (caso do Capítulo 4) e de polianilina leucoesmeraldina base para leucoesmeraldina sal (caso deste capítulo) (ver Figura 5.6). Como conhecido, a molécula de polianilina possui duas características distintas que se repetem ao longo da cadeia polimérica: uma parte da molécula apresenta unidade reduzida (C_6H_4NH), enquanto que a outra contém unidade na forma oxidada (C_6H_4N) (ver a Figura 5.6A). No caso da polianilina esmeraldina (Capítulo 4), a estrutura química se caracteriza por apresentar exatamente 50 % de cada uma dessas unidades (Figura 5.6B). Já a polianilina leucoesmeraldina tem estrutura química com unidades totalmente reduzidas (Figura 5.6 C).

A protonação ocorre pela interação de H^+ com N do grupo amina da unidade reduzida e/ou N do grupo imina da unidade oxidada e depende fortemente do estado de oxidação da polianilina e do pH do meio, uma vez que os mecanismos de protonação via grupo amina e imina são diferentes (NEOH; KANG; TAN, 1992). Por essa razão, a protonação do estado de oxidação esmeraldina (Capítulo 4) e leucoesmeraldina (neste capítulo) são distintas (MENARDO et al., 1988; NAKAJIMA et al., 1989; NEOH et al., 1992). A protonação da base esmeraldina ocorre preferencialmente no grupo imina e é completa para a razão estequiométrica $[S]_{DBSA}/[N]_{PANI} = 0,75$ (CAO, Y.; QIU; SMITH, 1995b) usada no capítulo anterior. Já para a leucoesmeraldina, a protonação ocorre exclusivamente no grupo amina, que se torna parcialmente protonado (cerca de 25% de nitrogênio presentes na cadeia) para o pH=2,5 usado neste capítulo (KANG, E. T. et al., 1990; PING et al., 1997). Isto significa dizer que se a concentração de N é a mesma para soluções de leucoesmeraldina e esmeraldina,

a protonação no mesmo pH levará à esmeraldina a apresentar mais grupos carregados que a leucoesmeraldina.

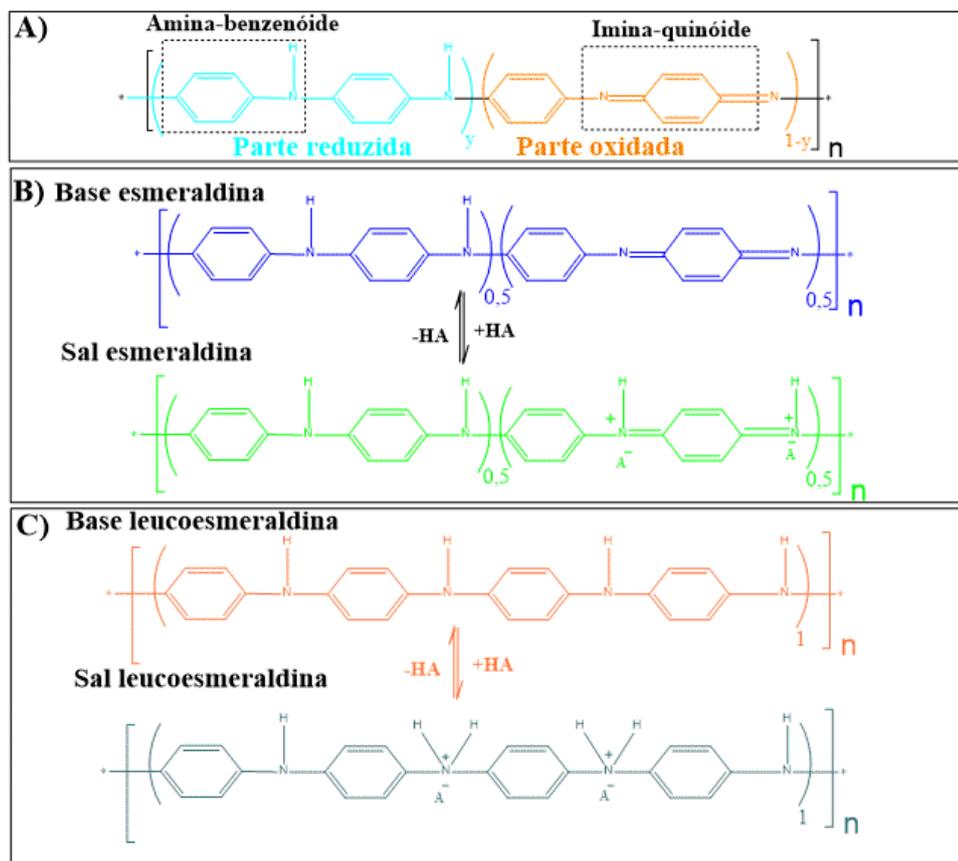


Figura 5.6 – A) Estrutura química geral da polianilina. B) Conversão da base esmeraldina para sal esmeraldina através da protonação por ácidos. C) Conversão da base leucoesmeraldina para sal leucoesmeraldina através da protonação por ácidos.

Mesmo com essa diferença na formação de radicais catiônicos no caso da leucoemeraldina, os fenômenos induzidos pela adição de DNA são similares ao observado quando do uso da PANI esmeraldina, como pode ser visto pela comparação mostrada na Figura 5.5. Isso significa dizer que, mesmo com a polianilina estando com grau de protonação distinto, é possível estabelecer paralelos entre os resultados encontrados neste Capítulo e no anterior, tendo em conta que cada extremo (máximo/mínimo) separa regiões bem específicas de estabilidade das cadeias de leucoesmeraldina. Na faixa de razão estequiométrica $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI-Au}} \leq 1$, o aumento [diminuição] progressivo da resistência de transferência de

carga [absorbância, fluorescência] indica a perda gradual da estabilidade do nanocompósito da solução devido à forte interação eletrostática estabelecida entre poliânion DNA e o polícatión leucoesmeraldina. Essa interação pode ser compreendida levando em conta a ocorrência de reações de troca iônica que pode ser estabelecidas como resultado da mistura entre os complexo DNA/DTAB e PANI-Au/DBSA. Cada ânion DBSA no complexo PANI-Au/DBSA realiza reações de troca com o poliânion DNA, do que resulta a formação dos complexos DBSA/DTAB e PANI-Au/DNA, sendo que último apresenta baixa estabilidade em clorofórmio com conseqüente precipitação, como fica nítido pela diminuição da absorção e fluorescência das soluções sobrenadante. Em termos das propriedades dielétricas, a perda de estabilidade conduz a mudanças na interface eletrodo/solução, o que pode ser entendido quando se considera que o transporte de cargas nessa interface está diretamente relacionado com o número de portadores de íons, poliíons e dipolos presente em solução. Assim, é possível concluir que monitorar as mudanças na R_{CT} é uma maneira eficaz de acompanhar a formação de complexos instáveis de PANI-Au/DNA, uma vez que o processo de precipitação conduz à diminuição no número de portadores de carga em solução. Mesmo que a adição de alíquotas DNA/DTAB na solução promova de início um aumento na concentração de portadores de cargas, o processo de agregação/precipitação do complexo PANI-Au/DNA faz com que, no balanço global, o transporte de carga na interface eletrodo/solução termina por diminuir devido a um número menor de cargas elétrica dispersas na solução final.

É interessante observar que a existência de dois pontos de inversão, que é uma característica de qualquer uma das curvas da Figura 5.5, está relacionada a mudanças na dispersão das cadeias de leucoesmeraldina em clorofórmio. Na primeira inversão, em $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au} = 1$, a diminuição da resistência de transferência de cargas pode ser associada a uma melhora na estabilidade das cadeias de DNA e PANI, como evidenciado pelas medidas de absorção/fluorescência. Isso significa dizer que o efeito do aumento no valor da razão $[P]_{DNA}/[N]_{PANI-Au}$, acima deste primeiro extremo é estabelecer novamente a formação de complexos PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB, uma vez que essas formas são as mais estáveis com que o DNA e aPANI podem se apresentar em clorofórmio, graça à presença da cauda hidrofóbica dos surfactantes DBSA e DTAB, respectivamente. Portanto, é evidente que a conversão parcial do complexo PANI-Au/DNA para PANI-Au/DBSA e DNA/DTAB passa a ser o efeito predominante em solução na condição analisada. O segundo ponto de inversão aponta para uma perda parcial da solubilidade das cadeias de DNA e PANI, o que significa

dizer que, novamente, o complexo PANI-Au/DNA se torna dominante na solução e termina por precipitar, devido a sua baixa estabilidade, provocada pelo afastamento dos surfactantes das cadeias de PANI e DNA.

Em resumo, a análise dos mecanismos de interação entre as moléculas de DNA e o nanocompósito PANI-Au mostram a existência de três regimes característicos: um primeiro, em que a interação entre polieletrólitos de natureza eletrostática oposta promove a formação do complexo instável PANI-Au/DNA, um segundo, caracterizado pela melhora na solubilidade das moléculas de DNA e PANI, e um outro, que novamente leva a uma perda da estabilidade das macromoléculas em clorofórmio.

Os resultados acima mostram que a formação de precipitado PANI-Au/DNA é o fenômeno dominante em certa faixa de valores da razão estequiométrica $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI-Au}}$, que poderia, portanto, vir a se tornar um parâmetro limitante para a aplicação do protocolo do teste ELINOR. A formação desses precipitados é um fator relevante no estabelecimento do teste ELINOR, uma vez que durante o processo de lavagem do substrato (uma das etapas finais do protocolo) esses precipitados são retirados do substrato, comprometendo assim a leitura por fluorescência. Por exemplo, isso pode levar o usuário a indicar o teste como negativo uma amostra de fato positiva (ou seja, causando um resultado falso negativo para o teste). Assim, mesmo que o paciente esteja infectado, por conta do processo de precipitação, o usuário do teste poderá indicá-lo como negativo. Esse é o ponto chave para o reconhecimento de doenças e este estudo aponta para novas e adequadas possibilidades em direção a estratégias que otimizem o teste Elinor.

5.4 - Conclusão

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a formação de precipitados/complexos de nanocompósitos PANI-Au/DNA ocorre ou não, a depender da faixa de valores da razão estequiométrica $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI-Au}}$. Além disso, os resultados indicam que uma maneira conveniente de acompanhar a formação desses complexos é usar a EIE, já que as interações estabelecidas entre o nanocompósito PANI-Au e a molécula de DNA influenciam diretamente na resposta elétrica da interface eletrodo/solução. De forma similar, tanto a intensidade de absorvância quanto a da fluorescência da solução são extremamente

afetadas por essas interações. Essa peculiaridade é facilmente identificada uma vez que a existência de extremos nas curvas da Figura 5.5 indica as condições de equilíbrio que separam as regiões de razoável estabilidade dos complexos PANI-Au/DBSA e de DNA/DTAB no meio daquela em que ocorre a precipitação do complexo PANI/DNA. O conhecimento dessas regiões é fundamental para estabelecer novos rumos e protocolos mais adequados para o teste ELINOR, uma vez que fica estabelecido para quais faixas de razão estequiométrica $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI-Au}}$ ocorre a precipitação de complexos PANI-Au/DNA, sendo esse um fator que deve ser levado em conta durante o processo de lavagem realizado no protocolo ELINOR.

Os dois próximos capítulos desta tese foram dedicados no estudo dos fenômenos relacionados às proteínas, onde serão abordados processos referentes à proteína albumina do soro bovino (BSA). No Capítulo 6 será descrito o processo de desnaturação da BSA, enquanto que no Capítulo 7 estudaremos o fenômeno de fibrilação da BSA, ambos analisados sobre o ponto de vista da EIE.

Capítulo 6 – Uso da espectroscopia de impedância elétrica para análise das mudanças conformacionais em proteínas, induzidas por surfactantes

Como mencionado no Capítulo 2, a organização estrutural (conformação) de uma proteína e suas funções estão intimamente interligadas, de tal forma que existam mudanças na organização molecular de uma proteína que a podem induzir perdas das suas propriedades físico-químicas. Como mencionado na Seção 2.6, mudanças nas condições do ambiente microscópico, tais como temperatura, pH, presença de surfactantes e de outras moléculas, resultam no “desenovelamento” ou desnaturação da cadeia polipeptídica, causando profundas alterações na conformação da proteína. Normalmente, técnicas tais como fluorescência, dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear, e calorimetria diferencial de varredura (ANAND; JASH; MUKHERJEE, 2010;2011; DE; GIRIGOSWAMI; DAS, 2005; GHOSH, S. et al., 2014; TAHERI-KAFRANI; BORDBAR, 2014) são usadas com a finalidade de acompanhar essas mudanças conformacionais de uma proteína. Neste capítulo, é examinada a capacidade da espectroscopia de impedância elétrica ser usada como uma técnica adequada para identificar as diferentes conformações da proteína albumina do soro bovino (BSA), induzidas por sua interação com surfactantes de natureza eletrostática distinta. Diversos trabalhos relatando essas interações foram publicados nos últimos anos (DEEP; AHLUWALIA, 2001; FAUSTINO; CALADO; GARCIA-RIO, 2009; GOSPODARCZYK; SZUTKOWSKI; KOZAK, 2014; KELLEY; MCCLEMENTS, 2003; TARDIOLI et al., 2010; ZHOU et al., 2013).

A capacidade de um surfactante provocar mudanças na conformação de uma proteína se baseia em sua característica molecular. A molécula de um surfactante é caracterizada pela presença simultânea de uma parte hidrofílica, que tem afinidade com água, e uma cauda hidrofóbica, que repele água (DE OLIVEIRA, HELINANDO P.; DE MELO, 2011). Tendo em conta o fato que uma molécula de proteína se caracteriza pela presença tanto de seções hidrofóbicas quanto hidrofílicas, é evidente que suas interações (sejam estas de natureza eletrostática, hidrofóbica ou por ponte de hidrogênio) com moléculas de surfactante induzem mudanças na estrutura terciária da proteína.

Além de promover mudanças na conformação, a presença de surfactantes pode também influenciar o processo de agregação de proteínas. Por exemplo, surfactantes têm sido apontados como moléculas capazes de desagregar fibrilas já formadas da beta amiloide (HE et al., 2011), uma proteína cujo processo de fibrilação guarda uma estreita relação com a manifestação do mal de Alzheimer (CAO, M. et al., 2007; HAN, Y. et al., 2009).

Tendo em conta a importância das interações proteínas-surfactantes, este capítulo será dedicado à verificação dos limites de aplicação da espectroscopia de impedância elétrica como uma abordagem não convencional para mapear mudanças na conformação de proteínas. Para validar essa hipótese, os resultados de EIE foram comparados com a análise de fluorescência, tida aqui como uma técnica controle, uma vez que seus métodos e resultados são bem estabelecidos.

6.1 - Materiais e Métodos

6.1.1 - Materiais

Albumina do soro bovino (BSA), brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e polietilenoglicol-terc-octilfenil éter (Triton X-100) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e usados como recebidos.

6.1.2 - Métodos

Preparação das soluções estoque de proteína e surfactantes.

A proteína BSA foi solubilizada em 50 mL de água deionizada para uma concentração final de 0.25 mg/L e usada como solução estoque em todos os experimentos. Soluções estoque com concentração de 20 mM dos surfactantes SDS, DTAB e Triton X-100 foram preparadas em 10 mL de água deionizada.

Procedimentos

Para a realização dos experimentos, alíquotas de 1 mL da solução estoque de BSA foram misturadas com alíquotas da solução estoque de surfactante, de maneira a termos diferentes concentrações de surfactante. Nestas condições, em todos os experimentos realizados, o volume final da mistura completado com água deionizada quando necessário foi de 2,5 mL, a concentração final de BSA de 0,1 mg/mL, e o intervalo de concentração para SDS e DTAB foi de 0 a 12 mM, enquanto que para o Triton X-100 foi de 0 a 10 mM.

Técnicas Experimentais

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Horiba Fluorolog IV (New Jersey, EUA), colocando a mistura BSA/surfactante em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. A cubeta foi então submetida a uma excitação de 295 nm (excitação característica do aminoácido triptofano) e a emissão coletada no intervalo de 305 nm a 450 nm.

As medidas de impedância foram realizadas usando o analisador de impedância Solartron 1260 (Hampshire, Reino Unido), com interface dielétrica 1296 (Hampshire, Reino Unido) e o porta amostra 1296A (Hampshire, Reino Unido) conectados como na Figura 4.2. Uma tensão AC de 100 mV foi aplicada entre os eletrodos na faixa de frequência 1 Hz a 1 MHz .

6.2 - Resultados

6.2.1 - Análise de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica bem estabelecida para acompanhar mudanças na organização de proteínas, e aqui será usada como técnica controle a fim de verificar a validade da técnica de espectroscopia de impedância elétrica como uma abordagem alternativa. A análise de fluorescência tem como base as mudanças na emissão intrínseca de

aminoácidos aromáticos fluorescentes. No caso da BSA, três aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp) contribuem para a resposta de fluorescência da proteína. Os primeiros apresentam baixo rendimento quântico e, por essa razão, a emissão do triptofano, que contribui com cerca de 90% da intensidade de fluorescência total das proteínas, é usada na maioria dos estudos. Assim faremos neste capítulo, quando da verificação do efeito da mudança de concentração de surfactantes.

Duas características são nítidas no comportamento do espectro de emissão de fluorescência das soluções de BSA após excitação dos resíduos de triptofano (295 nm), como pode ser verificado pela inspeção da Figura 6.1. Em primeiro lugar, um aumento na concentração de surfactantes induz uma diminuição na intensidade da fluorescência da proteína BSA. Além disso, quando as moléculas de BSA são expostas a um número maior de moléculas de surfactantes ocorre um deslocamento no espectro de emissão do pico de máxima intensidade para menores comprimentos de onda. Para entender as razões desse comportamento, é preciso considerar que, por ter um caráter apolar, o triptofano tende a permanecer no interior de bolsões hidrofóbicos da estrutura nativa da BSA, de forma a minimizar o possível contato com moléculas de água. Por sua vez, em ambientes hidrofóbicos, o triptofano apresenta um bom rendimento quântico de fluorescência, ou seja, exibe uma alta intensidade de emissão. Então, na medida em que aumenta a concentração de surfactante na solução de BSA, tanto as ligações de hidrogênio, quanto as interações eletrostáticas e hidrofóbicas que mantêm a proteína BSA na sua organização nativa são perturbadas, fazendo com que, progressivamente, o triptofano fique exposto a moléculas de água. Por sua vez, em ambientes hidrofílicos, o triptofano apresenta um baixo rendimento quântico e isso provoca uma conseqüente diminuição na intensidade de fluorescência da proteína. De maneira similar, é sabido que o pico de máxima intensidade do aminoácido triptofano é dependente do solvente presente no meio no qual este se encontra. Então, a mudança de um ambiente hidrofóbico (na estrutura nativa da BSA) para um hidrofílico (na estrutura não nativa da BSA) resulta no deslocamento para o azul nos espectros de fluorescência apresentados na Figura 6.1. Esses dois efeitos são evidentes para os três surfactantes (SDS, DTAB e Triton X-100), o que significa dizer que os mecanismos de interação do surfactante catiônico DTAB, aniônico SDS e não iônico Triton X-100 com BSA seguem etapas bem estabelecidas (e semelhantes entre si, como veremos mais a frente).

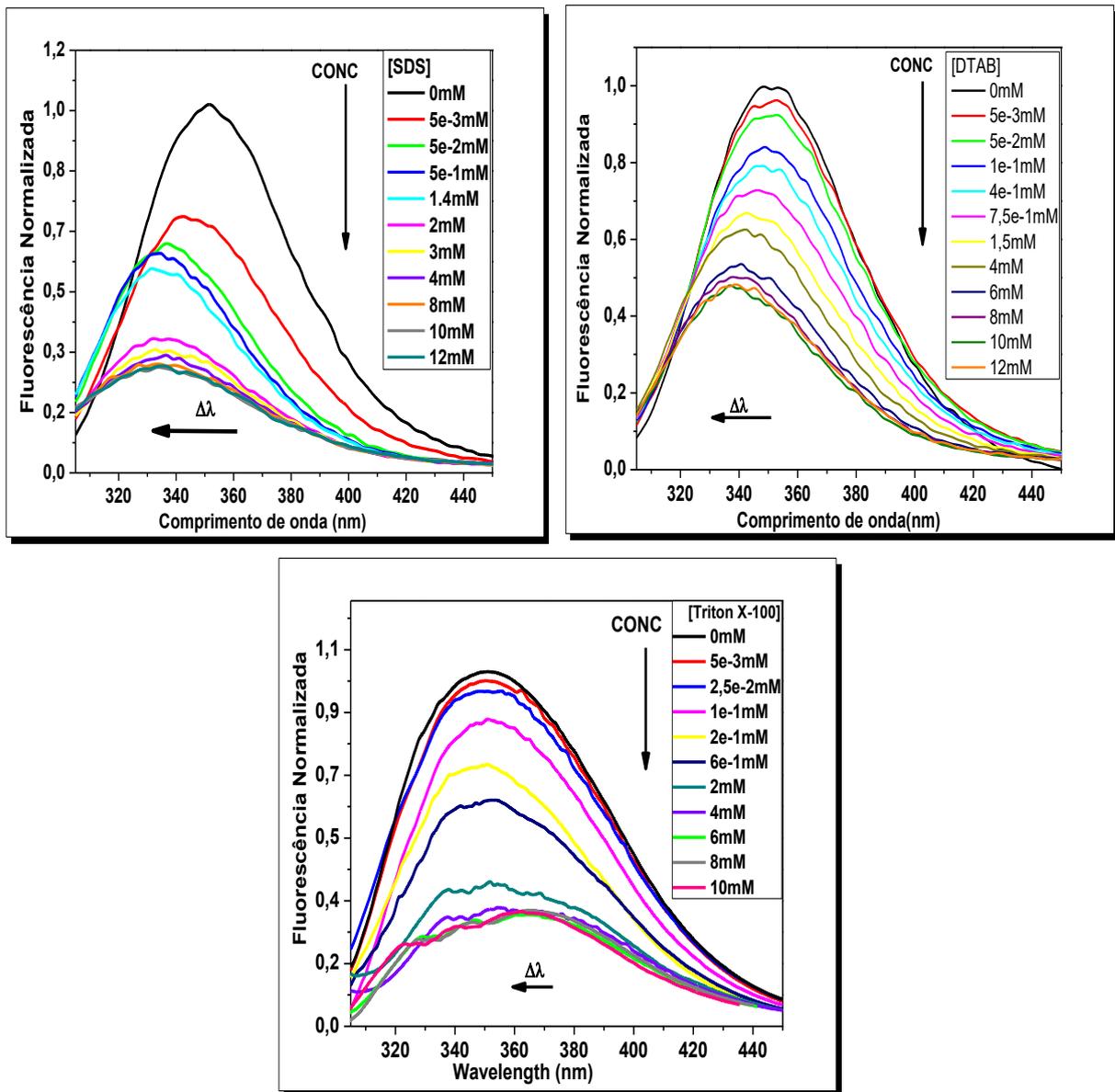


Figura 6.1 - Espectros de emissão de fluorescência das soluções de BSA em diferentes concentrações dos surfactantes SDS(aniônico), DTAB (catiônico) e Triton X-100 (não-iônico).

6.2.2 – Análise de impedância elétrica

Tipicamente, duas características são nítidas nos diagramas de Nyquist das soluções BSA em diferentes concentrações de surfactantes; um semicírculo que reflete a relaxação dos dipolos presentes em solução, e uma região linear, em baixa frequência, que caracteriza a existência de uma polarização interfacial (ver Figura 6.2).

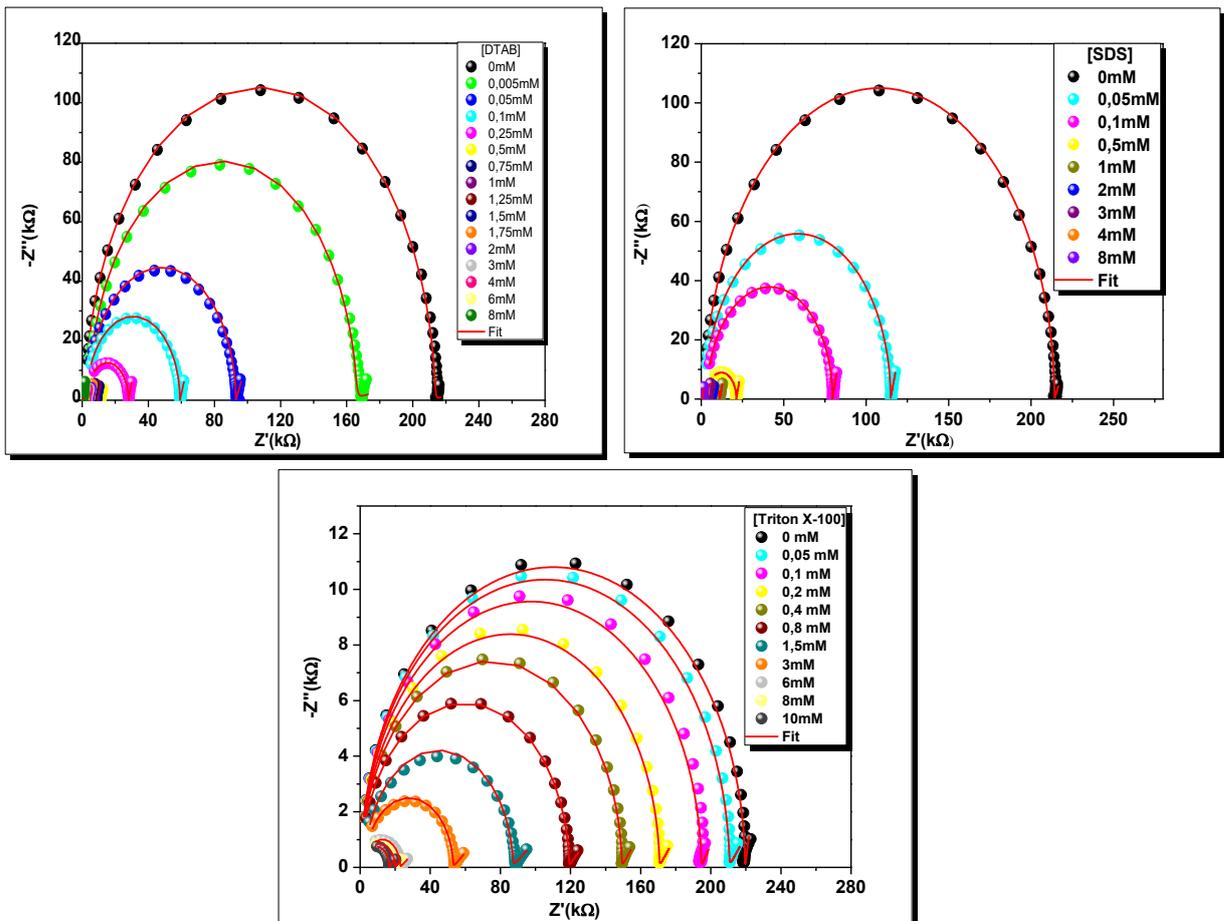


Figura 6.2 - Diagrama de Nyquist das soluções de BSA em diferentes concentrações dos surfactantes SDS (aniônico), DTAB (catiônico) e Triton X-100 (não-iônico). As linhas correspondem aos ajustes feitos usando o circuito elétrico equivalente apresentado na Figura 6.3.

Sob efeito do aumento da concentração de surfactantes, a polarização interfacial se intensifica e o diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist diminui, como resultado das mudanças provocadas no transporte de carga no meio. É evidente, uma vez que a adição de surfactante faz com que o número de portadores de cargas em solução se torne maior, que isso contribui para o aumento do transporte de carga elétrica, o que se traduz enfim na diminuição do nível de impedância no meio.

Por outro lado, à medida que a concentração de surfactante aumenta, as ligações que mantêm a estrutura nativa são rompidas, provocando assim o desdobramento da proteína. Isso significa dizer que a cadeia polipeptídica adota uma configuração espacial diferente, de forma que os mecanismos de transporte de carga elétrica da proteína BSA apresentam características

distintas na estrutura desnaturada quando comparados com a estrutura nativa. Deve ser notado, porém, que essa expectativa não se faz evidente pela simples inspeção dos diagramas de Nyquist mostrados na Figura 6.2. Então, se torna necessário encontrar um parâmetro da espectroscopia de impedância elétrica que, ao ser comparado com um método padrão, como a espectroscopia de fluorescência, permita com que seja esclarecido o processo de desnaturação da proteína BSA. Para determinar esse parâmetro, um passo importante é encontrar o circuito elétrico equivalente que ajuste o processo de relaxação de dipolos definido pelo semicírculo no diagrama de Nyquist e a polarização de eletrodo na região linear em baixa frequência.

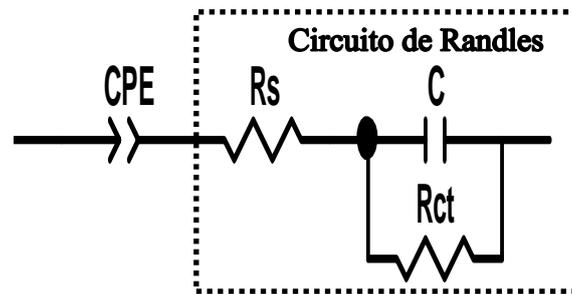


Figura 6.3 - Circuito elétrico equivalente usado para ajustar o comportamento de soluções de BSA em diferentes concentrações dos surfactantes SDS (aniônico), DTAB (catiônico) e Triton X-100 (não-iônico).

Em geral, é considerado que a impedância de polarização eletrodo (ZP) é associada em série com a impedância da amostra (MELLOR et al., 2012). Para quantificar a impedância de polarização de eletrodo, o elemento de fase constante (CPE) ($Z_{CPE} = \frac{A_0}{(j\omega)^n}$) foi associado em série com o circuito de Randles (FELDMAN et al., 1998; MELLOR; KELLIS; MAZZEO, 2011; PAUL BEN et al., 2013; SANABRIA; MILLER, 2006; YU, F. et al., 2001; ZHAO; WANG; YAO, 2015), como mostrado na Figura 6.3.

Pelos resultados mostrados na Figura 6.2, esse circuito ajusta bem sua resposta (as linhas vermelhas) aos dados experimentais (os pontos) e apresenta impedância equivalente com partes real e imaginária dadas por⁹

$$Z' = \frac{R_{ct}}{1 + (\omega\tau)^2} + R_s + \frac{A_0}{\omega^n} \cos(n \frac{\pi}{2}) \quad (6.1)$$

⁹ Onde foi considerado que o número imaginário pode ser escrito na forma $j = e^{j\frac{\pi}{2}} = \cos(\frac{\pi}{2}) + j\text{sen}(\frac{\pi}{2})$

$$e Z'' = -\frac{R_{ct}\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} - \frac{A_0}{\omega^n} \text{sen}\left(n\frac{\pi}{2}\right) \quad (6.2)$$

Como pode ser visto, apenas em baixas frequências é que o termo ω^n passa a ser relevante; é exatamente nessa região que a polarização de eletrodo se torna o fenômeno dominante.

6.3 - Discussão

Levando em consideração os parâmetros descritos pelo circuito mostrado na Figura 6.3, e que foi usado para caracterizar as soluções de BSA, é possível determinar uma metodologia elétrica para acompanhar as mesmas mudanças na organização da proteína, de uma forma análoga ao que é feito ao se usar o método padrão de fluorescência. No entanto, para abordar esse ponto é preciso ter em conta os mecanismos de interação estabelecidos entre a BSA e os surfactantes.

Em geral, quando é aumentada a concentração relativa de um surfactante em uma solução de proteína, as moléculas de surfactantes podem interagir com as moléculas de proteína em quatro estágios distintos: ligação específica, ligação não cooperativa, ligação cooperativa e saturação (SANTOS, S. F. et al., 2003) (Figura 6.4). Na **ligação específica**, em baixíssima concentração (isto é, bem abaixo da concentração micelar crítica do surfactante), grupos carregados das moléculas de surfactantes interagem via forças coulombianas, com regiões especificamente carregadas da proteína (FAUSTINO et al., 2009). Com o aumento progressivo da concentração de surfactante em solução, as interações eletrostáticas entre as moléculas de surfactantes e os grupos carregados de proteínas deixam de ser dominantes, e começam a ocorrer **ligações não cooperativas**, que são caracterizadas por interações hidrofóbicas entre a cauda dos surfactantes e as porções hidrofóbicas da proteína. Nesse regime, moléculas de surfactantes já ligadas na proteína não influenciam na interação de outras moléculas de surfactante com a mesma. Por outro lado, na **ligação cooperativa**, uma molécula de surfactante já ligada na proteína influencia de forma cooperativa e acelera de maneira decisiva o processo de desnaturação da proteína. Por conta dessa ação cooperativa dos surfactantes, o processo de desenovelamento da proteína ocorre nesta faixa de concentração. Por fim, ao ser alcançada a **condição de saturação** não é mais possível

estabelecer interações entre proteína e surfactantes, e, nestas condições, as moléculas de surfactantes começam a se organizar sob a forma de agregados micelares.

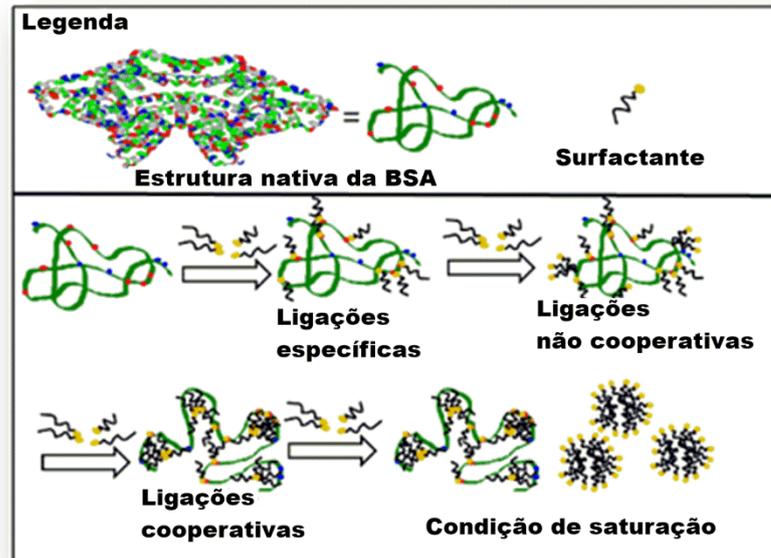


Figura 6.4 - Representação esquemática das sucessivas etapas do processo de desnaturação de proteína induzido por surfactantes.

Geralmente, para determinar esses estágios por meio de medidas de fluorescência intrínseca da proteína, é usada a análise de Stern-Volmer sob a forma da Eq. 6.3 (ANAND et al., 2013), que leva em conta o fato de ocorrer uma supressão da intensidade de emissão de fluorescência da BSA à medida que a concentração de surfactante é aumentada. Esse é um importante método para acompanhar as diferentes interações estabelecidas entre moléculas de surfactantes e a molécula de BSA,

$$\log\left[\frac{F_0 - F}{F}\right] = \log K_a + n \cdot \log[\text{surf}], \quad (6.3)$$

onde F_0 e F representam a intensidade de emissão de fluorescência da proteína na ausência e na presença de surfactantes, respectivamente, K_a é a constante de associação da molécula de BSA com o surfactante, n a constante que indica a afinidade entre a biomolécula e o surfactante e $[\text{surf}]$ a concentração de surfactante.

Para o caso da técnica da espectroscopia de impedância elétrica (EIE), a ideia é propor que a existência das diferentes regiões de interação de surfactantes com albumina sérica

bovina (BSA) pode ser identificada ao se levar em conta a aplicação de um método análogo à equação de Stern–Volmer, escrita na forma da Eq. 6.4.

$$\log\left[\frac{R_{ct}^0 - R_{ct}}{R_{ct}}\right] = \log K1 + K2 \cdot \log[\text{surf}], \quad (6.4)$$

onde R_{ct}^0 e R_{ct} representam a resistência de transferência de carga elétrica das soluções da BSA na ausência e na presença de surfactantes, enquanto que $K1$ e $K2$ são constantes determinadas a partir do ajuste linear das curvas apresentadas nas Figuras 6.5-7.

Dessa forma, nossa hipótese é mostrar que a dependência da resistência de transferência elétrica da solução de BSA/surfactante com a variação da concentração de surfactante é similar à dependência observada para a intensidade de fluorescência. Para testar a acurácia dessa metodologia, em cada caso os resultados encontrados por EIE foram comparados com aqueles obtidos a partir de uma análise Stern-Volmer da emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano presentes na BSA, como mostrado nas Figuras 6.5-7. Uma vez que os diferentes padrões identificados podem estar associados a regiões características da interação proteínas-surfactante, um simples exame das alterações da resposta dielétrica como função da concentração relativa nos possibilitaria identificar as regiões correspondentes aos diferentes regimes de interação surfactante/proteína.

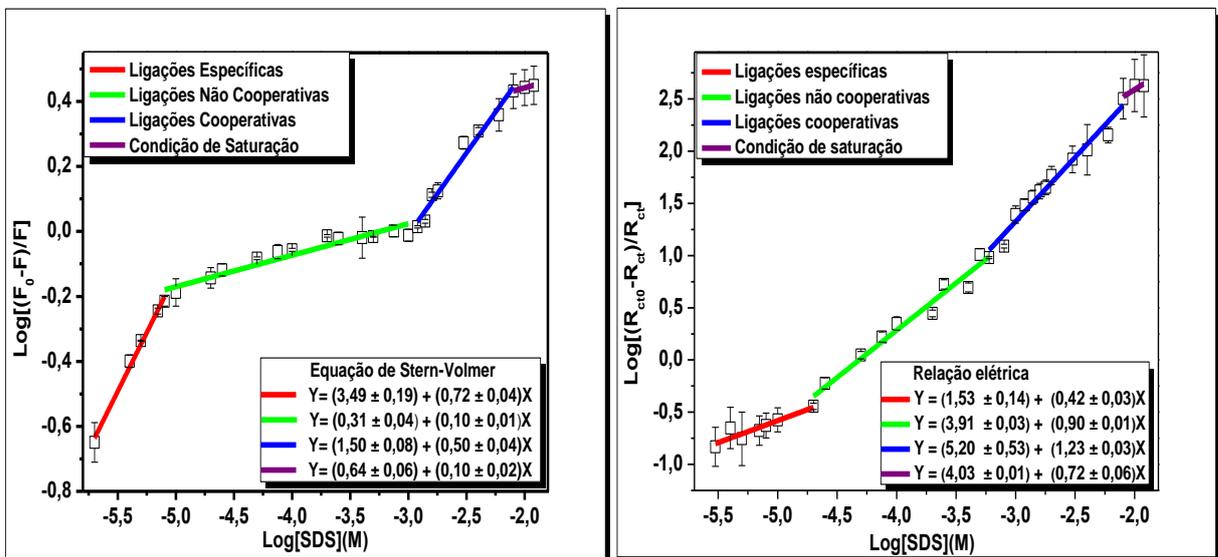


Figura 6.5 - Comparação entre a metodologia padrão (fluorescência) e a alternativa aqui proposta (EIE) no estudo do processo de desnaturação da BSA induzido pelo surfactante SDS.

Pela comparação da metodologia alternativa EIE com a análise de Stern–Volmer (metodologia padrão) para o caso do surfactante de SDS, é possível verificar que a existência de regiões lineares em ambas as metodologias pode ser associada aos regimes de ligação específica, não cooperativa, cooperativa e saturação. Note que cada mudança nos coeficientes angulares das retas identifica o início de um novo estágio de interação. O mesmo comportamento é observado para o surfactante catiônico DTAB, como pode ser comprovado pela Figura 6.6.

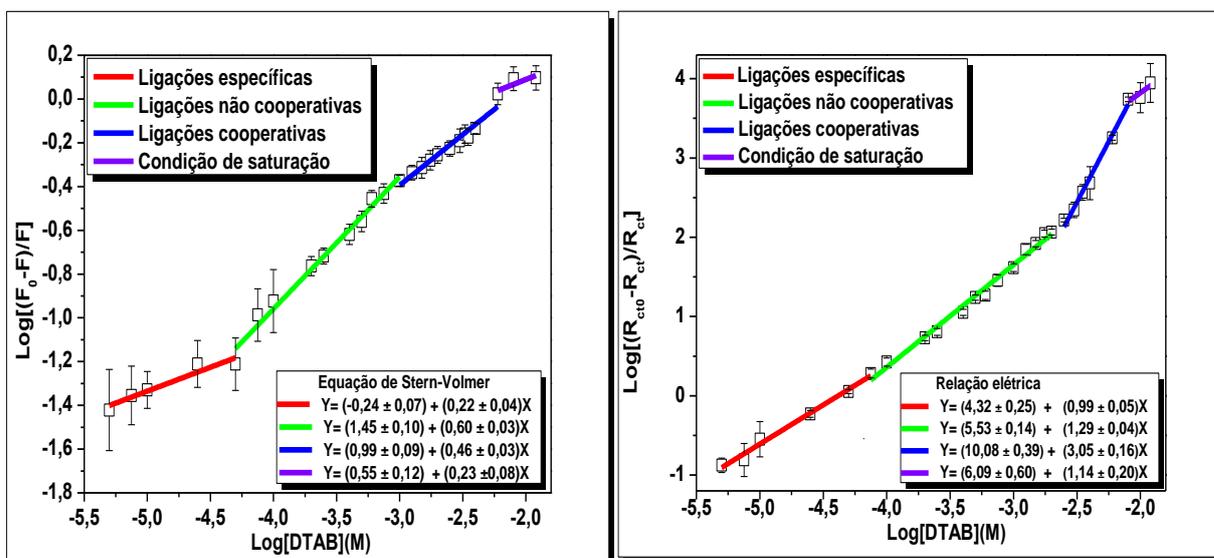


Figura 6.6 - Comparação entre a metodologia padrão (fluorescência) e a alternativa aqui proposta (EIE) no estudo do processo de desnaturação da BSA induzido pelo surfactante DTAB.

Da mesma forma, a análise de Stern–Volmer mostra que a existência de três regiões de interação entre o surfactante não iônico e a proteína BSA, como mostrado na Figura 6.7. A existência de três regimes de interação, ao invés de quatro como nos outros surfactantes, pode ser entendida pela natureza do surfactante não iônico Triton X-100, já que o mesmo não apresenta grupos carregados na sua estrutura molecular; assim, as interações específicas estabelecidas com a BSA são minimizadas, o que torna difícil separar o regime de interação específica e não cooperativa nas curvas mostradas na Figura 6.7. Portanto, foi considerado que as ligações específica e não cooperativa ficam definidas por uma única reta com coeficiente angular bem estabelecido na Figura 6.7. Outra observação importante está relacionada ao fato de que os coeficientes que separam a região de ligação específica/não

cooperativa com ligação cooperativa são próximos na curva de fluorescência da Figura 6.7. Isso é diferente daquela que foi observada nos dois últimos casos de surfactante, para os quais a separação é mais clara. De fato isso já era o esperado, tendo em conta que surfactantes não iônicos apresentam um efeito menor sobre a estrutura nativa da proteína, se comparados aos surfactantes iônicos, que são considerados bem mais fortes agentes de mudança da conformação das proteínas. Finalmente, na terceira região, o nível de fluorescência sofre pouca variação, o que indica que neste intervalo de concentração as interações Triton X-100/BSA atingem um nível de saturação, não sendo mais possível alterações na intensidade de fluorescência do conjunto.

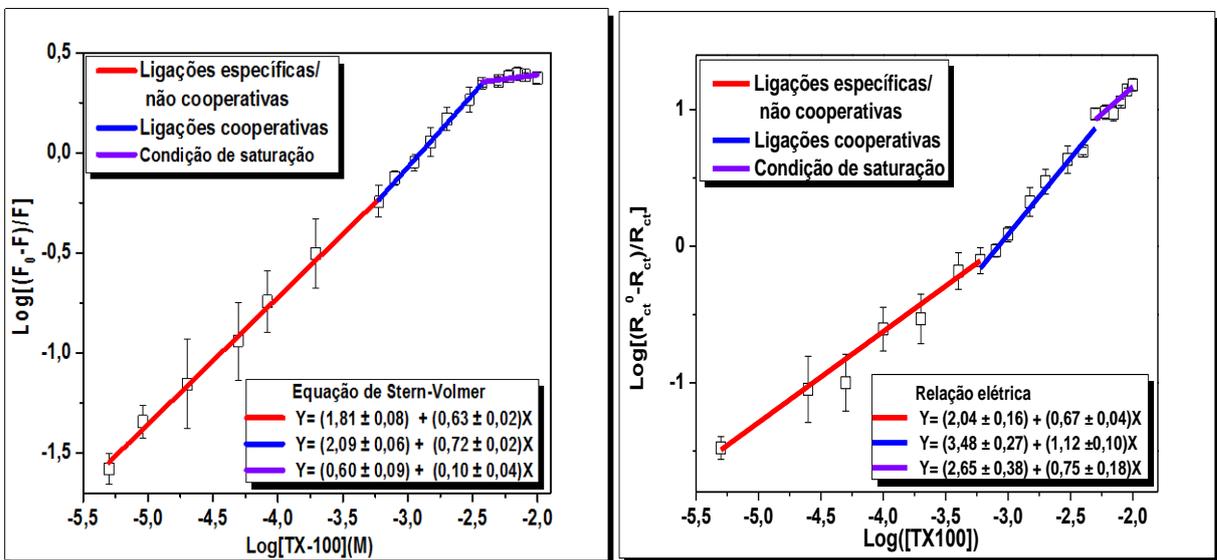


Figura 6.7 - Comparação entre a metodologia padrão (fluorescência) e a alternativa aqui proposta (EIE) no estudo do processo de desnaturação da BSA induzido pelo surfactante Triton X-100.

Para o caso da metodologia alternativa de impedância aplicada aos sistemas BSA/surfactantes, é importante ressaltar que, em comparação ao método padrão de fluorescência, ocorre uma boa concordância entre as metodologias, uma vez que o início de cada regime de interação estabelecida entre os surfactantes e BSA estão situados em pontos bem próximos em ambas abordagens.

Do ponto de vista do processo de desnaturação, se acredita que é na ligação cooperativa que a proteína muda sua conformação de forma drástica (SANTOS, S. F. et al.,

2003). E esse comportamento é claramente determinado pela metodologia alternativa, uma vez que de forma nítida existe ainda uma clara separação entre os regimes não cooperativo e cooperativo, em todos os casos, o que pode ser comprovado pelos valores do coeficiente angular das medidas das duas regiões. Portanto, esses resultados evidenciam a importância da técnica de EIE como um método complementar, que se apresenta como alternativa promissora para a caracterização dos processos que se desenrolem pela interação entre surfactantes e proteínas.

Neste sentido, a abordagem por EIE pode ser útil em situações nas quais a abordagem por fluorescência dos resíduos de aminoácidos não é efetiva. Em particular, nos casos de proteínas em que esteja ausente o resíduo triptofano ou a tirosina, fazendo com que elas tenham limitada intensidade de emissão de fluorescência intrínseca, fica impossibilitado o seu uso como um método adequado para caracterizar mudanças de conformação de proteínas (ROYER, 2006). Outra situação onde a abordagem de fluorescência é prejudicada é aquela relacionada às hemoproteínas, (como a hemoglobina), já que os grupos hemes presentes nestas proteínas absorve radiação na mesma região em que o triptofano tem emissão de fluorescência, o que dificulta muito a análise e exige um tratamento de correção de filtro interno que nem sempre é de fácil implementação (JAMESON, 2014). Essas duas situações limite mostram o quanto é importante a busca de alternativa na caracterização de mudanças de conformacionais de proteínas. Neste sentido, a EIE se apresenta como uma técnica adequada, limpa, e sem restrições nas aplicações, já que não envolve qualquer interferência no processo de desnaturação de proteína. Nesta direção, a aplicação da EIE em novos estudos envolvendo esses casos limites no método padrão de fluorescência é passo fundamental para fortalecer a metodologia proposta neste capítulo. Sendo, portanto, uma extensão natural deste capítulo em trabalhos futuros.

6.4 – Conclusão

Neste capítulo, o conceito-chave da proposta do uso da técnica de espectroscopia de impedância elétrica para a caracterização da organização estrutural de macromoléculas foi usada com sucesso para acompanhar as mudanças conformacionais em uma proteína modelo (BSA). Claramente, o método se mostra viável, especialmente na identificação da região de ligação cooperativa estabelecida entre os surfactantes e BSA, o que é importante, uma vez que

é nesta região que a proteína perde a capacidade de exercer suas funções. Nessa direção, determinar a R_{CT} através da abordagem de circuito elétrico é, sem dúvida, um passo essencial para desenvolvimento desta proposta, como pode ser visto pela sua comparação com a técnica convencional de fluorescência.

Capítulo 7 - Cinética de fibrilação da proteína BSA acompanhada por EIE

Como visto na Seção 2.6, a formação dos agregados ordenados de proteína, denominados de fibrilas mantém uma estreita relação com uma série de doenças coletivamente conhecidas como amiloidoses. Dessa maneira, conhecer a cinética de formação de fibrilas e os estágios envolvidos nos processos de reorganização microscópica da proteína (ver a Figura 2.6) é fundamental para o entendimento da relação estrutura-função correspondente. Em geral, a cinética de formação de fibrilas pode ser acompanhada através de diferentes técnicas já bem estabelecidas, desde aquelas de natureza morfológica, como microscopia de transmissão eletrônica (TEM), microscopia de força atômica, até aquelas outras de natureza ótica, como dicroísmo circular, absorção UV-Vis e fluorescência. Deve ser notado que as duas últimas requerem o uso de corantes como “molécula-repórter” para indicar a existência dos agregados. Neste capítulo, verificaremos se a técnica de espectroscopia de impedância elétrica pode também ser usada como um método para acompanhar a cinética de fibrilação da BSA, ao compararmos os resultados obtidos com base na técnica padrão da absorção UV-Vis do corante vermelho do Congo (congo red).

7.1 - Materiais e Métodos

7.1.1 - Materiais

Albumina do soro bovino (BSA) e o vermelho do Congo foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), e usados como recebidos. Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) adquirido da Dinâmica (Brasil) foram usados como reagentes na preparação da solução tampão para o corante vermelho. O filtro com diâmetro 0,2 μm da Whatman (Reino Unido) foi usado para filtrar as soluções de BSA e eliminar prováveis agregados inicialmente presentes, antes de serem incubadas na temperatura de 70 °C.

7.1.2 - Métodos

Procedimentos

Para a realização dos experimentos, tanto de absorção UV-Vis, quanto de espectroscopia de impedância elétrica, uma solução de BSA (5 mg/mL) foi preparada em um volume de 25 mL contendo água deionizada e, posteriormente, filtrada com o filtro Whatman de 0,2 μm . Para a caracterização ótica, o corante vermelho do Congo (20 μM) foi solubilizado em uma solução tampão fosfato (19,3 mM de NaH_2PO_4 e 30,3 mM de Na_2HPO_4 , $\text{pH}=7,4$) e usado em todos experimentos.

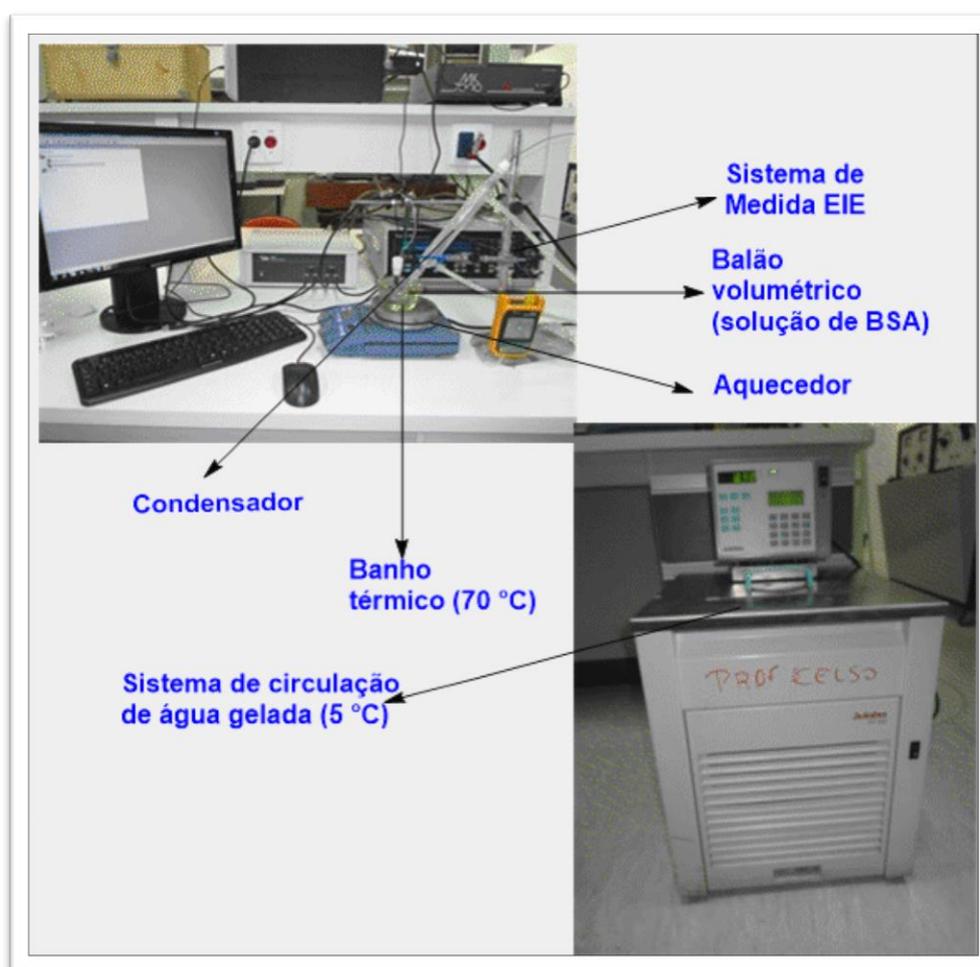


Figura 7.1 - Montagem experimental para realização de cinética de fibrilação de BSA.

Para realizar a cinética de fibrilação da BSA, a montagem experimental mostrada na Figura 7.1 foi adotada. Essa montagem é composta por:

- a) Um balão volumétrico contendo a solução da proteína BSA.
- b) Um banho térmico (mantido a 70 °C) no qual foi colocado o balão volumétrico.
- c) Um sistema de circulação de água gelada (5 °C) embutido ao condensador ligado ao balão volumétrico foi usado para minimizar a evaporação da água e manter o volume constante nos experimentos de EIE.
- d) Dois eletrodos de placas paralelas conectados ao sistema de medida de impedância elétrica.

As medidas de EIE foram feitas *in situ*, com os eletrodos imersos na solução de BSA dentro do balão volumétrico, e em contato com o banho térmico durante um intervalo de tempo entre 0 e 170 minutos. Quanto às medidas de absorção UV-Vis, alíquotas de 100 µL da solução de BSA foram retiradas a cada 10 minutos, e então misturadas com 1900 µL da solução estoque de vermelho do Congo e deixada resfriar para que fosse alcançado o equilíbrio térmico e de interação entre o corante e as fibrilas, antes da realização dos experimentos.

7.2 - Resultado

7.2.1 - Análise da Absorção UV-Vis do vermelho do Congo.

O espectro de absorção do vermelho do Congo apresenta um pico característico ao redor de 490 nm, correspondente à transição $\pi-\pi^*$, que é sensível à presença de agregados ordenados da proteína BSA. Em solução aquosa, esse pico característico é a resposta ótica de moléculas aleatoriamente distribuídas, mas que se apresentam com uma torsão de cerca 20° entre os dois anéis fenil centrais (GROENNING, 2010), como mostra a Figura 7.2 B. Mesmo que o mecanismo microscópico dessa interação não seja ainda totalmente compreendido, acredita-se que quando as moléculas do vermelho do Congo se ligam às fibrilas, elas adotam uma orientação específica com conformação planar (os modelos apresentados na literatura indicam modos de ligação paralela ou perpendicular ao eixo de formação das fibrilas, como mostrado na Figura 7.2 C), o que restringe a torsão central da molécula (WU; SCOTT; SHEA,

2012), alterando suas propriedades eletrônicas e, como consequência, modificando o espectro da absorção do vermelho do Congo. Como efeito desta restrição na torção, um aumento da intensidade da absorção, acompanhada de um deslocamento do pico para comprimento de onda maior (WU et al., 2012) (GROENNING, 2010), é observada nos espectros do vermelho do Congo em diferentes tempos de reação, como mostra a Figura 7.3, o que indica um aumento na concentração da estrutura secundária de folha-beta, que se organizam na forma de fibrilas. Portanto, baseado nas mudanças de suas propriedades óticas, o vermelho do Congo pode ser usado para estudar a cinética de formação das fibrilas de BSA.

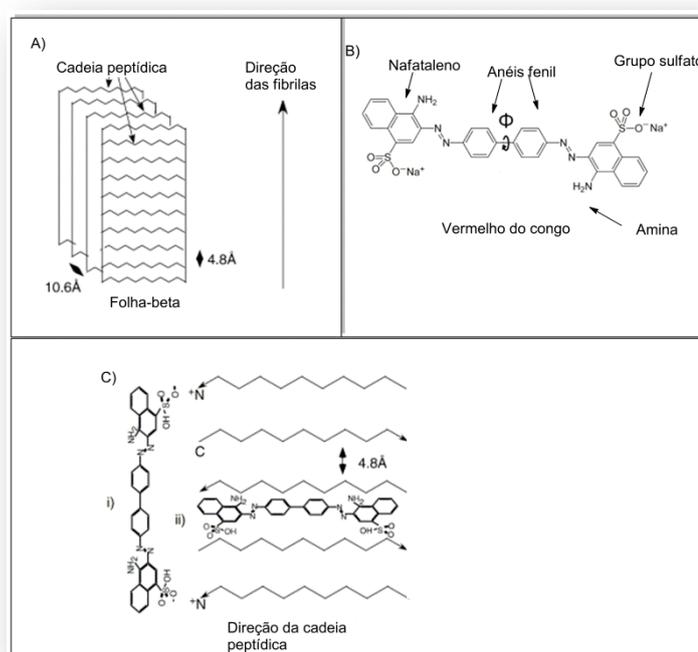


Figura 7.2 - Estrutura química do vermelho do Congo e os modos de interação com as fibrilas. Em A,) um recorte de fibrila, em B), a estrutura química do vermelho do Congo e, em C), os possíveis modelos de ligação da molécula de vermelho do Congo com as fibrilas; em paralelo (i) ou perpendicular(ii) à direção das fibrilas.

Com o uso da Eq. 7.1, é possível determinar a concentração de moléculas de vermelho do Congo ligadas às fibrilas ($[\text{Congo} - \text{Fibrilas}] (\text{mM})$), que, ao ser monitorado ao longo do tempo, pode indicar a formação das fibrilas (INOUE; KIRSCHNER, 2005). Essa equação

leva em conta a diferença nas propriedades espectral da fibrila na ausência e na presença do vermelho do Congo.

$$[\text{Congo} - \text{Fibrilas}](mM) = \frac{A_{541}}{47,8} - \frac{A_{403}}{38,1}, \quad (7.1)$$

onde A_{541} e A_{403} representam a absorvância em 541 nm (ponto de máxima diferença espectral da fibrila pura e na presença do vermelho do Congo) e 403 nm (ponto isobéctico da fibrila pura e na presença do vermelho do Congo), respectivamente.

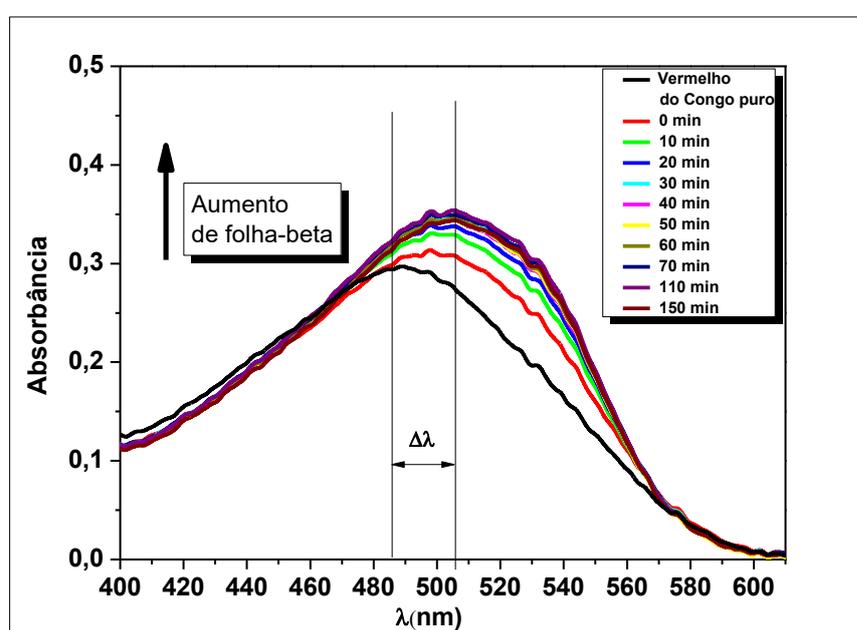


Figura 7.3 - Método padrão: espectro de absorção do corante vermelho do Congo como função do tempo de incubação de BSA na temperatura de 70°C.

Na Figura 7.4 é mostrada a cinética de fibrilação da BSA pelo método descrito na Eq. 7.1. Como se pode facilmente observar, a curva apresenta inicialmente um rápido crescimento, correspondendo à fase de alongamento (ver a Figura 2.6), o que significa dizer que a concentração de fibrilas em solução aumenta à medida que o tempo passa e, como consequência, levando a um aumento no número de moléculas de vermelho do Congo ligadas a esses agregados. Esse comportamento é observado até que a concentração $[\text{Congo} - \text{Fibrilas}](mM)$ atinja um valor limite, em aproximadamente de 60 minutos, o que indica que

o processo de fibrilação alcançou a fase de equilíbrio, caracterizada pela saturação na concentração de fibrilas de BSA.

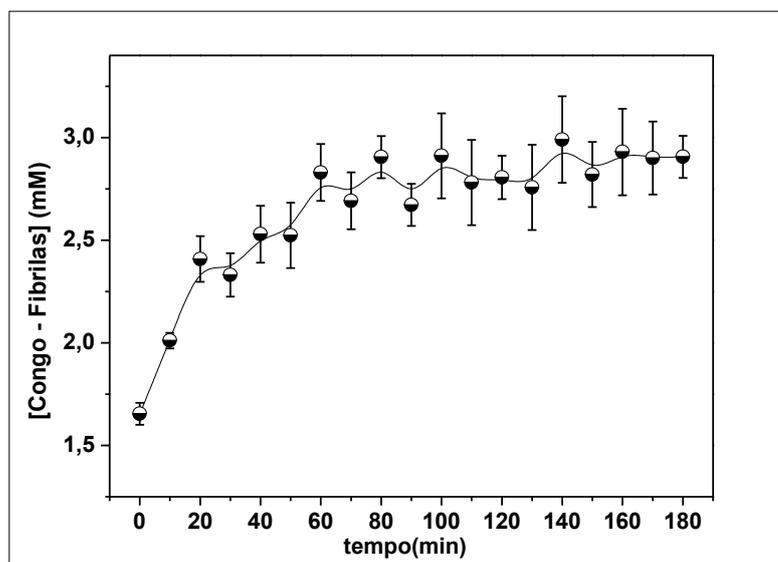


Figura 7.4 - Cinética de fibrilação da BSA acompanhada por absorção no UV-Vis (método padrão).

7.2.2 - Análise da EIE

Tipicamente, os espectros de impedância elétrica das soluções de BSA ao longo do tempo apresentam duas polarizações elétricas correspondentes aos dipolos na faixa de frequência de (10^5 - 10^6) Hz, e à polarização interfacial em baixas frequências, como mostra a Figura 7.5. Com o decorrer da cinética de fibrilação da BSA, ocorre uma diminuição nos valores de impedância elétrica, indicando que esse processo promove mudanças no meio que facilitam o transporte de cargas elétricas e a orientação dipolar na solução. Em outras palavras, a transformação da estrutura secundária alfa-hélice para folha-beta causa uma reorientação molecular que induz nítidas alterações nas propriedades elétricas da solução de BSA. Assim, é de se esperar que, quando a transformação se completar, as mudanças nos mecanismos de transporte e de orientação dipolar tendam a se minimizar. Portanto, uma maneira útil para caracterizar a formação de fibrilas é acompanhar essas mudanças ao longo do tempo.

Tendo em conta as informações do parágrafo anterior, é preciso estabelecer um parâmetro relacionado à impedância que forneça bases de comparação com o método padrão

de absorção do vermelho do Congo. Para isso, foi realizado um ajuste de circuito elétrico equivalente baseado no circuito elétrico mostrado na Figura 6.3, que claramente é um bom modelo para o comportamento da solução de BSA durante o processo de fibrilação. Isso pode ser comprovado pela concordância dos dados experimentais (pontos) com os valores característicos do circuito usado (linhas vermelhas), como mostra a Figura 7.5.

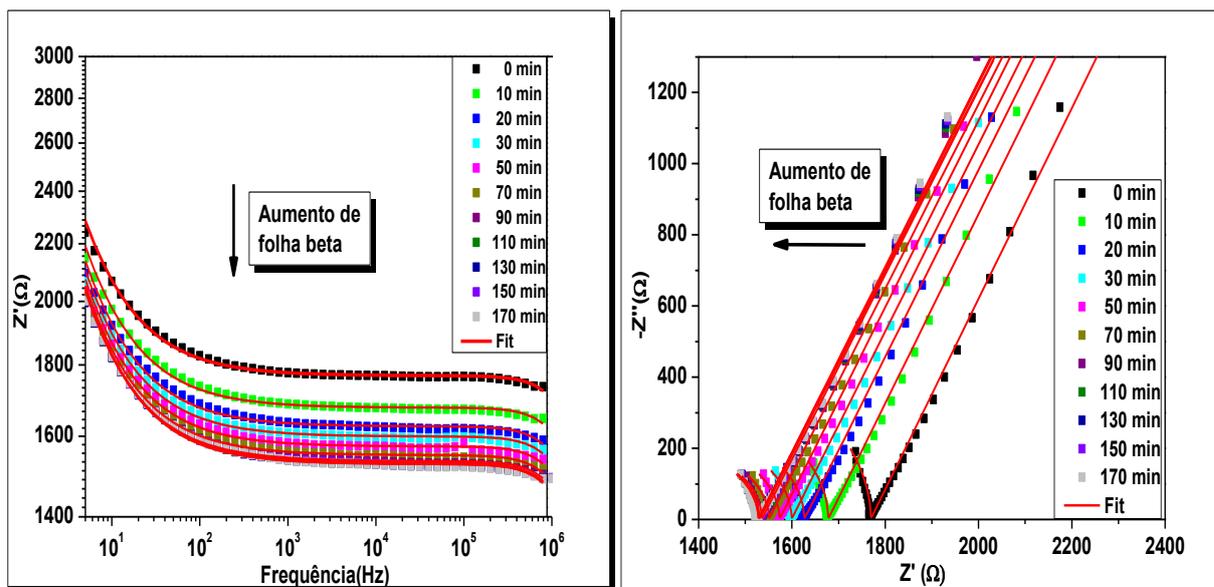


Figura 7.5 - Espectros de impedância das soluções de BSA na ausência do vermelho do Congo ao longo da cinética de fibrilação. Os pontos representam os dados da medição enquanto que as linhas são ajustes feitos usando o circuito elétrico equivalente mostrado na Figura 6.3.

Tanto a resistência de transferência de cargas (R_{CT}), quanto a capacitância do circuito modelo usado no ajuste da solução de BSA, se mostram parâmetros confiáveis para indicar a existência de fibrilas, já que ambos exibem um típico comportamento de saturação em função do tempo em aproximadamente 60 min, como pode ser constatado pela observação da Figura 7.6. Portanto, mudanças nesses parâmetros surgem naturalmente como um indicativo elétrico da formação das fibrilas de BSA em solução.

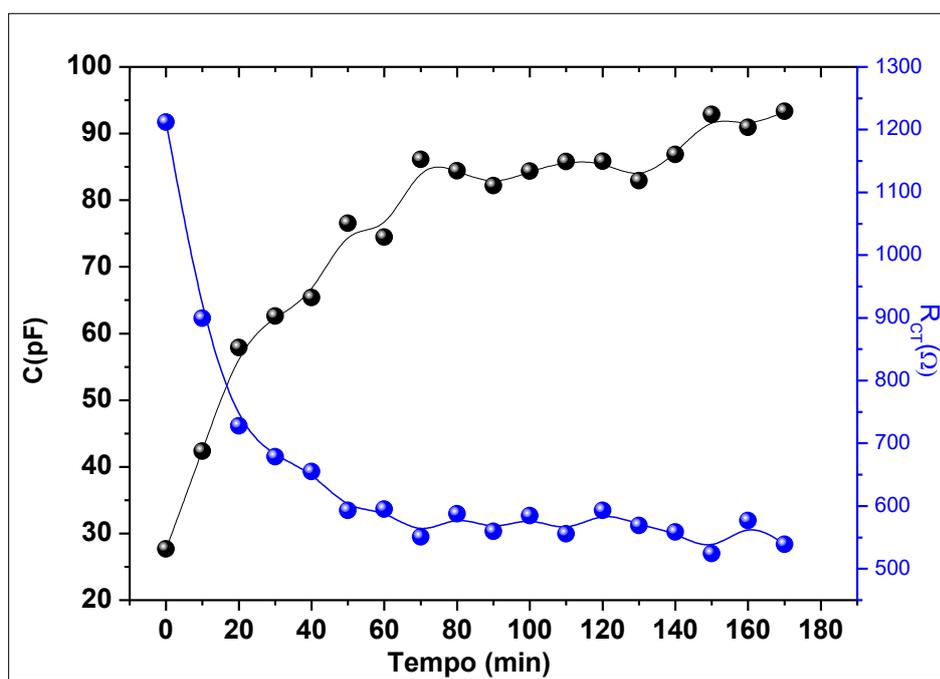


Figura 7.6 - Parâmetros resistência de transferência de cargas (R_{ct}) e a capacitância (C) em diferentes tempo da cinética apontam que a EIE fornece informações adequadas sobre o processo de fibrilação da BSA.

Para mostrar que a hipótese do parágrafo acima está correta, na Figura 7.7 a capacitância ao longo do tempo foi comparada com a concentração de molécula de vermelho do Congo ligadas às fibrilas, como determinada pelo método padrão de absorção UV-Vis. A concordância nas duas técnicas mostra a confiabilidade da EIE para ser usada como uma técnica adequada para mapear a formação das fibrilas. Note que inicialmente a capacitância da solução aumenta e, posteriormente, ela alcança um regime de saturação. Claramente, isso é um indicativo que a transformação da alfa-hélice para folha-beta, com posterior formação das fibrilas de BSA, causa mudanças na configuração de dipolos que facilitam sua orientação na direção do campo elétrico, o que contribui para uma elevação dos valores da capacitância. Gradativamente, à medida que as fibrilas são formadas, um aumento na capacitância indica uma evidente transformação dessas estruturas; uma subsequente saturação no valor da capacitância surge como uma evidência de que a formação das fibrilas atingiu seu limite máximo. Em termos do modelo da cinética de fibrilação apresentado na Seção 2.6 e resumido na Figura 2.6, um aumento da capacitância caracteriza a fase de alongamento das fibrilas, enquanto que a saturação da mesma pode ser identificada como o equilíbrio de fase.

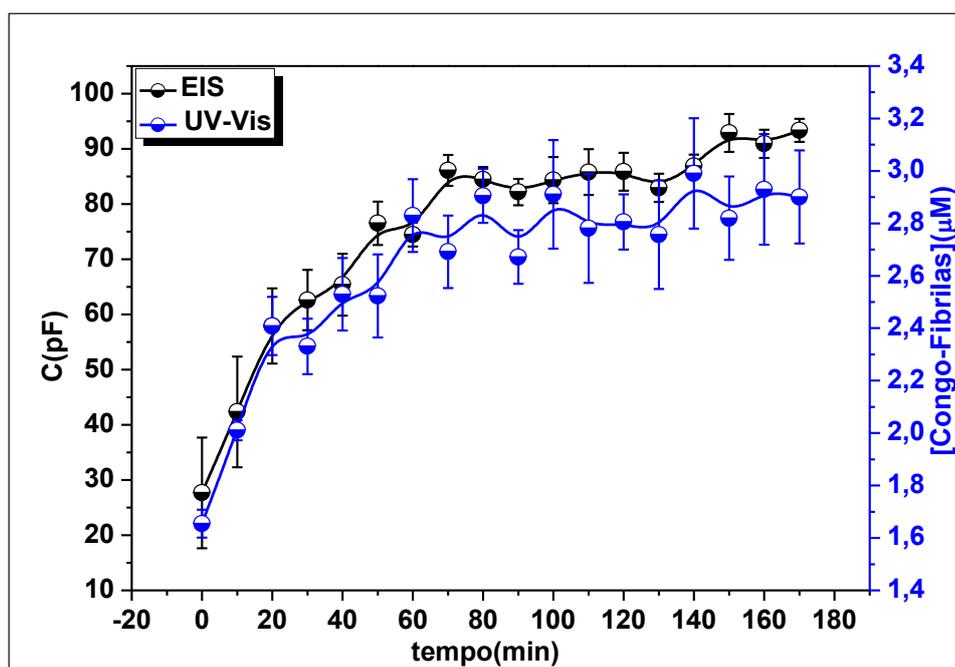


Figura 7.7 - Comparação entre EIE (método alternativo) e absorvância (método padrão) para acompanhar a cinética de fibrilação da proteína BSA.

É importante notar também que a capacitância aumenta por um fator aproximadamente igual a 9 entre o início e o fim do processo de fibrilação, enquanto que o fator de aumento da $[Congo - Fibrilas](mM)$ é de apenas cerca de 1,8, o que mostra que EIE é uma técnica bem mais sensível que a abordagem padrão baseada no uso do vermelho do Congo. Muito embora o método aqui desenvolvido tenha sido aplicado apenas ao caso de uma única proteína (BSA), os resultados alcançados são bastante sugestivos de que a técnica de EIE apresenta consideráveis vantagens sobre a metodologia usual.

7.3 - Discussão

Tipicamente, como mostra a Seção 2.6, o processo de crescimento das fibrilas ao longo do tempo envolve um estágio lento, seguido por uma fase relativamente rápida, (conhecida como fase de alongamento), que por fim alcança uma fase de equilíbrio, um indicativo da saturação de fibrilação (LEE et al., 2007). Observando a Figura 7.7, é evidente a ausência do estágio lento durante a cinética de fibrilação, o que sugere que os processos que

ocorrem durante este estágio (como a desnaturação e a nucleação) podem ser relativamente rápidos.

Para identificar a existência de estados desnaturados da BSA na temperatura de 70°C (temperatura que foi usada para realizar a fibrilação), a mesma metodologia da EIE desenvolvida para o caso do surfactante foi também aplicada para determinar a temperatura de desnaturação para BSA, nas mesmas condições usadas nos estudos de fibrilação. Para tanto, a impedância elétrica foi registrada na faixa de temperatura de 30°-80°C. Na Figura 7.8 é mostrado o gráfico $\log \left[\frac{R_{ct}^{30} - R_{ct}^T}{R_{ct}^T} \right]$ versus o $\log(T)$, onde R_{ct}^{30} e R_{ct}^T representam a resistência de transferência de cargas na temperatura de 30°C e em uma temperatura T, respectivamente. Claramente, existe um ponto na curva (correspondente a 57°C) que apresenta uma mudança da derivada, o que pode ser associado como a temperatura de desnaturação da BSA. Isso pode ser comprovado, pela sua concordância com os valores encontrados na literatura (LU et al., 2015; MURAYAMA; TOMIDA, 2004). Portanto, na temperatura de fibrilação (70°C), a conformação da BSA se encontra no estado desnaturado, o que é uma condição necessária para iniciar a formação de fibrilas.

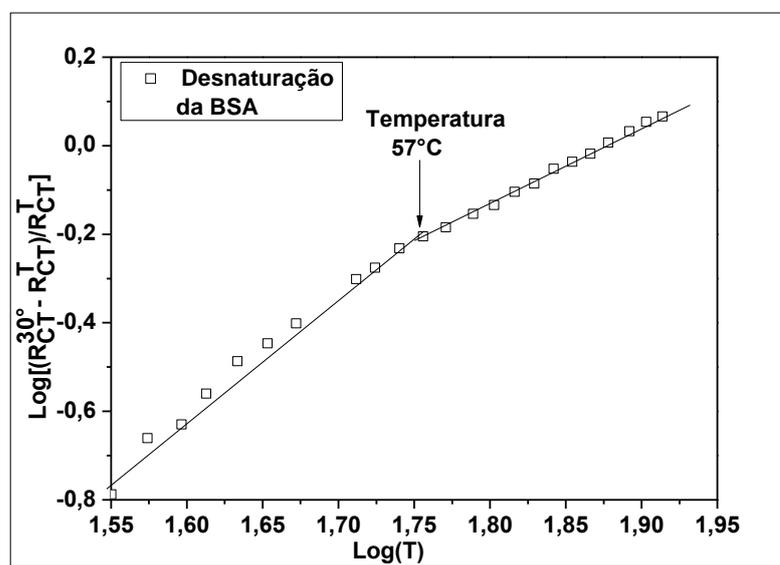


Figura 7.8 - Processo de desnaturação da BSA acompanhada por EIE.

Em geral, o processo de desnaturação da BSA é um fenômeno relativamente rápido (MILITELLO et al., 2004; MILITELLO; VETRI; LEONE, 2003). Dessa forma, a existência

de um estágio lento durante a fibrilação é modelada pela ocorrência do processo de nucleação. Assim para o caso da proteína BSA, duas são as possibilidades para a nucleação: ou este é um processo extremamente rápido, ou simplesmente não é necessário para a formação das fibrilas, indicando que não existe nenhuma barreira energética que precisa ser vencida para iniciar o processo de fibrilação. Recentemente, alguns trabalhos (BHATTACHARYA, M.; JAIN; MUKHOPADHYAY, 2011; HOLM et al., 2007; SAHA; DEEP, 2014) têm apontado para a segunda opção ser a mais provável de acontecer nas condições usadas neste capítulo. Por outro lado, como mostra (SAHA; DEEP, 2014), em certas condições a BSA pode começar a apresenta um estágio lento.

Novamente, a fato de ambas as técnicas apontarem para não existência do estágio lento é um demonstrativo, do ponto de microscópico, que a EIE acompanha o mesmo fenômeno físico – químico mapeado pela metodologia padrão por vermelho do Congo, o que reforça nosso argumento de que a metodologia proposta pode ser usada como técnica de caracterização de fibrilas.

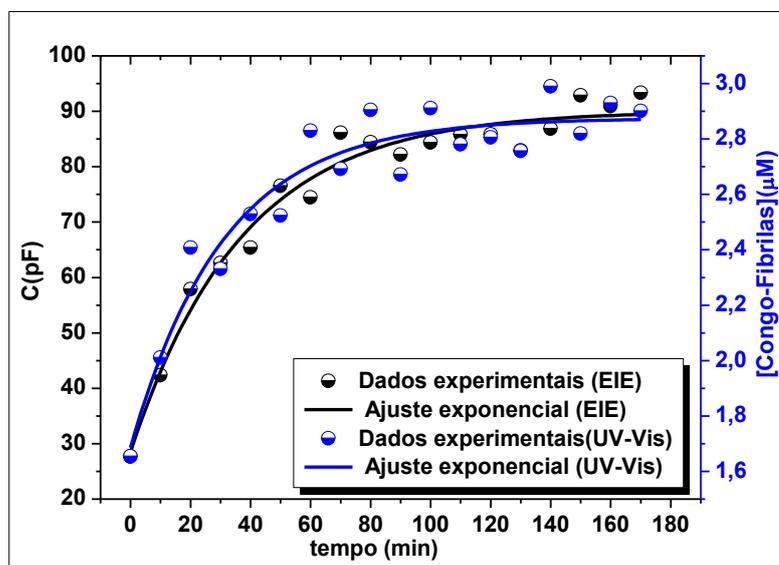


Figura 7.9 – Ajuste exponencial para cinética de fibrilação da BSA acompanhado pelo método padrão (azul) e o alternativo (preto).

Quanto à fase de alongamento, no qual ao longo do tempo mais moléculas de proteínas são ligadas entre si na forma de fibrilas, é possível identificar a taxa de crescimento (K) dessas estruturas, ao tomarmos um simples ajuste exponencial para ambas às curvas

mostradas na Figura 7.7. Como esperado, a taxa de crescimento de ambas as curvas são bem próximas (K é igual a $0,032 \text{ min}^{-1}$ para a metodologia do vermelho do Congo, e $0,027 \text{ min}^{-1}$ para a metodologia desenvolvida por EIE), como mostram as linhas (ajustes) das curvas apresentadas na Figura 7.9. Isso é mais um indicativo que ambas as técnicas estão acompanhando o mesmo fenômeno físico, o qual, neste caso, está relacionado com a formação de agregados ordenados (fibrilas) da BSA.

Esse é mais uma evidência de que a EIE é um método confiável para acompanhar a formação os mecanismos envolvidos durante o processo de fibrilação da BSA. Do ponto de vista elétrico, alterações na configuração molecular da BSA promovem mudanças abruptas na capacitância global da amostra, o que indica que essa nova configuração permite que um número maior de moléculas de BSA se oriente ao longo da direção do campo elétrico aplicado.

A comprovação de que a metodologia da EIE é adequada para identificar fibrilação da BSA é de grande importância, especialmente para o acompanhamento *in situ* desse processo, uma vez que o vermelho do Congo não pode ser usado para este fim, por sua presença influenciar no processo de formação desses agregados (PRATIM BOSE et al., 2010). Até mesmo a tioflavina T, outro corante usado para caracterizar esse processo *in situ*, tem sido apontado em estudos recentes como uma molécula que também influencia no processo de cinética de fibrilação (D'AMICO et al., 2012).

Portanto, desenvolver métodos capazes de identificar a fibrilação *in situ* é uma questão de interesse prático. Como podemos observar na parte experimental, todos os experimentos de impedância foram realizados *in situ*, de forma simples e adequada para mapear a cinética de fibrilação, sem qualquer interferência no curso da cinética, o que torna nossa metodologia uma candidata competitiva para lidar com problemas dessa natureza.

7.4 - Conclusão

A análise dos resultados apresentados neste capítulo nos fornece fortes evidências a favor do uso da EIE com uma metodologia apropriada para acompanhar a progressiva formação de fibrilas de BSA. Da comparação desses resultados com aqueles obtidos com a técnica padrão (absorbância de uma molécula repórter) foi possível estabelecer que o valor da

capacitância elétrica, obtida a partir do ajuste de circuito elétrico equivalente, é um parâmetro que apresenta mudanças abruptas no decorrer da cinética de fibrilação, de maneira similar ao observado quando do uso da metodologia padrão. Assim, passaremos a associar ao comportamento da capacitância as transformações na estrutura secundária da BSA decorrente do processo de fibrilação. A associação da capacitância com transformações na estrutura secundária da proteína é uma ótima maneira de lidar com o problema de fibrilação *in situ*, permitindo a aplicação de uma metodologia limpa, diferente da metodologia padrão onde a interação entre corantes e proteínas pode influenciar a cinética de fibrilação, o que impede seu uso *in situ*.

Capítulo 8 - Conclusões e Perspectivas

Como pode ser visto ao longo dos diferentes capítulos apresentados, esta tese teve como ponto central a caracterização de sistemas biológicos e suas interações com polímeros e surfactantes, bem como o efeito da temperatura sobre as suas propriedades. Isso foi conseguido a partir do uso de uma abordagem elétrica das mudanças conformacionais e dos processos de fibrilação na proteína BSA, e das variações na estabilidade das cadeias da polianilina em clorofórmio como função de sua interação com moléculas de DNA. Assim, a EIE pode ser considerada como uma técnica potencialmente aplicável nesta caracterização, uma vez que a partir dela foi possível determinar as diferentes mudanças nas condições de equilíbrio das cadeias de polianilina e DNA sob efeito de variações da concentração relativa DNA/Polianilina ($[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}$). Da mesma forma, com o uso da analogia de circuitos equivalentes, as mudanças na conformação da proteína BSA pode também ser acompanhadas. A partir do ajuste dos parâmetros, diferentes características dos sistemas estudados foram determinadas no intuito de verificar e compreender os mecanismos envolvidos nas mudanças decorrente nas cadeias de DNA e da proteína. O tratamento dos efeitos da concentração relativa DNA/polianilina por meio de circuitos equivalentes de Randles provou ser uma eficiente abordagem não-convencional de análise, em contraposição às técnicas rotineiras que fazem uso da absorção UV-Vis. Além disso, essa análise permite que parâmetros próprios da solução e outros que sinalizam propriedades inerentes à interface eletrodo/eletrolito possam ser matematicamente separados, de modo a analisar a resposta característica do circuito de Randles e, os quais, então, podem ser aplicados no tratamento dos efeitos de $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}$ na estabilidade das cadeias de DNA e polianilina em solução.

Nesse sentido, podemos destacar que o uso da EIE permite estabelecer que a resistência de transferência de carga (parâmetro relacionado a processos interfaciais) caracteriza as interações estabelecidas entre as cadeias de DNA e moléculas de polianilina. Das curvas analisadas, é possível verificar a presença de três regiões distintas, separadas por condições de equilíbrio (pontos extremos nas curvas de absorbância e resistência de transferência de carga), que indicam para quais valores da razão estequiométrica $[P]_{\text{DNA}}/[N]_{\text{PANI}}$ as cadeias de polianilina apresentam boa estabilidade ou sofrem processos de precipitação devido à formação de complexos PANI/DNA. É fácil observar que o processo de

precipitação das espécies presentes em solução se caracteriza pelo aumento da resistência de transferência de cargas, enquanto que uma diminuição está associada a uma melhor dispersão das moléculas de polianilina em solução. Dessa forma, devido à formação de complexos PANI/DNA ou à conversão de PANI/DNA para PANI/DBSA, ocorrem mudanças que afetam de maneira extremamente evidente as propriedades dielétrica no meio, cujo comportamento pode então ser descrito pela existência de pontos de máximos e de mínimos, a separar as três regiões anteriormente identificadas.

A introdução do conceito de circuito equivalente também se mostrou bem promissor para o entendimento das interações envolvendo o nanocompósito fluorescente polianilina/ouro com cadeias de DNA, uma vez que os processos envolvidos causam mudanças nas propriedades do meio, permitindo com que se tenha a adequada descrição dos mecanismos relevantes da interação. Além disso, o uso da espectroscopia de impedância permite a identificação de regiões de concentração relativa nanocompósito/DNA que apresentam um mais acentuado processo de precipitação, o que é um fator a ser considerado para o aperfeiçoamento dos testes de diagnósticos de doenças desenvolvidos no grupo de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física da UFPE. A EIE permite que se tenha um entendimento microscópico dos processos que conduzem à separação de fases e dos processos de precipitação, mostrando a importância do controle da razão estequiométrica $[P]_{DNA}/[N]_{PANI}$ para a implementação dos testes de diagnósticos.

Por fim, neste trabalho foi possível estabelecer a real influência dos surfactantes SDS, DTAB e Triton X-100 sobre as mudanças da estrutura 3-D (conhecida como estrutura nativa) da proteína modelo BSA. O uso de circuitos elétricos equivalentes se mostra bastante eficiente para a identificação das regiões de concentração de surfactante onde são estabelecidas as interações específicas, não-cooperativas, cooperativas e de saturação entre a BSA e os surfactantes. O comportamento do parâmetro R_{CT} , ao ser comparado com a metodologia rotineira de fluorescência, se mostrou adequado para a indicação dessas regiões, e em especial da região de interação cooperativa, que é entendido na literatura como a região onde a proteína se torna totalmente desnaturada. Da mesma forma, o acompanhamento das variações no comportamento elétrico pela metodologia de circuito elétrico equivalente permite mapear a assinatura elétrica da cinética de fibrilação da BSA, apontando para novas possibilidades na caracterização da formação de fibrilas, que são agregados ordenados

relacionados a uma diversidade de doenças degenerativas. Novamente, a partir dos parâmetros do circuito elétrico equivalente escolhido, foi possível estabelecer a resistência de transferência de carga e a capacitância como grandezas que são capazes de identificar a cinética da fibrilação, o que significa dizer que a reorientação molecular decorrente do processo de fibrilação faz com que ocorram mudanças nas propriedades de transporte e de polarização de carga. Claramente, a capacitância aumenta ao longo do tempo, indicando que a transformação de estrutura secundária alfa-hélice para folha-beta facilita a polarização de cargas na direção do campo elétrico, o que explica esse aumento.

Na perspectiva de realização de novos trabalhos, uma simples inspeção (ver Figura 8.1) nas estruturas químicas do vermelho do Congo e da leucoesmeraldina presente no nanocompósito fluorescente revela algumas similaridades que apontam para novas possibilidades de estudo. Assim como o vermelho do Congo, a molécula de leucoesmeraldina apresenta anéis fenil, e grupos carregados (a depender do pH) com condições de interagir com agregados fibrilares de proteínas. Outra característica em comum entre as moléculas é o fato de que ambas apresentam uma torsão entre dois adjacentes anéis fenil presentes nas suas estruturas químicas.

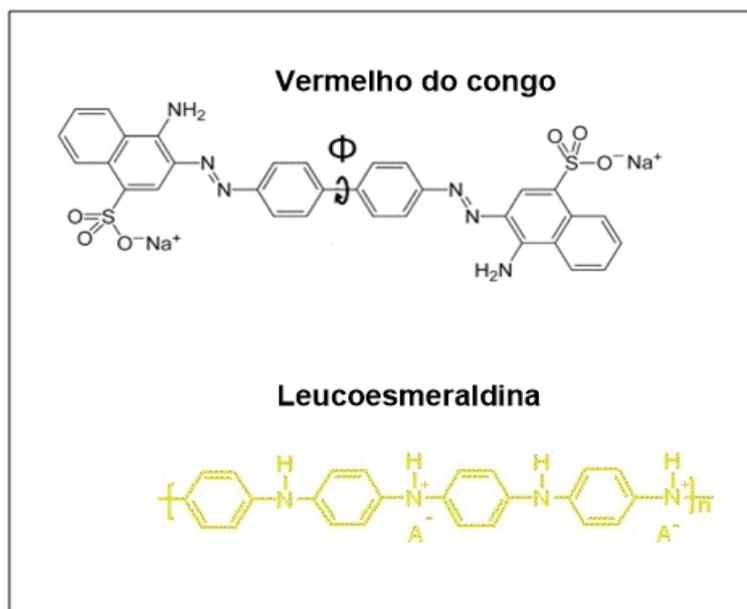


Figura 8.1 - Comparação das estruturas química do vermelho do Congo e a leucoesmeraldina.

É sabido que o ângulo de torção e as propriedades eletrônicas da molécula de leucoesmeraldina guardam entre si uma estreita relação, de forma que restrições na torção alteram a deslocalização dos elétrons π , e conseqüentemente, a estrutura eletrônica e as propriedades óticas (CHOI; KERTESZ, 1997; GINDER; EPSTEIN, 1990; LIBERT et al., 1997) dessa molécula. Resultados desenvolvidos no grupo Polímeros Não-Convencionais apontam para essas alterações nas propriedades de fluorescência do nanocompósito fluorescente PANI-Au induzida por restrições na torção da molécula de leucoesmeraldina. Assim, esses resultados e as características moleculares da leucoesmeraldina apresentadas acima sugerem que o nanocompósito possa ser usado como uma molécula de prova para identificação de fibrilação. Para testar essa hipótese é preciso a realização de diversos experimentos tal como segue:

- Escolha adequada do solvente para realização dos testes.
- Verificação o efeito da variação da razão estequiométrica nanocompósito/fibrilas sobre a estabilidade da cadeias de leucoesmeraldina, o que pode ser feito com o uso da EIE referenciados de acordo com os resultados mostrados Capítulos 4 e 5.
- A identificação da melhor razão estequiométrica, de modo a realizar os experimentos referentes ao uso do nanocompósito com moléculas de prova para acompanhar a cinética de fibrilação de proteínas, comparando seus resultados com aqueles apresentados por vermelho do congo e EIE, usados os mesmos métodos usados nos Capítulos 6 e 7.

Portanto, essas novas possibilidades podem apontar para novos rumos na identificação de fibrilas, bem como sugerir novos problemas nos quais a EIE, baseada no uso de circuito elétrico equivalente, possa vir de fato a se confirmar como uma metodologia complementar e/ou alternativa às técnicas comumente aplicadas para esse fim. Além disso, o uso de polímeros fluorescentes (por exemplos, os derivados de politiofenos) para mapear a cinética de fibrilação tem se mostrado efetivos e adequados, como pode ser visto em trabalhos recente (HERLAND; INGANÄS, 2007; NILSSON, K. P. R. et al., 2005). Neste sentido, os nanocompósitos fluorescentes desenvolvidos no grupo são candidatos para o mesmo fim. Portanto, uma extensão natural deste trabalho se norteia em duas direções principais: o uso da espectroscopia de impedância elétrica como método de identificação do processo de fibrilação

e a aplicação dos nanocompósitos sintetizados no grupo Polímeros Não Convencionais como uma molécula de prova capaz determinar a formação de fibrilação.

Referências

AFZAL, A. B. et al. Dielectric and impedance studies of DBSA doped polyaniline/PVC composites. **Current Applied Physics**, v. 10, n. 2, p. 601-606, 3// 2010.

ALEX, S.; DUPUIS, P. FT-IR and Raman investigation of cadmium binding by DNA. **Inorganica Chimica Acta**, v. 157, n. 2, p. 271-281, 1989.

AMARNATH, C.; PALANIAPPAN, S. Polyaniline doped by a new class of dopants, benzoic acid and substituted benzoic acid: synthesis and characterization. **Polymers for advanced technologies**, v. 16, n. 5, p. 420-424, 2005.

Amino Acids, Proteins, and Enzymes. 2015. Disponível em: < <http://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s21-amino-acids-proteins-and-enzym.html> >. Acesso em: 29 de out. 2015.

AMRITHESH, M. et al. Enhanced luminescence observed in polyaniline–polymethylmethacrylate composites. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 449, n. 1–2, p. 176-179, 1/31/ 2008a.

_____. Polyaniline doped with orthophosphoric acid—A material with prospects for optoelectronic applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 458, n. 1–2, p. 532-535, 6/30/ 2008b.

ANAND, U. et al. Effect of β -CD on refolding dynamics of the unfolded and reduced states of human serum albumin. **Indian Journal of Chemistry**, v. 52, p. 1031-1040, 2013.

ANAND, U.; JASH, C.; MUKHERJEE, S. Spectroscopic Probing of the Microenvironment in a Protein–Surfactant Assembly. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 48, p. 15839-15845, 2010/12/09 2010.

_____. Protein unfolding and subsequent refolding: a spectroscopic investigation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 45, p. 20418-20426, 2011.

ANDERSON, J. C. et al. **Materials Science for Engineers, 5th Edition**. CRC Press, 2004. ISBN 9780203502624.

ANSARI, M. O.; MOHAMMAD, F. Thermal stability and electrical properties of dodecyl-benzene-sulfonic-acid doped nanocomposites of polyaniline and multi-walled carbon nanotubes. **Composites Part B-Engineering**, v. 43, n. 8, p. 3541-3548, Dec 2012.

ARAKAWA, H. et al. A Comparative Study of Calf Thymus DNA Binding to Cr (III) and Cr (VI) Ions EVIDENCE FOR THE GUANINE N-7-CHROMIUM-PHOSPHATE CHELATE FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10150-10153, 2000.

ARAUJO, E. S. et al. Aggregational processes of low molecular weight polyethylene-b-polyethylene oxide diblock copolymer probed by electrical impedance spectroscopy. **European Polymer Journal**, v. 46, n. 9, p. 1854-1859, Sep 2010.

ARORA, K. et al. Ultrasensitive DNA hybridization biosensor based on polyaniline. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 5, p. 613-620, 12/15/ 2007.

ASAMI, K. Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 305, n. 1, p. 268-277, 2002.

B for Biology: Biomolecules of the Cell - Proteins. 2015. Disponível em: < <http://namrataheda.blogspot.com.br/2013/03/biomolecules-of-cell-proteins.html> >. Acesso em: 31 de out. 2015.

BARRETT, G. C.; ELMORE, D. T. **Amino Acids and Peptides**. Cambridge University Press, 1998. ISBN 9780521468275.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R. **Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications**. John Wiley & Sons, 2005. ISBN 0471716227.

BARTNIKAS, R. **Electrical Insulating Liquids**. Astm Intl, 1994. ISBN 0803120559.

BARTON, A. C.; DAVIS, F.; HIGSON, S. A. P. Labelless immunosensor assay for prostate specific antigen with picogram per milliliter limits of detection based upon an ac impedance protocol. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 16, p. 6198-6205, 2008.

BAYFORD, R. Bioimpedance tomography (electrical impedance tomography). **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 63-91, 2006.

BHADRA, S. et al. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 8, p. 783-810, Aug 2009.

BHATTACHARYA, M.; JAIN, N.; MUKHOPADHYAY, S. Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 14, p. 4195-4205, 2011/04/14 2011.

BHATTACHARYA, S.; MANDAL, S. S. Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on intercalation and DNA melting. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1323, n. 1, p. 29-44, 1/14/ 1997.

BOGOMOLOVA, A. et al. Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 10, p. 3944-3949, 2009.

BOLISETTY, S. et al. Amyloid Directed Synthesis of Titanium Dioxide Nanowires and Their Applications in Hybrid Photovoltaic Devices. **Advanced Functional Materials**, v. 22, n. 16, p. 3424-3428, 2012.

BONANOS, N.; PISSIS, P.; MACDONALD, J. R. Impedance Spectroscopy of Dielectrics and Electronic Conductors. In: (Ed.). **Characterization of Materials**: John Wiley & Sons, Inc., 2002. ISBN 9780471266969.

BOOß-BAVNBEK, B. et al. **BetaSys: Systems Biology of Regulated Exocytosis in Pancreatic β -Cells**. Springer New York, 2011. ISBN 9781441969569.

BOYER, M. I. et al. Vibrational Study of the FeCl₃-Doped Dimer of Polyaniline; A Good Model Compound of Emeraldine Salt. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 38, p. 8952-8961, 2000/09/01 2000.

CALLADINE, C. R. et al. **Understanding DNA: The Molecule and How it Works**. Elsevier Science, 2004. ISBN 9780080474663.

CAO, M. et al. Modulation of Fibrillogenesis of Amyloid β (1-40) Peptide with Cationic Gemini Surfactant. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 47, p. 13436-13443, 2007/11/01 2007.

CAO, W. et al. Chitosan as a Polymer for pH-Induced DNA Capture in a Totally Aqueous System. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 20, p. 7222-7228, 2006/10/01 2006.

CAO, Y.; QIU, J.; SMITH, P. Effect of solvents and co-solvents on the processibility of polyaniline: I. Solubility and conductivity studies. **Synthetic Metals**, v. 69, n. 1, p. 187-190, 1995a.

_____. Effect of solvents and co-solvents on the processibility of polyaniline: I. solubility and conductivity studies. **Synthetic Metals**, v. 69, n. 1-3, p. 187-190, 3/1/ 1995b.

CAO, Y.; SMITH, P.; HEEGER, A. J. Counter-ion induced processibility of conducting polyaniline and of conducting polyblends of polyaniline in bulk polymers. **Synthetic Metals**, v. 48, n. 1, p. 91-97, 1992.

CHANDA, M.; ROY, S. K. **Plastics Technology Handbook, Fourth Edition**. CRC Press, 2006. ISBN 9781420006360.

CHINAGLIA, D. et al. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 30, n. 4, p. 4504, 2008.

CHINAGLIA, D. L. et al. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 30, p. 4504.1-4504.9, 2008.

CHO, M. S. et al. Synthesis and electrical properties of polymer composites with polyaniline nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 24, n. 1-2, p. 15-18, 2004.

CHOI, C. H.; KERTESZ, M. Conformational Studies of Vibrational Properties and Electronic States of Leucoemeraldine Base and Its Oligomers. **Macromolecules**, v. 30, n. 3, p. 620-630, 1997/02/01 1997.

COSGROVE, T. **Colloid Science: Principles, Methods and Applications**. John Wiley & Sons, 2010. ISBN 9781444320190.

D'AMICO, M. et al. Thioflavin T Promotes A β (1–40) Amyloid Fibrils Formation. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 12, p. 1596-1601, 2012/06/21 2012.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio) sensors. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

DE ALBUQUERQUE, J. E. et al. Study of the interconversion of polyaniline oxidation states by optical absorption spectroscopy. **Synthetic Metals**, v. 146, n. 1, p. 1-10, 2004.

DE LIMA, S. V. **Transições de fase em colóides: Física básica e aplicações em liberação controlada de fármacos**. 2010. (Mestrado em Ciência dos Materiais). Pós-graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro - Bahia.

DE LIMA, S. V.; DE OLIVEIRA, H. P. Melting point of ionic ternary systems (surfactant/salt/water) probed by electrical impedance spectroscopy. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1-3, p. 132-137, Jul 20 2010.

DE LIMA, S. V. et al. A dielectric study of interpolymer complexes of polyaniline and DNA. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 471, n. 0, p. 139-147, 4/20/ 2015.

DE MELO, C. P.; DE ANDRADE, C. A. S.; DOS SANTOS, C. G. **Fluorescent nanoparticle composites themselves, process for the preparation of such composites, and use in rapid diagnosis systems with affinity to biological molecules**: Google Patents 2012.

DE OLIVEIRA, H. P. **Espectroscopia de impedância aplicada a sistemas nano estruturados e polímeros condutores**. 2004. (Doutorado em Física). Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

DE OLIVEIRA, H. P.; DE MELO, C. P. Use of Electrical Impedance Spectroscopy as a Practical Method of Investigating the Formation of Aggregates in Aqueous Solutions of Dyes and Surfactants. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 21, p. 6903-6908, Jun 2 2011.

DE OLIVEIRA, H. P.; OLIVEIRA, E. G. L.; DE MELO, C. P. Aggregation of methyl orange probed by electrical impedance spectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, n. 2, p. 444-449, Nov 15 2006.

DE, S.; GIRIGOSWAMI, A.; DAS, S. Fluorescence probing of albumin–surfactant interaction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 2, p. 562-573, 5/15/ 2005.

DEAN, D. A. et al. Electrical Impedance Spectroscopy Study of Biological Tissues. **Journal of electrostatics**, v. 66, n. 3-4, p. 165-177, 2008.

DEEP, S.; AHLUWALIA, J. C. Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, n. 20, p. 4583-4591, 2001.

Dielectric and Impedance Spectroscopy. 2015. Disponível em: < http://novocontrol.de/html/intro_mat_spectr.htm >. Acesso em: 28 de out. 2015.

DOBSON, C. M. Protein folding and misfolding. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 884-890, 12/18/print 2003.

DOBSON, C. M.; ŠALI, A.; KARPLUS, M. Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 7, p. 868-893, 1998.

Double layer (interfacial) - Wikipedia, the free encyclopedia. 2015. ISSN 978-0-387-35402-6. Disponível em: < [https://en.wikipedia.org/wiki/Double_layer_\(interfacial\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Double_layer_(interfacial)) >. Acesso em: 3 de nov 2015.

DOVBESHKO, G. I. et al. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. **Talanta**, v. 53, n. 1, p. 233-246, 2000.

FABREGAT-SANTIAGO, F. et al. Characterization of nanostructured hybrid and organic solar cells by impedance spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 20, p. 9083-9118, 2011.

FAUSTINO, C. M. C.; CALADO, A. R. T.; GARCIA-RIO, L. Gemini Surfactant–Protein Interactions: Effect of pH, Temperature, and Surfactant Stereochemistry. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 9, p. 2508-2514, 2009/09/14 2009.

FELDMAN, Y. et al. Fractal-polarization correction in time domain dielectric spectroscopy. **Physical Review E**, v. 58, n. 6, p. 7561-7565, 12/01/ 1998.

FINKELSTEIN, A. V.; PTITSYN, O. B. **Protein Physics: A Course of Lectures**. Academic Press, 2002. ISBN 9780122567810.

FULAY, P.; LEE, J. K. **Electronic, Magnetic, and Optical Materials**. CRC Press, 2013. ISBN 9781439882603.

GALIANI, P. D. et al. Compósitos de borracha natural com polianilina. **Polímeros**, v. 17, p. 93-97, 2007.

GHOSH, S. et al. Stepwise Unfolding of Bovine and Human Serum Albumin by an Anionic Surfactant: An Investigation Using the Proton Transfer Probe Norharmane. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2014.

GHOSH, S. P. C., A. K. **Network Analysis & Synthesis**. McGraw-Hill Education (India) Pvt Limited, 2010. ISBN 9780070144781.

GIAVAZZI, F. et al. A fast and simple label-free immunoassay based on a smartphone. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, n. 0, p. 395-402, 8/15/ 2014.

GINDER, J. M.; EPSTEIN, A. J. Role of ring torsion angle in polyaniline: Electronic structure and defect states. **Physical Review B**, v. 41, n. 15, p. 10674-10685, 05/15/ 1990.

GOORMAGHTIGH, E.; RUYSSCHAERT, J.-M.; RAUSSENS, V. Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 8, p. 2946-2957, 4/15/ 2006.

GOSPODARCZYK, W.; SZUTKOWSKI, K.; KOZAK, M. Interaction of Bovine Serum Albumin (BSA) with Novel Gemini Surfactants Studied by Synchrotron Radiation Scattering (SR-SAXS), Circular Dichroism (CD), and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 29, p. 8652-8661, 2014/07/24 2014.

GROENNING, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. **J Chem Biol**, v. 3, n. 1, p. 1-18, Mar 2010.

GUO, F. et al. Preparation and characterization of magnetic composite microspheres using a free radical polymerization system consisting of DPE. **Polymer**, v. 50, n. 8, p. 1887-1894, 2009.

GUPTA, K.; JANA, P. C.; MEIKAP, A. K. Optical and electrical transport properties of polyaniline-silver nanocomposite. **Synthetic Metals**, v. 160, n. 13-14, p. 1566-1573, 7// 2010.

HABA, Y. et al. Polymerization of aniline in the presence of DBSA in an aqueous dispersion. **Synthetic Metals**, v. 106, n. 1, p. 59-66, 9/30/ 1999.

HAGEN, J. A. et al. Molecular Beam Deposition of DNA Nanometer Films. **Nano Letters**, v. 7, n. 1, p. 133-137, 2007/01/01 2006.

HAN, D. X. et al. Reversed micelle polymerization: a new route for the synthesis of DBSA-polyaniline nanoparticles. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 259, n. 1-3, p. 179-187, May 31 2005.

HAN, Y. et al. Facile Disassembly of Amyloid Fibrils Using Gemini Surfactant Micelles. **Langmuir**, v. 26, n. 3, p. 1583-1587, 2010/02/02 2009.

HE, C. et al. Disassembly of Amyloid Fibrils by Premicellar and Micellar Aggregates of a Tetrameric Cationic Surfactant in Aqueous Solution. **Langmuir**, v. 27, n. 8, p. 4551-4556, 2011/04/19 2011.

HERLAND, A.; INGANÄS, O. Conjugated Polymers as Optical Probes for Protein Interactions and Protein Conformations. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 28, n. 17, p. 1703-1713, 2007.

HOLM, N. K. et al. Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1774, n. 9, p. 1128-1138, 9// 2007.

HONG, J. W. et al. Conjugated-Polymer/DNA Interpolyelectrolyte Complexes for Accurate DNA Concentration Determination. **Advanced Materials**, v. 18, n. 7, p. 878-882, 2006.

HU, Y. et al. Conjugated self-doped polyaniline-DNA hybrid as trigger for highly sensitive reagentless and electrochemical self-signal amplifying DNA hybridization sensing. **Analyst**, v. 138, n. 4, p. 1067-1074, 2013.

HUANG, Y. F.; LIN, C. W. Introduction of methanol in the formation of polyaniline nanotubes in an acid-free aqueous solution through a self-curling process. **Polymer**, v. 50, n. 3, p. 775-782, 1/28/ 2009.

IJIRO, K.; OKAHATA, Y. A DNA-lipid complex soluble in organic solvents. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, n. 18, p. 1339-1341, 1992.

INOUYE, H.; KIRSCHNER, D. Alzheimer's β -Amyloid: Insights into Fibril Formation and Structure from Congo Red Binding. In: HARRIS, J. R. e FAHRENHOLZ, F. (Ed.). **Alzheimer's Disease**: Springer US, v.38, 2005. cap. 10, p.203-224. (Subcellular Biochemistry). ISBN 978-0-387-23225-6.

JAMESON, D. M. **Introduction to Fluorescence**. CRC Press, 2014. ISBN 9781439806050.

JANGIR, D. K. et al. FTIR and circular dichroism spectroscopic study of interaction of 5-fluorouracil with DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 105, n. 2, p. 143-148, Nov 3 2011.

JANGIR, D. K. et al. Carboplatin interaction with calf-thymus DNA: A FTIR spectroscopic approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 969, n. 1-3, p. 126-129, Apr 22 2010.

KANG, E.; NEOH, K.; TAN, K. Polyaniline: a polymer with many interesting intrinsic redox states. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 2, p. 277-324, 1998.

KANG, E. T. et al. Structural studies of poly(p-phenyleneamine) and its oxidation. **Macromolecules**, v. 23, n. 11, p. 2918-2926, 1990/05/01 1990.

KAO, K. C. **Dielectric Phenomena in Solids: With Emphasis on Physical Concepts of Electronic Processes**. Academic Press, 2004. ISBN 9780123965615.

KAR, S. **High Permittivity Gate Dielectric Materials**. Springer, 2013. ISBN 9783642365355.

KASSANOS, P. et al. Towards the development of an electrochemical biosensor for hCG β detection. **Physiological measurement**, v. 29, n. 6, p. S241, 2008.

KELLEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 73-85, 1// 2003.

KHANDELWAL, G.; BHYRAVABHOTLA, J. A Phenomenological Model for Predicting Melting Temperatures of DNA Sequences. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12433, 2010.

KIM, K. J.; TADOKORO, S. **Electroactive Polymers for Robotic Applications: Artificial Muscles and Sensors**. Springer, 2007. ISBN 9781846283727.

KLIMOV, V. I. **Semiconductor and Metal Nanocrystals: Synthesis and Electronic and Optical Properties**. Taylor & Francis, 2003. ISBN 9780824757830.

KOHN, P.; SCHRÖTER, K.; THURN-ALBRECHT, T. Interfacial Polarization and Field-Induced Orientation in Nanostructured Soft-Ion Conductors. **Physical review letters**, v. 102, n. 21, p. 216101, 2009.

KRATZ, R. F. **Molecular and Cell Biology For Dummies**. Wiley, 2009. ISBN 9780470531044.

KREMER, F.; SCHÖNHALS, A. **Broadband Dielectric Spectroscopy**. Springer Berlin Heidelberg, 2003. ISBN 9783540434078.

KUBO, R. Statistical-Mechanical Theory of Irreversible Processes. I. General Theory and Simple Applications to Magnetic and Conduction Problems. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 12, n. 6, p. 570-586, 1957/06/15 1957.

LEE, C. C. et al. A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. **Biophys J**, v. 92, n. 10, p. 3448-58, May 15 2007.

LEONES, R. et al. Characterization of flexible DNA films. **Electrochemistry Communications**, v. 22, p. 189-192, Aug 2012.

LIANG, L. et al. Electronic properties of DNA-surfactant complex and its application to DNA-based bio-organic field effect transistor memory. 2012. doi: **10.1117/12.932267**. p.846406-846406-9.

LIBERT, J. et al. From neutral oligoanilines to polyanilines: A theoretical investigation of the chain-length dependence of the electronic and optical properties. **Physical Review B**, v. 56, n. 14, p. 8638-8650, 10/01/ 1997.

LIMA, S. V. D.; OLIVEIRA, H. P. D. Determinação do ponto de névoa em surfactantes não iônicos por espectroscopia de impedância elétrica. **Química Nova**, v. 33, p. 1928-1932, 2010.

LOKSHIN, N. A. et al. Polyaniline-containing interpolymer complexes synthesized in low-polar organic media. **Langmuir**, v. 19, n. 18, p. 7564-7568, Sep 2 2003.

LU, R. et al. Probing the secondary structure of bovine serum albumin during heat-induced denaturation using mid-infrared fiberoptic sensors. **Analyst**, v. 140, n. 3, p. 765-770, 2015.

LVOVICH, V. F. **Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena**. Wiley, 2012. ISBN 9781118164105.

MACDONALD, D. D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 8-9, p. 1376-1388, 1/20/ 2006.

MACDONALD, J. R. Impedance spectroscopy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 20, n. 3, p. 289-305, 1992/05/01 1992.

MANNING, G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 11, n. 02, p. 179-246, 1978.

MEDINA LLAMAS, J. C. et al. Use of magnetic polyaniline/ γ -Fe₂O₃ nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. in press, 2014.

MEIER, C.; LIFINCEV, I.; WELLAND, M. E. Conducting Core-Shell Nanowires by Amyloid Nanofiber Templated Polymerization. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 2, p. 558-563, 2015/02/09 2015.

MELLOR, B. L. et al. Increased bandwidth for dielectric spectroscopy of proteins through electrode surface preparation. **Review of Scientific Instruments**, v. 83, n. 1, p. 015110, 2012.

MELLOR, B. L.; KELLIS, N. A.; MAZZEO, B. A. Note: Electrode polarization of Galinstan electrodes for liquid impedance spectroscopy. **Review of Scientific Instruments**, v. 82, n. 4, p. 046110, 2011.

MENARDO, C. et al. Investigation on the structure of polyaniline: ¹³C n.m.r. and titration studies. **Synthetic Metals**, v. 25, n. 4, p. 311-322, 9/15/ 1988.

MILITELLO, V. et al. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. **Biophysical Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 175-187, 2/1/ 2004.

MILITELLO, V.; VETRI, V.; LEONE, M. Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. **Biophysical Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 133-141, 8/1/ 2003.

MITCHELL, B. S. **An Introduction to Materials Engineering and Science for Chemical and Materials Engineers**. Wiley, 2004. ISBN 9780471473367.

Module 3: Basic Science, Biology Core. 2015. Disponível em: < http://www.abcte.org/files/previews/biology/s3_p2.html >. Acesso em: 3 de nov. 2015.

MOHAMED, H. D. A. et al. Magnetic and conductive magnetite nanowires by DNA-templating. **Nanoscale**, v. 4, n. 19, p. 5936-5945, 2012.

MOLITON, A. **Applied Electromagnetism and Materials**. Springer New York, 2007. ISBN 9780387380643.

MURAYAMA, K.; TOMIDA, M. Heat-Induced Secondary Structure and Conformation Change of Bovine Serum Albumin Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11526-11532, 2004/09/01 2004.

NAKAJIMA, T. et al. Study on the interconversion of unit structures in polyaniline by x-ray photoelectron spectroscopy. **Macromolecules**, v. 22, n. 6, p. 2644-2648, 1989/06/01 1989.

NAVEA, S. et al. Chemometric tools for classification and elucidation of protein secondary structure from infrared and circular dichroism spectroscopic measurements. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 63, n. 3, p. 527-541, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W.H. Freeman, 2013. ISBN 9781464109621.

NEOH, K. G.; KANG, E. T.; TAN, K. L. Spectroscopic studies of protonation, oxidation and light irradiation of polyaniline solutions. **Polymer**, v. 33, n. 11, p. 2292-2298, // 1992.

NILSSON, K. P. R. et al. Conjugated Polyelectrolytes: Conformation-Sensitive Optical Probes for Detection of Amyloid Fibril Formation†. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3718-3724, 2005/03/01 2005.

NILSSON, M. R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. **Methods**, v. 34, n. 1, p. 151-160, 9// 2004.

O'DONNELL, M. M. C. J. A. D. M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Artmed Editora, 2012. ISBN 9788536327419.

OH, T. I. et al. Validation of a multi-frequency electrical impedance tomography (mfEIT) system KHU Mark1: impedance spectroscopy and time-difference imaging. **Physiological measurement**, v. 29, n. 3, p. 295, 2008.

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**. Wiley, 2011. ISBN 9781118209943.

OUAMEUR, A. A.; TAJMIR-RIAAHI, H.-A. Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt (III) hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 42041-42054, 2004.

OUCHEN, F. et al. Modified processing techniques of a DNA biopolymer for enhanced performance in photonics applications. **Applied Physics Letters**, v. 101, n. 15, Oct 8 2012.

PACE, C. N.; GRIMSLEY, G. R.; SCHOLTZ, J. M. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13285-13289, 2009.

PAUL BEN, I. et al. Electrode polarization in dielectric measurements: a review. **Measurement Science and Technology**, v. 24, n. 10, p. 102001, 2013.

PERELMAN, Y.; GINOSAR, R. **The NeuroProcessor: An Integrated Interface to Biological Neural Networks**. Springer Netherlands, 2008. ISBN 9781402087264.

PETROVA, J. N. et al. Fully Doped Oligomers of Emeraldine Salt: Polaronic versus Bipolaronic Configuration. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 14, p. 3765-3776, Apr 14 2011.

PETSKO, G. A.; RINGE, D. **Protein Structure and Function**. New Science Press, 2004. ISBN 9781405119221.

PING, Z. et al. In situ Fourier transform infrared attenuated total reflection (FTIR-ATR) spectroscopic investigations on the base—acid transitions of different forms of polyaniline. Base—acid transition in the leucoemeraldine form. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 420, n. 1–2, p. 301-306, 1/15/1997.

PORSCH, B. et al. Molecular Weight and Polydispersity of Calf-Thymus DNA: Static Light-Scattering and Size-Exclusion Chromatography with Dual Detection. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 11, p. 3148-3150, 2009/11/09 2009.

PRATIM BOSE, P. et al. Effects of Congo Red on A β 1–40 Fibril Formation Process and Morphology. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 315-324, 2010/04/21 2010.

PYSHKINA, O.; SERGEYEV, V. Complexes of nucleic acids with oppositely charged amphiphilic ions in aqueous and organic solutions. **Polymer Science Series C**, v. 54, n. 1, p. 48-56, 2012.

PYSHKINA, O. A.; SERGEYEV, V. G. Complexes of nucleic acids with oppositely charged amphiphilic ions in aqueous and organic solutions. **Polymer Science Series C**, v. 54, n. 1, p. 48-56, 2012/09/01 2012.

RAMBARAN, R. N.; SERPELL, L. C. Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. **Prion**, v. 2, n. 3, p. 112-7, Jul-Sep 2008.

REED, R. G. et al. Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Conformation and ligand binding. **Biochemistry**, v. 14, n. 21, p. 4578-4583, 1975/10/01 1975.

RODRIGO, M. A. M. et al. HIV Biosensors - The Potential of the Electrochemical Way. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 7, p. 3449-3457, Jul 2014.

ROYER, C. A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 5, p. 1769-1784, 2006/05/01 2006.

SAHA, S.; DEEP, S. Switch in the Aggregation Pathway of Bovine Serum Albumin Mediated by Electrostatic Interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 31, p. 9155-9166, 2014/08/07 2014.

SAHARAN, R.; DHAWAN, S. K. **Effect of oxidant concentration on the co-polymerization of m-aminobenzene sulfonic acid and aniline co-polymer: synthesis and characterization.** 2014. ISBN 2321 – 4635|escape}.

SANABRIA, H.; MILLER, J. H. Relaxation processes due to the electrode-electrolyte interface in ionic solutions. **Physical Review E**, v. 74, n. 5, p. 051505, 11/20/ 2006.

SANCHES, E. A. et al. Structural Characterization of Emeraldine-Salt Polyaniline/Gold Nanoparticles Complexes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 7, 2011.

SANTOS, R. F. et al. Visible luminescence in polyaniline/(gold nanoparticle) composites. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2013.

SANTOS, S. F. et al. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 262, n. 2, p. 400-408, 6/15/ 2003.

SARKAR, D.; MANDAL, M. Static and dynamic magnetic characterization of DNA-templated chain-like magnetite nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 5, p. 3227-3234, 2012.

SELKOE, D. J. Folding proteins in fatal ways. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 900-904, 12/18/print 2003.

SERGEEV, V. G. et al. Synthesis of a conducting interpolymer polyaniline-DNA complex. **Doklady Physical Chemistry**, v. 390, n. 1-3, p. 118-121, May 2003.

SHIMANO, J. Y.; MACDIARMID, A. G. Polyaniline, a dynamic block copolymer: key to attaining its intrinsic conductivity? **Synthetic Metals**, v. 123, n. 2, p. 251-262, 9/4/ 2001.

SNEPPEN, K.; ZOCCHI, G. **Physics in Molecular Biology**. Cambridge University Press, 2005. ISBN 9780521844192.

STAVELEY, B. E. BIOL2060: DNA, Chromosomes & the Nucleus. 2015. Disponível em: < <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/CB18.html> >. Acesso em: 29 de out. 2015.

SUBRAMANIAN, S.; PADIYAN, D. P. Effect of structural, electrical and optical properties of electrodeposited bismuth selenide thin films in polyaniline aqueous medium. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, n. 2-3, p. 392-398, 2/15/ 2008.

SUN, Y. et al. Controllable preparation of magnetic polymer microspheres with different morphologies by miniemulsion polymerization. **Journal of colloid and interface science**, v. 308, n. 2, p. 332-336, 2007.

TAHERI-KAFRANI, A.; BORDBAR, A.-K. Isothermal titration calorimetric study on the interaction of apo-human transferrin with sodium n-dodecyl sulfate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2123-2127, 2014/03/01 2014.

TANG, J. et al. Infrared spectra of soluble polyaniline. **Synthetic Metals**, v. 24, n. 3, p. 231-238, 1988.

TARDIOLI, S. et al. Interaction of bovine serum albumin with gemini surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 347, n. 1, p. 96-101, 7/1/ 2010.

TRCHOVÁ, M.; STEJSKAL, J. Polyaniline: The infrared spectroscopy of conducting polymer nanotubes (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 10, p. 1803-1817, 2011.

TSEKENIS, G. et al. Label-less immunosensor assay for myelin basic protein based upon an ac impedance protocol. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 6, p. 2058-2062, 2008.

TSEKENIS, G. et al. Detection of fluoroquinolone antibiotics in milk via a labelless immunoassay based upon an alternating current impedance protocol. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9233-9239, 2008.

WANG, X.; LI, Y.; ZHONG, C. Amyloid-directed assembly of nanostructures and functional devices for bionanoelectronics. **Journal of Materials Chemistry B**, 2015a.

_____. Amyloid-directed assembly of nanostructures and functional devices for bionanoelectronics. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 25, p. 4953-4958, 2015b.

WANG, X. et al. Chemically Modified Graphene and Sulfonic Acid-Doped Polyaniline Nanofiber Composites: Preparation Routes, Characterization, and Comparison of Direct DNA Detection. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 17, p. 9076-9084, 2015/04/30 2015.

WATSON, S. M. et al. Electrically conductive magnetic nanowires using an electrochemical DNA-templating route. **Nanoscale**, v. 5, n. 12, p. 5349-5359, 2013.

Web of Science. 2015. Disponível em: < http://apps-webofknowledge.ez21.periodicos.capes.gov.br/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=4FxnfgTaJI98jtc9P5A&page=1&cr_pgid=1&viewType=summary&colName=WOS >. Acesso em: 2 de nov. 2015.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.

WILSON, M. R.; YERBURY, J. J.; POON, S. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. **Molecular BioSystems**, v. 4, n. 1, p. 42-52, 2008.

WU, C.; SCOTT, J.; SHEA, J. E. Binding of Congo red to amyloid protofibrils of the Alzheimer A β (9-40) peptide probed by molecular dynamics simulations. **Biophys J**, v. 103, n. 3, p. 550-7, Aug 8 2012.

WÜTHRICH, K. et al. Protein secondary structure determination by NMR Application with recombinant human cyclophilin. **FEBS Letters**, v. 285, n. 2, p. 237-247, 7// 1991.

YOON, S.-B.; YOON, E.-H.; KIM, K.-B. Electrochemical properties of leucoemeraldine, emeraldine, and pernigraniline forms of polyaniline/multi-wall carbon nanotube nanocomposites for supercapacitor applications. **Journal of Power Sources**, v. 196, n. 24, p. 10791-10797, Dec 15 2011.

YU, F. et al. Electrode polarization correction in time domain dielectric spectroscopy. **Measurement Science and Technology**, v. 12, n. 8, p. 1355, 2001.

YU, S. et al. New hydroxyapatite monolithic column for DNA extraction and its application in the purification of *Bacillus subtilis* crude lysate. **Journal of Chromatography A**, v. 1183, n. 1-2, p. 29-37, 3/7/ 2008.

YUAN, X. Z. R. et al. **Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells: Fundamentals and Applications**. Springer London, 2009. ISBN 9781848828469.

ZENG, X. R.; KO, T. M. Structures and properties of chemically reduced polyanilines. **Polymer**, v. 39, n. 5, p. 1187-1195, 1998.

ZHANG, L. et al. Polymeric Acid Doped Polyaniline Nanotubes for Oligonucleotide Sensors. **Electroanalysis**, v. 19, n. 7-8, p. 870-875, 2007.

ZHAO, Y.; WANG, M.; YAO, J. Characterization of Colloidal Particles Using Electrical Impedance Spectroscopy in Two-electrode System with Carbon Probe. **Procedia Engineering**, v. 102, n. 0, p. 322-328, // 2015.

ZHOU, T. et al. Interactions of bovine serum albumin with cationic imidazolium and quaternary ammonium gemini surfactants: Effects of surfactant architecture. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 389, n. 1, p. 175-181, 1/1/ 2013.

Anexo

Produção científica decorrente da bolsa de doutorado:

Artigos publicados:

- **LIMA, S. V.**, OLIVEIRA, H. P. de, ANDRADE, C. A. S., MELO, C. P. A dielectric study of interpolymer complexes of polyaniline and DNA. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects (Print)*. , v.471, p.139 - 147, 2015.
- Silva, R. R., **LIMA, S. V.**, SILVA, G. H.C, Oliveira, Helinando Pequeno de, OLIVEIRA, M. D. L., ANDRADE, C. A. S. Dielectric behavior of alginate-based hydrogel containing neomycin-loaded lipid nanovesicles under influence of electrical potentials. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*. , 2016.

Congressos:

- **LIMA, S. V.**, MELO, C. P., OLIVEIRA, H. P. Dielectric Study of Protein Unfolding Induced by Amphiphilic Molecules In: XXXVII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 2014, Costa do Sauípe. **XXXVII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada.** , 2014.
- **LIMA, S. V.**, OLIVEIRA, H. P., MELO, C. P. A Dielectric Investigation of Polyaniline/DNA Complexes In: XXXVI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada. **XXXVI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada.** , 2013.
- **LIMA, S. V.**, MELO, C. P., OLIVEIRA, H. P. Electrical impedance spectroscopic investigation of polyaniline/DNA interactions In: XXXI ENCONTRO DE FÍSICOS DO NORTE E NORDESTE, 2013, Campina Grande. **XXXI ENCONTRO DE FÍSICOS DO NORTE E NORDESTE.** , 2013.
- **LIMA, S. V.**, MELO, C. P., ANDRADE, C. A. S., OLIVEIRA, H. P. Use of electrical impedance spectroscopy to investigate conformational changes of proteins In: XXX Encontro de Físicos do Norte e Nordeste, Salvador. **XXX Encontro de Físicos do**

Norte e Nordeste. , 2012.