



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais

Rubênia Silveira Monte

**SEPARAÇÃO E ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS POR
MEMBRANAS NANOESTRUTURADAS DE
POLIESTIRENO**

Recife
2017

RUBÊNIA SILVEIRA MONTE

**SEPARAÇÃO E ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS POR MEMBRANAS
NANOESTRUTURADAS DE POLIESTIRENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Co-orientador interno: Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago Falcão

Co-orientador externo: Dr. Juan Carlos Medina Llamas

Recife

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária Elaine Cristina de Freitas CRB4-1790

M772s Monte, Rubênia Silveira
 Separação e adsorção de proteínas por membranas nanoestruturadas de poliestireno / Rubênia Silveira Monte. – 2017.
 139 f.: fig., tab.

 Orientador: Celso Pinto de Melo.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2017.
 Inclui referências e apêndices

 1. Ciência de Materiais. 2. Eletrofiliação 3. Membranas porosas. I. Melo, Celso Pinto de (Orientador). II. Título.

 620.11 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2018-12

RUBÊNIA SILVEIRA MONTE

**SEPARAÇÃO E ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS POR MEMBRANAS
NANOESTRUTURADAS DE POLIESTIRENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 07/ 03/ 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Departamento de Física

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Departamento de Farmácia

Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Departamento de Bioquímica

Dedico este trabalho a todos aqueles que ao longo desta minha jornada não mediram esforços para torná-lo possível.

À minha mãe, meus irmãos e meus tios João e Adair, por todo apoio, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado direto ou indireto da contribuição de muitas pessoas, sem as quais ele não seria possível, por isso agradeço:

À Deus, por nos permitir desvendar os mistérios da sua criação.

À minha família, pelo amor e apoio incondicional, em especial minha mãe Aldenora e irmãos Robson, Rômulo e Rubens, por aceitaram minha ausência compreendendo que estou me empenhando por um futuro melhor.

Aos meus tios Adair e João, meus segundos pais, por terem depositado tanta confiança em mim, por todo amor e carinho, e por terem sido meus mestres no caminho da vida. Muito do que eu sou devo a vocês!

A Macário por me ajudar com a revisão deste trabalho, pelos ensinamentos e discussões. Obrigada pela paciência em me escutar e por todo companheirismo, amizade e apoio nos momentos de dificuldade.

À dona Edna Mirtes, pelos conselhos, paciência e cuidado comigo.

As pessoas que me acolheram em Recife, Azinete, Edna, Carla, Marcílio, Bruna, Inglid, Simone e Gláucia.

Ao professor Celso, excelente profissional e ser humano, pela sua dedicação, paciência, serenidade e transmissão do seu conhecimento.

A todos do Laboratório de Polímeros Não-Convencionais (PNC), pelas discussões, ensinamentos, contribuições, companheirismo e amizade, em especial a Winnie, Graciela, Filipe e Romário.

Aos pós-doutorandos do PNC Juan, Alicia e Jarib, pelas discussões e ensinamentos, e por contribuírem para que esse trabalho pudesse ser possível.

Ao Sandro pela amizade, ensinamentos e discussões.

À Jéssica e Aline do Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia e Hemoderivados da UFPE, por me ajudarem com o procedimento de eletroforese.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais.

À FACEPE e ao Ministério da Saúde, pelo suporte financeiro e ao CNPq pela bolsa concedida.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

—Theodore Roosevelt

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece”.

Benjamin Disraeli

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi a investigação de membranas de nanoestruturadas de poliestireno (MNPS) como matriz para protocolos de separação de proteínas. As MNPS utilizadas, fabricadas através da técnica de eletrofiação, foram expostas a um tratamento de plasma de ar para permitir sua funcionalização pela inserção de grupos carboxílicos. Examinamos as características químicas, morfológicas e superficiais dessas MNPS, e os parâmetros físico-químicos que mais tiveram influência sobre a adsorção de uma proteína modelo, a Albumina do Soro Bovino (BSA). Para elucidar as propriedades das MNPS, assim como os mecanismos envolvidos entre BSA/MNPS, foram empregadas caracterizações, como microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), quantificação dos COOH pelo método do corante Azul de Toluidina O (TBO), medidas de ângulo de contato, espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) e eletroforese. Quando estudada através de MEV, a morfologia das membranas modificadas revelou a presença de nanoestruturas em forma de fibras, com uma porosidade elevada que depende do tempo de exposição ao plasma (0 a 20 min). A análise por FTIR confirmou a incorporação de grupos carboxílicos na superfície das MNPS modificadas, o que é consistente com medidas de ângulo de contato que indicaram o alto grau de hidrofiliicidade e, com o método TBO que mostrou a elevada concentração de COOH nas MNPS. Ao estudar a afinidade das membranas carboxiladas pelos grupos amino da BSA, investigamos a variação da capacidade de adsorção das MNPS como função do pH do meio e do tipo de solução tampão utilizada, da concentração inicial de BSA e do tempo de modificação das MNPS pela exposição ao plasma. A análise das soluções de BSA por meio de UV-Vis confirmou a mudança da concentração de proteína no meio, nos permitindo estimar a quantidade de BSA adsorvida pelas MNPS. A maior capacidade de adsorção foi de 55,07 mg/g, para as MNPS submetidas a 14 min de tratamento por plasma e utilizando 500 µL de soluções preparadas com uma concentração inicial de BSA de 3,6 mg.mL⁻¹, em pH 5,0, em meio de 2 M HAc-NaAc (ácido acético-acetato de sódio). Os dados experimentais para a adsorção da BSA pelas MNPS carboxiladas sob estas condições foram bem ajustados pela isoterma de monocamada de Langmuir (R=0,99). As MNPS não só tiveram elevada capacidade de adsorção das moléculas de BSA, mas também foram capazes de liberar a proteína capturada, quando na presença de uma solução básica de 1,5 Tris-HCl (pH 10,0). Finalmente, medidas de eletroforese forneceram evidências de que a estrutura nativa da BSA era mantida após o processo de adsorção/dessorção pelas MNPS revelando peso molecular de 66 kDa. Com base em nossos resultados, e por sua comparação com aqueles relatados em outros trabalhos, os protocolos por nós utilizados aparecem como promissores, com vantagens comparativas associadas com a simplicidade do processo, e com os curtos tempos requeridos para altas taxas de adsorção e de dessorção (5 e 3 min, respectivamente). Sugerimos que essas MNPS modificadas podem se constituir em um promissor material alternativo para a extração de proteínas a partir de amostras biológicas.

Palavras-chave: Eletrofiação. Membranas porosas. Tratamento por plasma. Proteínas. Adsorção de BSA.

ABSTRACT

The main objective of this dissertation was the investigation of nanostructured polystyrene membranes (MNPS) as matrix for separation protocols of proteins. The membranes used were manufactured by the electrospinning technique, were exposed to an air plasma treatment to allow their functionalization by the insertion of carboxylic groups. We examined the chemical, morphological and surface characteristics of these membranes, and the physicochemical parameters that most influenced the adsorption of a model protein, Bovine Serum Albumin (BSA). In order to elucidate the properties of the MNPS, as well as the mechanisms involved in the BSA/MNPS interaction, characterization were employed, such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), COOH quantification by Toluidide O (TBO) dye, contact angle measurements, ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy and electrophoresis. When studied through SEM, the morphology of the modified membranes revealed the presence of nanostructures in the form of fibers, and exhibit a high porosity that depended on the time of exposure to the plasma (0-20 min). FTIR analysis confirmed the incorporation of carboxyl groups on the surface of the modified MNPS, a result that is consistent with contact angle measurements indicated the high degree of hydrophilicity and with the TBO method that showed the high concentration of COOH in the MNPS.

In studying the affinity of the carboxylated membranes for the amino groups of the BSA, we investigated the variation of the adsorption capacity of the MNPS as a function of the pH of the medium and the type of buffer used, the initial concentration of BSA and the time of modification of the MNPS by plasma exposure. Analysis of the BSA solutions by UV-VIS confirmed the change in protein concentration in the medium, allowing us to estimate the amount of BSA adsorbed by the carboxylated membranes. The highest adsorption capacity found was 55.07 mg/g, for the MNPS submitted to 14 min of plasma treatment and solutions prepared using an initial BSA concentration of 3.6 mg.mL⁻¹ at pH 5.0 in 2M HAc-NaAc medium (acetic acid-sodium acetate). The experimental data obtained for the adsorption of BSA by the carboxylated MNPS under these conditions were well adjusted by the Langmuir monolayer isotherm ($R=0.99$). The MNPS not only had high adsorption capacity of the BSA molecules, but were also were able to liberate the captured protein, when in the presence of a basic solution of 1.5 Tris-HCl (pH 10.0). Finally, electrophoresis measurements provided evidence that the native structure of BSA was maintained after of the adsorption/desorption process by the MNPS revealing molecular weight of 66 kDa. Based on our results, and based on the comparison of them with others reported in the literature, the protocols we use appear to be promising, with comparative advantages associated with the simplicity of the process and with the short times obtained for high adsorption and desorption rates (5 and 3 minutes, respectively). We suggest that these modified MNPS may be a promising alternative material for the extraction of proteins from biological samples.

Keywords: Electrospinning. Porous membranes. Plasma treatment. Protein. BSA adsorption.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de amônio
<i>b</i>	Constante de adsorção no equilíbrio
BSA	Albumina do Soro Bovino
<i>C_e</i>	Concentração no equilíbrio
<i>C_f</i>	Concentração final
<i>C₀</i>	Concentração inicial
DMF	Dimetilformamida
EF	Eletrofiação
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (tradução do termo em inglês)
HAc-NaAc	Ácido Acético- Acetato de Sódio
HSA	Albumina do Soro Humano
<i>m</i>	Massa do adsorvente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MNPS	Membranas nanoestruturadas de poliestireno
NaOH	Hidróxido de sódio
p/v	Peso por volume
PANI	Polianilina
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Poliestireno
PS-PANI	Membrana de poliestireno-polianilina
PSM	Processos de separação por membranas
<i>q_e</i>	Capacidade de adsorção no equilíbrio
<i>q_m</i>	Capacidade máxima de adsorção
R²	Coeficiente de correlação
<i>t</i>	Tempo
Tris-HCl	Tris[hidroximetil]aminometano-Ácido clorídrico
TBO	Azul de Toluidina O (abreviatura do termo em inglês)
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível
<i>V</i>	Volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do monômero estireno, que dá origem ao polímero PS.....	24
Figura 2 -	Em (a) Imagem digital da membrana TP/pluronic/PS (esquerda) e membrana Ag-TP / PS (direita). Imagens de MEV em b) da membrana TP/ pluronic/PS, e membrana Ag-TP / PS a baixa (c) e alta (d) ampliações. Adaptado da Ref. [32]	25
Figura 3 -	Membranas monolíticas de fibras de PS, com pontos quânticos de peroviskta (CsPbBr ₃) e suas caracterizações. Adaptado da Ref. [33]	25
Figura 4 -	Possíveis aplicações para membranas poliméricas. Adaptado da Ref. [42].....	26
Figura 5 -	Representação da estrutura de uma membrana biológica e anti-incrustante de um organismo bacteriano do tipo gram-negativo. Adaptado da Ref.[46].	27
Figura 6 -	Representação esquemática de um sistema de eletrofiação (a) vertical e (b) horizontal. Adaptado da Ref. [59].	31
Figura 7 -	Influência da polaridade de uma superfície em um procedimento de adsorção de proteína. Adaptado da Ref. [65].	35
Figura 8-	Classificação e representação esquemática da morfologia de seções transversais de membranas poliméricas. Adaptado da Ref. [47].	36
Figura 9 -	Representação da estrutura química dos aminoácidos. Adaptado da Ref. [3].	39
Figura 10 -	Estrutura química dos 20 aminoácidos que compõem as proteínas: em azul, destacamos a cadeia lateral que caracteriza cada aminoácido. Os aminoácidos estão separados de acordo com as características dos seus substituintes, que podem ser divididas em: a) polares com carga positiva, b) polares com carga negativa, c) polares sem carga e d) apolares.	40
Figura 11 -	Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas. Adaptado da Ref. [1].....	41
Figura 12 -	Estrutura espacial da BSA, com a distribuição das regiões hidrofílicas sendo representadas por azul, enquanto as regiões hidrofóbicas são representadas pela cor vermelha. Adaptado da Ref. [156]	44
Figura 13 -	Etapas envolvidas no procedimento tradicional de separação e purificação de proteínas pelo método de extração líquido-líquido.	46
Figura 14-	Representação de uma coluna cromatográfica utilizada na separação de proteínas. Adaptado da Ref. [92].....	47
Figura 15 -	Etapas de um procedimento de coluna de centrifugação. Adaptado da Ref. [94].	49
Figura 16 -	Fatores que influenciam na adsorção de proteínas. Adaptado da Ref. [104]. ..	52
Figura 17 -	Representação da interação de um plasma com uma superfície e os processos que podem acontecer decorrentes deste tratamento. Adaptado da Ref. [110].	55
Figura 18-	Representação dos elementos de um MEV. Adaptado da Ref. (http://fap.if.usp.br/~nandast/mev.html).....	58
Figura 19 -	Representação dos níveis de energia dos orbitais ligantes (π e σ), não ligantes (n) e anti-ligantes (π^* e σ^*) e seus possíveis níveis de transição eletrônica. Adaptado da Ref. [113].....	59
Figura 20 -	Reação de polimerização para a formação do gel de poliacrilamida.	62
Figura 21 -	Esquema da separação em um gel de eletroforese de poliacrilamida. Adaptado da Ref. [116].....	62
Figura 22 -	Esquema da produção de fibras de PS através do sistema de eletrofiação.....	65
Figura 23-	Esquema de modificação da superfície das MNPS pelo plasma e as caracterizações para estudar as propriedades dessas membranas.	65

Figura 24 -	Esquema da quantificação do número de grupos COOH existentes nas MNPS.	68
Figura 25 -	Equipamento utilizado para medir o ângulo de contato da água com as MNPS.	68
Figura 26 -	Imagem digital em a) centrífuga utilizada para o procedimento de coluna spin, e b) coluna spin com as MNPS.	72
Figura 27 -	Etapas do processo de adsorção/dessorção da proteína BSA pelas MNPS.	76
Figura 28 -	Imagem digital dos materiais utilizados no experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida.	78
Figura 29 -	Micrografias de MEV da superfície das fibras após eletrofiação com ampliação a) 15000x, e b) 50000x, c) distribuição de diâmetro das fibras eletrofiadas.	82
Figura 30 -	Micrografias de MEV da superfície das fibras após tratamento térmico com ampliação em a) 15000x, e b) 50000x, c) distribuição de diâmetro das fibras após tratamento térmico.	83
Figura 31 -	Imagem digital das MNPS após eletrofiação e tratamento térmico quando a) cortadas em quadrados 3 cm x 3 cm e b) em formato circular com diâmetro de 7 mm.	84
Figura 32 -	Micrografias de MEV com ampliações de 50000x da superfície das MNPS após a modificação por exposição ao plasma com a) 5, c) 14 e e) 20 min.	86
Figura 33 -	Espectros de FTIR das MNPS a) após processo de eletrofiação e tratamento térmico, e depois da modificação da superfície pela exposição ao plasma durante b) 5, c) 14 e d) 20 min.	88
Figura 34 -	Espectros de UV-Vis do corante TBO dessorvido pelas MNPS em uma solução aquosa de ácido acético (50% p/v).	90
Figura 35 -	Ângulo de contato das MNPS a) após o procedimento de eletrofiação, b) depois do tratamento térmico, e submetidas a modificação com c) 1 min, d) 3 min, e) 5 min, f) 8 min, g) 14 min, h) 17 min e i) 20 min de exposição ao plasma.	92
Figura 36 -	Espectros de absorção de UV-Vis da solução de BSA antes da interação com MNPS (curva azul) e após a interação com MNPS (curva pontilhada em preto).	94
Figura 37 -	Comparação entre os espectros de UV-Vis que demonstra a capacidade das MNPS em adsorver BSA: absorbância das soluções na concentração inicial (linha sólida vermelha) e final (linha pontilhada preta) de BSA.	95
Figura 38 -	Espectros de absorção UV-Vis da solução de BSA antes de passar através da coluna spin (preto) e solução sobrenadante de BSA ao longo de 7 ciclos consecutivos de adsorção pelas MNPS.	96
Figura 39 -	a) Percentual de adsorção de BSA em função do pH do meio (3,0-9,0), b) potencial zeta em função do pH da solução de proteína BSA em meio tamponado (c=0,6 mg.mL ⁻¹).	98
Figura 40 -	Representação da estrutura conformacional da proteína BSA em função do pH do meio em que se encontra. Adaptado da Ref. [139].	100
Figura 41 -	Mecanismo de reação química da dissociação de ácidos carboxílicos em meio aquoso.	101
Figura 42 -	Representação da estrutura química dos aminoácidos polares com carga positiva com maior probabilidade de se ligarem aos grupos COOH.	102
Figura 43 -	Percentual de adsorção de BSA pelas MNPS como função do tempo de exposição (0 a 20 min) das membranas ao tratamento por plasma.	103
Figura 44 -	Espectros de FTIR das MNPS a) após modificação com 14 min de exposição ao plasma, b) após 14 min de exposição ao plasma em que foram usadas no procedimento de adsorção de BSA e c) BSA pura.	104

Figura 45 -	Capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS como função da concentração inicial de proteína no meio.	105
Figura 46 -	Modelos de isoterma de a) Langmuir e b) Freundlich, encontrados para o ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de BSA pelas MNPS.	106
Figura 47 -	Ajuste dos dados experimentais aplicados a isoterma de Lagmuir (linha sólida vermelha), isoterma de Freundlich (linha pontilhada em azul) e os dados experimentais da adsorção de BSA pelas MNPS (quadrados em preto).	107
Figura 48 -	Percentual de BSA dessorvida para diferentes tipos de solução tampão de eluição utilizada. Em (1) NaH ₂ PO ₄ 0,2 M – Na ₂ HPO ₄ 0,2 M, pH 8,0 (2) Tris-EDTA pH 8,0 (3) NaOH-Gli, pH 10,0 (4) Tris-Gli, pH 10,0 (5) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (6) 1,5 M Tris-HCl, 10,0.	109
Figura 49 -	Eletroforese em PAGE-NATIVO, (1) padrão de proteínas, (2) solução de BSA inicial, (3) solução de BSA sobrenadante. Eluição da BSA com (4) NaH ₂ PO ₄ 0,2 M– Na ₂ HPO ₄ 0,2 M, pH 8,0 (5) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (6) Gli-NaOH 0,2 M, pH 10,0 (7) 1,5 M Tris-HCl, pH 10,0 (8) Tris-Gli, pH 10, (9) NaOH-Gli, pH 10,0.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Exemplos dos polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos usadas na fabricação de membranas poliméricas.....	34
Tabela 2 -	Comparação da composição química entre a BSA e HSA.....	43
Tabela 3 -	Comprimento de onda de absorção no infravermelho dos diferentes grupos funcionais presentes nas amostras de MNPS pura e posteriormente modificadas pelo plasma.....	88
Tabela 4 -	Quantidade de COOH na superfície das MNPS em função do tempo de tratamento a plasma.....	90
Tabela 5 -	Parâmetros calculados para as isotermas de Langmuir e Freundlich para a adsorção da BSA pelas MNPS.	106
Tabela 6 -	Comparação das MNPS com outros materiais reportados na literatura utilizadas para adsorver BSA.....	110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	Polímeros	21
2.1.1	Poliestireno	24
2.2	Membranas Poliméricas	26
2.2.1	Produção de membranas poliméricas	28
2.2.1.1	Histórico da eletrofiliação	28
2.2.1.2	A técnica de eletrofiliação e os parâmetros que influenciam no processo	30
2.3	Processos de Separação por Membranas	33
2.3.1	Propriedades químicas e morfológicas das membranas poliméricas que influenciam nos PSM	34
2.3.2	Métodos empregados em PSM	36
2.4	Proteínas	38
2.4.1	Albumina do Soro Bovino	43
2.4.1	Métodos de separação de proteínas	45
2.4.2	Mecanismos de Adsorção	50
2.4.3	Adsorção de proteínas	51
3	TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	54
3.4	Plasma: uma ferramenta importante para a modificação de superfícies	54
3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	57
3.6	Espectroscopia no Ultravioleta Visível	59
3.7	Eletroforese	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1	Reagentes	64
4.2	Produção das MNPS	64
4.3	Modificação da superfície das MNPS	65
4.4	Caracterização das MNPS	66
4.4.1	Microscopia eletrônica de varredura	66
4.4.2	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier	66
4.4.3	Quantificação dos ácidos carboxílicos originados nas MNPS	66
4.4.4	Ângulo de contato	68
4.5	Utilização das MNPS na adsorção de proteína BSA	69

4.5.1	Reagentes	69
4.5.2	Caracterização	69
4.5.2.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier...</i>	69
4.5.2.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....</i>	70
4.5.2.3	<i>Potencial zeta</i>	70
4.6	Experimentos de adsorção	70
4.6.1	Influência do pH da proteína BSA sobre a capacidade de adsorção pela MNPS	71
4.6.2	Efeito do tempo de exposição ao plasma ar sobre a capacidade de adsorção da proteína BSA pelas MNPS	72
4.6.3	Capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS	72
4.6.4	Isotermas de adsorção	73
4.7	Experimentos de dessorção.....	74
4.8	Eletroforese de proteínas	76
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO: CARACTERIZAÇÃO DAS MNPS	81
5.1	Preparação e caracterização das MNPS	81
5.2	Modificação da superfície das MNPS pelo plasma de ar	85
5.2.1	Caracterização morfológica pelo MEV	85
5.2.2	Caracterização química pelo FTIR	87
5.2.3	Quantificação dos ácidos carboxílicos originados nas MNPS	89
5.2.4	Ângulo de contato	91
6	APLICAÇÃO DAS MNPS	93
6.1	Experimentos de adsorção da BSA pelas MNPS.....	93
6.2	Influência do pH da proteína BSA sobre a capacidade de adsorção pela MNPS	97
6.3	Mecanismo de ligação entre as MNPS e a proteína BSA	100
6.4	Efeito do tempo de exposição ao plasma ar sobre a capacidade de adsorção da proteína BSA pelas MNPS	102
6.5	Caracterização química das MNPS após as etapas de adsorção.....	103
6.6	Capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS	105
6.7	Isotermas de adsorção.....	106
6.8	Experimentos de dessorção.....	107
6.9	Comparação com outros materiais.....	109
6.10	Eletroforese.....	111
7	CONCLUSÕES	113
8	PERSPECTIVAS	115
	REFERÊNCIAS.....	119

APÊNDICE A- GRÁFICOS ADICIONAIS.....	133
Apêndice A.1- Estudo da influência do pH da proteína BSA sobre a capacidade de adsorção pelas MNPS	133
Apêndice A.2- Efeito do tempo de exposição ao plasma sobre a capacidade de adsorção da proteína BSA pelas MNPS	134
Apêndice A.3- Dessorção da BSA utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH)	135

1 INTRODUÇÃO

As proteínas, também conhecidas como biopolímeros, são macromoléculas biológicas formadas pela união sequencial de aminoácidos¹ que se ligam através das reações peptídicas² [1]. As proteínas desempenham funções específicas, sendo fundamentais para o transporte de substâncias importantes para a manutenção da vida, como por exemplo, o transporte de oxigênio pela hemoglobina (no papel de agente transportador), podendo também contribuir estruturalmente para a formação de tecidos do corpo humano. Elas podem ainda agir como elementos de bioreconhecimento contra agentes patógenos e infecciosos, tais como parasitas, vírus e bactérias (caso dos anticorpos) e como catalisadores seletivos para inúmeras reações bioquímicas (ou, seja, as enzimas) [2]. As proteínas não operam unicamente como “máquinas moleculares” no interior de células e tecidos, mas são também os produtos essenciais a serem sintetizadas pelos genes, responsáveis pela expressão da informação genética [3].

Por todas essas funcionalidades, as proteínas são biomoléculas versáteis que podem intervir como biomarcadores nos estágios iniciais de doenças [4, 5], bem como no transporte de fármacos [6–8], na elaboração de medicamentos [9], na fabricação de biossensores [10, 11]. As proteínas são ainda moléculas relevantes nas áreas de diagnóstico e clínica médica, sendo também bastante usadas no desenvolvimento de dispositivos para aplicações nesses setores.

Um pré-requisito para aplicação das proteínas é sua extração sem degradação a partir de amostras biológicas (tecidos, células, plasma sanguíneo ou mistura de proteínas) [12]. Considerando a grande variedade de proteínas existentes, com propriedades bastante distintas e estruturas altamente complexas, os procedimentos correspondentes para sua extração e purificação se constitui em um permanente desafio para o campo da

¹ Aminoácidos são moléculas constituídas por um átomo central de Carbono, ligado covalentemente a um átomo de Hidrogênio, um grupamento amino e outro grupo carboxílico, e ainda um substituinte que confere características particulares (polares, não-polares, aromáticos, aniônicos e catiônicos) a cada tipo de aminoácido.

² Reação peptídica é um tipo de reação bioquímica pela qual um grupamento amino de um aminoácido une-se ao grupo carboxílico terminal de outro aminoácido, ocorrendo a liberação de uma molécula de água. Inúmeras ligações peptídicas (ou polipeptídicas) dão origem a sequência linear de aminoácidos que formam a biomolécula de proteína.

biotecnologia. A isso se acresce o requisito fundamental de que seja mantida inalterada a estrutura nativa e atividade biológica de cada proteína obtida [13]. Dessa maneira, o estudo de novos materiais e metodologias para identificação e isolamento das proteínas é um passo importante para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas específicas.

As metodologias tradicionais de separação de proteínas envolvem processos baseados na extração líquido-líquido. Para essa abordagem, são usualmente seguidas diversas etapas, que demanda o uso de solventes orgânicos e compostos salinos em grande quantidade e variedade, o que traz desvantagens devido ao elevado custo e tempo requeridos. A existência de múltiplas etapas, com grande uso de diferentes solventes, pode ocasionar perdas inerentes na quantidade de proteínas e na qualidade da sua estrutura nativa [14]. Atualmente, novas estratégias de separação de proteínas têm sido pensadas com o objetivo de minimizar o número dessas etapas e a quantidade de solventes a serem usados, garantindo maior eficácia ao processo [12, 15]. É nesse cenário que a extração em fase sólida se tornou uma alternativa relativamente recente para a obtenção de proteínas.

Existe na atualidade uma elevada demanda por materiais adsorventes para uso em processos de extração em fase sólida. Os materiais em escala nanométrica, como nanopartículas, microesferas, materiais monolíticos e membranas, têm sido utilizados para a adsorção de proteínas em diferentes meios. Em particular, membranas poliméricas têm sido utilizadas no desenvolvimento de colunas cromatográficas em substituição aos materiais baseados em resinas e sílicas [16].

Os processos de separação e adsorção de proteínas por membranas poliméricas nanoestruturadas têm recebido especial atenção nos últimos anos, devido ao fato de que essas membranas podem ser obtidas de maneira simples pela técnica de eletrofiação (EF). A EF é uma maneira que permite obter membranas com morfologia em forma de fibras, com controle relativamente fácil sobre a espessura e o diâmetro dos fios. Como as nanofibras eletrofiadas podem ser modificadas por funcionalização química e física, isso pode levar a um aumento na eficiência da separação de proteínas de interesse [13–15]. O tratamento por plasma é um método físico que vem sendo amplamente utilizado para modificar as propriedades de superfície de membranas poliméricas EF, de modo a que elas passem a apresentar maior compatibilidade com diversas moléculas biológicas, e, em particular, proteínas [19].

O objetivo geral do presente trabalho foi: o de usar a técnica de EF para a fabricação de nanofibras, resultando em membranas nanoestruturadas de poliestireno

(MNPS) que fossem então utilizadas como substrato sólido para a adsorção de proteínas, possibilitando sua fácil separação de meios líquidos. Para atingir esse objetivo geral, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- inicialmente, preparar membranas de poliestireno pelo ajuste das configurações experimentais do sistema de eletrofição;
- investigar as propriedades químicas e morfológicas dessas membranas, antes e após sua funcionalização pelo tratamento por plasma de ar;
- aplicar as membranas modificadas de poliestireno em colunas de separação de proteínas, usando a BSA, como sistema modelo para o estudo de adsorção e separação de proteínas dissolvidas em soluções aquosas;
- por fim, estudar cada um dos parâmetros que influenciam no processo de adsorção de proteínas pelas membranas, assim determinando o grau de aplicabilidade dessas membranas em protocolos de extração de proteínas.

Perante esta abordagem de pesquisa, surgem as seguintes questões de investigação: Por quê utilizar o poliestireno para produzir membranas? Por quê empregar o método físico de plasma na funcionalização das membranas ao invés de funcionalizá-las por métodos químicos? Qual é o impacto científico da aplicação de membranas nanoestruturadas na extração de proteínas? Por quê aplicar a BSA como proteína modelo? Quais os parâmetros influenciam no processo de adsorção pelas membranas de poliestireno?

Esses questionamentos serão respondidos ao longo desta dissertação, que está dividida em 6 capítulos. No Capítulo 2, será apresentada a fundamentação teórica dos assuntos relevantes para este trabalho, onde serão relatados os conceitos fundamentais sobre polímeros, e em especial, o poliestireno. Nele, apresentaremos ainda as definições de membranas poliméricas, o histórico da técnica de fabricação de membranas nanoestruturadas por eletrofição e suas características principais. No Capítulo 3, apresentaremos brevemente cada uma das técnicas de caracterização que foram empregadas tanto para o estudo das propriedades das membranas de poliestireno, quanto para a aplicação dessas membranas para a adsorção da BSA. Mais adiante, no Capítulo 4, serão mostrados os materiais e metodologias utilizadas para a fabricação das membranas e sua modificação pelo tratamento de plasma de ar, assim como os procedimentos realizados para os experimentos de adsorção e dessorção da proteína BSA. No Capítulo 5, demonstraremos e discutiremos os resultados experimentais das etapas de produção e modificação das MNPS, enquanto que no Capítulo 6 serão mostrados e

discutidos os resultados da aplicação das MNPS como substrato sólido em uma coluna para a separação da proteína BSA. Finalmente, serão apresentadas as conclusões deste trabalho e suas perspectivas futuras.

2

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, apresentaremos de maneira breve alguns fundamentos teóricos relevantes para uma melhor compreensão de nosso trabalho, discutindo conceitos básicos sobre o estudo de polímeros, e em especial do poliestireno, membranas, técnicas de processamento de polímeros, como a eletrofiação, fazendo ainda uma breve revisão da literatura.

2.1 Polímeros

Ao longo dos anos, diferentes materiais de natureza polimérica foram sendo usados de modo a atender as necessidades cotidianas dos seres humanos e dos setores industriais, como por exemplo em aplicações biomédicas [20, 21]. Polímeros são macromoléculas formadas a partir de unidades básicas menores que se repetem regularmente ao longo de sua estrutura, os monômeros, que se unem quimicamente entre si por meio de ligações covalentes e interações inter e intramoleculares [22, 23].

Polimerização é o nome dado à reação química que converte as moléculas de um monômero em macromoléculas de polímeros. Essa é uma reação funcional, capaz de continuar indefinidamente, desde que sejam mantidas as condições que preservam o centro ativo terminal, evitando sua extinção, e desse modo, a espécie química em crescimento vai incorporando novas moléculas de monômero ao seu centro ativo terminal, à medida que mais monômero é adicionado ao sistema [19–21].

A estrutura da unidade de repetição do polímero não é exatamente a mesma que a do monômero (ainda que ambos possuam átomos idênticos que ocupam posições relativamente semelhantes), pois a conversão do monômero em polímero envolve um rearranjo dos elétrons na cadeia. O número de unidades que formam a cadeia polimérica é denominado grau de polimerização, simbolizado por n [23, 24].

As características mecânicas, elétricas e propriedades físico-químicas (como peso molecular, pontos de fusão, número de unidades de repetição por cadeia, tipos de ligações

envolvidas, organização dos átomos na cadeia polimérica) de um polímero podem variar bastante, de acordo com a origem dos constituintes que o fabricam. Assim, é enorme a variedade dos polímeros e a diversidade dos termos técnicos usados para designá-los de acordo com suas propriedades. Apesar de existir mais de uma maneira de classificá-los, os polímeros podem ser diferenciados quanto:

- **À matéria-prima de origem para sua formação:** polímeros podem ser orgânicos ou inorgânicos, e de origem natural ou sintética. Como exemplo de polímeros naturais temos aqueles encontrados em materiais e produtos presentes no meio ambiente (amido, algodão, lã e poli-hidrocarbonetos) ou em sistemas biológicos (polissacarídeos, proteínas e os ácidos nucleicos), que são conhecidos como biopolímeros. Já os polímeros sintéticos são aqueles produzidos em laboratório (poliestireno e o náilon), enquanto os semi-sintéticos, também conhecidos como artificiais, são aqueles produzidos pelo homem a partir de fontes naturais [22, 23, 25, 26].
- **A unidade monomérica:** um homopolímero é formado por uma reação de polimerização em que apenas um único monômero é utilizado, enquanto que, em contrapartida, um copolímero resulta da reação de dois ou mais tipos de monômeros [22, 23, 25].
- **A reação de formação:** a adição é uma reação que leva a um único produto, quando os monômeros se unem, havendo a formação de ao menos uma ligação múltipla, ou quebrando ou rearranjando as ligações múltiplas ao longo da cadeia do polímero. Já durante uma reação de condensação ocorre a abstração de pequenas moléculas (por exemplo, H_2O ou KCl). Além disso, um polímero também pode ser preparado pela modificação de outro polímero, através de reações químicas de hidrólise, esterificação, acetalização, etc [22].
- **A organização da cadeia:** os polímeros podem ser lineares, ramificados, com ligações cruzadas ou em rede. Os lineares são aqueles em que a cadeia carbônica é arranjada linearmente, sem a presença de grupos laterais. Os polímeros ramificados possuem cadeias laterais que fazem parte da cadeia principal [23, 25].
- **A natureza química do polímero:** os polímeros homogêneos possuem em sua cadeia principal somente átomos de carbono e hidrogênio, enquanto que nos heterogêneos, podem estar também presentes, átomos de oxigênio ou nitrogênio, entre outros [23, 25].

• **A taticidade da cadeia do polímero:** quanto ao arranjo dos substituintes em sua cadeia, os polímeros podem ser classificados quanto como isotáticos, sindiotáticos ou atáticos³. No entanto, apenas raramente um polímero apresenta um único tipo de arranjo, mas sim uma mistura deles; sendo assim, a maneira como os substituintes estão distribuídos ao longo do polímero conferem a ele um certo grau de taticidade (cristalinidade)[27].

Os polímeros isotáticos possuem o arranjo dos seus substituintes localizados sempre do mesmo lado da cadeia e apresentam um elevado grau de cristalinidade. Já os sindiotáticos, onde os substituintes estão organizados em lados alternados na cadeia, apresentam-se parcialmente cristalinos, enquanto que para os atáticos não existe regularidade na distribuição dos substituintes, o que os torna amorfos em sua maioria [27].

• **As propriedades de condução eletrônica:** se polímeros convencionais são tipicamente isolantes, os não-convencionais apresentam uma série de propriedades elétricas e ópticas semelhantes aos semicondutores inorgânicos, do que são exemplo os polímeros condutores extrínsecos e intrínsecos, como o poliacetileno, a polianilina e o polipirrol [28].

• **A fusibilidade ou solubilidade:** os polímeros termoplásticos, são aqueles que podem ser moldados repetidamente, cada vez que sejam aquecidos e novamente solidificados, e que podem ser reciclados. A maioria dos termoplásticos são parcialmente cristalinos, sendo alguns totalmente amorfos. Por sua vez, os polímeros termorrígidos são aqueles que podem ser moldados unicamente durante sua fabricação, do que resulta um produto duro, que não amolece quando submetido a um aumento da temperatura; esses polímeros são completamente amorfos [27].

• **Ao seu comportamento mecânico:** os polímeros podem ser ainda diferenciados por seu comportamento como borracha ou elastômeros, plásticos ou fibras. Enquanto as borrachas possuem um elevado módulo de elasticidade, os plásticos tem certa rigidez e podem ser moldáveis (como no caso dos termoplásticos) ou não (como os termorrígidos) [27]. As fibras são polímeros finos e alongados, que podem ser submetidos a diversas deformações mecânicas (estiramento, torções, cisalhamento e abrasão), possuindo um

³ A organização dos substituintes em uma cadeia polimérica podem ser diferenciados em sindiotático (lados alternados), isotático (mesmo lado) ou atático (sem regularidade). Dessa maneira, a organização dos substituintes confere aos materiais poliméricos uma estrutura cristalina (quando existe uma regularidade na disposição espacial dos substituintes na cadeia) ou amorfa (quando não existe regularidade dos substituintes na organização espacial da cadeia polimérica).

limite de resistência a tração elevado, um alto módulo de elasticidade e resistência a abrasão [25].

Dentre os muitos polímeros existentes, neste trabalho lançamos mão do poliestireno como matéria-prima para a fabricação de membranas nanoestruturadas, como será discutido ao longo desta dissertação. A seguir, apresentaremos as informações mais relevantes sobre o poliestireno e mostraremos alguns exemplos de materiais baseados nesse polímero.

2.1.1 Poliestireno

O poliestireno (PS), um polímero da classe dos termoplásticos, possui a capacidade de amolecer e se tornar fluido quando submetido a um aumento de temperatura e pressão. Estas alterações em sua estrutura física são reversíveis, e se as condições são removidas, o polímero novamente se solidifica, alcançando a forma a que foi submetido [23]. A facilidade de seu processamento e de alterações em suas características moldáveis (é possível obtê-lo com diferentes formas e cores, ou ausência de cor), e seu custo reduzido de produção, o tornam um material vantajoso para um número elevado de aplicações, de modo que ele é muito utilizado em diferentes setores industriais [29, 30].

O PS pode ainda ser classificado como um homopolímero, originado por meio da reação por adição de sucessivas unidades do monômero estireno, cujas estruturas químicas estão representadas na Fig.1. A composição química do PS é baseada em um anel aromático (fenila), que está ligado a um substituinte de cadeia carbônica (vinila), e apresenta apenas átomos de carbono e hidrogênio, o que lhe confere características apolares [30, 31].

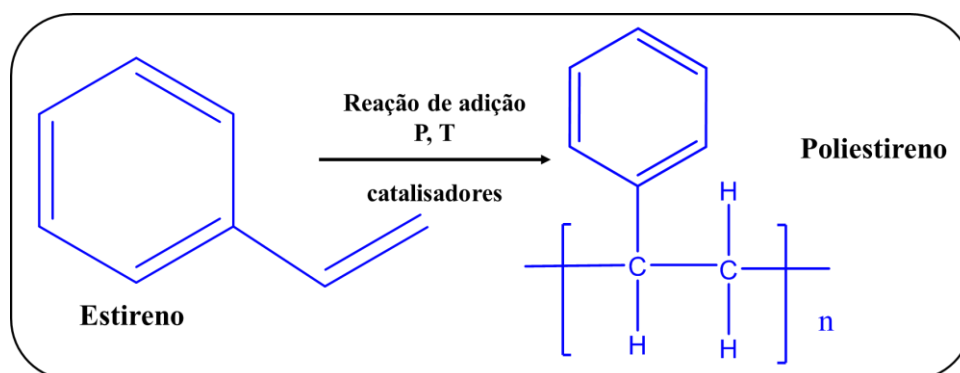


Figura 1 - Estrutura química do monômero estireno, que dá origem ao polímero PS.

Em virtude de suas propriedades moldáveis, e de sua considerável resistência química a ácidos e bases, o PS vem sendo muito utilizado para a fabricação de membranas para diferentes aplicações e com propriedades variadas. Por exemplo, Z. Liu *et.al.* (2015) [32], mostraram que membranas de PS eletrofiadas (a técnica correspondente será discutida na Seção 2.2.1.2) podem ser modificadas pela incorporação de nanopartículas de prata (Ag-TP/PS) por um agente redutor natural (TP, polifenóis de chá), de modo que as membranas de Ag-TP/PS (Fig. 2) exibem propriedades catalíticas para a degradação do corante azul de metileno e ação antibacteriana contra microrganismos Gram-positivo *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas de *Escherichia coli*.

Y. Wang *et.al.* (2016) [33], obtiveram membranas monolíticas de fibras de PS, com pontos quânticos de peroviskita (CsPbBr_3) encapsuladas em sua estrutura. Essas membranas (Fig. 3) foram usadas para a preparação de um sensor fluorescente de elevada sensibilidade para a detecção de Rodamina 6G.

Por sua vez, T. Isık *et.al.* (2016) [34] produziram membranas de PS com nanopartículas de ouro incorporadas e aplicaram esse material para a adsorção de proteína BSA e DNA, em uma possível aplicação em processos de diagnóstico rápido.

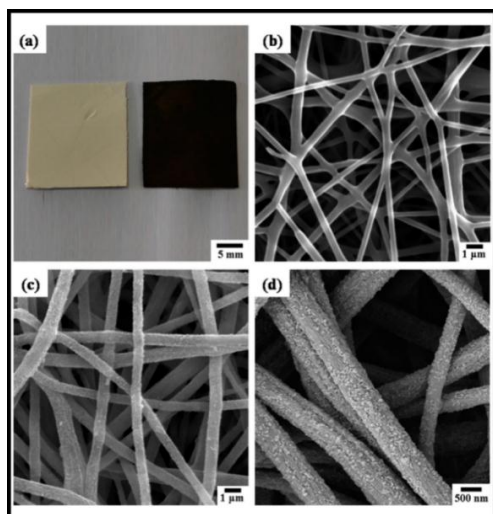


Figura 2 - Em (a) Imagem digital da membrana TP/pluronic/PS (esquerda) e membrana Ag-TP / PS (direita). Imagens de MEV em b) da membrana TP/ pluronic/PS, e membrana Ag-TP / PS a baixa (c) e alta (d) ampliações. Adaptado da Ref. [32]

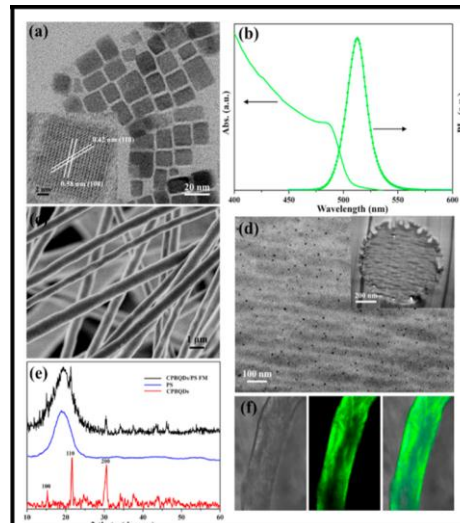


Figura 3 - Membranas monolíticas de fibras de PS, com pontos quânticos de peroviskita (CsPbBr_3) e suas caracterizações. Adaptado da Ref. [33]

Apesar da extensa utilização de membranas de PS como substrato para a imobilização de biomoléculas, poucos estudos têm investigado o papel dos grupos químicos funcionais introduzidos pela exposição física a um plasma e a capacidade de absorção das membranas assim modificadas. Nesse sentido, este trabalho visa examinar os processos de adsorção de moléculas de proteína na superfície de membranas PS funcionalizadas por grupos carboxílicos introduzidos pela exposição a um plasma. Para aprofundar o nosso conhecimento sobre as membranas, discutiremos a seguir alguns conceitos básicos sobre elas, sua importância e possíveis aplicações.

2.2 Membranas poliméricas

Nanofibras poliméricas têm sido empregadas para diferentes finalidades, e atualmente desempenham um papel importante em processos de separação e purificação de diferentes biomoléculas. Elas são também aplicadas em processos como a dessalinização de água, filtração, tratamento de efluentes, remoção de contaminantes [35], e em sensores e biossensores [36, 37], engenharia de tecidos [34–37], células solares, dentre outros usos (Fig. 2.4).

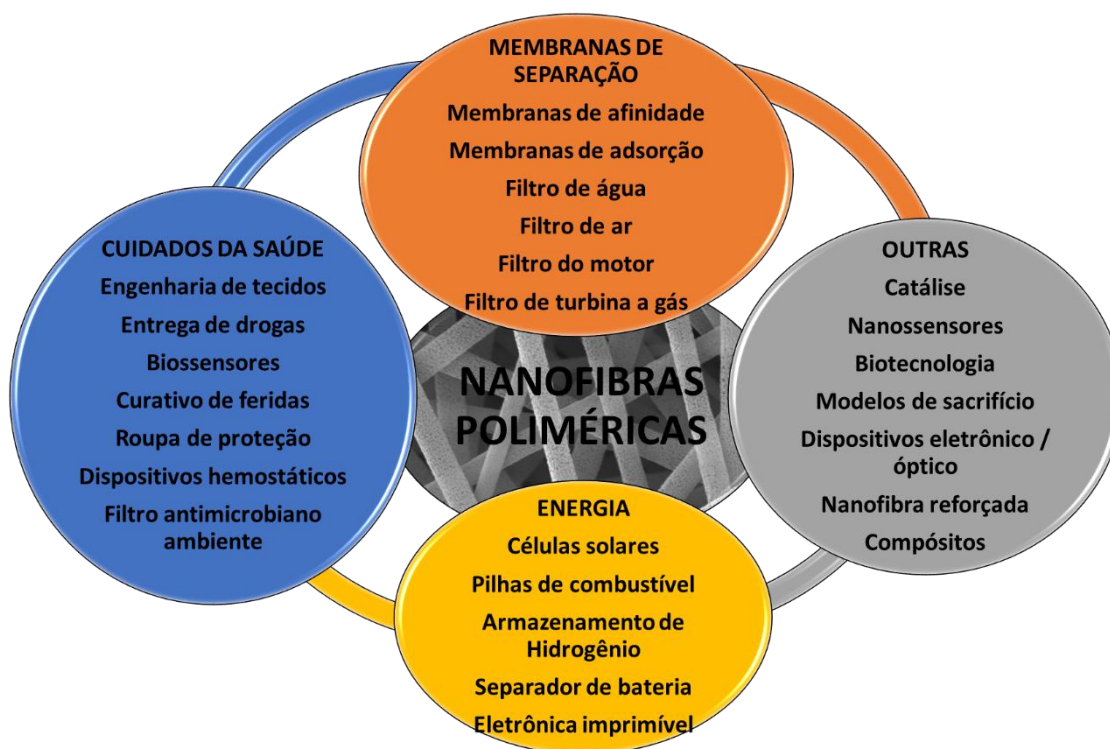


Figura 4 - Possíveis aplicações para membranas poliméricas. Adaptado da Ref. [42].

Uma membrana polimérica é uma interface sólida que não apenas atua como uma barreira, que pode restringir total ou parcialmente o transporte dos componentes de natureza molecular, iônica ou partículas existentes em líquidos ou vapores que entram em contato com sua superfície, mas é também capaz de realizar o transporte seletivo e separação dos componentes do meio fluido [42–44].

As membranas sintéticas são materiais que podem ser projetados para vir a atuar em alguns casos como materiais biomiméticos, ou seja, que imitam as estruturas e funções dos sistemas biológicos como modelos para formularem suas estruturas hierárquicas, desse modo, as membranas poliméricas podem ser desenvolvidas de maneira a desempenhar funções semelhantes às executadas pelas membranas celulares biológicas (ver representação desta estrutura na Fig. 5) que são preenchidas com muitos tipos diferentes de poros e canais e que controlam a troca de íons e moléculas entre os compartimentos subcelulares, atuando como uma fronteira que separa o interior de uma célula do ambiente externo [42, 43].

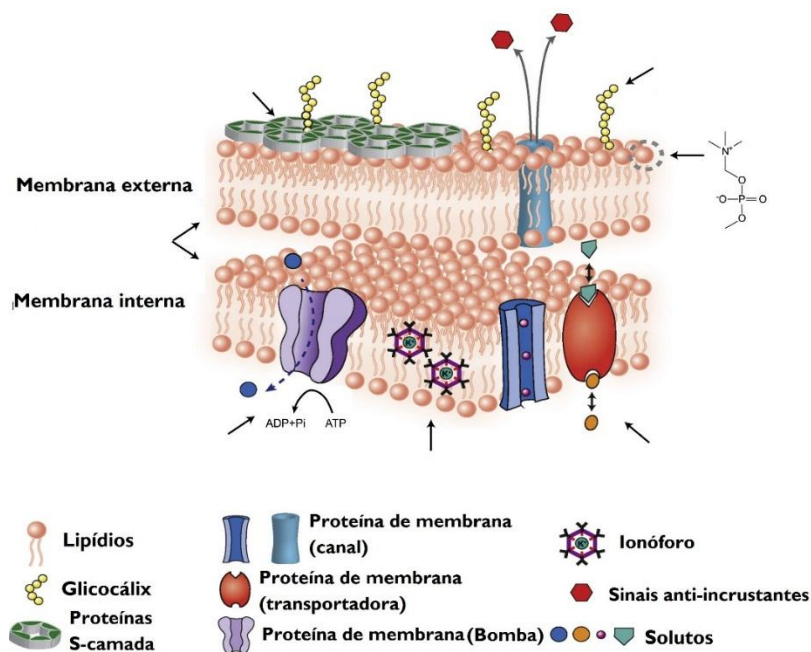


Figura 5 - Representação da estrutura de uma membrana biológica e anti-incrustante de um organismo bacteriano do tipo gram-negativo. Adaptado da Ref.[46].

Os setores científicos e comerciais têm se beneficiado com características dessas membranas que se constituem em vantagens comparativas, como a demanda de um menor custo, maior economia dos recursos energéticos, e a capacidade de agir de maneira seletiva [43, 47]. É possível manipular a composição dessas membranas pela introdução de agentes químicos de acoplamentos, modificações físicas, tais como ação por plasmas, ou incorporação de polímeros condutores nas matrizes poliméricas, de modo a que elas possam vir a ter melhor desempenho do que os materiais tradicionais, com uma maior facilidade de operação (por exemplo, sem que seja necessário o uso de mão de obra especializada, como acontece nos processos de separação por cromatografia), e ainda a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de membranas a partir de uma ampla gama de polímeros convencionais e não convencionais [35].

2.2.1 Produção de membranas poliméricas

Técnicas distintas podem ser usadas no processamento de polímeros para a fabricação de membranas, como inversão de fase, precipitação por imersão, separação de fases induzida por evaporação, polimerização interfacial, extrusão seguida por técnica de alongamento, ou a técnica de eletrofiação [42, 48]. Devido à importância da eletrofiação para a fabricação de nanofibras com propriedades controladas, neste trabalho será dada uma maior atenção a essa técnica.

2.2.1.1 Histórico da eletrofiação

A EF é uma técnica que consiste no uso de forças elétricas sobre soluções com propriedades adequadas (principalmente a concentração, a viscosidade e condutividade) para produzir materiais que resultam em uma estrutura morfológica constituída de fios. Anteriormente ao estabelecimento desta técnica, diversos pesquisadores realizaram estudos para determinar de que maneira uma tensão elétrica age sobre um líquido [49–52].

Dessa forma, os procedimentos envolvendo a utilização de processos físicos baseados na ação de forças eletrostáticas sobre líquidos remontam há mais de um século, apesar de que poucos trabalhos tenham sido documentados no início do século XX. Este procedimento foi descrito pela primeira vez pelo físico e matemático Lord Rayleigh (John W. Strutt), entre os anos 1882-1897. Mais tarde, em 1914, J. Zeleny, aprofundou os

estudos nesse campo de pesquisa, demonstrando que a indução de carga elétrica em líquidos ocasionava a formação de pequenas partículas (gotículas) pela técnica de *electrospraying* [53, 54]. No entanto, o marco histórico na área só veio a ocorrer entre os anos de 1934-1944, quando A. Formhals obteve avanços descrevendo procedimentos experimentais para a fabricação de fios têxteis através da ação de forças eletrostáticas, e se tornou o responsável pelas primeiras patentes relacionadas ao método [42, 51, 54].

Essa linha de pesquisa continuou avançando e, em 1952, os pesquisadores B. Vonnegut e R. L. Neubauer relataram o desenvolvimento de um instrumento de fácil manipulação para a atomização elétrica, que era capaz de produzir fluxos de gotas eletrificadas altamente uniformes com cerca de 0,1 mm de diâmetro. Já em 1955, V. G. Drozin estudou a dispersão de diferentes líquidos como aerossóis sob a influência de altos potenciais elétricos (0 a 12 kV); para isso, ele colocava o líquido dentro de um tubo de vidro que tinha um capilar na ponta, e então aplicava um potencial. Ele observou que a pressão eletrostática é responsável por dispersar o líquido, e que essa dispersão acontece em função da constante dielétrica e do raio de curvatura do líquido no capilar. Ele afirmou ainda que líquidos orgânicos apolares com baixas constantes dielétricas não poderiam ser dispersos [54, 55]. Em 1966, H. Simons patenteou um aparelho para a produção de estruturas fibrosas não tecidas com espessura ultrafinas, leves e com padrões diferenciados, em que os diâmetros das fibras poderiam ser menores ou maiores, a depender da viscosidade da solução empregada [54].

Um grande impacto nesse campo de pesquisa ocorreu em 1969, pelos estudos de G. Taylor sobre jatos acionados eletricamente pela aplicação de uma elevada diferença de potencial, devido a uma maior compreensão dos fenômenos que são responsáveis pela produção de fios de polímero. Segundo ele, quando um potencial elétrico é aplicado ao capilar que contém a solução, e este potencial se iguala a tensão superficial da gota, esta adquire o formato de um cone. À medida que o potencial torna-se suficientemente elevado, ele rompe a tensão superficial da gota, e então jatos líquidos de espessura muito fina são formados [54, 56]. Outra importante contribuição, foi a de P.K., Baumgarten, quando em 1971 construiu um aparelho para eletrofiar fibras de acrílico com diâmetros na faixa de 0,05 μm à 1,1 μm . Baumgarten demonstrou a relação direta entre a concentração da solução e o diâmetros das fibras, assim como os efeitos da aplicação de diferentes potenciais na produção das mesmas [54, 57]. Esse trabalho forneceu um modelo para outros pesquisadores, que passaram a utilizar instrumentos com uma configuração similar.

Se por volta da década de 80, diversos materiais passavam a ser produzidos pela ação de forças eletrostáticas, no entanto, somente na década de 90, foi que a ação de forças eletrostáticas se tornou uma ferramenta para a produção de fibras de polímeros tal como a conhecemos atualmente, quando J. Doshi e D. H. Reneker demonstraram a aplicabilidade de um campo elétrico para formar um jato carregado de solução polimérica, e fabricaram uma variedade de polímeros orgânicos, com estruturas fibrosas submicrométricas apresentando diâmetros entre 0,05 e 5 μm [49]. Somente em 1994, a produção de fibras por meio da ação de forças eletrostáticas passou a ser conhecida como eletrofiação (EF), tal qual como é denominada atualmente. Ela pode ser considerada uma variante do processo de eletro-pulverização (*electro-spraying*) [42]. Desde então, inúmeras áreas de atuação têm sido beneficiadas pelos materiais obtidos por meio desta técnica.

Especialmente nos últimos anos, a crescente demanda por materiais poliméricos nanoestruturados que correspondam às exigências dos avanços científicos e tecnológicos, fez da técnica de EF uma das principais ferramentas para elaboração de membranas poliméricas com morfologia fibrosa, para aplicações nos mais diversos campos de pesquisa. Dada a importância dessa técnica, discutiremos a seguir um pouco mais sua configuração experimental e os parâmetros que influenciam na formação das membranas fibrosas.

2.2.1.2 A técnica de eletrofiação e os parâmetros que influenciam no processo

A EF é uma técnica muito versátil para a fabricação de membranas com morfologia com base em fios com diâmetros da ordem de nanômetros até submicrometros a partir de uma larga gama de polímeros sintéticos ou biopolímeros (tais como quitosana, colágeno, gelatina, elastina) [50, 58]. A técnica é baseada na ação de forças eletrostáticas, isto é, na aplicação de potenciais elétricos sobre soluções poliméricas viscosas, permitindo a obtenção de fios de polímero que se organizam como membranas com características únicas. A maioria das membranas poliméricas eletrofiadas são constituídas por fibras que possuem diâmetros entre 1 nm a 100 nm até 1 μm [42].

Essas características especiais das membranas fibrosas estão relacionadas com a possibilidade de controle do comprimento, espessura e diâmetro de suas fibras, o que dá origem a estruturas com morfologia em escala nanométrica e micrométrica de elevada

área superficial, através do ajuste de parâmetros da solução polimérica, das condições ambientais e do sistema de eletrofiação [42, 52].

Na Fig. 6, vemos a configuração experimental para um sistema de eletrofiação, que é formado por uma fonte da tensão elevada que será aplicada sobre uma solução polimérica contida em uma seringa, que contém uma agulha ou um capilar em sua ponta, com a taxa de liberação dessa solução sendo controlada uma bomba mecânica. Uma distância adequada separa a agulha de um coletor metálico aterrado, onde serão depositadas as várias camadas de fibras para formar a membrana [42, 59].

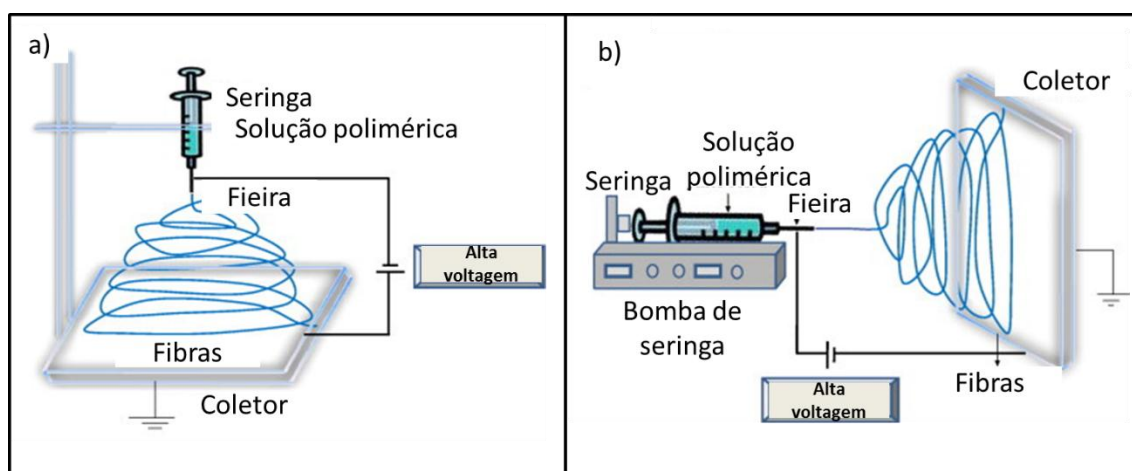


Figura 6 - Representação esquemática de um sistema de eletrofiação (a) vertical e (b) horizontal. Adaptado da Ref. [54].

Quando um campo elétrico suficientemente elevado é aplicado ao sistema de eletrofiação, a força elétrica rompe a tensão superficial da solução polimérica, ocasionando a deformação da gota na ponta da agulha, no que recebe o nome de cone de Taylor, resultando na liberação de um jato fino de polímero [42].

Sob condições ideais, esse jato eletrificado sofre um estiramento estável, e então começa a se dobrar e alongar aleatoriamente, como resultado dos efeitos da evaporação e repulsão de cargas do solvente, o que faz com que as fibras sejam atraídas pelo coletor de carga oposta. O material resultante, que é composto por uma “teia” de nanofibras alinhadas aleatoriamente, se assemelha a uma membrana não tecida [59]. Os parâmetros utilizados nesse procedimento influenciam diretamente as propriedades finais dos materiais eletrofiados, permitindo a formação de fibras lisas, porosas, com a presença de contas, ou com fios mais arredondados ou de diferentes diâmetros [48]. Por essa razão, discutiremos brevemente alguns desses fatores.

Os parâmetros da solução: na fabricação das fibras, os parâmetros da solução polimérica são de importância fundamental. Eles estão relacionados com o peso

molecular do polímero, a concentração e a viscosidade da solução, assim como com a tensão superficial, a condutividade e a taxa de evaporação do solvente utilizado em sua preparação, e influenciam diretamente na formação do jato de polímero que leva à formação das fibras. A viscosidade da solução depende das propriedades do polímero escolhido e da concentração usada [54].

De uma maneira geral, quando a solução polimérica possui baixa viscosidade o jato não é formado com precisão, ocasionando a presença de contas ou grânulos na superfície das fibras, enquanto que soluções com viscosidade alta provocam o entupimento da agulha. Portanto, existe uma concentração crítica para a qual é possível a formação de um jato estável de polímero para uma boa formação das fibras. Muitos dos trabalhos reportados na literatura relatam que isso acontece com soluções poliméricas com concentração entre 10 e 30 %. No entanto, isso não é uma regra, e a concentração ideal para a formação das fibras varia de acordo com o polímero escolhido [54].

Uma tensão superficial alta da solução normalmente induz a uma instabilidade dos jatos de polímero. A seleção do solvente é importante, sendo preferível utilizar solventes com baixo ponto de ebulição e com volatilidade relativamente alta [60]. Tem sido observado que um aumento na condutividade do solvente reduz o diâmetro das fibras. Quando alguns solventes utilizados nesse procedimento possuem baixa condutividade, podem ser adicionados sais para melhorá-la [48, 54].

Os parâmetros ambientais: a umidade e a temperatura têm influência sobre as características das fibras eletrofiadas. Tem sido observado que quando a umidade do ambiente é elevada, isso resulta na formação de poros circulares nas fibras, um fato que está relacionado com a dificuldade de evaporação do solvente; além disso, a umidade também pode afetar a obtenção de membranas homogêneas, resultando na aparência de algodão. Já um aumento na temperatura normalmente ocasiona uma diminuição do diâmetro das fibras [54].

Os parâmetros operacionais: a configuração experimental dos sistemas de eletrofiação, tal como a taxa de fluxo, voltagem aplicada, distância entre agulha e coletor, e o formato e arranjo do coletor também influenciam na formação das fibras.

Quando lenta, a taxa de fluxo, ou seja, a velocidade de liberação da solução polimérica até o coletor, pode permitir a diminuição do diâmetro da fibra. Quando a taxa de fluxo é alta pode ocorrer a formação de esferas. Com relação à intensidade do campo elétrico (voltagem aplicada entre agulha e coletor), tem sido observado que seu aumento

permite uma diminuição do diâmetro da fibra. Deve existir uma distância mínima entre a agulha e coletor para que ocorra a formação de fibras uniformes, uma vez que distâncias muito pequenas ou muito grandes levam à formação de esferas. Uma distância adequada permite um alongamento maior dos fios de polímero, como também a evaporação do solvente. Já uma distância muito pequena pode formar fibras com diâmetros maiores e não homogêneas com muitos grânulos, de modo a não ser possível a evaporação do solvente [54].

As propriedades mecânicas das membranas poliméricas nanoestruturadas podem ser melhoradas pela realização de tratamentos térmicos. Essas membranas também são de fácil modificação por métodos químicos ou físicos. Essas membranas podem ser empregadas em diferentes processos de separação, e a seguir mostramos algumas de suas características e os principais métodos de sua utilização.

2.3 Processos de separação por membranas

Membranas baseadas em uma ampla diversidade de polímeros têm sido bastante usadas para a separação e purificação de componentes de interesse biotecnológico. Em particular, esses materiais têm sido usados para a obtenção e purificação de vírus, bactérias, DNA e em particular a separação de proteínas [43], [61–63]. Conhecida como Processos de Separação por Membranas (PSM), essa tecnologia engloba uma série de processos que utilizam membranas, sejam elas de origem orgânica (polímeros) ou inorgânica (cerâmicas), como um substrato sólido para o fracionamento de misturas, soluções ou suspensões de uma vasta gama de compostos de tamanho e natureza química distintas.

2.3.1 Propriedades químicas e morfológicas das membranas poliméricas que influenciam nos PSM

O desempenho das membranas poliméricas na separação das biomoléculas é influenciado pelas propriedades do polímero utilizado em sua preparação, como, por exemplo, sua cristalinidade. A existência e densidade de poros, ou a ausência deles na membrana, a polaridade e carga superficial que está apresenta, a presença de sítios ativos, ou seja, grupamentos químicos capazes de reagir com moléculas de interesse, são outras características que influenciam o desempenho desses materiais [48, 64]. Todos esses fatores devem ser levados em consideração para a aplicação final desses materiais.

As propriedades superficiais das membranas podem ser de natureza hidrofílica ou hidrofóbica (ver exemplos na tabela 1.). Essas propriedades de superfície podem alteradas durante a fabricação ou após sua obtenção por metodologias químicas (reagentes químicos ou moléculas de acoplamento) ou físicas (utilização de plasmas, técnica que será discutida no Capítulo 3, seção 3.1), desse modo pode-se modificar uma membrana hidrofóbica para que esta se torne hidrofílica e o mesmo também pode ser feito para uma membrana hidrofílica fazendo com que essa se torne hidrofóbica.

Tabela 1 - Exemplos dos polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos usadas na fabricação de membranas poliméricas.

Membranas de polímeros hidrofóbicos	Membranas de polímeros hidrofílicos
Politetrafluoroetileno (PTFE)	Policarbonato (PC)
Poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF)	Poli (étersulfona) (PES)
Polipropileno (PP)	Acetato de celulose (AC)
Poliestireno (PS)	-
Polietersulfona (PES)	-

Fonte: Extraído e adaptado da Ref. [65].

A natureza hidrofílica ou hidrofóbica de uma superfície determina, por exemplo, o arranjo estrutural de uma proteína que com ela interage (Fig. 7). Quando em contato com uma superfície hidrofóbica, uma molécula de proteína interage através dos seus aminoácidos hidrofóbicos, como esses aminoácidos são mais internos, para manter sua estrutura, a proteína se desdobrará nesta superfície espalhando seu núcleo hidrofóbico. Já em contato com uma superfície hidrofílica, as moléculas de proteínas interagem por meio

dos seus grupos funcionais polares com os grupos carregados da superfície. As proteínas têm uma tendência muito menor para se desdobrar irreversivelmente quando em contato com uma superfície hidrofílica [66].

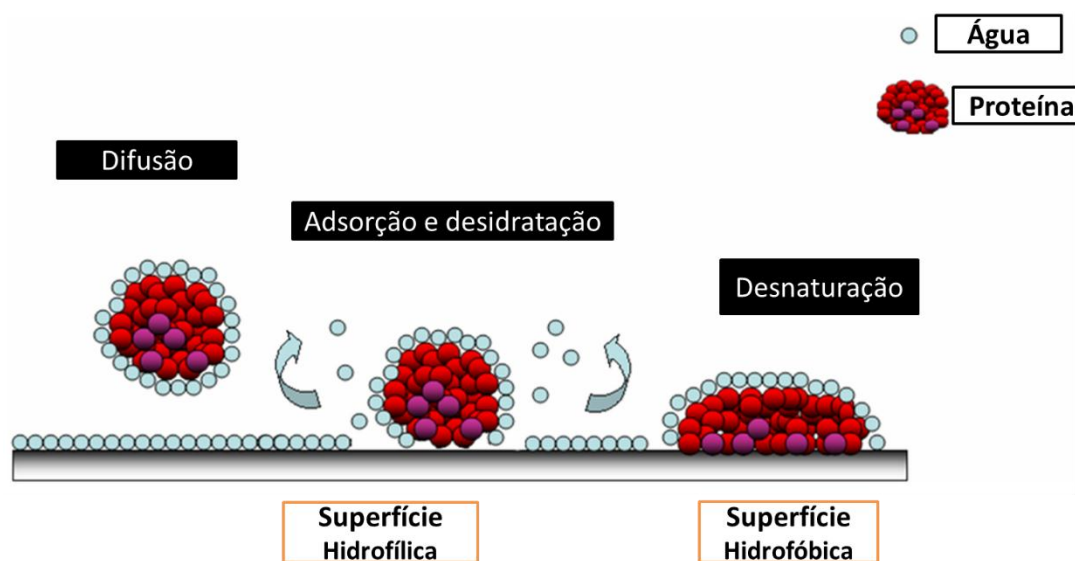


Figura 7 - Influência da polaridade de uma superfície em um procedimento de adsorção de proteína. Adaptado da Ref. [66].

Quanto à sua morfologia, as membranas podem ser distinguidas como densas ou porosas, com ambas podendo ser anisotrópicas⁴ ou isotrópicas⁵ (Fig.2.8). A principal característica de uma membrana densa é que o transporte dos componentes da fase fluida através dela envolve uma etapa de dissolução para que ocorra a posterior difusão por entre o material que a constitui. Isso difere do que ocorre em uma membrana porosa, onde o transporte dos compostos entre a fase fluida e a membrana acontece de maneira contínua pelo preenchimento dos poros dessa última [44, 47, 52].

Uma membrana densa pode ser classificada ainda como densa isotrópica (ou completamente uniforme), densa integral ou densa composta (anisotrópica ou assimétrica). Esta última apresenta características peculiares, pois possui uma camada fina externa (“pele”) que não apresenta poros ou cujos poros existentes são muito pequenos, menores do que 0,05 μm , enquanto que a camada interna (suporte ou substrato) possui poros de tamanhos progressivamente maiores. Nesse tipo de membrana, a região densa pode ser constituída pelo mesmo material da camada porosa ou por um material

⁴ Uma membrana anisotrópica apresenta redução no tamanho dos poros ao longo da seção transversal. Em uma membrana densa anisotrópica, a região densa pode ser do mesmo material da região porosa ou constituída por um material distinto.

⁵ Considera-se uma membrana isotrópica quando o tamanho e distribuição de seus poros é uniforme na seção transversal da mesma, ou mesmo completamente uniforme, como é o caso de uma membrana densa.

distinto. Apesar de possuir uma camada porosa, ela ainda pode ser descrita como uma membrana densa, pois o transporte dos componentes da fase fluida acontece inicialmente por sua dissolução e posterior difusão [44, 47].

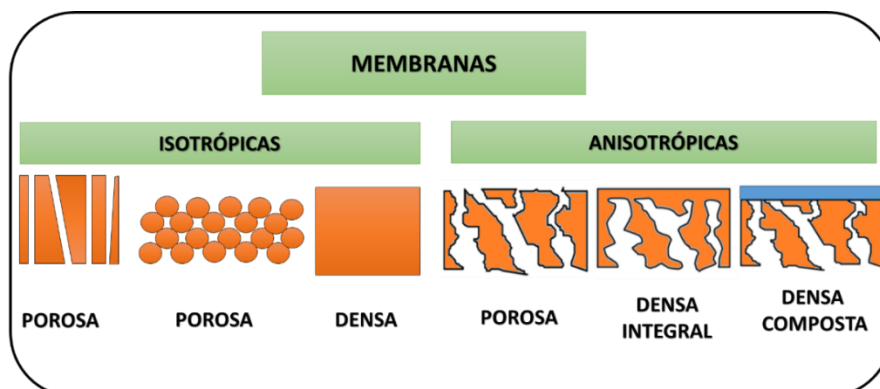


Figura 8 - Classificação e representação esquemática da morfologia de seções transversais de membranas poliméricas. Adaptado da Ref. [47].

As propriedades químicas e morfológicas das membranas determinam a taxa de fluxo, o transporte e a retenção dos compostos de interesse por esses materiais. Em especial, a morfologia da membrana e o tipo de força motriz empregada influenciam diretamente o mecanismo de transporte das espécies através da membrana, o que pode ocorrer por meio de convecção ou por difusão, ou até mesmo pelos dois processos [44]. A morfologia também pode determinar a seletividade de compostos (por exemplo, uma membrana que possui poros de tamanhos diferentes permite separar proteínas de tamanhos diferentes). Consequentemente, o conhecimento dessas propriedades permite uma adequada aplicação dessas membranas nos PSM. A seguir, vamos discutir as configurações em que as membranas são empregadas em PSM.

2.3.2 Métodos empregados em PSM

Nos processos de separação por membranas, para que ocorra o transporte das espécies é essencial que uma força motriz esteja atuando. Os PSM convencionais normalmente utilizam o gradiente de potencial químico e/ou o gradiente de potencial elétrico como força motriz. Devido à necessidade de separar componentes que muitas vezes são sensíveis ao uso de temperatura, de uma maneira geral muitos dos PSM envolvem a utilização do gradiente de potencial químico, ou seja, a dependência da força motriz em termos do gradiente de pressão e de concentração (ou pressão parcial) [52].

As membranas poliméricas nanoestruturadas apresentam maior área superficial (em termos da razão área/ volume), espessura e porosidade ajustável. A fabricação dessas membranas com propriedades de superfície controladas (hidrofílicas ou hidrofóbicas, porosas ou com superfícies lisas, e com tamanhos de fibras ajustáveis) para a aplicação desejada, e sua modificação pela inserção de grupos químicos específicos carregados positivamente ou negativamente, ou pela imobilização de ligantes de afinidade em sua superfície (primers, anticorpos, aptâmeros), torna possível realizar a separação e purificação de uma ampla gama de biomoléculas [67].

O uso de membranas em colunas de separação é uma alternativa para substituir os métodos convencionais de cromatografia baseados em resina e sílica. Em comparação com os métodos cromatográficos, os PSM oferecem vantagens como menor custo e a facilidade de expansão para produção comercial [43, 68] .

As tecnologias de extração em fase sólida podem usar diferentes configurações, desde sistemas miniaturizados até aqueles de grandes dimensões, e as membranas poliméricas podem ser aplicadas em sistemas de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF), osmose reversa (RO) e destilação por membrana (DM) [48, 52].

Dentre os métodos citados, a MF, UF e NF são os mais adequados para a separação, purificação e concentração de biomoléculas. Em particular, a ultrafiltração tem sido fundamental para a separação de moléculas de proteínas, devido à natureza porosa e tamanho dos poros (1-100 nm) presentes nas membranas que são utilizadas nesse procedimento [69, 70].

Uma ultrafiltração é um processo de separação por membrana em que a força motriz é o gradiente de pressão através dela e de seus poros, fazendo com que as macromoléculas sejam retidas. Como cada tipo de membrana polimérica e de configuração experimental possui características específicas, a escolha do método dependerá dos tamanhos e propriedades de cada molécula de proteína [43, 63].

A ultrafiltração tem sido muito utilizada na separação de proteínas do leite. A. Arunkumar e M. R. Etzel (2014) [71] utilizaram uma membrana de celulose contendo cargas positivas, tornando possível o fracionamento de α -lactalbumina bovina a partir de β -lactoglobulina presente no soro permeado de leite. Eles separaram as proteínas de acordo com o tamanho e ponto isoelétrico⁶, e obtiveram essas moléculas com um grau de pureza considerável.

As metodologias para separação de proteínas envolvem uma série de processos que têm como objetivo o isolamento de um único tipo de proteína, a partir de uma mistura complexa. Desse modo, a obtenção de proteínas com um grau de pureza é vital para a caracterização da sua função, estrutura e possíveis aplicações. Os PSM têm contribuído para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes, com as membranas nanoestruturadas sendo capazes de adsorver proteínas, podendo se mostrar específicas quando essas membranas são projetadas com ligantes de afinidade [72].

Para compreender melhor os processos de adsorção de proteínas em membranas, discutiremos a seguir definições básicas sobre proteínas, e em particular, a proteína BSA, que foi utilizada como modelo para o estudo de adsorção pelas membranas produzidas neste trabalho, descreveremos ainda alguns métodos de separação para essas biomoléculas, ressaltando as vantagens daqueles baseados no uso de membranas

2.4 Proteínas

Proteínas estão presente em todos os organismos vivos, desempenhando um conjunto de funções altamente especializadas, como a catálise dos processos metabólicos, o armazenamento e a transferência de energia, a expressão genética (replicação do DNA), transporte transmembranar, a comunicação e o reconhecimento molecular, a defesa e resposta a estímulos, o transporte de moléculas, a formação das estruturas intracelulares e extracelulares e outras atividades específicas em células e tecidos [3, 73].

⁶ O ponto isoelétrico (p.I) de uma proteína corresponde ao valor de pH do meio no qual a quantidade de carga positiva é igual ao de sua carga negativa. Quando uma proteína se encontra em um meio cujo valor de pH está abaixo do p.I, essa molécula transportará uma carga líquida positiva. Por outro lado, quando a proteína está em um meio onde o valor do pH corresponde a valores acima do p.I, essa molécula transportará carga negativa.

As proteínas são biopolímeros formados por uma sequência linear de unidades químicas fundamentais, os aminoácidos [74]. Todos os aminoácidos têm em comum uma mesma estrutura química geral, que inclui um átomo de carbono central (C_α), ligado covalentemente a um átomo de hidrogênio, um grupo amino (amino- α) e um grupo carboxilo (carboxilo- α). Um quarto substituinte acoplado em sua estrutura, referido como cadeia lateral (C_β), diferencia esses aminoácidos quanto à sua polaridade e carga elétrica. Na Fig. 9 podemos ver a representação da estrutura de um aminoácido [3].

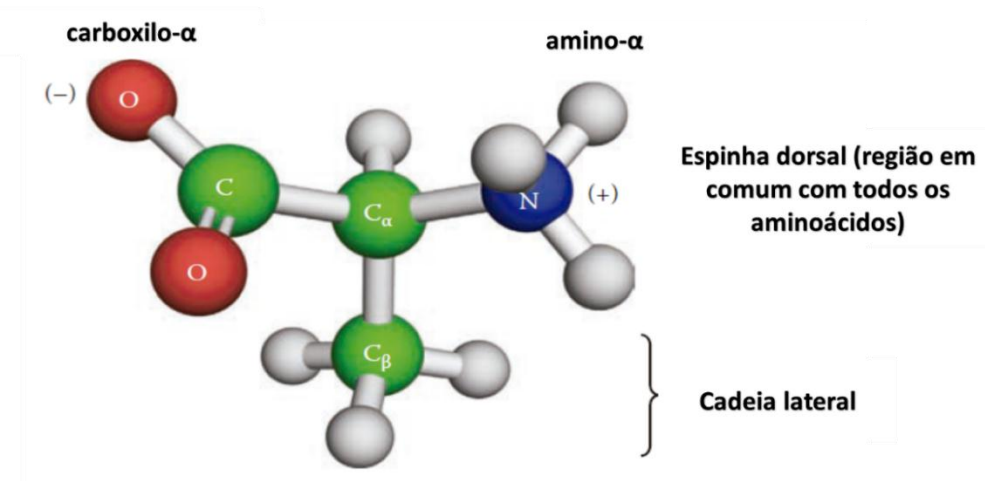


Figura 9 - Representação da estrutura química dos aminoácidos. Adaptado da Ref. [3].

Todas as proteínas são constituídas a partir de um conjunto de 20 diferentes tipos de aminoácidos (Fig. 10). Os aminoácidos se ligam covalentemente um ao outro a partir da interação de um grupamento amino com um ácido carboxílico, por meio de uma reação química, formando a chamada ligação peptídica [1]. A organização desses aminoácidos na proteína é o que irá estabelecer sua sequência genética e o que possibilita o seu enovelamento em uma estrutura tridimensional específica, que é responsável por sua atividade biológica [3].

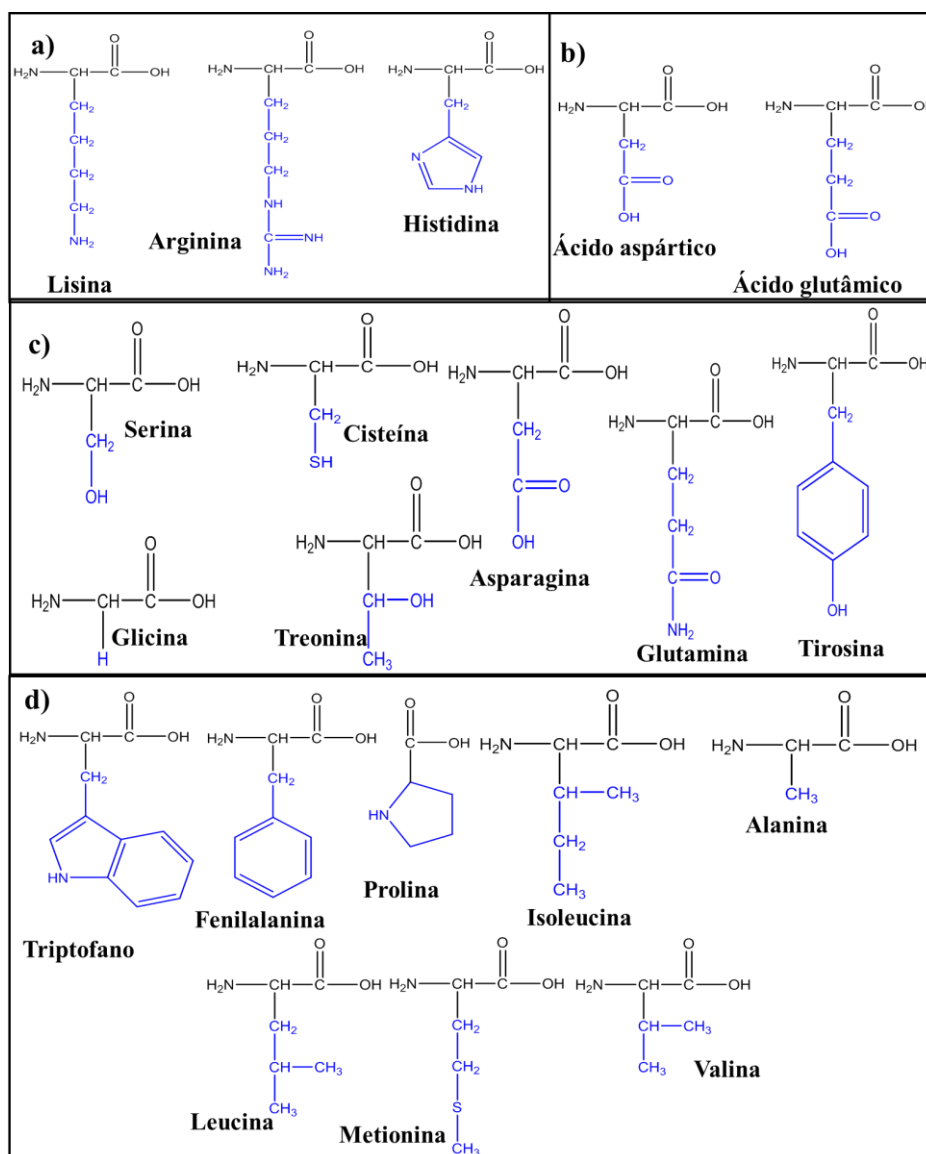


Figura 10 - Estrutura química dos 20 aminoácidos que compõem as proteínas: em azul, destacamos a cadeia lateral que caracteriza cada aminoácido. Os aminoácidos estão separados de acordo com as características dos seus substituintes, que podem ser divididas em: a) polares com carga positiva, b) polares com carga negativa, c) polares sem carga e d) apolares.

Essas biomoléculas possuem uma estrutura complexa, que é organizada em níveis de hierarquia estrutural (Fig. 11). A estrutura primária é formada por uma sequência de aminoácidos que é ordenada de maneira linear, compondo a cadeia polipeptídica, o que corresponde ao primeiro nível de hierarquia da proteína. Partindo dessa sequência linear, alguns segmentos dentro da cadeia se organizam em α -hélices e folhas dobradas (β -folhas), formando a estrutura secundária da proteína, o que se constitui no segundo nível da hierarquia dessas moléculas [1, 3, 66, 74].

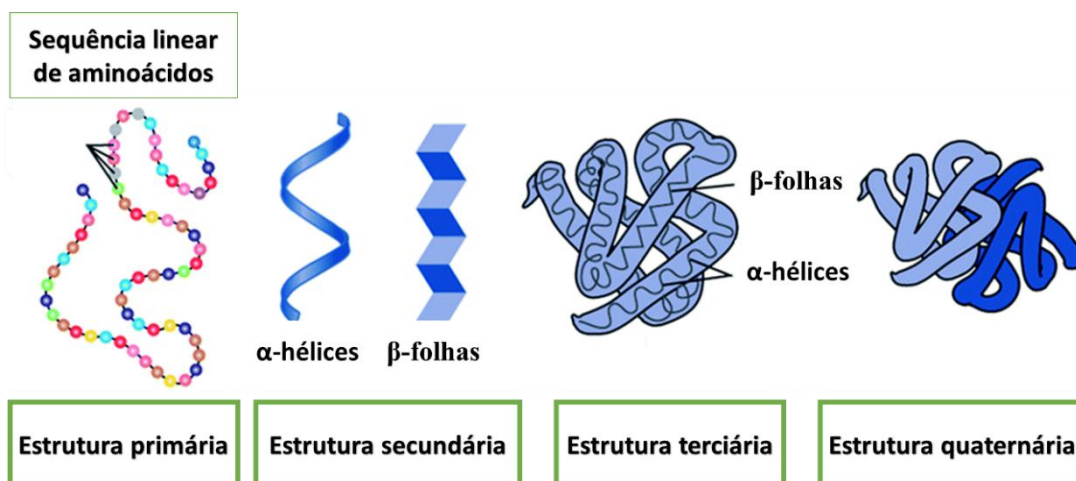


Figura 11 - Representação dos níveis de organização estrutural das proteínas. Adaptado da Ref. [1].

Por sua vez, as estruturas secundárias (α -hélices e β -folhas) tendem a se dobrar ainda mais, para formar uma estrutura terciária mais compacta, o que forma o terceiro nível da hierarquia. Essa estrutura é a forma mais estável da proteína, uma vez que ela otimiza as várias forças de atração entre os diferentes aminoácidos que compõem o cadeia da proteína, sendo justamente essa estrutura terciária a responsável pela forma biologicamente ativa (estrutura nativa) das proteínas [1, 66, 74].

A estabilidade das estruturas mais complexas das proteínas é mantida por meio da formação de ligações de hidrogênio, pelas interações hidrofóbicas e por ligações dissulfureto [75]. Quando acontecem pequenas mudanças no pH ou na temperatura do meio em que a molécula de proteína se encontra, sua estrutura terciária é modificada, podendo ocorrer sua inativação parcial ou completa, no que recebe o nome de desnaturação. Quando a proteína se encontra desnaturada, ou com um dobramento incorreto, diversos tipos de doenças podem resultar nos organismos [66].

Finalmente, algumas proteínas podem se dobrar separadamente em uma estrutura terciária, para logo em seguida se unirem a outras de modo a formar um complexo biologicamente ativo que recebe o nome de estrutura quaternária, o que se constitui no quarto nível de organização hierárquica [74].

A carga elétrica líquida das moléculas de proteína é um parâmetro decisivo que afeta fortemente seu comportamento físico-químico. Em um meio aquoso as proteínas tendem naturalmente a formar uma dupla camada elétrica, devido aos grupos funcionais presentes na estrutura química de seus aminoácidos. Como consequência, a carga

superficial líquida de uma proteína é afetada pelo valor do pH do meio ela está dispersa. Em particular, o ponto isoelétrico (p.I) de cada molécula de proteína, é muito importante, e este é definido como o valor de pH ao qual a superfície de uma molécula de proteína é eletricamente neutra, ou seja, possui igual quantidade de aminoácidos carregados positivamente e negativamente [76]. A organização das cargas positivas e negativas na proteína, influenciam na sua conformação estrutural e consequentemente na maneira como estas moléculas irão interagir com o meio biológico ou na interação com materiais. Quando o pI se torna igual ao valor de pH (a carga global da proteína é nula), e a repulsão elétrica entre as moléculas de proteína é minimizada, estabilizando sua estrutura [76, 77].

As proteínas podem ser diferenciadas quanto à sua composição, forma ou ainda com relação as funções desempenhadas por elas nos organismos vivos. Quanto a composição, elas podem ser divididas em homoproteínas, se forem formadas unicamente por aminoácidos (por exemplo, as albuminas, queratina e insulina), ou em heteroproteínas (licoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, metaloproteínas e as nucleoproteínas), que são aquelas constituídas por aminoácidos e componentes não proteicos, conhecidos como grupos prostéticos [1].

Quanto a sua forma, as proteínas podem ser globulares ou fibrosas. As proteínas globulares possuem uma forma esférica ou elipsoidal, como resultado dos dobramentos sobre si mesmas (o que ocorre, por exemplo, na hemoglobina), e, possuindo estruturas bem compactas, essas moléculas se mostram solúveis em maior ou menor grau. Por sua vez, as proteínas fibrosas têm um formato semelhante a uma lâmina, devido ao arranjo das cadeias peptídicas lineares (por exemplo, colágeno e a queratina), sendo praticamente insolúveis [1, 66].

As proteínas podem ainda desempenhar inúmeras funções nos organismos, mas são responsáveis principalmente pela formação estrutural das células e dos tecidos, pela resposta enzimática catalisando as reações bioquímicas (enzimas), como biomoléculas transportadoras de diversos compostos (tais como gases, lipídios e fármacos), nas atividades regulatórias (hormônios) e de defesa (anticorpos), no qual as imunoglobulinas protegem o organismo contra agentes estranhos (tais como bactérias, vírus, fungos, protozoários)[1, 3].

Dentre as diversas proteínas existentes, a BSA é uma das proteínas com propriedades mais amplamente estudadas, e na seção a seguir discutiremos as características mais importantes dessa proteína, de modo a nos permitir uma melhor compreensão dos resultados da adsorção da BSA por nossas membranas.

2.4.1 Albumina do Soro Bovino

A BSA é uma proteína extensamente utilizada como uma molécula modelo para a investigação dos mecanismos de adsorção de proteínas em superfícies sólidas. A BSA possui uma sequência de 583 aminoácidos e compartilha uma semelhança estrutural de 76% com Albumina do Soro Humano (HSA) [78, 79] ; devido a isso, a BSA é aplicada em estudos de sistemas biológicos em geral. Na Tabela 2 é mostrada uma comparação entre a composição de aminoácidos da proteína BSA e HSA

Tabela 2 - Comparação da composição química entre a BSA e HSA.

Aminoácidos e peso molecular	HSA	BSA
Ácido aspártico	36	40
Asparagina	17	14
Treonina	28	34
Serina	24	28
Ácido glutâmico	62	59
Glutamina	20	20
Prolina	24	28
Glicina	12	16
Alanina	62	46
Valina	41	36
Cisteína	35	35
Metionina	6	4
Isoleucina	8	14
Leucina	61	61
Tirosina	18	20
Fenilalanina	31	27
Lisina	59	59
Histidina	16	17
Triptofano	1	2
Arginina	24	23
Total de aminoácidos	585	583
Peso molecular (Da)	66.438.41	6641 1.17

Fonte: Extraído e adaptado da Ref. [80].

A BSA é uma proteína globular (Fig. 12) com dimensões de 4 nm × 4 nm × 14 nm, e possui um peso molecular médio de aproximadamente 66 kDa. De acordo com a literatura disponível, o ponto isoelétrico (p.I.) dessa proteína corresponde a um valor entre 4,7–5,0 [81–83]. A BSA tem a capacidade de adaptação conformacional (sendo uma proteína flexível), ou seja, ela possui isômeros conformacionais sob certas condições de pH [83–85]. Quando em meios ácidos, isto é, abaixo do seu p.I, essa proteína apresenta

carga positiva (devido aos aminoácidos lisina, arginina e histidina), e sob condições básicas, acima do valor do p.I, possui carga negativa (ácido glutâmico e ácido aspártico) [82, 86]. Devido a esse comportamento, a BSA tem a capacidade de se ligar de maneira reversível com diferentes materiais, por meio de ligações eletrostáticas.

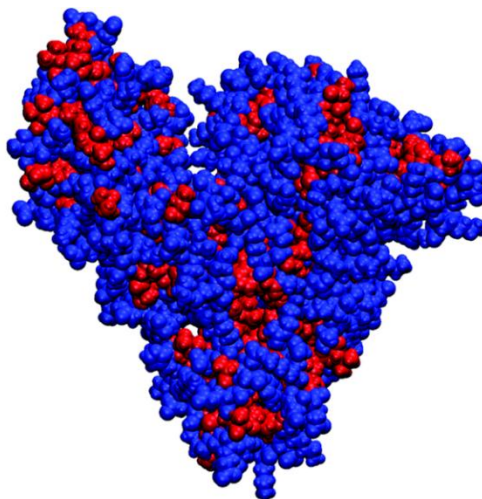


Figura 12 - Estrutura espacial da BSA, com a distribuição das regiões hidrofílicas sendo representadas por azul, enquanto as regiões hidrofóbicas são representadas pela cor vermelha. Adaptado da Ref. [161]

A BSA adota conformações de diferentes isômeros estruturais quando são provocadas alterações nos valores de pH do meio em que ela se encontra. A sua conformação é dita nativa (também denominada normal, “N”) quando o valor do pH está entre 5,0 e 7,0. A forma básica (B) é encontrada para valores de pH entre 8,0 e 10,0. Para valores de pH acima de 10,0 é dito que a forma da BSA é envelhecida (A). Existe uma faixa de transição, que recebe o nome de migração rápida (F), em que a BSA tem uma conformação parcialmente expandida, quando o pH está entre 3,0 e 4,3. Finalmente, a conformação expandida (E) da BSA é encontrada para valores inferiores a 2,7 [79, 87, 88].

A albumina, presente no plasma animal ou humano, desempenha importantes funções biológicas para a manutenção saudável dos organismos vivos: ela atua como ligante de afinidade e no transporte multifuncional para diversas moléculas, entre as quais se incluem, por exemplo, ácidos graxos, hormônios (tireoidais e lipossolúveis), enzimas, corantes, íons metálicos, aminoácidos e compostos farmacêuticos. Além disso, ela é a responsável pelo controle do pH sanguíneo e da pressão osmótica, respondendo por 80 % da pressão osmótica coloidal [78, 85, 89].

O grupo de proteínas no qual a BSA está inserida, denominado de albuminas do soro, mas também conhecidas como proteínas séricas, são as mais abundantes no plasma sanguíneo, correspondendo a cerca de 60 % do total das proteínas globulares [85]. Sua síntese nos mamíferos acontece no fígado, e elas têm uma vida média de aproximadamente 19 dias no sistema circulatório. Em condições fisiológicas, sua concentração no plasma sanguíneo varia em torno de 35 a 55 mg/mL (42 mg/mL para a HSA no plasma humano) [78, 90].

A proteína BSA vem sendo adotada como modelo para estudo de adsorção em materiais, como, por exemplo, em processos de separação de proteínas, na avaliação de transporte de drogas [91]. A BSA pode ser utilizada ainda em biossensores, como um elemento de bloqueio e de biorreconhecimento [92].

Desse modo, a escolha da BSA para a investigação desses sistemas se deve ao bom conhecimento sobre suas propriedades físico-químicas (como sua solubilidade em água), o elevado grau de pureza possível, sua disponibilidade, seu custo relativamente baixo quando comparada a outras proteínas, e a ampla literatura disponível sobre suas propriedades em função de diversos parâmetros de estudo (concentração, pH e de sua estrutura conformacional). É possível também adaptar os sistemas que utilizaram a BSA para procedimentos similares com outras proteínas de interesse. Por essa razão, escolhemos esta proteína para nossa investigação sobre o comportamento de adsorção pelas membranas de poliestireno apresentadas nesta dissertação.

2.4.2 Métodos de separação de proteínas

A separação adequada de moléculas de proteínas é fundamental para a obtenção de proteínas com a estabilidade da sua estrutura nativa, pois isso assegura a manutenção de suas funções biológicas em qualquer aplicação prática. Para as indústrias médica e farmacêutica, assim como para as finalidades analíticas em análises laboratoriais, é de interesse que os processos de separação de proteínas demandem o menor tempo possível, com uma maior eficiência de rendimento na obtenção das proteínas de interesse, e um mais elevado grau de pureza [43, 93].

A menos que uma proteína ou mistura de proteínas já se encontre em solução aquosa, a extração e separação de proteínas é uma tarefa extremamente difícil, a depender da natureza do espécime de partida (por exemplo, sangue, órgãos, célula ou tecido). Os

métodos tradicionais de separação e purificação de proteínas incluem cromatografia, eletroforese, precipitação e centrifugação [12, 14, 94].

De uma maneira geral, independentemente do método escolhido para realizar a separação das proteínas, o primeiro procedimento a ser realizado requer que, uma vez definida a natureza da amostra de onde se deseja extrair a proteína de interesse, seja feita a ruptura de suas células ou tecidos, fazendo com que as proteínas sejam liberadas em uma solução que é chamada de extrato bruto ou total. Isso acontece ao se submeter uma amostra a um banho de ultrassom, ou a detergente ou reagentes (para realizar a lise das células) e trituração ou pressão (para o rompimento dos tecidos) [12, 14, 95].

Nos métodos de extração líquido-líquido, ao ser obtido o extrato bruto de uma mistura de proteínas pode ser necessário separar esse extrato em frações subcelulares ou em organelas específicas; nesse caso, é realizada uma etapa de centrifugação diferencial e, em seguida, o fracionamento [94]. Quando não é necessário obter frações específicas, logo após a obtenção do extrato bruto é feito o fracionamento, o que é seguido pelas etapas de precipitação e diálise (Fig. 13).

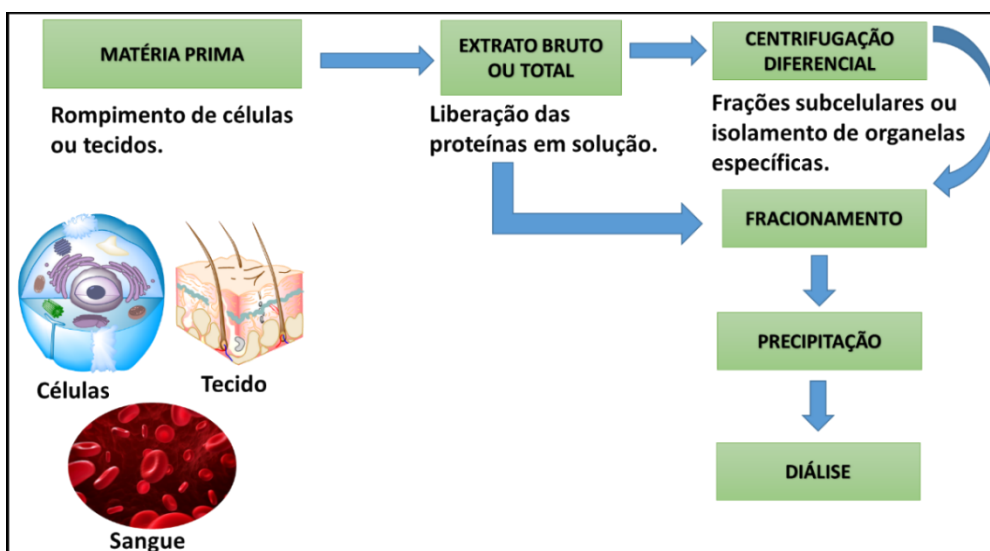


Figura 13 - Etapas envolvidas no procedimento tradicional de separação e purificação de proteínas pelo método de extração líquido-líquido.

Durante o fracionamento, as proteínas são separadas de acordo com sua solubilidade. A solubilidade de uma proteína está intimamente relacionada com a utilização de solventes polares e apolares, o pH do meio, a temperatura e a concentração salina. Como de uma maneira geral as proteínas possuem baixa solubilidade na presença de concentrações salinas elevadas, a etapa de precipitação envolve o *salting out* (ou seja, utilização de uma solução salina com concentração elevada), e durante essa etapa as proteínas que precipitam são separadas daquelas que continuam em solução, por meio de centrifugação [94].

Na diálise, as proteínas são separadas dos demais solutos (sais) e impurezas, através da diferença de tamanhos. Adicionalmente, também são utilizados os métodos cromatográficos (de troca iônica, polaridade, de exclusão por tamanho ou de afinidade), e na Fig.14 pode ser observado um exemplo de coluna cromatográfica utilizada para a separação de proteínas [96].

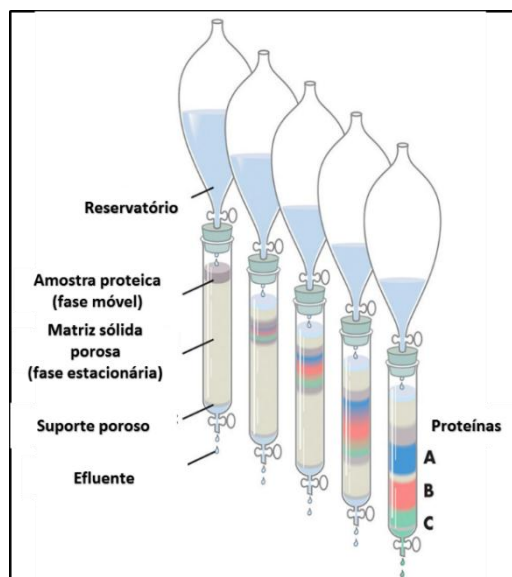


Figura 14 - Representação de uma coluna cromatográfica utilizada na separação de proteínas. Adaptado da Ref. [94].

Os métodos tradicionais baseados em extração líquido-líquido foram utilizados durante várias décadas. Esses métodos apresentam desvantagens, como baixos rendimentos de proteína, elevada quantidade de solventes orgânicos utilizados no processo (por exemplo, etanol, tolueno, acetona, dioxano, éter, metanol) e compostos salinos [97].

Embora a cromatografia ofereça alta seletividade para o fracionamento de proteínas, os sofisticados sistemas que caracterizam esse método são caros. Assim como a extração líquido-líquido, eles dão origem a grandes volumes residuais de solventes e sais, e demandam um tempo longo e têm custo alto, além de ser de difícil manipulação para o trabalho na indústria [71]. Isso permitiu que ao longo dos últimos anos pesquisadores desenvolvessem novos materiais e tecnologias que pudessem vir a superar essas desvantagens. Nesse sentido, um enfoque atual têm sido os processos de separação de proteínas por membranas [43]

As colunas de separação por centrifugação (coluna spin) se constituem em um método alternativo aos métodos cromatográficos. Colunas de separação com membranas oferecem a possibilidade de operação simples e contínua. A utilização das colunas spin costuma demandar poucas etapas e uma baixa quantidade de reagentes, e sua utilização também leva a uma redução na perda, degradação e desnaturação das proteínas [72].

A utilização das membranas nanoestruturadas nessas colunas permite a substituição dos materiais à base de sílica, cerâmicas ou resina, que normalmente são mais caros e necessitam do uso de elevadas pressões. As membranas nanoestruturadas têm sido utilizadas como substrato para essas colunas, e apresentam um melhor desempenho com relação à menor pressão utilizada e às altas taxas de fluxo. Além disso, é fácil a funcionalização dessas membranas para que passem a ter afinidade por proteínas específicas [43].

J.Li. *et. al.*(2013) [93] fabricaram membranas fibrosas à base de colágeno e demonstraram sua utilização como material de empacotamento de coluna, sendo aplicado na separação de diferentes proteínas (BSA, hemoglobina bovina e lisozima). Estes observaram que o pH e a força iônica influenciam nas interações eletrostáticas durante a adsorção das proteínas por essas membranas de colágeno. Eles demonstraram ainda a capacidade de reutilização desse material para diferentes ciclos de adsorção.

Em um procedimento de coluna de separação (Fig. 15), inicialmente a proteína é dissolvida em uma solução de ligação que será responsável por promover sua interação com a membrana, sendo então a coluna submetida a uma diferença de pressão para que seus poros venham a reter as proteínas, pela utilização de uma centrifuga. Em seguida, é realizada uma etapa de lavagem do material para que ocorra a remoção das proteínas não ligadas e de possíveis impurezas. Posteriormente, as proteínas adsorvidas são liberadas (dessorvidas) em um novo meio, conhecido como solução de eluição.

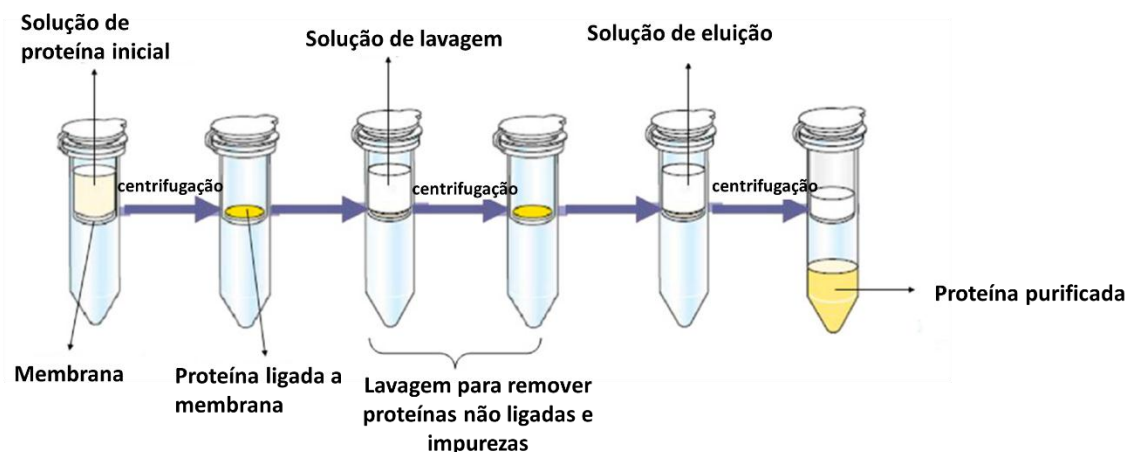


Figura 15 - Etapas de um procedimento de coluna de centrifugação. Adaptado da Ref. [72].

Os processos de separação por membranas recebem maior atenção tanto dos setores científicos-tecnológicos quanto dos comerciais, em decorrência de suas vantagens comparativas em relação a processos tradicionais, como eficiência elevada de remoção a partir dos meios fluidos, baixo consumo de energia, cinética rápida, facilidade para a miniaturização ou o escalonamento das membranas e dos sistemas que serão utilizados no processo [98, 99].

Os métodos de separação para as proteínas se baseiam nas propriedades que diferem de uma proteína para outra, como a carga, o ponto isoelétrico, o tamanho, a polaridade, a solubilidade e a afinidade por ligantes específicos. A tecnologia de separação de proteínas por membranas tem feito uso dessas propriedades com o objetivo de permitir com que proteínas possam ser obtidas através de métodos de adsorção em interfaces sólidas.

A estratégia de imobilização das proteínas em interfaces sólidas abrange duas categorias: a adsorção de proteínas através de processos não covalentes e a imobilização de proteínas por métodos covalentes. Nas interações não covalentes ocorre a adsorção passiva das proteínas através de interações físicas com superfícies hidrofóbicas, ou de interações químicas por meio de ligações eletrostáticas com superfícies carregadas. Nesse caso, as vantagens deste método decorrem do fato de que não se fazem necessários o uso de reagentes de acoplamento adicionais ou a modificação da proteína de interesse, bem como de que a reversibilidade do processo permite maior simplicidade na ligação da proteína e em sua dessorção da superfície [100].

2.4.3 Mecanismos de Adsorção

Muitos processos físicos, químicos e biológicos ocorrem na fronteira entre duas fases. A adsorção é um fenômeno que consiste na transferência de massa entre duas interfaces, ocasionando a adesão de substâncias em uma dada superfície. A adsorção pode acontecer entre diferentes interfaces, como, por exemplo, as do tipo líquido-sólido, líquido-líquido, líquido-gás ou gás-sólido [101].

Em adição, os processos de separação de biomoléculas por membranas é governado pela adsorção. Existe um grande interesse pelos processos de interface líquido-sólido, que representam um método eficaz de extração em fase sólida para realizar a separação, recuperação ou purificação de compostos dissolvidos em um meio fluido. Em um procedimento de adsorção, denominamos como adsorvente a superfície que será responsável por adsorver os compostos de interesse presentes no meio fluido, enquanto que os compostos adsorvidos por essa superfície são conhecidos como adsorbatos [101].

Dois tipos de mecanismos principais podem acontecer em um processo de adsorção por uma superfície, a fisissorção e a quimissorção. Em um mecanismo por fisissorção, uma superfície sólida adsorve moléculas através de interações físicas, por exemplo, por meio de forças de van der Waals ou por interações hidrofóbicas, o que resulta em interações fracas que geralmente são reversíveis; além disso, nesse mecanismo as moléculas podem ser adsorvidas em multicamadas [101].

Já nos mecanismos de quimissorção, as forças de atração entre as moléculas adsorvidas e a superfície sólida se devem a ligações químicas covalentes ou a interações eletrostáticas, e nesse caso a adsorção de moléculas ocorre apenas em monocamadas; além disso, essas interações são mais fortes e dependem da existência de condições favoráveis para que ocorra o rompimento da ligação entre o adsorvente e o adsorbato [101].

A partir de dados obtidos em um experimento de adsorção, modelos teóricos são capazes de descrever quais mecanismos predominam na interação entre uma superfície e as moléculas que estão sendo adsorvidas, uma vez que cada um deles se baseia em um conjunto diferente de princípios e requisitos subjacentes para sua aplicação apropriada: esses modelos são conhecidos como isotermas de adsorção [101].

Uma isoterma de adsorção expressa a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa adsorvente (essa é uma variável dependente geralmente expressa em gramas) em função da concentração de soluto em equilíbrio (que é uma variável independente, em

mg) e o seu grau de acumulação sobre a superfície adsorvente a uma temperatura constante [102]. As isotermas de Langmuir , de Freundlich, de Temkin , de Langmuir-Freundlich, Redlich-Peterson são alguns dos modelos que podem esclarecer como um processo de adsorção pode acontecer em uma superfície [103]

As isotermas de Freundlich e Langmuir são os modelos de adsorção mais utilizados, por serem capazes de descrever como ocorre a formação de camadas e seu grau de homogeneidade. Uma isoterma de Freundlich supõe que: a adsorção do adsorvato ocorre sobre uma superfície heterogênea por adsorção em multicamada, de modo que a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa adsorvente aumenta gradualmente, existindo diferentes energias de adsorção e taxas de adsorção [102].

Já a isoterma de Langmuir pressupõe que: (a) as moléculas devem ser adsorvidas apenas em locais definidos da superfície, que são os sítios de adsorção; (b) para cada sítio deve existir apenas uma molécula adsorvida, e que essas moléculas não interagem com as vizinhas; (c) a máxima quantidade de adsorção possível corresponde à monocamada em superfície homogênea; e (d) a superfície do adsorvente deve ser completamente uniforme do ponto de vista energético. Por essas razões, a isoterma de Langmuir é denominado de modelo de monocamada [102, 104, 105].

As equações que se aplicam as isotermas de Langmuir e Freundlich serão descritas na metodologia deste trabalho (Capítulo 4, Seção 4.6.4)

2.4.4 Adsorção de proteínas

O estudo da adsorção de proteínas em superfícies constitui um campo em constante avanço. A adsorção de proteínas é um passo fundamental para aplicações em biotecnologia [10, 89]. A adsorção de moléculas de proteína na interface entre um sólido e líquido pode acontecer principalmente por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio, ou por uma combinação dessas interações, quando o substrato possui características diferenciadas.

A adsorção de proteínas é um fenômeno complexo que é influenciado por diferentes fatores (Fig. 16). Em primeiro lugar, ela depende das propriedades intrínsecas da proteína, como seu ponto isoelétrico (já que cada tipo de proteína possui um p.I característico), tamanho e estado conformacional, além do fato que as proteínas possuem uma afinidade natural específica para adsorver em superfícies. Os parâmetros externos,

tais como a temperatura, pH, força iônica e composição do tampão em que uma proteína se encontra dissolvida são outros fatores que influenciam nesse processo. Por fim, as propriedades químicas e superficiais do material empregado como adsorvente também têm influência considerável. A energia superficial, polaridade, carga e a morfologia (forma, rugosidade, topologia e reologia) são alguns parâmetros que regulam a influência do adsorvente [106].

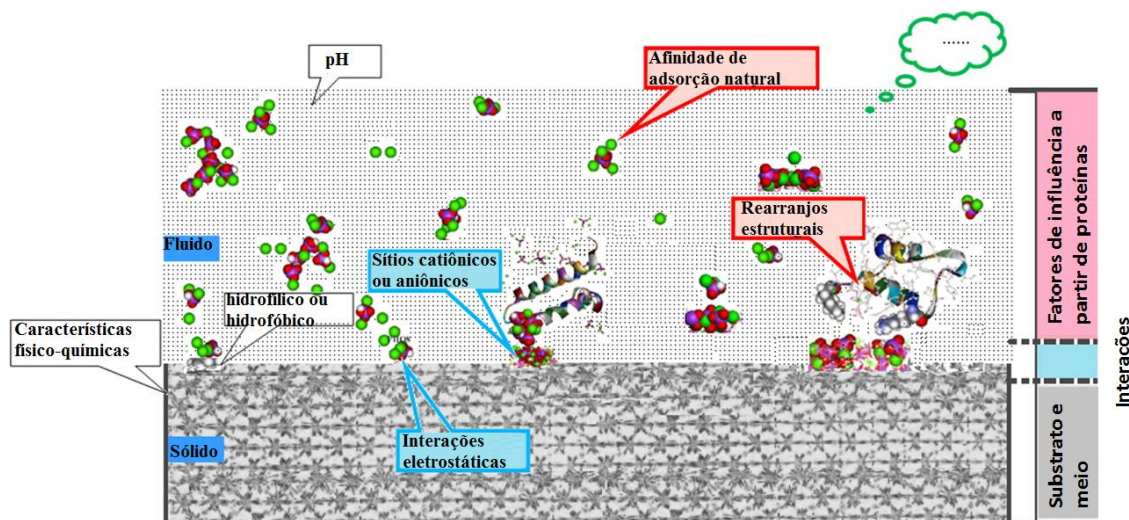


Figura 16 - Fatores que influenciam na adsorção de proteínas. Adaptado da Ref. [107].

O pH do meio e o tipo de solução tampão influenciam fortemente na maneira como as cargas elétricas estão distribuídas na proteína e, conseqüentemente, na sua adsorção por uma superfície, podendo determinar a ocorrência de três condições distintas. Primeiramente, quando o pH possui o valor igual ao p.I da proteína ($\text{pH}=\text{p.I}$), a quantidade de aminoácidos com cargas negativas é igual ao de cargas positivas, conferindo uma carga líquida neutra à molécula. No ponto isoeletrico, as repulsões eletrostáticas entre interações proteína-proteína são minimizadas, o que proporciona maiores densidades de empacotamento em uma superfície, aumentando desse modo a adsorção [108].

Em segundo lugar, quando o pH está abaixo do p.I ($\text{pH} < \text{p.I}$), as proteínas são carregadas positivamente, e em um terceiro caso, quando o pH é elevado acima do p.I ($\text{pH} > \text{p.I}$), as proteínas são carregadas negativamente. Para esses dois últimos casos, a adsorção da proteína por uma superfície somente será possível mediante a existência de cargas opostas entre o substrato e a proteína, pois as atrações eletrostáticas são responsáveis por acelerar a migração da proteína para a superfície. De uma maneira geral, quando o substrato e a proteína possuem a mesma carga, a repulsão entre eles promove a

desnaturação da proteína, e consequentemente a perda da atividade biológica da mesma [108].

Neste capítulo, abordamos os conceitos fundamentais sobre polímeros, a importância das membranas e sua aplicação nos procedimentos de adsorção. Discutimos ainda os fatores que mais influenciam o processo de adsorção. No próximo capítulo serão relatadas algumas das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho.

3

3 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho utilizamos diferentes técnicas de caracterização para investigar as propriedades das MNPS fabricadas pela técnica de eletrofiação, assim como na sua modificação e na aplicação como substrato para adsorção de proteínas. Neste sentido, serão expostos a seguir os principais detalhes que dizem respeito a algumas dessas técnicas, bem como as definições e propriedades do plasma e sua utilização como ferramenta na modificação de superfícies.

3.4 Plasma: uma ferramenta importante para a modificação de superfícies

O plasma é considerado o quarto estado da matéria por apresentar características peculiares que o tornam único, diferindo dos estados sólido, líquido e gasoso. A transformação da matéria por meio da energia, formando um gás ionizado é o que torna o plasma tão peculiar [109].

A superfície de algumas membranas poliméricas, incluindo as de PS, possui uma baixa energia superficial e propriedades de adesão fracas, sendo necessária a sua modificação por métodos químicos ou físicos para proporcionar a melhoria dessas características [30]. A técnica de plasma é um método físico que possibilita maior precisão, facilidade de controle do processo, e não somente é capaz de promover a hidrofilicidade de uma superfície, como também introduz grupos funcionais específicos; além disso, o plasma é uma técnica ambientalmente amigável [110].

Desta maneira, a modificação de superfícies poliméricas por um plasma se mostra uma técnica promissora, pois permite transformar a morfologia em escala nanométrica (normalmente na ordem de no máximo 10 nm), as propriedades superficiais e a estrutura química do polímero, tudo isso sem alterar suas propriedades macroscópicas, tais como a maleabilidade e resistência [30].

A formação do plasma acontece sob condições controladas, em que um gás é acionado dentro de uma câmara de baixa pressão, com o fornecimento contínuo de energia a esse sistema transformando-o a nível subatômico. Para que o plasma seja formado, é necessário que a energia cinética do gás exceda sua energia de ionização [110, 111].

Dessa maneira, o fornecimento de energia de alta frequência (radiofrequência, micro-ondas ou ultravioleta) faz com que a energia cinética devido ao movimento desordenado ocasione colisões que permitem a remoção de elétrons dos átomos, dando origem a uma mistura de elétrons, íons, radicais e moléculas neutras, sendo justamente essa mistura de espécies reativas o que passa a interagir com a superfície alvo [110, 111].

Nestas condições, o plasma possui energia cinética suficientemente elevada para quebrar as ligações covalentes de uma superfície e iniciar reações químicas [112]. As principais reações que podem ocorrer na superfície polimérica são a ablação (remoção de contaminantes), a ativação superficial (adição, substituição ou a formação de grupos funcionais), deposição, reticulação ou enxerto [113]. A eficiência de cada um desses processos depende da atmosfera, da composição do gás e da pressão utilizada, da temperatura, do tipo de superfície do polímero, potência e o tempo de ação do plasma. Na Fig. 17 é apresentado um resumo do que acontece no processo de modificação de superfície pela exposição a um plasma.

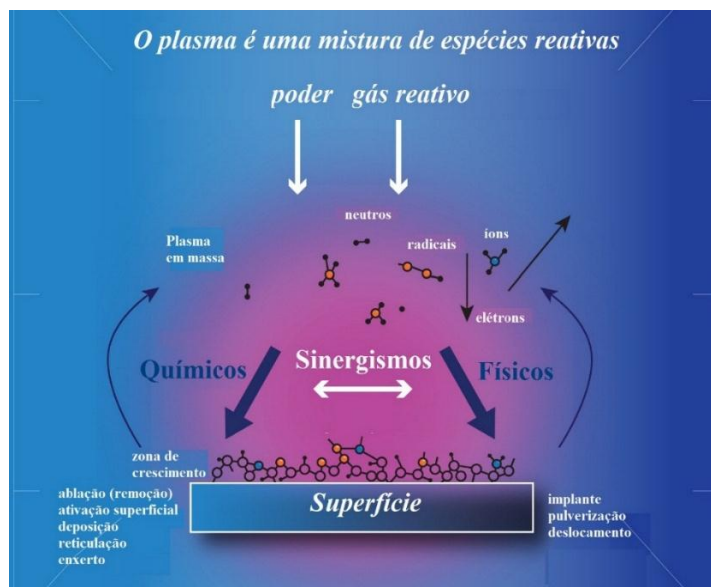


Figura 17 - Representação da interação de um plasma com uma superfície e os processos que podem acontecer decorrentes deste tratamento. Adaptado da Ref. [111].

As superfícies poliméricas podem adquirir um caráter hidrofílico ou hidrofóbico, a depender da composição do gás usado. No procedimento de ativação superficial, o plasma leva à modificação da superfície pela criação de grupos químicos funcionais pela ação de gases plasmáticos, como o oxigênio, o hidrogênio, o nitrogênio e a amônia, ou seja, gases ionizados que reagem com a superfície de interesse, tornando-a hidrofílica e reativa [112, 113].

A ativação da superfície de um polímero envolve a substituição de alguns átomos ou grupos poliméricos pelos grupos químicos do gás de plasma. Esse procedimento altera a atividade química e física da superfície polimérica, tais como sua reatividade, afinidade, e molhabilidade, promovendo uma melhor adesão e capacidade de adsorção de moléculas de interesse [113]. Por exemplo, quando utilizamos um plasma de oxigênio ou plasma de ar, um processo de oxidação irá acontecer na superfície, fazendo a quebra das ligações fracas do polímero e as substituindo por grupos carbonilo, carboxilo e hidroxilo, que são altamente reativos.

Em aplicações biotecnológicas, em geral, é requerido que um material possua biocompatibilidade com moléculas de interesse. Quando um material é não reativo, um plasma de ar pode modificá-lo de modo a atingir esse objetivo, e isso pode ser conseguido através da introdução das espécies químicas reativas como, por exemplo, grupos amino ($-NH_2$), carboxílicos ($-COOH$) e hidroxilas ($-OH$) [66].

Neste trabalho, nós mostramos a relação direta entre as propriedades obtidas da funcionalização da superfície das membranas de PS pela exposição a um plasma de ar, tornando-as compatíveis para adsorção de moléculas de proteínas, ao invés da utilização dos métodos químicos convencionais para a imobilização de biomoléculas. Por meio das técnicas de caracterização que serão descritas a seguir, nós investigamos as mudanças nas propriedades morfológicas, químicas, a formação de grupos carboxílicos e a molhabilidade das membranas de PS.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que possibilita tornar visível ao olho humano estruturas com dimensões muito pequenas. Um equipamento de MEV é capaz de produzir imagens de uma superfície com alta ampliação (de até 300.000 vezes, a depender do tipo de equipamento utilizado) e excelente resolução, o que permite conhecer em seus mínimos detalhes a morfologia e a topografia da amostra que está sendo investigada [114].

Esta técnica é útil para a análise de todos os tipos de materiais (polímeros, metais e cerâmicos) e de amostras biológicas [115], sendo utilizada por cientistas de materiais, químicos, biólogos, físicos ou engenheiros. Por meio da observação e da análise de imagens de MEV é possível conhecer melhor as correspondentes propriedades microestruturais, inclusive a presença ou não de possíveis defeitos. Quando a esse equipamento se acopla um acessório de Espectroscopia de Raios-X por Dispersão em Energia (EDS), também é possível determinar qualitativamente a composição química do material [114].

Na Fig. 18 podem ser observados os elementos básicos que compõem um MEV. Este equipamento consiste em uma coluna óptico-eletrônica que possui um sistema de vácuo. Na parte superior desta coluna existe um filamento de tungstênio (cátodo) por onde é emitido um feixe de elétrons com alta intensidade. O filamento de tungstênio é aquecido resistivamente por uma voltagem que pode variar entre 200 V e 30 kV, sendo o feixe de elétrons então acelerado através de um ânodo, e em seguida focalizado por uma ou duas lentes condensadoras. O feixe é então direcionado através de um conjunto de bobinas de varredura e placas de deflexão na coluna do microscópio. As lentes objetivas defletem o feixe horizontal e verticalmente para que ele realize a varredura em uma área retangular da superfície da amostra que está fixada em um suporte (*stub*) acoplado a um porta-amostra na parte inferior da coluna, ao qual um fio terra está conectado [114].

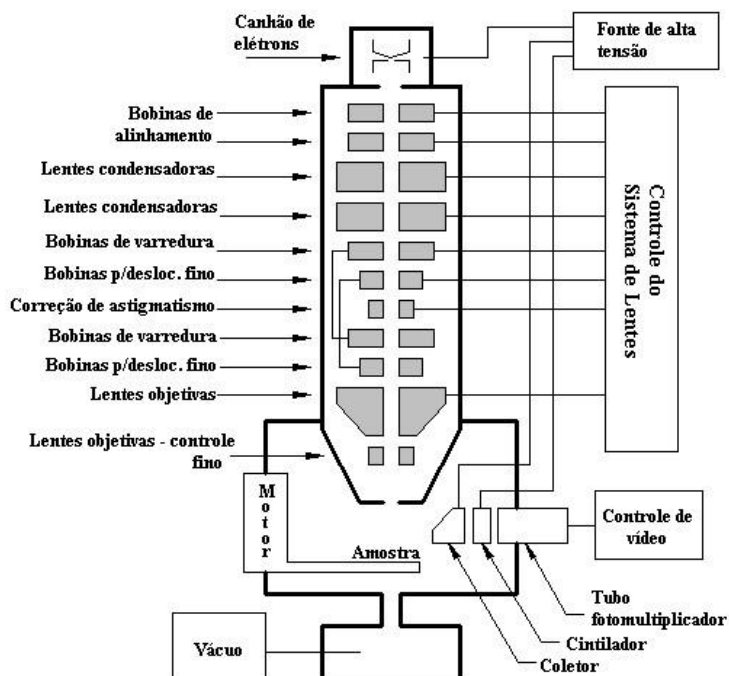


Figura 18 - Representação dos elementos de um MEV. Adaptado da Ref. [116]

Quando finalmente o feixe interage com a amostra, os elétrons perdem energia por dispersão e absorção. Dessa maneira, a superfície da amostra pode interagir com os elétrons secundários (com energia inferior a 50 eV, do que resultam imagens com resolução entre 3-5 nm), dos elétrons retroespalhados (com energia superior a 50 eV), dos elétrons transmitidos, dos elétrons absorvidos ou dos elétrons Auger (até 2 keV) e de Raios-X. Um detector recolhe o sinal gerado pelo MEV e transforma em uma imagem que pode ser visualizada em um computador. A qualidade da imagem gerada pelo MEV depende dos parâmetros do feixe de elétrons utilizado em sua aquisição, como por exemplo, o tamanho do foco, ângulo de abertura e a tensão aceleradora [114].

A preparação da amostra a ser caracterizada pelo MEV é importante. Quando a amostra não é condutora, ela deve ser revestida por uma fina camada metálica para que não acumule cargas negativas, pois isso faria com que o feixe de elétrons fosse repelido, impedindo a aquisição de uma boa imagem de MEV. Sendo assim, a metalização se faz necessária para conduzir os elétrons ao fio terra que está conectado ao porta-amostras. A camada metálica depositada pode ser de ouro, ouro/paládio, platina, tungstênio, grafite, dentre outros materiais. Essa camada metálica deve possuir uma composição que difira do material a ser analisado. Atualmente já existem alguns microscópios que dispensam a etapa de metalização das amostras [114, 117].

Neste trabalho, a técnica de MEV foi importante para investigar a morfologia e a superfície das membranas poliestireno obtidas pela eletrofição e aquelas que foram expostas aos diferentes tempos de exposição ao plasma. Com a ajuda de um *software* específico, nós analisamos cada uma das imagens que foram adquiridas pelo MEV, o que nos permitiu estimar o diâmetro das fibras das nossas membranas.

3.6 Espectroscopia no Ultravioleta Visível

A espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica robusta que permite medir a absorção de radiação eletromagnética pelos materiais ou moléculas na região do ultravioleta (190-400 nm) e do visível (400-800 nm). Ao absorver energia as moléculas passam por níveis de transição eletrônica, fazendo com que os elétrons do estado fundamental (nível de energia mais baixo) saltem para um estado excitado (nível de energia mais alto), quando o elétron retorna para ao seu nível original, ocorre a emissão da radiação em comprimento de onda característico. Esse fenômeno de transição dos níveis de energia é mais observado em moléculas conjugadas (com ligações duplas) e em átomos com elétrons não ligantes [115].

As moléculas capazes de absorver energia são denominadas cromóforos. Na Fig. 19, observamos os níveis de energia dos orbitais moleculares e as transições eletrônicas possíveis para cada um deles.

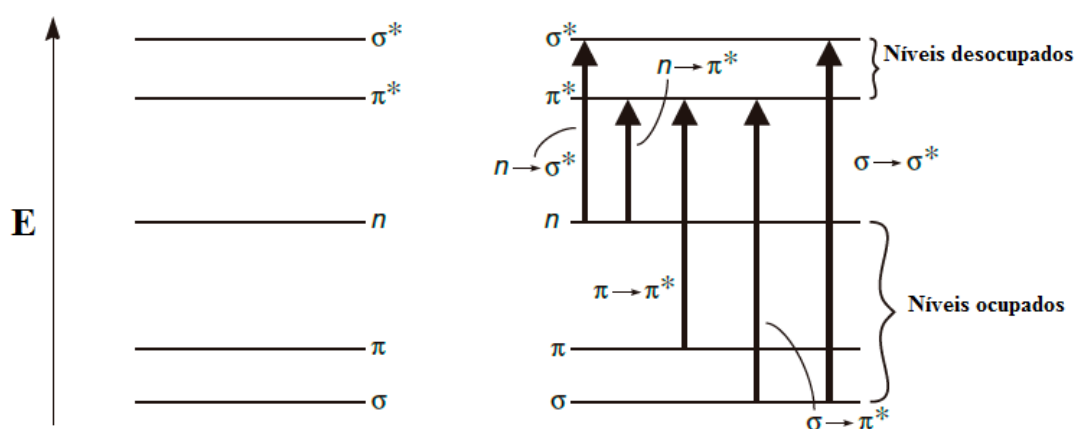


Figura 19 - Representação dos níveis de energia dos orbitais ligantes (π e σ), não ligantes (n) e anti-ligantes (π^* e σ^*) e seus possíveis níveis de transição eletrônica. Adaptado da Ref. [118].

A técnica de UV-Vis utiliza um equipamento denominado de espectrofotômetro, que é constituído basicamente por uma fonte de luz, um monocromador e um detector. A fonte de luz possui a propriedade de emitir a radiação eletromagnética, e normalmente são utilizados dois tipos de lâmpada, uma de deutério que emite na região UV e uma de tungstênio, responsável por emitir na região do VIS [118].

O monocromador possui uma rede de difração, e sua função é realizar a separação do feixe de luz nos comprimentos de onda dos componentes. Ele possui um sistema de fendas que focaliza no comprimento de onda desejado na amostra através de uma cubeta. A intensidade da luz que atravessa a amostra é então detectada e ampliada por um fotomultiplicador [115]. A resposta dessa medida, é obtida em termos de absorção da amostra *versus* o comprimento de onda na região selecionada para a medida no UV ou VIS.

A concentração de uma solução pode ser medida a partir do valor da absorbância (A) pela equação conhecida como Lei de Beer-Lambert, que pode ser escrita como:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

em que A é a absorbância medida, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar, c é a concentração da solução e l é o comprimento óptico.

A espectroscopia UV-VIS é um método não destrutivo que permite medir a concentração de uma amostra biológica (DNA ou proteínas) e de maneira qualitativa analisar a estrutura nativa das suas moléculas. As proteínas absorvem na região do UV com comprimento entre 275 e 280 nm, que se deve em maior parte aos aminoácidos aromáticos triptofano (280 nm), tirosina (275 nm) e fenilalanina (258 nm) e em menor parte as cisteínas (260 nm, das ligações dissulfureto). Alterações no tipo solvente e dobramento das proteínas podem deslocar os pico para 290-300 nm, indicando alterações na estrutura nativa da molécula [115].

Utilizamos a espectroscopia de UV-VIS para analisar a concentração de todas as soluções de proteína BSA antes e após os experimentos de adsorção/dessorção pelas nossas membranas. Neste trabalho, foi usado um UV-VIS específico para medir a concentração de amostras biológicas.

3.7 Eletroforese

A técnica de eletroforese em gel é de bastante relevância para a análise de amostras biológicas de ácidos nucleicos (DNA e RNA), glicanos e as proteínas [119]. Em particular, para amostras de proteínas, ela se faz conveniente não somente para a identificação das proteínas distintas presentes em uma mistura, como também para realizar a separação dessas moléculas de acordo com o seu peso molecular; além disso, ela pode também fornecer informações qualitativas sobre a estrutura nativa da molécula.

Dois importantes pesquisadores são reconhecidos como os pioneiros no procedimento de eletroforese: Michaelis, que em 1909 foi o responsável por introduzir o termo eletroforese, quando se referiu ao movimento de coloides sob a influência de um campo elétrico. Mais tarde, em 1937, Arne Tiselius, investigou a migração de moléculas carregadas como um método de separação, no que veio a ser denominado de eletroforese em campo livre. Em 1948, ele recebeu o prêmio Nobel de química por suas importantes contribuições pelo uso desse método para a identificação dos componentes albumina e α -, β - e γ - globulina presentes no plasma sanguíneo [119, 120].

Embora a eletroforese em campo livre não seja atualmente utilizada devido às suas inerentes limitações (como a instabilidade do equipamento e os efeitos de difusão e aquecimento ocasionados pelo campo elétrico, que prejudicam a separação das moléculas de interesse), ela em muito contribuiu para embasar o desenvolvimento das técnicas eletroforéticas que utilizam um suporte (tais como gel ou papel), para conter a migração das moléculas, minimizando dessa maneira os efeitos de difusão [119, 120].

Atualmente, os principais tipos de eletroforese utilizados para a análise de amostras biológicas utilizam géis de suporte para conter a migração das moléculas, que geralmente apresentam em sua composição a agarose ou a poliacrilamida. Para a análise de proteínas, a metodologia empregada é a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Na Fig. 20 está representada a reação química de copolimerização para a formação deste gel, onde através da união da acrilamida com o N, N-metilenobisacrilamida (bis-acrilamida), na presença do oxidante persulfato de amônio (APS) e do catalisador tetrametilenodiamina (TEMED) acontece sua polimerização. O gel é polimerizado entre duas placas de vidro, do que resulta um gel poroso. O tamanho dos poros do gel é controlado pela concentração de acrilamida/bis-acrilamida utilizada em sua preparação [95].

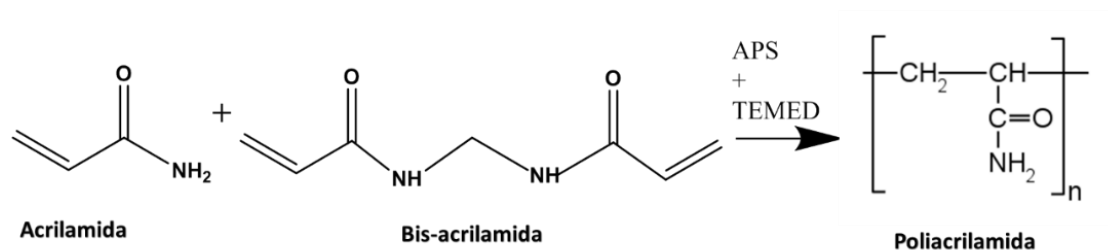


Figura 20 - Reação de polimerização para a formação do gel de poliacrilamida.

A eletroforese pode ser realizada sob condições desnaturantes e redutoras (PAGE-SDS) ou nativo (PAGE-NATIVO).

O PAGE-SDS é utilizado para determinar de maneira qualitativa as massas moleculares de proteínas em uma amostra. Nesse procedimento, as proteínas são desnaturadas com um detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) e utiliza-se o mercaptoetanol (agente redutor) para romper as ligações fortes de dissulfeto que mantêm a estrutura nativa da proteína. Já o PAGE-NATIVO é usado quando o objetivo é separar as proteínas presentes em uma amostra de acordo com a carga líquida da molécula em seu estado nativo e seu tamanho molecular, para analisar a qualidade da proteína [95, 121].

A configuração experimental usada para a eletroforese de proteínas (Fig. 21) consiste em uma cuba na posição vertical, onde está acoplado o gel de eletroforese. As amostras de proteínas são colocadas dentro dos poços (espaços formados no gel com um “pente”). Quando é aplicada a voltagem sobre o gel, as proteínas irão migrar de acordo com suas cargas e tamanhos [95, 121].

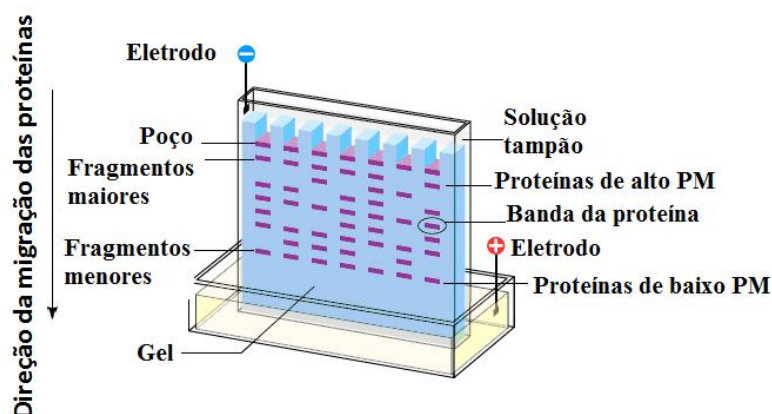


Figura 21 - Esquema da separação em um gel de eletroforese de poliacrilamida. Adaptado da Ref. [121].

O princípio de funcionamento da eletroforese é baseado na aplicação de um campo elétrico sobre as biomoléculas que estão dissolvidas em uma solução tampão com pH adequado, para que essas moléculas então adquiram carga elétrica e migrem em direção a um eletrodo de carga oposta à que as moléculas carregam. Como cada proteína tem seu peso molecular característico, elas irão migrar com diferentes velocidades, podendo então ser separadas em diferentes fragmentos que são únicos [121].

Geralmente é utilizada uma solução tampão com pH básico (tampão de corrida), para que as moléculas da proteína adquiram carga elétrica negativa e migrem em direção ao eletrodo positivo. Quanto maior o peso molecular da proteína, mais lenta será essa migração, de tal modo que em geral as moléculas pequenas migram rapidamente e terminam por serem encontradas na parte inferior do gel de eletroforese, enquanto as moléculas grandes se posicionam na parte superior do gel [121].

Normalmente, o corante Azul de Comassie é adicionado à amostra a ser analisada. Ele atua como um corante de rastreio para que essa amostra possa ser acompanhada durante sua corrida no gel. Posteriormente, o gel é corado com o Azul de Comassie e em seguida descolorido com uma solução ácida, para que se torne possível identificar no gel de eletroforese as bandas correspondentes aos pesos moleculares das proteínas sob análise.

A utilização da técnica de PAGE-NATIVO foi importante para este trabalho, pois através dela foi possível acompanhar a qualidade da proteína BSA em cada uma das etapas do procedimento de adsorção/dessorção pelas membranas nanoestruturadas de poliestireno. No próximo capítulo, detalharemos os materiais e as metodologias usadas, que foram separadas em duas partes: a preparação e caracterização das membranas de poliestireno, e sua aplicação em colunas de separação para adsorção de BSA.

4

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção descreveremos os reagentes, materiais e equipamentos utilizados, bem como as caracterizações e metodologias que foram adotadas tanto para a preparação de MNPS através da técnica de eletrofiação, e sua posterior modificação pelo tratamento com plasma de ar, quanto para a aplicação dessas membranas como um adsorvente para a extração de proteínas dissolvidas em meio aquoso.

4.1 Reagentes

Para a preparação das MNPS foi usado PS de alto peso molecular (M_w 280.000 (GPC); T_g 100,0 °C), obtido da Sigma-Aldrich (EUA), e dimetilformamida (DMF), adquirido da empresa brasileira Dinâmica.

4.2 Produção das MNPS

Durante este trabalho, produzimos MNPS de acordo com um protocolo anteriormente desenvolvido no grupo de Polímeros Não-Convencionais (PNC) da UFPE [35]. Para isso, preparamos uma solução pela dissolução de 2 g de PS em 10 mL de DMF, que foi submetida a agitação e aquecimento (80 °C) em uma chapa aquecedora, por um período de 12 h. Um volume de 2 mL desta solução, com uma concentração de 20% em peso, foi transferido para uma seringa de 3 mL.

As membranas de PS foram produzidas através de um sistema de eletrofiação dotado de uma fonte de alta tensão de 17 kV. No procedimento, a seringa foi fixada a uma bomba, com a taxa do fluxo mantida em 0,5 mL.h⁻¹, o que permitiu um bom controle da passagem da solução até o coletor. Mantivemos a agulha da seringa a uma distância de 15 cm do coletor das membranas, que foi recoberto por uma folha de alumínio, onde as fibras eram depositadas ao longo do processo. Esse procedimento encontra-se esquematizado na Fig. 22.

A membrana de PS obtida foi então deixada secar em temperatura ambiente por um período de 24 h. Posteriormente, realizamos um tratamento térmico-mecânico para

compactar as fibras e melhorar as suas propriedades mecânicas. Para isso essa membrana de PS foi recoberta com uma folha de alumínio e então inserida dentro de uma estufa sob aquecimento a 80 °C, e foi colocado sobre ela um peso equivalente a 2 kg, esse procedimento foi realizado durante 24 h.

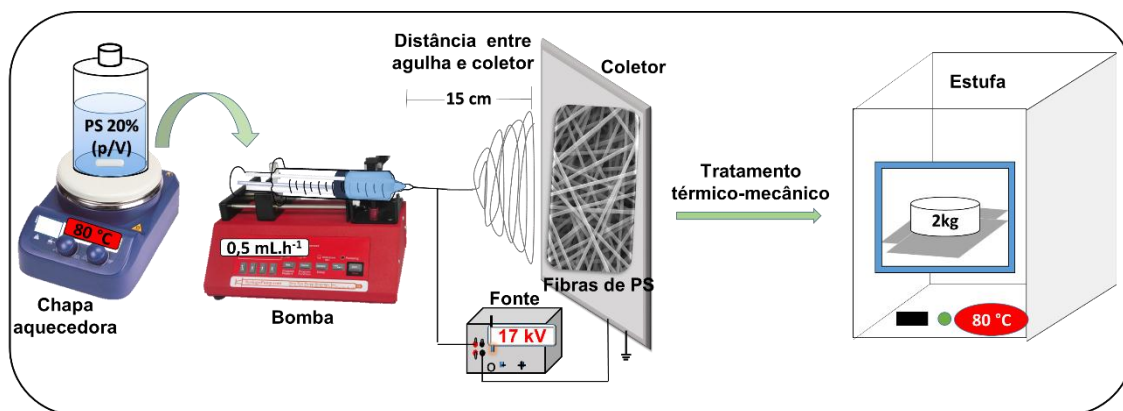


Figura 22 - Esquema da produção de fibras de PS através do sistema de eletrofiação.

4.3 Modificação da superfície das MNPS

Nós estudamos o efeito do tratamento de um plasma de ar sobre a superfície das MNPS, quando examinamos sua influência na composição química, porosidade e diâmetro das fibras. A modificação foi realizada colocando as MNPS dentro de um equipamento de plasma de ar operado por radiofrequência (PDC-002 Harrick, EUA). As MNPS foram submetidas a diferentes tempos de exposição (0, 1, 3, 5, 8, 14, 17 e 20 minutos) ao plasma e posteriormente caracterizadas, para obter informações sobre suas propriedades tais como composição química, morfologia e molhabilidade (Fig. 23).

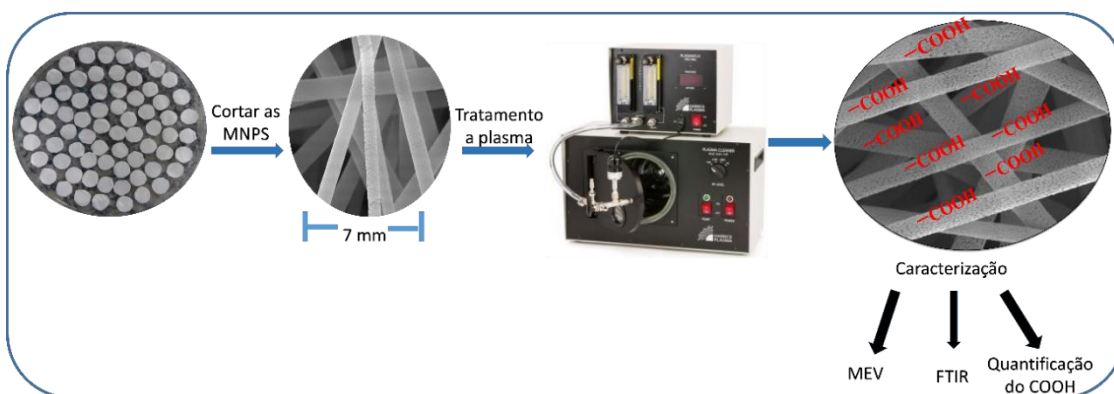


Figura 23 - Esquema de modificação da superfície das MNPS pelo plasma e as caracterizações para estudar as propriedades dessas membranas.

4.4 Caracterização das MNPS

4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Realizamos a caracterização morfológica das MNPS ao longo das diversas etapas de sua preparação, examinando amostras obtidas após o processo de eletrofiação, depois do tratamento térmico e após as modificações pelo plasma de ar. As características superficiais das MNPS, como o diâmetro de suas fibras e sua porosidade, foram estudadas através da análise das micrografias obtidas com o uso de um MEV Quanta 450-FEG (FEI, EUA), da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC). Uma tensão aceleradora de 15,00 kV foi adotada para a obtenção das micrografias com ampliações de 5000, 15000 e 50000 X. As amostras a serem analisadas foram previamente colocadas sobre fita de carbono aderida a um suporte (“*stub*”), sendo as amostras recobertas por uma fina camada de ouro para torná-las condutoras.

Por meio da análise das micrografias obtidas em 5000 X, nós calculamos o diâmetro médio das fibras através da medição de 80 fibras utilizando o *software* ImageJ (disponível gratuitamente para *download* no site <https://imagej.net/Welcome>). A espessura das membranas foi determinada com a utilização de um micrômetro digital.

4.4.2 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Analizamos a composição química das MNPS por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para a obtenção dos espectros, utilizamos o equipamento FTIR modelo IRTracer-100 (Shimadzu, Japão) localizado no Laboratório PNC, com uma janela de 4000-400 cm^{-1} . As amostras para análise de FTIR foram preparadas macerando-se 0,5 mg de membrana com 50 mg de Brometo de Potássio (KBr). A mistura macerada de MNPS e KBr foi colocada em uma prensa hidráulica de 2 tons (ou seja, um procedimento que equivalente a prensar a pastilha com um peso de 2000 kg), durante 10 minutos.

4.4.3 Quantificação dos ácidos carboxílicos originados nas MNPS

Uma maneira de quantificar grupos negativamente carregados em substratos sólidos é pelo método do corante TBO, que tem sido amplamente empregado para o caso de membranas poliméricas [122, 123]. O TBO é um composto catiônico que tem

afinidade eletrostática por substratos dotados de grupos carregados negativamente, e cuja presença pode ser facilmente detectada por sua característica da absorção de luz na região do azul [124]. Esse método foi empregado para examinar os ácidos carboxílicos gerados na superfície das nossas MNPS pela exposição durante diferentes intervalos de tempos ao plasma de ar. Nós quantificamos o número de grupos de ácidos carboxílicos desprotonados existentes nas MNPS por meio dessa interação com TBO. O método em questão consiste em permitir a interação do material de estudo com o corante TBO em meio básico por um tempo suficiente para que seja atingido o equilíbrio de adsorção. Preparamos inicialmente uma curva de calibração das concentrações conhecidas de TBO, a partir da densidade óptica a 633 nm, com o uso de um espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Japão). Conforme resumido no esquema mostrado na Fig. 24, o procedimento de adsorção para o corante foi realizado colocando-se as MNPS cortadas em círculos de 7 mm de diâmetro dentro de tubos *ependorf* contendo 2 mL de uma solução aquosa de TBO (0,5 mM), que foi ajustada para o pH 10,0 com NaOH. A interação das MNPS com o TBO foi deixada ocorrer durante 5 h, com os tubos *ependorf* sendo colocados em um agitador orbital a 250 rpm. Após a interação, as MNPS foram lavadas com NaOH (pH 10,0) para remover as moléculas de corante não ligadas. Em seguida, realizamos a dessorção do TBO ligado às MNPS, utilizando 2 mL de uma solução de ácido acético (50%, p/v) durante 20 minutos. A quantidade de TBO dessorvido das MNPS em meio de ácido acético foi calculada pela técnica de UV-Vis, com base na medida da intensidade de absorção óptica da solução em 633 nm. A quantificação dos ácidos carboxílicos nas MNPS foi medida considerando que 1 mol de TBO reage com 1 mol de ácido carboxílico [125].

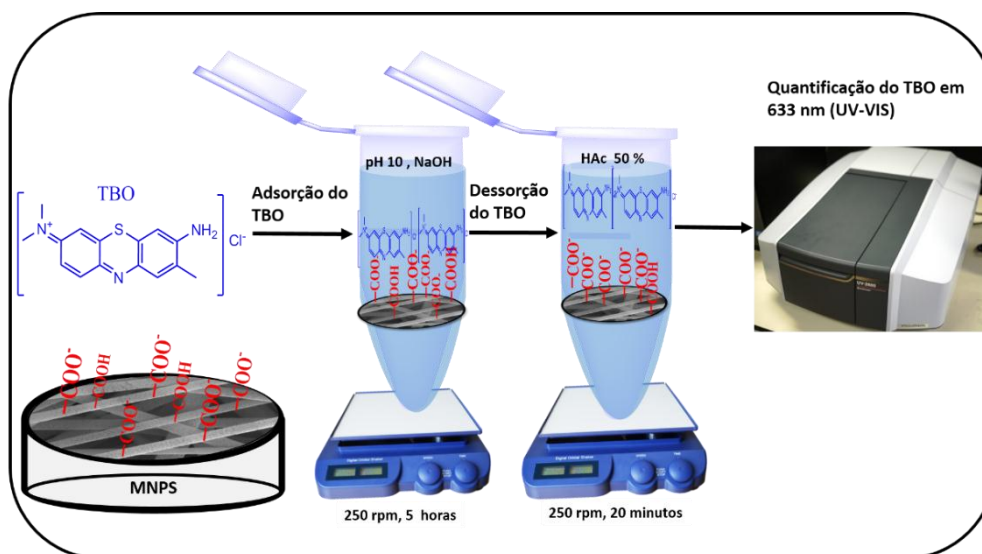


Figura 24 - Esquema da quantificação do número de grupos COOH existentes nas MNPS.

4.4.4 Ângulo de contato

Utilizamos o ângulo de contato para determinar a molhabilidade das MNPS após sua produção e tratamento térmico, bem como após modificação pelo plasma de ar com diferentes tempos de tratamento (0-20 min). As medidas de ângulo de contato foram realizadas em triplicata, e os resultados mostrados nesta dissertação correspondem à média dos dados obtidos. O ângulo de gotículas de água sobre as MNPS foi medido por um ângulo de contato do modelo CAM 100 (KSV, Finlândia) mostrado na Fig. 25

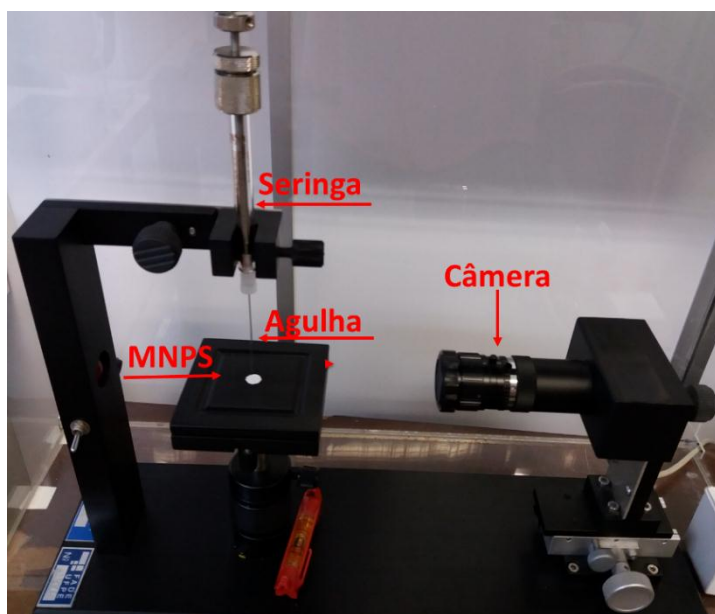


Figura 25 - Equipamento utilizado para medir o ângulo de contato da água com as MNPS.

4.5 Utilização das MNPS na adsorção de proteína BSA

4.5.1 Reagentes

Para os experimentos de adsorção de proteína, a BSA (*Sigma-Aldrich, EUA*) foi usada como proteína modelo. As soluções tampão foram preparadas a partir dos seguintes reagentes: fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4), adquiridos da Nuclear (Brasil). O hidróxido de sódio (NaOH) em pérolas, o ácido clorídrico (HCl) e o acetato de sódio (NaAc) foram obtidos da Química Moderna (Brasil). O ácido acético (AcH , Dinâmica, Brasil). A pureza da glicina (Gli; Promega, EUA) era de grau de biologia molecular. Todas as soluções usadas nos experimentos foram preparadas utilizando água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25°C) obtida através de um sistema Milli-Q da *Millipore* (EUA).

Para a preparação dos experimentos de eletroforese em gel nativo de poli(acrilamida) (PAGE nativo) e das amostras a serem analisadas por essa técnica, utilizamos acrilamida/Bis (30% T, 2,67% C), persulfato de amônio (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED, utilizado como catalisador na formação dos géis), azul de Bromofenol (um corante de rastreio para monitorar a corrida das amostras), azul brilhante de Comassie R-250 (solução de coloração para o gel), tris[hidroximetil]aminometano (Tris base), padrão de proteínas para eletroforese (amostra com pesos moleculares conhecidos), tendo todos estes reagentes sido adquiridos da BioRad (EUA).

4.5.2 Caracterização

4.5.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

Examinamos a composição química das MNPS após o processo de adsorção da proteína BSA. Com o objetivo de identificar a presença dos grupos químicos característicos da proteína nas MNPS, comparamos os espectros da proteína BSA pura e da MNPS após o processo de adsorção. A preparação das amostras de MNPS tratada por 14 min de plasma e MNPS (14 min de plasma)/BSA foi realizada por sua maceração com 50 mg de KBr, e colocando a mistura em uma prensa hidráulica de dois tons, durante 10 min. Os espectros de FTIR foram obtidos em um IRTracer-100 (*Shimadzu*, Japão) dotado de uma janela de trabalho de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

4.5.2.2 *Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível*

A técnica de UV-VIS foi utilizada para analisar as soluções de proteína ao longo de cada etapa do processo (adsorção, lavagem, eluição). A quantidade de BSA adsorvida nas MNPS foi calculada a partir da mudança na concentração inicial de solução de proteína BSA e, após os experimentos de adsorção. Após cada etapa, as soluções de BSA foram analisadas pelo uso de um espectrofotômetro de UV-Vis do modelo NanoDrop™ 2000 (*Thermo Fischer Scientific*, EUA), com a determinação da absorção óptica dessas soluções em 280 nm. Os espectros de absorção de UV-VIS encontram-se ao final desta dissertação, nos APÊNDICES A.1, A.2 e A.3.

4.5.2.3 *Potencial zeta*

Realizamos medidas de potencial zeta (potential ζ), com o intuito de examinar a carga das proteínas BSA em função da solução tampão e do pH do meio utilizados, de modo a conseguir uma melhor compreensão dos resultados obtidos no processo de adsorção entre MNPS/BSA. Para isso, diluímos a BSA em faixa de pH (3,0-9,0), em uma proporção de 1:1 em cada solução tampão, com concentração final de 0,6 mg.mL⁻¹. A carga das proteínas dissolvidas nas soluções tampão de estudo foi então investigada por meio da técnica de potential ζ , com o uso do equipamento Zetasizer NANO-2590 (Malvern Instrument, Reino Unido).

4.6 Experimentos de adsorção

Os experimentos para a adsorção de proteína BSA pelas MNPS foram realizados investigando alguns dos parâmetros que podem influenciar a capacidade de adsorção desses substratos. Assim, examinamos a influência do pH e a concentração da solução de proteína sobre a capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS. Além disso, investigamos também qual a influência da modificação da superfície das MNPS pela técnica de plasma de Ar sobre sua capacidade de adsorção de BSA.

O percentual de proteína adsorvido pelas MNPS foi calculado por meio da equação:

$$\% \text{ Adsorção} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100, \quad (1) \quad \text{onde:}$$

C_0 = concentração inicial da solução de proteína BSA

C_f = concentração final da solução de proteína BSA, após o processo de adsorção.

4.6.1 Influência do pH da proteína BSA sobre a capacidade de adsorção pela MNPS

Para otimizar as melhores condições de adsorção da proteína, inicialmente examinamos a influência do pH do meio. Para este estudo, as MNPS foram expostas ao tratamento por plasma de ar, durante 5 min. Essas MNPS, previamente cortadas em formato circular com diâmetro de 7 mm, foram dispostas em 4 camadas dentro de uma coluna de centrifugação (coluna spin). Lavamos essas MNPS duas vezes com um volume de 250 μL de água deionizada, passando por uma centrífuga (NanoSpin Plus, Loccus, Brasil, Fig. 26) a 5000 rpm durante 1 min, um procedimento que foi realizado antes de cada experimento de adsorção. Em seguida, um volume de 500 μL de proteína BSA ($0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$) preparada em solução tampão foi passado através da coluna spin, a 5000 rpm por 1 min, durante cinco ciclos de adsorção, correspondendo a um total de 5 min de interação com as MNPS. As soluções de proteína antes e após interação com as MNPS foram acompanhadas através da espectroscopia UV-VIS; os dados apresentados neste trabalho correspondem aos resultados do 5º ciclo de adsorção. Para estes experimentos, uma solução estoque de proteína BSA foi preparada na concentração de $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$, e somente no momento imediatamente anterior ao início do experimento de adsorção é que essa solução foi então diluída na proporção de 1:1 com uma solução tampão.

As soluções de proteína BSA/tampão foram preparadas em diferentes meios:

- Gli 0,1M-HCl 0,2 M (pH 3,0)
- AcH 2M –NaAc 2 M (pH 4,0-5,0)
- NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M (pH 6,0-8,0)
- Glicina 0,2 M- NaOH 0,2 M (pH 9,0)

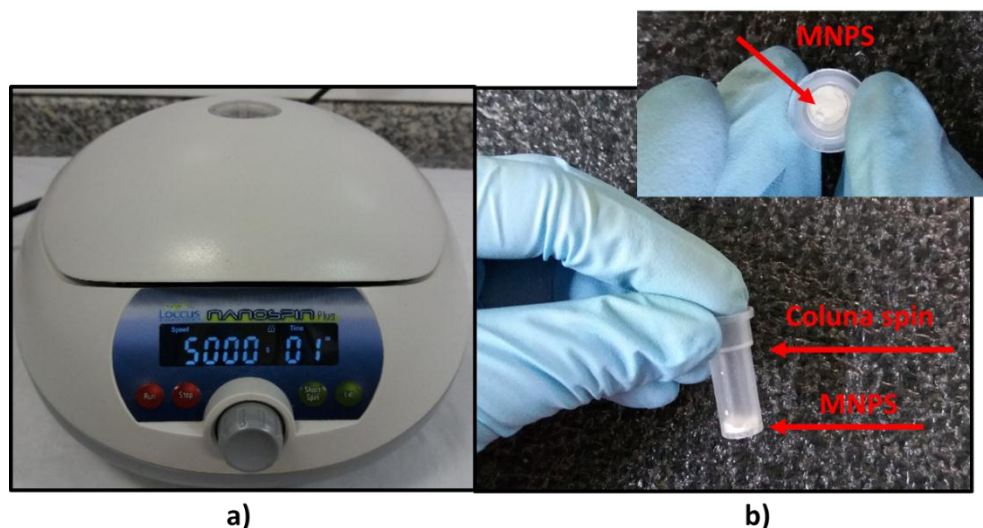


Figura 26 - Imagem digital em a) centrífuga utilizada para o procedimento de coluna spin, e b) coluna spin com as MNPS.

4.6.2 Efeito do tempo de exposição ao plasma ar sobre a capacidade de adsorção da proteína BSA pelas MNPS

O objetivo deste estudo foi o de examinar o efeito da modificação da superfície das MNPS sobre a capacidade de adsorção da proteína BSA. Essas MNPS foram expostas ao plasma de ar com tempos que correspondem a 0, 1, 3, 5, 8, 14, 17 e 20 min, respectivamente. A preparação da coluna spin seguiu o procedimento descrito na seção anterior. Neste estudo, assim como nos posteriores, as soluções de proteína BSA foram preparadas em solução tampão de AcH-NaAc 2 M (pH 5,0).

4.6.3 Capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS

Examinamos o efeito da concentração de proteína BSA sobre a capacidade de adsorção das MNPS. Para este estudo, uma solução estoque de proteína BSA foi diluída nas demais concentrações de interesse (0,6, 0,9, 1,2, 2,4 e 3,6 mg.mL⁻¹). A preparação da coluna spin foi aquela descrita na Seção 4.6.1.

A capacidade de adsorção pelas MNPS foi calculada através da equação

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{m} , \quad (2)$$

onde:

q_e = capacidade de adsorção no equilíbrio (mg.g⁻¹)

V = volume (mL) de solução utilizada no experimento

C_0 = concentração inicial de proteína BSA

C_e = concentração da solução de proteína BSA (mg.mL⁻¹) no equilíbrio

m = massa (g) de MNPS

4.6.4 Isotermas de adsorção

Com a finalidade de encontrar a isoterma de adsorção capaz de descrever de maneira satisfatória os fenômenos de adsorção envolvidos entre a proteína BSA e a superfície das MNPS, nós testamos a qualidade do ajuste de nossos dados experimentais para as isotermas de adsorção com os modelos das isotermas de Langmuir (Eq. 3) e Freundlich (Eq. 4), respectivamente.

Na equação que descreve o modelo de Langmuir

$$\frac{Ce}{qe} = \frac{1}{K_L \cdot q_{m\acute{a}x}} + \frac{Ce}{q_{m\acute{a}x}} \quad , \quad (3)$$

a capacidade de adsorção máxima ($q_{m\acute{a}x}$, mg/g) depende da concentração da solução em equilíbrio (Ce , mg/L), a massa de soluto adsorvida por unidade de massa adsorvente no equilíbrio (qe , mg/g), e a constante da isoterma de Langmuir (K_L , g/mg), enquanto que para o modelo de Freundlich

$$\log qe = \frac{1}{n} \log Ce + \log K_f \quad , \quad (4)$$

a isoterma é em função de dois parâmetros, a constante K_f e o expoente $\frac{1}{n}$. O termo K_f , corresponde ao valor teórico calculado para a capacidade máxima de adsorção de um material que se ajusta ao modelo Freundlich, e o valor n é qualitativamente relacionado com a distribuição de sítios no sólido. O termo $\log qe$ é o logaritmo da capacidade no

equilíbrio (q_e , mg/g), enquanto o $\log C_e$ é o logaritmo da concentração no equilíbrio (C_e , mg/L).

De um modo geral, enquanto a isoterma de Langmuir expressa um modelo segundo o qual a adsorção sobre uma superfície adsorvente ocorreria em um processo envolvendo a formação de uma monocamada, o modelo de Freundlich descreve uma adsorção baseada na formação de multicamadas [102].

4.7 Experimentos de dessorção

Após confirmar a presença da proteína adsorvida nas membranas de PS, seria interessante examinar como seria possível implementar sua dessorção, isto é, a eluição da proteína presente na membrana para um meio líquido. Baseados nos conhecimentos prévios do tipo de ligação existente entre a proteína BSA e nosso material de estudo, nos valem do incremento no pH e na força iônica do meio para realizar o rompimento das ligações eletrostáticas. Com essa finalidade, examinamos o efeito das soluções tampão básicas, variando não apenas as concentrações molares e o pH, mas também a concentração de NaCl no meio tamponado para melhorar o grau de eluição da proteína. Estudamos diferentes soluções com o objetivo de obter a melhor solução capaz de permitir a eluição da proteína BSA, enquanto mantendo sua estrutura nativa.

As soluções de eluição estudadas foram

- NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M (pH 8,0)
- Tris-EDTA (pH 8,0)
- 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8 e 10,0)
- Tris-Glicina (pH 10,0)
- 0,2 M Glicina - NaOH (pH 9,0 e 10,0)
- NaOH 0,01 M; 0,05 M; 0,1 M e 0,2 M (pH 10,0-13,0)

O percentual de BSA dessorvida foi calculado levando-se em consideração a quantidade de proteína adsorvida na MNPS e a concentração de proteína eluída presente na solução tampão, a partir da equação

$$\% \text{ Dessorção} = \frac{C_d}{C_a} \times 100 \quad , \quad (5)$$

onde:

C_d = quantidade de proteína eluída

$C_a = (C_i - C_f)$ é a concentração de proteína adsorvida, onde C_i e C_f correspondem a concentração inicial e final, respectivamente.

Na Fig. 27 o protocolo utilizado ao longo de todas as etapas dos experimentos por nós realizados é mostrado de maneira esquemática.

➤ **Etapas resumidas do protocolo otimizado de adsorção da proteína BSA:**

- Cortar as MNPS em círculos de 7 mm
- Tratar a superfície das membranas durante 14 minutos com um plasma de ar.
- Colocá-las dentro de uma coluna de centrifugação (coluna spin)
- Lavá-las duas vezes com 250 μ L de água deionizada (5000 rpm, 1 minuto cada lavagem).
- Preparar a solução de proteína BSA a ser adsorvida na proporção de 1:1 em solução tampão (AcH 2 M-NaAc 2 M, pH 5,0).
- Passar através da coluna spin 500 μ L da solução de proteína durante 5 ciclos de adsorção (5000 rpm, 1 min cada ciclo).
- Lavar as MNPS duas vezes com 250 μ L de água deionizada (5000 rpm, 1 min cada lavagem) para remover as proteínas não adsorvidas.

- Eluir as proteínas adsorvidas nas MNPS passando duas vezes através da coluna spin 125 μL de uma solução de eluição com pH básico, quando adicionar a solução aguardar 1 min antes de colocá-la na centrífuga (5000 rpm, 30 s cada eluição).

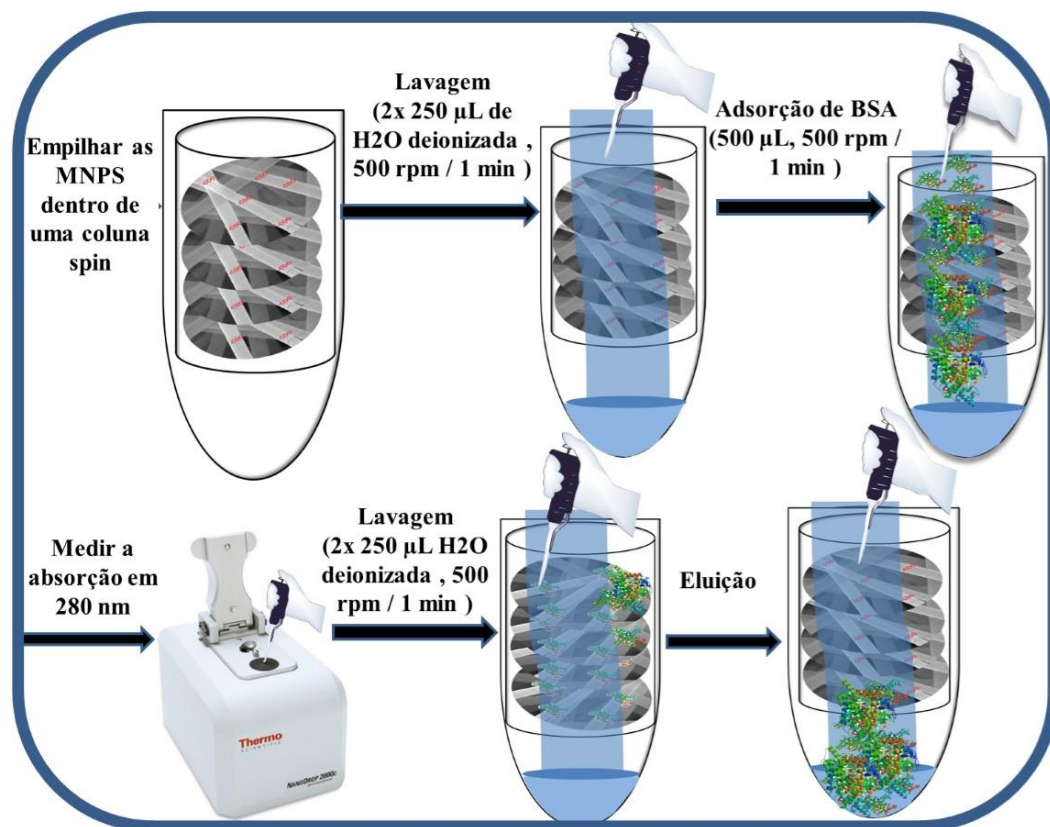


Figura 27 - Etapas do processo de adsorção/dessorção da proteína BSA pelas MNPS.

4.8 Eletroforese de proteínas

Nós utilizamos a eletroforese de proteínas para acompanhar cada etapa do procedimento de adsorção e eluição da BSA, com a finalidade de examinar a qualidade das moléculas da proteína após sua adsorção pelas MNPS. Para isso, fizemos uso da técnica de eletroforese em gel nativo de poliacrilamida nativa (PAGE-NATIVO) [121], ou seja, na ausência do agente desnaturante. Tanto as amostras de BSA controle, quanto aquelas de BSA obtidas após os experimentos de interação com as MNPS e após o processo de eluição, foram submetidas ao processo de PAGE-NATIVO.

O protocolo seguido para a preparação dos géis e do experimento de eletroforese foi de acordo com aquele disponibilizado pela *Bio-Rad* (EUA), que pode ser encontrado no manual em formato PDF no site <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf> [126], com ajustes para volumes menores de solução e géis de eletroforese. Todos os reagentes usados nestes experimentos foram obtidos da Bio-Rad, e são descritos na Seção 4.5.1.

➤ Protocolo para o experimento de eletroforese PAGE-NATIVO

- No dia anterior ao experimento, preparar todas as soluções tampão necessárias a serem utilizadas para a preparação das amostras e géis de eletroforese, e armazená-las na geladeira. A seguir demonstramos os reagentes e quantidades necessárias para preparar cada solução.

Preparar 120 mL de Tris base-Glicina, em seguida diluir 100 mL deste tampão para 900 mL de água deionizada (H₂O).

Tampão de corrida pH 8,3	
Tris base	3,64 g
Glicina	17,30 g

Diluir Tris base em 26,65 mL de H₂O, ajustar o pH desta solução para 8,8 com HCl 6 N. Em seguida, completar para 50,0 mL. Esta solução tampão será utilizada na preparação do gel (10%) de corrida.

Tampão 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	
Tris base	3,0 g
H ₂ O	30,0 mL

Diluir Tris base em 30,0 mL de H₂O, ajustar o pH desta solução para 6,8 com HCl 6 N. Em seguida, completar para 50,0 mL. Esta solução tampão será utilizada na preparação do gel (4%) de amostra.

Tampão 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	
Tris base	3,0 g
H ₂ O	30,0 mL
Tampão de amostra	
H ₂ O	2,78 mL
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,63 mL
Glicerol	1,50 mL
azul de bromofenol (4%)	0,10 mL

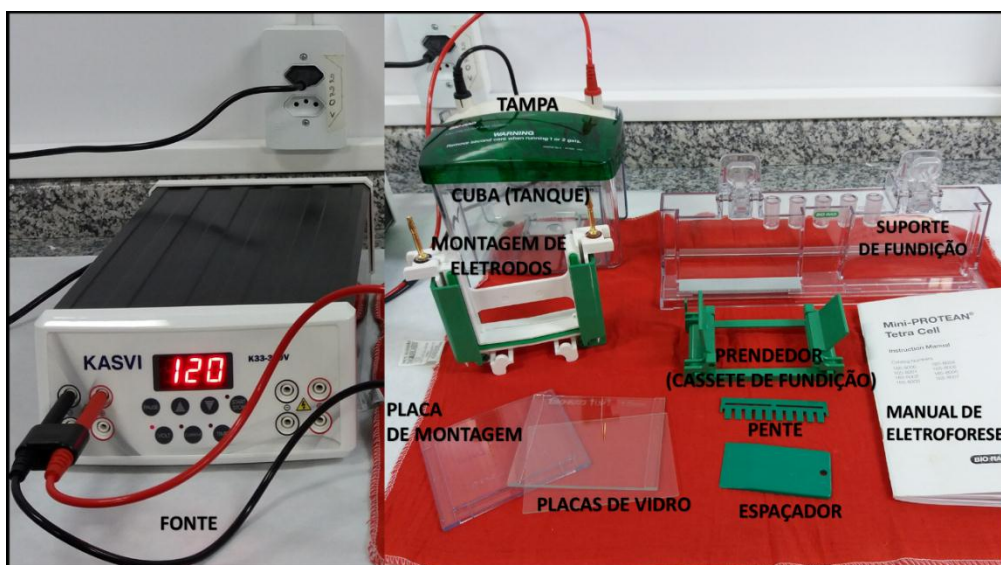


Figura 28 - Imagem digital dos materiais utilizados no experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida.

- No dia do experimento, organizar todos os materiais (Fig. 28) que serão utilizados. Limpar a bancada, os vidros e a cuba de eletroforese e os demais materiais com álcool (70%).

- Retirar da geladeira as soluções e a acrilamida/bisacrilamida, e retirar do freezer o marcador de proteínas, deixando-as atingir temperatura ambiente.
- Montar as placas de vidro no suporte, prestando atenção para não deixar frouxo os vidros, pois, desse modo o gel poderia escapar por baixo.
- Primeiramente, preparar a solução precursora do gel de corrida na concentração 10%, e adicioná-la entre as placas de vidro que estão fixadas ao suporte. Após a adição do gel (10%), colocar H₂O ou álcool butílico (butanol) para nivelar o gel. Aguardar a completa polimerização do gel (40 a 60 min), acompanhando a formação do gel pela quantidade que restou no tubo Falcon.

Observação: o TEMED e o APS (10%) somente devem ser introduzidos na solução no momento em que for necessário polimerizar o gel, antes de colocá-lo entre as placas.

Gel 10%	
H ₂ O	2905 µL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1750 µL
Acrilamida/Bis	2310 µL
TEMED	4,9 µL
APS (10%)	35,0 µL

- Enquanto aguarda a polimerização do gel de corrida, preparar o gel de amostra (4%).

Observação: da mesma forma que na preparação do gel anterior, o TEMED e o APS (10%) somente devem ser introduzidos na solução no momento em que for necessário polimerizar o gel, antes de colocá-lo entre as placas.

Gel 4%	
H ₂ O	1860 µL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	750 µL
Acrilamida/Bis	402 µL
TEMED	3,0 µL
APS (10%)	15,0 µL

- Após a polimerização do gel (10%), retirar com a ajuda de um papel filtro a água ou butanol que havia sido adicionado para nivelar o gel.
- Em seguida, adicionar entre as placas a solução precursora do gel de amostra (gel 4%), e colocar o pente (responsável por formar os poços em que serão colocadas as amostras a serem analisadas). Aguardar a completa polimerização do gel (30 a 40 min), acompanhando a formação do gel pela quantidade que restou no tubo Falcon.
- Enquanto aguarda a polimerização do gel (4%), preparar as amostras que serão analisadas. Misturar 5 μ L do tampão de amostra com 5 μ L da proteína de estudo.
- Após a polimerização do gel (4%), retirar os vidros do cassete de fundição e fixar ao suporte de eletrodos juntamente com a placa de montagem. Colocar o suporte dentro da cuba de eletroforese e preencher internamente com o tampão de corrida.
- Retirar em seguida o pente, e adicionar em cada poço as amostras a serem analisadas. Colocar no primeiro poço a amostra padrão do peso molecular de proteínas conhecidas.
- Fechar o tanque de eletroforese com a tampa, e conectar os eletrodos na fonte.
- Ligar a fonte inicialmente com 80 V, e deixar as amostras correrem do gel menos concentrado (gel 4%) para o gel mais concentrado (gel 10%), quando chegar ao gel mais concentrado mudar a voltagem para 120 V.
- Deixar a corrida acontecer até o corante atingir a extremidade inferior, e parar a corrida.
- Retirar as placas, e lavá-las com água deionizada para facilitar a remoção do gel, utilizar o espaçador para separar as placas e remover o gel.
- Colocar o gel dentro da solução corante (Azul de Coomassie) por 1 h ou durante a noite (*overnight*).
- Depois remover o gel dessa solução lavá-lo com água deionizada, e colocá-lo na solução descolorante, para revelar as bandas da eletroforese.

5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: CARACTERIZAÇÃO DAS MNPS

Neste capítulo, nós apresentaremos os resultados experimentais referentes a preparação e a modificação das MNPS, discutindo a relevância dos dados obtidos e comparando com a literatura existente. Primeiramente, descreveremos o processo de obtenção das MNPS pela técnica de eletrofiação e características das amostras obtidas. Em seguida, apresentaremos os resultados da modificação das MNPS pela técnica de plasma, mostrando as caracterizações químicas e morfológicas dessas membranas pelas técnicas de FTIR e MEV, respectivamente. Apresentaremos ainda através do método do corante TBO a quantificação dos COOH introduzidos nas MNPS pela exposição ao plasma. Em adição serão avaliados os processos de adsorção e dessorção da proteína de estudo, a BSA, os resultados para a aplicação das MNPS para essa finalidade serão discutidos no Capítulo 6.

5.1 Preparação e caracterização das MNPS

Preparamos membranas nanoestruturadas de OS pela técnica de eletrofiação, com base nos parâmetros descritos por Alcaraz-Espinoza *et. al* (2015). A obtenção dessas MNPS foi favorecida pelas seguintes condições: uma concentração de PS 20% (p/v), a utilização do solvente DMF, o controle das condições ambientais (umidade de 50% e a temperatura de 22 °C) e uma tensão elevada de 17,00 KV. Conforme podemos verificar nas micrografias de MEV (Fig.29 a-b), essas condições permitiram a formação de membranas com morfologia em forma de fibras bem definidas na escala submicrométrica, com uma superfície de aspecto liso. O diâmetro médio dos nanofios após a eletrofiação foi de $(0.76 \pm 0.11) \mu\text{m}$ (Fig 29 c).

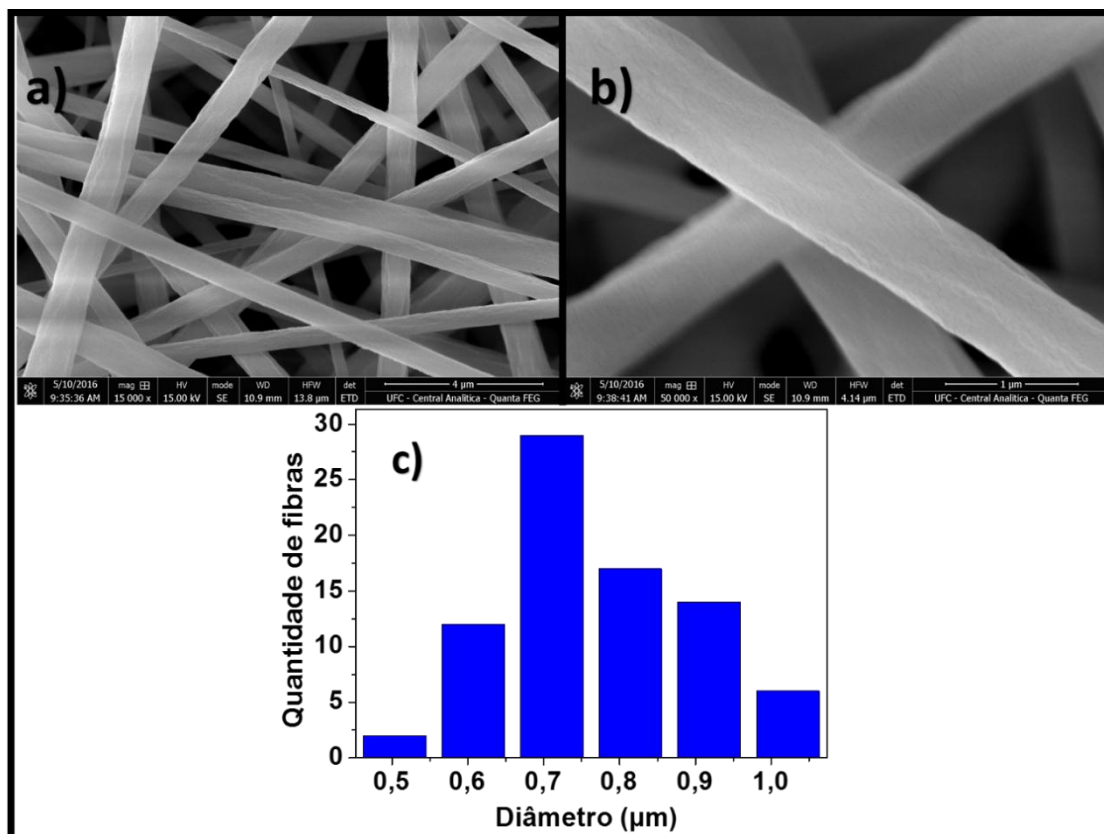


Figura 29 - Micrografias de MEV da superfície das fibras após eletrofiação com ampliação a) 15000x, e b) 50000x, c) distribuição de diâmetro das fibras eletrofiadas.

Uma etapa importante na preparação dessas membranas é o tratamento térmico aplicado às mesmas. A importância desse tratamento resulta do fato de que ele é responsável por melhorar a adesão das fibras entre si, sem que ocorra a destruição de sua morfologia fibrosa, o que torna possível a compactação de várias camadas de fibras, garantindo uma boa integridade e resistência mecânica para as aplicações a que elas serão submetidas [127].

Com essa finalidade, depois do procedimento de eletrofiação as membranas que obtivemos foram deixadas secar para haver a completa evaporação do solvente. Posteriormente, nós submetemos as MNPS ao tratamento térmico, as colocando dentro de uma estufa e pondo sobre elas um peso. Após o tratamento térmico, identificamos algumas características diferenciadas nas fibras, como o seu diâmetro médio que foi $(1,0 \pm 0,15) \mu\text{m}$ (Fig. 30 c), discretamente maior do que aquelas após o processo de eletrofiação e apresentando um espaçamento menor entre as fibras (Fig. 30 a-b), mudanças que são resultado da compactação das fibras e das camadas de fibras umas sobre as outras.

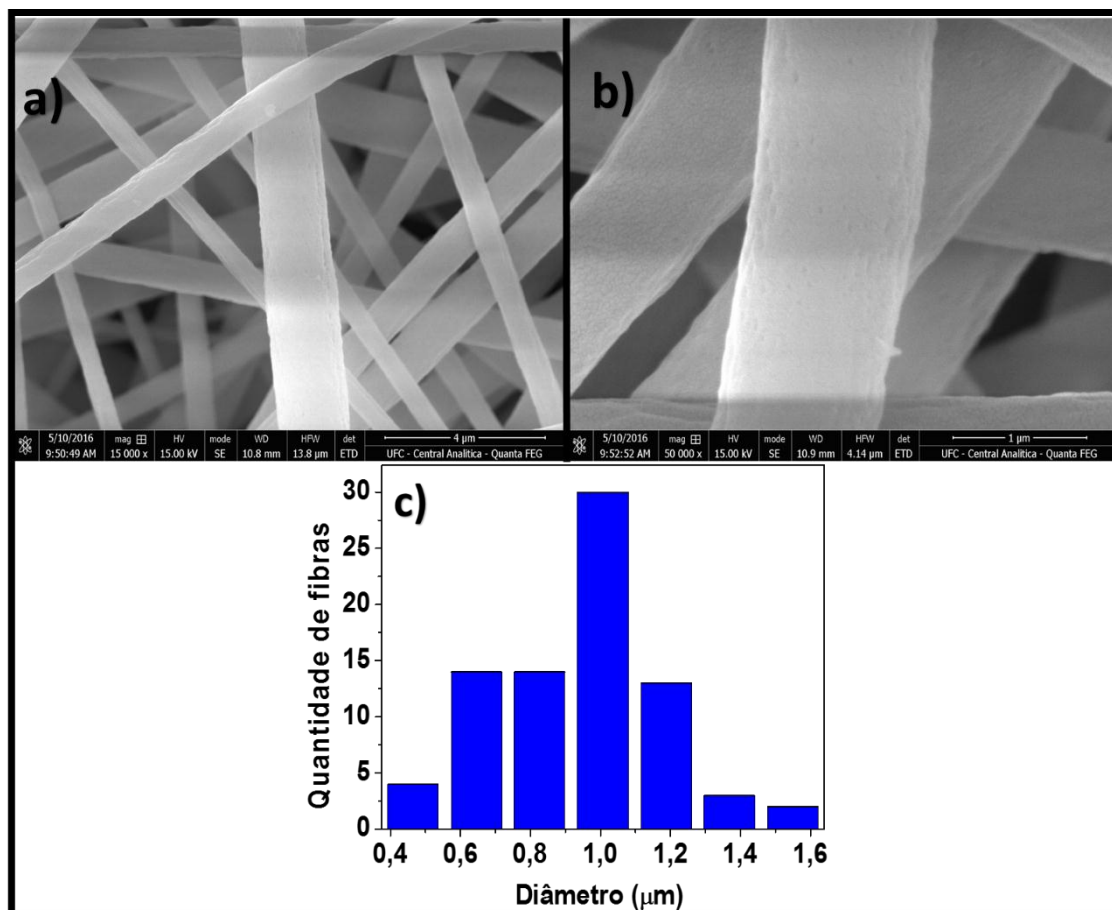


Figura 30 - Micrografias de MEV da superfície das fibras após tratamento térmico com ampliação em a) 15000x, e b) 50000x, c) distribuição de diâmetro das fibras após tratamento térmico.

A concentração da solução precursora de PS é importante para a obtenção dessas fibras nanoestruturadas. Isso se deve primeiramente a que, se a concentração é extremamente baixa, ocorre a obtenção de pequenas gotas (grânulos), devido ao rompimento do jato em gotículas (assim como acontece no procedimento de electrospray), e nesse caso a formação das fibras não é favorecida. Em segundo lugar, para concentrações muito elevadas, o fluxo contínuo da solução polimérica até o coletor é interrompido (o que é ocasionado pelo entupimento da agulha), não sendo formado o jato que é fundamental para obtenção dos fios de polímero que irão ser depositados no coletor. Desse modo, o uso de condições adequadas para concentração e de viscosidade da solução polimérica, e especialmente da condutividade do solvente onde o polímero está dissolvido, são determinantes para a produção dessas fibras [128].

As características das MNPS obtidas no desenvolvimento desta dissertação pela técnica de eletrofiação estão de acordo com os demonstrados por *T.Uyar e F. Besenbacher* (2008) [129], onde se afirma que fibras de PS com uma morfologia bem definida sem a presença de grânulos podem ser obtidas a partir de soluções de PS com concentrações moderadas que variam entre 20% a 30% (p/v), a depender da proporção de DMF utilizado. Além disso, a utilização do DMF tem sido relatada por inúmeros pesquisadores como a maneira mais adequada para a obtenção dessas membranas de PS, com a presença de fibras uniformes e arredondadas com superfícies lisas. Isso decorre do fato de que esse solvente apresenta elevado ponto de ebulição, uma constante dielétrica consideravelmente elevada (36,7 a 25 °C), e se comporta como um eletrólito, dissociando-se de maneira aleatória em cargas positivas e negativas [128–130].

A membrana obtida através dos procedimentos acima descritos foi retirada do papel alumínio e cortada em formato de um quadrado com dimensões de 3 cm x 3 cm (Fig. 31-a). Posteriormente, foram cortadas em círculos de diâmetro de 7 mm (Fig. 31-b), e então submetidas a modificação por um plasma de ar, e as características decorrentes deste tratamento nas membranas serão discutidas nas seções a seguir.

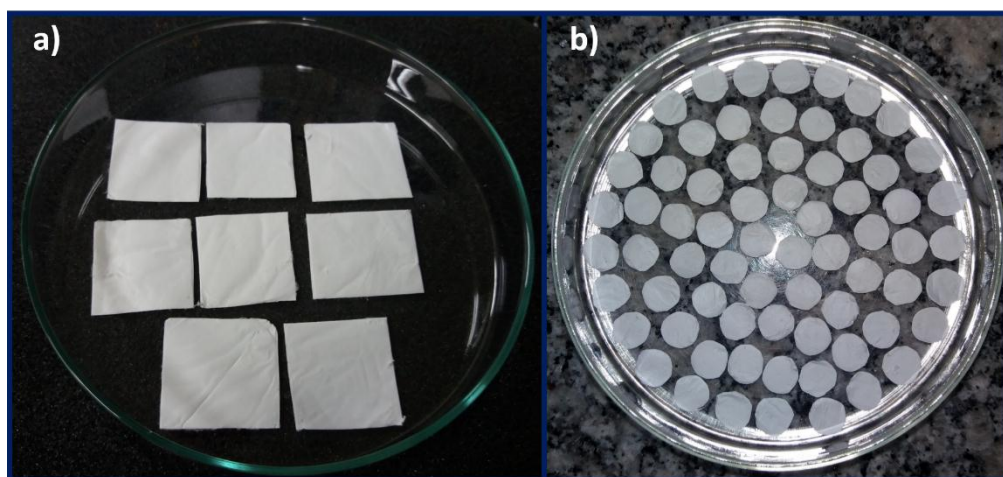


Figura 31 - Imagem digital das MNPS após eletrofiação e tratamento térmico quando a) cortadas em quadrados 3 cm x 3 cm e b) em formato circular com diâmetro de 7 mm.

5.2 Modificação da superfície das MNPS pelo plasma de ar

5.2.1 Caracterização morfológica pelo MEV

A utilização da técnica de plasma para a modificação de membranas poliméricas tem sido um método alternativo não somente para funcionalizar quimicamente as suas superfícies, mas como também para induzir a formação de estruturas porosas nas fibras das membranas [131, 132]. Desse modo, a composição química, energia superficial e a morfologia das membranas são afetada pelos parâmetros do plasma empregado (como por exemplo, tempo de tratamento, pressão do equipamento, temperatura e tipo de gás utilizado) [133, 134]

Nesse sentido, investigamos a influência do tempo exposição ao plasma nas características morfológicas das MNPS pelas imagens de MEV (Fig. 32- a, c, e), quando foi possível identificar que a morfologia das fibras que anteriormente tinham um aspecto liso (Fig. 30 e 31, Seção 5.1), em consequência da exposição das MNPS ao plasma agora apresentam pequenos poros, em decorrência da oxidação da superfície. A porosidade nas MNPS é de importância para o processo de adsorção da biomolécula de estudo (BSA) devido ao aumento da área superficial. O tempo do tratamento foi determinante na densidade dos poros. Nós percebemos que o incremento no tempo de tratamento (5, 14 e 20 min) levou a um aumento da quantidade e distribuição desses poros na superfície das fibras (Fig. 32- a, c, e).

Para 5 min de tratamento (Fig. 32- a), vemos uma quantidade discreta de poros circulares que estão distribuídos em algumas regiões da fibra. Para 14 min (Fig. 32- c), percebemos uma quantidade maior de poros distribuídos em várias regiões da fibra. Para os dois primeiros casos, é possível ressaltar que o plasma modifica a superfície sem ocasionar desgastes mecânicos ou rupturas nas fibras, por essa razão as MNPS em que foram tratadas com até 14 min possuem as melhores características para adsorção de biomoléculas. Por outro lado, como se pode visualizar na Fig. 32- e, para tempos extremos de exposição ao plasma (como 20 min), existe uma grande quantidade de poros, com formatos mais alargados e que ocupam toda a fibra, o que ocasionou desgaste e rupturas em sua estrutura.

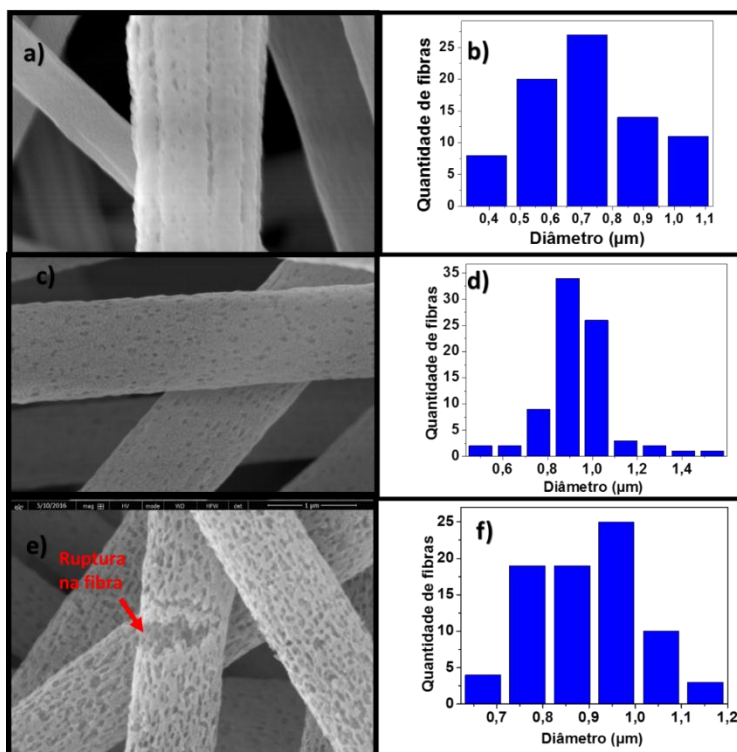


Figura 32 - Micrografias de MEV com ampliações de 50000x da superfície das MNPS após a modificação por exposição ao plasma com a) 5, c) 14 e e) 20 min.

Na literatura são reportados trabalhos em que materiais baseados em PS têm sido submetidos a modificações o que leva à funcionalização via processos químicos; contudo, esses processos necessitam de uma grande variedade e quantidade considerável de reagentes, ocasionando a formação de subprodutos, o que demanda um maior tempo e maiores custos para obter membranas com propriedades de interesse (porosidade, espessura fina e grupamentos reativos). Por outro lado, a modificação dessas membranas por processos físicos tais como plasma representa uma estratégia promissora e ambientalmente amigável [135], porque ele permite ativar a superfície de maneira eficaz e rápida, com custo e tempo reduzidos, sem que sejam gerados subprodutos tóxicos ao meio ambiente ou aos usuários [136].

Além de influenciar na morfologia, a ação do plasma sobre as MNPS possibilita a introdução de grupos químicos em sua superfície. Por essa razão, discutiremos a seguir a composição química das MNPS e a quantificação do número de grupos introduzidos.

5.2.2 Caracterização química pelo FTIR

O diferencial deste trabalho com relação às membranas produzidas anteriormente pelo grupo PNC consistiu em nossa proposta de examinar o comportamento das MNPS frente a diferentes tempos de exposição ao plasma de ar, identificando as mudanças resultantes nas propriedades químicas e morfológicas das MNPS e, consequentemente, os efeitos daí decorrentes quando de sua posterior aplicação para a adsorção de biomoléculas.

A modificação de superfícies poliméricas pela irradiação de energia de alta frequência, e em especial nos materiais baseados em PS, têm demonstrado que quando o plasma incide na superfície ocasiona uma leve cisão entre os carbonos, promovendo assim a formação de espécies oxigenadas, tais como C-O, C=O, ou COOH; acredita-se que esses grupos químicos se liguem ao anel fenila do PS [136, 137].

Ao usar a espectroscopia FTIR para examinar a composição química das MNPS na ausência de modificação, nós encontramos os picos do PS puro, ou seja, aqueles correspondentes aos estiramentos vibracionais dos grupos funcionais característicos e as deformações angulares (Fig. 33-a), aqueles em 3065 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento simétrico (ν_s) da ligação C-H do anel aromático do PS, e os presentes em 2848 cm^{-1} à ligação C-H da cadeia alifática. Por sua vez, em 1602 , 1487 e 1449 cm^{-1} são encontrados os estiramentos característicos das ligações C=C do anel aromático. As vibrações em 758 , 701 e 546 cm^{-1} são atribuídas as deformações angulares (δ) das ligações C-H fora do plano dos substituintes e do anel aromático. Já nos espectros correspondentes às MNPS após os processos de modificação por exposição ao plasma, surgem dois novos picos aos comprimentos de onda de 1730 e 3439 cm^{-1} (Fig. 33 b-d), como resultado da ação do plasma na superfície das MNPS ao longo do tempo; o que representam os estiramentos das ligações C=O e O-H, respectivamente [138, 139]. Essas informações estão resumidas na Tabela 3.

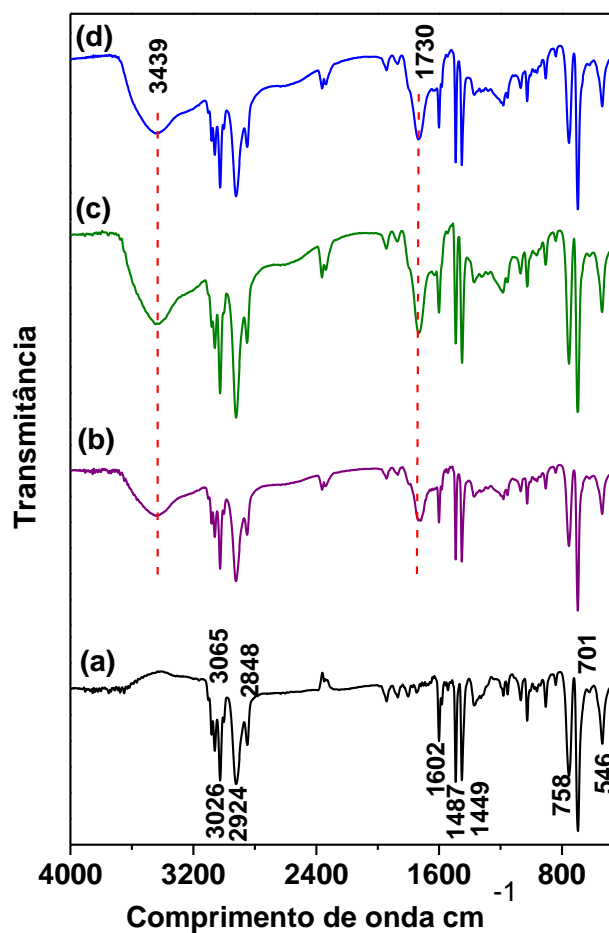


Figura 33 - Espectros de FTIR das MNPS a) após processo de eletrofiação e tratamento térmico, e depois da modificação da superfície pela exposição ao plasma durante b) 5, c) 14 e d) 20 min.

Tabela 3 - Comprimento de onda de absorção no infravermelho dos diferentes grupos funcionais presentes nas amostras de MNPS pura e posteriormente modificadas pelo plasma.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionais presentes na MNPS pura	Grupos funcionais presentes na MNPS modificada
3439	Ausente	O-H
3065	=C-H (v _s aromático)	=C-H (v _s aromático)
3026	C-H (v _s aromático)	C-H (v _s aromático)
2924	C-H (v _s alifática)	C-H (v _s alifática)
2848	C-H (v _s alifática)	C-H (v _s alifática)
1730	Ausente	C=O
1602	C=C, aromático	C=C, aromático
1487	C=C, aromático	C=C, aromático
1449	C=C, aromático	C=C, aromático
758	C-H (δ fora do plano)	C-H (δ fora do plano)
701	C-H (δ fora do plano)	C-H (δ fora do plano)
546	C-H (δ fora do plano)	C-H (δ fora do plano)

5.2.3 Quantificação dos ácidos carboxílicos originados nas MNPS

O tratamento por meio da técnica de plasma pode modificar a superfície de membranas poliméricas, e especialmente aquelas baseadas em PS de modo a melhorar o seu desempenho na afinidade por moléculas biológicas. Isso se dá pela criação de funcionalidades físicas e químicas (pequenos poros, adesão, mudança na hidrofiliabilidade, e adição de diferentes de grupos químicos como, por exemplo, os COOH, que têm afinidade por grupos amino de proteínas) [139]. O PS, devido à ausência de grupos funcionais polares em sua composição química, é conhecido como um polímero moderadamente hidrofóbico, uma vez que em sua estrutura existem apenas carbonos e hidrogênios, organizados no anel aromático fenilo e em seu substituinte vinila [30].

Assim, a modificação das MNPS pela exposição ao plasma de ar introduz grupos funcionais, como os ácidos carboxílicos, o que torna hidrofílica a superfície dessas membranas. Como discutido anteriormente, essas espécies químicas podem ser quantificadas através do método do corante TBO.

Neste estudo, as MNPS foram colocadas para interagir com uma solução de corante de concentração conhecida (TBO 0,5 mM) por um período de 5 h. Inicialmente a solução estava em um meio básico (NaOH, pH 10,0), para permitir que os grupos COOH da membrana, fossem dissociados completamente em COO⁻, e pudessem interagir com o TBO catiônico. Após o período de interação, retiramos as MNPS e as lavamos com água deionizada para remover o corante não ligado. Em seguida, dessorvemos durante 20 min as moléculas de TBO que haviam se ligado às MNPS, com a ajuda de uma solução de ácido acético (AcH, 50%). Esse TBO dessorvido na solução aquosa de AcH foi quantificado pela absorção no comprimento onda característico deste corante, em torno de 630 nm.

Na Fig. 34, é possível identificar que as MNPS modificadas com 20 min exibem a maior liberação do TBO na solução, indicando que uma quantidade maior do corante havia sido adsorvido por essas membranas.

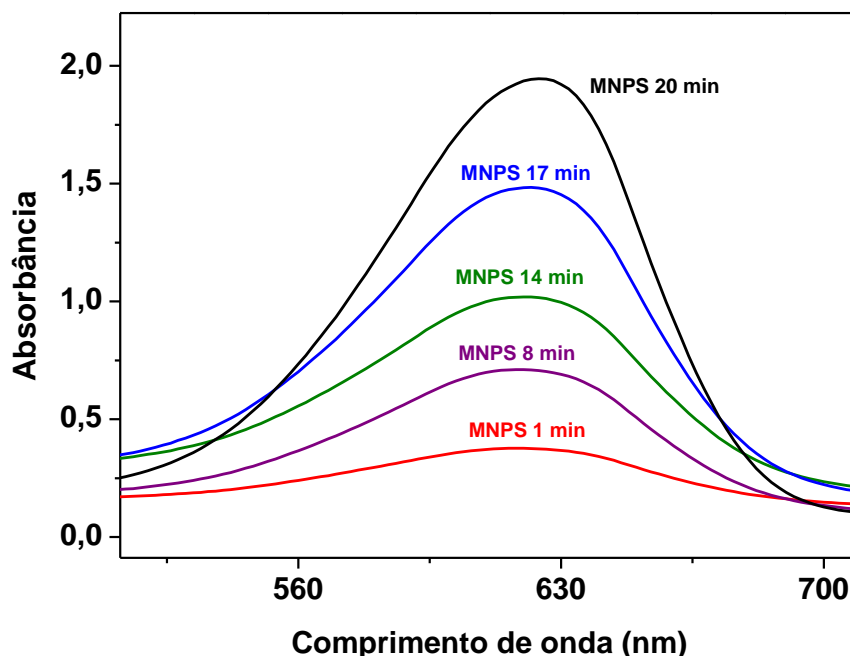


Figura 34 - Espectros de UV-Vis do corante TBO desorvido pelas MNPS em uma solução aquosa de ácido acético (50% p/v).

Como pode ser observado na Tabela 4, a quantificação pelo método TBO das espécies negativamente carregadas na superfície das MNPS mostrou que, conforme essas membranas são expostas a um maior tempo de tratamento a plasma (1 a 20 min), um maior número de grupos quimicamente reativos passa a ser formado em sua superfície. A partir da curva de calibração para as concentrações conhecidas de TBO, é possível calcular a quantidade de corante liberado pelas MNPS. Encontramos que a concentração de COOH nas MNPS foi de $11,3 \pm 1,3$; $18,1 \pm 1,0$; $27,0 \pm 0,7$; $40,0 \pm 0,8$ e $55,2 \pm 1,7$ μmol para tempos de exposição ao plasma iguais a 1,8,14,17 e 20 min, respectivamente.

Tabela 4 - Quantidade de COOH na superfície das MNPS em função do tempo de tratamento a plasma.

Tempo de exposição ao plasma (min)	Quantidade de COOH (μmol)
1	$11,3 \pm 1,3$
8	$18,1 \pm 1,0$
14	$27,0 \pm 0,7$
17	$40,0 \pm 0,8$
20	$55,2 \pm 1,7$

Este estudo mostrou que as MNPS possuem um número elevado de sítios ativos para interagir com biomoléculas. Sendo assim, usamos essas membranas em nossos experimentos de adsorção de proteína, onde 4 camadas de MNPS foram empilhadas dentro de uma coluna de centrifugação, o que será discutido no próximo capítulo (Capítulo 6). Podemos então considerar que para um conjunto de 4 MNPS, por exemplo, para as membranas tratadas durante 14 min, que o valor de $27,0 \pm 0,7 \mu\text{mol}$ encontrado para uma única membrana pode ser multiplicado por 4, equivalendo a $108 \mu\text{mol}$ de COOH.

5.2.4 Ângulo de contato

As propriedades interfaciais de membranas poliméricas, incluindo a molhabilidade, isto é, a habilidade com que os líquidos interagem com estes materiais são fatores determinantes para os sistemas em que elas poderão ser utilizadas [140]. Para indicar se uma superfície é hidrofílica, hidrofóbica ou super-hidrofóbica, é medido o ângulo de contato da gota de um líquido sobre esta superfície.

Existem valores de referência para classificar estas superfícies. Por exemplo, quando o ângulo de contato para uma gota de água sobre a superfície possui o valor inferior a 90° , a superfície é considerada como sendo hidrofílica. Por outro lado, se o valor do ângulo é superior a 90° , ela é hidrofóbica. Já as superfícies conhecidas como super-hidrofóbicas, exibem um ângulo de contato entre 150° e 180° [141].

Para ter conhecimento das características superficiais das nossas membranas, medimos o de ângulo de contato da água com a superfície das MNPS. Para avaliar o grau de molhabilidade dessas membranas, as medidas de ângulo de contato foram efetuadas para cada etapa: logo após sua produção, tratamento térmico e modificação pelo plasma. Como podemos perceber na Fig. 35, inicialmente (ou seja, logo após o procedimento de eletrofição), a superfície das MNPS tem propriedades hidrofóbicas ($131,14^\circ \pm 0,56^\circ$; Fig. 35-a). Já para aquelas submetidas ao tratamento térmico-mecânico, o ângulo de contato diminui levemente para ($121,4^\circ \pm 2,25^\circ$; Fig. 35-b).

Uma particularidade da introdução de COOH nas MNPS é a alteração na molhabilidade dessas membranas [30]. Quando as MNPS foram expostas a diferentes tempos de modificação (Fig. 35 c-i) (mesmo depois de apenas 1 min de plasma) o tratamento foi suficientemente rápido para tornar essas membranas hidrofílicas. Como

podemos visualizar na Fig. 35 para todos os tempos de modificação das MNPS com o plasma, o ângulo de contato foi igual a 0°.

Esse caráter hidrofílico das nossas MNPS, é relevante para estudos de separação de proteínas em que são utilizadas soluções aquosas, visto que isso possibilita o aumento do contato das moléculas alvo com a sua superfície. Assim, membranas hidrofílicas podem vir a desempenhar um papel importante na separação de amostras biológicas, e em especial as membranas hidrofílicas que possuem grupamento amino e ácidos carboxílicos em sua superfície, e que dispõem de propriedades anticoagulantes e antiincrustantes, tornam este tipo de material mais compatível para o trabalho com amostras de sangue [142].

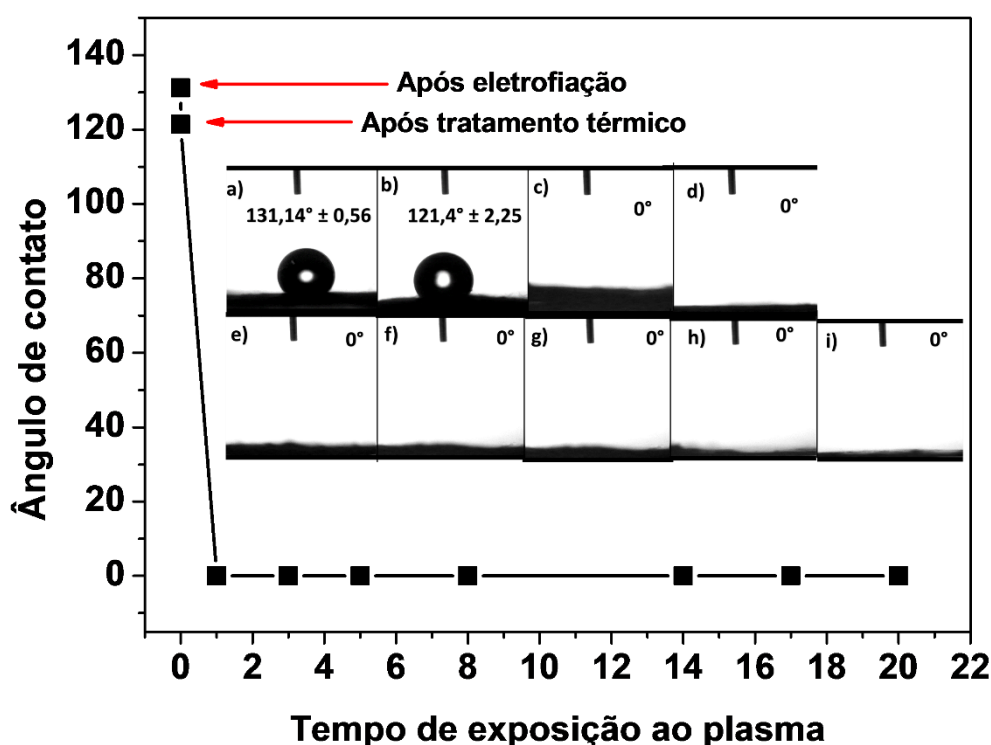


Figura 35 - Ângulo de contato das MNPS a) após o procedimento de eletrofiação, b) depois do tratamento térmico, e submetidas a modificação com c) 1 min, d) 3 min, e) 5 min, f) 8 min, g) 14 min, h) 17 min e i) 20 min de exposição ao plasma.

6

6 APLICAÇÃO DAS MNPS

Neste capítulo descreveremos os resultados dos experimentos relacionados ao uso das MNPS carboxiladas para a adsorção e extração de proteínas presentes em meios aquosos. Primeiramente, discutiremos os resultados de uma prova do conceito sobre a capacidade das MNPS em adsorver proteínas. Em seguida, descreveremos a influência do pH do meio, o efeito do tempo de exposição das MNPS ao plasma no processo de adsorção e a capacidade de adsorção pelas MNPS com relação a concentração de proteína inicialmente presente no meio aquoso. Explicaremos ainda os mecanismos de ligação entre MNPS e BSA e mostraremos que o modelo de isoterma que melhor descreve os processos interfaciais de adsorção entre MNPS/BSA é aquele proposto por Langmuir. Por fim, discutiremos a capacidade de dessorção e a qualidade das proteínas adsorvidas e dessorvidas como avaliadas através da eletroforese.

6.1 Experimentos de adsorção da BSA pelas MNPS

Para determinar a aplicação das MNPS como material adsorvente para proteínas, realizamos inicialmente experimentos como uma prova do conceito, onde MNPS foram submetidas à interação com soluções aquosas de BSA.

Para isso, nós dispusemos quatro camadas de MNPS (sem qualquer tratamento a plasma) dentro de uma coluna spin, por onde passamos uma solução de proteína BSA (pH 3,0). Com base na técnica de UV-Vis, nós determinamos a concentração de proteína ($c = 0,332 \text{ mg.mL}^{-1}$) dissolvida na solução antes e após de passar a solução através das MNPS pela coluna. O intuito deste experimento foi o de examinar se após o procedimento de eletrofiação e o tratamento térmico as MNPS poderiam exibir alguma interação com as moléculas de BSA.

Levantamos duas hipóteses a esse respeito. Primeiro, que a membrana de PS após sua produção é hidrofóbica (conforme mostramos no Capítulo 5, Seção 5.2.4), do que resultaria interações por adsorção física, por exemplo, entre as MNPS e a BSA. Em segundo lugar, entre as MNPS estariam agindo simplesmente como uma barreira física (filtro) de retenção para as proteínas.

No entanto, de acordo com o exibido na Fig. 36, essas duas hipóteses não se mostraram válidas, visto que a intensidade de absorção em 280 nm da solução de BSA inicial e a de solução sobrenadante dessa proteína após a interação com as MNPS são idênticas. Desse modo, verificamos não ter ocorrido mudanças na concentração de BSA da solução. Esse resultado pode ser explicado em termos das propriedades morfológicas das MNPS que, na ausência de tratamento a plasma, apresentam poucos poros (ou mesmo nenhum) em sua superfície, o que impossibilita a retenção de qualquer molécula de BSA, ou então a retenção em uma quantidade tão insignificante que não pode ser detectada pelo equipamento.

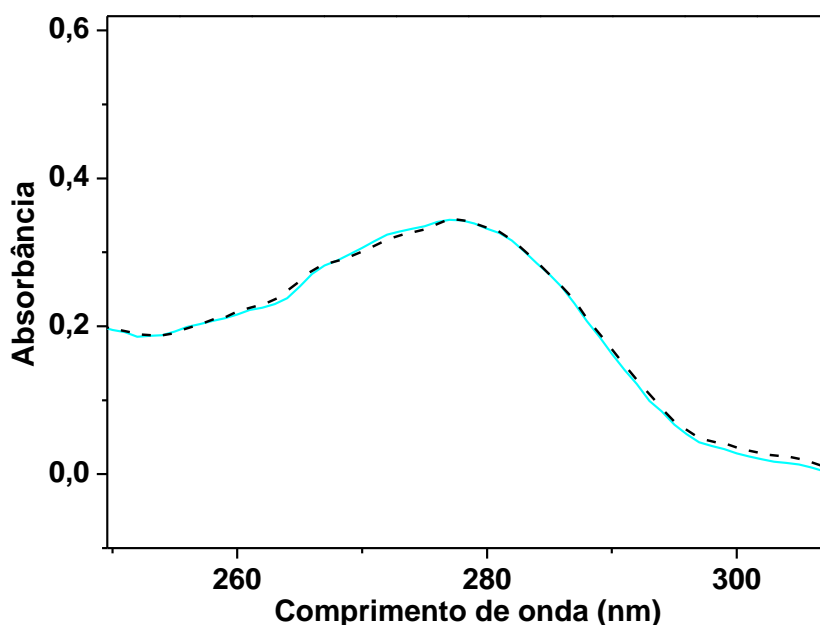


Figura 36 - Espectros de absorção de UV-Vis da solução de BSA antes da interação com MNPS (curva azul) e após a interação com MNPS (curva pontilhada em preto).

Em outro experimento, MNPS modificadas com 5 min de exposição ao plasma, e empilhadas dentro de uma coluna spin, foram submetidas ao contato com 500 μL de uma solução BSA de concentração inicial ($c_i=0,639 \text{ mg.mL}^{-1}$, pH 3). Após esse procedimento, medimos a concentração final (C_f) da solução sobrenadante de BSA, quando verificamos que após interagir com as MNPS, houve um decréscimo da concentração de BSA no meio, com o valor de C_f de BSA sendo igual a $0,511 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Fig. 37). Dessa maneira, podemos comprovar que a exposição dessas MNPS ao plasma é crucial para conferir às mesmas diferentes características superficiais devido à presença de sítios de ligação para a adsorção da BSA. Como mostramos no Capítulo 5, as mudanças nas características químicas (incorporação de grupos COOH), morfológicas (porosidade) e superficiais (grande hidrofiliicidade) das MNPS, que foram induzidas pela exposição ao plasma, permitiram que essas membranas se tornassem capazes da adsorção de moléculas de BSA. Partindo desses resultados, nos empenhamos em investigar os parâmetros que influenciam o processo de adsorção da BSA pelas MNPS. Discutiremos esses parâmetros em detalhes nas seções a seguir.

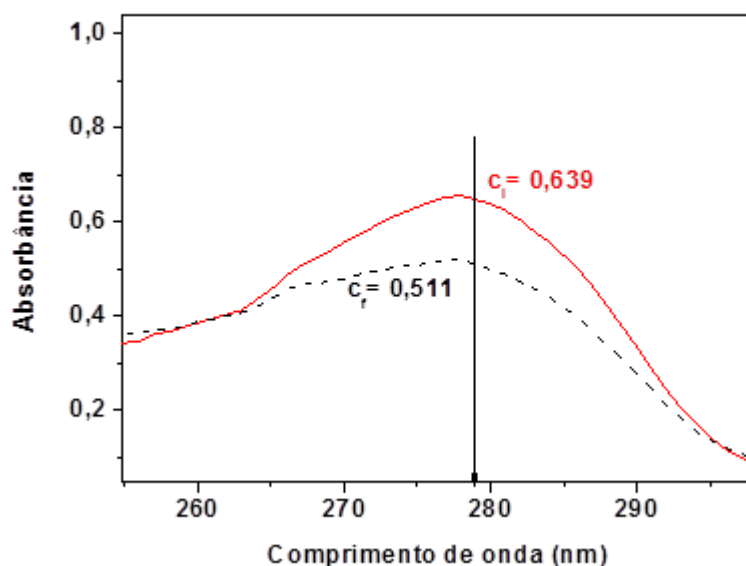


Figura 37 - Comparação entre os espectros de UV-Vis que demonstra a capacidade das MNPS em adsorver BSA: absorbância das soluções na concentração inicial (linha sólida vermelha) e final (linha pontilhada preta) de BSA.

Para dar prosseguimento aos trabalhos de utilização das MNPS, verificamos quantos ciclos seriam necessários para que viesse a ocorrer a saturação de BSA por essas membranas. Para isso, por repetidas vezes passamos uma solução de BSA ($0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$) através da coluna spin, até que a MNPS atingisse um equilíbrio de adsorção com a solução de BSA, a partir de quando não mais haveria mudanças no valor final da concentração de proteína na solução sobrenadante. Em experimentos em que a solução de BSA foi submetida a 7 ciclos de adsorção pelas MNPS, podemos perceber que após 5 ciclos já não mais ocorrem mudanças significativas na concentração da proteína na solução sobrenadante (Fig. 38); por essa razão, escolhemos realizar os demais experimentos de adsorção com 5 ciclos de adsorção.

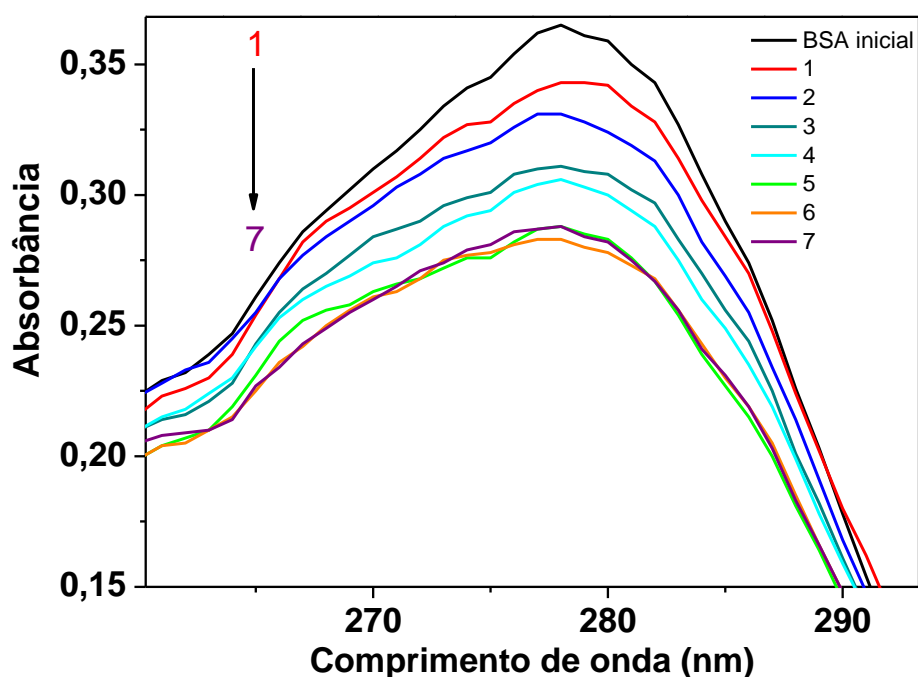


Figura 38 - Espectros de absorção UV-Vis da solução de BSA antes de passar através da coluna spin (preto) e solução sobrenadante de BSA ao longo de 7 ciclos consecutivos de adsorção pelas MNPS.

6.2 Influência do pH da proteína BSA sobre a capacidade de adsorção pela MNPS

Com o objetivo de utilizar MNPS modificadas por plasma como um material adsorvente para colunas de separação de proteínas, se fez necessário estudar os parâmetros que podem influenciar nesse processo. Quando se deseja aplicar um material para a separação de proteínas, é importante que antes de usá-lo em sistemas reais, em que existe uma mistura de proteínas, seja feito o estudo do comportamento desse material frente a soluções com um único tipo de proteínas. Por essa razão, examinamos inicialmente como a variação do pH de soluções da proteína BSA (proteína modelo nesse estudo) afetaria a capacidade de adsorção das MNPS. A importância desse estudo decorre também do fato de que pequenas mudanças no pH do meio em que se encontra a proteína podem alterar a estrutura tridimensional da BSA e, em decorrência disso, afetar sua função biológica.

Como podemos ver na Fig. 39, nesse estudo obtivemos a resposta de como varia o percentual de proteína adsorvido pelas MNPS *versus* pH do meio em que se encontra a BSA. O percentual máximo de adsorção da BSA pelas MNPS foi de aproximadamente 33,33%, para o valor do pH igual a 5,0 (Fig. 39-a), em uma solução tampão de HAc 2 M – NaAc 2 M. Dessa maneira, determinamos que essa seria a solução de ligação a ser utilizada em nossos estudos subsequentes, ou seja, a solução mais adequada para ativar a proteína de modo que ela interagisse com as MNPS. Podemos inferir desses resultados que as MNPS possuem capacidade de adsorver a BSA em uma faixa de pH compreendido entre 3,0 e 5,0 (ou seja, em meio ácido). Por outro lado, quando o valor do pH se encontra na faixa entre 6,0 e 9,0 não houve a adsorção da BSA. Para compreender esses resultados, devemos considerar principalmente dois fatores: a composição química das MNPS e o comportamento da BSA como função do pH do meio.

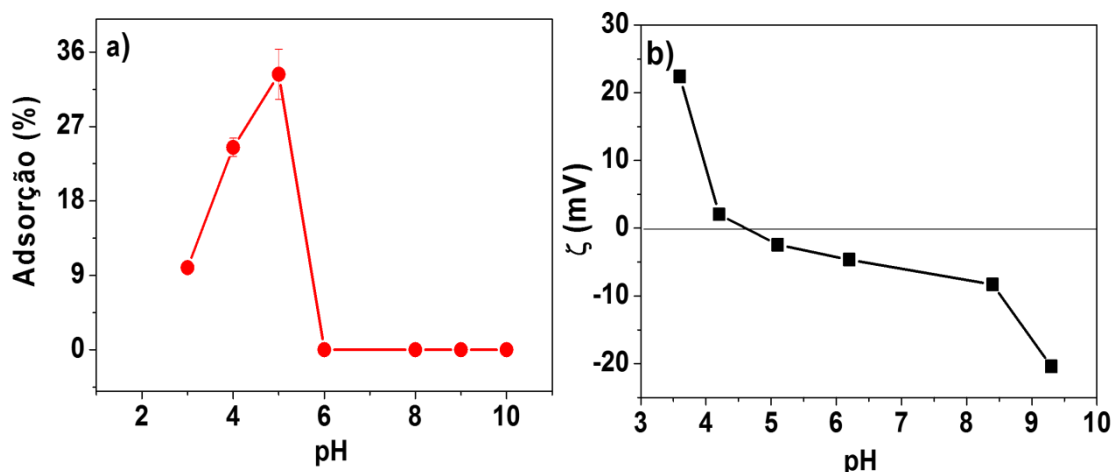


Figura 39 - a) Percentual de adsorção de BSA em função do pH do meio (3,0-9,0), b) potencial zeta em função do pH da solução de proteína BSA em meio tamponado ($c=0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Conforme discutido no Capítulo 4, quando as MNPS são modificadas pela exposição ao plasma, grupos carboxílicos são incorporados em sua superfície. Segundo a literatura, quando materiais que possuem em sua superfície este grupo funcional são expostos um meio altamente ácido, exibem um baixo percentual de dissociação dos COOH. Isso significa que em pH 3,0, por exemplo, a maioria dos COOH dessas membranas está em um estado neutro, adsorvendo uma quantidade menor de moléculas de BSA. Já para o pH 4,0, segundo relatado na literatura, estima-se que 15,0% dos COOH se encontrem dissociados (ou seja, carregados negativamente na forma de COO^- , dissociação comparável à do ácido acético, que possui $\text{pK}_a = 4,76$) [143]. Em pH 5,0, no entanto, um maior percentual de COO^- está presente, permitindo que uma maior quantidade de moléculas de BSA seja adsorvida pelas membranas. Quando o valor do pH da solução de ligação vai sendo deslocado para um meio extremamente básico (faixa entre 8,0-10,0), o número de COO^- dissociados no meio torna-se elevado (99,99%) [143].

O fato das membranas transportarem cargas negativas em pH básico esclarece o porquê das MNPS não possuírem capacidade de adsorver BSA em um valor de pH entre 6,0 e 9,0 pois a BSA também exibe grupos carregados negativamente em meio básico nas soluções de NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M (pH 6,0-8,0) e Gli 0,2 M- NaOH 0,2 M (pH 9,0), como demonstrado pela resposta do potencial zeta da BSA em função do pH do meio em que ela se encontra (Fig. 39-b). Essas cargas negativas provocam uma repulsão entre as moléculas de proteína e as MNPS, fazendo com que elas não sejam adsorvidas pelas MNPS. Com base nesses resultados, as nossas MNPS devem exibir carga negativa

na superfície, sendo capazes de adsorver apenas moléculas de BSA que possuam cargas opostas, ou seja, aminoácidos carregados positivamente.

Em consequência dessa elevada sensibilidade a variações em seu pH, a proteína BSA passa por alterações em sua estrutura conformacional e na distribuição de cargas elétricas [144, 145]. Na Fig. 39-b, é mostrado a variação o potencial zeta das moléculas de BSA dissolvidas nas soluções de ligação (usadas para promover a interação entre BSA/MNPS) que confirma a hipótese de que elas apresentam cargas positivas em uma solução na faixa de pH 3,0-4,0 [144, 145].

Para a BSA dissolvida na solução de HAc 2 M – NaAc 2 M, como o seu pH está próximo do p.I da BSA (pH 5,0), ela exibe igual quantidade de aminoácidos positivos e negativos, e desse modo a carga global da proteína é neutra (Fig. 39-b). Como os aminoácidos negativos estão mais protegidos na molécula, e os aminoácidos positivos estão mais expostos, a conformação se torna mais compacta e a maneira como as cargas da molécula estão distribuídas favorecem uma maior interação entre os grupos amino da BSA com os grupos COOH da superfície das MNPS, nessa faixa de pH.

A conformação da BSA também tem efeitos importantes sobre o processo de adsorção pelas MNPS, pois a macromolécula se organiza estruturalmente de diferentes maneiras, a depender do pH do meio em que se encontra, sendo de grande importância considerar as interações intermoleculares entre proteínas sobre o processo de adsorção.

Na Fig. 40, são esquematicamente mostradas as conformações que a BSA pode adotar quando há variações no pH do meio. Sua conformação sofre alterações em uma faixa de pH entre 2,0 e 10,0. Inicialmente, no pH 2,0, sua estrutura se encontra completamente expandida, com seus aminoácidos completamente expostos, e apresenta uma forma parcialmente expandida em pH 3,0. Já para a faixa de pH entre 4,0 e 7,0, ela passa a adotar uma forma mais compacta e rígida, conhecida como conformação normal. Finalmente, em meios alcalinos (pH 8,0-10,0) ela adota uma conformação básica, ainda não satisfatoriamente elucidada [144–146]. Desse modo, podemos compreender que quando a conformação das moléculas de BSA se encontra em seu estado parcialmente expandido, ocorre um bloqueio na superfície da membrana dificultando assim a adsorção de novas moléculas de proteína nas MNPS, o que explica o baixo percentual de adsorção no pH 3,0 (9,92%, Fig. 39-a). Na sua conformação normal (pH 5,0), esses efeitos de impedimento sobre as moléculas vizinhas são minimizados, permitindo que as MNPS possam adsorver uma maior quantidade de moléculas de BSA.

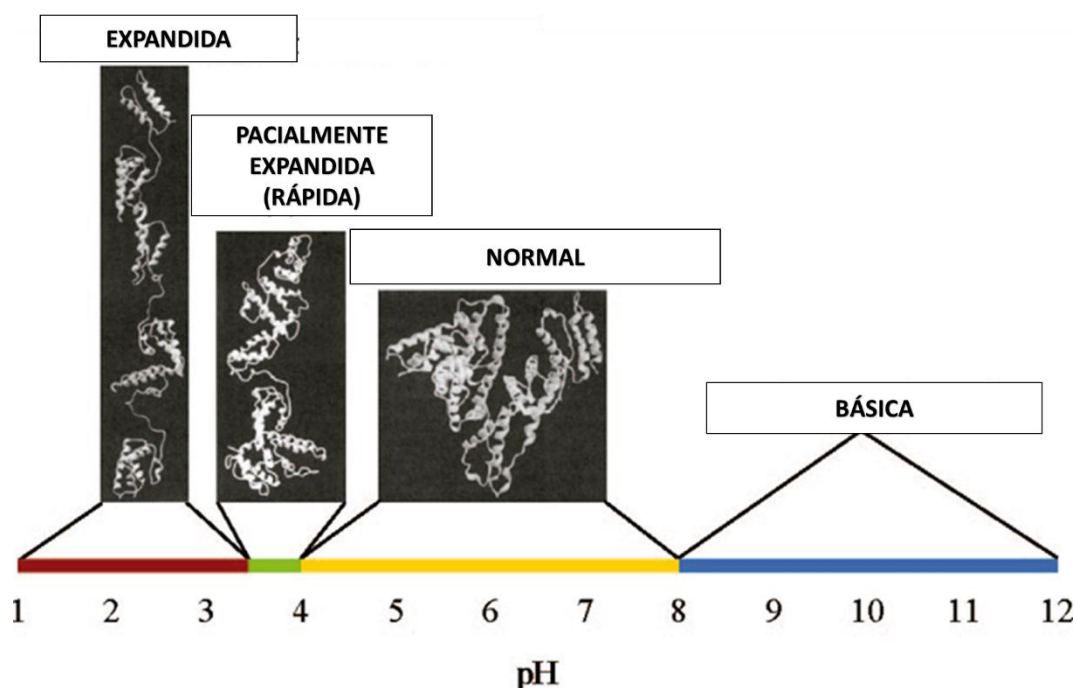


Figura 40 - Representação da estrutura conformacional da proteína BSA em função do pH do meio em que se encontra. Adaptado da Ref. [144].

Para interpretar de maneira mais profunda os resultados para captura de BSA pelas MNPS carboxiladas a partir de meio aquosos, é imprescindível que determinemos também quais são os mecanismos de ligação que estariam envolvidos na interação entre BSA/MNPS. Por essa razão, discutiremos a seguir os tipos de interação que podem ocorrer entre essa proteína e as MNPS.

6.3 Mecanismo de ligação entre as MNPS e a proteína BSA

A adsorção de proteínas em substratos sólidos é um processo complexo devido às diferentes conformações, cargas (positivas ou negativas) e propriedades que essas biomoléculas podem exibir. Uma consequência dessas propriedades distintas é que vários tipos de interações podem estar envolvidos no mecanismo de adsorção entre proteína e substrato, como por exemplo, a natureza eletrostática, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. No caso de separação de proteínas por membranas, esses materiais podem não só atuar como uma barreira física, como também adsorver as proteínas diretamente em sua superfície por meio de ligações químicas [88, 147].

De acordo com o relatado anteriormente (Capítulo 5, Seção 5.2.2), as MNPS tornam-se carboxiladas quando modificadas pela ação de um plasma, e estes grupos químicos são por sua vez ativados quando expostos a soluções aquosas diluídas capazes de desprotonar os COOH (Capítulo 6, Seção 6.2), passando assim a exibir em maior ou menor percentual cargas negativas dependentes do pH do meio. Essas cargas se devem à dissociação do ácido carboxílico, que dá origem ao íon carboxilato (COO-) [148], como descrito pela reação esquematizada na Fig. 41.

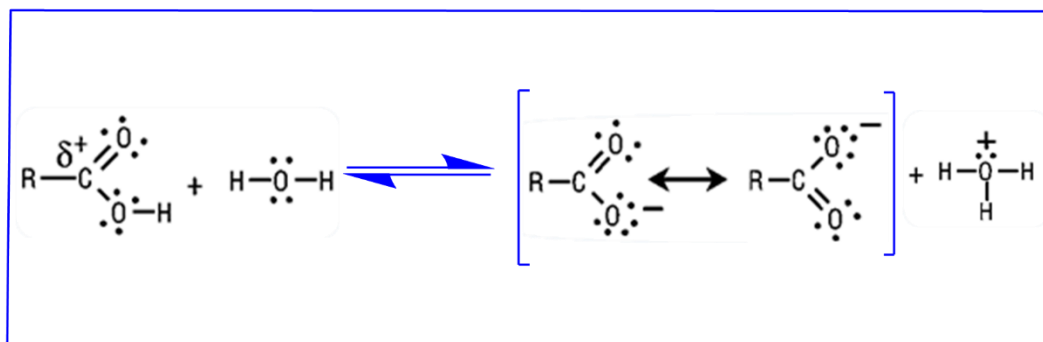


Figura 41 - Mecanismo de reação química da dissociação de ácidos carboxílicos em meio aquoso.

Em função disso, o mecanismo de interação MNPS/BSA pode ser explicado da seguinte maneira: quando as MNPS são colocadas para interagir com a solução de BSA (pH 3,0-5,0), acontecem processos de transferência iônica em sua superfície. Esse mecanismo de adsorção é baseado em processos de quimissorção, quando acontece a troca ou partilha de espécies carregadas entre as moléculas do adsorvato (proteína BSA) e a superfície do adsorvente (MNPS), resultando em uma reação de troca iônica.

Os COOH existentes nas MNPS dissociam-se, liberando íons H^+ para a solução, e, em troca, as MNPS interagem com os grupos amino positivos da proteína BSA. Em vista disso, as MNPS podem ser denominadas como uma membrana catiônica, pois liberam H^+ e em troca recebem grupos NH^+ . Deve-se ressaltar que, após o processo de adsorção, se passarmos uma solução de pH básico (8,0-10,0) pela membrana acontece a dessorção da BSA, o que nos fornece outra evidência de que o tipo de ligação entre os grupos químicos da membrana e BSA envolve o estabelecimento de ligações eletrostáticas. Também é possível que existam ligações de hidrogênio.

A BSA possui uma sequência total de 583 aminoácidos, dos quais seis tipos possuem grupos amino em sua cadeia lateral. Esses aminoácidos e suas respectivas quantidades são triptofano (2), glutamina (20), asparagina (14), lisina (59), arginina (23),

e histidina (17). O triptofano é um aminoácido apolar e seu grupamento amino não está carregado positivamente. Apesar de que a asparagina e a glutamina são polares, também não apresentam carga. Já a lisina, a arginina e a histidina são aminoácidos polares com cargas positivas [80]. Estas características fazem com que estes três últimos aminoácidos, cujas estruturas químicas estão representadas na Fig. 42, sejam aqueles com maior probabilidade para se ligar aos grupos carboxílicos existentes nas MNPS.

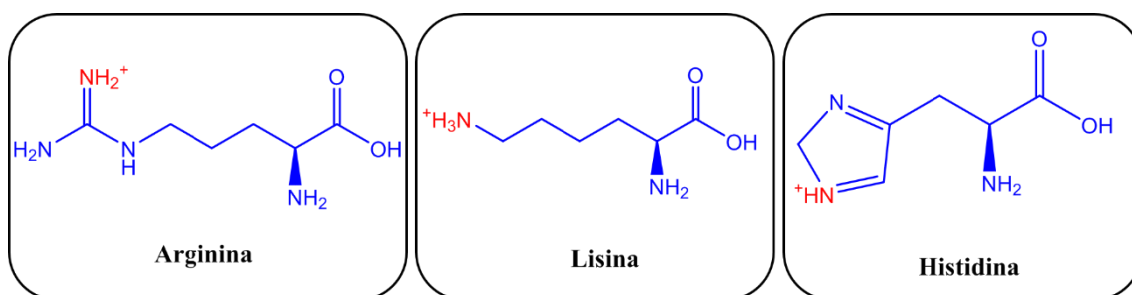


Figura 42 - Representação da estrutura química dos aminoácidos polares com carga positiva com maior probabilidade de se ligarem aos grupos COOH.

6.4 Efeito do tempo de exposição ao plasma ar sobre a capacidade de adsorção da proteína BSA pelas MNPS

Como já mencionado ao longo deste trabalho, o tratamento de superfícies não reativas pela utilização da técnica de plasma é um método rápido e eficaz para a modificação de superfícies poliméricas com o intuito de torná-las quimicamente reativas a biomoléculas [19].

Nesse sentido, estudamos o comportamento da membrana frente ao tratamento ao plasma de ar, examinando a influência dos diferentes tempos de exposição a esse tratamento sobre a capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS em meio aquoso. Nós percebemos que o percentual de remoção aumenta gradativamente à medida que as MNPS são submetidas a maiores tempos de tratamento (Fig. 43), sendo o maior percentual (44,86%) de remoção da BSA por adsorção na superfície das MNPS atingido para 14 min de exposição ao plasma. Os percentuais de recuperação de BSA encontrados foram de 21,43; 30,29 33,60; 41,22; 44,86; 43,12 e 38,9% para os tempos de 1, 3, 5, 8, 14, 17 e 20 min, respectivamente. Esse resultado se deve a uma combinação das propriedades oriundas da modificação pelo plasma, especialmente a elevada densidade de poros e a presença de um maior número de sítios ativos na superfície das membranas (o que corrobora os resultados obtidos quando da quantificação dos COO⁻ pelo método

TBO relatado no Capítulo 5). Para os tempos de exposição de 17 e 20 min, observamos um decréscimo na adsorção de BSA, o que se deve ao fato de que tempos mais elevados de tratamento ocasionam um desgaste das fibras da membrana, provocando rupturas em sua estrutura (conforme discutido no Capítulo 5, quando da caracterização morfológica das MNPS) e prejudicando dessa maneira a adsorção da BSA pelas MNPS. Concluimos, portanto, que as MNPS modificadas pelo plasma com 14 min de tratamento seriam aquelas mais adequadas para dar continuidade no uso em colunas de separação para a BSA.

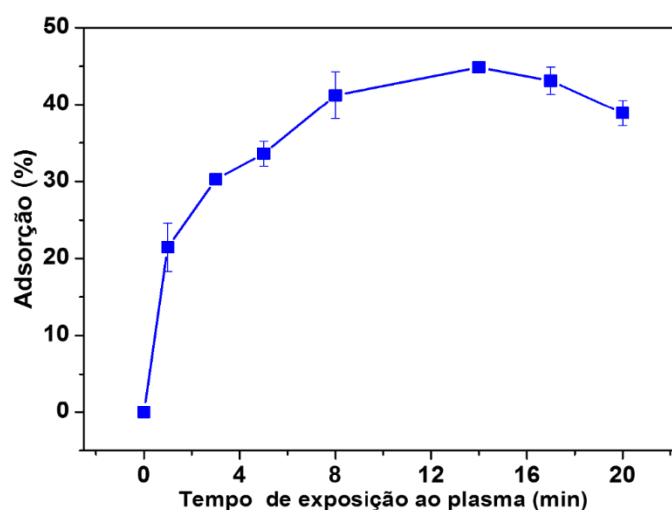


Figura 43 - Percentual de adsorção de BSA pelas MNPS como função do tempo de exposição (0 a 20 min) das membranas ao tratamento por plasma.

6.5 Caracterização química das MNPS após as etapas de adsorção

As MNPS submetidas ao processo de adsorção da BSA foram analisadas quanto à sua composição química, com a finalidade de identificar os grupos químicos característicos da proteína e verificar se de fato as membranas estavam retendo a BSA em sua superfície.

Ao analisar o espectro de FTIR para a BSA pura (Fig. 44-c), encontramos os picos característicos associados às amidas primárias e secundárias, com comprimento de onda em 1687 cm^{-1} que corresponde às amidas primárias (atribuído às vibrações de alongamento do C-O) e em 1544 cm^{-1} às amidas secundárias (atribuído às vibrações de flexão do N-H e do C-N), e ainda em 3381 cm^{-1} , o que se deve às vibrações de alongamento dos grupos hidroxila (OH) [149].

Na Fig. 44-a, estão presentes os picos referentes as MNPS submetidas a 14 min de tratamento por plasma, que já foram discutidos no Capítulo 5 (Seção 5.2.2). Já no espectro da Fig. 44-b, podem ser identificados os picos correspondentes aos grupos funcionais das MNPS modificadas com 14 min de plasma que foram submetidas ao procedimento de adsorção da proteína BSA: para esse caso, percebemos o surgimento dos picos característicos da BSA nos comprimentos de onda referentes às amidas primárias e secundárias (1687 cm^{-1} e 1544 cm^{-1} , respectivamente), e em 3381 cm^{-1} estão presentes os grupos OH da BSA, e ainda identificamos que houve o desaparecimento do pico referente aos grupos carboxílicos (1730 cm^{-1} , o que pode ser resultado da interação com os grupos da BSA), que antes estavam presentes nas MNPS modificadas pelo plasma (Fig. 44-a). Assim, pelo uso da técnica de FTIR nós podemos concluir, que devido à presença dos picos referentes aos grupos funcionais da BSA no espectro das MNPS que foram submetidas ao processo de adsorção, a BSA de fato foi adsorvida pelas nossas MNPS, indicando que os grupos amino da BSA interagiram com os carboxílicos dessas membranas.

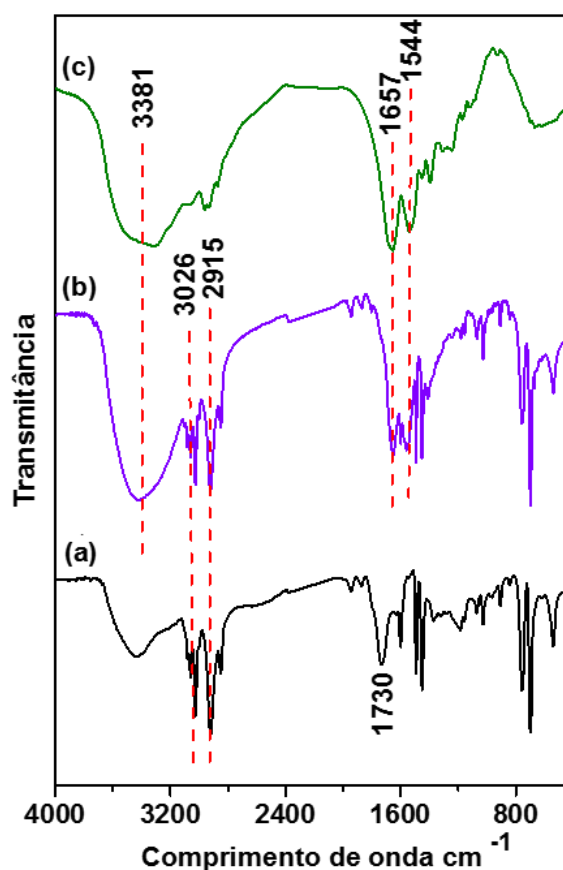


Figura 44 - Espectros de FTIR das MNPS a) após modificação com 14 min de exposição ao plasma, b) após 14 min de exposição ao plasma em que foram usadas no procedimento de adsorção de BSA e c) BSA pura.

6.6 Capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS

A capacidade de adsorção pelas MNPS, expressa em termos de massa (mg) de BSA por grama (g) de MNPS, é mostrada na Fig. 45, onde podemos notar que a máxima capacidade de adsorção foi de 55,07 mg/g para uma concentração de proteína no meio igual a 3,6 mg.mL⁻¹. Para as concentrações de 0,6; 0,9; 1,2; 1,8 e 2,4 mg.mL⁻¹ as capacidades de adsorção foram de 48,08; 50,76; 52,96 e 54,21 mg/g, respectivamente.

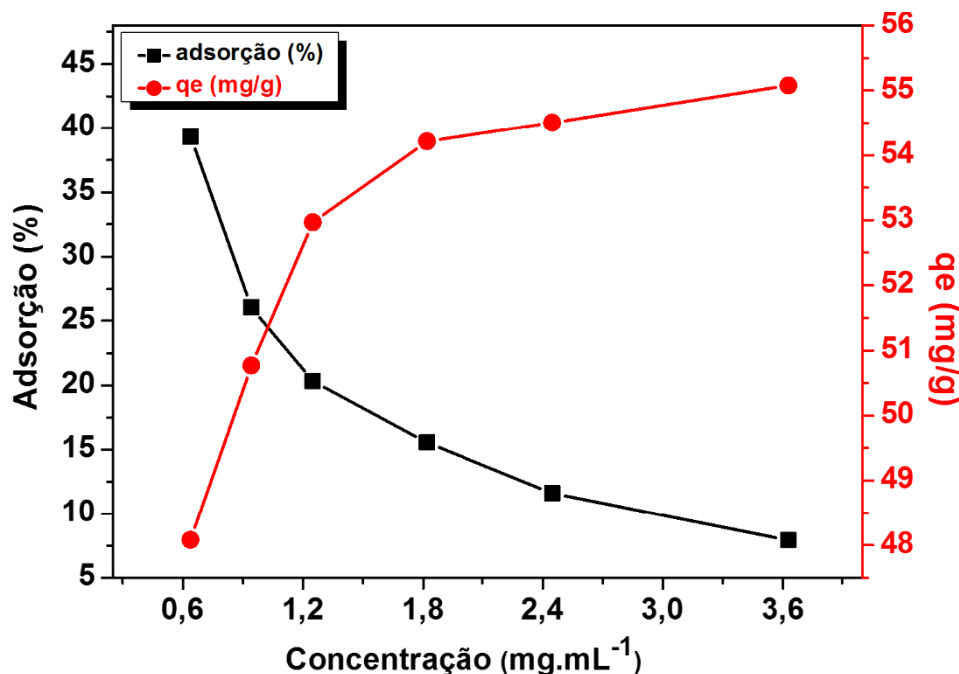


Figura 45 - Capacidade de adsorção da BSA pelas MNPS como função da concentração inicial de proteína no meio.

Embora a eficiência de remoção da BSA diminua com o aumento da concentração, a capacidade de adsorção pelas MNPS aumenta (Fig. 45), pois para concentrações maiores existe um maior número de moléculas para uma mesma quantidade de MNPS (0,00261 g). Por exemplo, para a concentração de 0,6 mg.mL⁻¹, o percentual de remoção foi 44,86% e a respectiva capacidade de adsorção foi de 48,08 mg/g, enquanto para a maior concentração o percentual foi de 7,93% com sua capacidade de adsorção sendo 55,07 mg/g. Esse comportamento, pode ser explicado como sendo devido aos efeitos de transferência de massa entre BSA/MNPS, onde a força motriz para que aconteça a transferência de massa de moléculas de BSA para MNPS torna-se maior com o aumento da concentração de BSA no meio.

6.7 Isotermas de adsorção

Para melhor avaliar os processos interfaciais que poderiam estar ocorrendo entre MNPS/BSA durante a adsorção da BSA, fizemos o ajuste dos dados experimentais obtidos no estudo de capacidade de adsorção às equações dos modelos de isoterma de monocamada de Langmuir e multicamadas de Freundlich (ver Capítulo 4, na Seção 4.6.4).

Como indicado na Fig. 46, uma tendência de maior linearidade é encontrado para relação de C_e/q_e em função de C_e , e desse modo o modelo que melhor descreve a adsorção de BSA na superfície das MNPS é o de isoterma de Langmuir (coeficiente de correlação, $R^2=0,99$). Baseado nesse modelo, a capacidade máxima (q_m) de adsorção de BSA pelas MNPS foi de 100 mg/g, o que deve ser comparado a isoterma de Freundlich, para a qual foi obtido um valor inferior ($R^2=0,95$ e $K_f=33,11$). Os parâmetros calculados para ambas as isotermas e os valores encontrados estão resumidos na Tabela 5.

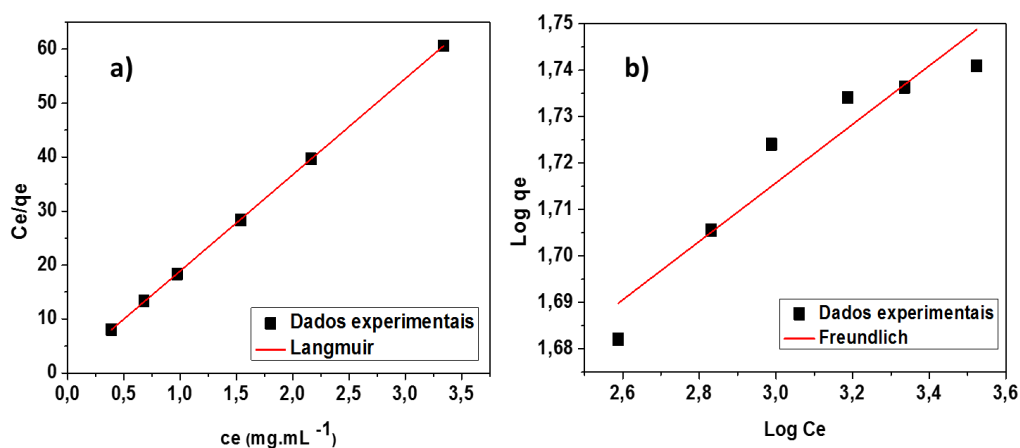


Figura 46 - Modelos de isoterma de a) Langmuir e b) Freundlich, encontrados para o ajuste linear dos dados experimentais para adsorção de BSA pelas MNPS.

Tabela 5 - Parâmetros calculados para as isotermas de Langmuir e Freundlich para a adsorção da BSA pelas MNPS.

Constantes de Langmuir			Constante de Freundlich		
$q_m(\text{mg/g})$	$b (\text{L/mg})$	R^2	$K_f (\text{mg/g})$	$1/n (\text{mg/g})$	R^2
100	0,008	0,99	33,11	0,06	0,95

Na Fig. 47, em que são representados os dados obtidos para os dois modelos de isoterma, percebemos de maneira mais clara que os pontos referentes aos dados experimentais estão mais próximos à isoterma do modelo de Langmuir. Este modelo é ajustável a processos de quimisorção, onde a superfície contém um número finito de sítios idênticos e bem definidos, cada um com a mesma energia de adsorção. Desse modo as moléculas que são adsorvidas desse modo não interagem com as moléculas vizinhas, e cada uma se deposita em um único sítio, o que faz com que esse modelo seja conhecido como o de deposição em monocamada [150]. Essas informações sugerem, portanto, que a adsorção de BSA pelas MNPS corresponde a uma adsorção em monocamada, ou seja, para cada sítio de ligação com as MNPS deve ser ocupado por uma molécula de BSA.

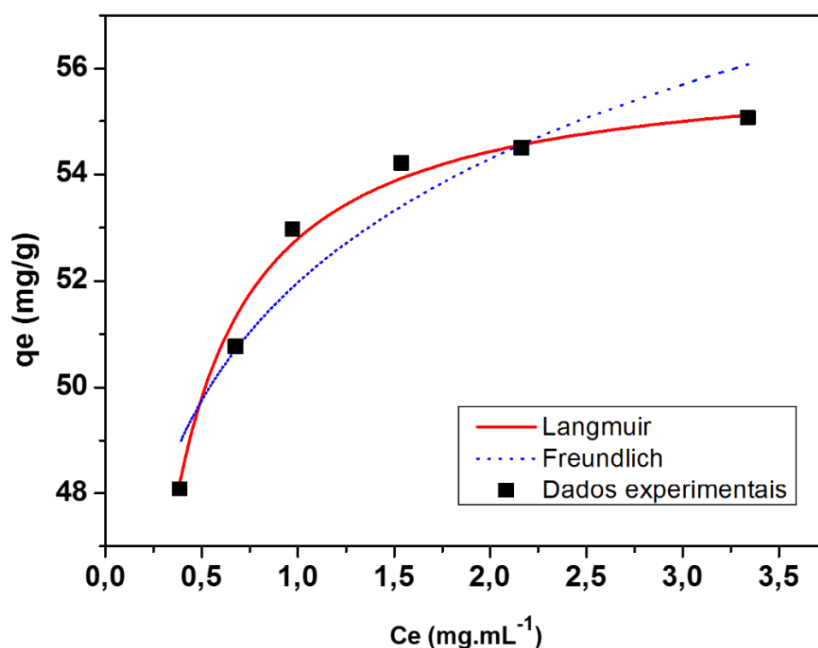


Figura 47 - Ajuste dos dados experimentais aplicados a isoterma de Lagmuir (linha sólida vermelha), isoterma de Freundlich (linha pontilhada em azul) e os dados experimentais da adsorção de BSA pelas MNPS (quadrados em preto).

6.8 Experimentos de dessorção

Uma vantagem dos materiais adsorventes que dependem do mecanismos de interação eletrostática com moléculas biológicas, é a sua capacidade de liberar essas moléculas em um novo meio.

De acordo com o discutido anteriormente (Seção 6.3), os grupamentos amino da proteína BSA se ligam aos sítios ativos presentes nas MNPS (COO^-) por meio de interações eletrostáticas. Como as MNPS adsorvem a proteína em meio levemente ácido (pH 5,0), a fim de que elas possam eluir as moléculas de BSA, ou seja, dessorver, investigamos uma série de soluções tampão com pH básico, cujo valor variou entre 8,0 e 10,0 (Fig. 48), para determinar aquela que apresente uma maior eficiência de dessorção. A utilização da solução tampão com pH básico é para que ocorra a neutralização das interações entre BSA/MNPS, permitindo assim o rompimento das ligações eletrostáticas, de modo a proporcionar a liberação da BSA na nova solução.

Para esse estudo, foi realizado o procedimento de adsorção de BSA ($0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, pH 5,0) pelas MNPS (modificadas com 14 min de plasma). Em seguida, essas MNPS foram lavadas com água deionizada para remover as moléculas de BSA não adsorvidas. Posteriormente, submetemos as MNPS ao processo de dessorção.

Investigamos a eficiência no processo de eluição da BSA pelas MNPS de três maneiras:

1. Adicionamos 500 μL de uma solução de eluição (pH básico) a uma coluna de centrifugação contendo as MNPS com as proteínas adsorvidas, e passamos pela centrífuga com 1 min.
2. Adicionamos duas vezes 250 μL de uma solução de eluição (pH básico) a uma coluna de centrifugação contendo as MNPS com as proteínas adsorvidas, passando pela centrífuga com 1 min em cada eluição.

(Os resultados referentes a metodologia 1 e 2, podem ser encontrados no Apêndice A.3 (Fig.A.5)).

3. Adicionamos duas vezes 125 μL de uma solução de eluição (pH básico) a uma coluna de centrifugação contendo as MNPS com as proteínas adsorvidas, aguardando 1 min antes de cada eluição para que a solução tivesse interação com a membrana antes de passar pela centrífuga durante 30 s.

Dentre as metodologias citadas acima, a terceira foi aquela que nos permitiu uma maior eficiência para a dessorção de BSA pelas MNPS. Inicialmente, tivemos dificuldade para eluir a BSA das MNPS, uma vez que as proteínas adsorvem fortemente em superfícies sólidas quando são usadas solução de ligação tamponantes [151], sendo necessário um pH altamente básico e um tempo de contato longo o suficiente para que venha a ocorrer a quebra da ligação entre MNPS/BSA. Sendo assim o percentual de BSA

dessorvido pelas MNPS com as soluções de eluição que utilizamos esteve entre 37,36 – 70,81% de BSA. Podemos concluir a partir deste estudo, que as MNPS com o auxílio de uma solução de eluição de 1,5 M Tris-HCl (pH 10,0) possuem um boa taxa de recuperação da proteína BSA, e que a eficiência de dessorção pode ainda ser melhor se for aumentado o tempo de contato entre solução de eluição/MNPS, sendo uma das perspectivas para este trabalho.

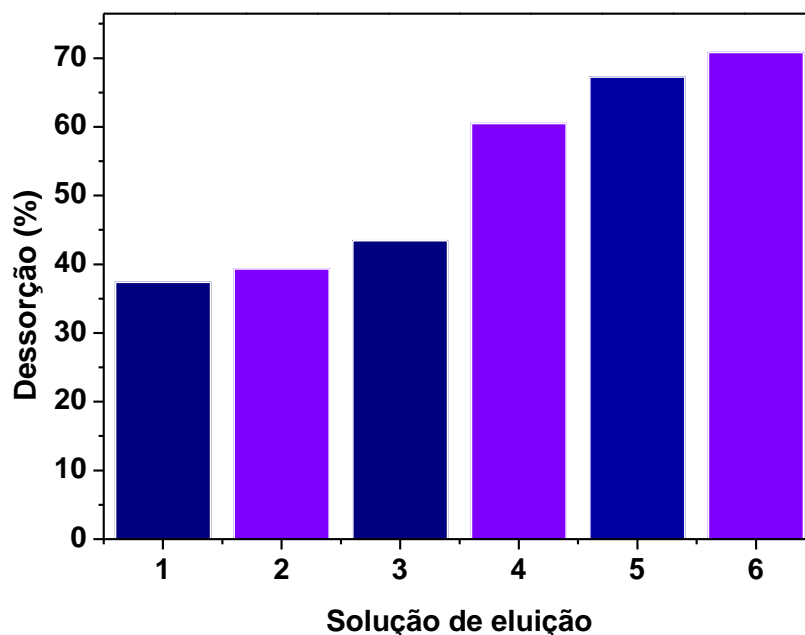


Figura 48 - Percentual de BSA dessorvida para diferentes tipos de solução tampão de eluição utilizada. Em (1) NaH₂PO₄ 0,2 M – Na₂HPO₄ 0,2 M, pH 8,0 (2) Tris-EDTA pH 8,0 (3) NaOH-Gli, pH 10,0 (4) Tris-Gli, pH 10,0 (5) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (6) 1,5 M Tris-HCl, pH 10,0.

6.9 Comparação com outros materiais

Quando comparamos as MNPS aos materiais reportados pela literatura (Tabela 6), encontramos que as MNPS carboxiladas exibem capacidade de adsorver e dessorver a BSA em um tempo muito inferior. Embora Lou, K. *et.al* (2016) [152] e Zang, Q. *et.al* (2016) [153] demonstraram materiais que possuem uma capacidade de adsorção mais elevada (140 e 65 mg/g, respectivamente) quando comparados às MNPS (55,07 mg/g), o tempo requerido para que neles ocorresse a adsorção da BSA foi para ambos 180 min, enquanto as MNPS adsorvem em apenas 5 min. Deve ser observado ainda que nesses trabalhos não é discutido o processo de dessorção da proteína. Quando comparamos as MNPS com a membrana relatada por Lan, T. *et.al* (2015) [17], mais uma vez encontramos

que capacidade de adsorção é superior (300,11 mg/g) para um tempo muito elevado de adsorção (480 min) e dessorção (60-70 % em um período de 600 min). Por outro lado, o adsorvente descrito por Lai *et. al* (2012)[154] adsorve 42,7 mg/g (uma capacidade inferior) para o mesmo tempo de adsorção de 5 min.

Tabela 6 - Comparação das MNPS com outros materiais reportados na literatura utilizadas para adsorver BSA.

Adsorvente	Adsorção qe(mg/g)	pH de adsorção	Tempo de Equil. de adsorção (min)	% Desso r.	pH da solução de eluição	Tempo de eluição (min)	Ref.
MWCNTs-COOH	140	7,4	180	----	----	---	[152]
CDNA	300,11	7,2	480	60-70	4	600	[17]
MEP HyperCel	65	5,0	180	---	---	---	[153]
PA-MNPs	42,7	7,0	5	----	----	----	[154]
GNPs	109,54	8,6	20	---	---	---	[83]
CSX	96,4	5,5	1440	---	---	---	[155]
MWNTs@Fe₃O₄-MIPs	52,8	4,7	40	---	---	---	[156]
GMA-co-EDMA/AuNP	16,6	5,0	---	94,8	≥11	---	[157]
CNTs	132–266	7,0	4320	---	---	---	[158]
CS-Fe₃O₄NPs	96,5	6,0	45	---	---	---	[159]
MNPS	55	5	5	70	10	3 min	Este trabalho

Legenda: MWCNTs-COOH (nanotubos de carbono caboxilados), CDNA (membrana de nitrato de diacetato de celulose), PA-MNPs (nanopartículas magnéticas revestidas com poliarginina), GNPs (nanopartículas de ouro), CSX (hidrogéis de quitosana reticulados com glutaraldeído), MWNTs@Fe₃O₄-MIPs (nanopartículas de óxido de ferro/nanotubos de carbono), CNTs (nanotubos de carbono), CS-Fe₃O₄NPs (nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana).

As características químicas e morfológicas das MNPS, e sua capacidade em adsorver quantidades significativas de BSA em um tempo curto de 5 min e dessorver em 3 min, faz com que possamos sugerir que essas membranas apresentem um excelente desempenho para protocolos de extração de proteínas a partir de meios aquosos, e apresentando uma boa competitividade com relação a outros materiais usados para esse fim.

6.10 Eletroforese

Fizemos uso da técnica de eletroforese de proteínas para acompanhar as etapas do processo de separação de BSA pelas MNPS. Para isso, colocamos em cada poço do gel de PAGE-NATIVO uma amostra referente a cada etapa de adsorção/dessorção de BSA. Na Fig. 49 podemos verificar as bandas de eletroforese correspondentes, onde no poço 1, se encontra a amostra padrão de proteínas, e seus respectivos pesos moleculares. Esse padrão serve como referência para identificarmos a banda que corresponde ao peso molecular da BSA (66 kDa). No poço 2, foi depositada a amostra referente a solução de BSA antes da interação com as MNPS, enquanto que no poço 3 é demonstrada a solução sobrenadante de BSA após interação com as MNPS. É possível notar que após essa etapa a qualidade da BSA dissolvida na solução sobrenadante não foi afetada, uma vez que as bandas características são mantidas.

As amostras 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (Fig. 49) correspondem à etapa de dessorção, com suas respectivas soluções de eluição. Para cada uma dessas amostras, podemos verificar a presença da banda característica da BSA, confirmando que as soluções de eluição não ocasionaram a desnaturação dessa proteína.

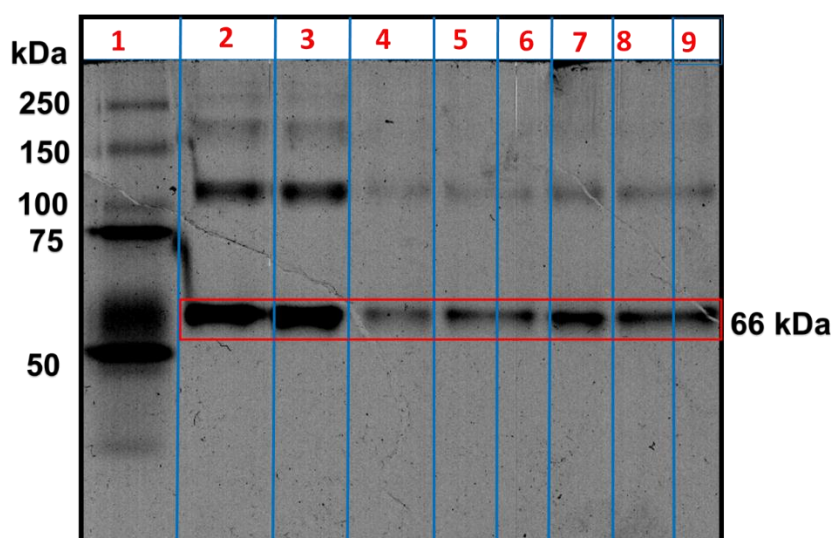


Figura 49 - Eletroforese em PAGE-NATIVO, (1) padrão de proteínas, (2) solução de BSA inicial, (3) solução de BSA sobrenadante. Eluição da BSA com (4) NaH₂PO₄ 0,2 M– Na₂HPO₄ 0,2 M, pH 8,0 (5) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (6) Gli-NaOH 0,2 M, pH 10,0 (7) 1,5 M Tris-HCl, pH 10,0 (8) Tris-Gli, pH 10, (9) NaOH-Gli, pH 10,0.

Por meio da análise do gel de eletroforese de proteínas, nós concluímos que a estrutura nativa da BSA foi mantida após cada etapa do processo de adsorção/dessorção. Cada uma das soluções de eluição utilizadas para dessorver a BSA das MNPS, manteve a estrutura nativa da BSA. Esse resultado demonstra o potencial de aplicação para as MNPS como adsorvente em processos de separação que desejam preservar a atividade biológica característica de cada uma dessas moléculas.

7

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, analisamos inicialmente a preparação de membranas nanoestruturadas de poliestireno obtidas pela técnica de eletrofiação e a caracterização de suas propriedades. Nós mostramos que quando funcionalizadas por um plasma de ar as MNPS passaram a exibir capacidade de adsorver proteínas BSA.

Como resultado dos trabalhos de caracterização realizados, algumas conclusões podem ser obtidas. Em primeiro lugar, um tratamento térmico-mecânico foi importante para a compactação das fibras das MNPS obtidas por meio da técnica de eletrofiação, o que favoreceu uma maior resistência mecânica desse material. As MNPS fabricadas pelo procedimento de eletrofiação tiveram uma morfologia de fibras com superfície lisas e exibiram um caráter hidrofóbico. Um experimento inicial mostrou que em sua forma original, ou seja, logo após serem eletrofiadas, as MNPS apresentavam baixa capacidade de adsorver moléculas de BSA.

A funcionalização dessas MNPS pelo plasma se mostrou um método econômico, rápido e eficiente que proporcionou mudanças em sua superfície adquirindo uma série de características desejáveis como hidrofiliabilidade, presença de sítios químicos reativos (COOH), assim como uma elevada densidade de poros na superfície das fibras, o que aumentou em muito sua área superficial. Diante desses resultados, as MNPS assim tratadas mostraram possuir propriedades superficiais de interesse para aplicações em métodos de separação de biomoléculas. Em um estudo detalhado mostramos que as MNPS funcionalizadas pelo plasma foram capazes de remover uma boa quantidade de moléculas de BSA a partir de meios aquosos.

As membranas tratadas pelo plasma apresentaram um elevado número de grupos carboxílicos, e se mostraram capazes de adsorver a BSA em sua superfície, mediante ligações eletrostáticas entre seus grupos carregados negativamente (COO^-) e os grupos positivos (NH^+) da proteína.

Os experimentos de adsorção mostraram que a capacidade de adsorção da BSA por essas membranas carboxiladas foi dependente do pH do meio, da concentração inicial

de BSA e do tempo de tratamento das MNPS. Desse modo, a funcionalização das MNPS por sua exposição ao plasma de ar se mostrou decisiva para melhorar o seu desempenho na remoção da BSA a partir de soluções aquosas. As condições otimizadas onde encontramos a máxima capacidade de adsorção de 55,07 mg/g foi para a BSA dissolvida em uma solução de 2 M HAc-NaAc com pH 5,0, para uma concentração inicial de BSA de 3,6 mg.mL⁻¹ utilizando as MNPS modificadas com 14 min de tratamento.

Os dados experimentais obtidos para a adsorção da BSA por nossas membranas carboxiladas foram bem ajustados pela isoterma de monocamada de Langmuir. Nós demonstramos que as MNPS não apenas adsorveram bastante a BSA, mas também foram capazes de dessorvê-las com a utilização de uma solução básica. As membranas foram capazes de eluir satisfatoriamente 70% (33,66 mg/g) de BSA em uma solução de 1,5 M Tris-HCl (pH 10,0).

Um resultado importante, e que foi confirmado pela eletroforese em PAGE-NATIVO, foi que a estrutura nativa da BSA não foi afetada pela interação com as MNPS, com a qualidade das proteínas dissolvidas nas soluções antes e após o processo de adsorção/dessorção permanecendo inalterada. Isso confirma nossa hipótese inicial de que essas MNPS carboxiladas modificadas pela ação de um plasma podem se mostrar materiais promissores para uso em protocolos para a recuperação de proteínas de interesse sem que seja afetada sua atividade biológica.

Portanto, podemos concluir que as nossas membranas carboxiladas devido a facilidade para a sua obtenção e modificação, assim como sua estrutura porosa. Apresentam vantagens competitivas em relação aos outros materiais discutidos na literatura, com boa capacidade de adsorção/dessorção em um curto espaço de tempo, com um percentual significativo de BSA sendo adsorvido em apenas 5 min, e posteriormente dessorvida em 3 min. Com base nos resultados apresentados nesta dissertação, pode-se esperar que as MNPS possam ser utilizados como substratos sólidos para fins analíticos em processo de separação de proteínas. Para isso, pretendemos dar continuidade a este trabalho, para melhorar o desempenho de adsorção e dessorção pelas MNPS.

8

8 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados apresentados nesta dissertação, as perspectivas de continuidade deste trabalho envolvem a realização de experimentos adicionais necessários para elucidar algumas propriedades das MNPS ainda não entendidas, como por exemplo, a estabilidade dos COOH que são formados nas MNPS pela modificação com o plasma e o diâmetro dos poros na superfície dessas membranas. Na aplicação do material, estabelecer a quantidade de MNPS necessária para capturar uma determinada concentração de proteína e como essas membranas se comportam frente a uma mistura de proteínas. Esse material demonstra ser promissor para o desenvolvimento de sistemas mais elaborados para a aplicação em processos de separação de outras proteínas e potencial para serem aplicadas como sensores de proteínas, por exemplo, essas membranas podem ser modificadas pela imobilização de anticorpos específicos em sua superfície para o reconhecimento de imunoglobulinas. Citamos aqui algumas questões fundamentais que justificam a continuidade deste trabalho:

a) Estabilidade dos carboxílicos formados nas MNPS

Para as MNPS modificadas por 14 min de tratamento a plasma, levantamos o seguinte questionamento: decorridos alguns dias desde a exposição ao plasma, essas MNPS continuam a adsorver a BSA? Realizamos um teste em que depois de decorridos 12 dias de modificação das MNPS, permitimos sua interação com uma solução de BSA (0,6 mg.mL⁻¹, pH 5,0), e analisamos as soluções sobrenadantes pela técnica de UV-Vis. Uma particularidade encontrada neste teste foi que os COOH originados nas membranas têm um tempo de vida útil considerável, e que mantiveram sua capacidade em remover a BSA da solução aquosa. Acreditamos, portanto, que quando armazenadas corretamente, as MNPS podem ter aplicabilidade mesmo decorridos vários dias desde a sua modificação, uma característica importante para seu uso prático em análises de laboratório.

b) Redução dos ciclos de adsorção e aumento do percentual de remoção da proteína

Acreditamos que o desempenho dessas colunas compostas por nossas MNPS poderia ser ainda melhorado se o número de ciclos de adsorção viesse a ser reduzido, com o percentual de proteína removida da solução sendo aumentado. Para atingir esse objetivo, uma possibilidade seria aumentarmos a quantidade de membranas dentro da coluna spin. Sendo assim, seria importante estudarmos qual o número de membranas adequado para ser empilhado dentro de uma coluna spin, sem que elas venham a interferir no fluxo da solução através da coluna.

Mostramos em nosso trabalho, que quando nós utilizamos 4 membranas elas removem 44,86% de BSA após 5 ciclos de adsorção (5 min). Em um teste preliminar, empilhamos 14 membranas (modificadas pela exposição a 14 min de plasma) dentro de uma coluna spin, por onde passamos uma solução de BSA (pH 5,0, $C_i = 0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$) através dela. Na Fig. P.1, podemos notar que já no primeiro ciclo de adsorção o percentual de remoção foi de 51,97%, enquanto que para o 5º ciclo de adsorção (5 minutos), o percentual de BSA adsorvida pelas MNPS aumentou para 70%. Devido à fina espessura das membranas e o seu empacotamento dentro da coluna spin, a utilização de 14 membranas não prejudicou o fluxo da solução.

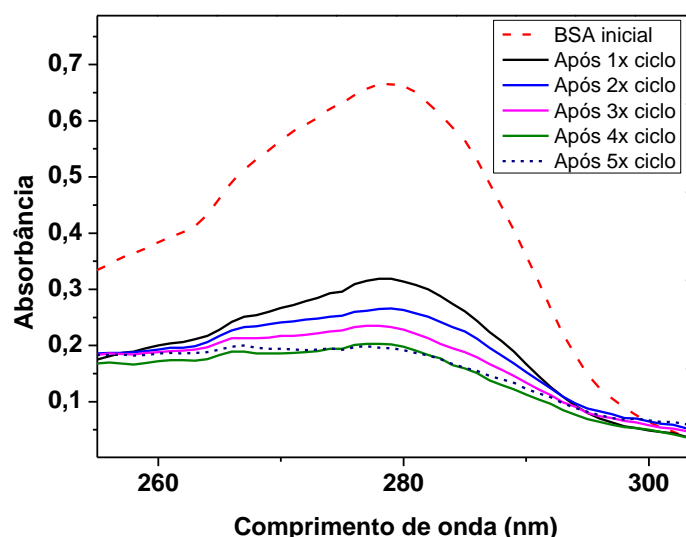


Figura P.1 Espectros de UV-Vis da solução inicial de BSA e solução de BSA sobrenadante após a interação com MNPS modificadas por exposição a 14 min de plasma.

c) Seletividade das MNPS e aplicações específicas

Para permitir a utilização das MNPS em aplicações práticas, iremos estudar de maneira mais detalhada, a seletividade das MNPS para a adsorção de diferentes proteínas de interesse. Uma possibilidade seria partirmos de uma mistura de proteínas e realizar a separação de acordo com o valor do ponto isoelétrico característico de cada uma delas. Nesse aspecto, nós pretendemos desenvolver diferentes metodologias para tornar as membranas específicas para proteínas de interesse (em particular para imunoglobulinas G (IgG), uma vez que essas proteínas são importantes para o diagnóstico de doenças). Para isso, iremos realizar a incorporação de polímeros condutores, como por exemplo, a polianilina (PANI), agentes de acoplamento e ligantes de afinidade (anticorpos, por exemplo). Depois de desenvolver o protocolo mais adequado com base em sistemas modelos, iremos testar o desempenho dessas membranas para uma mistura real de proteínas.

Em um teste inicial, incorporamos a polianilina (polímero condutor) às MNPS. Essas membranas de MNPS/PANI foram tratadas com uma solução de glutaraldeído 2% (preparada em meio tampão de PBS 10 mM, pH 7,4) durante 1 h. Em seguida, lavamos essas MNPS/PANI com PBS e água deionizada e as deixamos secando. Nosso intuito foi o de preparar a superfície dessas membranas para que elas pudessem adsorver a IgG. Para isso, colocamos as MNPS/PANI para interagir com 2 mL de uma solução de IgG (em meio de NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M, pH 6,0) durante 2 h, em modo batelada.

O resultado desse teste pode ser visto na Fig. P.2, onde após interação com as MNPS/PANI, a concentração de IgG na solução decresce. Com esse resultado podemos propor que essas membranas poderiam adsorver a IgG. Para dar continuidade nesse estudo, nossa proposta é incorporar o anti-IgG (antígeno) para adsorver especificamente essa proteína a partir de amostras biológicas, visto que capturar a IgG é de grande importância, no entanto, é uma problemática devido à grande quantidade de outras proteínas no plasma sanguíneo (principalmente as albuminas), que dificultam o processo de purificação da IgG.

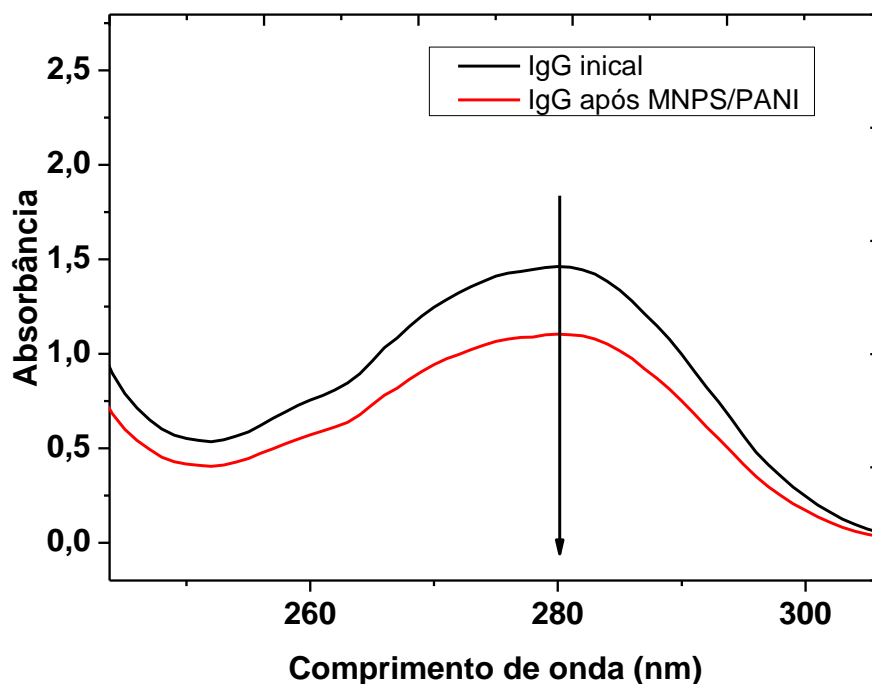


Figura P.2 Espectros de UV-Vis da solução inicial de IgG (preto) e solução sobrenadante de IgG (vermelho) após interação com as MNPS/PANI modificadas com glutaraldeído 2%.

d) Escalonamento

Diante das inúmeras possibilidades de modificação dessas membranas, acreditamos ser possível o desenvolvimento de sistemas bem elaborados para diferentes aplicações práticas. Nesta dissertação nós estabelecemos a viabilidade do uso das MNPS para aplicações analíticas em separação de proteínas, mais especificamente a BSA. Em uma visão de mais longo alcance, pretendemos investigar a possibilidade de ampliar o uso das MNPS em sistemas de separação para diferentes proteínas (especialmente a IgG), e também utilizar sistemas de maior porte e maiores tamanhos com maiores proporções em volume de amostra e diferentes quantidade de membranas incorporados.

REFERÊNCIAS

- [1] N. H. C. S. Silva, C. Vilela, I. M. Marrucho, C. S. R. Freire, C. Pascoal Neto, and A. J. D. Silvestre, "Protein-based materials: from sources to innovative sustainable materials for biomedical applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 24, p. 3715, 2014.
- [2] E. V. Suprun, V. V. Shumyantseva, and A. I. Archakov, "Protein Electrochemistry: Application in Medicine. A Review," *Electrochim. Acta*, vol. 140, pp. 72–82, 2014.
- [3] A. Kessel and N. Ben-Tal, *Introduction to Proteins: Structure, Function, and Motion*, 4th ed. London, 2012.
- [4] M. P. Beaumont-Epinette *et al.*, "Heavy/light chain specific immunoglobulin ratios provides no additional information than serum proteins electrophoresis and immunofixation for the diagnosis and the follow-up of intact immunoglobulin multiple myeloma patients," *Pathol. Biol.*, vol. 63, no. 4–5, pp. 215–221, 2015.
- [5] P. Steffen *et al.*, "Protein species as diagnostic markers," *J. Proteomics*, vol. 134, pp. 5–18, 2016.
- [6] L. Griffin, P. Annaert, and K. I. M. L. R. Brouwer, "Influence of Drug Transport Proteins on the Pharmacokinetics and Drug Interactions of HIV Protease Inhibitors," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 9, pp. 3636–3654, 2011.
- [7] E. Tamyurek, E. Maltas, S. Z. Bas, M. Ozmen, and S. Yildiz, "Magnetic nanoparticles-serum proteins bioconjugates for binding of irinotecan," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 73, no. 1, pp. 76–83, 2015.
- [8] Q. Peng and H. Mu, "The potential of protein-nanomaterial interaction for advanced drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 225, pp. 121–132, 2016.
- [9] C. Y. Dombu and D. Betbeder, "Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 34, no. 2, pp. 516–525, 2013.
- [10] F. Militano, T. Poerio, R. Mazzei, E. Piacentini, A. Gugliuzza, and L. Giorno, "Influence of protein bulk properties on membrane surface coverage during immobilization," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 143, pp. 309–317, 2016.
- [11] T. Taniguchi *et al.*, "Detection of antibody-antigen reaction by silicon nitride slot-ring biosensors using protein G," *Opt. Commun.*, vol. 365, pp. 16–23, 2016.

- [12] S. C. Tan and B. C. Yiap, "DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2009, pp. 1–10, 2009.
- [13] S. Dziomba, M. Araya-Farias, C. Smadja, M. Taverna, B. Carbonnier, and N. T. Tran, "Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 955, pp. 1–26, 2017.
- [14] D. Martínez-maqueda, B. Hernández-ledesma, L. Amigo, B. Miralles, and J. Á. Gómez-ruiz, *Extraction / Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion*. Springer Science+Business Media, New York, 2013., 2013.
- [15] H. F. Liu, J. Ma, C. Winter, and R. Bayer, "Recovery and purification process development for monoclonal antibody production," *mAbs, Landes Biosci.*, vol. 2, no. 5, pp. 480–499, 2010.
- [16] J. Ma, X. Wang, Q. Fu, Y. Si, J. Yu, and B. Ding, "Highly Carbonylated Cellulose Nanofibrous Membranes Utilizing Maleic Anhydride Grafting for Efficient Lysozyme Adsorption," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, p. 150701134231008, 2015.
- [17] T. Lan *et al.*, "Electrospun nanofibrous cellulose diacetate nitrate membrane for protein separation," *J. Memb. Sci.*, vol. 489, pp. 204–211, 2015.
- [18] N. E. Zander, J. A. Orlicki, A. M. Rawlett, and T. P. Beebe, "Quantification of protein incorporated into electrospun polycaprolactone tissue engineering scaffolds," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 4, pp. 2074–2081, 2012.
- [19] B. R. Coad, M. Jasieniak, S. S. Griesser, and H. J. Griesser, "Controlled covalent surface immobilisation of proteins and peptides using plasma methods," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 233, pp. 169–177, 2013.
- [20] V. K. Thakur, M. K. Thakur, P. Raghavan, and M. R. Kessler, "Progress in Green Polymer Composites from Lignin for Multifunctional Applications : A Review Progress in Green Polymer Composites from Lignin for Multifunctional Applications : A Review," *Am. Chem. Soc.*, vol. 2, p. 1072–1092, 2014.
- [21] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, "Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing," *Int. J. Pharm.*, vol. 463, no. 2, pp. 127–136, 2014.
- [22] E. B. Mano and L. C. Mendes, "Introdução a Polímeros," p. 208, 2004.
- [23] S. V. Canevarolo Jr., "Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros," *Ciência dos Polímeros um texto básico para tecnólogos e Eng.*, pp. 139–168, 2006.
- [24] R. O. Ebewele, *POLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY*. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 2000.

- [25] W. . Callister Jr., “Ciências dos Materiais Callister.pdf.” LTC, Rio de Janeiro, p. 370, 2007.
- [26] E. B. Mano and L. C. Mendes, *A natureza e os polímeros - meio ambiente, geopolímeros, fitopolímeros e zoopolímeros*, vol. I. 2013.
- [27] A. F. Padilha, “Materiais de engenharia: microestrutura e propriedades,” *Hemus*, p. 343, 2000.
- [28] A. J. Motheo, *Aspects on Fundaments and Applications of Conducting Polymers*, First., vol. 1. Rijeka, Croatia, 2012.
- [29] Cole Lynwood, Ed., *POLYSTYRENE: SYNTHESIS, SYNTHESIS, CHARACTERISTICS AND APPLICATIONS*. 2014.
- [30] A. Vesel, “Modification of polystyrene with a highly reactive cold oxygen plasma,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 205, no. 2, pp. 490–497, 2010.
- [31] H. Wiebeck and J. Harada, “Plásticos de engenharia: Tecnologia e Aplicações,” p. 352, 2005.
- [32] Z. Liu, J. Yan, Y. E. Miao, Y. Huang, and T. Liu, “Catalytic and antibacterial activities of green-synthesized silver nanoparticles on electrospun polystyrene nanofiber membranes using tea polyphenols,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 79, pp. 217–223, 2015.
- [33] Y. Wang *et al.*, “CsPbBr₃ Perovskite Quantum Dots-Based Monolithic Electrospun Fiber Membrane as an Ultrastable and Ultrasensitive Fluorescent Sensor in Aqueous Medium,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 21, pp. 4253–4258, 2016.
- [34] T. Isik, N. Horzum, U. H. Yildiz, B. Liedberg, and M. M. Demir, “Utilization of Electrospun Polystyrene Membranes as a Preliminary Step for Rapid Diagnosis,” *Macromol. Mater. Eng.*, pp. 1–9, 2016.
- [35] J. J. Alcaraz-Espinoza, A. E. Chávez-Guajardo, J. C. Medina-Llamas, C. A. S. Andrade, and C. P. De Melo, “Hierarchical composite polyaniline-(Electrospun Polystyrene) fibers applied to heavy metal remediation,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 13, pp. 7231–7240, 2015.
- [36] S. J. Park *et al.*, “Human Dopamine Receptor-Conjugated Multidimensional Conducting Polymer Nanofiber Membrane for Dopamine Detection,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, p. acsami.6b10437, 2016.
- [37] A. Y. El-Moghazy, E. A. Soliman, H. Z. Ibrahim, J. L. Marty, G. Istamboulie, and T. Noguer, “Biosensor based on electrospun blended chitosan-poly (vinyl alcohol)

- nanofibrous enzymatically sensitized membranes for pirimiphos-methyl detection in olive oil,” *Talanta*, vol. 155, pp. 258–264, 2016.
- [38] J. Walser and S. J. Ferguson, “Oriented nanofibrous membranes for tissue engineering applications: Electrospinning with secondary field control,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 58, pp. 188–198, 2016.
- [39] J. Nunes-Pereira *et al.*, “Poly(vinylidene fluoride) and copolymers as porous membranes for tissue engineering applications,” *Polym. Test.*, vol. 44, pp. 234–241, 2015.
- [40] W. Chen *et al.*, “Superabsorbent 3D scaffold based on electrospun nanofibers for cartilage tissue engineering,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, p. acsami.6b06825, 2016.
- [41] L. C. Lins *et al.*, “Development of Bioresorbable Hydrophilic–Hydrophobic Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Engineering,” *Biomacromolecules*, p. acs.biomac.6b00820, 2016.
- [42] X. Wang and B. S. Hsiao, “Electrospun nanofiber membranes,” *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 12, pp. 62–81, 2016.
- [43] A. Saxena, B. P. Tripathi, M. Kumar, and V. K. Shahi, “Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 145, no. 1–2, pp. 1–22, 2009.
- [44] M. Takht Ravanchi, T. Kaghazchi, and A. Kargari, “Application of membrane separation processes in petrochemical industry: a review,” *Desalination*, vol. 235, no. 1–3, pp. 199–244, 2009.
- [45] J. Zhao *et al.*, “Biomimetic and bioinspired membranes: Preparation and application,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 9, pp. 1668–1720, 2014.
- [46] Y. Shen, P. O. Saboe, I. T. Sines, M. Erbakan, and M. Kumar, “Biomimetic membranes : A review,” *J. of Membrane Science*, vol. 454, pp. 359–381, 2014.
- [47] A. C. Habert, C. P. Borges, and R. Nobrega, *Processos de Separação por Membranas*. 2006.
- [48] B. S. Lalia, V. Kochkodan, R. Hashaikeh, and N. Hilal, “A review on membrane fabrication: Structure, properties and performance relationship,” *Desalination*, vol. 326, pp. 77–95, 2013.
- [49] J. Doshi and D. H. Reneker, “Electrospinning process and applications of electrospun fibers,” *Conf. Rec. 1993 IEEE Ind. Appl. Conf. Twenty-Eighth IAS Annu. Meet.*, vol. 35, pp. 151–160, 1993.

- [50] R. Khajavi and M. Abbasipour, "Electrospinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers," *Sci. Iran.*, vol. 19, no. 6, pp. 2029–2034, 2012.
- [51] V. Pillay *et al.*, "A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications," *J. Nanomater.*, vol. 2013, 2013.
- [52] F. E. Ahmed, B. S. Lalia, and R. Hashaikeh, "A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications," *Desalination*, vol. 356, pp. 15–30, 2015.
- [53] J. Zeleny, "The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces," *Phys. Rev.*, vol. 3, no. 2, pp. 69–91, 1914.
- [54] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [55] V. G. Drozin, "The electrical dispersion of liquids as aerosols," *J. Colloid Sci.*, vol. 10, no. 2, pp. 158–164, 1955.
- [56] G. Taylor, "Electrically Driven Jets," *Proc. R. Soc. London A*, vol. 313, pp. 453–475, 1969.
- [57] P. K. Baumgarten, "Electrostatic spinning of acrylic microfibers," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 71–79, 1971.
- [58] E. C. Dario Puppi, Federica Chiellini, Mamoni Dash, "Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 45, pp. 659–670, 2014.
- [59] S. Homaeigohar and M. Elbahri, "Nanocomposite electrospun nanofiber membranes for environmental remediation," *Materials (Basel)*, vol. 7, no. 2, pp. 1017–1045, 2014.
- [60] A. Moheman, M. Sarwar, and A. Mohammad, "Recent trends in electrospinning of polymer nanofibers and their applications in ultra thin layer chromatography," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 229, pp. 1–24, 2015.
- [61] H. Ma, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Functionalized electrospun nanofibrous microfiltration membranes for removal of bacteria and viruses," *J. Memb. Sci.*, vol. 452, pp. 446–452, 2014.
- [62] J. Hahn, J. I. Clodt, V. Filiz, and V. Abetz, "Protein separation performance of self-assembled block copolymer membranes," *RSC Adv.*, vol. 4, p. 10252, 2014.

- [63] M. Kumar, D. McGlade, and J. Lawler, "Functionalized chitosan derived novel positively charged organic–inorganic hybrid ultrafiltration membranes for protein separation," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 42, pp. 21699–21711, 2014.
- [64] D. R. Nisbet, A. E. Rodda, D. I. Finkelstein, M. K. Horne, J. S. Forsythe, and W. Shen, "Surface and bulk characterisation of electrospun membranes: Problems and improvements," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 71, no. 1, pp. 1–12, 2009.
- [65] K. Hu and J. M. Dickson, *Membrane Processes for Dairy Ingredient Separation*. John Wiley & Sons, Ltd, 2015.
- [66] F. Poncin-Epaillard *et al.*, "Surface Treatment of Polymeric Materials Controlling the Adhesion of Biomolecules," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 3, pp. 528–543, 2012.
- [67] M. M. Puppolo *et al.*, "Plasma modification of microporous polymer membranes for application in biomimetic dissolution studies," *AAPS Open*, pp. 1–13, 2017.
- [68] Y. Hou *et al.*, "Advective Hydrogel Membrane Chromatography for Monoclonal Antibody Purification in Bioprocessing," *Biotechnol. Prog.*, vol. 31, no. 4, pp. 974–982, 2015.
- [69] G. Liu, L. Zhang, S. Mao, S. Rohani, C. Ching, and J. Lu, "Zwitterionic chitosan-silica-PVA hybrid ultrafiltration membranes for protein separation," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 152, pp. 55–63, 2015.
- [70] A. B. Abdul, K. Klaif, A. Cuciureanu, M. Chelu, and A. R. Miron, "Proteins Ultrafiltration using Polysulfone- polyaniline and Polysulfone-magnetite Nanoparticles Composite Membranes Proteins Ultrafiltration using Polysulfone- polyaniline and Polysulfone-magnetite Nanoparticles Composite Membranes," no. August, 2015.
- [71] A. Arunkumar and M. R. Etzel, "Fractionation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from bovine milk serum using staged, positively charged, tangential flow ultrafiltration membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 454, pp. 488–495, 2014.
- [72] Z. Ma and S. Ramakrishna, "Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification," *J. Memb. Sci.*, vol. 319, no. 1–2, pp. 23–28, 2008.
- [73] S. J. Costa, E. Coelho, L. Franco, A. Almeida, A. Castro, and L. Domingues, "The Fh8 tag: A fusion partner for simple and cost-effective protein purification in *Escherichia coli*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 92, no. 2, pp. 163–170, 2013.
- [74] S. A. Bhakta, E. Evans, T. E. Benavidez, and C. D. Garcia, "Protein adsorption

- onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 872, pp. 7–25, 2015.
- [75] C. Nick Pace, J. Martin Scholtz, and G. R. Grimsley, “Forces stabilizing proteins,” *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 14, pp. 2177–2184, 2014.
- [76] J. Kirkwood, D. Hargreaves, S. O’Keefe, and J. Wilson, “Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 9, pp. 1444–1451, 2015.
- [77] I. R. Krauss, A. Merlino, A. Vergara, and F. Sica, “An overview of biological macromolecule crystallization,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 6, pp. 11643–11691, 2013.
- [78] T. Chakraborty, I. Chakraborty, S. P. Moulik, and S. Ghosh, “Physicochemical and conformational studies on BSA-surfactant interaction in aqueous medium,” *Langmuir*, vol. 25, no. 10, pp. 3062–3074, 2009.
- [79] X. L. Cao, H. W. Li, Y. Yue, and Y. Wu, “PH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 65, pp. 186–192, 2013.
- [80] T. Peters and T. Peters, “2 – The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties,” *All About Albumin*, p. 9–II, 1995.
- [81] A. Salis *et al.*, “Measurements and theoretical interpretation of points of zero charge/potential of BSA protein,” *Langmuir*, vol. 27, no. 18, pp. 11597–11604, 2011.
- [82] H. T. M. Phan, S. Bartelt-Hunt, K. B. Rodenhause, M. Schubert, and J. C. Bartz, “Investigation of bovine serum albumin (BSA) attachment onto self-assembled monolayers (SAMs) using combinatorial quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and spectroscopic ellipsometry (SE),” *PLoS One*, vol. 10, no. 10, 2015.
- [83] M. S. Maleki, O. Moradi, and S. Tahmasebi, “Adsorption of albumin by gold nanoparticles: Equilibrium and thermodynamics studies,” *Arab. J. Chem.*, 2012.
- [84] S. J. McClellan and E. I. Franses, “Effect of concentration and denaturation on adsorption and surface tension of bovine serum albumin,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 28, no. 1, pp. 63–75, 2003.
- [85] T. Kopac, K. Bozgeyik, and J. Yener, “Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 322, no. 1–3, pp. 19–28, 2008.

- [86] B. Beykal, M. Herzberg, Y. Oren, and M. S. Mauter, "Influence of surface charge on the rate, extent, and structure of adsorbed Bovine Serum Albumin to gold electrodes," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 460, pp. 321–328, 2015.
- [87] B. Jachimska and A. Pajor, "Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces," *Bioelectrochemistry*, vol. 87, pp. 138–146, 2012.
- [88] M. Aramesh, O. Shimoni, K. Ostrikov, S. Praver, and J. Cervenka, "Surface charge effects in protein adsorption on nanodiamonds," *Nanoscale*, vol. 7, no. 13, pp. 5726–5736, 2015.
- [89] J. G. Vilhena, P. Rubio-Pereda, P. Velloso, P. A. Serena, and R. P??rez, "Albumin (BSA) Adsorption over Graphene in Aqueous Environment: Influence of Orientation, Adsorption Protocol, and Solvent Treatment," *Langmuir*, vol. 32, no. 7, pp. 1742–1755, 2016.
- [90] L. R. S. Barbosa, M. G. Ortore, F. Spinozzi, P. Mariani, S. Bernstorff, and R. Itri, "The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: A small-angle x-ray scattering study," *Biophys. J.*, vol. 98, no. 1, pp. 147–157, 2010.
- [91] S. P. Maddala, G. Mastroianni, D. Velluto, and A. C. Sullivan, "Intracellular delivery of BSA by phosphonate@silica nanoparticles," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 29, pp. 6057–6070, 2015.
- [92] X. Li *et al.*, "Preparation and characterization of bovine serum albumin surface-imprinted thermosensitive magnetic polymer microsphere and its application for protein recognition," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 51, pp. 261–267, 2014.
- [93] J. Li, X. Liao, Q. Zhang, and B. Shi, "Adsorption and separation of proteins by collagen fiber adsorbent," *J. Chromatogr. B*, vol. 928, pp. 131–8, 2013.
- [94] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Princípios de Bioquímica*, 3rd ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- [95] H. Ahmed and A. Hafiz, *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*, vol. 166, no. 4211. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 2005.
- [96] JAN-CHRISTER JANSON, *PROTEIN PURIFICATION: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, Third Edit. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [97] P. Alexander, H. P. Lundgren, and (Eds.), "A laboratory manual of analytical

- methods of protein chemistry.,” *Elsevier*, vol. 4, 2014.
- [98] A. (Angelo B. Basile and C. Charcosset, *Integrated membrane systems and processes*. 2015.
- [99] T. Zhu *et al.*, “Surface molecularly imprinted electrospun affinity membranes with multimodal pore structures for efficient separation of proteins,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 46, pp. 6449–6458, 2013.
- [100] L. S. Wong, F. Khan, and J. Micklefield, “Selective covalent protein immobilization: Strategies and applications,” *Chem. Rev.*, vol. 109, no. 9, pp. 4025–4053, 2009.
- [101] T.-Y. J. Hyung-Keun Chung, Woon-Hoe Kim, Jeongwon Park, Jinwoo Cho and P.-K. Park, “Adsorption - From theory to practice,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 93, no. 1–3, pp. 135–224, 2001.
- [102] H. K. Chung, W. H. Kim, J. Park, J. Cho, T. Y. Jeong, and P. K. Park, “Application of Langmuir and Freundlich isotherms to predict adsorbate removal efficiency or required amount of adsorbent,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 28, pp. 241–246, 2015.
- [103] X. Su, Y. Tian, W. Zuo, J. Zhang, H. Li, and X. Pan, “Static adsorptive fouling of extracellular polymeric substances with different membrane materials,” *Water Res.*, vol. 50, pp. 267–277, 2014.
- [104] P. S. Ghosal and A. K. Gupta, “Determination of thermodynamic parameters from Langmuir isotherm constant-revisited,” *J. Mol. Liq.*, vol. 225, pp. 137–146, 2017.
- [105] R. A. Latour, “The Langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 3, pp. 949–958, 2015.
- [106] G. Anand, S. Sharma, A. K. Dutta, S. K. Kumar, and G. Belfort, “Conformational transitions of adsorbed proteins on surfaces of varying polarity,” *Langmuir*, vol. 26, no. 13, pp. 10803–10811, 2010.
- [107] K. Wang, C. Zhou, Y. Hong, and X. Zhang, “A review of protein adsorption on bioceramics,” *Interface Focus*, vol. 2, no. 3, pp. 259–277, 2012.
- [108] M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, “Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 162, no. 1–2, pp. 87–106, 2011.
- [109] Maher I. Boulos; Pierre Fauchais and Emil Pfender., *Thermal plasmas: fundamentals and applications*, V.1. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 1994.
- [110] S. K. Pankaj *et al.*, “Applications of cold plasma technology in food packaging,”

- Trends Food Sci. Technol.*, vol. 35, no. 1, pp. 5–17, 2014.
- [111] [Http://plasmatrement.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-surface-technology/plasma-technology/plasma-treatment-explained/](http://plasmatrement.co.uk/henniker-plasma-technology/plasma-surface-technology/plasma-technology/plasma-treatment-explained/), “Plasma Treatment Explained in Simple Terms : Henniker Plasma Treatment.”
- [112] A. Kamińska, H. Kaczmarek, and J. Kowalonek, “The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action,” *Eur. Polym. J.*, vol. 38, no. 9, pp. 1915–1919, 2002.
- [113] H. Kaczmarek, J. Kowalonek, A. Szalla, and A. Sionkowska, “Surface Modification of thin polymeric films by air-plasmas or UV-irradiation,” *Surf. Sci.*, vol. 507–510, no. 1–3, pp. 883–888, 2002.
- [114] B. A. Dedavid, C. I. Gomes, and G. Machado, *MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- [115] F. Schmid, “Biological Macromolecules : UV-visible Spectrophotometry,” *Encycl. Life Sci.*, pp. 1–4, 2001.
- [116] “[Http://fap.if.usp.br/~nandast/mev.html](http://fap.if.usp.br/~nandast/mev.html).”
- [117] S. M. Mukhopadhyay, *Sample Preparation for Microscopic and Spectroscopic Characterization of Solid Surfaces and Films*. 2003.
- [118] P. Lampman, K. Vyvyan, D. L. Pavia, and G. S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, 4 Ed. USA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009.
- [119] Reiner Westermeier, *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, Fifth Edit. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2016.
- [120] B. T. Kurien and R. H. Scofield, “Protein Electrophoresis,” *Methods Protoc.*, vol. 869, no. 2873, p. 648, 2012.
- [121] http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf, “Electrophoresis:A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection,” *Bio-Rad*, p. 47, 2012.
- [122] L. A. Can-Herrera, A. Ávila-Ortega, S. de la Rosa-García, A. I. Oliva, J. V. Cauich-Rodríguez, and J. M. Cervantes-Uc, “Surface modification of electrospun polycaprolactone microfibers by air plasma treatment: Effect of plasma power and treatment time,” *Eur. Polym. J.*, vol. 84, no. November, pp. 502–513, 2016.
- [123] Z. Ma, Z. Lan, T. Matsuura, and S. Ramakrishna, “Electrospun polyethersulfone affinity membrane: Membrane preparation and performance evaluation,” *J.*

- Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 29, pp. 3686–3694, 2009.
- [124] A. Tiraferri and M. Elimelech, “Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces,” *J. Memb. Sci.*, vol. 389, pp. 499–508, 2012.
- [125] L. Ying *et al.*, “Immobilization of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly(ethylene terephthalate) film and its application to hepatocyte culture,” *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 1, pp. 157–165, 2003.
- [126] RAD-BIO, “Mini-Protean Tetra Cell,” pp. 1–35.
- [127] Z. Ma, K. Masaya, and S. Ramakrishna, “Immobilization of Cibacron blue F3GA on electrospun polysulphone ultra-fine fiber surfaces towards developing an affinity membrane for albumin adsorption,” *J. Memb. Sci.*, vol. 282, no. 1–2, pp. 237–244, 2006.
- [128] K. H. Lee, H. Y. Kim, H. J. Bang, Y. H. Jung, and S. G. Lee, “The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 44, no. 14, pp. 4029–4034, 2003.
- [129] T. Uyar and F. Besenbacher, “Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 49, no. 24, pp. 5336–5343, 2008.
- [130] T. Jarusuwannapoom *et al.*, “Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers,” *Eur. Polym. J.*, vol. 41, no. 3, pp. 409–421, 2005.
- [131] A. Vesel, I. Junkar, U. Cvelbar, J. Kovac, and M. Mozetic, “Surface modification of polyester by oxygen- And nitrogen-plasma treatment,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 40, no. 11, pp. 1444–1453, 2008.
- [132] R. Reis *et al.*, “Towards Enhanced Performance Thin-film Composite Membranes via Surface Plasma Modification,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, p. 29206, 2016.
- [133] L. F. Dumée, H. Alglave, T. Chaffraix, B. Lin, K. Magniez, and J. Schütz, “Morphology-properties relationship of gas plasma treated hydrophobic mesoporous membranes and their improved performance for desalination by membrane distillation,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 363, pp. 273–285, 2016.
- [134] R. Reis, L. F. Dumée, A. Merenda, J. D. Orbell, J. A. Schütz, and M. C. Duke, “Plasma-induced physicochemical effects on a poly (amide) thin- fi lm composite membrane,” *Des*, vol. 403, pp. 3–11, 2016.

- [135] Y. Qian *et al.*, “Fabrication of TiO₂-modified polytetrafluoroethylene ultrafiltration membranes via plasma-enhanced surface graft pretreatment,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 360, pp. 749–757, 2016.
- [136] A. R. Calchera, A. D. Curtis, and J. E. Patterson, “Plasma Treatment of Polystyrene Thin Films Affects More Than the Surface,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, pp. 3493–3499, 2012.
- [137] D. Zhang, S. M. Dougal, and M. S. Yeganeh, “Effects of UV Irradiation and Plasma Treatment on a Polystyrene Surface Studied by IR - Visible Sum Frequency Generation Spectroscopy,” *Langmuir*, vol. 16, no. 10, pp. 4528–4532, 2000.
- [138] M. Häidopoulos, M. Horgnies, F. Mirabella, and J. J. Pireaux, “Angle-resolved XPS study of plasma-deposited polystyrene films after oxygen plasma treatment,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 1, pp. 67–75, 2008.
- [139] S. Wild and L. Kesmodel, “High resolution electron energy loss spectroscopy investigation of plasma-modified polystyrene surfaces,” *J. Vac. Sci. Technol. A*, vol. 19, no. 3, p. 856, 2001.
- [140] G. Hurwitz, G. R. Guillen, and E. M. V Hoek, “Probing polyamide membrane surface charge, zeta potential, wettability, and hydrophilicity with contact angle measurements,” *J. Memb. Sci.*, vol. 349, no. 1–2, pp. 349–357, 2010.
- [141] Y. C. Jung and B. Bhushan, “Contact angle, adhesion and friction properties of micro- and nanopatterned polymers for superhydrophobicity,” *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 4970–4980, 2006.
- [142] B. P. Tripathi, N. C. Dubey, and M. Stamm, “Polyethylene glycol cross-linked sulfonated polyethersulfone based filtration membranes with improved antifouling tendency,” *J. Memb. Sci.*, vol. 453, pp. 263–274, 2014.
- [143] S. Hosseini *et al.*, “Aging effect and antibody immobilization on COOH exposed surfaces designed for dengue virus detection,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 99, pp. 183–192, 2015.
- [144] E. Edri and O. Regev, “pH Effects On BSA-Dispersed Carbon Nanotubes Studied by Spectroscopy-Enhanced Composition Evaluation Techniques pH Effects On BSA-Dispersed Carbon Nanotubes Studied by Spectroscopy-Enhanced Composition Evaluation Techniques,” vol. 80, no. 11, pp. 4049–4054, 2008.
- [145] S. He *et al.*, “Conformational change of bovine serum albumin molecules at neutral pH in ultra-diluted aqueous solutions,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 42, pp.

- 12207–12214, 2014.
- [146] L. G. Casção Pereira, O. Théodoly, H. W. Blanch, and C. J. Radke, “Dilatational rheology of BSA conformers at the air/water interface,” *Langmuir*, vol. 19, no. 6, pp. 2349–2356, 2003.
- [147] K. Ng, M. Haribabu, D. Harvie, D. E. Dunstan, and G. J. O. Martin, “Mechanisms of Flux Decline in Skim Milk Ultrafiltration: A Review,” *J. Memb. Sci.*, vol. 523, no. June 2016, pp. 144–162, 2016.
- [148] J. Mcmurry, *Química Orgánica*, 7a. edición. 2008.
- [149] M. Beragoui *et al.*, “*In situ* studies of bovine serum albumin adsorption onto functionalized polystyrene latices monitored with a quartz crystal microbalance technique,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 23, p. n/a-n/a, 2015.
- [150] R. Kamaraj, A. Pandiarajan, S. Jayakiruba, M. Naushad, and S. Vasudevan, “Kinetics, thermodynamics and isotherm modeling for removal of nitrate from liquids by facile one-pot electrosynthesized nano zinc hydroxide,” *J. Mol. Liq.*, vol. 215, pp. 204–211, 2016.
- [151] K. S. Y. Ng, M. Haribabu, D. J. E. Harvie, D. E. Dunstan, and G. J. O. Martin, “Mechanisms of flux decline in skim milk ultrafiltration: A review,” *J. Memb. Sci.*, vol. 523, no. June 2016, pp. 144–162, 2017.
- [152] K. Lou, Z. Zhu, H. Zhang, Y. Wang, X. Wang, and J. Cao, “Comprehensive studies on the nature of interaction between carboxylated multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 243, pp. 54–61, 2016.
- [153] Q. Zhang, F. Schimpf, H.-L. Lu, D.-Q. Lin, and S.-J. Yao, “Binary Adsorption Processes of Albumin and Immunoglobulin on Hydrophobic Charge-Induction Resins,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 61, no. 3, pp. 1353–1360, 2016.
- [154] B. H. Lai, C. C. Yeh, and D. H. Chen, “Surface modification of iron oxide nanoparticles with polyarginine as a highly positively charged magnetic nano-adsorbent for fast and effective recovery of acid proteins,” *Process Biochem.*, vol. 47, no. 5, pp. 799–805, 2012.
- [155] S. Mondal, C. Li, and K. Wang, “Bovine Serum Albumin Adsorption on Gluteraldehyde Cross-Linked Chitosan Hydrogels,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 60, no. 8, pp. 2356–2362, 2015.
- [156] Z. Zhang *et al.*, “Novel magnetic bovine serum albumin imprinted polymers with a matrix of carbon nanotubes, and their application to protein separation,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 9, pp. 2855–2863, 2011.

- [157] M. Vergara-Barberán, M. J. Lerma-García, E. F. Simó-Alfonso, and J. M. Herrero-Martínez, “Solid-phase extraction based on ground methacrylate monolith modified with gold nanoparticles for isolation of proteins,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 917, pp. 37–43, 2016.
- [158] P. Du, J. Zhao, H. Mashayekhi, and B. Xing, “Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme on Functionalized Carbon Nanotubes,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 38, pp. 22249–22257, 2014.
- [159] M. Shen *et al.*, “The synthesis and characterization of monodispersed chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles via a facile one-step solvothermal process for adsorption of bovine serum albumin,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 9, no. 1, p. 296, 2014.
- [160] R. Gao, X. Mu, J. Zhang, and Y. Tang, “Specific recognition of bovine serum albumin using superparamagnetic molecularly imprinted nanomaterials prepared by two-stage core-shell sol-gel polymerization,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 7, pp. 783–792, 2014.
- [161] B. A. Russell, K. Kubiak-Ossowska, P. A. Mulheran, D. J. S. Birch, and Y. Chen, “Locating the nucleation sites for protein encapsulated gold nanoclusters: a molecular dynamics and fluorescence study,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 34, pp. 21935–21941, 2015.

APÊNDICE A- GRÁFICOS ADICIONAIS

Apresentaremos aqui algumas informações adicionais sobre os espectros de UV-Vis das soluções sobrenadante de proteína BSA e, alguns testes de dessorção que foram realizados inicialmente com soluções de NaOH, e diferentes soluções com pH entre 8,0 e 10,0.

Apêndice A.1- Estudo da influência do pH da proteína BSA sobre a capacidade de adsorção pelas MNPS

- **Espectros de absorção no UV-Vis das soluções de BSA antes e após os experimentos de adsorção como uma função do pH do meio**

Assim como as demais proteínas, a BSA possui em sua composição química, aminoácidos cromóforos, ou seja, moléculas capazes de absorver a luz na região do ultravioleta (280 nm). Os aminoácidos triptofano e tirosina são os principais responsáveis pela absorção de UV das proteínas. Isso torna possível utilizar a técnica de UV-Vis para acompanhar o processo de adsorção da proteína BSA pelas MNPS. Em primeiro lugar, examinamos o efeito do pH da proteína sobre a capacidade de adsorção das MNPS, o que nos permitiu identificar que ao longo de uma faixa de pH de 3,0 a 5,0 acontece a adsorção da BSA pelas MNPS. Isso foi demonstrado pela medida de intensidade do pico de absorção da solução de proteína em 280 nm, com a intensidade de absorção diminuindo para essa faixa de pH, enquanto que em pH maiores que 5,0 não acontece adsorção.

Para uma faixa de pH básico (8,0-10,0), esperávamos que o valor da absorbância das soluções em 280 nm permanecesse o mesmo antes e após o procedimento de adsorção, caso não ocorresse a adsorção pelas MNPS nessa faixa de pH. No entanto, conforme podemos verificar na Fig. A.1, onde os espectros pontilhados correspondem a essas soluções, o valor da absorbância aumentou. Esse resultado pode ser explicado da seguinte maneira: para essa faixa de pH, a BSA transporta cargas negativas, assim como as membranas que quando expostas a soluções básicas tem seus carboxílicos na forma de COO⁻ (como discutido no Capítulo 6, Seções. 6.2 e 6.3). Desse modo, além de não serem capazes de adsorver BSA nessa faixa de pH, as repulsões eletrostáticas entre BSA/MNPS ocasionam a desnaturação das proteínas presentes na solução, e essa desnaturação pode

expor os aminoácidos cromóforos, o que leva ao aumento inesperado no valor da absorbância.

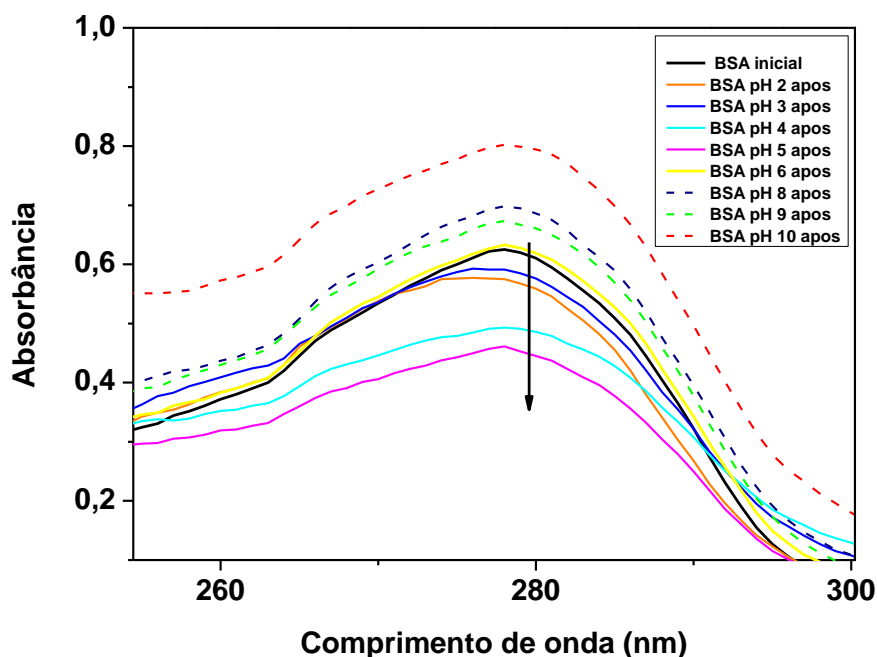


Figura A.1 Espectros de UV-Vis da solução de proteína BSA, com a concentração inicial de BSA de $0,6 \text{ mg. mL}^{-1}$ (curva preta), e após interação com as MNPS modificadas com 5 min de plasma em uma faixa de pH entre 3,0 e 6,0. As curvas pontilhadas representam as soluções de BSA após interação com as MNPS para os pH 8,0, 9,0 e 10,0.

A técnica de UV-Vis, portanto, foi bastante útil para acompanharmos a concentração das soluções de BSA, ao longo de cada uma das etapas de adsorção/dessorção pelas MNPS.

Apêndice A.2- Efeito do tempo de exposição ao plasma sobre a capacidade de adsorção da proteína BSA pelas MNPS

Na Fig. A.2, mostramos os espectros de UV-VIS das soluções de BSA após interação com MNPS expostas a diferentes tempos de tratamento. Percebemos que absorção das soluções no comprimento de onda de 280 nm foi decrescendo à medida em que foram sendo utilizadas fibras modificadas para tempos de tratamento crescentes e iguais a 1, 3, 5, 8 e 14 min. Esse decréscimo da absorção é devido à diminuição da concentração de BSA no meio. Note que para os tempos de 17 e 20 min, a absorbância retorna a aumentar, um resultado que está em concordância com o que foi observado

quando da caracterização dessas membranas por MEV (Capítulo 5, Seção 5.2.1), onde as fibras quando expostas a tempos elevados de tratamento ficam sujeitos a desgastes em sua estrutura, podendo ocorrer seu rompimento, o que faz com que a capacidade de adsorção dessas membranas se mostre menor. Esses resultados confirmam que as MNPS modificadas com 14 min tiveram a maior capacidade de adsorver a BSA.

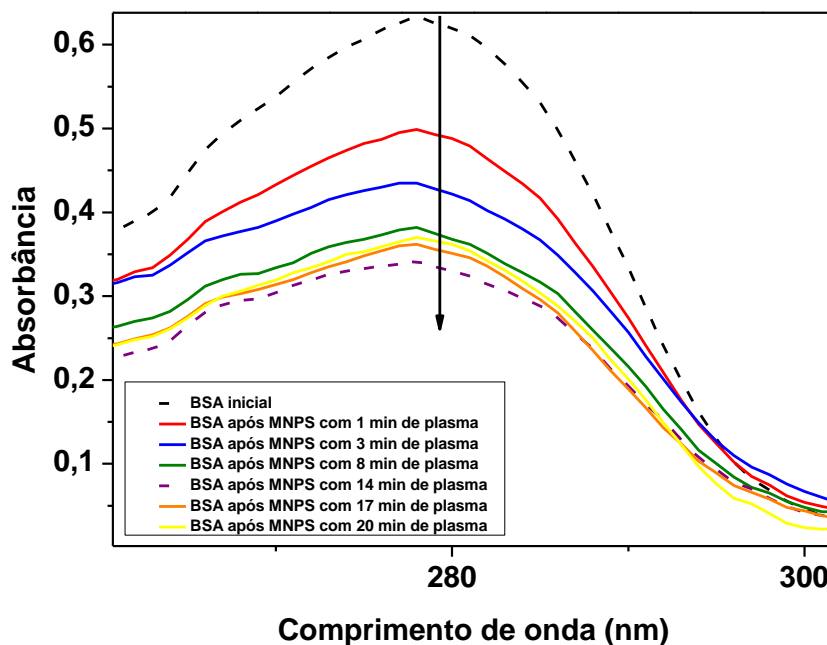


Figura A.2 Espectros de UV-Vis da solução de proteína BSA (concentração inicial de BSA de 0,6 mg.mL⁻¹), antes (curva pontilhada em preto) e após interação com as MNPS modificadas com diferentes tempos (1-20 min) de exposição ao plasma.

Apêndice A.3- Dessorção da BSA utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH)

Em alguns trabalhos reportados na literatura [160], foi usada uma solução de NaOH para que o material adsorvente pudesse eluir a proteína BSA. Por essa razão, nos experimentos de dessorção da BSA, a primeira solução de eluição que nós testamos para eluição foi o NaOH. No entanto, como veremos a seguir, as análises pelas técnicas de UV-Vis e eletroforese nos mostraram que essa solução afetava a estrutura nativa da BSA.

Na Fig. A.3.a-d, notamos que independente das concentrações de NaOH utilizadas na tentativa de eluir a BSA das MNPS, dois efeitos aconteceram: o comprimento de onda

foi deslocado para direita (290 nm) e houve o aumento da absorbância. Isso nos levou a acreditar que essa solução estaria desnaturando a proteína. Para confirmar esse resultado, resolvemos submeter essas soluções a uma eletroforese em PAGE nativo.

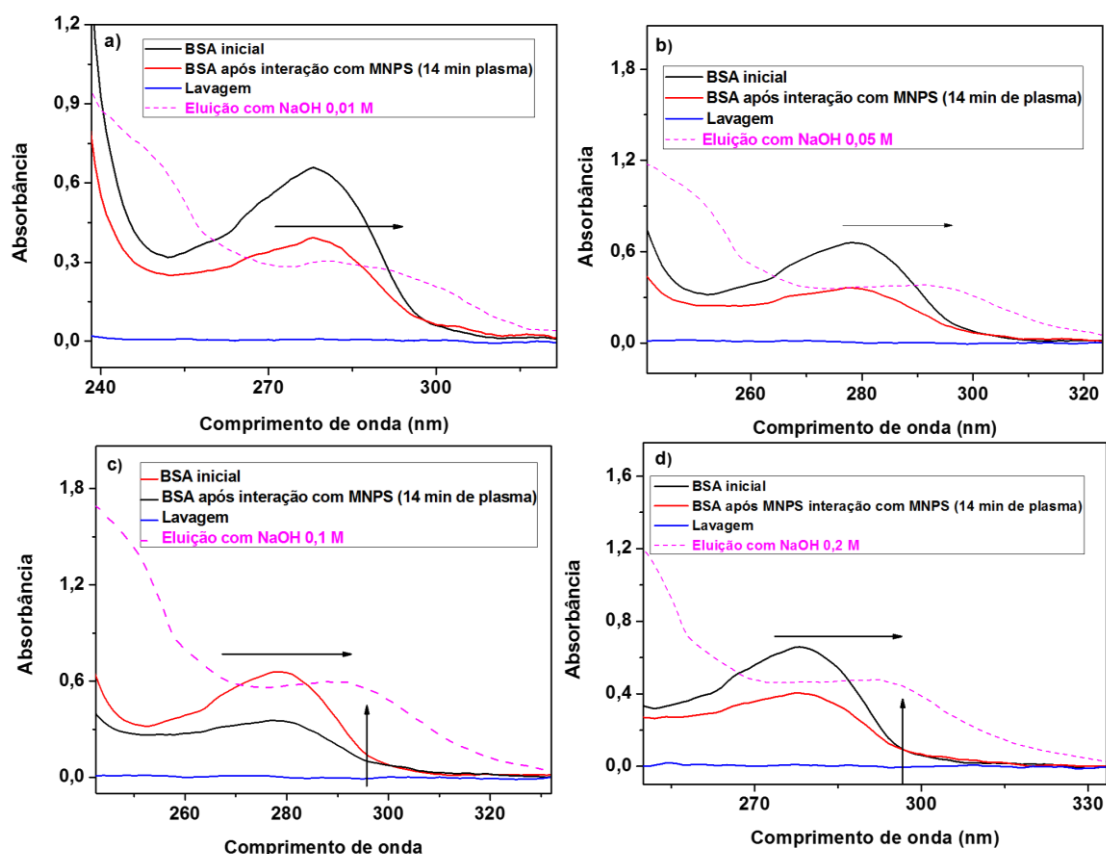


Figura A.3 Espectros de UV-Vis as curvas pontilhadas representam a eluição da BSA em solução de NaOH com concentrações molares de a) 0,01, b) 0,05, c) 0,1 e d) 0,2 M.

Na Fig. A.4, no poço 1, foi depositada a amostra padrão de peso moleculares para proteínas. No poço 2 e 3, estão presentes a amostra de solução inicial de BSA e solução sobrenadante de BSA após interação com as MNPS, respectivamente. Já no poço 4, colocamos a solução de BSA após eluição com NaOH; note que existe um rastro e está ausente a banda característica da BSA, e assim podemos afirmar que essa solução provoca a desnaturação da BSA. A manutenção da estrutura nativa da proteína é fundamental para que ela exerça adequadamente suas funções biológicas. Dessa maneira, esses resultados nos indicaram que essa solução não é adequada para eluir a BSA. Por essa razão, descartamos utilizar o NaOH para dessorção da BSA pelas MNPS.

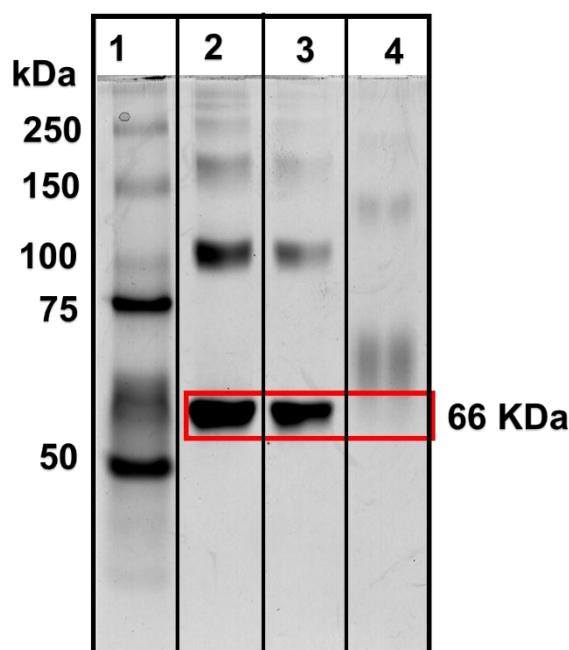


Figura A.4 Eletroforese em PAGE-NATIVO (1) padrão de proteínas, (2) solução inicial de BSA, (3) solução sobrenadante de BSA após interação com as MNPS e em (4) Eluição da BSA em solução de NaOH 0,01 M.

• Estudo de dessorção

Independente da metodologia utilizada para eluir a BSA, baixas quantidades de BSA foram desorvidas das MNPS, quando foram utilizadas soluções com o valor do pH entre 6,0 e 8,0.

Para um experimento em que passamos 500 μ L de uma solução de eluição (pH básico), pela coluna de centrifugação contendo as MNPS com as proteínas adsorvidas, e sendo em seguida usada a centrífuga durante 1 min, obtivemos baixos percentuais de proteína eluída (2,8 a 29,3%). Esse resultado pode ser interpretado da admitindo que: as moléculas de BSA foram adsorvidas fortemente pelas MNPS e a solução de eluição estaria passando ligeiramente pelas MNPS, sem que houvesse tempo para romper as demais ligações entre BSA/MNPS.

Para um segundo experimento em que nós adicionamos duas vezes um volume de 250 μ L de uma solução de eluição com o pH básico dentro da coluna de centrifugação que continha as MNPS com as proteínas adsorvidas (passando pela centrífuga com 1 min em cada eluição), nós encontramos um aumento no percentual de dessorção da BSA, pois as MNPS foram submetidas a dois ciclos de dessorção, isso permitiu que as MNPS tivessem um maior contato com a solução de eluição, o que promove o rompimento da

ligação entre BSA/MNPS. Na Fig. A.5-b, vemos que o maior percentual de dessorção foi encontrado para o pH 10,0, com a solução de 1,5 M Tris-HCl (59,5%). Para as demais soluções de NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M (pH 8,0), 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), NaOH-Gli (pH 10,0), foram encontrados os valores 32,05 ;45,03; 51,71%, respectivamente.

Com esses resultados, percebemos que seria necessário não só utilizar um pH 10,0, como também seria importante um tempo maior de interação da solução de eluição com a MNPS para promover a liberação da BSA nessa solução. Como discutimos no capítulo 6 (Seção 6.8), quando permitimos um maior tempo de contato da solução foi possível aumentar a liberação atingindo o percentual de 70%, uma das perspectivas deste trabalho é a de estudar maneiras de elevar ainda mais a dessorção da proteína.

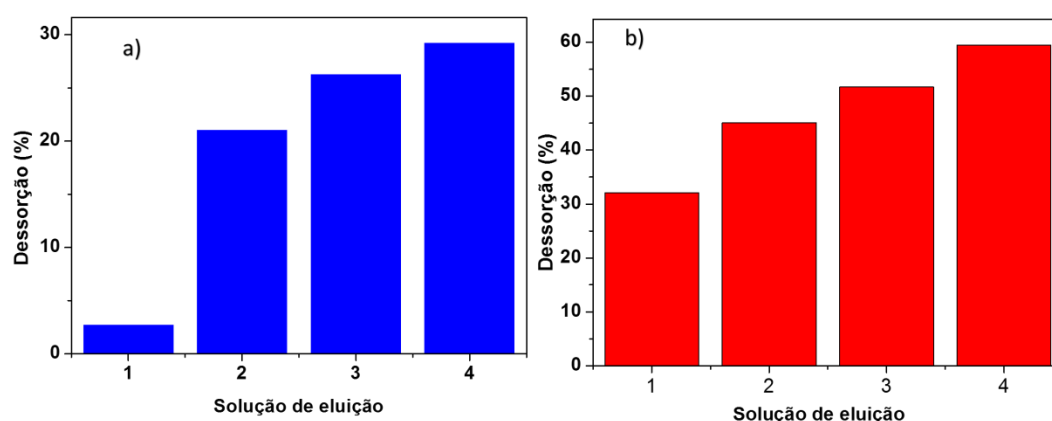


Figura A.5 Percentual de BSA dessorvida das MNPS, nas colunas azuis temos as soluções de **1)** NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M (pH 6,0), **2)** NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M (pH 8,0), **3)** NaOH-Gli (pH 9,0) e **4)** NaOH-Gli (pH 10,0). Nas colunas vermelhas temos as soluções de **1)** NaH_2PO_4 0,2 M – Na_2HPO_4 0,2 M (pH 8,0), **2)** 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), **3)** NaOH-Gli (pH 10,0) e **4)** 1,5 M Tris-HCl (pH 10,0).