



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

WINNIE QUEIROZ BRANDÃO

**MEMBRANAS COMPÓSITAS DE POLIESTIRENO/POLIANILINA
PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DE MEIOS AQUOSOS**

Recife
2016

WINNIE QUEIROZ BRANDÃO

**MEMBRANAS COMPÓSITAS DE POLIESTIRENO/POLIANILINA
PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DE MEIOS AQUOSOS**

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

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

Recife
2016

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

B817m Brandão, Winnie Queiroz.
Membranas compósitas de poliestireno/polianilina para a extração de DNA de meios aquosos / Winnie Queiroz Brandão. – 2016.
127 f.: fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Física. Recife, 2016.
Inclui referências e apêndice.

1. Polímeros condutores. 2. DNA . I. Melo, Celso Pinto de (Orientador). II. Título.

541.2254

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2016-47

WINNIE QUEIROZ BRANDÃO

**MEMBRANAS COMPÓSITAS DE POLIESTIRENO/POLIANILINA
PARA A EXTRAÇÃO DE DNA DE MEIOS AQUOSOS**

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

Aprovada em: 29/07/2016.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes
Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka
Examinador Externo
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – Campus de Araraquara

*Dedico este trabalho aos meus pais e as minhas irmãs,
por todo carinho e apoio.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por sempre estar comigo.

A minha mãe, meu pai, minhas irmãs e meu tio Luiz Alberto, por todo amor, apoio, incentivo e carinho, em todos os momentos.

Ao professor Celso, pela oportunidade, paciência, conselhos, dedicação e confiança.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Física da UFPE que contribuíram para a minha formação.

A Alicia Elizabeth, Juan Carlos e Jarib, por todo apoio, ensinamentos, dedicação, paciência e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Polímeros Não-Convencionais, Rubênia, Bruna, Graciela, Filipe, Romário, Yuri, Hugo, Macário, Sandro, Edson e Rodrigo por todos os ensinamentos e discussões, cada um de vocês teve um papel importante em minha formação.

Aos amigos da casa dos físicos, Edwin, Juan Marcos, Johan e Johanna, pela paciência, ensinamentos, apoio e amizade.

A Márcio, Erick, Daniel, Rennan, Igor, Isaac e Vinicius por todo apoio, amizade, conselhos e ensinamentos.

As minhas amigas do pensionato Laís e Lilian pela amizade, apoio e conselhos.

Ao pessoal do Departamento de Física da UFPE, Alexis, Yoandris, Leonardo, Alejo, Oscar Bravo, Oscar, Lucas, Ari, Igor, Bruna, Alisson, André, Vitor, Lenin, Paola, Joas, Wellington Martins, Sandra, Nicolas, Francisco e Wilmer, por todo apoio e auxílio ao longo da minha formação.

Aos amigos Flamel, Nádia, Heritier e Lutuima, pelos conselhos e incentivo.

Aos amigos Mirco Ragni, Ana Carla, Vera e Carlos Alberto por todo incentivo e apoio.

A Jaiver, Sindy, Mariana e Elizane pelo apoio e amizade.

Aos amigos do CIEAC e SENAI, que mesmo longe, sempre me apoiaram em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Física da UFPE, Hilda, Aleksandra e Ailton,

AGRADECIMENTOS

por toda a dedicação, em resolver todas as burocracias.

Por fim, agradeço à FACEPE pelo apoio financeiro.

*“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo.”*

—NELSON MANDELA

Resumo

A extração de DNA a partir de amostras biológicas é um passo necessário em quase todos os processos biotecnológicos. No entanto, não apenas as amostras contendo DNA são geralmente distintas na origem, como não existe um único processo comum para estes métodos de extração, ou mesmo um único material que satisfaça todos os requisitos necessários para realizar estas tarefas. Como consequência, o desenvolvimento de novos materiais ou métodos para a melhoria dos protocolos de extração de DNA, em termos de rendimento, pureza, tempo e custo, continua sendo de grande interesse. Neste trabalho, descrevemos a preparação de um novo tipo de membrana compósita de poliestireno/polianilina (PS/PANI) que não só exhibe altos níveis de captura de cadeias de DNA a partir de soluções aquosas, mas também permite essa liberação de maneira simples e eficiente. A membrana compósita consiste de fibras de PS produzidas pela técnica de eletrofição e modificadas com nanogrãos de PANI depositados através de uma polimerização química *in situ*. As membranas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), medidas de ângulo de contato, espectroscopia UV-Vis e por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Utilizamos solução aquosa de DNA de esperma de salmão como um sistema modelo para examinar a capacidade de adsorção destas membranas para moléculas de ácido nucleico. Em experimentos realizados no modo batelada, encontramos uma capacidade máxima de adsorção de 153,8 mg de DNA por grama de PANI, com o limite de saturação sendo alcançado em apenas 9 min. Além disso, demonstramos que é possível conseguir a liberação completa do DNA adsorvido por simples alteração do pH do meio aquoso. Os processos de adsorção e dessorção foram acompanhados por imagens de fluorescência. Realizamos também experimentos de adsorção de DNA através da adaptação da membrana a uma coluna de centrifugação. Os resultados correspondentes indicam que nessa configuração experimental as membranas compósitas de PS/PANI se mostram um material bastante promissor para a purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas.

Palavras-chave: Eletrofição. Membranas de polianilina. Recuperação do DNA.

Abstract

Extraction of nucleic acids from biological samples is a necessary step in almost all biotechnological procedures. However, whereas DNA-containing samples are usually distinct in origin and no single common methodology exists for these extraction methods, there is no single material that satisfies the necessary requirements to carry out these tasks. Consequently, the development of new materials or methods to the improvement of DNA extraction protocols (in terms of yield, purity, time, and cost) continues to be of great interest. In this work, we describe the preparation of a novel type of polyaniline/polystyrene (PANI/PS) membrane that not only exhibits high levels of capture of DNA strands dissolved in aqueous solutions but also allows for their simple and efficient posterior release. The composite membrane consists of electrospun PS fibers modified with deposited PANI nanograins through an in situ chemical polymerization. The membranes were characterized by scanning electron microscopy (SEM), contact angle, UV-Vis spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). We have used aqueous solution sodium salt of Salmon Sperm DNA as a model system to examine the adsorption capacity of these membranes for nucleic acid molecules. In batch-mode experiments, we have found a maximum adsorption capacity of 153.8 mg of DNA per gram of PANI, with the saturation limit being reached within only 9 min. In addition, we have demonstrated that it is possible to achieve the complete release of the adsorbed DNA by simple changes on the pH of the aqueous medium. The adsorption and desorption procedures were followed by fluorescence imaging. We also performed DNA adsorption experiments by adapting the composite membrane to a spin column. Under this experimental setup, the PANI/PS composite membranes appear as promising material for the efficient purification of nucleic acids and other valuable biomolecules.

Keywords: Electrospinning. Polyaniline membranes. DNA retrieval.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- Ab** - Absorbância
- APS** - Do inglês, ammonium persulfate (persulfato de amônio)
- C_e** - Concentração no equilíbrio
- C_{Des}** - Concentração de dessorção
- C_f** - Concentração final
- C_i** - Concentração inicial
- C_t** - Concentração em função do tempo
- CTAB** - Do inglês, Cetyl trimethylammonium bromide (brometo de cetil-trimetilamônio)
- DNA** - Do inglês, Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
- FTA** - Do inglês, Flinders Technology Associates
- FTIR** - Do inglês, Fourier transform infrared spectroscopy (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)
- KBr** - Brometo de Potássio
- m** - Massa
- MEV** - Microscopia eletrônica de varredura
- MSP** - Mesoporos
- MNC** - Do inglês, Magnetic Nanocomposite (Nanocompósito Magnético)
- PCR** - Do inglês, Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
- PCs** - Polímeros condutores
- PS** - Poliestireno
- PANI** - Polianilina
- RNA** - Do inglês, ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
- SDS** - Do inglês, sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
- Tr** - Transmitância
- q_e** - Capacidade de adsorção no equilíbrio
- q_t** - Capacidade de adsorção em função do tempo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

R² - Coeficiente de correlação

UV-Vis - Ultravioleta-visível

V - Volume

Lista de Figuras

2.1	Estruturas de alguns monômeros e de seus respectivos polímeros	24
2.2	Exemplo da polimerização por adição: produção do poliestireno.	26
2.3	Exemplo de uma reação de condensação. Formação do PET e eliminação da água.	26
2.4	Representação da estrutura do nucleotídeo.	27
2.5	Cadeia simples do DNA.	28
2.6	Representação da cadeia dupla helicoidal do DNA e da estrutura química dos nucleotídeos.	29
2.7	Desnaturação da dupla hélice do DNA.	29
2.8	Estrutura química de alguns polímeros condutores.	30
2.9	Representação da banda de condução e valência para materiais isolantes, semicondutores e condutores.	32
2.10	Condutividade de alguns materiais e compostos metálicos, semicondutores e isolantes comparadas com a dos polímeros condutores.	32
2.11	Uma possível estrutura do trans-poliacetileno com a presença de um sóliton.	33
2.12	Configuração de banda para um sóliton positivo (a), neutro (b) e negativo (c), com spin 0, 1/2 e 0, respectivamente.	34
2.13	Formação dos polárons e bipólarons com cargas positiva.	35
2.14	Estrutura geral da polianilina.	35
2.15	Estados de oxidação da polianilina.	36
2.16	Formação da polianilina dopada.	37
2.17	Algumas das áreas de aplicação de materiais preparados com a técnica de eletrofiação.	38
2.18	Configuração dos primeiros sistemas para preparação de fibras a partir de força elétrica.	39
2.19	Configuração horizontal para o processo de eletrofiação e formação das fibras.	41

LISTA DE FIGURAS

2.20	Fibras de poliestireno eletrofiadas em diferentes concentrações; 10 % (1), 15 % (2), 20 % (3).	42
3.1	Componentes de um processo de adsorção.	45
3.2	Modelo de monocamada de Langmuir. Os pontos pretos representam os sítios de adsorção e as elipses brancas as moléculas adsorvidas.	47
3.3	Modelo de Freundlich que descreve a adsorção em uma superfície heterogênea.	49
3.4	Extração de DNA por fase líquido-líquido.	53
3.5	Extração de DNA por fase sólida. Etapas do processo (1), DNA ligado ao material (2)	55
3.6	Extração de DNA por fase sólida, utilizando partículas magnéticas modificadas.	56
3.7	Cuba de eletroforese.	57
3.8	Reação em cadeia polimerase.	59
4.1	Componentes de um microscópio eletrônico de varredura.	61
4.2	Representação de superfícies hidrofílica, hidrofóbica e superhidrofóbica.	62
4.3	Moléculas de um líquido interagindo entre si.	63
4.4	Esquema do equipamento medidor de ângulo de contato.	63
4.5	Relação de polímeros de acordo com o grau de polaridade.	64
4.6	Estrutura do poliestireno após do tratamento a plasma: quebra das ligações apolares do poliestireno possibilita a adição de grupos funcionais polares.	65
4.7	Possíveis transições eletrônicas.	66
4.8	Espectro eletromagnético.	66
4.9	Esquema de distintos espectrofotômetros. (1) feixe único e (2) feixe duplo.	67
4.10	Espectro de absorção da PANI em três diferentes estados de oxidação.	68
4.11	Componentes de um espectrômetro FTIR (1) e o interferômetro de Michelson (2).	70
5.1	Equipamentos utilizados para o processo de eletrofição.	72
5.2	Em (a) mostramos a estufa utilizada para o tratamento térmico e em (b) as membranas devidamente padronizadas com dimensão 3 cm x 3 cm após o tratamento.	73
5.3	Etapas para o revestimento da membrana de PS.	74

LISTA DE FIGURAS

5.4	Amostras fixadas em um suporte. Em 1 e 2 temos a membrana de PS original e com tratamento térmico, respectivamente, em 3 com tratamento a plasma e em 4 a membrana revestida com polianilina.	75
5.5	Foto do equipamento usado para estimar o ângulo de contato.	75
5.6	Foto do espectrofotômetro utilizado para caracterização da membrana de PS/PANI por espectroscopia UV-Vis, onde também é mostrado o compartimento interno (porta-amostras).	76
5.7	Preparação das pastilhas de KBr-amostras e as pastilhas prontas.	77
5.8	Foto do instrumento utilizado para a caracterização da membrana de PS e PS/PANI por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. No detalhe a direita, é mostrado o compartimento interno (porta-amostras).	77
5.9	Etapas seguidas nos testes de adsorção.	79
5.10	Etapas dos testes de dessorção.	80
5.11	Estrutura da coluna de centrifugação (1) e etapas dos testes de adsorção e dessorção (2)	81
6.1	Membrana de PS após 4 horas do processo de eletrofação, depositada sobre o coletor.	82
6.2	Membrana de PS antes e depois do tratamento térmico - mecânico.	83
6.3	Testes realizados para a escolha do protocolo a ser utilizado no revestimento da PANI nas membranas de PS. (1) membrana tratada a plasma e (2) sem tratamento a plasma.	84
6.4	Membranas compósitas de PS/PANI utilizadas no trabalho.	84
6.5	Micrografia das fibras de PS após o processo de eletrofação em duas distintas ampliações: 15000 x (a) e 50000 x (b).	85
6.6	Micrografia das fibras de PS após o tratamento térmico - mecânico em duas distintas ampliações: 15000 x (a) e 60000 x (b).	86
6.7	Micrografia das fibras de PS após o tratamento a plasma em duas distintas ampliações: 15000 x (a) e 60000 x (b).	86
6.8	Micrografia das fibras de PS após o revestimento com PANI nanoestruturada em duas distintas ampliações: 15000 x (b) e 60000 x (c).	86
6.9	Medida de ângulo de contato mostrando a hidrofobicidades das membranas de PS após a eletrofação (a) e tratada termicamente e mecanicamente (b).	87

LISTA DE FIGURAS

6.10	Medida de ângulo de contato mostrando o caráter hidrofílico das membranas de PS tratada a plasma (a) e revestida com PANI (b).	88
6.11	Caracterização por espectroscopia UV-Vis para a membrana de PS/PANI. . . .	88
6.12	Caracterização por FTIR das membranas de PS (a) e PS/PANI (b).	89
6.13	Teste de adsorção do DNA com a membrana de PS tratada a plasma.	90
6.14	Prova do conceito para mostrar a capacidade da membrana de PS/PANI em capturar DNA de espermatozóide de salmão, através da diminuição do pico de absorvância ($\lambda = 260nm$).	91
6.15	Efeito do tempo de interação de DNA adsorvido pelas membranas PS/PANI para as concentrações: (a) 5 mg/L, (b) 11 mg/L, (c) 22 mg/L, (d) 49 mg/L, (e) 79 mg/L, (f) 111 mg/L e (g) 168 mg/L.	92
6.16	Efeito da concentração inicial de DNA em relação a porcentagem de adsorção e de q_e da membrana de PS/PANI.	93
6.17	Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA em membranas de PS/PANI utilizando os modelos de isoterma de Langmuir (a) e Freundlich (b). . .	94
6.18	Ajuste dos dados experimentais de acordo com os modelos de isotermas de Langmuir e Freundlich para a adsorção do DNA em membranas de PS/PANI. . . .	95
6.19	Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção do DNA em membranas de PS/PANI usando os modelos de pseudo primeira ordem (a), pseudo segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).	96
6.20	Efeito do tempo de interação sobre a capacidade de adsorção de DNA para as membranas de PS/PANI e ajuste de acordo com o modelo pseudo-segunda ordem (1). Troca iônica do contra-íons da PANI com os grupos fosfatos do DNA (2). . .	97
6.21	Espectro UV-Vis da solução de DNA antes (C_i) e após (C_f) a interação com a membrana de PS/PANI e o espectro da solução de DNA após o processo de dessorção utilizando uma solução tampão fosfato/fosfato - pH 7,6 (a), Hidróxido de sódio - pH 11,7 (b), SDS pH 6 (c) e SDS pH 6 + hidróxido de sódio (d). . . .	99
6.22	Imagens de fluorescência da membrana PS/PANI antes da interação com o DNA ou corante (a), membrana molhada com a solução de ativação e corante (b), após adsorção do DNA marcado (c), e após a dessorção (d).	102

LISTA DE FIGURAS

6.23	Espectro UV-Vis da solução de DNA antes (C_i) e depois (C_f) da interação com membranas de PS/PANI usando uma coluna de centrifugação e espectro de solução de DNA após o processo de dessorção (C_{Des}).	103
A.1	Sequência de passos para a execução da técnica de eletroforese. (1) materiais utilizados no processo, (2) a preparação do gel, (3) adição do corante Diamond, (4) bandeja acoplada com o pente para o suporte do gel, (5) preparação da amostras, (6) amostras adicionadas ao poço e, finalmente, em (7) a cuba pronta para a execução da técnica.	126
A.2	Eletroforese do DNA de esperma de salmão antes (1) e depois da interação com a membrana de PS/PANI (2).	127

Lista de Tabelas

6.1	Parâmetros de isothermas de Langmuir e Freundlich para adsorção de DNA em membranas de PS/PANI.	94
6.2	Parâmetros de cinética de adsorção do DNA em membranas de PS/PANI.	97
6.3	Comparação da membrana de PS/PANI com outros adsorventes de DNA. .	100

Sumário

1	Introdução	21
2	Fundamentação Teórica	24
2.1	Conceitos básicos sobre polímeros	24
2.1.1	Classificação	25
2.1.1.1	Quanto à origem: polímeros sintéticos ou naturais	25
2.1.1.2	Quanto à preparação: polimerização por adição ou condensação	25
2.2	Ácido nucleico: DNA	27
2.3	A classe dos polímeros condutores	30
2.3.1	Mecanismo de condução dos polímeros	31
2.3.2	Polianilina: formação, propriedades e características	35
2.4	Processamento de polímeros	38
2.4.1	Técnica de eletrofição	38
2.4.1.1	Um pouco da história da eletrofição	39
2.4.1.2	Princípio de funcionamento	40
2.4.1.3	Parâmetros fundamentais para o processo de eletrofição	41
2.4.1.4	Modificação da superfície das membranas	44
3	Métodos de extração de DNA	45
3.1	Estudo sobre adsorção	45
3.2	Isotermas de adsorção	46
3.2.1	Isoterma de Langmuir	47
3.2.2	Isoterma de Freundlich	48
3.3	Cinética de adsorção	50
3.3.1	Pseudo primeira ordem	50
3.3.2	Pseudo segunda ordem	50
3.3.3	Morris-Weber	51

SUMÁRIO

3.4	Métodos de extração e purificação de DNA	52
3.4.1	Extração por fase líquido - líquido	52
3.4.2	Extração e purificação por fase sólida	53
3.5	Eletroforese	56
3.6	Aplicação do DNA	58
3.6.1	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	58
4	Fundamentos das técnicas de caracterização	60
4.1	Microscopia eletrônica de varredura	60
4.2	Ângulo de contato	61
4.2.1	Tratamento a plasma	64
4.3	Espectroscopia Ultravioleta-Visível	65
4.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	69
5	Materiais e Métodos	71
5.1	Materiais	71
5.2	Preparação das membranas de poliestireno	71
5.3	Revestimento com polianilina	73
5.4	Métodos de caracterização	74
5.4.1	Microscopia eletrônica de varredura	74
5.4.2	Ângulo de contato	75
5.4.3	Espectroscopia UV-VIS	75
5.4.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	76
5.5	Aplicação: estudo sobre adsorção de DNA	78
5.5.1	Experimento de tempo de interação e concentração inicial de DNA	78
5.6	Experimentos de dessorção	79
5.7	Fluorescência	80
5.8	Separação de DNA por coluna de centrifugação	80
6	Resultados e Discussões	82
6.1	Produção das membranas de poliestireno	82
6.2	Revestimento das membranas de poliestireno com polianilina	83
6.3	Caracterização das membranas	85
6.3.1	Microscopia eletrônica de varredura	85
6.3.2	Ângulo de contato	87

SUMÁRIO

6.3.3	Espectroscopia UV-VIS	88
6.3.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	89
6.4	Estudo sobre adsorção de DNA	90
6.4.1	Efeito do tempo de interação e da concentração inicial de DNA	91
6.4.2	Isotermas de adsorção	93
6.4.2.1	Modelos de Langmuir e Freundlich	93
6.4.3	Cinética de adsorção	95
6.5	Experimento de dessorção	98
6.6	Comparação com outros trabalhos encontrados na literatura	99
6.7	Experimento de fluorescência	101
6.8	Processo de separação de DNA por centrifugação	102
	Conclusões e Perspectivas	104
	Referências	108
	A Apêndice	125
A.1	Experimento de eletroforese em gel de agarose	125
A.1.1	Resultado Eletroforese	127

Introdução

Moléculas de DNA desempenham papel fundamental no controle e codificação das instruções para todos os processos que sustentam a vida e na transmissão das informações hereditárias para a próxima geração de um dado organismo. Nas últimas décadas, a capacidade de manipular e analisar sequências de DNA alcançou enorme interesse tanto científico quanto social em distintas áreas e aplicações, tais como genética [1], farmacologia [2], diagnóstico clínico [3] e medicina forense [4]. Em todos eles, um procedimento fundamental é o desenvolvimento de métodos aprimorados para a extração e purificação das cadeias de DNA.

Atualmente, a separação das moléculas de DNA a partir de uma dada amostra biológica é feita através da utilização de duas metodologias distintas, que são baseadas em extrações por fase líquido-líquido ou por fase sólida [5]. O primeiro método implica no uso de diversos solventes orgânicos, em sucessivos processos de precipitação e centrifugação para extrair o DNA, como na técnica amplamente adotada de extração por fenol-clorofórmio, e no procedimento de CTAB [6, 7]. Enquanto isso, os métodos de extração por fase sólida envolvem a utilização de grânulos [8], colunas [9], monólitos compostos por sílica [10], celulose, ou resinas para adsorver o DNA. Embora essas metodologias sejam regularmente utilizadas, elas não estão livres de algumas desvantagens, como protocolos de extração complicados, demorados e que demandam trabalho intensivo, com o risco de contaminação da amostra, e o uso de produtos químicos tóxicos (em especial, para o caso de métodos líquido-líquido) [11]. Mais recentemente, novos materiais estruturados em nanoescala com melhores afinidades com as cadeias de DNA passaram a ser desenvolvidos. Estes novos materiais podem melhorar o rendimento e a pureza do material obtido, ao mesmo tempo em que eliminam a necessidade de utilizar produtos químicos tóxicos, levando, portanto, a uma redução do custo dos métodos de extração de fase sólida. Um

bom exemplo destes novos materiais usados para a extração e purificação de DNA são os nanocompósitos magnéticos (MNCs). Tipicamente, o processo correspondente consiste em várias etapas, em que primeiramente os MNCs são colocados em um meio heterogêneo que contém o DNA alvo, cujas condições físico-químicas (pH, força iônica) são em seguida ajustadas para promover a interação entre o DNA e o MNC. Subsequentemente, o complexo MNC-DNA recém formado pode ser espacialmente confinado pela aplicação de um campo magnético externo. Uma vez recolhido, o complexo é então submetido a passos sucessivos de purificação. Finalmente, as cadeias de DNA são desorvidas do MNC, e posteriormente analisadas [12]. Normalmente, esses adsorventes magnéticos são produzidos em dois passos separados, em que inicialmente as nanopartículas magnéticas são sintetizadas, sendo em seguida sua superfície revestida por um material com elevada afinidade pelas cadeias de DNA (tal como de sílica ou um polímero orgânico) [11, 13]. Outra abordagem para a extração do DNA corresponde à utilização de matrizes sólidas compostas por membranas. Alguns exemplos desses materiais são a miniprep Sigma - *PrepTM*, Wizard [14], colunas, por centrifugação e cartões FTA (Flinders Technology Associates) já disponíveis no mercado. Neste trabalho, propomos o uso de membranas fibrosas funcionalizadas com nanoestruturas que tenham afinidade pelas cadeias de DNA como um material alternativo para os métodos de extração atuais baseados em matrizes sólidas. Nós utilizamos a técnica de eletrofição (ES) para produzir as membranas. Esta técnica se destaca por ser um procedimento de baixo custo, versátil, e que permite a preparação de micro e nano fibras dos mais diversos materiais [15].

Alta área superficial e grau de porosidade elevado são características intrínsecas das membranas produzidas por eletrofição. Quando utilizados como agentes adsorventes para a extração de biomoléculas, esses materiais possuem uma taxa de transferência de massa das moléculas superior em relação a qualquer das membranas porosas preparadas por métodos de moldagem [16] ou monólitos (bastonetes de sílica porosa [17]) utilizados para os mesmos fins [18]. Apesar dessas vantagens comparativas, o uso de membranas ES em abordagens de extração de DNA foi até aqui pouco explorado [19] assim como sua utilização é pequena em aplicações onde a adsorção de DNA é um passo intermediário dos procedimentos para entrega de genes [20, 21]. Neste estudo, desenvolvemos um material baseado na polimerização química *in situ* da anilina na superfície das membranas de PS. Esse composto (membrana PS/PANI) favorece a adsorção de DNA através de um efeito

sinérgico da porosidade da membrana e a atividade química da polianilina (PANI) nanoestruturada.

No Capítulo 2 será apresentada uma revisão básica dos conceitos fundamentais sobre os polímeros em geral e sobre a classe dos polímeros condutores, em especial, a polianilina. Além disso, ali serão mostrados os fundamentos do processo de eletrofição. No Capítulo 3, apresentaremos os conceitos mais importantes relativos ao processo de adsorção em geral, além dos métodos de extração de DNA. No Capítulo 4, fazemos uma revisão das técnicas de caracterização utilizadas. Em seguida, no Capítulo 5, apresentaremos os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento das membranas através do processo de eletrofição e, conseqüentemente, para o revestimento com um polímero condutor. Nesse capítulo também será mostrado todo o procedimento necessário para a realização dos experimentos de adsorção e dessorção do DNA. No Capítulo 6 serão apresentados os resultados e discussões, e por fim, as conclusões e perspectivas deste trabalho.

Fundamentação Teórica

Neste capítulo abordaremos sobre os conceitos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

2.1 Conceitos básicos sobre polímeros

Os polímeros orgânicos são materiais constituídos por ligações covalentes entre átomos de carbono e hidrogênio, em especial, podendo também envolver heteroátomos. O nome polímero é de origem grega, onde poli e mero significam muitos e partes, respectivamente. A formação desses materiais é conseguida por meio da repetição de uma mesma unidade química, denominada monômero (em geral, de baixo peso molecular), através do processo de polimerização. Na Figura 2.1 são mostradas duas estruturas químicas de monômeros e seus respectivos polímeros.

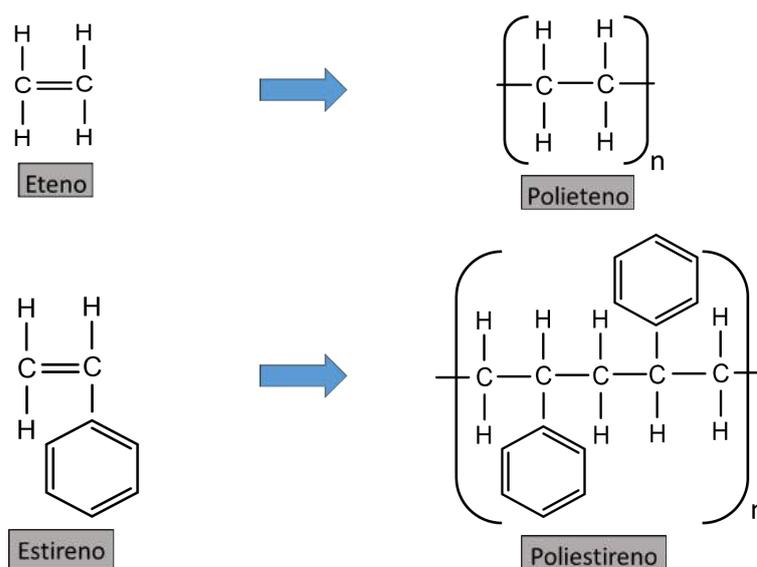


Figura 2.1: Estruturas de alguns monômeros e de seus respectivos polímeros .

2.1.1 Classificação

Os polímeros podem ser classificados de distintas maneiras; por exemplo, de acordo com sua origem, quando podem ser sintéticos ou naturais. Podem ser classificados também quanto à composição (homopolímero e copolímero), estrutura química (linear, ramificado ou ramificado), taticidade ¹ da cadeia polimérica (isotático, sindiotático e atático), fusibilidade ² (termoplástico ou termorrígido) e quanto ao tipo de preparação (adição ou condensação) [22, 23].

2.1.1.1 Quanto à origem: polímeros sintéticos ou naturais

- **Polímeros sintéticos:** Essa classe de polímeros inclui aqueles produzidos artificialmente e, de acordo com o seu comportamento mecânico, podem ser sub-divididos em fibras, elastômeros ou plásticos. Fazem parte dessa classe o poliestireno, o polietileno, polipropeno e o polibutadieno.
- **Polímeros naturais:** Esse é o caso dos polímeros produzidos ao longo do desenvolvimento de um organismo vivo. Entre eles estão os ácidos nucleicos (o ácido desossorribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA)), as proteínas, a celulose, e a borracha.

2.1.1.2 Quanto à preparação: polimerização por adição ou condensação

Os polímeros são preparados por meio da reação de polimerização. Esse processo consiste da combinação química entre diversas moléculas de monômeros de baixo peso molecular para gerar uma cadeia polimérica com alto peso molecular. Em torno do ano de 1929, Wallace H. Carothers subdividiu a reação de polimerização em duas formas, adição e condensação [24]:

- **Adição:** Caso em que a longa cadeia dos polímeros se origina por meio da adição de monômeros idênticos, um após o outro. Na maioria das vezes os monômeros apresentam cadeias duplas ou triplas em sua estrutura. Um exemplo deste tipo de polimerização é a formação do poliestireno, mostrado na Figura 2.2.

¹Taticidade: cristalinidade de um polímero.

²Fusibilidade: capacidade que um material tem de derreter pelo aumento da temperatura.

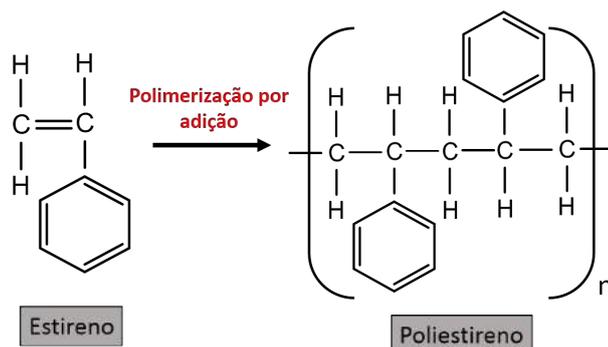


Figura 2.2: Exemplo da polimerização por adição: produção do poliestireno.

Basicamente, a formação desse polímero ocorre através da quebra da ligação dupla do carbono-carbono (presente no monômero estireno), resultando em uma ligação simples carbono-carbono, o que permite a junção de outros monômeros estireno na cadeia, por repetidas vezes [25]. Além do poliestireno, existem muitos outros polímeros que são formados a partir da polimerização por adição, como o polietileno e o poliácridonitrila [23].

- **Condensação:** Nesse tipo de polimerização, diferentes monômeros podem interagir para formar o polímero, e geralmente esse processo ocorre lentamente. Ao longo da polimerização, uma molécula pequena, na maioria das vezes água, é eliminada [24]. Um exemplo deste tipo de polimerização é a formação de um poliéster por meio da reação de um ácido tereftálico e etileno glicol para a formação do polietilenotereftato (PET), como mostrado na Figura 2.3 [26].

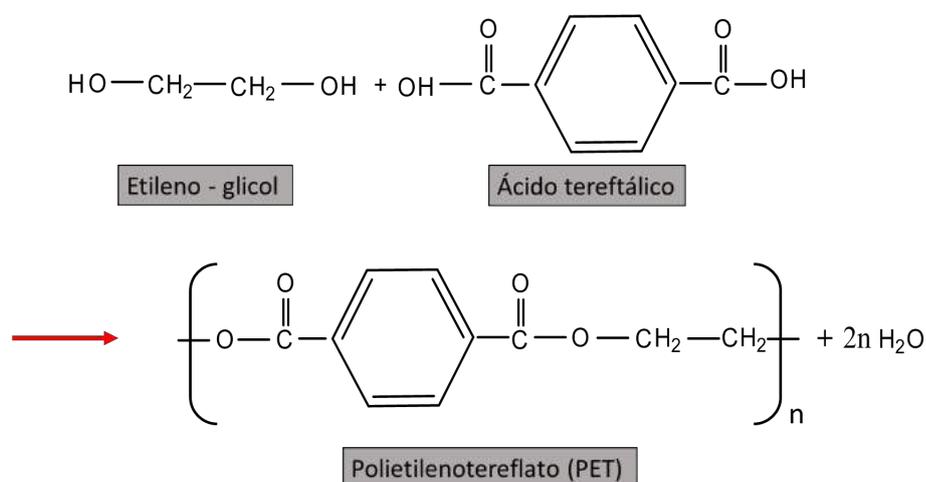


Figura 2.3: Exemplo de uma reação de condensação. Formação do PET e eliminação da água.

2.2 Ácido nucleico: DNA

Os ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e ribonucleicos (RNA) representam uma importante classe de macromoléculas biológicas comuns a todos os organismos vivos, cuja função é armazenar e transmitir a informação genética. Assim como o ácido ribonucleico RNA, o DNA é considerado um polímero natural por ser composto por polinucleotídeos, com a unidade repetitiva sendo quatro distintas sub-unidades denominadas nucleotídeos. Esses nucleotídeos são compostos pela ligação de uma base nitrogenada, um grupo fosfato e um açúcar (desoxirribose), como mostrado na Figura 2.4. As bases podem ser divididas em duas classes: as purinas, que são representadas pela Adenina (A) e Guanina (G), e a classe das pirimidinas, onde temos a Citosina (C) e Timina (T), no caso do DNA e Uracila (U) no caso do RNA. Outra característica do DNA é que ele possui em sua estrutura cargas negativas em cada nucleotídeo, devido aos grupos fosfatos. Na Figura 2.5 é apresentada a estrutura dos nucleotídeos que compõem a cadeia do DNA.

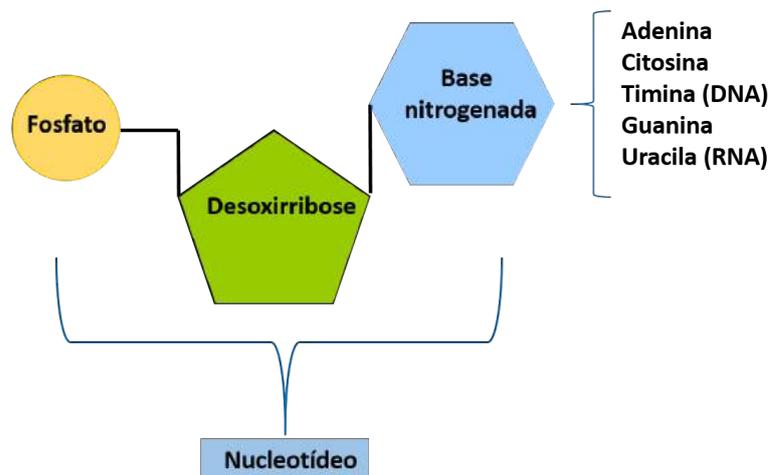


Figura 2.4: Representação da estrutura do nucleotídeo.

A estrutura do DNA pode ser entendida como sendo de dois tipos: a primária (encontrada em alguns vírus), onde há a formação de uma cadeia simples, e a secundária, que representa a junção de duas cadeias simples através de ligações tipo hidrogênio [27]; por exemplo, esta última conformação é a encontrada nos seres humanos. A estrutura primária é formada a partir da reação de condensação entre os nucleotídeos. Nesse caso, a polimerização ocorre quando o grupo hidroxila que se encontra ligado ao carbono 3' do açúcar de um nucleotídeo faz uma ligação chamada de fosfodiéster com o carbono 5' do açúcar de outro nucleotídeo, sendo que ao longo desse processo ocorre a eliminação de

água [28]. Esse procedimento se repete sucessivas vezes para a formação da fita simples de DNA. A polimerização segue uma sequência química, onde o início e o fim da cadeia são indicados pelas extremidades 3' e 5' [29] na Figura 2.5. A extremidade 5' contém um grupo fosfato e a outra extremidade 3' um grupo hidroxila.

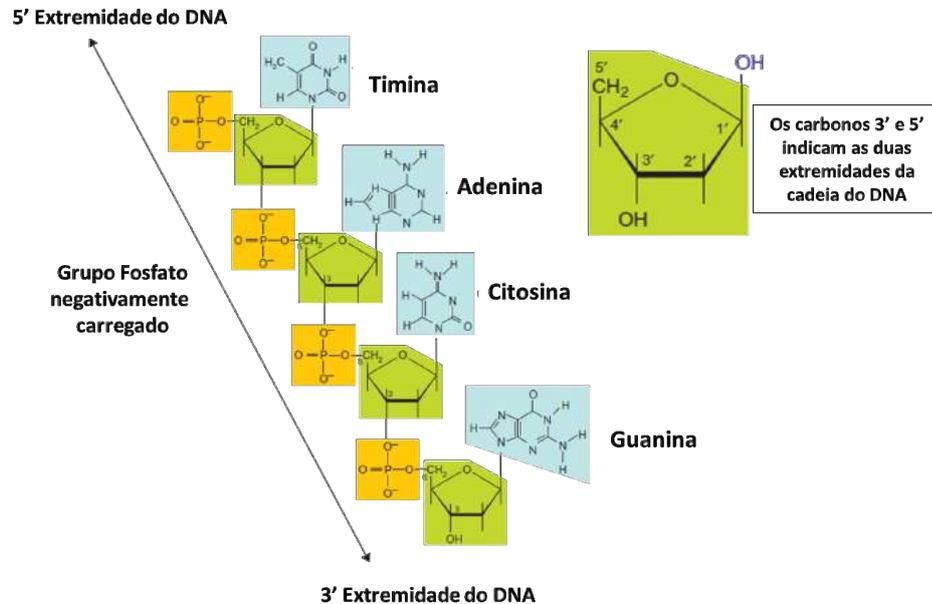


Figura 2.5: Cadeia simples do DNA. Adaptado da Ref. [30].

Por sua vez, a estrutura secundária está relacionada com o estabelecimento de uma série de pontes de hidrogênio entre duas fitas simples, o que permite formar a dupla hélice do DNA; esse fenômeno da junção das duas fitas é chamado de hibridização. O modelo de dupla hélice, que pode ser visualizado na Figura 2.6, foi proposto por James Watson e Francis Crick em 1953 [31, 32]. No caso da dupla hélice, as extremidades 3' e 5' possuem direções opostas. Como pode ser visto nessa figura, os nucleotídeos contendo a base guanina se unem apenas à base citosina através de três ligações de hidrogênio, enquanto que a timina se liga à base adenina por duas ligações de hidrogênio. Essa ligação dos pares de base depende do tamanho, forma e composição química das bases.

Quando a dupla cadeia do DNA é exposta a uma temperatura maior que 90°C , ocorre a chamada desnaturação, que é o fenômeno de quebra das ligações de hidrogênio, do que resulta a separação da fita dupla (ver Figura 2.7). Ao diminuir drasticamente a temperatura para aproximadamente 50°C , as fitas são induzidas a novamente se ligarem por pontes de hidrogênio, mais uma vez formando uma hélice dupla [34, 35].

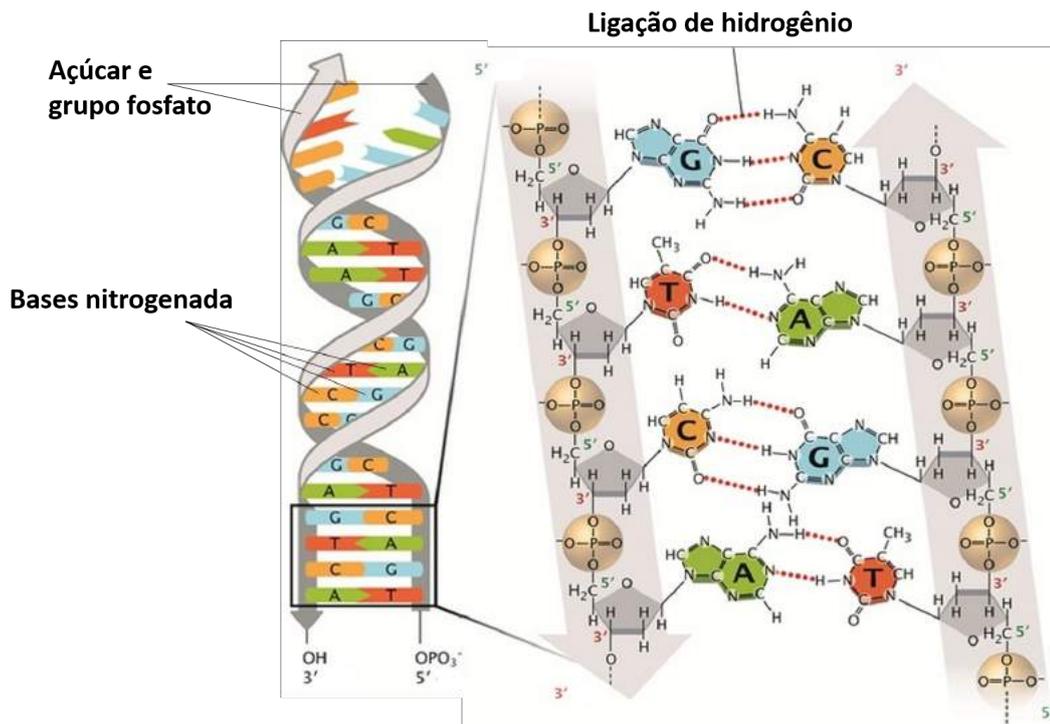


Figura 2.6: Representação da cadeia dupla helicoidal do DNA e da estrutura química dos nucleotídeos. Adaptado da Ref. [33].

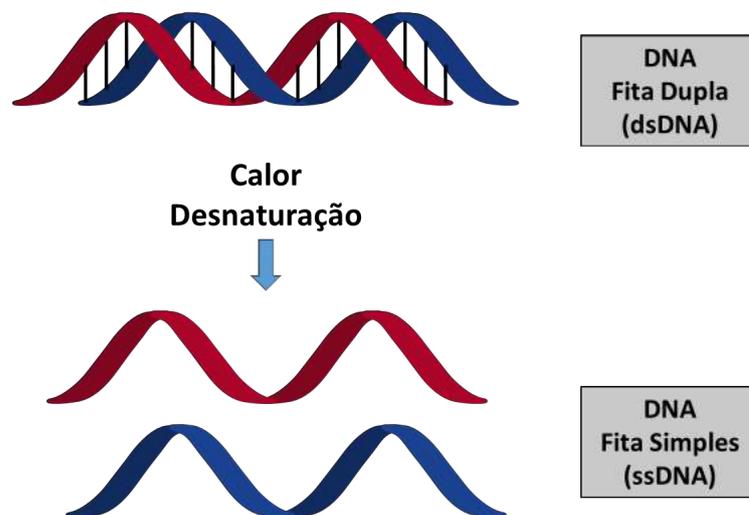


Figura 2.7: Desnaturação da dupla hélice do DNA. Adaptado da Ref. [36].

Com o grande avanço tecnológico das últimas décadas, o estudo sobre a molécula de DNA tem se tornado a base para o conhecimento mais profundo sobre o metabolismo dos seres vivos, sendo de fundamental importância para diversas disciplinas, como genética e biologia molecular. Além disso, na área da saúde a molécula de DNA pode ser utilizada no diagnóstico de algumas doenças, e na ciência forense, para a identificação de indivíduos.

2.3 A classe dos polímeros condutores

Em geral, os polímeros podem ser utilizados como excelentes isolantes térmicos e elétricos. No entanto, a descoberta inesperada da condutividade elétrica em alguns polímeros conjugados despertou um grande interesse entre os pesquisadores de diferentes áreas. A identificação dessa propriedade dos polímeros ocorreu em 1977, por Alan Heeger, Alan MacDiarmid, e Hideki Shirakawa. Eles descobriram que ao expor o poliacetileno isolante a vapores de iodo (procedimento que atualmente é denominado de dopagem), ocorre um grande aumento na condutividade elétrica desse polímero [37]. Esse grande feito foi reconhecido mais de 20 anos depois, no ano 2000, quando esses pesquisadores receberam o prêmio Nobel de Química.

Atualmente, a classe de polímeros condutores (PCs) tem recebido bastante atenção, pois eles apresentam características únicas, como a possibilidade de alteração de suas propriedades de acordo com as condições do meio. Essas características tornam esses polímeros muito procurados para as mais diversas aplicações, como em dispositivos para armazenamento de energia [38], sensores e biosensores [39, 40], dispositivos eletrônicos [41] (como diodos emissores de luz e células solares) e proteção contra corrosão [42, 43]. Alguns dos PCs mais utilizados recentemente são o polipirrol (PPi), o poliacetileno (PA), o politiofeno (PT) e a polianilina (PANI); na Figura 2.8 é mostrada a estrutura química de cada um desses polímeros [44].

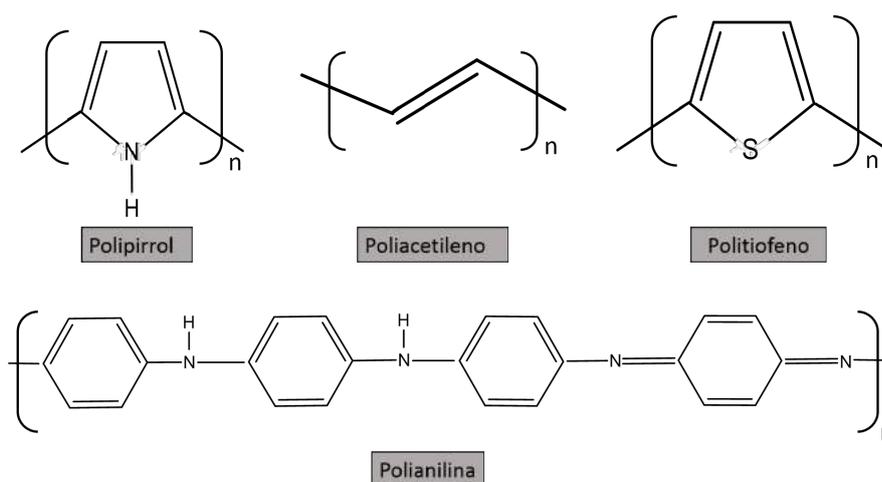


Figura 2.8: Estrutura química de alguns polímeros condutores. Adaptado da Ref. [44]

Como pode ser visto nessa figura, os polímeros condutores apresentam alternância entre ligações covalentes simples e duplas ao longo da cadeia polimérica principal e, devido

a essa configuração, os PCs são conhecidos como polímeros conjugados. A ligação dupla é constituída por uma ligação "sigma"(σ) fortemente localizada ³ e uma ligação "pi"(π) espacialmente deslocalizada ⁴ [45]. Nesse último caso, os elétrons da ligação π podem ser removidos ou adicionados facilmente da cadeia polimérica para formar um íon. Com isso, os polímeros que possuem essa configuração conjugada podem ser convertidos de isolante para condutor, por meio da oxidação ou redução do sistema π da cadeia polimérica, na presença de um agente de transferência de carga ⁵, conhecido como dopante em um mecanismo que será explicado na próxima seção [46].

2.3.1 Mecanismo de condução dos polímeros

O mecanismo de condução de um polímero pode ser explicado através da teoria de banda [32], similarmente como em um cristal. De acordo com essa teoria, a interação de uma célula unitária do cristal (polímero) com todos os seus vizinhos, conduz à formação de bandas eletrônicas [47]. Mais precisamente, pelo princípio de exclusão de Pauli dois elétrons de mesmo spin não podem ocupar o mesmo nível de energia, o que leva à subdivisão dos orbitais em estados energéticos discretos, o que dá origem às bandas de energia [48]. A banda completamente ocupada de mais alta energia é denominada de banda de valência. Por outro lado, os níveis eletrônicos desocupados de menor energia formam a banda de condução. A região de energia que separa essas bandas denomina-se gap, podendo também ser chamada de banda proibida. A largura do gap determina o grau de condutividade do material (ver Figura 2.9).

Como podemos observar na Figura 2.9, no caso de um gap de energia muito grande ($> 3,0\text{eV}$), o material será considerado isolante, ou seja, enquanto a banda de valência estará totalmente preenchida, será necessária uma energia relativamente alta para que os elétrons saltem para a banda de condução. Caso essa largura diminua (gap = 0,1-3,0 eV) o material será semicondutor e, finalmente, se a banda de valência está parcialmente preenchida, os materiais serão considerados metálicos (condutor) [49]. Dessa forma, o caráter elétrico de um dado material depende da sua estrutura de bandas.

³Ligação química localizada é aquela em que os elétrons são compartilhados apenas por dois núcleos.

⁴Ligação química deslocalizada é aquela em que os elétrons são compartilhados por mais de dois núcleos.

⁵Agente de transferência de carga: composto que tem a capacidade de aceitar ou doar elétrons.

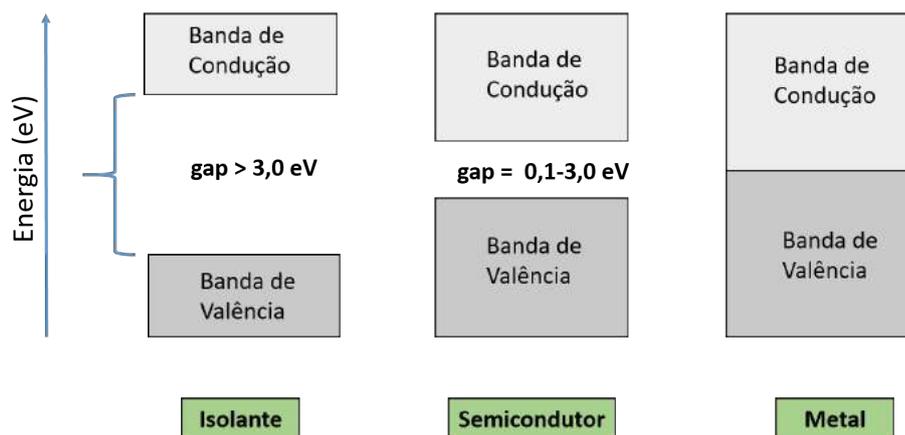


Figura 2.9: Representação da banda de condução e valência para materiais isolantes, semicondutores e condutores.

Na Figura 2.10 é mostrada a condutividade (S/cm) de alguns materiais, incluindo os polímeros condutores.

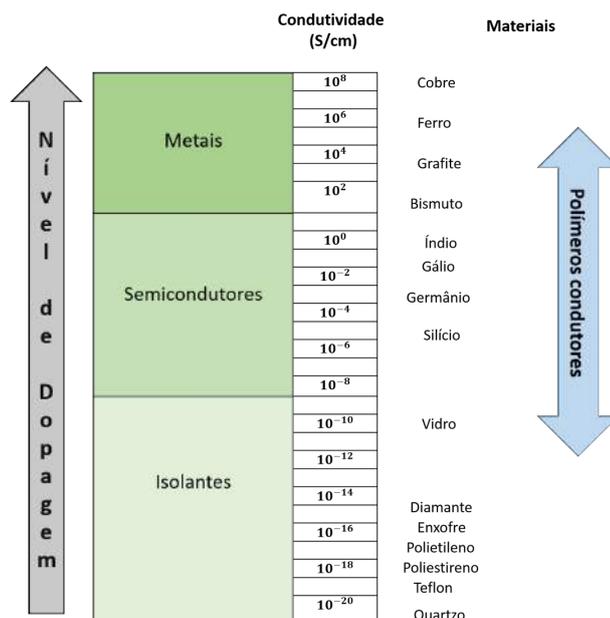


Figura 2.10: Condutividade de alguns materiais e compostos metálicos, semicondutores e isolantes comparadas com a dos polímeros condutores. Adaptado da Ref. [50].

Assim como nos materiais semicondutores inorgânicos, a condutividade dos polímeros orgânicos só é atingida com a inserção de um agente dopante durante o processo de polimerização (no caso dos PCs). Uma vez que a maioria dos polímeros orgânicos não possuem portadores de carga, é necessário que ocorra a oxidação/redução da cadeia polimérica, para que sejam modificadas as características elétricas do polímero (de isolante para condutor) [51], processo conhecido como dopagem. Existe uma variedade de compostos que

são utilizados como aceitadores e doadores de elétrons, e entre eles temos o AsF_5 , I_2 , Br_2 , HF, Li, Na e K. Em alguns casos, a dopagem ocorre ao mesmo tempo da oxidação do polímero (como, por exemplo, é o caso do polipirrol). Ao longo do processo de oxidação (redução), elétrons são retirados da cadeia, ocasionando o aparecimento de cargas deslocalizadas, o que é compensado da presença dos contraíons (dopantes) para neutralizar a carga [46]. A dopagem pode ser realizada por métodos químicos ou eletroquímicos.

A maior condutividade dos polímeros conjugados pode ser explicada pela presença de defeitos estruturais na cadeia polimérica, conhecidos como sólitons, polárons e bipolarons. Em princípio, o estudo sobre condutividade foi aplicado ao trans-poliacetileno ⁶. Esse polímero faz parte da classe dos polímeros condutores degenerados, pois apresentam duas estruturas geométricas com mesma energia. As duas estruturas diferem pela sequência de ligações simples e duplas (A) e duplas e simples (B) do carbono-carbono. Essa alternância ocorre devido à presença de um defeito estrutural conhecido como sólito. Na Figura 2.11 é mostrada uma estrutura do trans-poliacetileno, indicando a presença de um sólito neutro deslocalizado. Esse defeito conformacional pode se deslocalizar ao longo de toda a cadeia principal do polímero [52].

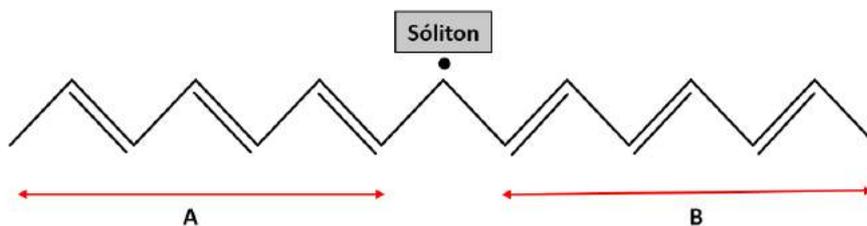


Figura 2.11: Uma possível estrutura do trans-poliacetileno com a presença de um sólito. Adaptado da Ref. [53].

A presença desse defeito cria um nível de energia semipreenchido com um elétron na região central do gap, resultando em um spin total igual a $1/2$. Quando um agente dopante é inserido na reação, o sólito neutro poderá ser oxidado, perdendo um elétron para formar um sólito positivo, ou reduzido, para originar um sólito negativo, ambos com spin nulo [52]. Os diferentes estados do sólito são mostrados na Figura 2.12.

No entanto, a condutividade de polímeros conjugados que possuem estruturas aromáticas (como o polipirrol e a polianilina) não pode ser entendida pelo modelo de sólitons, devido a ausência de degenerescência. Os polímeros que possuem essa característica apre-

⁶Trans-poliacetileno: Isômero do poliacetileno, obido através de polimerização a altas temperaturas.

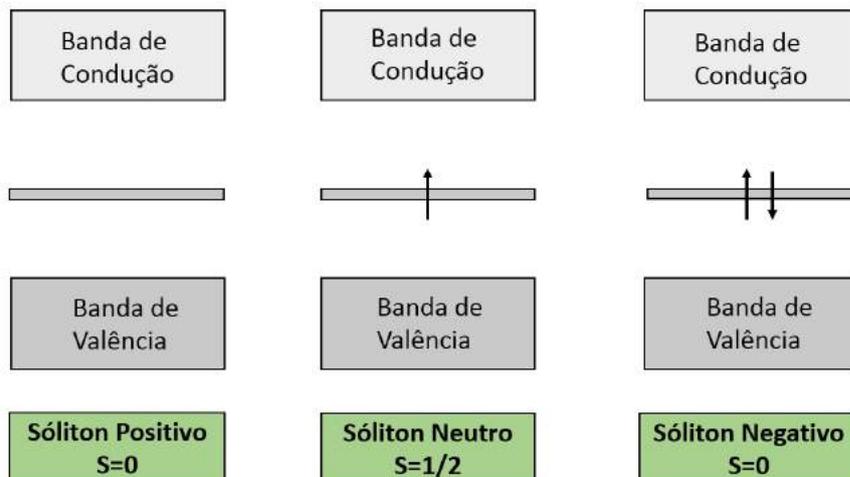


Figura 2.12: Configuração de banda para um sóliton positivo (a), neutro (b) e negativo (c), com spin 0, 1/2 e 0, respectivamente. Adaptado da Ref. [48].

sentam estruturas conformacionais com energias distintas. Por exemplo, esse é o caso de alguns polímeros nos quais ao longo do processo de polimerização o anel aromático muda para a forma quinônica. Esta última estrutura possui energia de ionização menor, e maior afinidade eletrônica que a forma aromática [54]. A condutividade desses sistemas foi explicada com base em defeitos chamados de pólarons e bipólarons. O estado eletrônico pólaron pode ser considerado como a ligação de um sóliton neutro com um sóliton carregado, formando dois níveis de energia no centro do gap, ou seja, devido ao spin $1/2$ do sóliton neutro e a carga do sóliton carregado, o estado poláron é um transportador de carga $\pm e$ com spin $1/2$ [55]. O poláron positivo ou negativo é formado após a oxidação ou redução da cadeia principal do polímero conjugado, respectivamente [50]. Para que ocorra esse defeito, a banda de valência deve permanecer cheia e a banda de condução desocupada, enquanto que os estados que surge no gap de energia ficam parcialmente ocupados. Por outro lado, o defeito bipólaron é um estado ligado por dois sólitons carregados com cargas semelhantes (positivas ou negativas). A formação do bipólaron gera níveis eletrônicos no gap mais afastados da banda de valência. [46, 56]. Na Figura 2.13 é mostrada a formação de um pólaron e bipólaron com carga positiva.

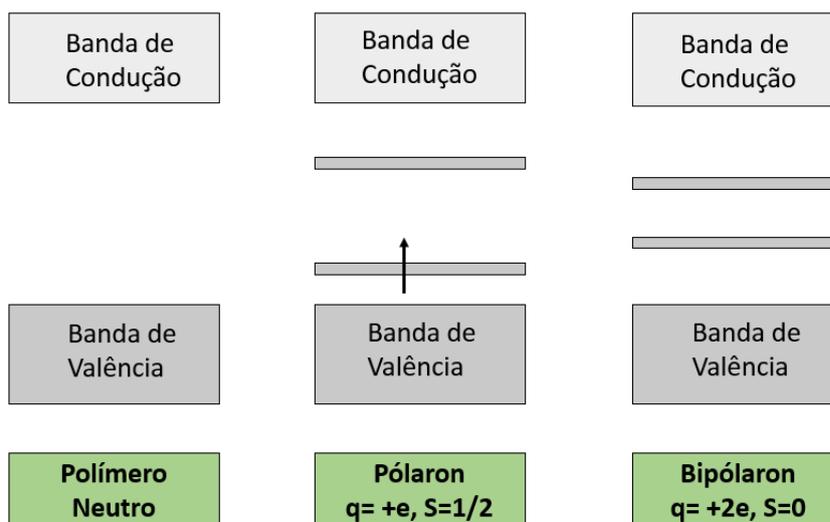


Figura 2.13: Formação dos polárons e bipólaron com cargas positiva. Adaptado da Ref. [56].

2.3.2 Polianilina: formação, propriedades e características

A polianilina (PANI) é um dos polímeros conjugados mais estudados, juntamente com o polipirrol. Esse polímero se destaca por possuir propriedades e características promissoras para uma grande variedade de aplicações tecnológicas, como biosensores e capacitores [44]; entre essas características estão incluídas a facilidade na síntese, a alta estabilidade química em condições ambientais e boa condutividade elétrica, além do baixo custo [57]. Na Figura 2.14 é mostrada a estrutura química geral da polianilina em seu estado básico, ou seja, não dopado.

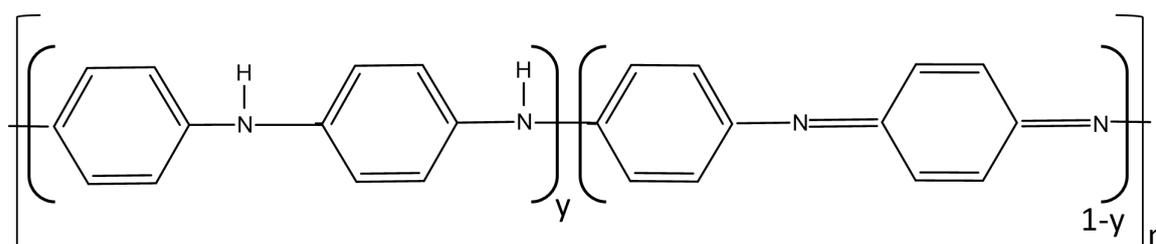


Figura 2.14: Estrutura geral da polianilina.

O lado esquerdo da estrutura da PANI, mostrado na Figura 2.14, representa a parte reduzida (y), enquanto no direito está indicada a parte oxidada ($1-y$), ou seja, onde há ganho e perda de elétrons, respectivamente. Uma característica interessante da PANI é a possibilidade de apresentar diferentes estados de oxidação. Nesse contexto, o valor de y pode em princípio variar entre 0 e 1, onde para $y=1$ a PANI estará completamente reduzida, e para $y=0$ estará completamente oxidada. Os distintos estados de oxidação são

denominados de leucoesmeraldina ($y=1$), base esmeraldina (estado parcialmente oxidado, $y=0,5$) e a pernigranilina ($y=0$). Além disso, ainda podemos ter as formas protoesmeraldina ($y=0,75$) e a nigranilina ($y=0,25$) [58]. As estruturas químicas que representam os diferentes graus de oxidação da PANI são mostradas na Figura 2.15. De acordo com o grau de oxidação, a PANI apresenta propriedades eletrocromáticas, ou seja, uma variação em sua cor: enquanto a leucoesmeraldina exibe uma cor amarelada, a base esmeraldina é azul, e sua forma protonada sal esmeraldina é verde e, finalmente, a pernigranilina exibe uma coloração violeta.

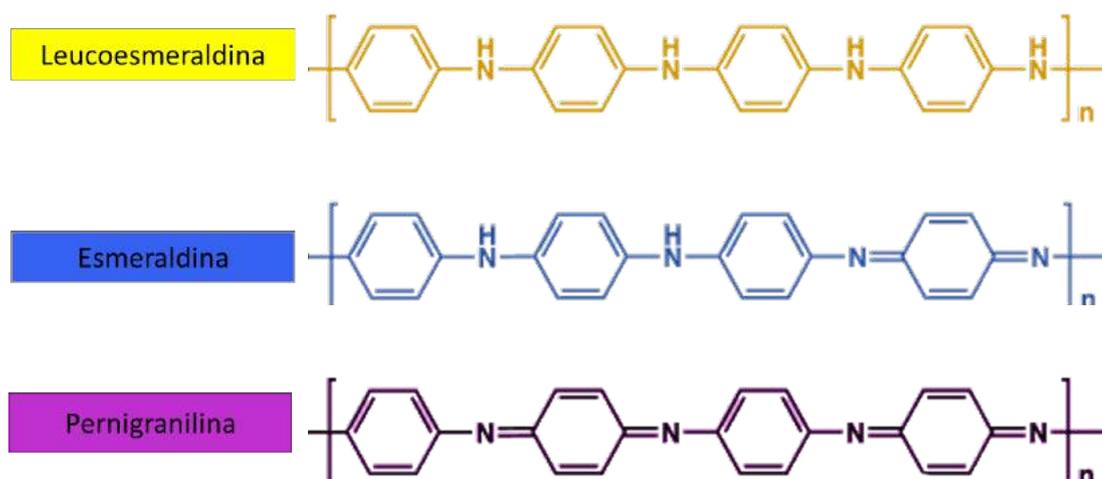


Figura 2.15: Estados de oxidação da polianilina. Adaptado da Ref. [48].

A polianilina é geralmente preparada por polimerização química [59] ou eletroquímica da anilina em um meio aquoso ácido. A escolha do tipo de preparação depende da aplicação desejada [60]. A síntese química é a mais utilizada, devido à possibilidade de produção do material em grandes quantidades. Basicamente, para a preparação da polianilina por via química são necessários o monômero (anilina), o agente dopante (como, por exemplo, o HCl) e o oxidante (como o APS - Persulfato de Amônio) e água. Por outro lado, a polimerização eletroquímica da PANI ocorre através da oxidação da anilina em soluções ácidas de eletrólitos (HCl, HNO_3 , entre outros). Essa técnica possui algumas vantagens, como a possibilidade de controlar a espessura do polímero e a condutividade [61]. Esse tipo de polimerização é geralmente utilizado para sua formação de filmes finos de PANI.

Na polianilina, o mecanismo de condutividade difere do encontrado em outros polí-

meros condutores, devido ao fato do átomo de nitrogênio estar envolvido na formação do cátion radical; na maioria dos polímeros condutores, o cátion é associado ao átomo de carbono [61]. Além disso, o polímero pode ser dopado por protonação, caso em que durante a dopagem não há mudança no número de elétrons (oxidação/redução) que envolve à cadeia polimérica. A dopagem da PANI é geralmente aplicada no estado base esmeraldina (BE), pois é o estado de oxidação que atinge maiores valores de condutividade após a dopagem (da ordem de 10 S/cm). Na forma BE, a cadeia polimérica possui uma mesma quantidade de grupos amina (-NH-) e imina (=NH-). O mecanismo de condutividade é explicado quando, na presença de compostos ácidos, ocorre a protonação das iminas da base esmeraldina e, conseqüentemente, a formação do bipólaron (forma condutora, conhecida como sal de esmeraldina (SE)). Na Figura 2.16 é mostrada a origem das formas bipolarônica e polarônica da PANI dopada [62, 63]. A PANI pode facilmente retornar ao estado base por uma simples exposição a uma solução com pH básico, como o hidróxido de amônia (NH_4OH) [51].

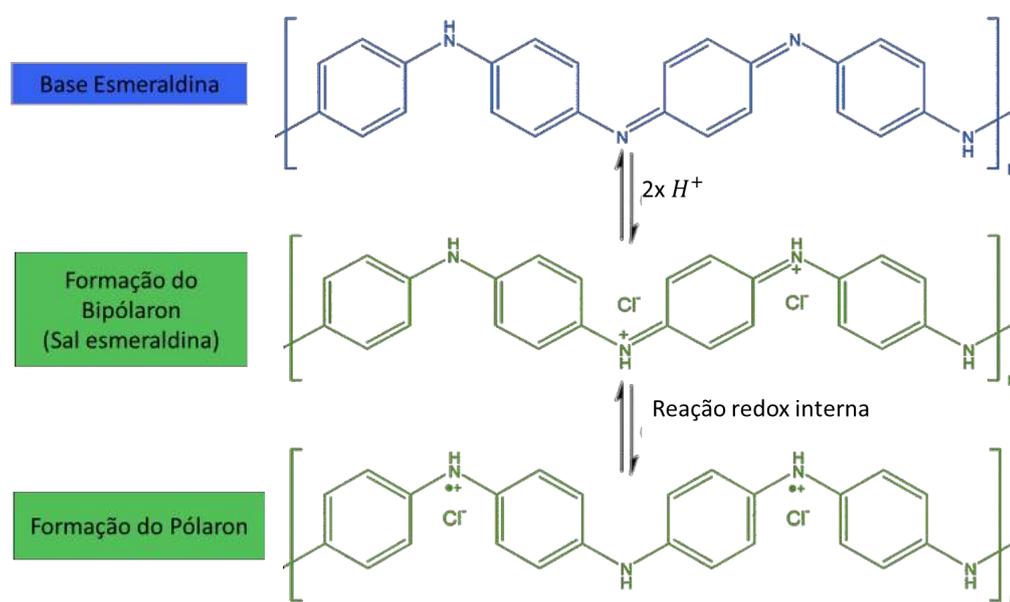


Figura 2.16: Formação da polianilina dopada. Adaptado da Ref. [64]

2.4 Processamento de polímeros

2.4.1 Técnica de eletrofição

A eletrofição é uma técnica de processamento de polímeros que tem recebido bastante atenção nas últimas décadas [65]. Essa técnica se destaca por permitir a produção de fibras com diâmetros em escalas nano e micrométricas, com alta porosidade e, elevada área superficial. Nessa técnica, que é versátil e de baixo custo, é possível controlar a morfologia e as propriedades do material resultante, de acordo com a aplicação desejada. Essas características a tornam de grande interesse para a preparação de membranas poliméricas para uso nas mais diversas áreas, como em processos de filtração, na indústria farmacêutica (liberação controlada de fármacos), e em biotecnologia, entre outras áreas (ver Figura 2.17).

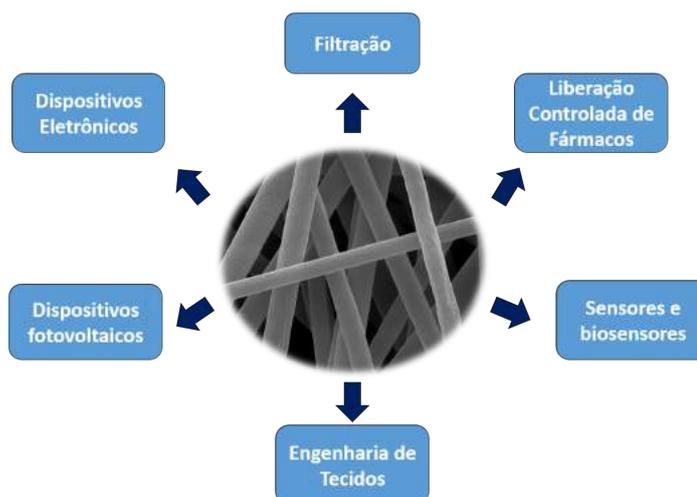


Figura 2.17: Algumas das áreas de aplicação de materiais preparados com a técnica de eletrofição.

A técnica de eletrofição permite o processamento de uma grande variedade de polímeros sintéticos (biodegradáveis ou não) ou naturais [66]. Na área de biotecnologia, na maioria das vezes é recomendável utilizar materiais que sejam biocompatíveis, como os polímeros naturais (de que são exemplos o colágeno, a quitosana, a gelatina e o acetato de celulose). Ao longo dos últimos anos, proteínas como o colágeno⁷ são muito utilizadas em engenharia de tecidos, e elas se tornaram alguns dos polímeros naturais mais usados no processo de eletrofição [67,68]. Por outro lado, os polímeros sintéticos são os materiais mais utilizados na produção de fibras por eletrofição; essa classe de polímeros possui

⁷Colágeno: proteína mais abundante da matriz extracelular dos mamíferos.

algumas vantagens em relação aos naturais, como a possibilidade de adaptar a solução polimérica para configurar as propriedades mecânicas (tal como a resistência) necessárias para determinadas aplicações [69]. Atualmente, existe uma gama de polímeros sintéticos (como o poliestireno [70], policloreto de polivinila (PVC) [71], acetato de celulose [72], entre outros) que são capazes de formar fibras através do processo de eletrofiação.

2.4.1.1 Um pouco da história da eletrofiação

O processo de preparação de materiais poliméricos a partir do uso de forças eletrostática é uma técnica antiga, que tem seus primórdios em 1897, quando Rayleigh realizou os primeiros experimentos correspondentes. O conhecimento mais elaborado da técnica se fez em uma série de patentes publicadas entre 1934-1944 [73–77] por Anton Formhals, que apresentou distintas formas de preparação de materiais usando o método eletrostático (até então o termo eletrofiação não era ainda usado). Em uma de suas patentes, ele apresentou um sistema para a produção de fibras têxteis artificiais, utilizando uma solução de acetato de celulose, tendo o álcool e acetona como solventes. As fibras foram formadas a partir de um sistema composto por uma fonte de alta tensão (com o uso de uma diferença de potencial de 57 kV), onde o eletrodo negativo foi fixado no recipiente de metal onde se encontrava a solução, e o eletrodo positivo em um coletor rotativo, onde as fibras eram depositadas (ver Figura 2.18) [78].

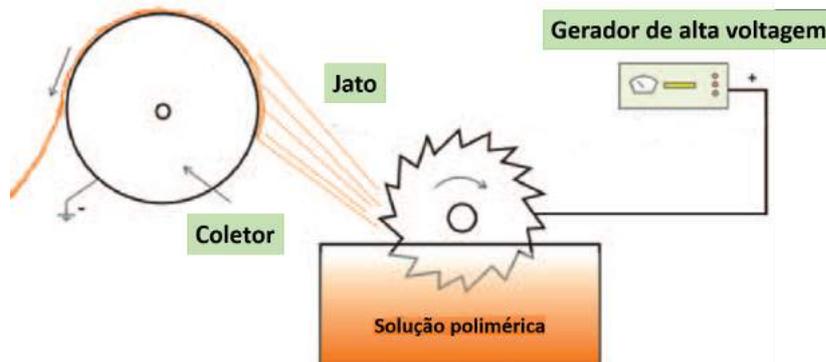


Figura 2.18: Configuração dos primeiros sistemas para preparação de fibras a partir de força elétrica. Adaptado da Ref. [79].

Depois de estabelecida essa nova tecnologia, diversos trabalhos foram realizados ao longo dos anos, com o uso de diferentes metodologias e equipamentos para a produção de fibras a partir de forças eletrostáticas [80–83]. Um exemplo importante foi aquele apresentado por Harold Simons em 1966 [82], que desenvolveu um sistema que produzia fibras

ultra-finas, onde o eletrodo positivo da fonte de tensão era imerso na solução polimérica e o eletrodo negativo preso ao coletor. Simons mostrou que em soluções com baixas viscosidades as fibras se tornavam mais curtas e mais finas, o que não acontece quando a viscosidade é aumentada. A capacidade de formar fibras que proporcionassem algumas propriedades importantes, como alta área superficial e boa porosidade, entre outras vantagens, fez com que ao longo dos anos o interesse por essa técnica se intensificasse. A partir do ano de 1994, esse processo de produzir fibras através forças elétricas passou a ser chamado de eletrofiação, um termo que significa fiação eletrostática [84]. A Figura 2.19 mostra uma configuração mais recente de um sistema de eletrofiação.

2.4.1.2 Princípio de funcionamento

Basicamente, um sistema de eletrofiação é composto por um conjunto de três componentes: uma seringa com agulha metálica, onde é armazenada a solução polimérica, uma fonte de alta tensão e um coletor (revestido com um material condutor como o alumínio), onde são depositadas as fibras. O eletrodo positivo da fonte de tensão é conectado à agulha metálica, enquanto que o eletrodo negativo é conectado ao coletor. O processo de produção das membranas tem início com a aplicação de uma grande diferença de potencial entre a agulha e o coletor, o que faz com que cargas sejam induzidas no interior da solução. Quando há o aumento do campo elétrico, ocorre a formação de uma gota da solução na extremidade da agulha, que rapidamente se transforma em um jato alongado de solução, conhecido como cone de Taylor [79]. Ao aumentar ainda mais o campo elétrico, as cargas atingem um valor crítico, fazendo com que a força eletrostática vença a tensão superficial da solução, e dessa forma a solução na ponta do cone de Taylor é expelida em direção ao coletor (região de menor potencial). Enquanto o jato está sendo expelido, o solvente é evaporado, de modo a fazer com que apenas o polímero solidificado e carregado seja depositado sobre a superfície do coletor. Na Figura 2.19 é mostrado o aparato experimental com configuração horizontal para a execução do processo de eletrofiação.

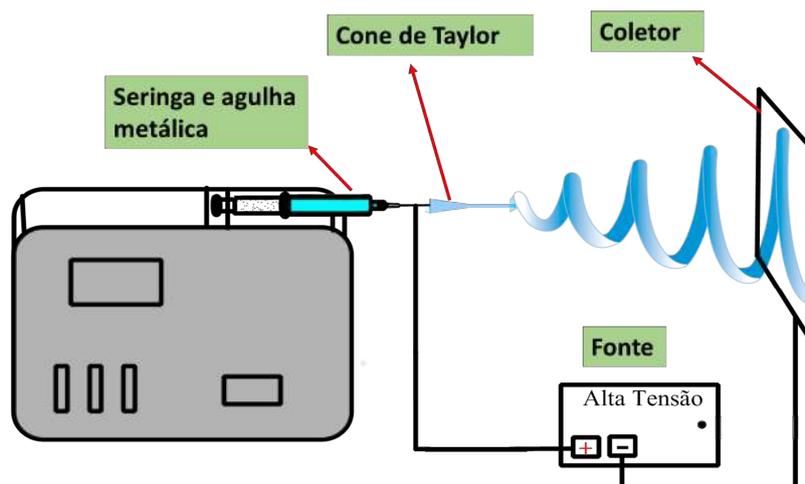


Figura 2.19: Configuração horizontal para o processo de eletrofição e formação das fibras. Adaptado da Ref. [85].

2.4.1.3 Parâmetros fundamentais para o processo de eletrofição

Existem alguns parâmetros no processo de eletrofição que influenciam a morfologia final das fibras. Esses parâmetros podem ser divididos em três grupos: a) aqueles relacionados com a preparação da solução polimérica, como a concentração do polímero e a viscosidade da solução, b) os que dizem respeito às condições do processamento, tais como tensão eletrostática aplicada e a distância entre a agulha metálica e o coletor, e finalmente, c) os parâmetros ambientais, como a temperatura e a umidade do ambiente [86, 87]. De acordo com a aplicação desejada, todos esses parâmetros devem ser bem controlados para obtenção das fibras.

- Preparação da solução polimérica:** Os parâmetros envolvidos na preparação da solução polimérica são fundamentais para o processo de eletrofição e para a morfologia final das fibras. O peso molecular do polímero, que está associado ao tamanho da cadeia polimérica, é um dos fatores que mais influenciam a viscosidade da solução, afetando o emaranhamento da cadeia polimérica e, conseqüentemente, a formação das fibras. Caso o peso molecular do polímero dissolvido em um solvente (específico para cada polímero) seja muito alto, a viscosidade será maior do que a solução de um mesmo polímero com peso molecular menor. Os emaranhamentos da cadeia polimérica em solução são os responsáveis por permitir que o jato alongado de solução polimérica saia da extremidade da agulha metálica continuamente, sem que haja a quebra ao longo da "viagem" em direção ao coletor. Dessa forma, o peso

molecular e a viscosidade devem ser ajustados para garantir que ocorra a formação das fibras lisas, com ausência de grânulos. A concentração da solução também é um parâmetro que influencia a viscosidade da solução. Geralmente, se a concentração for muito baixa, vamos obter um maior número de grânulos de fibras, enquanto que à medida que a concentração aumenta um pouco, ocorre a formação da mistura de grânulos e fibras e, finalmente, quando temos uma concentração ótima, ocorre a formação de fibras lisas [87]. Na Figura 2.20 são mostradas três imagens SEM de fibras de poliestireno eletrofiadas com três distintas concentrações, em (1) 10%, (2) 15% e (3) 20% [70]. O diâmetro das fibras também é afetado pela variação da viscosidade, ou seja, quanto maior foi a viscosidade, maior será o diâmetro médio das fibras. Outros parâmetros também influenciam o diâmetro da fibra, como a voltagem aplicada e a distância agulha-coletor.

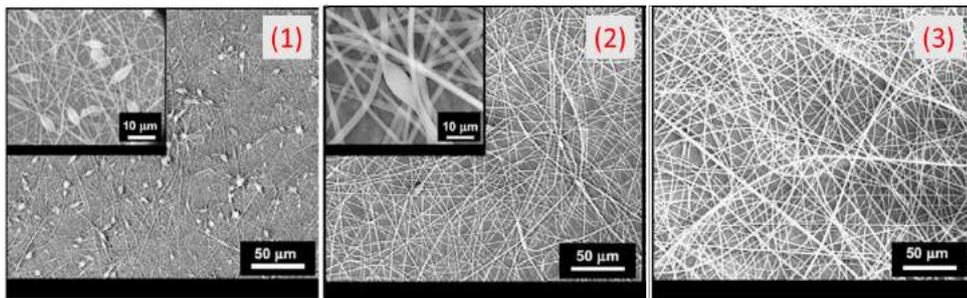


Figura 2.20: Fibras de poliestireno eletrofiadas em diferentes concentrações; 10 % (1), 15 % (2), 20 % (3). Adaptado da Ref. [70].

A tensão superficial é outro fator determinante para o processo de eletrospinação. Esse parâmetro contribui para a redução da área superficial por unidade de massa de um líquido, levando à formação de gotas esféricas na ponta da agulha, enquanto que o aumento da carga elétrica no jato de solução tende a aumentar a área da superfície através de alongamento; quando a voltagem aplicada é suficientemente alta para fazer com que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota, o jato é expelido em direção ao coletor [88]. A condutividade da solução polimérica também influencia no aparecimento de grânulos durante o processo de eletrospinação. Essa condutividade pode ser aumentada pelo uso de agentes tensoativos, como surfactantes. Esses agentes irão elevar a quantidade de cargas na solução, o que irá favorecer o alongamento do jato.

- **Condições de processamento:** Quando uma voltagem é aplicada ao sistema, o

campo elétrico gerado dá início ao processo de eletrofiação. Para uma dada voltagem, a intensidade do campo elétrico será inversamente proporcional à distância de trabalho (isto é, a distância entre a agulha e o coletor); assim, quanto maior essa distância, menor será a intensidade do campo, e vice versa. Para que haja a formação de fibras individuais, a distância entre a agulha e o coletor não deve ser pequena, pois o tempo de viagem do jato de solução deve ser grande o suficiente para que todo o solvente possa evaporar durante o percurso até o coletor. Essa distância também não deve ser muito grande para não reduzir o campo elétrico, de modo a assegurar que o jato não deixe de alcançar a placa de deposição. Tanto a voltagem, quanto o campo elétrico, têm contribuição para o alongamento do jato de solução, e esses parâmetros podem influenciar a morfologia e o diâmetro das fibras resultantes. Quando temos uma voltagem pequena, o campo elétrico se tornará mais fraco, o que acarreta um tempo de viagem do jato mais longo, assim gerando fibras mais finas. Por outro lado, se a tensão for mais elevada, poderá ocorrer a formação de fibras com grânulos ou com diâmetros maiores. Com isso, existem valores ótimos para a tensão e a distância que favorecem a formação de fibras adequadas para determinada aplicação [87, 89].

- **Parâmetros ambientais:** O processo de eletrofiação é bastante complexo e requer muito cuidado para o controle adequado de alguns parâmetros relativos ao ambiente em que será realizado. Entre esses parâmetros, a umidade e temperatura são os mais importantes, pois também podem afetar a morfologia e o diâmetro médio das fibras. Por exemplo, a umidade do ambiente pode alterar a solubilidade do polímero durante o processo de eletrofiação. Por sua vez, quando o ambiente está com uma umidade elevada, água poderá condensar sobre a superfície da fibra que está sendo formada [87], levando à modificação da sua morfologia.

2.4.1.4 Modificação da superfície das membranas

Atualmente, há interesse na busca por materiais que possuam como características uma alta porosidade e elevada área superficial, e as membranas (conjunto de fibras) formadas através do processo de eletrofição apresentam essas vantagens. No entanto, quando elas são utilizadas em determinadas aplicações, por vezes se faz necessário modificar as características de sua superfície de modo a melhorar o desempenho. Tais modificações incluem alterações físicas ou químicas a serem feitas após o processo de eletrofição. Existem várias propriedades da superfície da membrana que podem ser modificadas, como a composição química, a hidrofobicidade, a rugosidade e a condutividade, entre outros. Essas modificações podem ser realizadas por meio da aplicação de diferentes técnicas. O tratamento por métodos físicos pode alterar a rugosidade, o tamanho de poro, e a porosidade da superfície [90]. Um outro exemplo de modificação por métodos físicos é o tratamento térmico, que tem como objetivo melhorar a compactação das membranas e suas propriedades mecânicas. Nesse caso, as membranas podem ser tratadas sob pressão a quente, sendo a temperatura utilizada aquela entre a temperatura de transição vítrea (t_g) e a temperatura de fusão do material [91]. A mudança por métodos físicos também pode conduzir a alterações na composição química, devido à remoção ou à adição de um grupo químico ou a ativação de uma reação química na superfície de um material. Um exemplo desse tipo de modificação é o tratamento a plasma (técnica que será explicada mais detalhadamente na Seção 4.2.1) de ar, argônio ou oxigênio. Esse tratamento é utilizado na maioria das vezes para melhorar a capacidade de adesão da superfície de um material pela adição de grupos funcionais polares. Por sua vez, a modificação química altera a composição da superfície da membrana. Por exemplo, no presente trabalho a técnica de modificação por métodos químicos foi utilizada para revestir a membrana eletrofiada com um polímero condutor, mudando a natureza de sua superfície de isolante para condutora, como veremos mais adiante. Dessa forma, a modificação da superfície das membranas, seja por métodos físicos ou químicos, é de fundamental importância para a adequação do material para as mais variadas aplicações.

A revisão apresentada neste capítulo serviu como base para os conhecimentos sobre; polímeros em geral, polímeros condutores e sobre a técnica de eletrofição. No próximo capítulo será apresentada uma breve discussão sobre processos de adsorção e alguns métodos de extração e purificação de DNA.

Métodos de extração de DNA

Neste capítulo serão apresentados alguns métodos de extração de biomoléculas, em particular cadeias de DNA. Iniciaremos, porém, pela apresentação de uma breve revisão sobre o processo de adsorção.

3.1 Estudo sobre adsorção

A adsorção é um fenômeno pelo que moléculas originalmente dissolvidas em um fluido (gases ou líquidos) são transferidas para uma superfície sólida. Nos últimos anos o método de adsorção tem sido bastante usado, por exemplo, na remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos (tais como metais tóxicos e corantes) de meios aquosos [92] e na purificação de biomoléculas (DNA, RNA, proteínas,...) a partir de amostras biológicas. Esse método se destaca por proporcionar um processo rápido e limpo, ou seja, na maioria das vezes não se necessário o uso de produtos tóxicos. Além disso, o processo de adsorção é econômico e relativamente fácil de ser implementado. Detalhes de um processo de adsorção são mostrados na Figura 3.1.

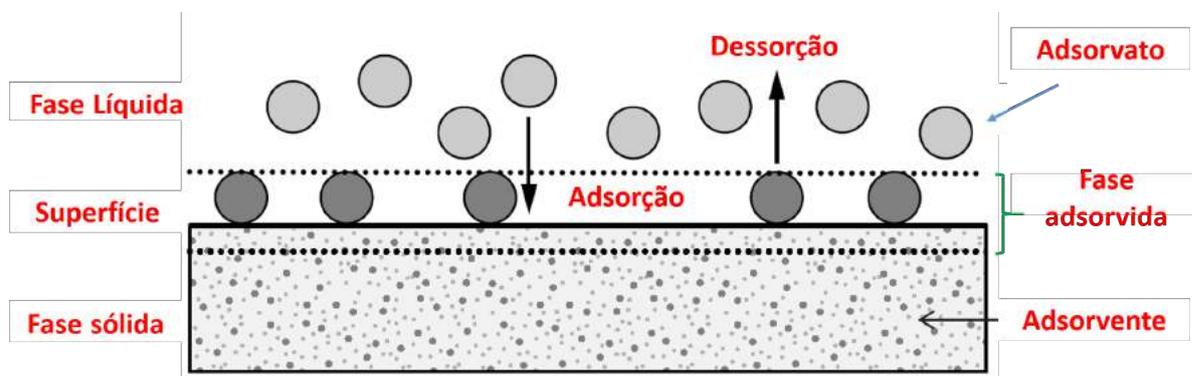


Figura 3.1: Componentes de um processo de adsorção. Adaptado da Ref. [93].

O material sólido no qual ocorrerá a adsorção denomina-se adsorvente, enquanto que

as espécies que vão ser adsorvidas são referidas como adsorvatos. Quando as condições do meio líquido, como por exemplo a temperatura e o pH, são modificadas, o adsorvido poderá ser liberado da superfície, voltando assim para a fase líquida. Esse último processo é conhecido como dessorção [93].

Os materiais adsorventes podem ser classificados como naturais e sintéticos. Os primeiros podem ser encontrados em abundância, do que são exemplos o carvão, argilas e zeólitos, entre outros. Já os adsorventes sintéticos podem ser preparados a partir de produtos agrícolas, resíduos industriais e adsorventes poliméricos. Cada material adsorvente possui características únicas, tais como densidade e estrutura dos poros e a natureza da sua superfície [94].

O processo de adsorção pode ser classificado em fisissorção e quimissorção. A fisissorção ocorre quando as interações predominantes entre o adsorvato e o adsorvente são fracas, como é o caso das forças de Van der Waals. Por outro lado, na quimissorção as moléculas do adsorvato se unem à superfície do adsorvente através de ligações químicas (ou seja, via uma interação forte) [92, 95]. No processo de adsorção diversos fatores podem influenciar a interação entre o adsorvente e o adsorvato, como a temperatura, a área superficial do adsorvente, e o pH do meio.

3.2 Isotermas de adsorção

Quando se pretende utilizar um adsorvente para a remoção de um determinado soluto ¹ é de fundamental importância conhecer algumas informações básicas sobre o sistema, como por exemplo, o seu comportamento no equilíbrio. Para analisar o sistema no equilíbrio, mantendo constante a temperatura, inicialmente um material adsorvente de massa (m) é colocado a interagir com o adsorvato (com concentração inicial C_0) em um certo volume (V). Com o passar do tempo, as moléculas presentes na solução irão migrar para o adsorvente, até que seja atingido o equilíbrio; nesse momento, a concentração de soluto (C_e) em solução permanecerá constante. A partir dos dados obtidos, podemos encontrar a capacidade de adsorção (q_e) do adsorvente. Esse procedimento é repetido para diferentes concentrações iniciais. A partir disso, podemos montar um gráfico da variação de q_e versus C_e , que é conhecido como isoterma de adsorção, uma vez que o processo foi inicialmente

¹Soluto: substância que será adsorvida pelo material adsorvente.

realizado a uma temperatura constante. As concentrações podem ser determinadas, por exemplo, através da espectroscopia no ultravioleta visível, enquanto que a capacidade de adsorção do adsorvente no equilíbrio é obtida através da relação [95]

$$q_e = V \frac{(C_0 - C_e)}{m} \quad , \quad (3.1)$$

onde V é o volume total da solução (L), m é a massa de adsorvente (g), q_e é a capacidade de adsorção no equilíbrio (mg/g), C_0 e C_e são as concentrações inicial e no equilíbrio de soluto (mg/L), respectivamente.

Na literatura existem diferentes modelos de isoterma que podem servir para ajustar o gráfico de q_e versus C_e , e a partir desses ajustes a capacidade máxima de adsorção do adsorvente pode ser encontrada. Aqui vamos apresentar os modelos de isotermas de Langmuir e Freundlich, que são aqueles mais amplamente utilizados.

3.2.1 Isoterma de Langmuir

Em 1932, Irving Langmuir ganhou o prêmio Nobel de Química devido a sua grande contribuição na área de química de superfícies [96]. Em seu modelo, Langmuir considerou a adsorção de um gás ideal sobre uma superfície, e presumiu que o gás seja adsorvido a uma série de diferentes locais na superfície do sólido. Devido a essa análise, o modelo de isoterma de Langmuir é também conhecido como modelo de monocamada e descreve a adsorção em superfícies homogêneas. A Figura 3.2 mostra o exemplo do efeito da adsorção em monocamada [97].

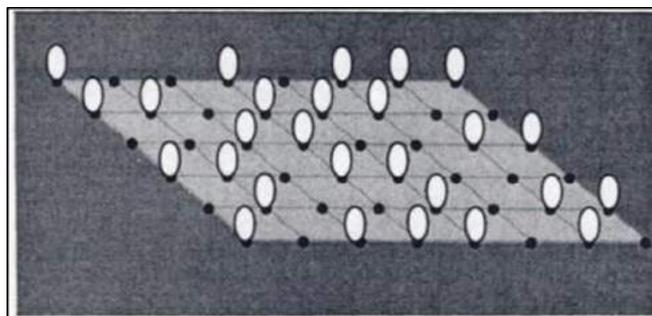


Figura 3.2: Modelo de monocamada de Langmuir. Os pontos pretos representam os sítios de adsorção e as elipses brancas as moléculas adsorvidas. Adaptado da Ref. [97].

Após a análise do sistema, ele apresentou uma série de pressupostos básicos em relação a seu modelo [98]:

1. As moléculas são adsorvidas em locais definidos na superfície do adsorvente;
2. Cada local pode acomodar apenas uma molécula (monocamada);
3. As moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras;
4. A energia de adsorção é a mesma em todos os locais.

A equação de isoterma de Langmuir relaciona o volume do gás e pressão e é dada na forma

$$V = \frac{V_m b P}{1 + b P} \quad , \quad (3.2)$$

onde V é o volume de gás adsorvido a uma pressão P , V_m é o volume adsorvido quando todos os sítios da superfície adsorvente estão ocupados, b é a constante de Langmuir. Esse modelo também pode ser aplicado para soluções líquidas, agora relacionando a concentração do soluto e a capacidade de adsorção, quando pode ser expressa na forma

$$q_e = \frac{q_m b C_e}{1 + b C_e} \quad (3.3)$$

onde q_m é a quantidade máxima de moléculas adsorvida por unidade de massa de adsorvente e b é uma constante de Langmuir. Em sua forma linear, a Equação 3.3 pode ser expressa como

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{b q_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad . \quad (3.4)$$

Para encontrar o valor das constantes, é necessário fazer a regressão linear do gráfico de C_e/q_e em função de C_e .

3.2.2 Isoterma de Freundlich

O modelo de isoterma de Freundlich foi proposto em 1909 por Herbert Freundlich [99]. Em seu trabalho, Freundlich apresentou uma relação empírica entre a quantidade de gás adsorvido por unidade de massa de adsorvente e pressão a uma determinada temperatura. Este modelo descreve a adsorção em superfícies heterogêneas, ou seja uma situação em que mais de uma molécula pode estar em um único sítio e a adsorção ocorre em configuração de multicamada (ver Figura 3.3) [98]. Além disso, as energias dos sítios de adsorção

podem ser distribuídas de uma forma exponencial, situação distinta ao que ocorre com o modelo de Langmuir, no qual se assume que as energias são distribuídas uniformemente.

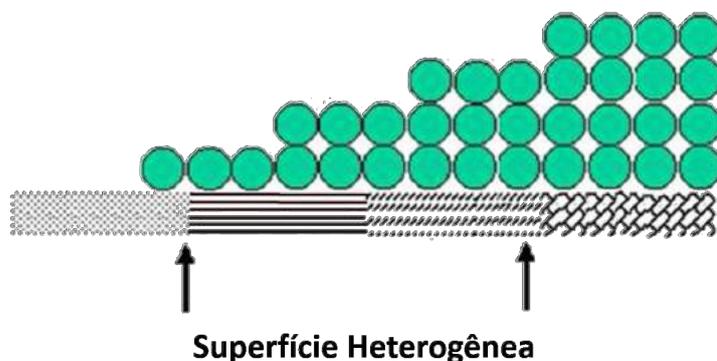


Figura 3.3: Modelo de Freundlich que descreve a adsorção em uma superfície heterogênea. Adaptado da Ref. [100].

A equação que descreve esse modelo no caso de um gás é dada na forma

$$V = K_F P^{\frac{1}{n}} \quad , \quad (3.5)$$

onde V é o volume de gás adsorvido a uma pressão P , $1/n$ é a constante de heterogeneidade da superfície e K_F é a constante está relacionada a capacidade de adsorção de Freundlich. A equação de Freundlich para soluções toma a forma

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad , \quad (3.6)$$

onde q_e é a quantidade de soluto adsorvido, m a massa do adsorvente, C_e é a concentração de soluto no equilíbrio. Em sua forma linear, a equação de Freundlich pode ser obtida pela aplicação do logaritmo em ambos os lados da Equação 3.6, ou seja,

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad . \quad (3.7)$$

A variação de $\log q_e$ como função de $\log C_e$ permite obter as constantes presentes na equação.

Na literatura existem outros modelos de isotermas de adsorção, como por exemplo o modelo de Temkin e Dubinin–Radushkevich [101].

3.3 Cinética de adsorção

A investigação da cinética de adsorção, ou seja, a velocidade com que as moléculas são adsorvidas no material, é de suma importância para conhecer o mecanismo de interação entre o adsorvato e o adsorvente. A velocidade da adsorção depende de alguns parâmetros, como a concentração inicial de adsorvato, temperatura da solução, pH do meio, velocidade de agitação, tamanho dos poros do adsorvente, dentre outros fatores. Existem diferentes modelos cinéticos na literatura que investigam qual mecanismo de adsorção melhor se aplica a um determinado sistema, como os de pseudo primeira ordem, pseudo segunda ordem e o modelo de Morris-Weber, os quais serão apresentados a seguir.

3.3.1 Pseudo primeira ordem

O modelo de cinética de pseudo-primeira ordem, proposto por Lagergren em 1898, foi um dos primeiros modelos a descrever o processo de cinética de adsorção e está relacionado a processos físicos, onde a variação da taxa de adsorção em relação ao tempo como função da capacidade de adsorção [102] é dada na forma

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad . \quad (3.8)$$

Integrando, e aplicando as condições de contorno $t = 0$, $q_t = 0$ e a $t = t$, $q_t = q_t$, obtemos

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2,303}t \quad , \quad (3.9)$$

onde k_1 é a constante da taxa de adsorção de pseudo primeira ordem (min^{-1}), q_e e q_t são as quantidades de soluto adsorvido no equilíbrio e em um instante t (mg/g), respectivamente. As constantes são obtidas por regressão linear, através do gráfico de $\log(q_e - q_t)$ versus t .

3.3.2 Pseudo segunda ordem

O modelo cinético de pseudo segunda ordem foi apresentado por Ho e Mckay, em 1999 [103]. Esse modelo de velocidade está relacionado com a adsorção química, ou quimissorção, ou seja, o processo onde ocorre a partilha ou troca de elétrons entre adsorvente e o adsorvato [103,104]. A equação que descreve esse modelo é dada por

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad . \quad (3.10)$$

Integrando, e aplicando as seguintes condições de contorno $t = 0$, $q_t = 0$ e a $t = t$, $q_t = q_t$, obtemos

$$\frac{1}{q_e - q_t} = \frac{1}{(q_e)} + k_2 t \quad . \quad (3.11)$$

Em sua forma linear, essa expressão pode ser reescrita como

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2(q_e)^2} + \frac{t}{q_e} \quad , \quad (3.12)$$

onde k_2 é a constante da taxa de adsorção de pseudo segunda ordem (min^{-1}), e q_e e q_t são a quantidade de soluto adsorvido no equilíbrio e em um instante t (mg/g), respectivamente. As constantes podem ser obtidas por regressão linear, através do gráfico de $\frac{t}{q_t}$ versus t .

3.3.3 Morris-Weber

O modelo de cinética de Morris-Weber foi proposto em 1963 por Walter J. Weber e J. Carrell Morris [105]. Esse modelo afirma que o processo de adsorção ocorre por meio de difusão do soluto através dos poros de um dado material, no que pode ser chamado de difusão intrapartícula [106]. A equação característica desse modelo diz que a quantidade de soluto adsorvida em um dado tempo t (q_t) varia de acordo com a raiz quadrada do tempo, sendo na forma

$$q_t = k_{id}t^{0,5} + C \quad , \quad (3.13)$$

onde k_{id} (min^{-1}) e C são as constantes de velocidade de difusão intrapartícula.

Dessa forma o modelo diz que ao se aplicar a regressão linear, a reta deve passar pela origem, quando o processo ocorre devido à difusão intrapartícula. Caso contrário, esse mecanismo não é o único parâmetro que controla a adsorção. As constantes são determinadas por regressão linear, através do gráfico de q_t versus $t^{0,5}$.

Neste trabalho, tanto diferentes modelos de isoterma, quanto os de cinética foram aplicados para o estudo de adsorção do DNA na membrana de PS/PANI.

3.4 Métodos de extração e purificação de DNA

A extração e purificação de biomoléculas (DNA, RNA, proteínas, etc) é um procedimento fundamental em laboratórios de biotecnologia, sendo uma etapa inicial em diversas práticas clínicas, como no diagnóstico de doenças, provas forenses, e na identificação de organismo e materiais transgênicos. Para essas análises, inicialmente é feita a coleta de uma amostra biológica, como o sangue, saliva, tecido ou fios de cabelo. Depois da coleta, é preciso liberar todos os componentes da célula (proteínas, RNA, lipídios, entre outros), incluindo o DNA. Dessa forma, ao longo dos últimos anos, diferentes métodos e tecnologias têm sido desenvolvidos para extração de DNA. Esses métodos de extração podem ser classificados como de fase líquida e fase sólida. De forma geral, em princípio ambos os métodos são inicialmente executados com um procedimento conhecido como lise celular, que ocorre em uma série de etapas, na forma [5]:

1. Rompimento da parede celular do material de origem por meio do uso de detergentes (por exemplo, o surfactante SDS) para liberar todos os componentes;
2. A próxima etapa é a desnaturação de complexos nucleoproteicos, utilizando a enzima proteinase K ou outros compostos;
3. Inativação do DNA (usando a enzima DNase) em caso de extração do RNA e inativação do RNA (enzima RNase) na extração do DNA;
4. Após esses procedimentos, a amostra está preparada para a extração do DNA.

A seguir discutimos brevemente alguns métodos de extração de biomoléculas.

3.4.1 Extração por fase líquido - líquido

O método de extração de biomoléculas por fase líquido-líquido, também conhecida como sendo a técnica convencional de extração, se baseia no uso de uma série de solventes orgânicos para a precipitação da molécula de interesse. Esse método é principalmente utilizado na extração de DNA, RNA e proteínas. Geralmente, na extração de DNA se utiliza como solvente orgânico uma mistura de fenol/clorofórmio (1:1) [107,108]. As etapas de extração por fase líquido-líquido podem ser explicadas na forma [109]

1. Inicialmente é feita a lise celular;

2. Posteriormente, uma mistura de fenol-clorofórmio (1:1) é adicionada, e por centrifugação a solução é separada em duas fases (aquosa e orgânica), separadas por uma camada na interface. Na fase aquosa, se encontra o DNA enquanto que na fase orgânica estão contidos os outros resíduos, ficando as proteínas na camada de interface entre as duas fases;
3. Finalmente, o DNA é recuperado por precipitação, utilizando o etanol.

A Figura 3.4 ilustra as etapas de extração e purificação pelo método de fase líquida.

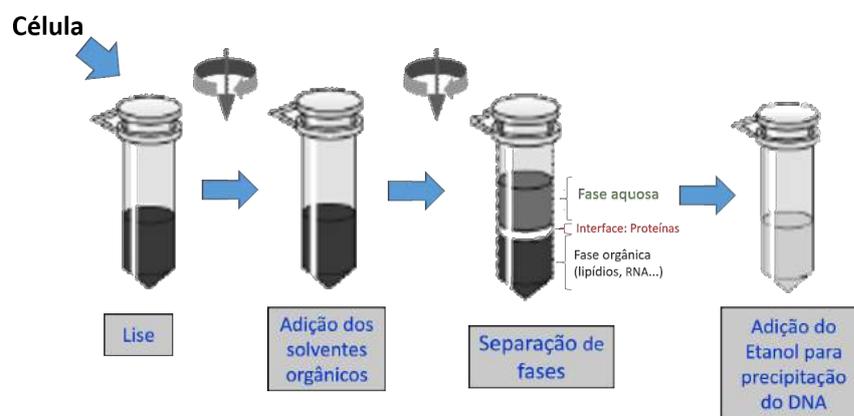


Figura 3.4: Extração de DNA por fase líquido-líquido. Adaptado da Ref. [110]

Esse método é considerado muito eficiente, porém apresenta algumas limitações, como o longo tempo (aproximadamente, 1 hora e meia - 2 horas, dependendo da amostra [111, 112]) envolvido no processo (tanto na separação das fases, quanto na precipitação) e, principalmente, o uso de solventes tóxicos que, além de prejudicarem a saúde humana, podem agredir o ecossistema e contaminar o DNA extraído [113].

3.4.2 Extração e purificação por fase sólida

Atualmente a extração por fase sólida é uma das mais utilizadas para o isolamento do DNA. Esse procedimento se destaca por envolver um processo de maior rapidez e eficiência [114, 115]. Além disso, não é necessário na maioria das vezes o uso de solventes orgânicos tóxicos, o que torna a purificação livre de contaminantes. Na extração de DNA por fase sólida, os procedimentos podem ser realizados com auxílio de um tubo, onde na parte externa encontra-se o material sólido no qual o ácido nucleico será adsorvido. A adsorção do ácido nucleico só será possível com o ajuste das condições do meio (como o pH). Esse material sólido pode ser baseado na tecnologia de sílica, separação magnética,

ou troca iônica. Atualmente podem ser encontrados no mercado kits de extração de ácidos nucleicos que contêm uma coluna com o material sólido e as soluções necessárias para a realização dos procedimentos. Para a escolha correta de um kit de extração, uma série de fatores devem ser considerados, como por exemplo a origem da amostra (sangue, tecido, etc), quantidade de amostras a serem analisadas, pureza, peso molecular do DNA, entre outros.

- **Separação por sílica**

Diferentes kits de extração encontrados no mercado utilizam a sílica como material adsorvente. Esse material pode estar em formato de membranas, ou partículas. A adsorção do DNA na superfície desse material é favorecida pela presença de uma elevada concentração de sais caotrópicos², como por exemplo o perclorato de sódio, que são responsáveis pela desnaturação das proteínas. O princípio da purificação do DNA se baseia na elevada afinidade da estrutura principal do DNA carregado negativamente com as partículas de sílica com carga positiva. As etapas básicas para a extração e purificação do DNA são apresentadas abaixo [116].

1. Inicialmente é feita a lise celular;
2. Por centrifugação, o ácido nucleico é adsorvido na superfície sólida, sendo o sobrenadante com os contaminantes descartado;
3. Adiciona-se a solução de lavagem para garantir a remoção dos contaminantes (a quantidade de lavagem e secagem depende do kit);
4. Por fim, adiciona-se uma solução de eluição de baixa salinidade, para liberar o DNA ligado à superfície sólida, que é coletado na parte inferior do suporte [117].

A Figura 3.5 ilustra as etapas do processo de extração de DNA por fase sólida, utilizando uma matriz de sílica.

²Sais caotrópicos: responsáveis pela quebra de ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e hidrofóbicas.

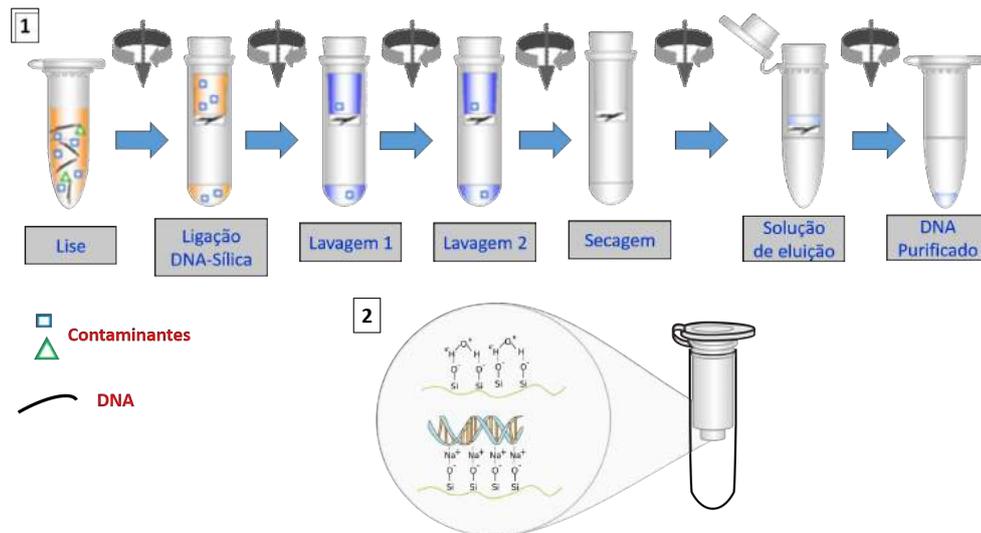


Figura 3.5: Extração de DNA por fase sólida. Etapas do processo (1), DNA ligado ao material (2). Adaptado da Ref. [118].

• Separação magnética

A extração de DNA por separação magnética tem alcançado muito interesse nos últimos anos, pois essa metodologia representa um procedimento simples, rápido e limpo. Nesse método são geralmente utilizadas partículas magnéticas de Fe_3O_4 e γFe_2O_3 [119] revestidas com um composto que possua afinidade com o ácido nucleico como, por exemplo, alguns polímeros condutores (por exemplo, a polianilina) [12]. Os passos realizados com esse sistema são mostrados na Figura 3.6.

1. Lise celular;
2. As partículas magnéticas são adicionadas;
3. Posteriormente, o DNA é adsorvido na superfície das partículas magnéticas e com, auxílio de um ímã, o complexo partículas-DNA é retido na parede do suporte;
4. Em seguida, o sobrenadante com os contaminantes é descartado e adiciona-se a solução de lavagem;
5. Por fim, uma solução de eluição é adicionada para liberar o DNA ligado às partículas magnéticas.

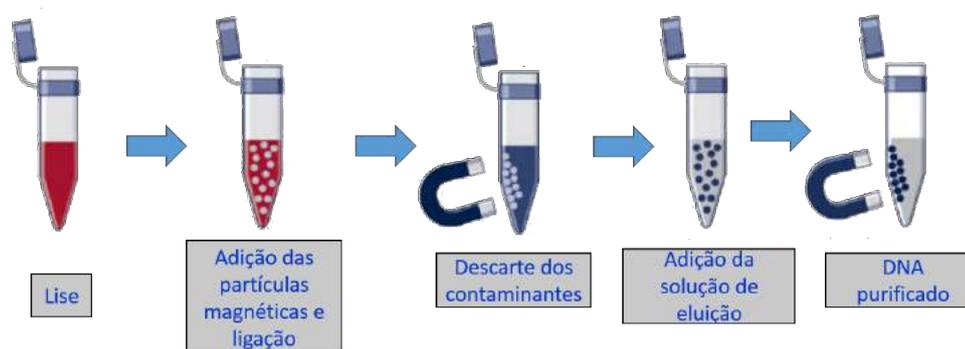


Figura 3.6: Extração de DNA por fase sólida, utilizando partículas magnéticas modificadas. Adaptado da Ref. [120].

3.5 Eletroforese

A técnica de eletroforese em gel é uma metodologia bastante utilizada em diversos laboratórios para a análise do tamanho dos fragmentos de ácidos nucleicos (DNA/RNA) e proteínas. A eletroforese se baseia na migração de uma molécula carregada pelo interior de um gel, sob a influência de um campo elétrico [121]. Um exemplo é o caso da molécula de DNA, que apresenta uma carga líquida negativa devido à presença dos grupos fosfatos; assim, quando exposta à ação de um campo elétrico, ela irá migrar do cátodo para o ânodo [122, 123].

Os géis podem ser preparados com agarose ³ ou pela poliacrilamida. No caso do DNA, o tipo de gel a ser utilizado vai depender do tamanho de fragmentos que se queira visualizar. O gel de agarose é formado pela dissolução desse composto em água fervente, e se torna solidificado com a diminuição da temperatura. Devido a sua alta porosidade (que pode ser ajustada de acordo a concentração usada), geralmente se utiliza o gel de agarose para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb ⁴, enquanto o gel de poliacrilamida é mais usado para a separação de fragmentos pequenos [123].

Para a execução da eletroforese em gel de agarose, inicialmente o gel é preparado utilizando uma solução tampão e uma quantidade de agarose (que depende da concentração desejada). Antes do gel se solidificar, uma quantidade de corante é adicionada ao líquido. Esse corante irá se ligar às bases do DNA, permitindo a visualização por fluorescência dos fragmentos na presença da luz ultravioleta. Quando a temperatura é diminuída (para

³Agarose: polissacarídeo extraído de algas marinhas.

⁴1 kb = 1000 pares de bases.

aproximadamente 50°C), o gel é colocado em um recipiente, onde se encontra um acessório acoplado, responsável pela criação dos poços onde serão depositadas as amostras. Após a solidificação, o gel é transferido para a cuba de eletroforese e uma quantidade de solução tampão anteriormente preparada é adicionada à cuba, até ocorrer a imersão do gel solidificado. Em seguida, retira-se o acessório com cautela, para que não haja a quebra dos poços formados. Posteriormente, as amostras de DNA a serem analisadas são colocadas com cuidado dentro de distintos poços, juntamente com um corante que permite aumentar a densidade da amostra (esse corante impede que a amostra saia do poço). Além disso, uma amostra de DNA padrão, com tamanhos de fragmentos conhecidos, também é adicionada para fins de comparação ao final do procedimento. Depois disso, a tampa da cuba é fechada e os eletrodos positivos e negativos são conectados à fonte. Em seguida a fonte é ligada, aplicando uma voltagem de 1 a 5 V por centímetro, um valor que depende da distância dos eletrodos da fonte. Neste momento, a amostra de DNA sairá do poço e penetrará no poros do gel, migrando do lado negativo para o positivo. Ao longo dessa corrida, os fragmentos menores migram mais rapidamente do que os maiores. A fonte de alimentação é desligada após certo tempo, a depender do tamanho de fragmento que se queira analisar. Após o desligamento, o gel é então transferido para um equipamento conhecido como transiluminador [123]. Na Figura 3.7 é mostrada a cuba de eletroforese em configuração horizontal (pode ser encontrada também em configuração vertical), com o gel e as amostras imersas nos poços (1). Além disso, também se mostra o gel após a migração, com indicação de separação dos fragmentos (2).

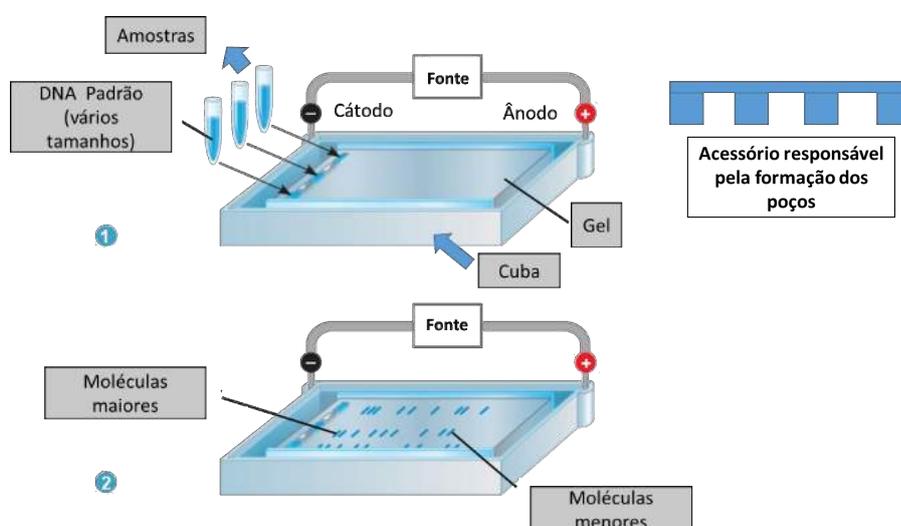


Figura 3.7: Cuba de eletroforese. Adaptado da Ref. [124].

3.6 Aplicação do DNA

Após sua purificação, o DNA obtido pode ser utilizado em diversas aplicações, como por exemplo, nas ciências forenses. Quando uma amostra é recebida para análise, inicialmente o DNA é extraído e purificado por meio de algum dos métodos que foram apresentados anteriormente. Geralmente, após a purificação a quantidade de DNA obtida é insuficiente para análise laboratorial, e dessa forma se faz necessária a amplificação dessa amostra. A amplificação é possível através da utilização um método conhecido como reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction). A seguir apresentaremos uma breve explicação sobre essa técnica.

3.6.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A técnica de reação em cadeia de polimerase foi desenvolvida por Kary Mullis, em 1983 [125]. Essa técnica permite a repetição de um único segmento de DNA específico diversas vezes, em inúmeras cópias idênticas, a partir de uma mistura de moléculas de DNA. Atualmente, a técnica de PCR é bastante utilizada em laboratórios médicos e de biologia molecular para testes de diagnóstico, análises forenses, entre outras aplicações. Para executar esta técnica é basicamente necessário utilizar iniciadores (primers) de DNA e uma enzima especial conhecida como DNA polimerase, nucleotídeos e uma solução tampão. A sequência de etapas para execução da reação em cadeia polimerase é resumida a seguir. Essa sequência acontece em ciclos, sendo que a quantidade necessária de ciclos depende da quantidade de cópias de interesse [126, 127].

1. Inicialmente, uma pequena quantidade de solução contendo a amostra de DNA (cadeia dupla) é aquecida (até aproximadamente 94°C), com o intuito de quebrar as ligações de hidrogênio e desnaturar o DNA (formando duas cadeias de DNA simples);
2. No próximo passo, a temperatura é reduzida (geralmente para 40°C a 65°C), e os iniciadores se ligam ao DNA de cadeia simples (processo conhecido como hibridização). Deve ser lembrado que os iniciadores utilizados são complementares às sequências de bases específicas de ambos os lados da sequência de DNA;
3. Em seguida, a temperatura é aumentada para cerca de 72°C , permitindo assim que

o enzima DNA polimerase inicie uma síntese para complementar a cadeia de DNA com os nucleotídeos presentes na solução, de que resultam em moléculas de DNA de cadeia dupla.

Caso o processo de PCR não seja interrompido, as etapas, 1,2 e 3 podem ser repetidas n vezes em ciclo contínuo, aumentando exponencialmente (2^n) o número de cópias idênticas da mesma cadeia de DNA inicial. Depois de terminada a amplificação, a amostra obtida é analisada por meio de outras técnicas e procedimentos para determinar o perfil genético de DNA alvo (como, por exemplo, o sequenciamento e a eletroforese). A Figura 3.8 mostra as etapas descritas anteriormente.

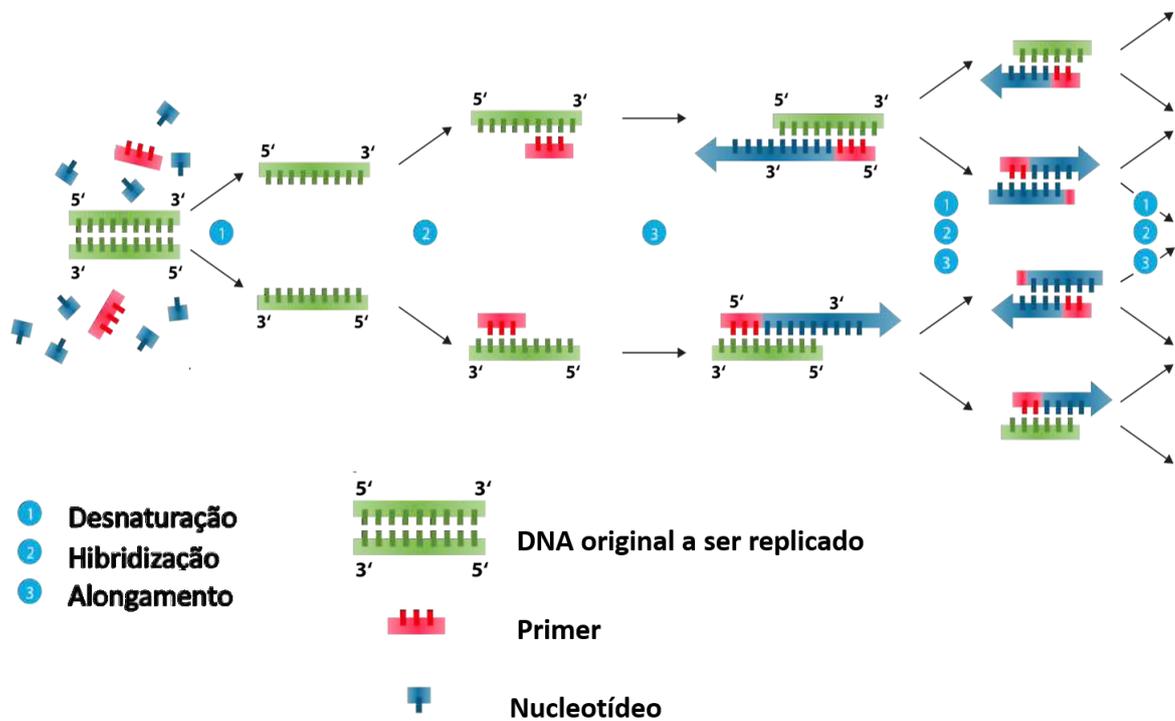


Figura 3.8: Reação em cadeia polimerase. Adaptado da Ref. [128].

Todos os conceitos apresentados neste capítulo foram de fundamental importância para o conhecimento básico sobre processos de adsorção. Além disso, foram mostradas algumas tecnologias usadas para extração e purificação de DNA. No próximo capítulo serão relatadas as diferentes técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho.

Fundamentos das técnicas de caracterização

Neste capítulo apresentaremos uma revisão básica sobre as diferentes técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho.

4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica fundamental para análise da superfície de materiais microestruturadas, podendo ser utilizada para o acompanhamento das diferentes fases de produção. Essa análise permite conhecer o material detalhadamente por meio da obtenção de imagens com alta resolução ($> 100\ 000$ vezes, dependendo do equipamento), permitindo um melhor entendimento sobre suas propriedades e também a observação de eventuais defeitos estruturais (como os grânulos na superfície das fibras de poliestireno, mostrada na Seção 2.4.1.3). Atualmente, essa técnica tem sido utilizada em diferentes áreas, como a química, ciências dos materiais e biologia.

O princípio de funcionamento do MEV é baseado na incidência de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro ($\sim 100\text{\AA}$). Esse feixe provém geralmente de uma fonte catódica de tungstênio, e os elétrons são subsequentemente acelerados através de um ânodo e, por meio de um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser direcionado de tal forma a varrer a superfície da amostra. Quando o feixe atinge a superfície da amostra, ocorre uma série de eventos, tais como a emissão de elétrons secundários e elétrons retroespalhados, raios-X, elétrons Auger e fótons, entre outros. Esse fenômeno fornece dados sobre a natureza da amostra, como a topografia da superfície e sua composição. O sinal, que é recolhido por um detector, pode ser transformado em sinal de vídeo para o computador, permitindo assim a observação da imagem [129, 130].

Basicamente, o equipamento utilizado na caracterização por microscopia eletrônica de varredura é composto por uma coluna ótica, um sistema de vácuo, eletrônica e software [131]. A Figura 4.1 ilustra alguns dos componentes que compõem o microscópio eletrônico de varredura.

Uma discussão detalhada sobre o princípio de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura pode ser encontrado na Ref. [132].

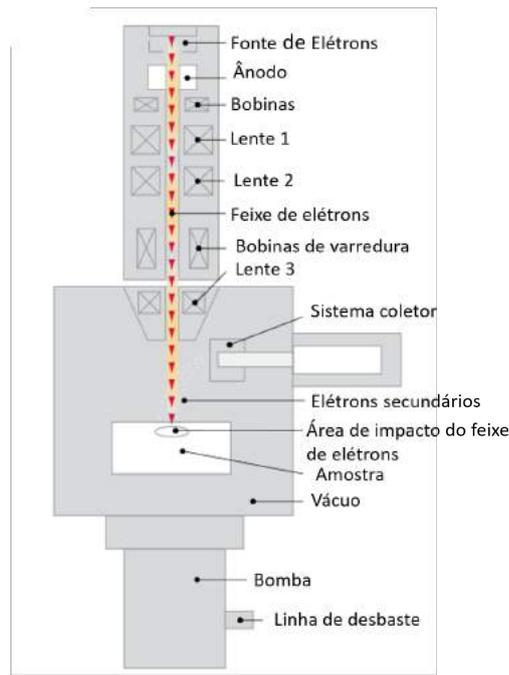


Figura 4.1: Componentes de um microscópio eletrônico de varredura. Adaptado da Ref. [131].

Para caracterização por MEV, inicialmente a amostra a ser analisada deve ser devidamente revestida por uma camada de uma substância condutora (caso a amostra já seja intrinsecamente condutora, não há necessidade dessa preparação). Isso se faz necessário, uma vez que se as amostras não fossem condutoras elas poderiam absorver os elétrons e acumular uma carga líquida negativa, o que repeliria o feixe de elétrons [133]. Dessa forma, a metalização é necessária para conduzir os elétrons ao fio terra conectado ao porta amostra.

4.2 Ângulo de contato

A molhabilidade de um material sólido pode ser definida como a tendência que um líquido tem de se espalhar por sua superfície. O grau de molhabilidade da superfície de um dado material pode ser investigado através da medida de ângulo de contato (θ). Essa

caracterização é de fundamental importância em distintas aplicações, do que é exemplo importante a indústria de embalagens, que utiliza materiais com baixa energia superficial (como determinados tipos de plástico) e necessita aplicar um acabamento ao produto, como impressão ou até mesmo um revestimento de tintas [134]. Neste caso, o ângulo de contato do líquido tem que ser mínimo, para obtermos um perfeito espalhamento no material. A determinação do ângulo de contato também se faz necessário quando do uso da aplicação industrial de diferentes produtos derivados do petróleo (óleo, gasolina, etc), como por exemplo, processamento de certos materiais como o aço [135, 136].

O cálculo do ângulo de contato pode ser realizado por meio de uma equação matemática proposta por Thomas Young em 1805 [137]. Essa equação relaciona a ação de três tensões de superfície entre as interfaces sólida (S), líquida (L) e vapor (V), na forma

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad , \quad (4.1)$$

onde γ_{LV} , γ_{SV} , γ_{SL} , indicam as tensões interfaciais entre o líquido - vapor, sólido - vapor e sólido - líquido, respectivamente. Na Figura 4.2 é representado um material que tem afinidade por um líquido, caso em que o ângulo de contato será menor que 90° , quando o material é então denominado como hidrofílico. Por outro lado, quando temos um ângulo maior do que 90° e menor do que 150° , a superfície é considerada hidrofóbica, e para ângulos maiores que 150° , o material é dito superhidrofóbico.

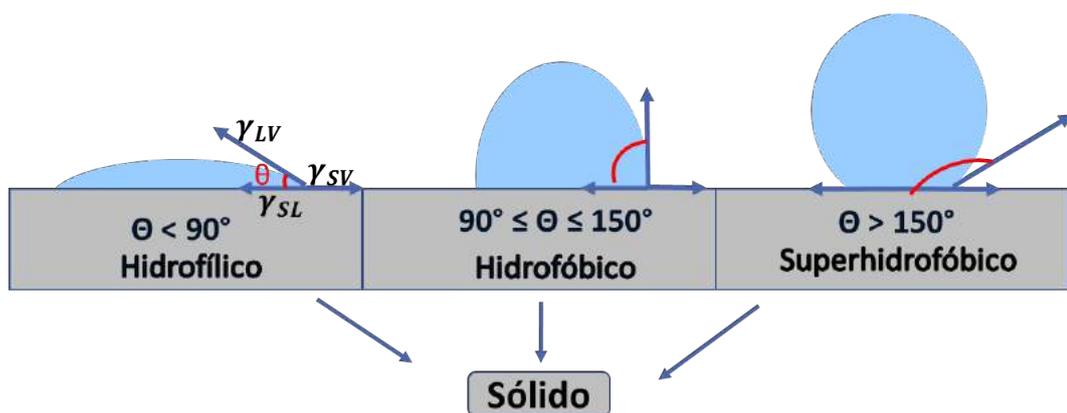


Figura 4.2: Representação de superfícies hidrofílica, hidrofóbica e superhidrofóbica. Adaptado da Ref. [138].

A tensão superficial é um fator determinante para a forma que toma a gota de um líquido. Para exemplificar isso, consideremos uma gota de água, como representado na Figura 4.3. As moléculas de água situadas mais próximas do centro da gota estão rodeadas

de moléculas vizinhas, o que faz com que haja atração sobre elas a partir de todas as direções. No entanto, as moléculas que estão na superfície terminam por serem puxadas para o interior. Com isso, o líquido se contrai em sua superfície para alcançar a situação de menor energia, formando gotas esféricas [138]. O mecanismo responsável pela contração da gota contrair é denominado de tensão superficial.

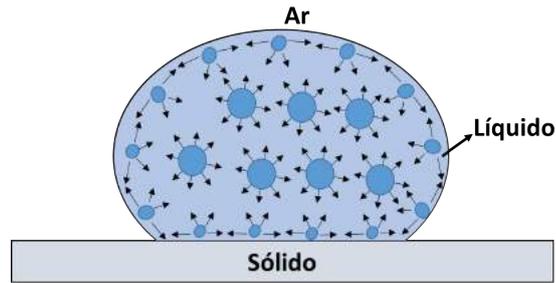


Figura 4.3: Moléculas de um líquido interagindo entre si. Adaptado da Ref. [138].

O equipamento usado para por medir o ângulo de contato é composto basicamente por uma fonte de luz, uma vídeo-câmera, uma seringa e um computador, como mostrado na Figura 4.4. Inicialmente, a vídeo-câmera captura a imagem da gota do líquido que é liberada pela seringa na superfície do material, sendo em seguida o ângulo calculado por meio de um software, com base na equação de Young.

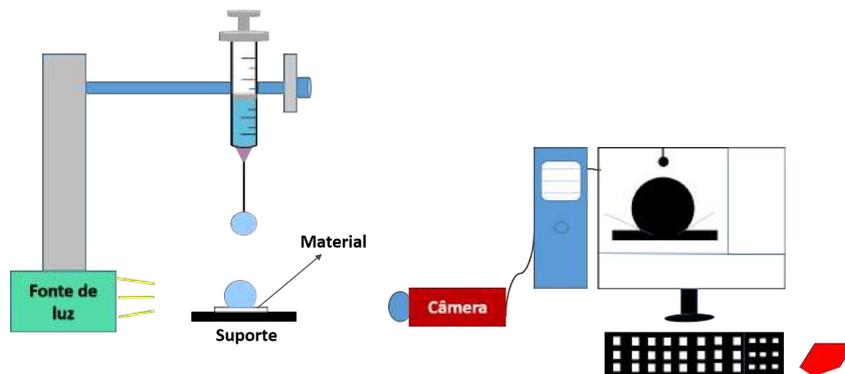


Figura 4.4: Esquema do equipamento medidor de ângulo de contato.

O ângulo de contato entre um líquido e um sólido pode ser diminuído através da aplicação de diferentes técnicas que permitam o aumento da energia de superfície dos materiais e, conseqüentemente, o aumento de sua molhabilidade. Na próxima seção, será discutido o tratamento a plasma, uma técnica eficiente capaz de alterar as características de uma superfície sólida.

4.2.1 Tratamento a plasma

O parâmetro que determina o grau de molhabilidade de um dado material é a polaridade elétrica de suas moléculas. Essa polaridade resulta das diferenças de eletronegatividade entre os átomos das moléculas e a geometria [139]. Na Figura 4.5 é mostrada uma variedade de materiais de acordo com seu grau de polaridade.



Figura 4.5: Relação de polímeros de acordo com o grau de polaridade. Adaptado da Ref. [140]

Um das técnicas que promovem o aumento dessa energia superficial e permitem a melhora da adesão dos materiais é o tratamento a plasma. O plasma pode ser considerado como o quarto estado da matéria (juntamente com os estados sólido, líquido e vapor) formado por um gás ionizado composto por elétrons, íons e átomos neutros. A base para a formação do plasma deve-se ao aquecimento de um gás, que pode induzir a dissociação das moléculas em seus átomos com radicais constituintes e também à ionização das moléculas ou átomos do gás, transformando-o em um plasma com partículas neutras, íons e elétrons [141]. O tratamento a plasma é utilizado não só para melhorar a adesão, mas também em processos de limpeza de superfícies (como na preparação de um material antes de colagens), em biomateriais (na esterilização de superfícies), entre outras aplicações. No tratamento a plasma para aumentar a adesão, o gás ionizado ativa a superfície do material, alterando suas propriedades e características. No caso de um material polimérico, a ativação ocorre através da quebra de ligações fracas no polímero, permitindo a adição de grupos altamente reativos, como o carbonilo, carboxilo ou hidroxilo [142]. Um exemplo do efeito do plasma em um polímero pode ser visto na Figura 4.6, onde é mostrada a cadeia principal do poliestireno. A estrutura desse polímero é composta por carbonos e hidrogênios, que apresentam eletronegatividade similar, o que faz com que o material

seja considerado como um polímero apolar, ou seja, hifrofóbico [143]. Após a exposição ao plasma, a cadeia principal do poliestireno é rompida, permitindo a adição de grupos funcionais [144].

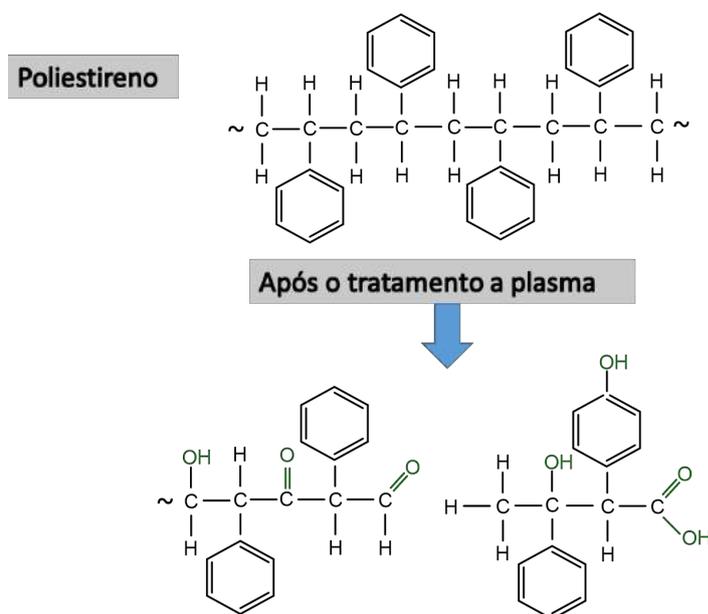


Figura 4.6: Estrutura do poliestireno após do tratamento a plasma: quebra das ligações apolares do poliestireno possibilita a adição de grupos funcionais polares. Adaptado da Ref. [144].

4.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visível

A espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica muito utilizada para examinar a absorção de luz por compostos orgânicos e inorgânicos, possibilitando a análise quantitativa (como a concentração de uma determinada substância) da composição de um determinado material [145]. A incidência da radiação eletromagnética permite a excitação de elétrons dos átomos e moléculas a partir de níveis de energia mais baixos (estado fundamental) para os mais elevados, ou seja, quando uma molécula absorve energia, um elétron é promovido de um nível ocupado para um nível desocupado de maior energia; quando o elétron retorna para ao seu nível original, ocorre a emissão de radiação. No caso da radiação na faixa do ultravioleta-visível, a absorção corresponde a transições entre níveis de energia eletrônicos [146,147]. Por exemplo, as possíveis transições eletrônicas de uma molécula conjugada estão representados na Figura 4.7.

O espectro no UV-vis representa apenas uma pequena faixa do espectro eletromagnético (190-780)nm, que inclui outras formas de radiação, tais como ondas de rádio,

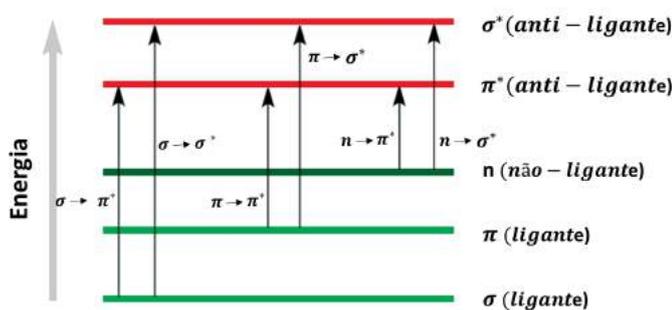


Figura 4.7: Possíveis transições eletrônicas. Adaptado da Ref. [146]

infravermelho (IV), raios X e raios γ (ver Figura 4.8).

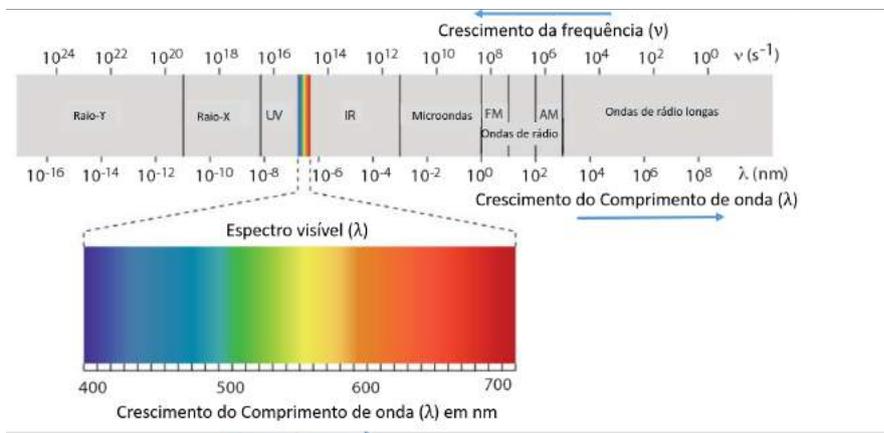


Figura 4.8: Espectro eletromagnético. Adaptado da Ref. [148].

A absorvância (Ab) pode ser relacionada com a concentração de uma substância em solução, o que permite a análise quantitativa. A relação entre esses dois parâmetros é conhecida como Lei de Beer-Lambert [146], que pode ser escrita como

$$Ab = \varepsilon cl \quad , \quad (4.2)$$

onde Ab é a absorvância medida, ε é o coeficiente de absorção da amostra e l é o comprimento óptico (distância percorrida na amostra).

O equipamento que possibilita a realização de medidas de espectroscopia UV-Vis é conhecido como espectrofotômetro. Basicamente, esse equipamento é composto por uma fonte de luz, um monocromador, compartimento de amostras e um detector. A Figura 4.9 ilustra duas configurações de espectrofotômetro: em (1), temos um modelo convencional de feixe único e em (2), o de feixe duplo, onde neste caso são comparados os espectros de uma solução de referência e da amostra.

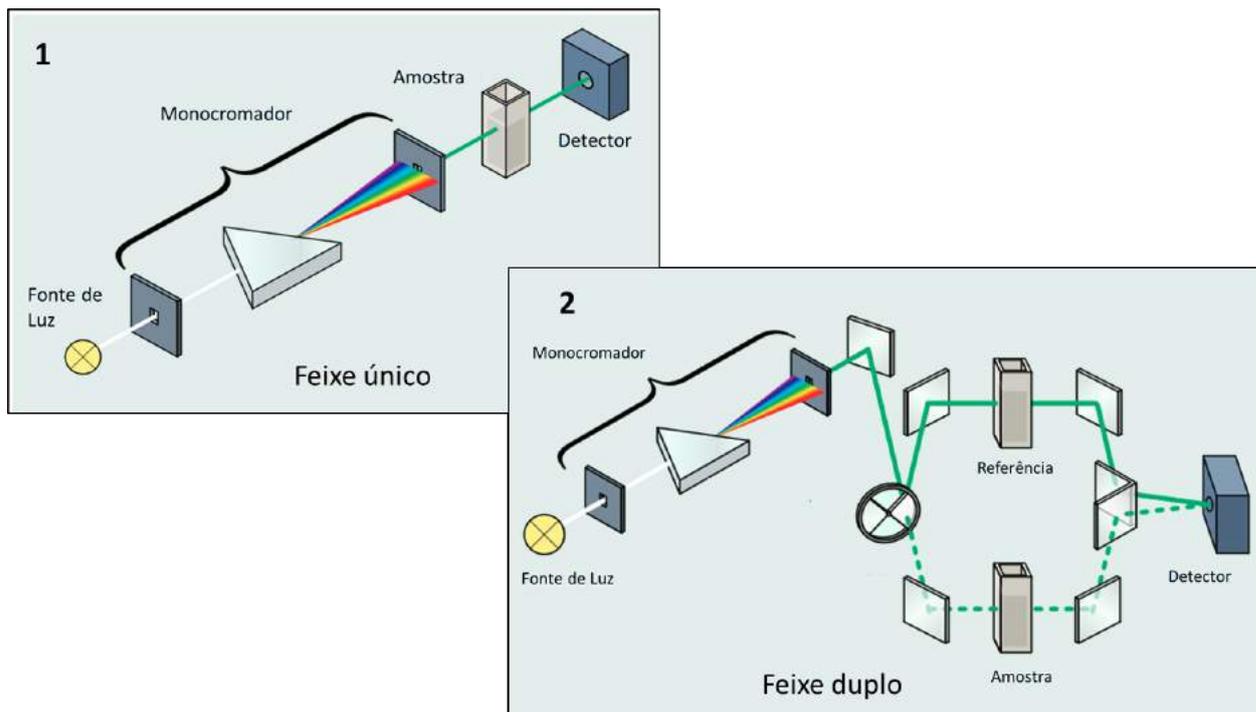


Figura 4.9: Esquema de distintos espectrofotômetros. (1) feixe único e (2) feixe duplo. Adaptado da Ref. [149]

Como exemplo, o espectro UV-vis da polianilina é mostrado na Figura 4.10. Como discutido na Seção 2.3.2, esse polímero condutor varia sua coloração de acordo com seu estado de oxidação. Na Figura 4.10 a curva espectral da PANI é mostrada em três diferentes estados. A base leucoesmeraldina, que é o estado totalmente reduzido ($y=1$) da PANI, apresenta um pico de absorção em 343 nm, que está relacionado à transição $\pi - \pi^*$. O estado de oxidação base esmeraldina ($y=0,5$) apresenta um pico em 330 nm, também atribuído à transição $\pi - \pi^*$, e uma segunda banda em 637 nm, que está relacionada com a transferência de carga. Finalmente, o estado pernigranilina (estado totalmente oxidado, $y=0$) apresenta uma banda em 330 nm, que é atribuída a transição $\pi - \pi^*$, além dos picos em 283 nm e 530 nm [150, 151].

Em biotecnologia, a espectroscopia UV-Vis é geralmente utilizada para a determinação da concentração de DNA, RNA e proteínas em solução. Os ácidos nucleicos, em especial, apresentam uma forte absorção na região de $\lambda = 260$ nm (valor médio). Essa absorção se deve à transição eletrônica $\pi - \pi^*$ nos anéis das bases nitrogenadas pirimidina (citosina, timina e uracila) e purina (adenina e guanina) [152, 153]. Como explicado na Seção 2.2, um aumento na temperatura da solução de DNA provoca desnaturação, ou seja, a dupla hélice do DNA se desfaz, resultando em duas cadeias simples. Esse acontecimento

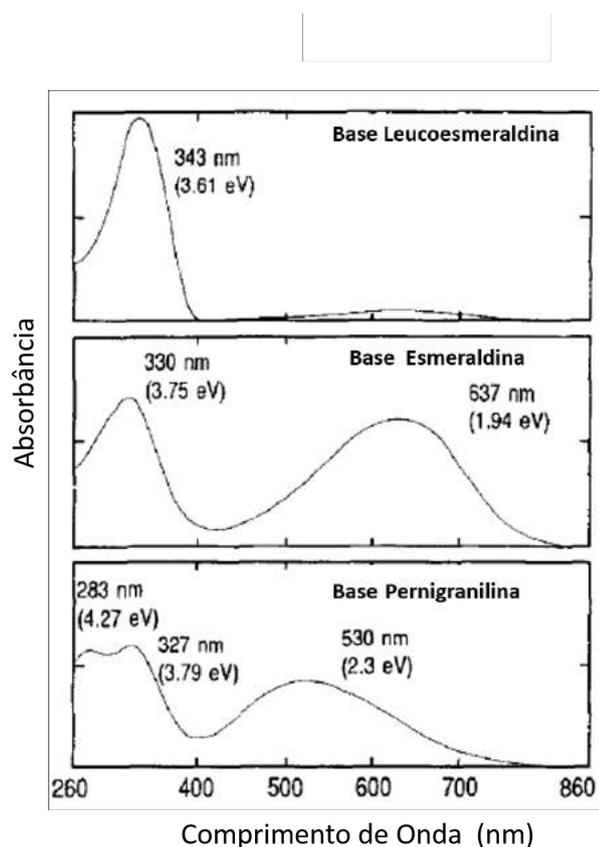


Figura 4.10: Espectro de absorção da PANI em três diferentes estados de oxidação. Adaptado da Ref. [151].

pode ser comprovado ao ser observado um aumento do pico de absorbância (em 260 nm), quando comparado com a absorbância da solução original (não aquecida), em um fenômeno conhecido como hipocromismo. A diminuição da absorbância do DNA em dupla hélice deve-se ao empilhamento das bases que compõem sua estrutura, e quando a ligação de hidrogênio é rompida (originando o DNA de cadeia simples) o pico de absorção tende a aumentar. A absorbância ainda é mais alta para cada base individualmente [153, 154]. No espectrofotômetro utilizado para análise do DNA, a absorbância é igual a 1 para a concentração de 50 nanogramas por microlitros no caso do DNA em fita dupla, enquanto que esse mesmo valor de absorbância equivale a 33 nanogramas por microlitros para o DNA em fita simples [155].

4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A caracterização por espectroscopia no infravermelho (IV) é uma técnica que possibilita a identificação e análise dos compostos químicos que compõem um determinado material. Ao contrário da espectroscopia UV-Vis, que é baseada em uma detecção da energia associada a transições eletrônicas, a espectroscopia de infravermelho detecta a energia relativa às vibrações dos átomos de uma molécula [156]. A radiação infravermelha (IV) se localiza entre as regiões do visível e microondas e pode ser classificada em três regiões distintas: infravermelho distante ($< 400 \text{ cm}^{-1}$), infravermelho médio (400 à 4000 cm^{-1}) e infravermelho próximo (4000 à 13000 cm^{-1}) [157].

O princípio de funcionamento do equipamento responsável por esta caracterização se baseia na interferência entre dois feixes de radiação. O esquema dos componentes de um espectrômetro de infravermelho é mostrado na Figura 4.11. Basicamente o funcionamento desse equipamento pode ser explicado na seguinte forma: inicialmente, um feixe de luz infravermelha é direcionado para um interferômetro (geralmente, do tipo Michelson), onde neste momento ocorre a divisão do feixe. Uma metade desse feixe é transmitida para um espelho fixo, enquanto a outra metade é refletida para um espelho móvel. Em seguida, o feixe é recombinado no divisor de feixes, indo atingir posteriormente a amostra. Após a passagem através da amostra, o sinal em forma de interferograma é detectado. Esse sinal é produzido como uma função da mudança de comprimento da trajetória entre os dois feixes [158]. Posteriormente, esse interferograma é transformado de analógico para digital. Os dados então passam por um tratamento matemático de séries de Fourier, que é realizada no computador, para obter o espectro [159, 160]. O espectro obtido relaciona a transmitância (Tr) ou absorbância (Ab) em função do número de onda. A Tr e Ab são expressas na forma

$$Tr = \frac{I_0}{I} \cdot 100 \quad (4.3)$$

$$Ab = \log \frac{I_0}{I} \quad , \quad (4.4)$$

onde I_0 é a intensidade da luz incidente I é a intensidade de luz transmitida.

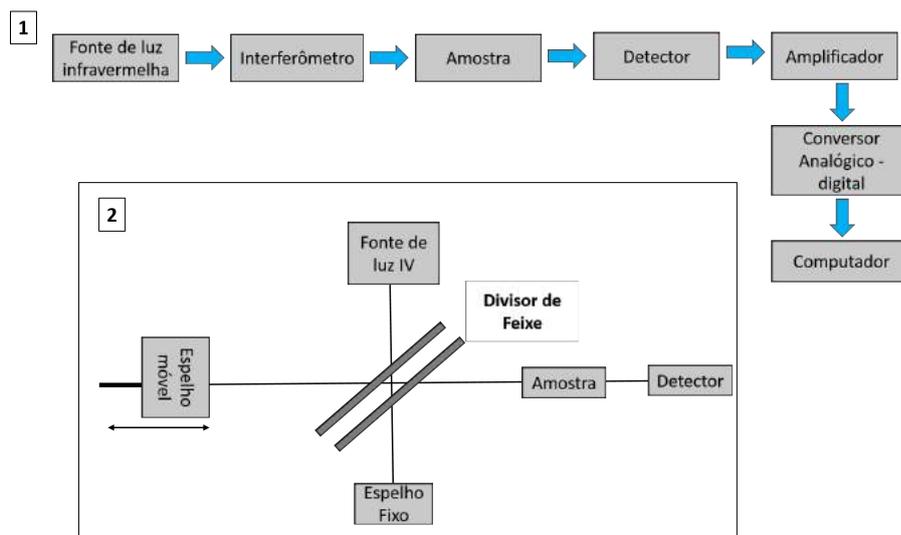


Figura 4.11: Componentes de um espectrômetro FTIR (1) e o interferômetro de Michelson (2). Adaptado da Ref. [156,159].

Esta revisão sobre as diferentes técnicas de caracterização nos trouxe a base de conhecimento necessária para o bom desenvolvimento do trabalho. No próximo capítulo serão discutidos os procedimentos realizados para a produção, caracterização e aplicação do material proposto neste trabalho.

Materiais e Métodos

Neste capítulo, serão apresentados os materiais e as metodologias utilizadas para a produção das membranas de poliestireno e o posterior revestimento com a polianilina, além dos procedimentos necessários para a caracterização e aplicação desse material.

5.1 Materiais

Poliestireno (PS) (PM=280 kDa), persulfato de amônio (APS), dodecil sulfato de sódio (SDS) e o DNA de esperma de salmão foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Dimetilformamida (DMF) e o hidróxido de Sódio (NaOH) foram obtidos da Dinâmica (Brasil). O ácido clorídrico (HCl) foi comprado da Química Moderna (Brasil) e a anilina ($C_6H_5NH_2$), o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e bibásico (Na_2HPO_4) foram adquiridos da Nuclear, uma empresa brasileira. A glicina ($C_2H_5NO_2$), foi comprada na Promega (EUA), enquanto que o corante SYBR Green foi fornecido pela Thermo Fisher Scientific (EUA). Todos os reagentes foram utilizados tal como recebidos, com exceção do monômero de anilina, que foi destilado sob pressão reduzida, antes do uso. Em todos os experimentos utilizamos água após passagem por um sistema de purificação (Millipore, EUA).

5.2 Preparação das membranas de poliestireno

As membranas de PS foram preparadas através da técnica de eletrofição. O procedimento usado para a produção deste material pode ser detalhado da seguinte forma: inicialmente, preparamos a solução polimérica dissolvendo 2 g de PS em 10 mL de DMF em um frasco de laboratório (15 mL). Posteriormente, transferimos o frasco com a solução para um recipiente submetido a um agitador magnético, onde permaneceu durante 24 ho-

ras a uma temperatura de 85°C. Todo o procedimento de preparação foi cuidadosamente realizado em uma capela. Depois disso, adicionamos um volume de 2 mL da solução a uma seringa de 3 mL (Beckton Dickinson, EUA), que foi subsequentemente acoplada uma agulha metálica. O aparato experimental foi montado em uma configuração horizontal, utilizando uma bomba de seringa NE-4000 (New Era, EUA), como mostrado na Figura 5.1.

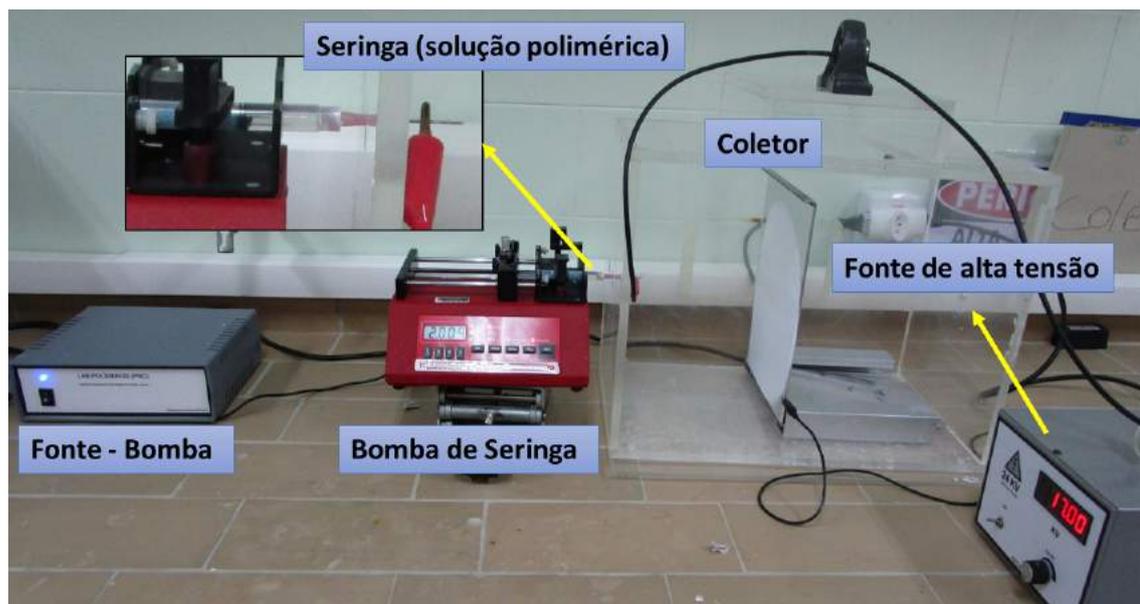


Figura 5.1: Equipamentos utilizados para o processo de eletrofição.

Para produzir a diferença de potencial entre a agulha e o coletor, usamos uma fonte de alta tensão de fabricação caseira, com o eletrodo positivo conectado na agulha e o eletrodo negativo no coletor, que estava revestido por uma folha de alumínio. Os parâmetros ajustados para a execução da técnica de eletrofição foram: distância de 15 cm entre a agulha e o coletor, fluxo de 0,5 mL/h e uma voltagem de 17 kV. Ao todo, o processo de produção da membrana leva aproximadamente 4 horas, nestas condições. Ao término do processo, transferimos a folha de alumínio juntamente com a membrana para uma capela, onde permaneceu por 12 h à temperatura ambiente, permitindo assim a completa evaporação do solvente.

Após a secagem, o material passou por um tratamento térmico-mecânico, a fim de melhorar as propriedades física e mecânica. Para isso, recobrimos a membrana com um papel alumínio e a pressionamos usando um peso de aproximadamente 2 kg. Este sistema foi colocado em uma estufa de laboratório a 80°C, onde permaneceu por 24 h (ver Figura 5.2a). Finalmente, a membrana foi cortada em quadrados, de dimensões 3 cm x 3 cm e,

em seguida, cada um deles foi pesado (ver Figura 5.2b).

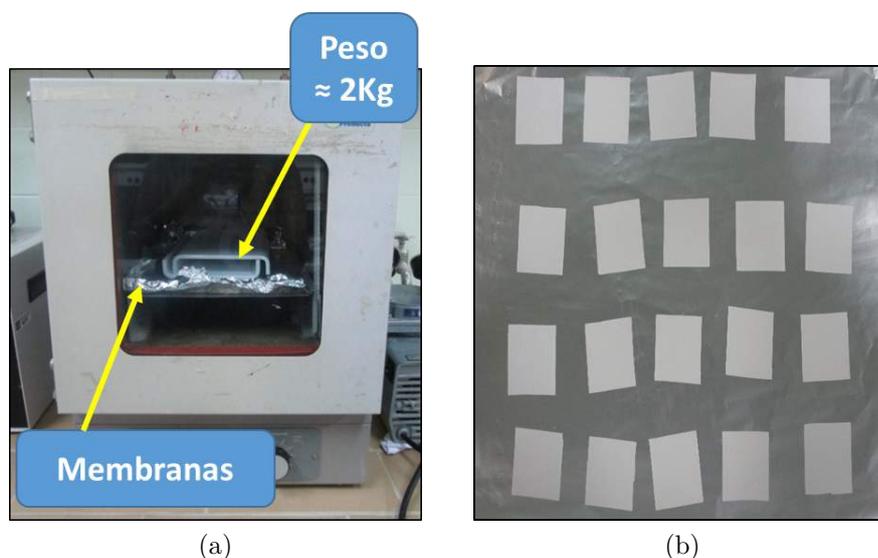


Figura 5.2: Em (a) mostramos a estufa utilizada para o tratamento térmico e em (b) as membranas devidamente padronizadas com dimensão 3 cm x 3 cm após o tratamento.

5.3 Revestimento com polianilina

Após o tratamento térmico-mecânico, a superfície da membrana de PS foi subsequentemente revestida com PANI, obtida segundo um processo de polimerização química *in situ* da anilina em meio aquoso. A princípio, para favorecer o crescimento da PANI na superfície da membrana de PS, modificamos as características de molhabilidade dessa última, de modo que passasse de hidrofóbica para hidrofílica (como explicado na seção 2.1.1.1, o poliestireno possui um caráter hidrofóbico).

Dessa forma, a membrana foi tratada por plasma de ar, utilizando um equipamento de limpeza por plasma PDC-002, fabricado pela Harrick (EUA). As membranas de PS foram expostas ao plasma durante 3 min, tempo necessário para a membrana se tornar totalmente hidrofílica. Esta exposição provoca, por exemplo, a quebra das ligações de hidrogênio da estrutura do poliestireno, possibilitando a adição de grupos funcionais polares. A seguir são listadas os testes realizados para a escolha do protocolo de revestimento da PANI, onde em dois diferentes béqueres foram usados:

- **Protocolo 1:** 37,5 ml de HCl 1M, 0,52 mmol de anilina, membrana de PS tratada a plasma;

- **Protocolo 2:** 37,5 ml de HCl 1M, 0,52 mmol de anilina, membrana de PS apenas tratada termicamente.

Depois disso, transferimos os recipientes para uma placa agitadora e, após 15 min, adicionamos 12,5 ml de HCl 1M contendo 0,33 mmol de APS (agente oxidante que dará início à polimerização da anilina), em todos os recipientes. O processo de polimerização ocorreu em um ambiente a 5°C, durante 12 horas. Dessa forma, ao término da polimerização, as membranas foram lavadas várias vezes com água deionizada e secadas à temperatura ambiente, e em seguida pesadas. Na Figura 5.3 são mostradas as etapas para o revestimento da membrana de PS.

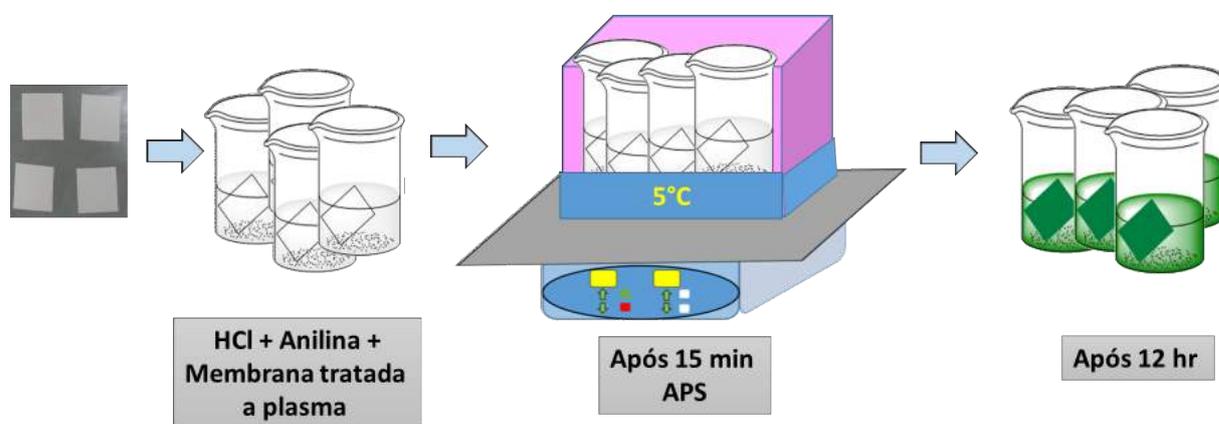


Figura 5.3: Etapas para o revestimento da membrana de PS.

5.4 Métodos de caracterização

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica e a determinação do diâmetro das fibras foram realizadas usando o microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG (FEI, EUA) da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram preparadas e em seguida fixadas em um porta amostras (stubs), com o auxílio de uma fita de carbono, como mostrado na Figura 5.4. Depois disso, as amostras foram metalizadas utilizando uma metalizadora SC-701 (SANYU ELECTRON, China) do Departamento de Química Fundamental (DQF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), quando uma camada de 20 nm de ouro foi depositada em cada amostra.

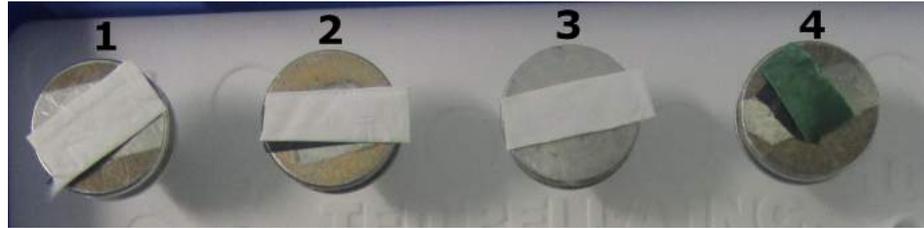
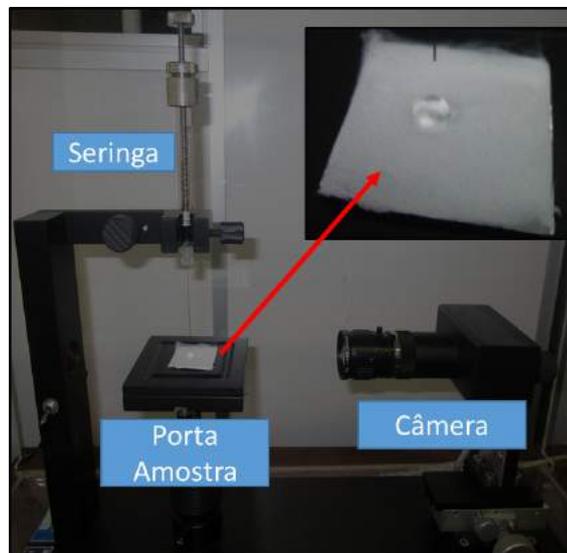


Figura 5.4: Amostras fixadas em um suporte. Em 1 e 2 temos a membrana de PS original e com tratamento térmico, respectivamente, em 3 com tratamento a plasma e em 4 a membrana revestida com polianilina.

5.4.2 Ângulo de contato

Com o intuito de estudar o grau de molhabilidade das membranas, medimos o ângulo de contato de gotas de água na superfície das membranas. Para isso, esse ângulo foi determinado em 5 regiões distintas da superfície, sendo o valor final considerado como a média aritmética dos valores encontrados. Essa caracterização foi feita na superfície das membranas de PS recém preparadas por eletrofição, após os tratamentos térmico-mecânico e por plasma, e também após serem revestidas com PANI. O instrumento utilizado para esse fim foi um medidor de ângulo de contato CAM 100 (KSV, Finlândia).



(a)

Figura 5.5: Foto do equipamento usado para estimar o ângulo de contato.

5.4.3 Espectroscopia UV-VIS

A PANI apresenta uma mudança de cor de acordo com o seu estado de oxidação, o que é uma característica pouco comum entre os polímeros condutores. Neste trabalho, a PANI

foi utilizada na forma dopada, ou seja, no estado sal esmeraldina (verde). Para corroborar a presença deste polímero condutor na membrana de PS, realizamos a caracterização por espectroscopia UV-VIS, utilizando o espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão), mostrado na Figura 5.6. Na Figura 5.6 também apresentamos o compartimento onde as amostras são fixadas. Para obter o espectro da PANI, inicialmente fixamos uma amostra de referência (membrana de PS) e a amostra de interesse (membrana de PS/PANI). As membranas foram ajustadas de tal forma que o feixe de luz as atravessasse.

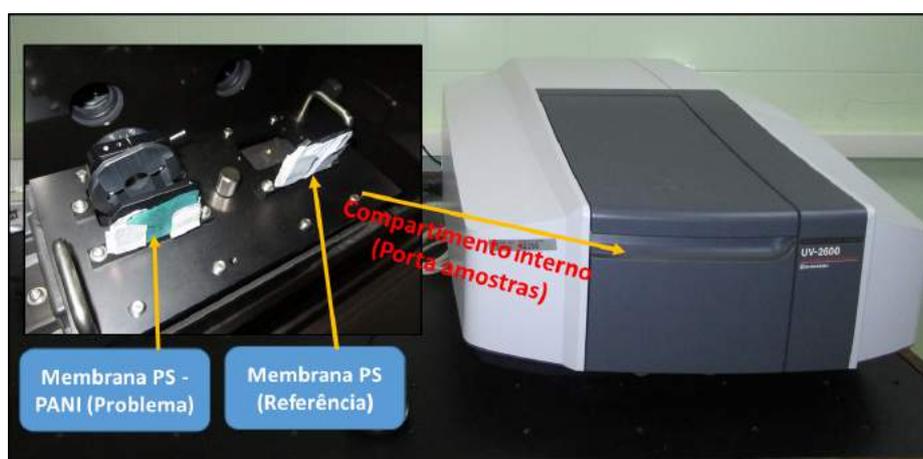


Figura 5.6: Foto do espectrofotômetro utilizado para caracterização da membrana de PS/PANI por espectroscopia UV-Vis, onde também é mostrado o compartimento interno (porta-amostras).

5.4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A composição química das membranas de PS e PS/PANI foi determinada através da caracterização por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para esse experimento, as amostras foram preparadas em forma de pastilhas. Para isso, inicialmente 3 recipientes contendo 50 mg de pó de Brometo de Potássio (KBr) permaneceram na estufa durante 4 horas, a uma temperatura de 120°C, a fim de retirar toda a umidade. As amostras a serem analisadas foram mantidas em uma dessecadora à temperatura ambiente. Em seguida, maceramos o KBr-amostra no almofariz, transferindo o pó para um molde de pastilha, o qual foi subsequentemente fixado em uma prensa de bancada. O pó de KBr-amostra permaneceu pressionado com o uso de um peso de 2000 kg durante 10 min. Ao final do processo, as pastilhas se mostraram transparentes, permitindo a passagem de um feixe de luz de um lado para o outro. Esse procedimento foi realizado para a amostra de referência (apenas KBr) e para as amostras de interesse, ou seja, membrana de PS e de PS/PANI. Na Figura 5.7 mostramos o material utilizado na

preparação das pastilhas, a prensa e as três pastilhas já prontas (em (1) temos a pastilha de KBr puro, em (2) KBr + membrana de PS e em (3) KBr + membrana de PS/PANI). O conjunto de acessórios para a produção das pastilhas, juntamente com o brometo de potássio (KBr) foram obtidos da Specac (EUA).

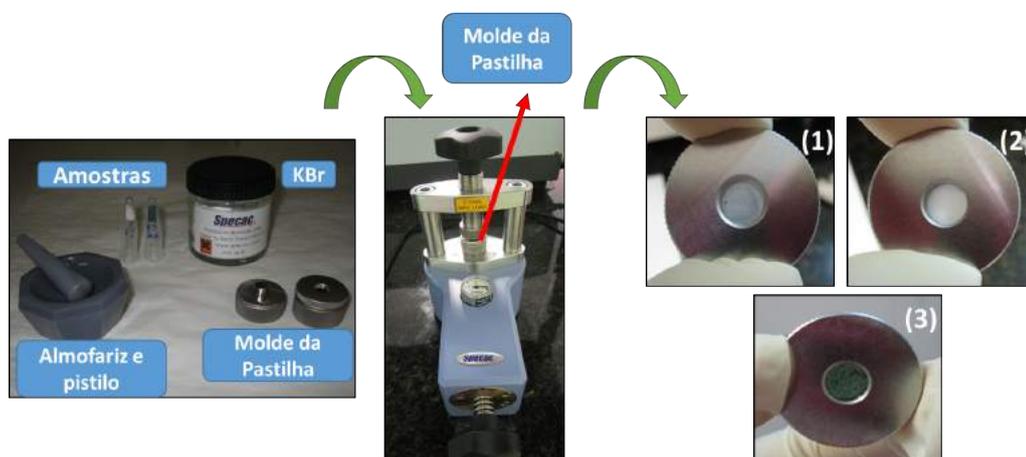


Figura 5.7: Preparação das pastilhas de KBr-amostras e as pastilhas prontas.

Depois disso, a pastilha foi colocada em um porta-amostras e transferida para o compartimento do espectrofotômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão), como podemos visualizar na Figura 5.8.

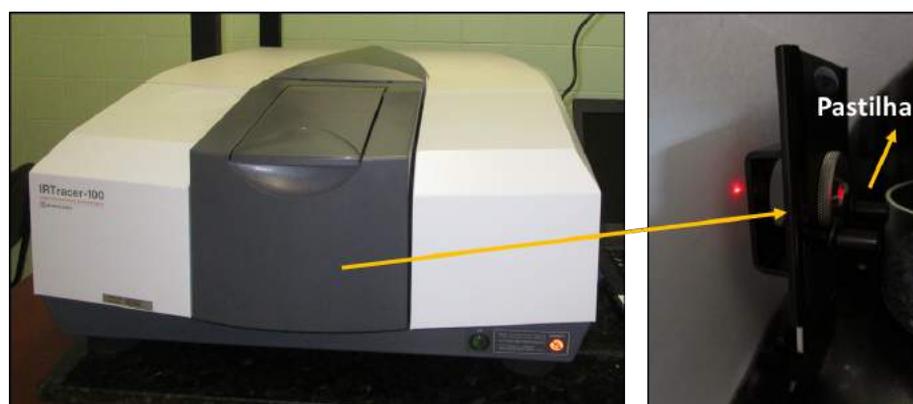


Figura 5.8: Foto do instrumento utilizado para a caracterização da membrana de PS e PS/PANI por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. No detalhe a direita, é mostrado o compartimento interno (porta-amostras).

5.5 Aplicação: estudo sobre adsorção de DNA

Para provar o conceito de que existe uma atração eletrostática entre as cargas positivas presentes na estrutura da polianilina e as cargas negativas do DNA, realizamos testes de adsorção. Em princípio, preparamos uma solução estoque por dissolução de 40 mg de DNA de esperma de salmão em 100 mL de água deionizada. Todos os experimentos foram realizados utilizando tubos Eppendorf de 2 mL e membranas de PS/PANI com dimensões de 0,75 cm x 3 cm. Para executar os experimentos de adsorção, aplicamos as seguintes etapas: primeiramente, a membrana foi ativada com uma solução ácida de glicina-HCl (pH 2,8), sendo posteriormente agitada no vortex durante 10 segundos, sendo em seguida adicionada a solução de DNA. Os volumes de glicina-HCl e DNA utilizados foram variados de acordo com a concentração de DNA desejada, para um volume total de 2 mL fixo em todos os casos. O experimento foi realizado com o auxílio de um agitador orbital operando a 250 rpm, e à temperatura ambiente. Depois disso, retiramos uma alíquota da solução para a medida da absorbância (em 260 nm) e conseqüentemente obtenção o valor da concentração de DNA em solução, utilizando um espectrofotômetro Nanodrop, fabricado pela Thermo Fisher Scientific (EUA). Por questão de comparação, colocamos a membrana de PS tratada a plasma para interagir com a solução de DNA (durante 10 min), sendo a concentração desejada de DNA regulada com a adição de água deionizada.

5.5.1 Experimento de tempo de interação e concentração inicial de DNA

A capacidade da membrana de PS/PANI em adsorver as cadeias de DNA foi avaliada como uma função do tempo de interação e da concentração inicial de DNA dissolvido na solução aquosa. Os experimentos de adsorção foram realizados na forma descrita acima, sendo que neste caso analisamos diferentes concentrações de DNA: 5, 11, 22, 49, 79, 111, 168 mg/L. As medidas de absorbância foram realizadas com a retirada de uma alíquota da solução a cada 1 minuto. As etapas do teste de adsorção são mostradas na Figura 5.9. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

A porcentagem de DNA adsorvido sobre a membrana de PS/PANI foi estimada através da relação

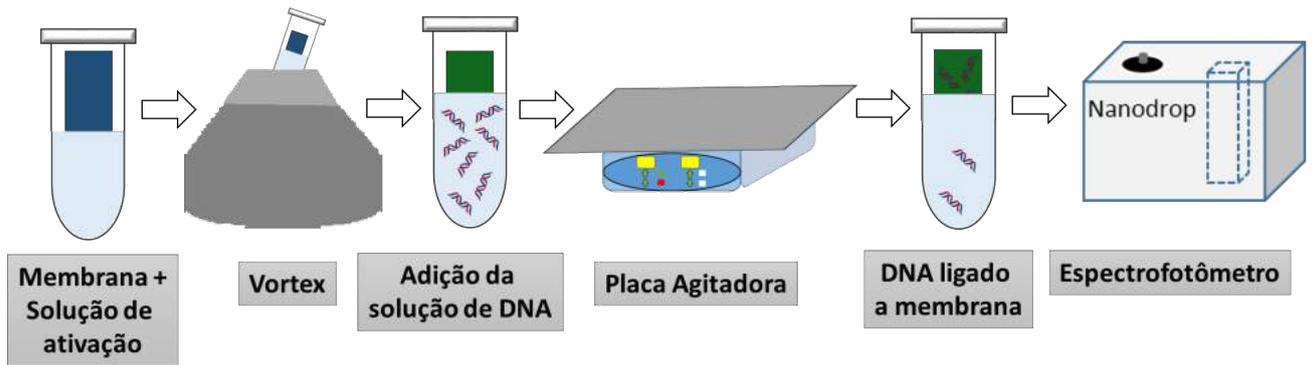


Figura 5.9: Etapas seguidas nos testes de adsorção.

$$\%Adsorção = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \cdot 100 \quad . \quad (5.1)$$

A capacidade de adsorção de DNA pela membrana no tempo t , isto é, a quantidade (em mg) de DNA adsorvida por unidade de massa (g) da membrana, foi denotada como q_t e estimada na forma

$$q_t = V \frac{(C_0 - C_t)}{m} \quad , \quad (5.2)$$

onde V é o volume total da solução (mL), C_0 representa a concentração inicial de DNA (mg/L) em solução, C_t é a concentração de DNA (mg/L) na solução em um instante e m é a massa de PANI depositada nas fibras de PS. Depois que o processo atinge o equilíbrio, a capacidade final de adsorção de DNA na membrana, isto é, a quantidade total (em mg) de DNA adsorvido por unidade de massa (g) da membrana, denotada por q_e , deve ser

$$q_e = \lim_{C_t \rightarrow C_e} q_t \quad , \quad (5.3)$$

onde C_e representa a concentração de DNA em solução no equilíbrio. Os dados experimentais foram ajustados com as isotermas de Langmuir e Freundlich e modelos de cinética [161].

5.6 Experimentos de desorção

O processo de liberação do DNA de esperma de salmão foi estudado utilizando diferentes soluções tampão, de modo a encontrar aquela que proporcionasse a maior eficiência. Para realizar os testes, inicialmente as membranas foram lavadas com 1 mL de água deionizada para retirada de qualquer DNA não ligado. Em seguida, a membrana foi transferida

para outro tubo Eppendorf e adicionou-se 1 mL de uma solução aquosa de eluição. Uma série de soluções tampão foram analisadas: fosfato/fosfato, hidróxido de sódio (0,1 M), SDS (pH 6) e uma mistura de 3,96 μmol de SDS e 8068 μM de NaOH, pH 11,7. Depois disso, o tubo foi transferido para um agitador orbital, operando a 250 rpm durante 10 min e, em seguida, o sobrenadante foi recolhido e examinado por espectroscopia UV-Vis. As etapas do processo de dessorção estão representadas na Figura 5.10.

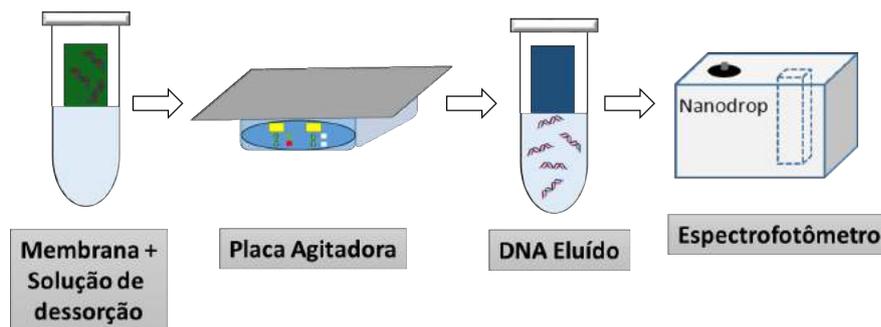


Figura 5.10: Etapas dos testes de dessorção.

5.7 Fluorescência

O processo de adsorção e dessorção foi acompanhado por meio da microscopia de fluorescência. Para isso, adicionamos 2 μl do corante SYBR Green ¹ na solução de Glicina - DNA (50 mg/L), que tem a função de se ligar ao DNA. Em seguida, executamos o mesmo procedimento descrito nas Seções 5.5 e 5.6. As imagens foram capturadas através de um microscópio Axio Imager 2 (Zeiss, Alemanha), utilizando um filtro com intervalo de excitação de 450-490 nm e emissão de 515-565 nm.

5.8 Separação de DNA por coluna de centrifugação

Preparamos a coluna de centrifugação (ver Figura 5.11) de forma semelhante a aquela encontrada em produtos semelhantes no mercado [162]. Essas colunas são compostas por um suporte para fixar o material adsorvente e um tubo Eppendorf para reter o líquido. A coluna foi composta por 4 membranas de PS e 4 de PS/PANI, cortadas em formato de círculos com diâmetro de 7 mm, e que foram depois empilhadas no interior do tubo (com as membranas de PS na parte inferior e as de PS/PANI na superior). Depois disso,

¹SYBR Green: Corante que quando se liga ao DNA de fita dupla, ocorre um aumento significativo em sua fluorescência.

avaliamos a eficiência da separação do DNA de espermatozoides de salmão dissolvido em meio aquoso, de acordo com o seguinte protocolo. Inicialmente, 500 μl de solução tampão glicina-HCl (pH 2,8) foram adicionados ao tubo, que foi então centrifugado. Após isso, o sobrenadante foi rejeitado e adicionou-se 500 μl de glicina-HCl/DNA (50 mg/L). Em seguida, o tubo foi novamente centrifugado e a concentração de DNA restante no sobrenadante foi determinada por espectroscopia UV-Vis. Depois disso, lavamos a membrana por adição de 500 μl de água, centrifugamos a solução, e posteriormente o sobrenadante foi descartado. Obtivemos a dessorção do DNA ligado à membrana pela adição de 500 μl da solução de eluição no tubo. Finalmente, o tubo foi mais uma vez transferido para a centrífuga, sendo então o DNA eluído recolhido da parte inferior do dispositivo. Todas as medidas de absorção foram realizadas em $\lambda = 260\text{nm}$. Em cada passo, a centrífuga operou a 4000 rpm durante 20 s. Todos os experimentos de adsorção-dessorção do DNA foram feitos em duplicata.

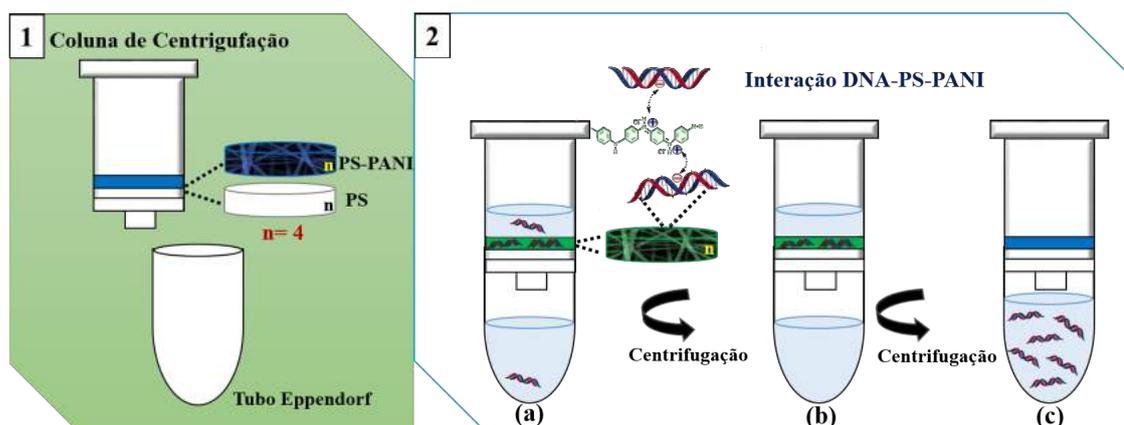


Figura 5.11: Estrutura da coluna de centrifugação (1) e etapas dos testes de adsorção e dessorção (2)

Neste capítulo, relatamos todos os procedimentos necessários para a realização do trabalho. No próximo capítulo, serão discutidos os resultados encontrados.

Resultados e Discussões

Neste capítulo, serão discutidos os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento do trabalho.

6.1 Produção das membranas de poliestireno

As membranas de poliestireno (PS) foram produzidas utilizando o processo de eletrofição. Para isso, inicialmente preparamos uma solução de poliestireno em DMF com 20 % de concentração. Depois da dissolução do poliestireno no solvente, obtivemos uma solução polimérica com a viscosidade necessária para formação de uma membrana uniforme e sem a presença de grânulos, como mostrado na Figura 6.1. Esse resultado foi comprovado através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), como será discutido na Seção 6.3.1.



Figura 6.1: Membrana de PS após 4 horas do processo de eletrofição, depositada sobre o coletor.

Após o processo de eletrofição, as membranas apresentam propriedades mecânicas relativamente pobres, como a não flexibilidade, sendo então necessário um tratamento térmico-mecânico para melhorá-las e assim facilitar o futuro processamento. Na Figura

6.2 mostramos a membrana, antes, onde podemos perceber certa semelhança com um algodão, quanto depois do tratamento, que corresponde a uma membrana mais compacta e resistente. A modificação com tratamento térmico-mecânico permitiu que o trabalho posterior com as membranas pudesse ser feito sem grandes problemas.

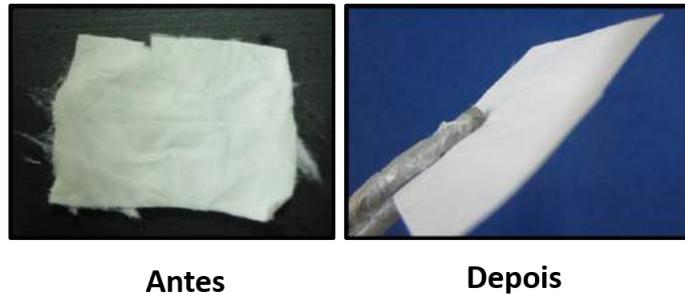


Figura 6.2: Membrana de PS antes e depois do tratamento térmico - mecânico.

6.2 Revestimento das membranas de poliestireno com polianilina

Escolhemos trabalhar com a PANI por ela possuir características únicas entre os polímeros intrinsecamente condutores, como, por exemplo, uma boa condutividade elétrica, eletrocromismo, propriedades redox, entre outras [161]. No entanto, o fato de que ela é insolúvel em diferentes solventes torna relativamente difícil o seu processamento [163,164] em uma forma mais conveniente, tal como películas ou fibras [15]. Como uma maneira de superar esta limitação, e permitir a exploração de algumas das propriedades vantajosas do polímero condutor, utilizamos as membranas de PS como uma base para depositar as cadeias de PANI sob uma forma nanoestruturada. Inicialmente, para favorecer o revestimento da PANI, a membrana de PS foi exposta a um ambiente de plasma, quando grupos funcionais hidrofílicos devem vir a ser adicionados à estrutura do PS. O revestimento pelas cadeias da PANI foi realizado através da polimerização *in situ*. Para permitir uma melhor comparação, fizemos também um teste com a membrana de PS sem tratamento a plasma. Na Figura 6.3 é mostrado o resultado desses testes.

Observando a Figura 6.3, vemos que a membrana sintetizada com o protocolo 1, ou seja, aquele em que tratamos a membrana de PS a plasma, apresenta um revestimento uniforme da PANI em sua superfície. Por outro lado, o resultado obtido com o protocolo 2 não foi satisfatório, pois podemos perceber que houve um baixo crescimento na "face" da

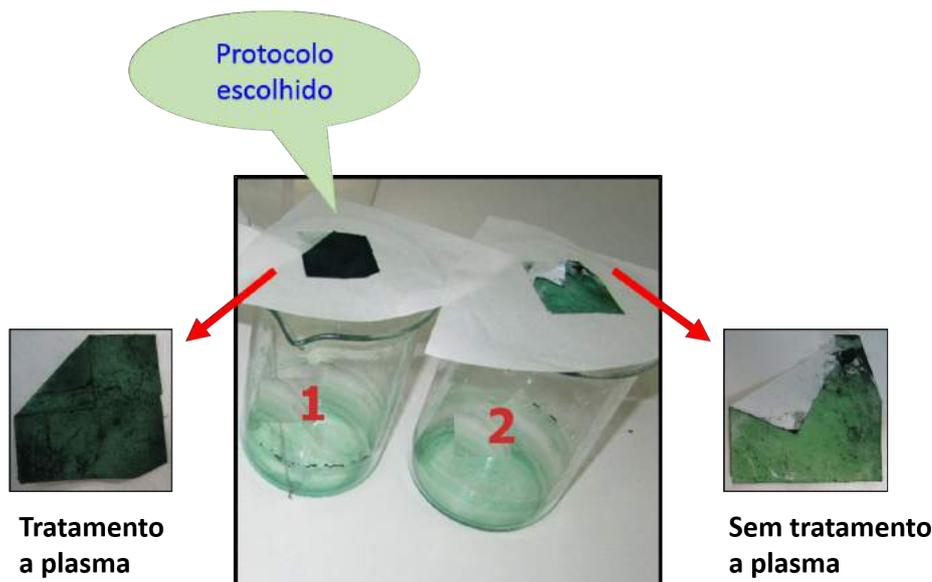


Figura 6.3: Testes realizados para a escolha do protocolo a ser utilizado no revestimento da PANI nas membranas de PS. (1) membrana tratada a plasma e (2) sem tratamento a plasma.

membrana que se encontrava em contato com a solução. Deve ser lembrado que, nesse protocolo a membrana não foi exposta ao plasma, e nessas condições não existe adesão ao meio aquoso. Levando em conta os resultados desses testes, todas as membranas utilizadas para os experimentos de isolamento do DNA foram sintetizadas de acordo com o protocolo 1, como mostrado na Figura 6.4. Nessa Figura também mostramos a capacidade da membrana compósita em conduzir eletricidade, através da conexão de um diodo emissor de luz (LED).

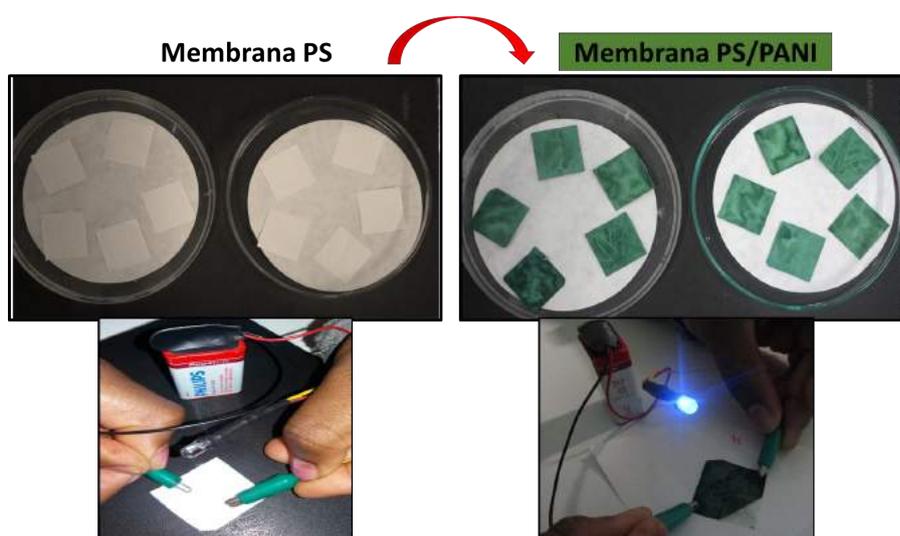


Figura 6.4: Membranas compósitas de PS/PANI utilizadas no trabalho.

6.3 Caracterização das membranas

6.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

O grau de viscosidade da solução é um parâmetro fundamental para determinar a morfologia das fibras que formam a membrana. Neste trabalho, a solução de PS (20 %) apresentou uma viscosidade que permitia a formação de membranas sem a presença de grânulos. A morfologia das fibras de PS em diferentes estágios é mostrada nas Figuras 6.5, 6.6, 6.7, 6.8. Através das imagens de microscopia, o diâmetro das fibras foi estimado em cerca de $(1,6 \pm 0,4)\mu m$. Na Figura 6.5 são mostradas diferentes magnificações das fibras originais, ou seja, logo após o processo de eletrofiação, o que permite confirmar a uniformidade das fibras.

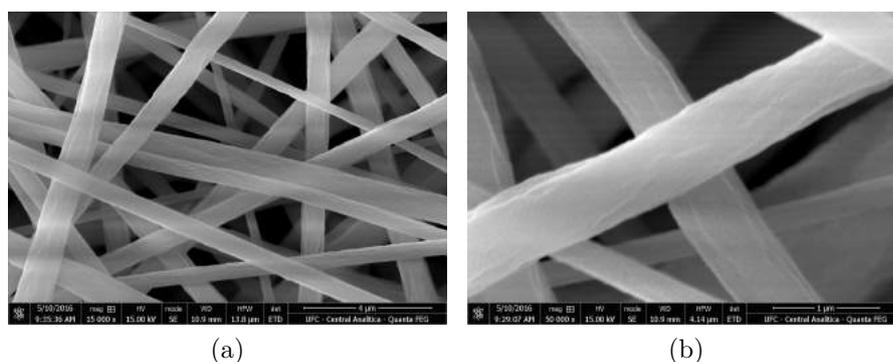


Figura 6.5: Micrografia das fibras de PS após o processo de eletrofiação em duas distintas magnificações: 15000 x (a) e 50000 x (b).

Na Figura 6.6 é mostrada a micrografia das fibras após o tratamento térmico-mecânico, onde pode ser notada a boa homogeneidade, a ausência de rugosidade e também que a membrana se tornou mais compacta. Aumentando a magnificação, observamos os poros presentes nas fibras. Com isso, nesta etapa a membrana adquiriu uma resistência considerável, o que deve favorecer sua manipulação e transporte durante os experimentos.

A morfologia mostrada na Figura 6.7 é uma consequência da presença dos grupos carboxílicos gerados durante o tratamento com o plasma de ar. Como pode ser visto, o tratamento não prejudicou as fibras, ou seja, elas permaneceram compactas e uniformes.

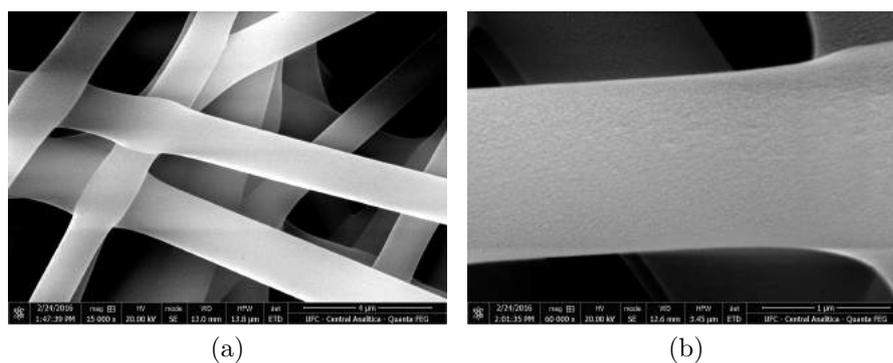


Figura 6.6: Micrografia das fibras de PS após o tratamento térmico - mecânico em duas distintas ampliações: 15000 x (a) e 60000 x (b).

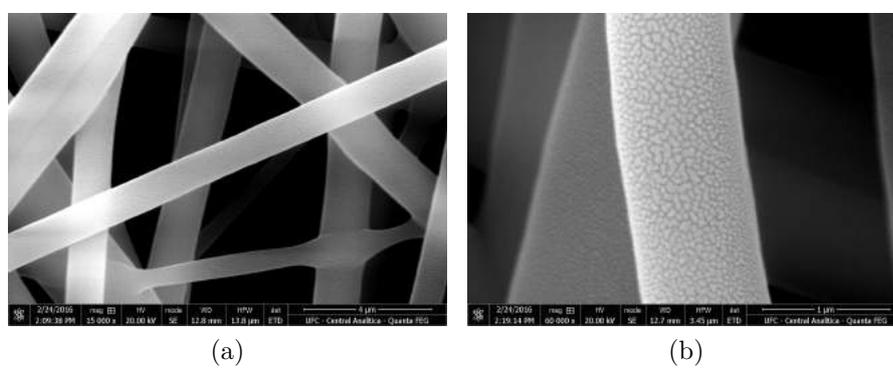


Figura 6.7: Micrografia das fibras de PS após o tratamento a plasma em duas distintas ampliações: 15000 x (a) e 60000 x (b).

Finalmente, na Figura 6.8 é possível observar que a porosidade da fibra não foi afetada, o que provavelmente se deve ao fato de que a exposição da membrana ao plasma de ar favoreceu o crescimento da PANI ao longo das superfícies das fibras. Na Figura 6.8b mostramos uma ampliação da superfície de uma fibra de PS/PANI, onde podemos observar nanogrãos de PANI depositados ao longo da fibra.

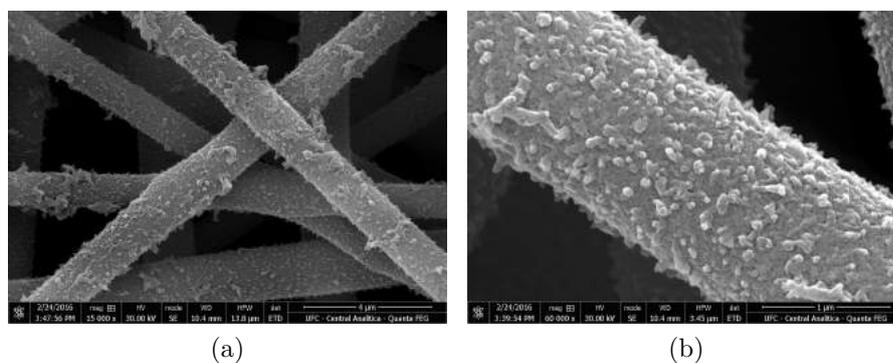


Figura 6.8: Micrografia das fibras de PS após o revestimento com PANI nanoestruturada em duas distintas ampliações: 15000 x (b) e 60000 x (c).

6.3.2 Ângulo de contato

A molhabilidade das membranas de PS e PS/PANI foi avaliada através da medida de ângulo de contato da água. Como descrito na Seção 5.4.2, a medida foi realizada através da deposição de gotas de água em 5 diferentes regiões da superfície das membranas, e que foi seguido pelo cálculo do valor médio. A Figura 6.9a mostra o resultado dos experimentos feitos com as membranas de PS após o processo de eletrofiação, onde obtivemos um ângulo de $(125^\circ \pm 3^\circ)$, um valor que indica um alto grau de hidrofobicidade para a membrana. Esse resultado se deve à baixa energia de superfície do poliestireno. Após o tratamento térmico e mecânico, as fibras que compõem a membrana tornam-se mais próximas, levando assim a uma diminuição no ângulo ($114^\circ \pm 2^\circ$), como pode ser observado na Figura 6.9b.

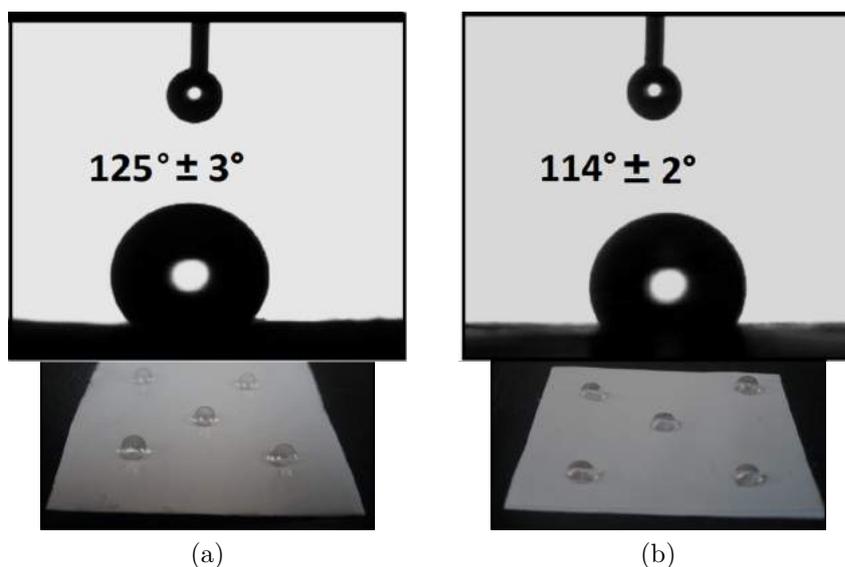


Figura 6.9: Medida de ângulo de contato mostrando a hidrofobicidades das membranas de PS após a eletrofiação (a) e tratada termicamente e mecanicamente (b).

Como visto na Seção 5.3, o tratamento a plasma favoreceu a mudança nas características da superfície da membrana de PS, tornando-a totalmente hidrofílica (ângulo de contato de 0° , Figura 6.10a), uma propriedade que permanece após o revestimento da superfície com PANI (Figura 6.10b).

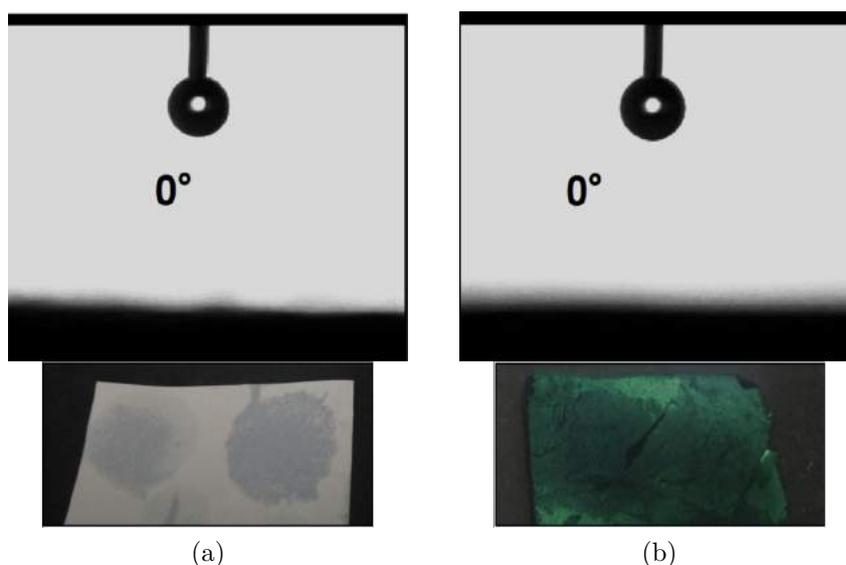


Figura 6.10: Medida de ângulo de contato mostrando o caráter hidrofílico das membranas de PS tratada a plasma (a) e revestida com PANI (b).

6.3.3 Espectroscopia UV-VIS

A mudança de cor de acordo com o seu estado de oxidação é uma característica intrínseca da polianilina [49, 165]. Neste trabalho, utilizamos a PANI protonada, ou seja, no seu estado de oxidação sal esmeraldina (que tem uma coloração esverdeada). A Figura 6.11 mostra o espectro obtido para a membrana de PS/PANI, onde podemos observar os três picos característicos da PANI protonada. O pico em 346 nm é atribuído à transição $\pi - \pi^*$ dos anéis benzênicos, enquanto que os picos 430 nm e 782 nm correspondem às transições de pólaron e bipólaron, respectivamente [166–168].

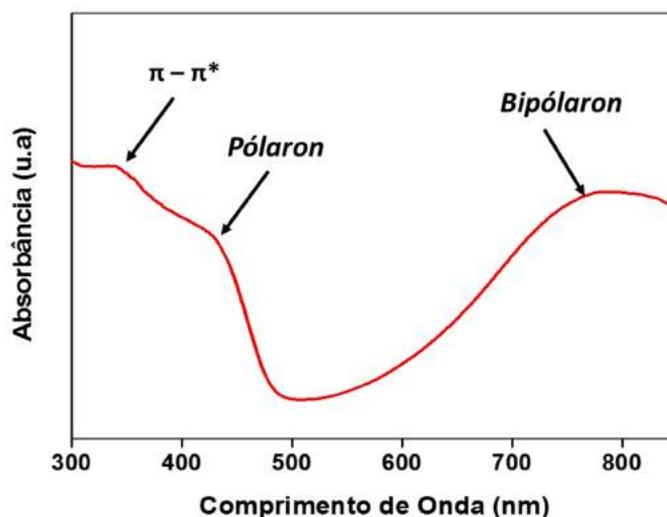


Figura 6.11: Caracterização por espectroscopia UV-Vis para a membrana de PS/PANI.

6.3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Para confirmar a composição química das membranas, utilizamos a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (ver Figura 6.12), que permite identificar o movimento vibracional das moléculas. O espectro da membrana de PS é mostrado na curva (a), onde os picos em 3059 cm^{-1} e 3026 cm^{-1} são associados à vibração C-H do anel aromático [169]. Por sua vez, as vibrações em 2922 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} estão relacionadas com o estiramento da ligação C-H, enquanto que o pico a 1600 cm^{-1} é atribuído ao estiramento C = C aromático [170]. Os picos 1492 cm^{-1} e 1448 cm^{-1} correspondem a uma vibração de flexão do C-H e, finalmente, o pico 698 cm^{-1} pode ser atribuído aos anéis aromáticos mono-substituídos [169]. No espectro correspondente à membrana de PS/PANI (curva b), é possível observar as bandas características de PANI no seu estado sal de esmeraldina, onde os picos em 1597 cm^{-1} e 1490 cm^{-1} estão relacionados com a vibração de estiramento C = C do anéis quinóide e benzenóide, respectivamente. Em 1298 cm^{-1} , pode-se encontrar a vibração de alongamento C-N, que é uma característica do anel benzenóide. Finalmente, enquanto a banda em 1141 cm^{-1} é atribuída ao C-H aromático no plano de curvatura, o pico em 813 cm^{-1} representa o anel benzenóide 1,4 substituído. [15].

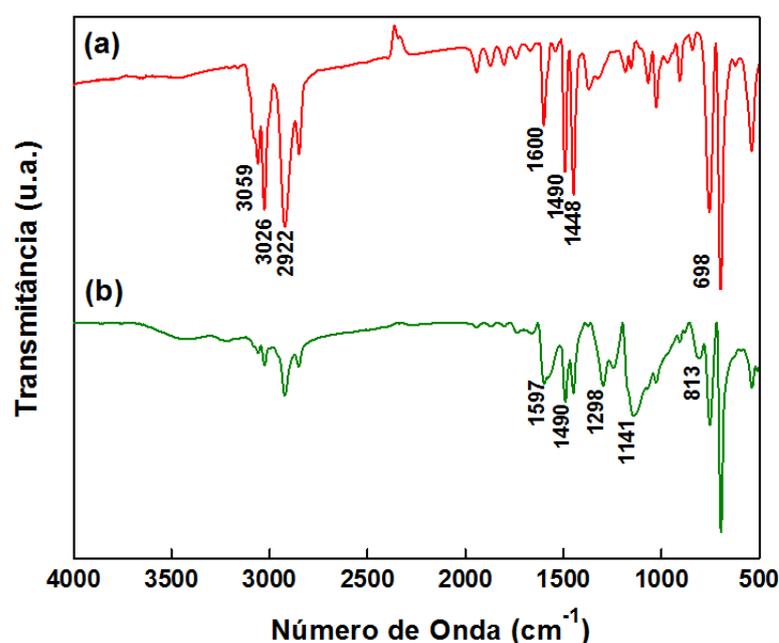


Figura 6.12: Caracterização por FTIR das membranas de PS (a) e PS/PANI (b).

6.4 Estudo sobre adsorção de DNA

Na sua forma de sal de esmeraldina, a PANI é um polycation capaz de interagir com ânions e poliânions, tais como moléculas de DNA. Essa propriedade foi examinada em um trabalho anterior do laboratório de Polímeros Não-Convencionais (UFPE), quando foi desenvolvido um nanocompósito de PANI- γFe_2O_3 para ser utilizado como adsorvente de fase sólida [12]. Esse compósito permitiu a recuperação magnética do DNA de esperma de salmão dissolvido em soluções aquosas. Dessa forma, neste trabalho investigamos as propriedades de adsorção de um novo sistema de recuperação de DNA, que foi especialmente desenvolvido com base na utilização de membranas de PS/PANI. Inicialmente, os testes de adsorção do DNA de esperma de salmão foram realizados utilizando a membrana de PS tratada a plasma, de acordo com o procedimento mencionado na Seção 5.5. Esse processo foi acompanhado através de medidas de espectroscopia UV-VIS, o que nos permitiu determinar as concentrações do DNA antes e depois da interação com a membrana. A Figura 6.13 mostra o espectro do DNA medido (em $\lambda = 260$ nm) antes e depois da interação com a membrana de PS.

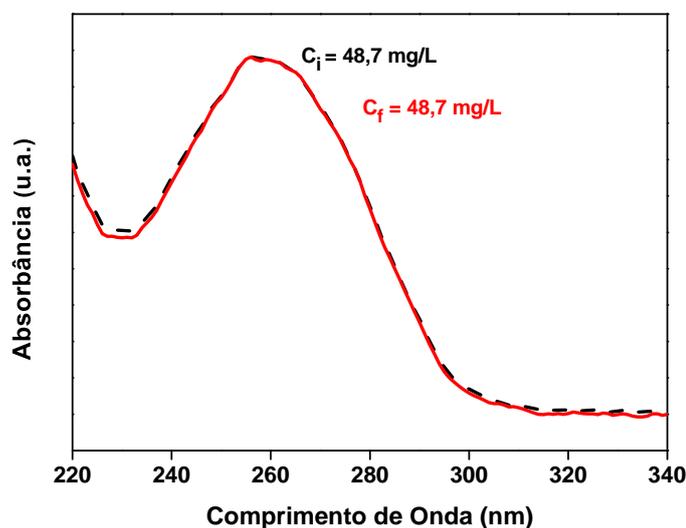


Figura 6.13: Teste de adsorção do DNA com a membrana de PS tratada a plasma.

Como podemos observar, os dois espectros coincidem, resultando em um mesmo valor (48,7 mg/L) para a concentração inicial (C_i) (curva tracejada) e final após a exposição (C_f) (curva contínua), mostrando que não ocorre a interação entre o DNA e a membrana de PS. Esse comportamento pode estar relacionado à repulsão eletrostática entre as cargas

negativas, que o PS adquiriu ao ser exposto ao plasma de ar, e as cargas negativas presentes no grupo fosfato da estrutura do DNA.

Em seguida, realizamos a prova do conceito com a membrana de PS/PANI, utilizando o procedimento descrito na Seção 5.5. O resultado desse teste é mostrado na Figura 6.14, onde são apresentados dois espectros de absorção do DNA.

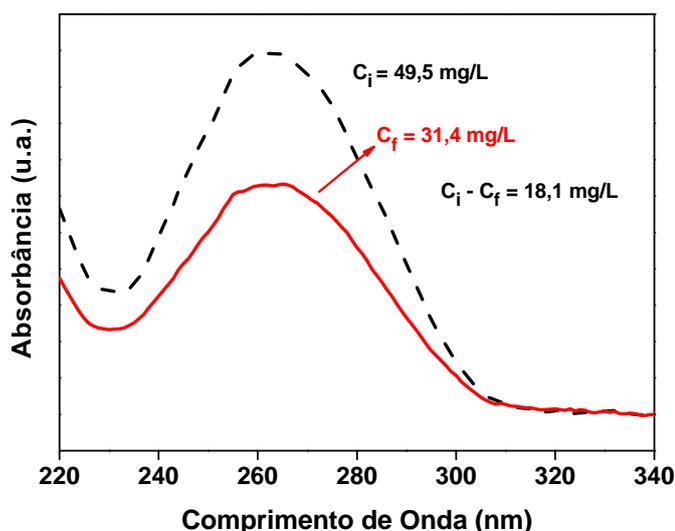


Figura 6.14: Prova do conceito para mostrar a capacidade da membrana de PS/PANI em capturar DNA de esperma de salmão, através da diminuição do pico de absorbância ($\lambda = 260 \text{ nm}$).

O primeiro espectro está relacionado com a solução de DNA antes da exposição, quando a concentração inicial (C_i) era de 49,5 mg/L, enquanto que o segundo mostra claramente que ocorre uma diminuição no pico de absorção (em 260 nm), com o que foi estimada uma concentração final (C_f) de 31,4 mg/L. Com isso, comprovamos que realmente existe uma interação entre o DNA e a membrana compósita de PS/PANI. Com esse resultado, foi possível darmos continuidade ao estudo sobre adsorção do DNA na membrana de PS/PANI, como será explicado nas Seções 6.4.1, 6.4.2, 6.6, 6.4.3.

6.4.1 Efeito do tempo de interação e da concentração inicial de DNA

Nós avaliamos inicialmente como a capacidade de adsorção da membrana de PS/PANI variava como função do tempo de interação e da concentração inicial de DNA na solução aquosa. Esses dois parâmetros são importantes para melhor determinar quão rapidamente o composto seria saturado e como a capacidade de adsorção da membrana é afetada pela quantidade total de DNA inicialmente presente na solução aquosa. Para estudar isso,

inicialmente ativamos a membrana de PS/PANI com uma solução tampão glicina/HCl, para ter certeza de que de fato o compósito ficava positivamente carregada. Depois disso, a solução de DNA foi adicionada ao compósito para permitir a formação do complexo PS/PANI-DNA. Na Figura 6.15 mostramos o gráfico de porcentagem de adsorção em função do tempo de interação, onde se pode observar claramente que, para todas as concentrações de DNA avaliadas, a taxa de adsorção cresce mais rapidamente nos primeiros minutos e tende a aumentar com o tempo de interação. Este comportamento pode ser atribuído ao maior número de locais vazios presentes na superfície da membrana durante os primeiros minutos de interação. Vemos também que apenas 9 min ou menos foram suficientes para que o sistema atingisse o equilíbrio, isto é, seja alcançada a situação em que a membrana compósita passa a não mais capturar DNA.

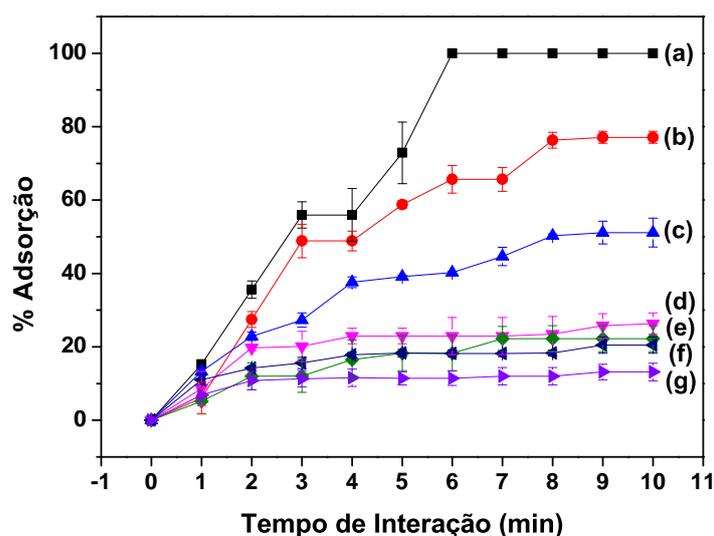


Figura 6.15: Efeito do tempo de interação de DNA adsorvido pelas membranas PS/PANI para as concentrações: (a) 5 mg/L, (b) 11 mg/L, (c) 22 mg/L, (d) 49 mg/L, (e) 79 mg/L, (f) 111 mg/L e (g) 168 mg/L.

Na Figura 6.16 é mostrado o gráfico que relaciona a capacidade de adsorção no equilíbrio (q_e) e a porcentagem de adsorção em função da concentração inicial de DNA. Podemos observar com mais detalhes que, em concentrações mais elevadas, uma maior quantidade de DNA foi adsorvido, o que pode ser explicado pelo aumento da força motriz necessária capaz de permitir a transferência de massa entre o adsorvato e o adsorvente [171]. Para exemplificar isso, tomamos a concentração inicial de 5 mg/L, onde 100 % do DNA foram capturados pela membrana. Em termos de massa, esse valor corresponde a 0,012 mg de

DNA. Por outro lado, em relação a concentração de 168 mg/L, apenas 13,1 % do DNA foram adsorvidos pela membrana, ou seja, 0,043 mg de DNA. Todos os experimentos foram realizados com 2 mL de volume total.

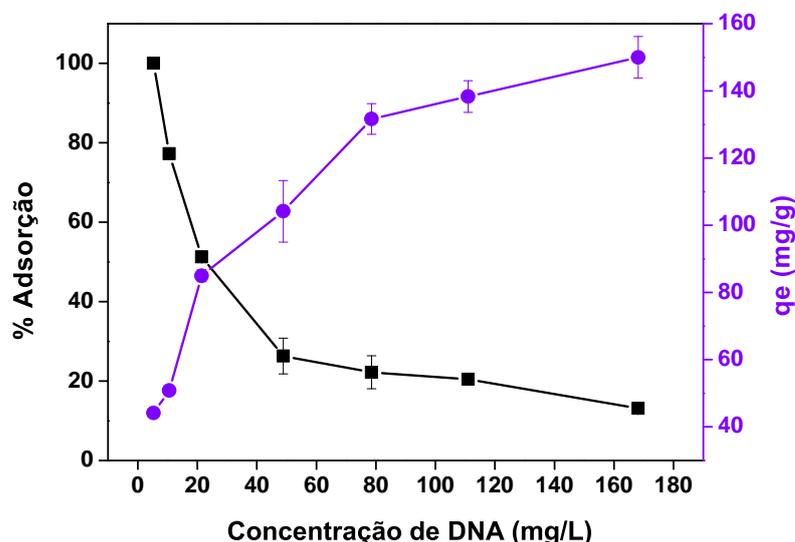


Figura 6.16: Efeito da concentração inicial de DNA em relação a porcentagem de adsorção e de q_e da membrana de PS/PANI.

6.4.2 Isotermas de adsorção

A análise da isoterma de adsorção pode nos fornecer informações de grande interesse, pois permite uma melhor compreensão do processo que envolve a adsorção de DNA na superfície da membrana do PS/PANI no equilíbrio. Para isso, os nossos dados experimentais foram analisados utilizando os modelos de isoterma de Langmuir e Freundlich [172, 173].

6.4.2.1 Modelos de Langmuir e Freundlich

Como explicado na Seção 3.1, o modelo de isoterma de Langmuir assume que a adsorção ocorre com a formação de uma monocamada com um número finito de locais de adsorção idênticos e energeticamente equivalentes. Por sua vez, o modelo de Freundlich considera a existência de sítios ativos de diferentes naturezas e admite que a adsorção ocorra em multicamadas. Na forma linearizada, estes modelos podem ser expressos como

- **Langmuir**

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m b} + \frac{C_e}{q_m} \quad (6.1)$$

- **Freundlich**

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad , \quad (6.2)$$

onde C_e (mg/L) representa a concentração de DNA no estado de equilíbrio, q_e (mg/g) é a capacidade de adsorção de DNA, b (L/mg) é a constante de Langmuir, q_m (mg/g) é a capacidade máxima de adsorção de DNA, e K_F e n são constantes de Freundlich, respectivamente. Os valores das constantes de cada isoterma foram determinados a partir da inclinação e interseção do gráfico de C_e/q_e versus C_e (Figura 6.17a) e $\log q_e$ versus $\log C_e$, respectivamente (Figura 6.17b).

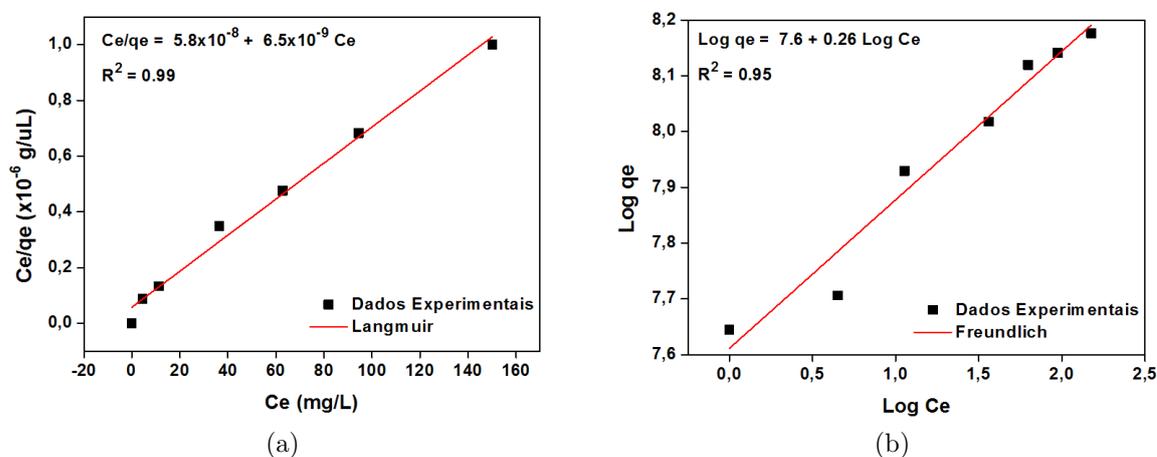


Figura 6.17: Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de DNA em membranas de PS/PANI utilizando os modelos de isoterma de Langmuir (a) e Freundlich (b).

Os resultados encontrados para cada parâmetro estão resumidos na Tabela 6.1; com esses valores é possível concluir que o modelo de Langmuir é aquele que melhor se adapta ao nossos dados (com um coeficiente de correlação de 0,99), um resultado que concorda com a ideia de que os grupos amina da PANI são os únicos sítios ativos que adsorvem as fitas de DNA. A capacidade máxima de adsorção foi então calculada como 153,8 mg de DNA por grama de PANI.

Tabela 6.1: Parâmetros de isotermas de Langmuir e Freundlich para adsorção de DNA em membranas de PS/PANI.

Langmuir			Freundlich		
q_m (mg/g)	b (L/mg)	R^2	K_F (mg/g)	$1/n$ (mg/g)	R^2
153,8	0,112	0,99	39,8	0,26	0,95

Na Figura 6.18, apresentamos o ajuste de nossos dados experimentais pelas isotermas

de Langmuir e Freundlich.

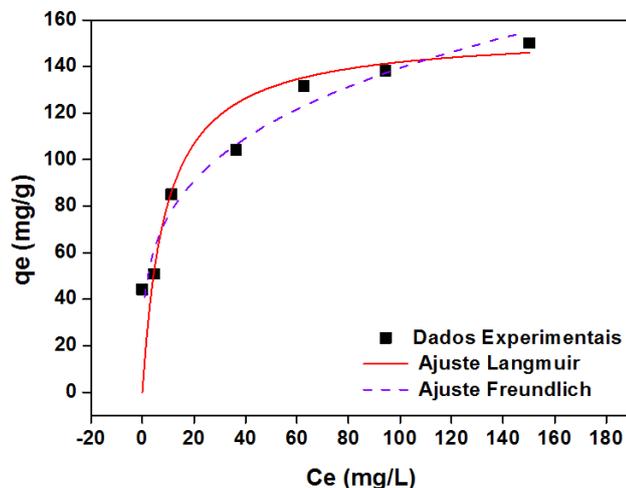


Figura 6.18: Ajuste dos dados experimentais de acordo com os modelos de isotermas de Langmuir e Freundlich para a adsorção do DNA em membranas de PS/PANI.

6.4.3 Cinética de adsorção

O estudo da cinética de adsorção é uma forma importante de se investigar os mecanismos envolvidos na interação entre adsorvato-adsorvente. Para examinar essa questão, ajustamos nossos dados experimentais segundo três modelos cinéticos diferentes (pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Morris-Weber). O primeiro e o segundo modelo estão associados com processos físicos e químicos, respectivamente, e em sua forma linearizada podem ser expressos como [161]

- **Pseudo-primeira ordem**

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303}t \quad (6.3)$$

- **Pseudo-segunda ordem**

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e}t \quad , \quad (6.4)$$

respectivamente. Nas expressões anteriores, q_e e q_t são as capacidades de adsorção do DNA (mg/g) no equilíbrio e no tempo t , k_1 (min^{-1}), k_2 ($\text{g}/\text{mg}\cdot\text{min}$) são constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem e pseudo segunda ordem, respectivamente, e t é o tempo (min). Já o modelo de Morris-Weber descreve processos difusivos e pode ser escrito como [174]

- **Morris-Weber**

$$q_t = k_{id}(t)^{0,5} + C \quad , \quad (6.5)$$

onde k_{id} (min^{-1}) e C são as constantes de velocidade de difusão intrapartícula.

Na Figura 6.19 é mostrada a regressão linear para cada modelo de cinética de adsorção. A partir desse ajuste, podemos estimar os valores das constantes correspondentes. No caso do modelo de pseudo primeira ordem, plotamos o gráfico de $\log(q_e - q_t)$ versus tempo (min)(Figura 6.19a), t/q_t versus tempo (min) para o modelo de pseudo segunda ordem (Figura 6.19b) e, finalmente, q_t versus $t^{0,5}$ para Morris-Weber (Figura 6.19c).

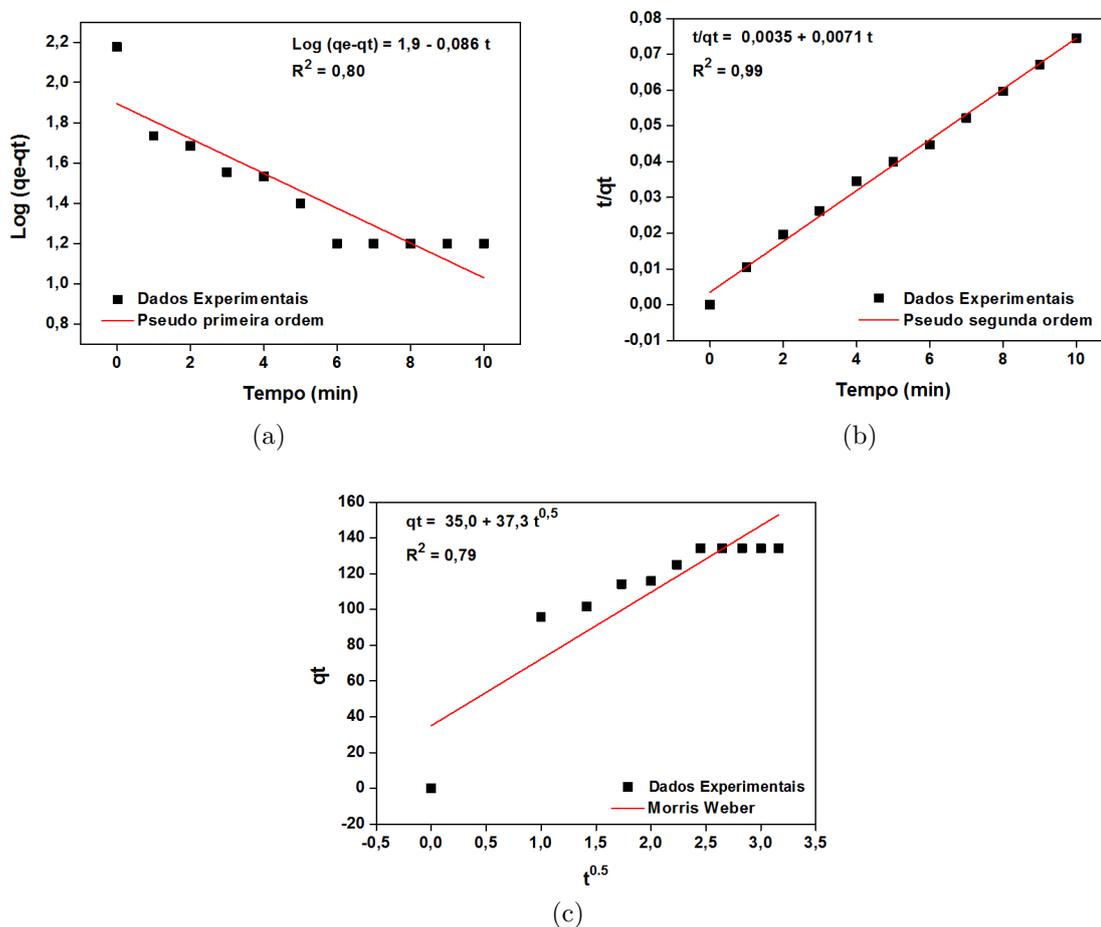


Figura 6.19: Ajuste linear dos dados experimentais para adsorção do DNA em membranas de PS/PANI usando os modelos de pseudo primeira ordem (a), pseudo segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).

Na Tabela 6.2 mostramos os resultados dos parâmetros obtidos com o ajuste dos dados para cada um desses modelos cinéticos. A partir dos valores de R^2 correspondentes, pode-se verificar que a cinética de adsorção de moléculas de DNA na membrana PS/PANI é melhor descrito pelo modelo de pseudo-segunda ordem. Portanto, podemos concluir que

as cadeias de DNA, são adsorvidas pela membrana de PS/PANI, de acordo com processos químicos. Em nosso sistema, a PANI foi dopada com HCl, o que torna os grupos imina e amina da PANI base esmeraldina altamente polarizados. Ao adicionar o DNA, os contra-íons Cl^- associados com as cadeias de PANI darão lugar aos grupos fosfato do DNA, pelo processo de troca iônica.

Tabela 6.2: Parâmetros de cinética de adsorção do DNA em membranas de PS/PANI.

$q_{e,exp}$ (mg/g)	Primeira Ordem			Segunda Ordem			Morris-Weber	
	k_1 (min^{-1})	$q_{e,calc}$ (mg/g)	R^2	k_1 (g/mg.min)	$q_{e,calc}$ (mg/g)	R^2	k_{id} (min^{-1})	R^2
153,8	0,20	78,4	0,80	0,014	140,8	0,99	37,3	0,79

O ajuste dos dados cinéticos para o modelo de pseudo-segunda ordem é mostrado na Figura 6.20.

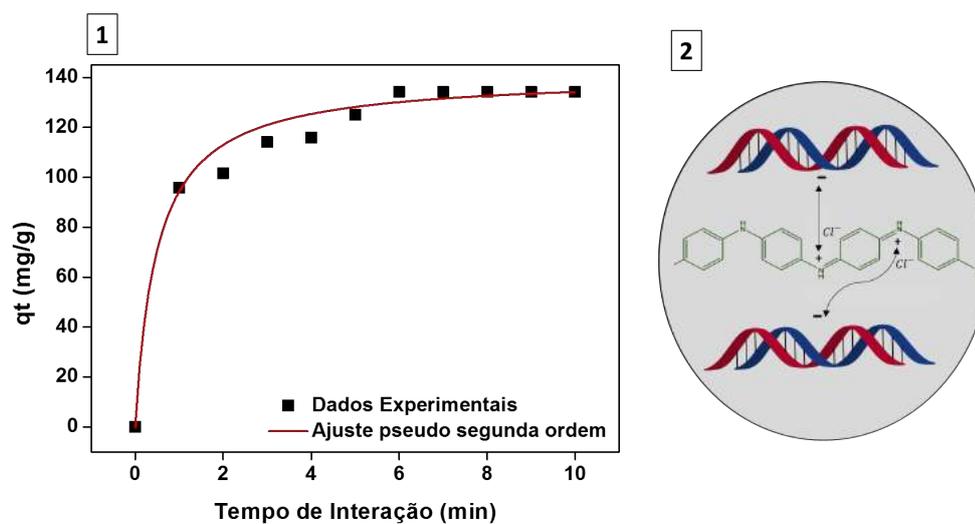


Figura 6.20: Efeito do tempo de interação sobre a capacidade de adsorção de DNA para as membranas de PS/PANI e ajuste de acordo com o modelo pseudo-segunda ordem (1). Troca iônica do contra-íons da PANI com os grupos fosfatos do DNA (2).

6.5 Experimento de dessorção

As moléculas de DNA se ligam às cadeias de PANI presentes nas fibras que formam a membrana de PS por meio de interações eletrostáticas entre os grupos amina carregados positivamente do polímero condutor e os seus fosfato carregados negativamente. Para que possam ser liberadas, isto é, dessorvidas da membrana, utilizamos uma série de soluções tampão para investigar aquela que exibisse uma maior eficiência. Os resultados são mostrados na Figura 6.21; em cada caso, é incluído o espectro de DNA antes da interação com a membrana com concentração inicial (C_i), após a interação (C_f) com as cadeias de DNA, e após ocorrer a dessorção (C_{Des}). Nesse último caso, deve ser lembrado que o volume utilizado para dessorver o DNA foi apenas 1 mL, ou seja, a metade do volume utilizado no processo de adsorção. A função da solução tampão é desprotonar as cadeias da PANI, permitindo o enfraquecimento da interação eletrostática, de modo a proporcionar a liberação do DNA.

Inicialmente, usamos uma solução básica de fosfato/fosfato (pH 7,6); neste caso, nenhuma porcentagem de DNA foi liberada da membrana, como mostrado na Figura 6.21a. Como não conseguimos liberar o DNA com essa solução, fizemos outro experimento, agora adicionando uma solução de NaOH (pH 11,7). Quando adotamos este procedimento, cerca de 67 % do DNA capturado foram dessorvidos, como pode ser visto na Figura 6.21b. Por essa razão, nós decidimos incluir SDS (pH 6) na solução alcalina de NaOH, com a expectativa de que os ânions de sulfato de SDS poderiam ajudar a melhorar a repulsão eletrostática entre a PANI e os grupos de fosfatos do DNA. Com isso, a liberação de DNA a partir da superfície da membrana se faria de maneira mais fácil. Verificamos primeiramente a porcentagem de dessorção do DNA, utilizando apenas a solução de SDS. O resultado é mostrado na Figura 6.21c, onde podemos observar que foram liberados da membrana apenas 40,6 % do DNA. Dessa forma, quando misturamos a solução de SDS com o NaOH obtivemos o resultado mostrado na Figura 6.21d, onde são apresentados os espectros UV-Vis gerados em cada passo desta experiência. Enquanto a curva C_i corresponde ao espectro de absorção da solução de DNA antes da adsorção (53,9 mg/L), a curva C_f corresponde ao caso depois da interação (41,4 mg/L). O grau de adsorção de DNA sobre as fibras é ilustrado pelo decréscimo considerável do pico de absorbância a $\lambda = 260nm$. Mais tarde, quando se realizou o processo de dessorção (curva C_{Des}), foi

possível liberar todo o DNA adsorvido pela membrana (25 mg/L de concentração).

Com esses resultados, podemos afirmar que não apenas existe uma troca de cargas negativas entre o DNA e as soluções tampão, mas também provavelmente outras propriedades devem contribuir para que uma solução seja mais eficiente do que outra, tal como, por exemplo, o tamanho das moléculas e seu grau de eletronegatividade.

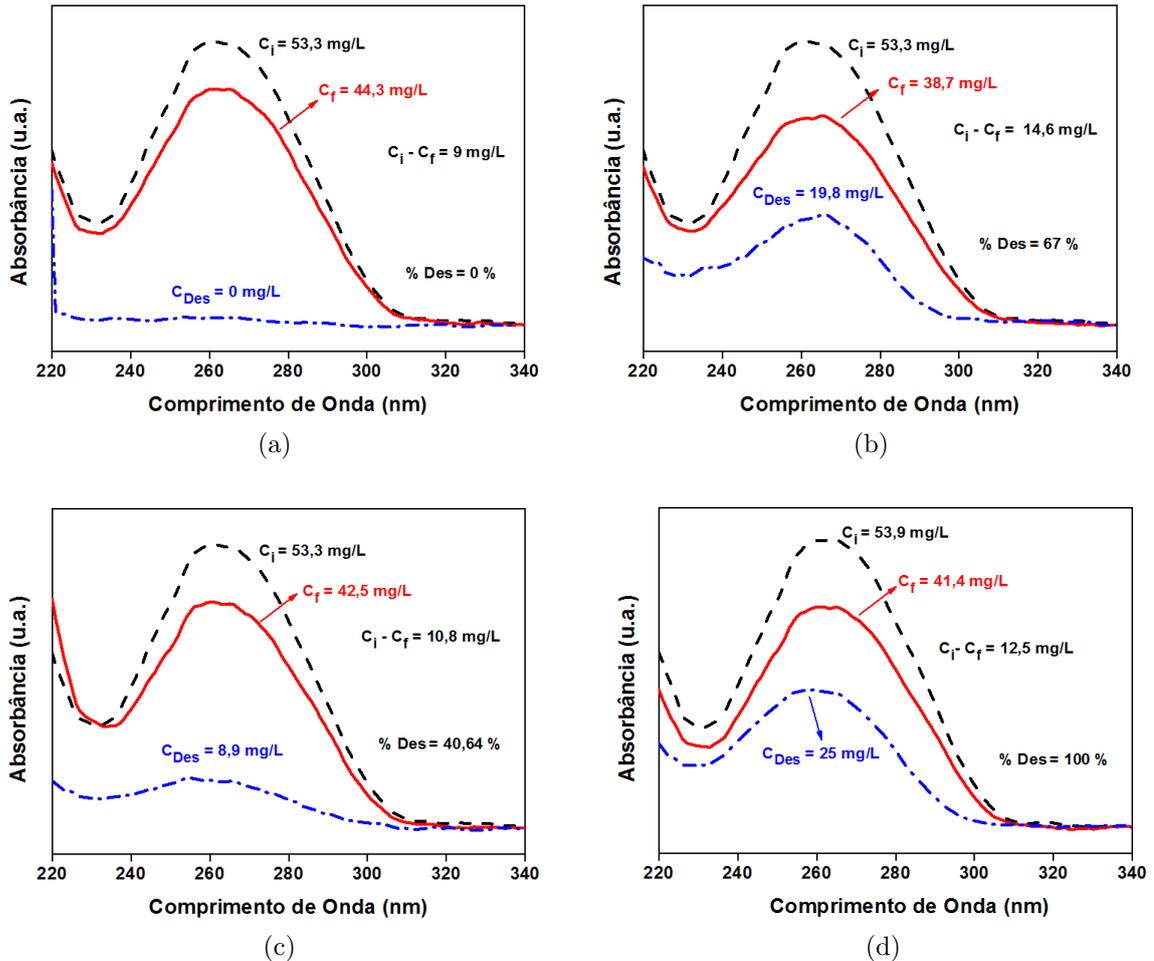


Figura 6.21: Espectro UV-Vis da solução de DNA antes (C_i) e após (C_f) a interação com a membrana de PS/PANI e o espectro da solução de DNA após o processo de dessorção utilizando uma solução tampão fosfato/fosfato - pH 7,6 (a), Hidróxido de sódio - pH 11,7 (b), SDS pH 6 (c) e SDS pH 6 + hidróxido de sódio (d).

6.6 Comparação com outros trabalhos encontrados na literatura

Como forma de melhor avaliar o desempenho da membrana de PS/PANI na captura das cadeias de DNA, na Tabela 6.3 listamos a capacidade de adsorção e dessorção de alguns materiais adsorventes que têm sido utilizados para a captura do DNA de esperma

de salmão.

Tabela 6.3: Comparação da membrana de PS/PANI com outros adsorventes de DNA.

Adsorventes	Capacidade Ads.(mg/g)	Temp. Ads. (min)	Des. (%)	Temp. Des. (min)	Ref.
Microesferas de líquidos iônicos poliméricos	190,7	1	80,7	-	[175]
MSP ^a ZrBF	238,6	480	89,0	240	[176]
MSP Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	46,0	-	-	-	[177]
MSP Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	121,0	1200	89,5	60	[13]
Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	57,8	-	-	-	[178]
MSP Fe ₃ O ₄ /SiO ₂	375,0	-	-	-	[179]
Esférulas alofano	28,0	-	-	-	[180]
NMC ^b PANI/γ-Fe ₂ O ₃	75,2	10	94,0	2	[12]
Membrana de PS/PANI	153,8	9	100,0	10	Este trabalho

^aMesoporos (MSP): poros com diâmetros entre 2 a 50 nm.

^bNMC= Nanocompósito Magnético.

De acordo com esses resultados, podemos afirmar que a membrana proposta no presente trabalho corresponde a uma excelente combinação de valores das capacidades e dos tempos de adsorção e dessorção. Por exemplo, muito embora o adsorvente proposto por Tang et al [176] possuía uma maior capacidade de adsorção (238,6 mg/g) do que aquela encontrada para a membrana compósita (153,8 mg/g), o tempo necessário para adsorção do DNA pela membrana por nós apresentada no presente trabalho é comparativamente muito menor (cerca de 9 min). Já quando comparamos a capacidade e o tempo de adsorção da membrana compósita com o material relatado por Wang et al [175], observamos que naquele caso o valor da capacidade foi relativamente maior (190,7 mg/g), e conseguido em um curto período de tempo (1 min), porém em com a dessorção se dando em uma porcentagem menor, de cerca de 80,7 % (o tempo de dessorção não foi informado no trabalho). Outros materiais analisados possuem uma baixa capacidade de adsorção quando comparados com a membrana compósita; um exemplo disso é o adsorvente Fe_3O_4/SiO_2 sugerido por Teng et al [177], que apresenta um valor de q_m equivalente a 46 mg/g, e aqueles propostos por Huang et al [180] e Li et al [178], com capacidades de 28 mg/g e 57,8 mg/g, respectivamente. O adsorvente proposto por Medina et al [12] apresenta uma capacidade de adsorção menor do que a membrana compósita, cerca de 75,2 mg/g, mas, no entanto, consegue liberar 94 % do DNA capturado em apenas 2 min de interação. De acordo com essa análise, podemos concluir que a membrana compósita de PS/PANI

oferece uma boa capacidade de adsorção em tempos relativamente curtos, tanto para a adsorção quanto a dessorção, quando comparada com os valores correspondentes apresentados por outros adsorventes.

6.7 Experimento de fluorescência

Outra maneira adotada para acompanhar os processos de adsorção e dessorção do DNA na superfície da membrana de PS/PANI foi através da técnica de microscopia de fluorescência. Para isso, utilizamos um corante que interage fortemente com as cadeias simples e dupla do ácido nucleico, mas que apresenta como característica especial o fato de que sua fluorescência é notavelmente maior no último caso [181]. Na Figura 6.22 apresentamos as imagens de fluorescência da membrana PS/PANI antes e depois da adsorção de DNA e também após o processo de dessorção, sendo agora os experimentos realizados com a presença do corante SYBR Green, um eficiente marcador de DNA. As Figuras 6.22a e 6.22b mostram que tanto a membrana PS/PANI em sua forma original, quanto após ser molhada com a solução de ativação juntamente com o corante, não apresentam fluorescência. No entanto, na Figura 6.22c podemos observar uma elevada densidade de pontos verdes brilhantes dispostos ao longo das fibras, após a membrana ser exposta à solução contendo DNA, em uma confirmação de que as cadeias de DNA foram de fato capturadas pela membrana de PS/PANI. Essa hipótese é corroborada pela observação de que o número de pontos brilhantes restantes na superfície da membrana diminui após o processo de dessorção do DNA (Figura 6.22d). Isso corresponde ao esperado, uma vez que, como mostrado na seção anterior, conseguimos eluir uma grande quantidade do DNA que se encontrava na superfície da membrana de PS/PANI.

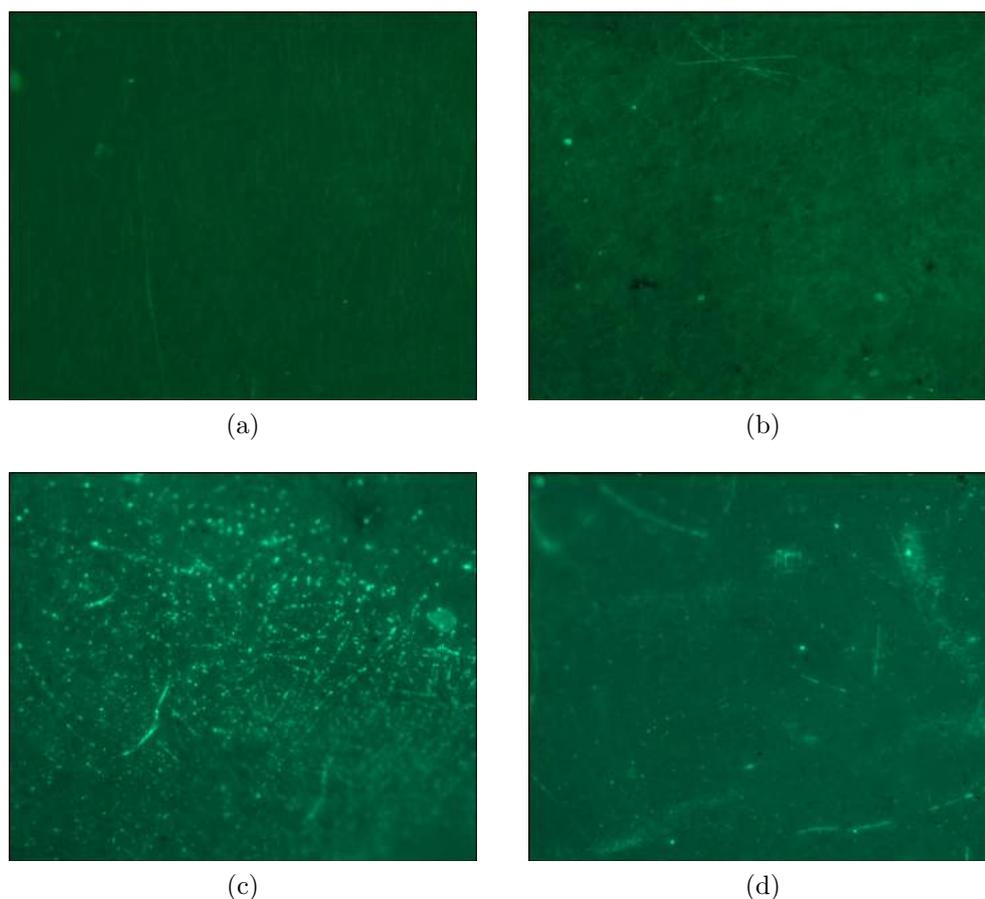


Figura 6.22: Imagens de fluorescência da membrana PS/PANI antes da interação com o DNA ou corante (a), membrana molhada com a solução de ativação e corante (b), após adsorção do DNA marcado (c), e após a dessorção (d).

6.8 Processo de separação de DNA por centrifugação

Os resultados com os experimentos anteriores confirmaram que o DNA dissolvido em solução aquosa é capturado pelas membranas de PS/PANI. Resolvemos então testar o desempenho destes materiais quando usado como um adsorvente de ácido nucleico depois de serem incorporadas em uma coluna de centrifugação. Para isso, foi montado o aparato representado na Figura 5.11, onde um conjunto de quatro discos de membranas de PS em sua forma original, sem tratamento a plasma, foram adicionados, juntamente com um conjunto de quatro discos de PS/PANI. Devido à sua elevada hidrofobicidade (como mostrado na Figura 6.9b), as membranas de PS devem atuar como uma barreira física que favorece a retenção da solução, permitindo assim que ocorra uma melhor interação entre os discos de PS/PANI e o DNA. Na Figura 6.23, é mostrado o espectro de absorção UV-Vis da solução de DNA em cada etapa dos experimentos realizados com a utilização

dessa configuração de coluna de centrifugação. Na curva C_i , a banda em 260 nm corresponde a uma concentração de DNA de 50,9 mg/L. Depois de termos passado a solução de DNA através de uma coluna de centrifugação, a intensidade (curva C_f) diminui consideravelmente, sendo a concentração final de DNA estimada como de apenas 11,2 mg/L. Dessa forma, 78 % das cadeias de DNA presentes na solução original foram capturadas com sucesso. Após a adição da solução de eluição, as cadeias de ácidos nucleicos foram liberadas da superfície das membranas de PS/PANI, como pode ser visto ao se examinar a curva C_{DES} , onde a intensidade da banda de 260 nm corresponde a uma concentração de 28,8 mg/L, o que revela que 72,5 % da quantidade total de adsorvida DNA foi eluída para a solução.

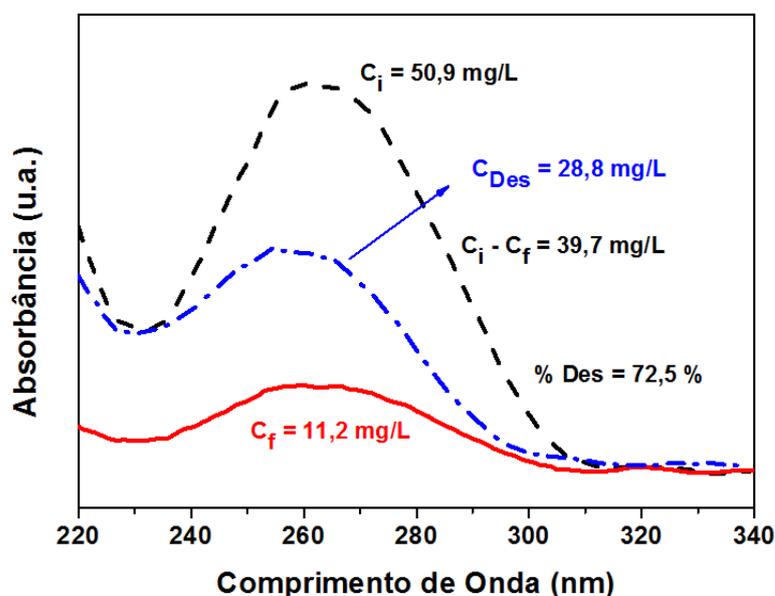


Figura 6.23: Espectro UV-Vis da solução de DNA antes (C_i) e depois (C_f) da interação com membranas de PS/PANI usando uma coluna de centrifugação e espectro de solução de DNA após o processo de dessorção (C_{Des}).

Dessa forma, ao compararmos os resultados dos experimentos realizados sob agitação com aqueles obtidos usando a configuração de coluna de centrifugação, vemos que a segunda aparece como a mais eficiente. Quando se utiliza a coluna de centrifugação, observou-se que não só a percentagem de adsorção foi consideravelmente mais elevada, mas também que todo o processo foi mais rápido do que no modo batelada. Atribuímos este fato a um aumento do grau de difusão da solução aquosa de DNA sobre a membrana. Esta experiência podem ser tomada como uma prova de conceito de que as membranas PS/PANI podem ser facilmente adaptadas para uma configuração de coluna de centru-

gação. Para complementar essa análise, utilizamos a técnica de eletroforese para mostrar que o DNA não é danificado durante o processo de dessorção; a metodologia e os resultados correspondente podem ser encontrados no Apêndice A.1.

Podemos concluir então que a incorporação das membranas compósitas em uma coluna de centrifugação proporciona uma maior rapidez nos processos de adsorção e dessorção, além de uma grande facilidade na operação, sendo ainda relativamente econômico. Essas vantagens são de fundamental importância em laboratórios clínicos, como por exemplo, no diagnóstico de doenças, onde a rapidez na obtenção dos resultados pode ser uma vantagem competitiva sobre os métodos tradicionais.

Conclusões e Perspectivas

Discutimos neste trabalho a preparação de membranas PS/PANI capazes de interagir com cadeias de DNA de esperma de salmão, através da interação eletrostática entre as cargas positivas da PANI e as negativas naturalmente existentes em uma cadeia de DNA. Essas membranas resultam da modificação de membranas PS preparadas através da técnica de eletrofiação, que são posteriormente tratadas termicamente e a plasma, e a seguir sujeitas à polimerização *in situ* química da anilina. Seguindo esses procedimentos, obtivemos membranas flexíveis e porosas que exibiram propriedades físico-químicas compatíveis com revestimento nanoestruturado da PANI sobre as fibras de PS. Com isso, fomos capazes de superar os problemas de aglomeração e fragilidade normalmente associados ao uso de polímeros intrinsecamente condutores. As técnicas de caracterização adotadas permitiram o conhecimento mais detalhado sobre a superfície, propriedades e composição das membranas de PS e PS/PANI. Um exemplo disso é a medida de ângulo de contato, que revelou ser possível a mudança da propriedade de molhabilidade das membranas após serem expostas ao tratamento a plasma. Além disso, a caracterização da membrana de PS/PANI por UV-Vis confirmou que as cadeias de PANI se encontravam no estado de oxidação sal esmeraldina. Depois de concluídos os trabalhos de caracterização, foi testada a capacidade de adsorção de DNA das membranas de PS/PANI como função de vários parâmetros, tal como o tempo de interação e a concentração inicial de DNA. A partir destes estudos, verificou-se que, quando utilizadas em modo de batelada, as membranas de PS/PANI possuem uma elevada capacidade de adsorção de DNA (153,8 mg/g) após um tempo de interação de apenas 9 minutos. A capacidade de dessorção foi outro parâmetro relevante que examinamos, quando podemos mostrar que 100 % da quantidade de DNA adsorvido poderia ser liberado em apenas 10 min. A relevância destes valores surge quando eles são comparados com as capacidades de outros materiais previamente relatados na literatura: em relação a eles, a membrana PS/PANI apresenta uma excelente combinação de propriedades favoráveis, tais como alta capacidade de adsorção, elevado

grau de DNA desorvido pela eluição e curtos tempos de adsorção-desorção. Com os resultados dos experimentos de adsorção-desorção, exploramos o fato de que as membranas de PS/PANI podem ser facilmente utilizadas sob várias formas alternativas (ou seja, dobradas, cortadas ou compactadas) sem perder sua integridade, para adaptá-las para uso em uma instalação experimental coluna de centrifugação. Por sua vez, imagens de fluorescência permitiram o acompanhamento dos experimentos, através da ligação de um corante com o DNA, o que revelou existir um aumento e decréscimo de pontos brilhantes na superfície da membrana nos processos de adsorção e desorção, respectivamente. Os resultados correspondentes usando uma coluna de centrifugação indicam que não só o processo foi mais rápido, mas também que a quantidade de DNA adsorvido foi maior do que a obtida no modo batelada. Portanto, sugerimos que estas membranas de PS/PANI poderiam ser usadas como componentes ativos para kits de extração de DNA semelhantes a aqueles que estão atualmente disponíveis. Com isso, futuramente estas membranas de PS/PANI poderiam ser utilizadas em diferentes aplicações biomédicas, tais como suportes de DNA para a transfecção genética, biossensores e agentes para separação e purificação de outras biomoléculas a partir de vários meios.

Neste trabalho, membranas compósitas de PS/PANI foram utilizadas com sucesso para remoção de cadeias de DNA dissolvidas em meio aquoso. Como perspectiva para novos trabalhos, podemos tentar aprimorar a capacidade de adsorção das cadeias de DNA na superfície dessas membranas, como por exemplo, através do aumento da sua área superficial. Essa característica, pode ser conseguida pela diminuição do diâmetro das fibras da membrana de PS. Além disso, pode ser realizado um estudo com diferentes polímeros condutores para investigar a possível melhora adicional na capacidade de adsorção. Outra análise que pode ser feita é um estudo teórico sobre a termodinâmica de adsorção. Finalmente, a membrana de PS/PANI pode ser também testada em experimentos para amostras biológicas reais, como o sangue. Um trabalho de especial interesse que pode ser desenvolvido com base nessas membranas de PS/PANI é a possibilidade de torná-la específica para capturar um determinado DNA. Por exemplo, se o objetivo foi o de capturar o DNA de esperma de salmão, e na solução existir uma mistura de vários DNAs (fita simples) de distintas origens (como por exemplo, o DNA plasmídeo (bactérias)), deve-se imobilizar um primer (DNA de fita simples) específico de esperma de salmão na superfície da membrana. Dessa forma, quando a membrana com o primer ligado entrar em contato

com a solução, apenas o DNA correspondente ao primer irá se ligar. A motivação que nos leva a pensar no sucesso da membrana de PS/PANI específica são os recentes resultados promissores da imobilização de primers em plataformas plásticas revestidas com polianilina, um trabalho que se encontra em andamento no Grupo de Polímeros Não-Convencionais. As possíveis modificações e aplicações sugeridas para a membrana de PS-PANI podem contribuir para o avanço e desenvolvimento de estudos sobre adsorção de biomoléculas, diagnóstico de doenças e biosensores.

Referências

- [1] BRANCO, S. et al. Genetic isolation between two recently diverged populations of a symbiotic fungus. *Molecular ecology*, Wiley Online Library, v. 24, n. 11, p. 2747–2758, 2015.
- [2] KIEFFER, B. L. et al. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 89, n. 24, p. 12048–12052, 1992.
- [3] KOONTZ, D. et al. Evaluation of DNA extraction methods for the detection of cytomegalovirus in dried blood spots. *Journal of Clinical Virology*, Elsevier, v. 66, p. 95–99, 2015.
- [4] KASU, M.; SHIRES, K. The validation of forensic DNA extraction systems to utilize soil contaminated biological evidence. *Legal Medicine*, Elsevier, v. 17, n. 4, p. 232–238, 2015.
- [5] TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *BioMed Research International*, Hindawi Publishing Corporation, v. 2009, 2009.
- [6] MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, Oxford Univ Press, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.
- [7] ALLEN, G. et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature protocols*, Nature Publishing Group, v. 1, n. 5, p. 2320–2325, 2006.
- [8] JIANG, W. et al. Optimized DNA extraction and metagenomic sequencing of airborne microbial communities. *Nature protocols*, Nature Publishing Group, v. 10, n. 5, p. 768–779, 2015.

- [9] LITTLE, M. C. *Process for the purification of DNA on diatomaceous earth*. [S.l.]: Google Patents, 1991. US Patent 5,075,430.
- [10] KENDALL, E. L.; WIENHOLD, E.; DEVOE, D. L. A chitosan coated monolith for nucleic acid capture in a thermoplastic microfluidic chip. *Biomicrofluidics*, AIP Publishing, v. 8, n. 4, p. 044109, 2014.
- [11] CORCHERO, J. L.; VILLAVERDE, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends in biotechnology*, Elsevier, v. 27, n. 8, p. 468–476, 2009.
- [12] MEDINA-LLAMAS, J. C. et al. Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions. *Journal of colloid and interface science*, Elsevier, v. 434, p. 167–174, 2014.
- [13] LI, X.; ZHANG, J.; GU, H. Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Langmuir*, ACS Publications, v. 27, n. 10, p. 6099–6106, 2011.
- [14] *GENELUTETM* Plasmid Miniprep Kit. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln70bul.pdf>. Acessado em 19/04/2016.
- [15] ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. et al. Hierarchical composite polyaniline–(electrospun polystyrene) fibers applied to heavy metal remediation. *ACS applied materials & interfaces*, ACS Publications, v. 7, n. 13, p. 7231–7240, 2015.
- [16] WANG, R. et al. Electrospun nanofibrous membranes for high flux microfiltration. *Journal of Membrane Science*, Elsevier, v. 392, p. 167–174, 2012.
- [17] MINAKUCHI, H. et al. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 68, n. 19, p. 3498–3501, 1996.
- [18] HARDICK, O. et al. Nanofiber adsorbents for high productivity continuous downstream processing. *Journal of biotechnology*, Elsevier, v. 213, p. 74–82, 2015.

- [19] DEMIRCI, S.; CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Surface modification of electrospun cellulose acetate nanofibers via raft polymerization for DNA adsorption. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 113, p. 200–207, 2014.
- [20] SAKAI, S. et al. Surface immobilization of poly (ethylamine) and plasmid DNA on electrospun poly (l-lactic acid) fibrous mats using a layer-by-layer approach for gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Wiley Online Library, v. 88, n. 2, p. 281–287, 2009.
- [21] ZHANG, J. et al. Co-electrospun fibrous scaffold–adsorbed DNA for substrate-mediated gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Wiley Online Library, v. 96, n. 1, p. 212–220, 2011.
- [22] MANO, E. B.; MENDES, L. C. *Introdução a polímeros. 2ª*. [S.l.]: Ed, 2004.
- [23] EBEWELE, R. O. *Polymer science and technology*. [S.l.]: CRC press, 2000.
- [24] COWIE, J. M. G.; ARRIGHI, V. *Polymers: chemistry and physics of modern materials*. [S.l.]: CRC press, 2007.
- [25] ENGINEERS, N. *Disposable Products Manufacturing Handbook*. NIIR PROJECT CONSULTANCY SERVICES, 2014. ISBN 9789381039328. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=PQaJAqAAQBAJ>>.
- [26] A2 Advanced Organic Chemistry - Polymerisation. <http://www.chemistryrules.me.uk/candrands/polymerisation.htm>. Acessado em 24/04/2016.
- [27] PATRICK, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*. [S.l.]: Oxford university press, 2013.
- [28] LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. *Molecular cell biology* 4th edition. National Center for Biotechnology Information's Bookshelf, 2000.
- [29] WATSON, J. D. et al. The structure of DNA and RNA. *Molecular biology of the gene Volume chapter*, v. 6, 2004.
- [30] SINDEN, R. R. *DNA structure and function*. [S.l.]: Elsevier, 2012.

- [31] WATSON, J. D.; CRICK, F. H. et al. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953.
- [32] CHANG, R.; GOLDSBY, K. *Química*. [S.l.]: AMGH Editora, 2013.
- [33] PRAY, L. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education*, v. 1, n. 1, 2008.
- [34] REGATEIRO, F. J. Manual de genética médica. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2003.
- [35] PURVES, W. K. *Vida: a ciência da biologia: volume I: célula e hereditariedade*. [S.l.]: ArTmed, 2005.
- [36] FREYMAN, G. von et al. Bottom-up assembly of photonic crystals. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry, v. 42, n. 7, p. 2528–2554, 2013.
- [37] SHIRAKAWA, H. et al. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, Royal Society of Chemistry, n. 16, p. 578–580, 1977.
- [38] SHI, Y.; PENG, L.; YU, G. Nanostructured conducting polymer hydrogels for energy storage applications. *Nanoscale*, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 30, p. 12796–12806, 2015.
- [39] JANATA, J.; JOSOWICZ, M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. *Nature materials*, Nature Publishing Group, v. 2, n. 1, p. 19–24, 2003.
- [40] NAMBIAR, S.; YEOW, J. T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 26, n. 5, p. 1825–1832, 2011.
- [41] SHOWN, I. et al. Conducting polymer-based flexible supercapacitor. *Energy Science & Engineering*, Wiley Online Library, v. 3, n. 1, p. 2–26, 2015.
- [42] SITARAM, S. P.; STOFFER, J. O.; O'KEEFE, T. J. Application of conducting polymers in corrosion protection. *Journal of Coatings Technology*, Springer, v. 69, n. 866, p. 65–69, 1997.

- [43] ROHWERDER, M. Conducting polymers for corrosion protection: a review. *International Journal of Materials Research*, Carl Hanser Verlag, v. 100, n. 10, p. 1331–1342, 2009.
- [44] RAVICHANDRAN, R. et al. Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, The Royal Society, v. 7, n. Suppl 5, p. S559–S579, 2010.
- [45] HEEGER, A.; AG, M.; SHIRAKAWA, H. The Nobel Prize in Chemistry, 2000: Conductive polymers, kungl. Vetenskapsakademien, *The Royal Swedish Academy Of Science, Sweden*, 2000.
- [46] FAEZ, R. et al. Polímeros condutores. *Química Nova na Escola*, v. 11, n. 1, p. 13–18, 2000.
- [47] BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. *Accounts of Chemical Research*, ACS Publications, v. 18, n. 10, p. 309–315, 1985.
- [48] MEDEIROS, E. S.; FILHO, J. O.; MATTOSO, L. Uso de polímeros condutores em sensores. parte 1:introdução aos polímeros condutores. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 7, n. 2, p. 62–77, 2012.
- [49] MOLAPO, K. M. et al. Electronics of conjugated polymers (i): polyaniline. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 7, n. 12, p. 11859–11875, 2012.
- [50] ELSCHNER, A. et al. *PEDOT: principles and applications of an intrinsically conductive polymer*. [S.l.]: CRC Press, 2010.
- [51] WAN, M. et al. *Conducting polymers with micro or nanometer structure*. [S.l.]: Springer, 2008.
- [52] LI, Y. *Organic optoelectronic materials*. [S.l.]: Springer, 2015. v. 91.
- [53] ROTH, S.; CARROLL, D. Conducting polymers: Solitons and polarons. *One-Dimensional Metals: Conjugated Polymers, Organic Crystals, Carbon Nanotubes, Second Edition*, Wiley Online Library, p. 85–112, 2015.

- [54] ZOPPI, R. A.; PAOLI, M.-A. D. Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: perspectivas atuais. *Química nova*, v. 16, p. 6, 1993.
- [55] BERNIER, P.; BIDAN, G.; LEFRANT, S. *Advances in synthetic metals: twenty years of progress in science and technology*. [S.l.]: Elsevier, 1999.
- [56] SANCHES, E. A. *Estudos de XRD e SAXS aplicados à Polianilina e à Poli (o-metoxianilina)*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2011.
- [57] ANSARI, R.; KEIVANI, M. Polyaniline conducting electroactive polymers thermal and environmental stability studies. *Journal of Chemistry*, Hindawi Publishing Corporation, v. 3, n. 4, p. 202–217, 2006.
- [58] MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. *Química Nova*, v. 19, n. 4, p. 388–399, 1996.
- [59] BHADRA, S. et al. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in polymer science*, Elsevier, v. 34, n. 8, p. 783–810, 2009.
- [60] NALWA, H. S. *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers, Volume 2, Conductive Polymers: Synthesis and Electrical Properties*. [S.l.]: Chichester: John Wiley and Sons, 1997.
- [61] WANG, B.; TANG, J.; WANG, F. Electrochemical polymerization of aniline. *Synthetic Metals*, Elsevier, v. 18, n. 1, p. 323–328, 1987.
- [62] STAFSTRÖM, S. et al. Polaron lattice in highly conducting polyaniline: theoretical and optical studies. *Physical Review Letters*, APS, v. 59, n. 13, p. 1464, 1987.
- [63] SAINI, P.; ARORA, M. Microwave absorption and emi shielding behavior of nanocomposites based on 2 intrinsically conducting polymers, 3 graphene and carbon nanotubes 4. 2012.
- [64] CANALES, M. et al. Polyaniline emeraldine salt in the amorphous solid state: Polaron versus bipolaron. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 118, n. 39, p. 11552–11562, 2014.
- [65] RNJAK-KOVACINA, J.; WEISS, A. S. Increasing the pore size of electrospun scaffolds. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 17, n. 5, p. 365–372, 2011.

- [66] BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology advances*, Elsevier, v. 28, n. 3, p. 325–347, 2010.
- [67] MATTHEWS, J. A. et al. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, ACS Publications, v. 3, n. 2, p. 232–238, 2002.
- [68] JHA, B. S. et al. Electrospun collagen: a tissue engineering scaffold with unique functional properties in a wide variety of applications. *Journal of Nanomaterials*, Hindawi Publishing Corp., v. 2011, p. 7, 2011.
- [69] LIU, H. et al. Electrospinning of nanofibers for tissue engineering applications. *Journal of Nanomaterials*, Hindawi Publishing Corp., v. 2013, p. 3, 2013.
- [70] UYAR, T.; BESENBACHER, F. Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer*, Elsevier, v. 49, n. 24, p. 5336–5343, 2008.
- [71] ES-SAHEB, M. et al. A novel electrospinning application for polyvinyl chloride nanofiber coating deposition as a corrosion inhibitor for aluminum, steel, and brass in chloride solutions. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 7, n. 7, p. 5962–5976, 2012.
- [72] LIU, H.; HSIEH, Y.-L. Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, Wiley Online Library, v. 40, n. 18, p. 2119–2129, 2002.
- [73] ANTON, F. *Process and apparatus for preparing artificial threads*. [S.l.]: Google Patents, 1934. US Patent 1,975,504.
- [74] FORMHALS, A. Patent no. 2,160,962. *United States*, 1939.
- [75] ANTON, F. *Artificial thread and method of producing same*. [S.l.]: Google Patents, 1940. US Patent 2,187,306.
- [76] ANTON, F. *Production of artificial fibers from fiber forming liquids*. [S.l.]: Google Patents, 1943. US Patent 2,323,025.
- [77] ANTON, F. *Method and apparatus for spinning*. [S.l.]: Google Patents, 1944. US Patent 2,349,950.

- [78] WENDORFF, J. H.; AGARWAL, S.; GREINER, A. *Electrospinning: materials, processing, and applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.
- [79] HE, J.-H. et al. *Electrospun nanofibres and their applications*. [S.l.]: ISmithers Shawbury, UK, 2008.
- [80] VONNEGUT, B.; NEUBAUER, R. L. Production of monodisperse liquid particles by electrical atomization. *Journal of colloid science*, Elsevier, v. 7, n. 6, p. 616–622, 1952.
- [81] DROZIN, V. G. The electrical dispersion of liquids as aerosols. *Journal of colloid science*, Elsevier, v. 10, n. 2, p. 158–164, 1955.
- [82] SIMONS, H. L. *Process and apparatus for producing patterned non-woven fabrics*. [S.l.]: Google Patents, 1966. US Patent 3,280,229.
- [83] BAUMGARTEN, P. K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of colloid and interface science*, Elsevier, v. 36, n. 1, p. 71–79, 1971.
- [84] HUANG, Z.-M. et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, Elsevier, v. 63, n. 15, p. 2223–2253, 2003.
- [85] ZIABARI, M.; MOTTAGHITALAB, V.; HAGHI, A. Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Scielo Brasil, v. 26, n. 1, p. 53–62, 2009.
- [86] MIT-UPPATHAM, C.; NITHITANAKUL, M.; SUPAPHOL, P. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromolecular Chemistry and Physics*, Wiley Online Library, v. 205, n. 17, p. 2327–2338, 2004.
- [87] RAMAKRISHNA, S. et al. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. [S.l.]: World Scientific, 2005. v. 90.
- [88] Instrumentação, E. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. *Polímeros*, Scielo Brasil, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.

- [89] LI, Z.; WANG, C. Effects of working parameters on electrospinning. In: *One-Dimensional Nanostructures*. [S.l.]: Springer, 2013. p. 15–28.
- [90] HILAL, N.; KHAYET, M.; WRIGHT, C. J. *Membrane modification: Technology and applications*. [S.l.]: CRC Press, 2012.
- [91] ELECTROSPINTECH. *Heat treatment of Electrospun Membrane*. <http://electrospintech.com/heatmembrane>. Acessado em 20/04/2016.
- [92] SHARMA, S. K. *Green Chemistry for dyes removal from waste water: research trends and applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015.
- [93] WORCH, E. *Adsorption technology in water treatment: fundamentals, processes, and modeling*. [S.l.]: Walter de Gruyter, 2012.
- [94] RASHED, M. N. *Adsorption technique for the removal of organic pollutants from water and wastewater*. [S.l.]: INTECH Open Access Publisher, 2013.
- [95] NASCIMENTO, R. F. do et al. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. *Biblioteca de Ciências e Tecnologia*, 2014.
- [96] LANGMUIR, I. Surface chemistry. *Nobel Lectures. Chemistry 1922-1941*, p. 287–325, 1932.
- [97] MASEL, R. I. *Principles of adsorption and reaction on solid surfaces*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1996. v. 3.
- [98] FAUST, S. D.; ALY, O. M. *Adsorption processes for water treatment*. [S.l.]: Elsevier, 2013.
- [99] FREUNDLICH, H. *Kapillarchemie, eine Darstellung der Chemie der Kolloide und verwandter Gebiete, von Dr. Herbert Freundlich,...* [S.l.]: akademische Verlagsgesellschaft, 1909.
- [100] BASHIRI, H.; OROUJI, S. A new isotherm for multilayer gas adsorption on heterogeneous solid surfaces. *Theoretical Chemistry Accounts*, Springer, v. 134, n. 1, p. 1–7, 2015.

- [101] DADA, A. et al. Langmuir, freundlich, temkin and dubinin–radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn^{2+} unto phosphoric acid modified rice husk. *Journal of Applied Chemistry*, v. 3, n. 1, p. 38–45, 2012.
- [102] LARGERGREN, S. *Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe*. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens*. [S.l.: s.n.], 1898. v. 24. 1–39 p.
- [103] HO, Y.-S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process biochemistry*, Elsevier, v. 34, n. 5, p. 451–465, 1999.
- [104] FEBRIANTO, J. et al. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: a summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 162, n. 2, p. 616–645, 2009.
- [105] WEBER, W. J.; MORRIS, J. C. Kinetics of adsorption on carbon from solution. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, ASCE, v. 89, n. 2, p. 31–60, 1963.
- [106] PLAZINSKI, W.; RUDZINSKI, W. Kinetics of adsorption at solid/solution interfaces controlled by intraparticle diffusion: a theoretical analysis. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, v. 113, n. 28, p. 12495–12501, 2009.
- [107] CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, Elsevier, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.
- [108] KIRBY, K.; COOK, E. Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd, v. 104, n. 1, p. 254, 1967.
- [109] BUTLER, J. M. *Fundamentals of forensic DNA typing*. [S.l.]: Academic Press, 2009.
- [110] PHENOL-CHLOROFORM Extraction. <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf>. Acessado em 23/06/2016.
- [111] CORTHELL, J. T. *Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls*. [S.l.]: Academic Press, 2014.

- [112] SANKHYAN, A.; RAO, V. *Human Origins, Genome and People of India: Genomic, Palaeontological and Archaeological Perspectives*. [S.l.]: New Delhi (India): Allied Publishers, 2007.
- [113] UZMA, N. et al. Impact of organic solvents and environmental pollutants on the physiological function in petrol filling workers. *International journal of environmental research and public health*, Molecular Diversity Preservation International, v. 5, n. 3, p. 139–146, 2008.
- [114] HAWKINS, T. L. et al. DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, v. 22, n. 21, p. 4543, 1994.
- [115] WOLFE, K. A. et al. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. *Electrophoresis*, Wiley Online Library, v. 23, n. 5, p. 727–733, 2002.
- [116] DHALIWAL, A. DNA extraction and purification. *Labome*, v. 3, p. 191, 2014.
- [117] ESSER, K.-H.; MARX, W. H.; LISOWSKY, T. maxxbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods/ Application Notes*, Nature Publishing Group, 2006.
- [118] SONI, N. Extraction and purification of nucleic acid using cbnp & pcia technique. *PharmaTutor*, PharmaTutor Edu Labs, v. 4, n. 6, p. 20–22, 2016.
- [119] GHAEMI, M.; ABSALAN, G. Study on the adsorption of DNA on fe_3o_4 nanoparticles and on ionic liquid-modified fe_3o_4 nanoparticles. *Microchimica Acta*, Springer, v. 181, n. 1-2, p. 45–53, 2014.
- [120] BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, Springer, v. 73, n. 3, p. 495–504, 2006.
- [121] REDDY, P. R.; RAJU, N. Gel-electrophoresis and its applications. *Gel Electrophoresis-Principles and basics*, InTech, p. 15–32, 2012.
- [122] KARP, G. *Biologia celular y molecular: conceptos y experimentos (6a)*. [S.l.]: McGraw Hill Mexico, 2011.

- [123] POSSIK, P. A. *A análise de DNA por eletroforese*. http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia_molecular/testesgeneticos.pdf. Acessado em 20/06/2016.
- [124] DNA and Gel Electrophoresis. 2015. <http://pt.slideshare.net/mpattani/dna-and-gel-electrophoresis>. Acessado em 24/06/2016.
- [125] MULLIS, K. B. et al. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, v. 262, n. 4, p. 56–61, 1990.
- [126] FITZGERALD-HAYES, M.; REICHSMAN, F. *DNA and Biotechnology*. [S.l.]: Academic Press, 2009.
- [127] PELT-VERKUIL, E. V.; BELKUM, A. V.; HAYS, J. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. 2008. [S.l.]: Springer Verlag, Berlin. View Article Google Scholar.
- [128] POLYMERASE chain reaction. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction. Acessado em 28/06/2016.
- [129] DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. [S.l.]: EdiPUCRS, 2007.
- [130] MALISKA, A. M. *Microscopia eletrônica de varredura. Florianópolis: Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.*
- [131] AN Introduction to electron microscopy electron microscopy. http://www.nanolab.ucla.edu/pdf/Introduction_to_EM_booklet_July_10.pdf. Acessado em 20/06/2016.
- [132] SKOOG, D. A.; WEST, D. M. *Principles of instrumental analysis*. [S.l.]: Saunders College Philadelphia, 1980. v. 158.
- [133] MUKHOPADHYAY, S. M. Sample preparation for microscopic and spectroscopic characterization of solid surfaces and films. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., v. 162, n. 9, p. 377–411, 2003.

- [134] WOLF, R.; SPARAVIGNA, A. C. et al. Role of plasma surface treatments on wetting and adhesion. *Engineering*, Scientific Research Publishing, v. 2, n. 06, p. 397, 2010.
- [135] PRABHU, K. N.; FERNADES, P.; KUMAR, G. Effect of substrate surface roughness on wetting behaviour of vegetable oils. *Materials & Design*, Elsevier, v. 30, n. 2, p. 297–305, 2009.
- [136] JAGANNATH, V.; PRABHU, K. N. Quench severity and kinetics of wetting of vegetable oil blends and nanofluids for heat treatment. In: *Proceedings of New Challenges in Heat Treating and Surface Engineering—Conference in Honor of Božidar Liščić*. [S.l.: s.n.], 2009. p. 17–22.
- [137] YOUNG, T. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, JSTOR, v. 95, p. 65–87, 1805.
- [138] BRACCO, G.; HOLST, B. *Surface science techniques*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2013.
- [139] TOTTEN, G. E.; LIANG, H. *Surface modification and mechanisms: friction, stress, and reaction engineering*. [S.l.]: CRC Press, 2004.
- [140] MCKEEN, L. W. *The effect of sterilization on plastics and elastomers*. [S.l.]: William Andrew, 2012.
- [141] STURROCK, P. A. *Plasma Physics: An Introduction to the Theory of Astrophysical, Geophysical and Laboratory Plasmas*. [S.l.]: Cambridge University Press, 1994.
- [142] PLASMA-SURFACE Interaction. <http://harrickplasma.com/plasma/plasma-surface-interaction>. Acessado em 17/06/2016.
- [143] CHAUHAN, B. *Principles of biochemistry and biophysics*. [S.l.]: Firewall Media, 2008.
- [144] RYAN, J. A. Evolution of cell culture surfaces. *BioFiles*, v. 3, p. 21, 2008.
- [145] SPECTROSCOPIC Methods. http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/10_Spectroscopic_Methods. Acessado em 19/06/2016.

- [146] ULTRAVIOLET - Visible Spectroscopy (UV). <http://www.rsc.org/learn-chemistry/resource/download/res00000282/cmp00001304/pdf>. Acessado em 17/06/2016.
- [147] ULTRAVIOLET Spectroscopy. http://web.williams.edu/wp-etc/chemistry/epeacock/EPL_CHEM_155/LEC_NOTES_F02/UVvis.pdf. Acessado em 19/06/2016.
- [148] RADIAÇÃO eletromagnética.
- [149] PRIMER, A. Fundamentals of UV-visible spectroscopy. *Copyright Hewlett-Packard Company, Hewlett-Packard publication*, n. 12-5965.
- [150] KANG, E.; NEOH, K.; TAN, K. Polyaniline: a polymer with many interesting intrinsic redox states. *Progress in Polymer Science*, Elsevier, v. 23, n. 2, p. 277–324, 1998.
- [151] IZUMI, C. M. S. *Caracterização espectroscópica da polianilina em diferentes ambientes químicos*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2006.
- [152] CHANG, R. *Físico-Química: para as ciências químicas e biológicas*. [S.l.]: AMGH Editora, 2010. v. 2.
- [153] SCHMID, F.-X. Biological macromolecules: Uv-visible spectrophotometry. *eLS*, Wiley Online Library, 2001.
- [154] WATSON, J. D.; LEVINTHAL, C. et al. Molecular biology of the gene. *Molecular biology of the gene.*, New York and Amsterdam: WA Benjamin, Inc., 1965.
- [155] ROBERTS, R. J. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. *Journal of Fish Diseases*, Wiley Online Library, v. 28, n. 10, p. 627–627, 2005.
- [156] STUART, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications/H. Barbara Stuart*. [S.l.]: Wiley, 2004, 224 p.
- [157] DIAS, S. L. P. et al. *Química Analítica: Teoria e Prática Essenciais*. [S.l.]: Bookman Editora, 2016.

- [158] SEIDEL, A. *Characterization and analysis of polymers*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008.
- [159] HARVEY, D. *Modern analytical chemistry*. [S.l.]: McGraw-Hill New York, 2000. v. 1.
- [160] GÜNZÍER, H.; WILLIAMS, A. Handbook of analytical techniques. *Evolution*, v. 1, p. 1–2, 2001.
- [161] LIN, J.; WANG, L. Comparison between linear and non-linear forms of pseudo-first-order and pseudo-second-order adsorption kinetic models for the removal of methylene blue by activated carbon. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, Springer, v. 3, n. 3, p. 320–324, 2009.
- [162] (MADISON), P. C.; DOYLE, K.; MILES, J. *Protocols and applications guide*. [S.l.]: Promega Corporation, 1996.
- [163] BEIN, T.; ENZEL, P. Inclusion of conducting polymers in inorganic hosts: Towards conducting nanostructures. In: *Intrinsically Conducting Polymers: An Emerging Technology*. [S.l.]: Springer, 1993. p. 51–60.
- [164] RASHID, M. et al. Polyaniline/palm oil blend for anticorrosion of mild steel in saline environment. *Journal of Applied Chemistry*, Hindawi Publishing Corporation, v. 2014, 2014.
- [165] STEJSKAL, J.; SAPURINA, I.; TRCHOVÁ, M. Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation. *Progress in Polymer Science*, Elsevier, v. 35, n. 12, p. 1420–1481, 2010.
- [166] KIM, B.-J. et al. Synthesis and characterization of polyaniline nanoparticles in sds micellar solutions. *Synthetic Metals*, Elsevier, v. 122, n. 2, p. 297–304, 2001.
- [167] MAHANTA, D. et al. Adsorption of sulfonated dyes by polyaniline emeraldine salt and its kinetics. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 112, n. 33, p. 10153–10157, 2008.

- [168] GUL, S.; BILAL, S. et al. Synthesis and characterization of processable polyaniline salts. In: IOP PUBLISHING. *Journal of Physics: Conference Series*. [S.l.], 2013. v. 439, n. 1, p. 012002.
- [169] LU, X. et al. Room temperature ionic liquid based polystyrene nanofibers with superhydrophobicity and conductivity produced by electrospinning. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, v. 20, n. 10, p. 3420–3424, 2008.
- [170] CHEN, Y. et al. Fabrication of pedot nanowhiskers for electrical connection of the hemoglobin active center for h_2o_2 electrochemical biosensing. *J. Mater. Chem. B*, The Royal Society of Chemistry, v. 1, n. 28, p. 3451–3457, 2013.
- [171] JAVADIAN, H.; VAHEDIAN, P.; TOOSI, M. Adsorption characteristics of Ni (II) from aqueous solution and industrial wastewater onto polyaniline/hms nanocomposite powder. *Applied Surface Science*, Elsevier, v. 284, p. 13–22, 2013.
- [172] GOLDBERG, S. et al. Equations and models describing adsorption processes in soils. *Chemical processes in soils*, Soil Science Society of America Inc., p. 489–517, 2005.
- [173] FO, O.; ODEBUNMI, E. Freundlich and langmuir isotherms parameters for adsorption of methylene blue by activated carbon derived from agrowastes. *Advances in Natural and Applied sciences*, v. 4, p. 281–288, 2010.
- [174] JAVADIAN, H. et al. Study of the adsorption of Cd (II) from aqueous solution using zeolite-based geopolymer, synthesized from coal fly ash; kinetic, isotherm and thermodynamic studies. *Arabian Journal of Chemistry*, Elsevier, 2013.
- [175] WANG, X. et al. Novel polymeric ionic liquid microspheres with high exchange capacity for fast extraction of plasmid DNA. *Analytica chimica acta*, Elsevier, v. 837, p. 64–69, 2014.
- [176] TANG, Y.; REN, Y.; SHI, X. Bifunctional mesoporous zirconium phosphonates for delivery of nucleic acids. *Inorganic chemistry*, ACS Publications, v. 52, n. 3, p. 1388–1397, 2013.

- [177] TENG, Z. et al. Highly magnetizable superparamagnetic iron oxide nanoparticles embedded mesoporous silica spheres and their application for efficient recovery of DNA from agarose gel. *Journal of Materials Chemistry*, Royal Society of Chemistry, v. 19, n. 13, p. 1811–1815, 2009.
- [178] LI, X.; ZHANG, J.; GU, H. Study on the adsorption mechanism of DNA with mesoporous silica nanoparticles in aqueous solution. *Langmuir*, ACS Publications, v. 28, n. 5, p. 2827–2834, 2012.
- [179] ZHANG, J. et al. Synthesis and characterization of pore size-tunable magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, Elsevier, v. 361, n. 1, p. 16–24, 2011.
- [180] HUANG, Y.-T. et al. DNA adsorption by nanocrystalline allophane spherules and nanoaggregates, and implications for carbon sequestration in andisols. *Applied Clay Science*, Elsevier, v. 120, p. 40–50, 2016.
- [181] LI, R. *Forensic biology*. [S.l.]: CRC Press, 2015.

Apêndice

A.1 Experimento de eletroforese em gel de agarose

Esta técnica foi utilizada para verificar se o DNA não seria danificado pela membrana compósita após o processo de dessorção. O experimento foi realizado com amostras de DNA de esperma de salmão obtidas antes e depois da interação com a membrana. Na Figura A.1, são mostrados algumas sequências dos passos necessários para a realização do experimento.

- **Preparação do gel de agarose e execução da técnica**

1. Inicialmente, organizamos todos os materiais necessários para a execução da técnica (passo 1), depois pesamos 1 g de agarose e preparamos 1 L de solução tampão TAE 0,5 X (Promega (EUA));
2. Em um Erlenmeyer de 250 mL adicionamos a agarose e 100 mL da solução tampão, sendo posteriormente aquecido durante 1 min (passo 2);
3. Depois disso, 10 μ l do corante fluorescente de ácidos nucleicos *DiamondTM* (Promega (EUA)) foram adicionados ao Erlenmeyer (passo 3), que foi deixado 'descansar' até atingir uma temperatura em torno de 50°C, para então ser despejado com cuidado em uma bandeja, onde encontrava-se acoplado um acessório responsável pela formação dos poços, onde são depositadas as amostras (passo 4);
4. Após a solidificação da agarose, o suporte foi colocado na cuba de eletroforese 15 cm x 15 cm (Kasvi, Brasil), sendo em seguida despejada a solução tampão 0,5 X até o preenchimento de toda a bandeja com o gel de agarose;
5. Posteriormente, em uma película flexível preparamos as amostras de DNA de esperma de salmão a serem analisadas. Para isso, 8 μ l de cada amostra de DNA

foi misturada com $2 \mu\text{l}$ do corante Blue-Orange Loading Dye 6 X (Promega (EUA)), totalizando $10 \mu\text{l}$ em cada poço (passo 5);

6. Com as amostras prontas, retiramos o acessório acoplado na bandeja e adicionamos cuidadosamente as amostras nos poços (passo 6);
7. Depois disso, fechamos a cuba e conectamos os eletrodos positivo e negativo a uma fonte de alimentação para eletroforese (Kasvi, Brasil), aplicando uma voltagem de 60 V para dar início a corrida, que após 10 min foi aumentada para 100 V (passo 7);
8. Ao término do processo, o gel foi retirado da cuba e levado para o transiluminador (Kasvi, Brasil) para ser analisado.

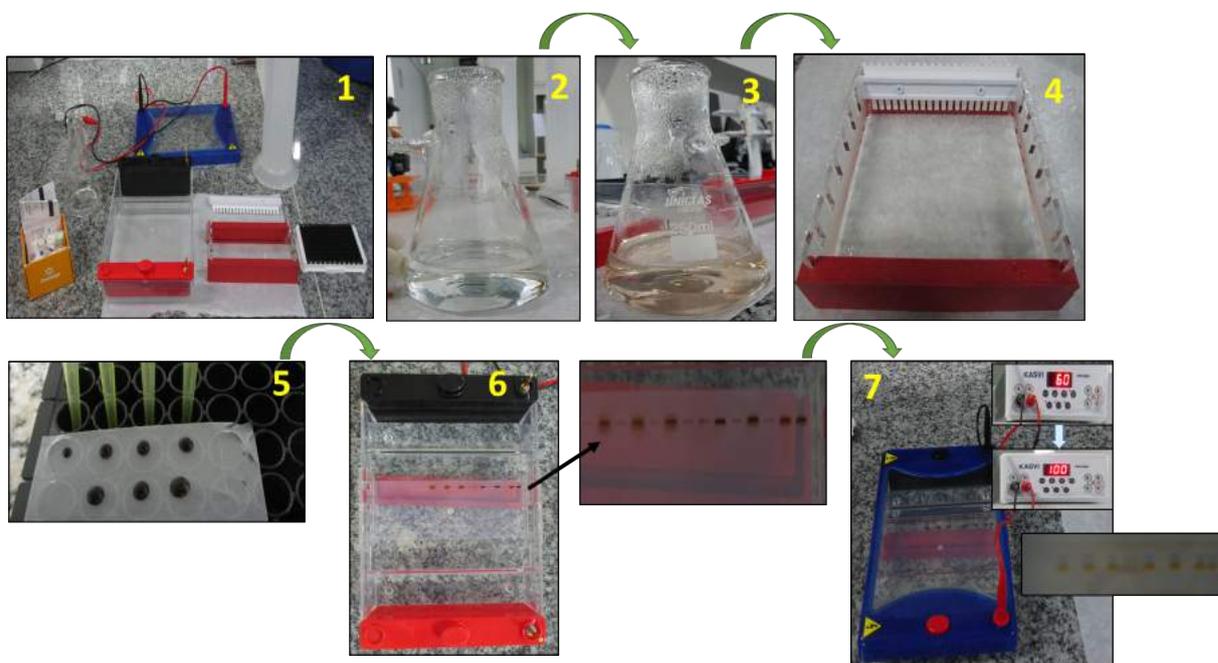


Figura A.1: Sequência de passos para a execução da técnica de eletroforese. (1) materiais utilizados no processo, (2) a preparação do gel, (3) adição do corante Diamond, (4) bandeja acoplada com o pente para o suporte do gel, (5) preparação das amostras, (6) amostras adicionadas ao poço e, finalmente, em (7) a cuba pronta para a execução da técnica.

A.1.1 Resultado Eletroforese

Utilizamos a técnica de eletroforese em gel de agarose para verificar se o DNA de esperma de salmão não seria danificado após o processo de dessorção. Para isso, realizamos o processo de adsorção-dessorção utilizando a configuração por coluna de centrifugação. A Figura A.2 mostra os resultados obtidos ao término do processo. No primeiro poço do gel de agarose, foi depositada a amostra de DNA antes da interação com a membrana de PS/PANI (1), enquanto que no segundo foi colocada aquela após a dessorção (2). Podemos observar que nos dois casos a intensidade não muda, ou seja, que o DNA não é prejudicado ao ser eluído da membrana. Neste experimento não conseguimos um tamanho de banda definido. O rastro que visualizamos antes e depois da dessorção, provavelmente está relacionado com a preparação do DNA de esperma de salmão comercial, ou seja, que podem existir diferentes tamanhos de fragmentos de DNA na amostra. Dessa forma, não conseguindo identificar uma banda precisa.

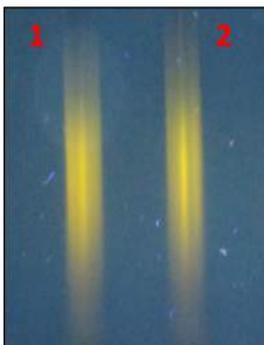


Figura A.2: Eletroforese do DNA de esperma de salmão antes (1) e depois da interação com a membrana de PS/PANI (2).