



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS E SUAS APLICAÇÕES PARA
SENSORIAMENTO, REMEDIAÇÃO AMBIENTAL,
PURIFICAÇÃO DE DNA, E ATIVIDADE ANTITUMORAL E BACTERICIDA**

Recife
2020

GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS E SUAS APLICAÇÕES PARA
SENSORIAMENTO, REMEDIAÇÃO AMBIENTAL,
PURIFICAÇÃO DE DNA, E ATIVIDADE ANTITUMORAL E BACTERICIDA**

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

Área de concentração: Física da Matéria Condensada

Orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Recife
2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

R236d Ratkovski, Gabriela Plautz

Desenvolvimento de compósitos e suas aplicações para sensoriamento, remediação ambiental, purificação de DNA, e atividade antitumoral e bactericida/ Gabriela Plautz Ratkovski – 2020.

226f., il., fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Física, Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Física da Matéria Condensada. 2. Nanopartículas magnéticas. 3. Nanocompósitos híbridos. 4. Polímeros condutores. I. Melo, Celso Pinto de. (orientador) II. Título.

530.41

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2021-73

GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI

**DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS E SUAS APLICAÇÕES PARA
SENSORIAMENTO, REMEDIAÇÃO AMBIENTAL, PURIFICAÇÃO DE DNA,
E ATIVIDADE ANTITUMORAL E BACTERICIDA**

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

Aprovada em: 28/08/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Celso Pinto de Melo
Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Eduardo Padrón Hernández
Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Arandi Ginane Bezerra Junior
Examinador Interno
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Osvaldo Novais de Oliveira Junior
Examinador Externo
Universidade de São Paulo

Prof. Carlos Eduardo Calzavara Silva
Examinador Externo
Fundação Oswaldo Cruz

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus. Aos meus pais, Jorge e Lúndalene, que me ensinaram valores e me deram todo o apoio, incentivo e suporte para voar voos sempre mais altos. Ao meu esposo Danilo, por todo o amor, paciência, companheirismo, carinho e apoio, ao longo desses anos que passamos nesse período turbulento do doutorado. E a minha irmã Rafaela, que mesmo de longe sempre está ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Nesse momento, com o coração transbordando de gratidão, gostaria de agradecer a aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse período de Doutorado.

Inicialmente não poderia deixar de agradecer a **Deus** por ter me dado um coração de cientista, me dando a paciência, a persistência, a intuição, a curiosidade, a força, necessária para enfrentar e superar os desafios encontrados ao longo dessa caminhada. À minha família, especialmente aos meus pais, **Lindalene Luchtenberg Plautz e Jorge Luiz Plautz**, pelas orações, apoio, incentivo, e por me ensinarem com todo seu amor e carinho, a buscar sempre a Deus, e não desistir dos meus sonhos. A minha irmã, **Rafaela Luchtenberg Plautz**, por ser sempre a minha chata favorita que divide comigo as paixões mais bobas, e por sempre estar presente e disposta a me ouvir.

Ao meu esposo, **Danilo Roberto Ratkovski**, por todo o amor compartilhado ao longo da nossa história, por toda a paciência, companheirismo e dedicação, que se estenderam desde o início, nos quais passamos longas horas estudando para os exames, até os dias de hoje, em que estamos juntos enfrentando essa reta final para alcançarmos nosso tão sonhado título de Doutor. Por ser meu porto-seguro e sempre estar comigo em todos os momentos. Sem ele, essa caminhada seria com toda a certeza muito difícil. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado você em minha vida. Também agradeço aos meus sogros, **Iara Aparecida da Silva Ratkovski e Claudismar Ratkovski**, por todo apoio e incentivo para que pudéssemos concluir com êxito nossos estudos.

Aos meus amigos, talvez seja melhor dizer, melhores amigos, **Bruna, Lizeth, Romário e Kamila**, pelas conversas, as risadas, as saídas, os conselhos, as contribuições, as discussões científicas, a ajuda (mão de obra altamente especializada) e por dividir comigo essa aventura diária de viver fazendo experimentos. Tenho certeza de que esse período não seria o mesmo sem vocês.

Ao **Laboratório de Polímeros Não - Convencionais (PNC)** por dispor da infraestrutura e as condições necessárias para o desenvolvimento dos projetos de pesquisa. A todos os colegas de trabalho, que fizeram e fazem parte do grupo PNC, **Graciela, Filipe, Winnie, Hérica, Edson, Elton, Hanna, Maurício, Hugo, Andressa, Jéssica, Gizele e Joyce**, pela convivência, respeito, amizade, descontrações, discussões e contribuições para a realização dos trabalhos aqui apresentados. E especialmente ao professor **Celso Pinto de Melo** por ter me recebido de portas abertas, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, pela confiança, a orientação, pelos ensinamentos transmitidos e pelas críticas construtivas que proporcionaram o

crescimento e a evolução deste trabalho. Muito obrigada pela disposição, incentivo e apoio recebido.

A todos os colegas do Departamento, pelos bons momentos, por caminhar junto nessa longa e complicada jornada, e por compartilhar comigo o sonho de que a ciência e os cientistas venham a ser valorizados pela nossa nação.

À UFPE, ao programa de Pós-graduação em Física Departamento de Física, e a todos os professores do departamento que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Ao centro de microscopia da UFPR, pela microscopia eletrônica de transmissão das amostras.

A FACEPE, pelo auxílio financeiro fornecido através da bolsa de Doutorado, sem o qual não seria viável a conclusão do doutorado.

*“Porque a um, pelo Espírito, é dada a palavra da sabedoria; a outro, pelo mesmo Espírito, a
palavra da ciência;”*

(Bíblia, 1 Coríntios 12:8, 1969)

RESUMO

Nesse trabalho abordamos a preparação e a caracterização de diversos tipos de materiais nanoestruturados e suas aplicações para o sensoriamento de íons fosfato, remoção de contaminantes, e purificação de ácidos nucleicos, e como agentes terapêuticos e antibacterianos. Especificamente, os materiais aqui desenvolvidos e caracterizados foram: i) nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄ NPs), com a superfície modificada através da imobilização de sonda de DNA marcadas com fluoróforo (CoFe/ssDNA*); ii) compósitos magnéticos híbridos de Alginato/Quitosana/CoFe₂O₄NPs, obtidos pela técnica de gelificação ionotrópica, revestidos pelo polímero condutor (PC) polipirrol (PPy@Alg/Qui/CoFeNPs); iii) nanocompósitos magnéticos (NCMs) constituídos por CoFe₂O₄ NPs com a superfície recoberta com polipirrol (CoFe/PPy); iv) compósito de Ag/Polianilina, formados a partir da síntese de uma reação redox simultânea entre o metal e o PC. A plataforma de CoFe/ssDNA* foi desenvolvida para a detecção por fluorescência sensível e seletiva de íons fosfato. Para isso, foi explorada a extinção de fluorescência que ocorre quando o fluoróforo se liga à superfície das NPs. Desse modo, nosso método de detecção consiste na recuperação da intensidade da fluorescência observada quando uma amostra contendo íons fosfato é colocada em contato com a plataforma, devido ao desprendimento das sondas de DNA imobilizadas pelos íons fosfato presentes na solução. Nossos resultados indicam ser este procedimento um método simples, rápido e altamente sensível, e que apresenta um limite de detecção de 1,75 nM. Os NCM PPy@Alg/Qui/CoFeNPs foram também utilizados para a remoção do corante de azul de metileno em meios aquosos. Estudos cinéticos e termodinâmicos da adsorção revelaram que, utilizado na sua forma em pó, o compósito apresentou vantagens relativamente a seu uso na sua forma em pérola, com uma capacidade de absorção superior em um menor intervalo de tempo. Para ambas as formas do compósito ocorre o incremento na capacidade de adsorção com o aumento da temperatura. O compósito magnético CoFe/PPy foi ainda utilizado como adsorvente de fase sólida para a purificação de ácidos nucleicos. Para isso, foram desenvolvidos protocolos de purificação do DNA total extraído a partir de amostras de sangue total. Nossos resultados indicam que o uso do compósito CoFe/PPy é simples e rápido, levando a um bom rendimento de DNA. Seu desempenho é equivalente ao de kits comerciais, com a qualidade necessária para que seja possível usá-lo em protocolos regulares de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Por fim, apresentamos resultados relativos à preparação, caracterização e aplicação do compósito fluorescente de Ag/Polianilina. Embora ainda preliminares, ensaios de citotoxicidade usando células Vero indicaram que a excelente biocompatibilidade desse compósito. Esse compósito se mostrou também eficaz na redução da viabilidade de células

HeLa, de carcinoma cervical humano, e células bacterianas Gram-negativas (*E. coli*), indicando o potencial antitumoral e antibacteriano do compósito de Ag/Polianilina.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Nanocompósitos híbridos. Polímeros condutores. Sensoriamento. Remediação ambiental. Purificação de DNA.

ABSTRACT

In this work, we discuss the preparation and characterization of several types of nanostructured materials and their applications for sensing phosphate ions, removing contaminants, purifying nucleic acids, and as therapeutic and antibacterial agents. Specifically, the materials developed and characterized here were: i) nanoparticles of cobalt ferrite (CoFe₂O₄ NPs), whose surface had been modified through immobilizing a DNA probe marked with a fluorophore (CoFe/PPy); ii) hybrid magnetic composites of Alginate/Chitosan/CoFe₂O₄NPs, which were obtained by ionotropic gelation technique, with the surface covered by polypyrrole (PPy@Alg/Chit/CoFeNPs); iii) magnetic composite consisting of CoFe₂O₄ NPs with the surface covered by polypyrrole (CoFe/PPy); iv) composite of Ag/Polyaniline, formed by a simultaneous redox reaction synthesis between the metal and the PCs. The CoFe/ssDNA* platform was developed for the sensitive and selective detection of phosphate ions by fluorescence. For this, the fluorescence extinction characteristic was explored when the fluorophore binds to the surface of the NPs. Our detection method consists of the recovering of the fluorescence intensity when a sample containing phosphate ions is placed in contact with the platform, due to the detachment of the previously immobilized DNA probes by the phosphate ions present in the solution. Our results indicate that this procedure is a simple, fast, and highly sensitive method, with a detection limit of 1.75 nM. In sequence, the PPy@Alg/Chit/CoFeNP NCMs were used to remove the methylene blue dye from aqueous media. Kinetic and thermodynamic studies of adsorption revealed that the use of the composite in its powder form had advantages over than its pearl form, with a superior absorption capacity in a shorter time. In both forms, the composite showed an increase in the adsorption capacity with increasing temperature. We tested the use of the magnetic composite CoFe/PPy as a solid phase adsorbent of nucleic acids and developed protocols for the purification of DNA extracted from whole blood samples. Our results indicate that the CoFe/PPy composite can be used in simple and fast methods for obtaining a good DNA yield. In this, the performance of this magnetic composite is equivalent to those of commercial kits in producing DNA samples with the adequate quality for use in regular molecular biology protocols, such as Polymerase Chain Reactions (PCR). Finally, we present results regarding the preparation, characterization, and biomedical application of the fluorescent composite Ag/Polyaniline. Preliminary cytotoxicity tests using Vero cells indicated good biocompatibility of the composite. Also, the composite proved to be effective in reducing the viability of human cervical carcinoma (HeLa) cells and Gram-negative bacteria (*E. coli*), indicating a possible antitumor and antibacterial activity of the Ag/Polyaniline composite.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Hybrid nanocomposites. Conductive polymers. Sensing. Environmental remediation. DNA purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema representativo de um sensor/biossensor, mostrando a organização dos seus componentes.....	34
Figura 2 –	Representação dos íons metálicos nos sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B) da estrutura do espinélio AB_2O_4	36
Figura 3 –	Representação esquemática do processo de imobilização do ssDNA*.....	45
Figura 4 –	Representação esquemática do processo de imobilização do ssDNA* e o método utilizado para realizar os ensaios de detecção de fluorescência.	46
Figura 5 –	Representação esquemática do mecanismo de detecção de fluorescência de íons fosfato usando as $CoFe_2O_4$ NPs e do método adotado para realizar os ensaios de detecção de fluorescência.	47
Figura 6 –	Difratogramas de raios X das amostras CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b).....	48
Figura 7 –	Espectros infravermelho das amostras CoFeNPs (a), e a-CoFeNPs (b).....	49
Figura 8 –	Micrografias TEM das amostras CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b), os padrões de SAED são mostrados em (c) e (d) para CoFeNPs e a-CoFeNPs, respectivamente. O histograma do tamanho de partícula das amostras foi obtido após a estimativa do diâmetro de 130 [110] partículas, conforme representado em micrografias TEM, para CoFeNPs (e) e a-CoFeNPs (f), respectivamente.....	51
Figura 9 –	Curvas de magnetização de amostras de CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b).....	52
Figura 10 –	Espectros de emissão de fluorescência normalizados da solução de ssDNA* (30nM) (I) e após interação com CoFeNPs (II) e a-CoFeNPs (III).....	54
Figura 11 –	Medidas de DLS para as amostras CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b) antes e a imobilização das sondas (ssDNA*).....	56
Figura 12 –	Curvas de TGA para as amostras de CoFeNPs e ssDNA*/CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs (b).	57

Figura 13 –	Porcentagem da recuperação da fluorescência após a interação do complexo ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs com uma solução de fosfato de 500 μ M.	58
Figura 14 –	Espectros de emissão de fluorescência da solução sobrenadante ssDNA* e intensidade da emissão da fluorescência em 520 nm (detalhe) após 120 min de interação, para diferentes concentrações iniciais dos a-CoFeNPs. Observe que há a superposição das curvas 0,16 e 0,24 g L ⁻¹	60
Figura 15 –	Resposta da fluorescência das a-CoFeNPs sob diferentes tipos de experimentos.	61
Figura 16 –	Estudo cinético da diminuição da fluorescência da solução durante a imobilização do ssDNA* na superfície das a-CoFeNPs (a) e do aumento da fluorescência após a exposição do ssDNA*/a-CoFeNPs a uma solução de fosfato (b).	62
Figura 17 –	Intensidade da resposta de fluorescência dos a-CoFeNPs após a adição de íons fosfato na faixa de 150 a 5000 nM (a) e a faixa de resposta linear do sensor a-CoFeNP (b).	63
Figura 18 –	Resposta do complexo ssDNA*/a-CoFeNPs a diferentes ânions (10 μ M) dissolvidos em uma solução tampão Tris-HCl, pH 7,4.	65
Figura 19 –	Resposta de recuperação de fluorescência da plataforma ssDNA*/a-CoFeNPs para diferentes concentrações de fosfato em amostras de SBF.	67
Figura 20 –	Resposta da fluorescência da plataforma ssDNA*/a-CoFeNPs após exposição a HBS puro e HBS sem proteínas (spHBS).	68
Figura 21 –	Representação da estrutura química do corante azul de metileno.	73
Figura 22 –	Representação da classificação dos polímeros quanto (a) à estrutura molecular (linear, ramificado e reticulado), e à composição química (homopolímeros ou copolímeros) (b).	76
Figura 23 –	Estrutura química da quitosana.	77
Figura 24 –	Representação da estrutura química do alginato de sódio.	78
Figura 25 –	Representação esquemática da ligação cruzada dos blocos de homopolímero com os íons de cálcio, formando uma estrutura semelhante a uma “caixa de ovos”.	79
Figura 26 –	Estados de carga nas quais as estruturas do PPy podem ser encontradas.	81

Figura 27 –	Representação esquemática das etapas presentes no processo de preparação do compósito PPy@Alg/Qui/CoFeNPs.....	83
Figura 28 –	Representação esquemática da montagem experimental para os estudos de adsorção do corante AM pelo NCM PPy@Alg/Qui/CoFeNPs em modo batelada.....	87
Figura 29 –	Espectros de FTIR das CoFe ₂ O ₄ NPs (a), NCM Alg/Qui/CoFeNPs (b) e NCM PPy@Alg/Qui/CoFeNPs (c).	93
Figura 30 –	Micrografias dos compósitos Alg/Qui/CoFeNPs (a, b, c) e PPy@Alg/Chi/CoFeNPs (d, e, f).	94
Figura 31 –	Curvas de TGA para as NPs CoFe ₂ O ₄ (a) e o compósito PPy@Alg/Qui/CoFeNPs (b) e sua derivada primeira - DTG (c).	95
Figura 32 –	Espectros de UV-Vis da solução de AM (curva a) após 24 h de interação com os NCM Alg/Qui/CoFeNPs (b) e PPy@Alg/Chi/CoFeNPs (c).	96
Figura 33 –	Efeito da variação do pH sobre a eficiência de adsorção de AM (a) e determinação do ponto zero de carga (b) do compósito PPy@Alg/Qui/CoFeNPs.	97
Figura 34 –	Efeito do tempo de interação na eficiência de remoção de AM pelo compósito PNCM-PPy (a) e PóNCM-PPy.....	99
Figura 35 –	Efeito da concentração inicial de AM sobre (■) a quantidade percentual de remoção e (♦) na qe do nanocompósito magnético.	100
Figura 36 –	Ajuste dos modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem (linha contínua), pseudo-segunda ordem (linha tracejada) e Morris-Weber (linha pontilhada) junto aos dados experimentais de remoção de AM pelo compósito PNCM-PPy.....	101
Figura 37 –	Ajustes lineares dos dados experimentais de remoção de AM pela amostra PNCM-PPy com os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).	101
Figura 38 –	Ajuste dos modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem (linha contínua), pseudo-segunda ordem (linha tracejada) e Morris-Weber (linha pontilhada) junto aos dados experimentais de remoção de AM pelo compósito PóNCM-PPy.....	102
Figura 39 –	Ajustes lineares dos dados experimentais de remoção de AM pela amostra PóNCM-PPy com os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).	103

Figura 40 –	Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha tracejada), e Freundlich (linha contínua) junto aos dados experimentais para a remoção de AM pelo compósito PNCM-PPy.....	104
Figura 41 –	Ajustes lineares dos modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados	104
Figura 42 –	Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha tracejada), e Freundlich (linha contínua) junto aos dados experimentais para a remoção de AM pelo compósito PóNCM-PPy.....	105
Figura 43 –	Ajustes lineares dos modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados experimentais de adsorção de AM pela amostra PóNCM-PPy.....	106
Figura 44 –	Efeito da temperatura sobre a capacidade de remoção do compósito PNCM-PPy para diferentes concentrações iniciais de AM.....	108
Figura 45 –	Efeito da temperatura sobre a capacidade de remoção do compósito PóNCM-PPy para diferentes concentrações iniciais de AM.....	109
Figura 46 –	Ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir em função da temperatura de adsorção para as amostras PNCM-PPy (a) e PóNCM-PPy (b).....	110
Figura 47 –	Composição dos nucleotídeos.....	114
Figura 48 –	Estrutura dos ácidos nucleicos (RNA e DNA) e estrutura química das bases nitrogenadas que compõe os nucleotídeos.....	115
Figura 49 –	Representação esquemática das principais etapas da síntese por fase-vapor do nanocompósito CoFe/PPy.....	119
Figura 50 –	Representação esquemática das principais etapas do protocolo de purificação de DNA a partir de amostras de sangue total humano....	124
Figura 51 –	Representação esquemática das principais etapas da PCR.....	126
Figura 52 –	Esquema da técnica de eletroforese em gel de agarose para a identificação da integridade e tamanho de fragmentos de DNA.....	129
Figura 53 –	Esquema ilustrativo das principais etapas em um protocolo de eletroforese em gel de agarose.....	131
Figura 54 –	Difratogramas de raios X das amostras e CoFe ₂ O ₄ NPs (a) e CoFeNPs (b).....	132
Figura 55 –	Espectros infravermelho das CoFe ₂ O ₄ NPs (linha tracejada), e do nanocompósito CoFe/PPy (linha contínua).....	134

Figura 56 –	Curvas de magnetização à temperatura ambiente (293 K) para as CoFe ₂ O ₄ NPs (▲), e o nanocompósito CoFe/PPy (●).	135
Figura 57 –	Espectros UV-Vis para a solução de DNA de esperma de salmão antes (linha contínua), e depois de interagir por 10 min com o nanocompósito CoFe/PPy (linha tracejada).	136
Figura 58 –	Porcentagem de adsorção de DNA de esperma de salmão pelo CoFe/PPy em função do pH da solução tampão de ligação.	137
Figura 59 –	Cinética do processo de adsorção do DNA de esperma de salmão pelos nanocompósitos CoFe/PPy.	139
Figura 60 –	Efeito da concentração inicial de DNA sobre a quantidade percentual de adsorção (---) e capacidade de adsorção q _e (—) do CoFe/PPy.	140
Figura 61 –	Dessorção do DNA adsorvido pelo NCM CoFe/PPy para as soluções-tampão: Fosfato/Fosfato (pH 7,8), Glicina/NaOH (pH 9,0) e Tris/SDS (pH 8,0).	141
Figura 62 –	Ajuste dos dados experimentais para a adsorção de DNA pelo compósito CoFe/PPy às isothermas de adsorção dos modelos de Langmuir (linha tracejada) e Freundlich (linha contínua).	142
Figura 63 –	Ajustes lineares dos modelos de isothermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados experimentais de adsorção de DNA pelo CoFe/PPy.	142
Figura 64 –	Ajuste dos dados experimentais de adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPy aos modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem (linha contínua), pseudo-segunda ordem (linha tracejada) e Morris-Weber (linha pontilhada).	144
Figura 65 –	Ajustes lineares dos dados experimentais de adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPt aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).	144
Figura 66 –	Espectros UV-Vis para amostras de DNA purificado a partir de sangue total humano utilizando o nanocompósito CoFe/PPy como adsorvente de fase sólida. No detalhe, experimento de eletroforese em gel de agarose (1%) para as mesmas amostras.	147
Figura 67 –	Variação do rendimento (●) e da razão 260/280 (■) da amostra de DNA em função do volume inicial de sangue humano.	148

Figura 68 –	Evolução do rendimento de DNA purificado após múltiplas eluições para uma mesma adsorção.	149
Figura 69 –	Curva de amplificação PCR em tempo real para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano com o NCM CoFe/PPy para as amostras CoFe/PPy – eluído (●) e CoFe/PPy – sem eluir (▲).	150
Figura 70 –	Espectros UV-Vis para as amostras de CoFe/PPy – eluído (curva contínua) e CoFe/PPy – sem eluir (curva pontilhada) após a amplificação PCR.	151
Figura 71 –	Comparação do rendimento do DNA obtido pelo uso do nanocompósito CoFe/PPy com os kits comerciais de purificação de DNA.	152
Figura 72 –	Estrutura química da polianilina em seus estados de oxidação.....	157
Figura 73 –	Diagrama simplificado de Jablonski.	159
Figura 74 –	Representação dos estados fundamental, excitado singlete e excitado tripleto.	160
Figura 75 –	Representação esquemática da preparação do compósito Ag/Polianilina.	164
Figura 76 –	Mecanismo de síntese do compósito Ag/Polianilina.	164
Figura 77 –	Gráficos lineares para o composto padrão e amostra a ser analisada. O gradiente para cada amostra é proporcional ao campo quântico de fluorescência da amostra.	168
Figura 78 –	Espectro de UV-Vis do compósito de Ag/Polipirrol das amostras A01 (linha contínua) e A08 (linha tracejada).....	173
Figura 79 –	Espectro do FTIR do compósito Ag/Polianilina das amostras A01 (linha contínua) e A08 (linha tracejada).....	174
Figura 80 –	Intensidade máxima de fluorescência do compósito Ag/Polianilina para diferentes comprimentos de onda de excitação.....	176
Figura 81 –	Espectro de emissão do compósito Ag/Polianilina para todos os experimentos analisados (A01 a A08) com $\lambda_{exc} = 300$ nm.	177
Figura 82 –	Representações gráficas da análise estatística para a intensidade de fluorescência dos compósitos de Ag/Polianilina: (a) Gráfico de Pareto e (b) gráfico cúbico.	178
Figura 83 –	Variação da intensidade de fluorescência da amostra A08 em função do pH do meio.	180

Figura 84 –	Varição da resistência de transporte de carga da amostra A08 em função do pH do meio.....	181
Figura 85 –	Representações gráficas da análise estatística do potencial zeta dos compósitos de Ag/Polianilina. (a) Gráfico de Pareto e (b) gráfico cúbico.	183
Figura 86 –	Varição do potencial zeta da amostra A08 em função do pH do meio.....	184
Figura 87 –	Representações gráficas da análise estatística para o tamanho de partícula dos compósitos de Ag/Polianilina. (a) Gráfico de Pareto e (b) Gráfico cúbico.	185
Figura 88 –	Gráficos lineares da área integrada de fluorescência em função do valor da absorvância no comprimento de onda de excitação ($\lambda = 300$ nm) para a) o sulfato de quinina e b) a amostra A08 do compósito de Ag/Polianilina.	186
Figura 89 –	Efeito do Ag/Polipirrol sobre células Vero de mamíferos.....	188
Figura 90 –	Efeito do compósito Ag/Polianilina sobre células de carcinoma cervical humano.	189
Figura 91 –	Imagens do microscópio de fluorescência de células de E. coli. a) sem tratamento (controle) b) sob ação do solvente (DMSO) e c) sob ação do compósito Ag/Pani/DMSO.	192

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores estimados de tempo de vida da sonda de DNA (ssDNA*), ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs.	54
Tabela 2 –	Valores estimados do potencial zeta (mV) das amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs com e sem a imobilização da ssDNA*.	55
Tabela 3 –	Desempenho do ssDNA */a-CoFeNPs para detecção de fosfato em comparação com os de diferentes sensores relatados na literatura.	64
Tabela 4 –	Compostos químicos do soro de sangue simulado preparado (SBF).	67
Tabela 5 –	Valores estimados da superfície de carga do AM pelo NCM PPy@Alg/Qui/FeCoNPs sob variação do pH.	98
Tabela 6 –	Parâmetros cinéticos para adsorção de AM pelas amostras PNCM-PPy e PóNCM-PPy.	102
Tabela 7 –	Parâmetros de isoterma de Langmuir e Freundlich para adsorção de AM pelas amostras PNCM-PPy e PóNCM-PPy.	105
Tabela 8 –	Capacidade de adsorção de AM em temperatura ambiente pelos compósitos PóNCM-PPY e PNCM-PPY em comparação com diferentes adsorventes reportados na literatura.	107
Tabela 9 –	Parâmetros termodinâmicos para adsorção de AM pelas amostras PNCM-PPy e PóPNCM-PPy.	110
Tabela 10 –	Lista de reagentes utilizados.	117
Tabela 11 –	Comparação entre a técnica de PCR convencional e a PCR em tempo real.	127
Tabela 12 –	Parâmetros de isoterma de Langmuir e Freundlich para adsorção de DNA de salmão pelo CoFe/PPy.	143
Tabela 13 –	Parâmetros cinéticos para a adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPy.	143
Tabela 14 –	Capacidade de adsorção de AM em temperatura ambiente pelo compósito PóNCM-PPY em comparação com diferentes adsorventes reportados na literatura.	145
Tabela 15 –	Lista de reagentes utilizados.	162
Tabela 16 –	Fatores e níveis adotados no planejamento para a síntese do compósito de Ag/Polianilina.	163
Tabela 17 –	Matriz de coeficiente de contraste do planejamento fatorial 2 ³ para a síntese do compósito de Ag/Polianilina.	163

Tabela 18 –	Planejamento fatorial e intensidade de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 342 nm) dos compósitos Ag/Polianilina.	178
Tabela 19 –	Planejamento fatorial e medidas de potencial zeta dos compósitos Ag/Polianilina.	182
Tabela 20 –	Planejamento fatorial e medidas de diâmetro médio de partículas dos compósitos Ag/Polianilina.	185

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
a-CoFeNPs	Nanopartículas de ferrita de cobalto tratadas termicamente.
Ag	Prata
Ag/Polianilina	Compósito de Ag e polianilina
Alg	Alginato
Alg/Qui/CoFeNPs	Nanocompósito magnético híbrido de alginato, quitosana e CoFeNPs
AM	Azul de metileno
ATP	Adenosina Trifosfato
CC₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CCD	Dispositivo de carga acoplada
C_e	Concentração no equilíbrio
C_f	Concentração final
C_i	Concentração inicial
Co	Cobalto
CoFe/PPy	Nanocompósito magnético de ferrita de cobalto revestido com Polipirrol
CoFe₂O₄	Ferrita de Cobalto
CoFeNPs	Nanopartículas de ferrita de cobalto
CONAMA	Conselho brasileiro do meio ambiente
CPRH	Agência Estadual do Meio Ambiente
Cu	Cobre
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTG	Análise termogravimétrica diferencial
dTNP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAM	6-Carboxifluoresceína
Fe	Ferro
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
G	Guanina
h	Horas
HBS	Soro de sangue humano

HeLa	Células de câncer cervical humano
I	Intensidade de fluorescência
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IR	Radiação infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
m	Massa do adsorvente
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio
min	Minutos
MPTS	3-Mercaptopropiltrimetoxisilano
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCM	Nanocompósito magnético
Ni	Níquel
NPs	Nanopartículas
PANI	Polianilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCs	Polímeros condutores
pH	Potencial hidrogeniônico
PNC	Laboratório de Polímeros Não-Convencionais
PNCM-PPy	NCM revestido com PPy em sua forma de pérola
PóNCM-PPy	NCM revestido com PPy em sua forma de pó
PPy	Polipirrol
PPy@Alg/Qui/Co	Nanocompósito magnético híbrido de alginato, quitosana e CoFeNPs
FeNPs	revestido com PPy
q_e	Capacidade de absorção no equilíbrio
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
q_t	Capacidade de absorção no tempo t
Qui	Quitosana
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SAED	Difração de elétrons de área selecionada
SBF	Soro de sangue simulado
SDS	Dodecilsulfato de sódio

spHBS	Soro de sangue humano sem proteínas
ssDNA	DNA de fita simples
ssDNA*	DNA de fita simples marcado com 6-carboxifluoresceína
ssDNA*/α-CoFeNPs	DNA de fita simples marcado com 6-carboxifluoresceína imobilizado sobre nanopartículas magnéticas de α -CoFe ₂ O ₄
ssDNA*/CoFeNPs	DNA de fita simples marcado com 6-carboxifluoresceína imobilizado sobre nanopartículas magnéticas de CoFe ₂ O ₄
T	Timina
T	Temperatura
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TGA	Análise Termogravimétrica
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
U	Uracila
UV	Radiação ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
v/v	Volume por volume
ζ	Potencial zeta
Zn	Zinco
ΔG	Energia Livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	USO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO PARA A DETECÇÃO DE ÍONS FOSFATO.	32
2.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	32
2.1.1	Sensores e Biossensores	33
2.1.2	Estrutura e Propriedades das Ferritas	35
2.1.2.1	Estrutura Cristalina	35
2.1.2.2	Propriedades Magnéticas	36
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.2.1	Materiais	38
2.2.1.1	Síntese das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe ₂ O ₄ NPs)	39
2.2.2	Métodos de caracterização.....	40
2.2.2.1	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	40
2.2.2.2	Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	40
2.2.2.3	Difração de Raios X.....	42
2.2.2.4	Análise Termogravimétrica	42
2.2.2.5	Magnetização	43
2.2.2.6	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	44
2.2.3	Experimentos de sensoriamento por fluorescência	45
2.2.3.1	Imobilização das sondas de DNA marcadas (ssDNA*) nas CoFeNPs	45
2.2.3.2	Mecanismo de detecção dos íons de fosfato.....	46
2.2.3.3	Preparação das amostras de soro de sangue humano.....	47
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.3.1	Caracterização da Nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFeNPs).....	47
2.3.1.1	Difração de Raios X.....	47
2.3.1.2	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	49
2.3.1.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	50
2.3.1.4	Medidas de Magnetização (Histereses)	51
2.3.2	Uso das CoFe₂O₄NPs como plataformas para sensoriamento de íons fosfato.....	53

2.3.2.1	Imobilização da sonda (ssDNA*) em CoFeNPs e a-CoFeNPs	53
2.3.2.2	Eficiência na detecção de íons fosfato das amostras ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs.....	58
2.3.2.3	Otimização para detecção dos íons fosfato em solução.....	59
2.3.2.4	Sensibilidade para a detecção dos íons fosfato em solução.....	62
2.3.2.5	Seletividade para a detecção dos íons fosfato em solução	64
2.3.2.6	Análises em amostras mais complexas.....	65
2.4	CONCLUSÕES	68
3	USO DO COMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE (POLIPIRROL/QUITOSANA/ALGINATO/FERRITA DE COBALTO) PARA A REMOÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO DE MEIOS AQUOSOS.....	70
3.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	70
3.1.1	Corantes.....	71
3.1.1.1	Azul de Metileno	72
3.1.2	Métodos de remoção de corantes.....	73
3.1.3	Polímeros	75
3.1.3.1	Quitosana	76
3.1.3.2	Alginato	77
3.1.3.3	Polipirrol.....	79
3.1.4	Compósitos	81
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
3.2.1	Materiais.....	82
3.2.1.1	Síntese das partículas de ferrita de cobalto (CoFe ₂ O ₄ NPs).....	82
3.2.1.2	Preparação do nanocompósito magnético híbrido PPy@Alg/Qui/CoFeNPs.....	83
3.2.2	Métodos de caracterização.....	84
3.2.2.1	Microscopia eletrônica de varredura	84
3.2.2.2	Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	84
3.2.2.3	Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	84
3.2.2.4	Análise Termogravimétrica	85
3.2.2.5	Determinação do ponto de carga zero	85
3.2.2.6	Experimentos de adsorção	86
3.2.2.7	Modelos de Isotermas de Adsorção.....	87

3.2.2.8	Modelos Cinéticos de Adsorção	89
3.2.2.9	Estudos termodinâmicos de adsorção	91
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.3.1	Caracterização dos compósitos.....	92
3.3.1.1	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	92
3.3.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	93
3.3.1.3	Análises Termogravimétricas	94
3.3.2	Experimentos de adsorção	95
3.3.2.1	Efeito do pH e mecanismo de adsorção.....	96
3.3.2.2	Efeito do tempo de interação e da concentração inicial de AM	98
3.3.2.3	Cinética de adsorção	100
3.3.2.4	Isotermas de Adsorção.....	103
3.3.2.5	Estudos termodinâmicos.....	107
3.4	CONCLUSÕES	110
4	USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO (FERRITA DE COBALTO)/POLIPIRROL PARA A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	112
4.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	112
4.1.1	Ácidos Nucléicos.....	113
4.1.2	Métodos de purificação de ácidos nucleicos	115
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	117
4.2.1	Materiais.....	117
4.2.1.1	Síntese das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe ₂ O ₄ NPs).....	118
4.2.1.2	Síntese do nanocompósito magnético de ferrita de cobalto e polipirrol (CoFe/PPy)	118
4.2.2	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	119
4.2.2.1	Difração de Raios X.....	119
4.2.2.2	Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	119
4.2.2.3	Magnetização	120
4.2.2.4	Experimento de adsorção de DNA	120
4.2.2.5	Experimentos de desadsorção de DNA	122
4.2.2.6	Purificação de DNA de amostra de sangue real	122
4.2.2.7	Reação em Cadeia de Polimerase	124
4.2.2.8	Eletroforese.....	128

4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
4.3.1	Caracterização das Nanopartículas	131
4.3.1.1	Difração de Raios X.....	131
4.3.1.2	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	133
4.3.1.3	Medidas de Magnetização em função do campo remanente (Histereses)	134
4.3.2	Uso do nanocompósito CoFe/PPy como material adsorvente de ácidos nucleicos.	135
4.3.2.1	Estudos de adsorção em sistema modelo.....	135
4.3.2.2	Isotermas de Adsorção.....	141
4.3.2.3	Cinéticas de Adsorção	143
4.3.2.4	Comparação do uso das CoFe/PPy com outros adsorventes de DNA	145
4.3.2.5	Estudos da adsorção de DNA a partir de amostras biológicas complexas	146
4.4	CONCLUSÕES	152
5	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE UM COMPÓSITO FLUORESCENTE DE PRATA/POLIANILINA	154
5.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	154
5.1.1	Polímeros Condutores – Polianilina.....	155
5.1.1.1	Polianilina	155
5.1.2	Fenômeno da Fotoluminescência.....	158
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	162
5.2.1	Materiais.....	162
5.2.1.1	Síntese do compósito Ag/Polianilina.....	162
5.2.2	Métodos de Caracterização.....	165
5.2.2.1	Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	165
5.2.2.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	165
5.2.2.3	Potencial Zeta (ζ).....	165
5.2.2.4	Espectroscopia de transformada de Fourier.....	166
5.2.2.5	Espectroscopia de Fluorescência	167
5.2.2.6	Rendimento Quântico	167
5.2.2.7	Espectroscopia Eletroquímica de Impedância	169
5.2.2.8	Ensaio de citotoxicidade	170
5.2.2.9	Ensaio de Atividade Antitumoral in vitro.....	171
5.2.2.10	Análises estatísticas	171

5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	172
5.3.1	Caracterização do compósito Ag/Polianilina	172
5.3.1.1	Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	172
5.3.1.2	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	173
5.3.1.3	Espectroscopia de Fluorescência	175
5.3.1.4	Potencial Zeta (ζ)	181
5.3.1.5	Diâmetro médio das partículas	184
5.3.1.6	Rendimento Quântico Relativo de Fluorescência.....	186
5.3.2	Uso do nanocompósito CoFe/PPy para ensaios de citotoxicidade e atividade antitumoral <i>in vitro</i>	187
5.3.3	Uso do nanocompósito CoFe/PPy como material antibacteriano	190
5.4	CONCLUSÕES	193
6	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	195
	REFERÊNCIAS.....	198
	APÊNDICE A – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO	219
	APÊNDICE B – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	221

1 INTRODUÇÃO

No presente manuscrito serão apresentados os resultados obtidos ao longo da realização do meu projeto de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Física (PPGFísica) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os trabalhos aqui discutidos foram desenvolvidos no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais, localizado no Departamento de Física (DF) da UFPE.

Esse trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de materiais baseados em nanopartículas magnéticas, nanopartículas metálicas, polímeros condutores e suas aplicações em sensoriamento de íons de fosfato, como adsorvente para a remoção de contaminantes em meio aquosos, em protocolos de purificação magnética de biomoléculas e como agentes terapêuticos e antimicrobianos.

Para alcançar nossos objetivos gerais, trabalhamos ao longo dos seguintes objetivos específicos:

- Produzir e caracterizar nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4 NPs) utilizando o método de co-precipitação.
- Imobilizar cadeias de DNA de fita simples, marcadas com um fluoróforo, na superfície das nanopartículas e aplicá-los como sistema de detecção de íons fosfato em meios aquosos e complexos.
- Estabelecer parâmetros de sensibilidade, seletividade da detecção por fluorescência ao se fazer o uso das plataformas de ssDNA*/CoFeNPs.
- Modificar a superfície de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4 NPs) com o polímero condutor polipirrol (PPy) através da polimerização química em fase vapor do monômero pirrol.
- Estabelecer os melhores parâmetros físico-químicos e cinéticos de adsorção de DNA a partir de sistemas modelos (meio aquoso) para o nanocompósito magnéticos (CoFe/PPy).
- Desenvolver protocolos de purificação magnética de DNA a partir de amostras biológicas complexas como sangue humano, fazendo uso do nanocompósitos CoFe/PPy como material adsorvente de fase sólida.
- Preparar nanocompósitos magnéticos híbridos de Alginato/Quitosana/CoFeNPs a partir da técnica de gelificação ionotrópica e realizar a modificação da sua superfície através da incorporação do PPy (PPy@Alg/Qui/CoFeNPs).

- Avaliar o comportamento do nanocompósito PPy@Alg/Qui/CoFeNPs como adsorvente para a remoção do corante de azul de metileno em meio aquoso, em função de parâmetros físico-químicos, cinéticos e termodinâmicos.
- Preparar um compósito de nanopartículas de prata (Ag NPs) e polianilina (PANI), e avaliar seu potencial citotóxico, antitumoral e antibacteriano.
- Otimizar as propriedades do compósito de Ag/Polianilina através do uso do planejamento fatorial (2^3) experimental.
- Caracterizar os diferentes materiais desenvolvidos quanto às suas propriedades químicas, morfológicas, magnéticas, elétricas, óticas, por meio das técnicas de espectroscopias no infravermelho (FTIR), ultravioleta-visível (UV-Vis), fluorescência, microscopia eletrônica de varredura e transmissão (MEV, MET), difração de Raio-X, medidas de magnetização, impedância elétrica, tamanho médio de partículas, potencial zeta e análises termogravimétricas.

Esta tese está organizada da seguinte forma:

- * Inicialmente são descritos os procedimentos empregados para a imobilização de sondas de DNA, marcadas com um fluoróforo, na superfície das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄ NPs), assim como os resultados obtidos do uso dessa plataforma como sistema de sensoriamento para a detecção de íons fosfato em meio aquoso e em um meio mais complexo, como o soro do sangue humano.
- * Em seguida são apresentados a preparação, caracterização e os procedimentos experimentais utilizados para a obtenção dos compósitos poliméricos híbridos de PPy@Alg/Qui/CoFeNPs, bem como os resultados dos ensaios de remoção do corante de azul de metileno.
- * Em seguida são descritos os procedimentos experimentais utilizados para a preparação e a caracterização do compósito magnético polimérico, CoFe/PPy, e sua aplicação para extração de DNA total em amostras de sangue humano.
- * Após isso, abordamos a preparação do compósito de Ag/Polianilina seguindo um planejamento fatorial (2^3), sua caracterização, e sua avaliação na atividade antitumoral e antibactericida contra células de câncer cervical humano (HeLa) e células bacterianas Gram-negativas (*E. coli*), respectivamente.
- * Por fim, apresentamos as conclusões e as perspectivas gerais de continuação do trabalho.

Esta tese contém ainda dois apêndices, onde são apresentadas uma descrição da preparação das soluções tampão utilizadas nos experimentos de sensoriamento dos íons fosfato e nos protocolos de purificação de DNA (**Apêndice A**), e uma relação dos trabalhos realizadas durante o período de Doutorado (**Apêndice B**).

2 USO DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO PARA A DETECÇÃO DE ÍONS FOSFATO.

2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os grupos fosfato são um componente essencial para todos os organismos vivos, pois desempenham muitas funções metabólicas (Jia *et al.*, 2016). Como exemplo, pode-se citar sua presença em fosfolipídios (moléculas essenciais para a formação de membranas celulares), em trifosfato de adenosina (fonte de energia para todos os processos celulares), em ácidos nucleicos (DNA e RNA), e também a rigidez mecânica de ossos e dentes, que se deve aos sais de fosfato de cálcio (Law Al e Adeloju, 2013).

A medida de concentrações dos níveis de fosfatos em amostras biológicas pode fornecer muitas informações para o diagnóstico clínico de vários problemas de saúde, indicando doenças como insuficiência renal, hipertensão, deficiência de vitamina D, distúrbios ósseos e hiperparatireoidismo (Kumar, 2009; Slatopolsky, 2011). Se altos níveis de fosfato no soro sanguíneo ($> 45 \text{ mg L}^{-1}$) estão presentes, o paciente pode ser diagnosticado com hiperfosfatemia, uma doença que leva a acúmulos de cálcio em tecidos moles, hipoparatiroidismo e à síndrome de lise tumoral (Askar, 2015; Tonelli *et al.*, 2005). Por outro lado, quando baixos níveis de fosfato ($> 25 \text{ mg L}^{-1}$) são observados, o paciente pode estar com hipofosfatemia, um distúrbio eletrolítico que causa amolecimento ósseo, insuficiência cardíaca, respiratória, e pode até levar ao coma (Adams, 2018; Fitzgerald, 2003). Se os níveis de fosfato no soro sanguíneo forem abaixo de 10 mg L^{-1} , a síndrome é classificada como grave, o que pode levar à alteração da composição e função das membranas celulares, causando redução de compostos fosforilados intracelulares, como o ATP e difosfoglicerato, com a resultante na disfunção de múltiplos sistemas (Araújo *et al.*, 2006).

Além disso, o fosfato é também usado comumente em fertilizantes, como precursor do fósforo, um nutriente essencial da planta. No entanto, seu uso extensivo na agricultura faz dos íons fosfato um importante contaminante do solo e da água, sendo que a recomendação da Organização Mundial da Saúde para uma concentração de fosfato na água potável é de no máximo 1 mg L^{-1} (Law Al e Adeloju, 2013). Isso porque elevados índices de fosfato em lagos e rios podem induzir o crescimento excessivo de plantas e algas (no processo conhecido como eutrofização), o que impede a penetração da luz, reduzindo a taxa fotossintética nas camadas inferiores. Com isso, ocorre o déficit de oxigênio suficiente para atender a demanda respiratória dos organismos aeróbios, conseqüentemente interrompendo os ciclos de vida aquáticos. Este problema normalmente provocado pelo homem é resultado das constantes descargas industriais, utilização excessiva de adubos, criação intensiva de animais e demais descartes antropogênicos

no ambiente (Camarero e Catalan, 2012; Knutsson, Rauch e Morrison, 2013). Portanto, existe também a necessidade de sensores de fácil manipulação que possam avaliar rapidamente a concentração de fosfato em meio aquoso, de modo a permitir um melhor monitoramento da qualidade da água.

Os procedimentos convencionais para a detecção de fosfato envolvem o uso de cromatografia e espectrofotometria, métodos que tendem a ser laboriosos, demorados e demandantes de muitos solventes, o que, por sua vez, torna essas técnicas de alto custo (Fujiwara *et al.*, 1982; Quintana, Rodil e Reemtsma, 2006). Com isso em mente, várias estratégias para a detecção e remoção de íons de fosfato de meios aquosos têm sido desenvolvidas. Em busca para um método mais econômico e de monitoramento rápido, neste trabalho investigamos o uso de nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFeNPs) para o reconhecimento seletivo de íons fosfato dissolvidos em meio aquoso e presentes em amostras mais complexas, como soro de sangue humano (HBS) (Wang, Lopez e Liu, 2018).

Visando as mais diferentes aplicações em nanotecnologia, as nanopartículas de ferrita têm sido muito investigadas por apresentarem excelentes propriedades elétricas e magnéticas. As nanopartículas de CoFe_2O_4 exibem propriedades de baixa coercividade, magnetização moderada e anisotropia magnetocristalina cúbica que, juntamente com uma boa estabilidade física, permitem seu uso em várias aplicações, como tintas magnéticas e memórias magnéticas de alta densidade, administração de medicamentos a partes específicas do corpo (“*drug delivery*”), tratamento térmico em células tumorais através da resposta térmica das partículas a campos magnéticos alternados e em sensores de gás (Hergt *et al.*, 2004; Kim, Kim e Lee, 2003; Masrour, Hamedoun e Benyoussef, 2012).

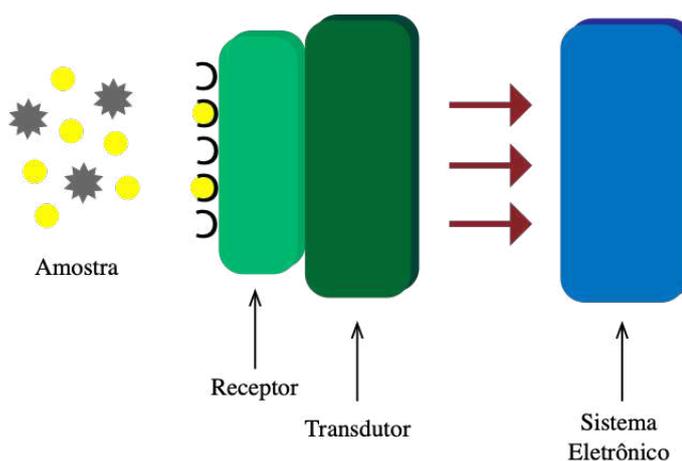
Neste capítulo, demonstramos o uso de CoFeNPs contendo sondas de DNA de cadeia única (ssDNA*) marcadas com fluorescência imobilizada na superfície da partícula, que podem ser aplicadas para a detecção seletiva de íons fosfato dissolvidos em meio líquido. Nós exploramos o fato de que os grupos fosfato podem deslocar sondas de ssDNA* anexadas às nanopartículas, causando uma mudança perceptível no sinal de fluorescência do líquido sobrenadante.

2.1.1 Sensores e Biossensores

Por definição, um sensor é um dispositivo que responde a um estímulo, sendo ele químico ou físico, de maneira específica, e que transforma essa informação em um sinal analítico, com o objetivo de obter uma determinada informação. Existem diferentes tipos de sensores que respondem a estímulos variados, como os óticos, eletroquímicos, térmicos, cinéticos, elétricos, sonoros, e entre outros.

Sensores normalmente são compostos por i) um receptor, que proporciona o reconhecimento da amostra a ser analisada, ii) um transdutor, que transforma o estímulo em uma grandeza física (um sinal) que pode ser eletronicamente armazenado, e iii) o sistema de processamento, que é responsável por filtrar, amplificar e analisar o sinal transduzido, transmitindo-o para um monitor ou armazenando-o em algum dispositivo, como mostrado na Fig. 1.

Figura 1 – Esquema representativo de um sensor/biossensor, mostrando a organização dos seus componentes.



Fonte: Autoria própria (2020).

Quando a amostra de reconhecimento é de natureza biológica, como anticorpos, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, organelas e células, tem-se o chamado biossensor. Os biossensores são pequenos dispositivos que têm como principal característica combinar a atividade seletiva das reações biológicas com a sensibilidade a um analito de interesse, para a detecção de analitos-alvo. Altamente sensíveis e seletivos, os sensores vêm sendo cada vez mais explorado, uma vez que podem ser usados nas mais diversas áreas como no campo ambiental, na saúde, veterinária, entre outros (Mehrvar e Abdi, 2004; Wang, 2000).

A detecção pode ser direta, quando a interação biológica é medida diretamente, ou indireta, que se dá através do uso de elementos catalíticos (enzimas) ou elementos modificados com marcadores fluorescentes. Muito embora um sistema de medição direta, chamado de não-reticulado, apresente maior sensibilidade, menor custo e menor tempo de operação, os sistemas reticulados (isto é, os de medição indireta) exibem maior estabilidade (Mehrvar e Abdi, 2004). Os sensores também podem ser classificados através da natureza do estímulo reconhecido (dependendo do elemento biológico), que pode ser por bioafinidade, quando dependem da ligação específica/seletiva do analito-alvo ligado à superfície do receptor (como, por exemplo, antígeno e anticorpos, sonda de oligonucleotídeos), ou biocatalítico, que tem como princípio as

reações catalisadas por macromoléculas, nas quais enzimas ou células imobilizadas são usadas para o reconhecimento do substrato-alvo (Wang, 2000).

Para o desenvolvimento de biossensores mais eficientes, é importante observar algumas características, como i) seletividade, que relaciona a habilidade de diferenciar o analito-alvo das demais espécies presentes, ii) sensibilidade, na busca pela amplificação do sinal detectado, e iii) estabilidade, tanto operacional como de armazenamento através da preservação da camada biológica. Assim, diversos materiais têm sido explorados para o aprimoramento desse tipo de dispositivos, na tentativa de encontrar os melhores parâmetros de funcionamento e da identificação da matriz, receptor e transdutor mais adequados (Kohles *et al.*, 2011).

Dentre dos materiais explorados, os nanomateriais têm sido largamente aplicados em biodispositivos para análises na nanoescala, e que foram desenvolvidos para estudar com alta sensibilidade as interações de nível celular e molecular, ao permitir o aumento da relação sinal/ruído e a obtenção de um limite de detecção para concentrações na faixa entre nanomolar e picomolar (Choi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). Recentemente, houve um grande interesse no uso de nanopartículas magnéticas ou metálicas em aplicações analíticas pelo uso de sondas altamente programáveis baseadas em DNA e RNA. Essas sondas de DNA específicas podem ser incorporadas em plataformas versáteis para uso em biossensores, os quais, por sua vez, podem ser convenientemente adaptados para o reconhecimento de diferentes alvos (Lopez, Zhang e Liu, 2017; Yu, Liu e Liu, 2017). Nesse sentido, a ligação de sondas de DNA nas nanopartículas pode conferir um reconhecimento molecular, permitindo o desenvolvimento de sensores altamente específicos. Nessa perspectiva, nesse trabalho propomos realizar a síntese e caracterização de nanopartículas de ferrita de cobalto recobertas com sondas de DNA de cadeias únicas (ssDNA*) em sua superfície para o sensoriamento de íons fosfato em meios complexos, como o soro do sangue humano.

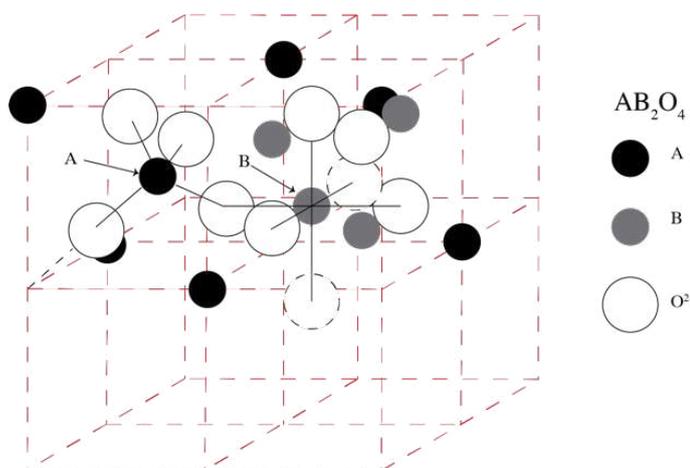
2.1.2 Estrutura e Propriedades das Ferritas

2.1.2.1 Estrutura Cristalina

As ferritas, que pertencem ao grupo de materiais óxidos, são constituídas pela combinação de átomos de ferro e de um metal divalente, sendo representadas através da fórmula geral $(Me)Fe_2O_4$, onde (Me) é um metal de transição, como Cu, Ni, Co, Mg, Zn e Fe. Elas possuem estrutura cristalina semelhante à do mineral espinélio ($MgAl_2O_4$), com estrutura cúbica de face centrada, devido ao empacotamento dos ânions bivalentes (Heck *et al.*, 2005). Por definição, o espinélio é um óxido ternário, cuja fórmula química é AB_2O_4 , onde A representa um cátion metálico divalente (Me^{2+}), que normalmente ocupa um sítio tetraédrico, e B representa um cátion metálico trivalente, que ocupa um sítio octaédrico de um cristal de

estrutura cúbica (Heck *et al.*, 2005); quando o cátion trivalente for ocupado por átomos de ferro, o material é denominado ferrita.

Figura 2 – Representação dos íons metálicos nos sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B) da estrutura do espinélio AB_2O_4 .



Fonte: Autoria Própria (2020).

A representação de uma célula unitária com estrutura do espinélio pode ser vista na Fig. 2. Sua estrutura pode ser descrita por uma célula unitária composta por 32 átomos de oxigênio, gerando 64 interstícios de simetria tetraédrica (sítios A) e 32 sítios de simetria octaédrica (sítios B), sendo que apenas 8 dos sítios A são ocupados, e 16 dos sítios B. As ferritas do tipo espinélio normal são aquelas em que os íons de Me^{2+} ocupam os sítios A e os íons de Fe^{3+} os sítios B, sendo as do tipo espinélio inverso aquelas com metade dos íons de Fe^{3+} preenchendo os sítios A e a outra metade, juntamente com os íons de Me^{2+} , os sítios B (Smit e Wijn, 1959).

Uma representação mais detalhada pode ser feita através da fórmula cristalográfica $(Me_{\delta}Fe_{\delta-1})[Me_{\delta-1}Fe_{\delta+1}]O_4$, com o parênteses representando o sítio A e o colchetes o sítio B. Quando $\delta = 1$, tem-se a ferrita do tipo normal, e $\delta = 0$, a do tipo inverso. No entanto, esses dois casos ideais não são prováveis de serem encontrados, sendo mais comum ocorrer as ferritas do tipo espinélio misto, $0 < \delta < 1$, as quais têm estrutura intermediária entre as outras duas. Para os metais divalentes que se encontram no mesmo período do ferro, com configuração eletrônica d^6 , d^7 , d^8 e d^9 , a estrutura formada é preferencialmente do tipo espinélio inverso, sendo esse o caso dos íons de cobalto (Co^{+2}) (Smit e Wijn, 1959).

2.1.2.2 Propriedades Magnéticas

Na estrutura dos espinélios, os cátions localizados nos sítios A e B têm como primeiros vizinhos os cátions em sítios B e A, respectivamente. A energia de interação de troca ocorre

entre dois átomos da mesma sub-rede, ou entre elas. Nas ferritas, essa interação de troca se deve ao fato de que os primeiros vizinhos dos cátions de metal de transição são os ânions bivalentes de oxigênio, que por sua vez mediam a interação entre os cátions. Assim, as interações de troca nesses materiais ocorrem através dos elétrons dos átomos do oxigênio, sendo chamadas de interações de supertroca, porque as funções de onda dos orbitais p do oxigênio se sobrepõem às funções de onda dos orbitais 3d dos cátions (Arelaro, 2008; O’Handley, 2000).

Os íons situados nos sítios A e no sítio B pertencem a sub-rede com acoplamento ferromagnético ou antiferromagnético, e as interações de supertroca entre as duas sub-redes favorecem o alinhamento antiparalelo dos spins; no entanto, devido à diferença entre os números de cátions nos sítios A e B, o comportamento da ferrita é comumente ferrimagnético (CULLITY e GRAHAM, 2009).

As propriedades magnéticas de um material estão diretamente relacionadas com sua estrutura eletrônica. Na presença de campos magnético é possível classificar as características magnéticas dos materiais de acordo com os tipos de interação entre seus momentos de dipolo magnéticos. Estas interações geram diferentes orientações espontâneas dos spins, as quais ocorrem em temperaturas abaixo da temperatura crítica, chamada de temperatura de Curie (T_c). Abaixo desta temperatura o material pode ser classificado como ferromagnético, ferrimagnético e antiferromagnético e para temperaturas superiores a T_c , os efeitos de flutuação térmica quebram essa ordem magnética, tornando o material paramagnético.

Como o momento magnético total de um material magnético é dado pela soma dos momentos de spin, um material é chamado de ferromagnético quando possui alinhamento espontâneo e paralelo dos spins. Já quando o acoplamento de spin é antiparalelo, gerado por duas sub-redes, uma com spins orientados para cima e outra com spins orientados para baixo, resultando em um momento magnético total nulo, o material é chamado de antiferromagnético. Por sua vez, quando os momentos de spin são antiparalelos, mas com magnitudes diferentes, resultando num momento magnético não nulo, o material é chamado de ferrimagnético.

Além disso, há também aqueles materiais em que os spins desemparelhados não possuem interação entre si, de modo a não haver acoplamento, resultando em spins com orientações aleatórias. No entanto, quando submetidos a um campo magnético externo, pode ocorrer um alinhamento paralelo ou antiparalelo ao campo magnético aplicado, o que caracteriza as substâncias como sendo paramagnéticas e diamagnéticas, respectivamente.

As propriedades magnéticas dos materiais magnéticos também são sensíveis ao tamanho das partículas. Quando uma partícula possui um diâmetro menor que o diâmetro crítico (d_c), os momentos magnéticos passam a ser orientados apenas em uma direção, possuindo assim apenas um domínio magnético. Quando estes materiais estão em temperatura acima de T_c são

conhecidos como superparamagnéticos. Abaixo de T_c , tanto os materiais ferromagnéticos quanto os ferrimagnéticos apresentam comportamento semelhante ao dos materiais paramagnéticos, pois quando submetidos a um campo magnético externo, com intensidade suficiente, seus monodomínios se alinham paralelamente ao campo magnético (O'Handley, 2000).

Na atualidade, os materiais magnéticos, têm sido amplamente utilizados nas mais variadas áreas, com aplicações que se estendem desde a fabricação de dispositivos eletrônicos (bobinas, imãs, motores) pela indústria até para o armazenamento de dados, sensoriamento, contraste de imageamento por ressonância magnética nuclear, remediação ambiental, tratamentos por hipertermia, liberação controlada de drogas, purificação de moléculas biológicas.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Para a síntese das partículas de ferrita de cobalto, foram usados o cloreto de cobalto (II) hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, EUA), e o cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica, Brasil), como precursores metálicos, e o hidróxido de amônia (NH_4OH , Dinâmica, Brasil). Cloreto de magnésio (MgCl_2 , Vetec, Brasil), ácido clorídrico (HCl , Química Moderna, Brasil) e tris-(hidroximetil)aminometano (Tris, Sigma-Aldrich, EUA) foram usados para preparar a solução tampão de Tris-HCl. A sequência de oligonucleotídeos marcados com carboxifluoresceína (FAM) usada neste estudo (FAM - CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT) foram sintetizadas e purificadas pela Thermo Fisher Scientific (EUA). Cloreto de sódio (NaCl , Química Moderna, Brasil), iodeto de sódio (NaI , Química Moderna, Brasil), bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , Proquímios, Brasil), carbonato de sódio (Na_2CO_3 , Reagente, Brasil), sulfato de sódio (Na_2SO_4 , Merck, Alemanha), citrato de trissódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Nuclear, Brasil), nitrato de sódio (NaNO_3 , Química Moderna, Brasil), brometo de sódio (NaBr , Química Moderna, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH , Química Moderna, Brasil), acetato de sódio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Química Moderna, Brasil) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4 , Nuclear, Brasil) foram usados no ensaios de seletividade e para preparar as amostras de soro de sangue simulado (SBF). Em todos os experimentos, utilizamos água deionizada de alta pureza obtida a partir de um sistema de purificação Synergy® (Millipore, EUA).

2.2.1.1 Síntese das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄NPs)

As nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFeNPs) foram produzidas pelo método de co-precipitação química através de uma adaptação do método usado por (Medina-Llamas *et al.*, 2014), em um processo de várias etapas que envolve a troca de um precursor de ferro por um precursor de cobalto. Primeiramente, em um balão de fundo redondo de 250 mL foram misturados 25 mL de uma solução de CoCl₂ (0,5 M) e 25 mL de uma solução de FeCl₃ (1 M). Após 5 min, foi adicionado 125 mL de uma solução aquosa de NH₄OH (50% v/v), sob vigorosa agitação. A solução final foi mantida a 100°C por 1h e o precipitado foi decantado com a ajuda de um ímã. O material coletado foi repetidamente lavado com água deionizada para reduzir a contaminação e depois seco em uma estufa a 80 ° C por 48h. O pó resultante foi macerado em um almofariz ágata até homogeneização.

O método de co-precipitação utilizado é baseado na precipitação simultânea dos hidróxidos e oxalatos dos cátions (Co³⁺ e Fe³⁺) pelo NH₄OH. O processo resulta da policondensação inorgânica envolvendo os íons metálicos em solução, levando à nucleação de óxidos metálicos, na forma



Examinamos também o efeito do tratamento térmico nas propriedades das nanopartículas de ferrita de cobalto preparadas. Para isso, parte da amostra de pó de CoFeNPs (chamada posteriormente de a-CoFeNPs) foi aquecida a alta temperatura em uma atmosfera de ar, usando um forno elétrico, e outra parte (CoFeNPs) foi separada na forma como preparada. A temperatura de 600 °C foi escolhida com o objetivo de melhorar as propriedades magnéticas e cristalinas das partículas sem aumentar sua agregação e distribuição de tamanho (Purnama *et al.*, 2015). Nesse processo, as amostras foram aquecidas primeiro a uma taxa de 10 ° C/min até atingir 600 °C, uma temperatura que foi mantida por 1 h. E em seguida, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente (RT) a uma taxa de 10 ° C/min. Esse procedimento de recozimento foi essencial para modificar o ordenamento químico e alterar a cristalinidade e as propriedades magnéticas das partículas CoFeNPs. Realizamos então o estudo para estabelecer as diferenças entre nanopartículas de ferrita de cobalto que não foram submetidas ao tratamento térmico (CoFeNPs) e aquelas termicamente tratadas (a-CoFeNPs).

2.2.2 Métodos de caracterização

2.2.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Na microscopia eletrônica de transmissão (TEM), elétrons são gerados por um filamento incandescente e acelerados através de uma coluna sob vácuo, por meio de uma diferença de potencial elétrico. O feixe de elétrons passa por várias lentes eletromagnéticas para fins de focalização e correção de aberrações. Após passar pelas lentes, o feixe atinge perpendicularmente a amostra, tendo uma área de seção transversal típica de alguns micrômetros. Ainda neste trecho das lentes, existe uma abertura (diafragma) que controla a coerência, intensidade e paralelismo do feixe. Depois de atravessar a amostra, um conjunto de lentes magnéticas focaliza o feixe transmitido sobre uma tela fosforescente (ou então sobre um CCD), para a formação de uma imagem nítida e ampliada. Há basicamente três tipos de feixes que irão emergir da amostra: (i) o feixe diretamente transmitido sem mudanças relevantes em relação ao feixe incidente; (ii) o feixe devido ao espalhamento elástico, ou seja, o feixe difratado que obedece a lei de Bragg; e (iii) o feixe espalhado inelasticamente devido à interação com os elétrons dos átomos da amostra (Tang e Yang, 2017).

O microscópio utilizado foi um JEOL JEM 1200EX-II (Jeol, Japão) do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME-UFPR). O microscópio opera com um filamento de tungstênio e com potencial de operação de até 120 kV. O microscópio tem uma resolução máxima de 0,2 nm e está equipado com uma câmera CCD. Para a preparação da amostra, 1mg do material foi diluído em 5 mL de água deionizada e disperso na ponteira ultrassônica por 5 min; posteriormente, um volume de 10 μ L dessa solução de CoFe_2O_4 NPs, previamente preparada, foi depositado com o auxílio de uma micropipeta em uma grade de Cu (mesh 400) da Ted Pella (EUA), recoberta com um filme ultrafino (~ 2 nm) de carbono. Após a deposição, as grades foram colocadas em um dessecador por 24 h para a total evaporação do solvente.

2.2.2.2 Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia por infravermelho é muito utilizada para a obtenção de informações estruturais sobre uma amostra. Quando um material é exposto à radiação infravermelha, transições vibracionais/rotacionais podem acontecer se a frequência da radiação coincidir com os modos de vibração das moléculas que constituem o material. Esses modos de vibração podem ser de dois tipos: as vibrações de deformações axiais (ou de estiramento) e as vibrações de deformações angulares. As deformações de estiramento envolvem a alteração do comprimento da ligação através do aumento/diminuição da distância entre dois átomos da molécula, e podem ser simétricas ou antissimétricas. Já as vibrações de deformações angulares,

envolvem a alteração do ângulo da ligação pelas mudanças das posições dos átomos em relação ao eixo de ligação inicial, por sua vez estas deformações podem ser simétrica, no plano (chamada de torção) e fora do plano (tesoura), ou antissimétrica, no plano (balanço) e fora do plano (rotação) (Pavia *et al.*, 2010).

Um espectro de infravermelho reflete a energia absorvida nas transições vibracionais de uma molécula, que aparecem como bandas ou picos com diferentes valores do número de onda (cm^{-1}). A intensidade, que corresponde à quantidade de energia absorvida pela amostra, é proporcional ao número de moléculas interagentes com a radiação e pode ser estimada em termos da transmitância através da razão da potência radiante transmitida pela potência incidente.

O diferencial da espectroscopia por transformada de Fourier é o uso de um interferômetro, que permite a medida simultânea de diferentes frequências no infravermelho, tornando a técnica mais rápida e de maior sensibilidade quando comparada com o uso de espectrômetros dispersivos. O interferômetro mais comumente usado em espectroscopia de infravermelho é o interferômetro de Michelson, que consiste em dois espelhos (um fixo e um móvel) e um divisor de feixes localizado a 45° dos espelhos.

No processo da medida de absorção no infravermelho, a luz de uma fonte de infravermelho é colimada por um espelho e introduzida no interferômetro. A radiação incidente atinge o divisor de feixes e separada em dois feixes, sendo uma parte a luz transmitida e a outra refletida pelos espelhos. Dessa forma, quando essas duas partes são então refletidas de volta e recombinadas no separador de feixes ocorre um processo de interferência que pode ser construtiva ou destrutiva, a depender da diferença entre os caminhos ópticos percorridos por cada feixe. Esse feixe gerado passa então para a região da amostra, que por sua vez absorve os comprimentos de onda (frequências) correspondentes a seu espectro infravermelho (Pavia *et al.*, 2010). Quando o sinal do interferograma modificado chega ao detector, o mesmo é então comparado pelo computador com o interferograma produzido por um feixe de laser de referência que serve como padrão de comparação. No entanto, apenas após a realização da transformada de Fourier pelo computador, é possível extrair as frequências individuais que foram absorvidas pela amostra do interferograma final, para então se obter o gráfico típico do espectro infravermelho (Pavia *et al.*, 2010).

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (região do chamado infravermelho médio) foram obtidos usando um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão) com resolução de 4 cm^{-1} , com uma média de 64 varreduras. As amostras foram preparadas utilizando pastilhas de KBr, obtidas pela

maceração de 0,1 mg do material e 50 mg de KBr em um almofariz de ágata, com a mistura sendo levada por 10 min a um pastilhador sob 2 toneladas.

2.2.2.3 Difração de Raios X

Desde sua descoberta, a técnica de difração de Raios X (XRD) tem sido muito utilizada para a caracterização estrutural de diversos tipos de materiais, tanto em forma de pó (material massivo) como em forma de filme fino. A geometria mais comum de uma medida de XRD é a chamada Bragg-Brentano ou $\theta - 2\theta$ (CULLITY, 1978), utilizada na caracterização estrutural das nanopartículas neste trabalho. Nesta configuração, um feixe monocromático de raios X atinge a amostra a diferentes ângulos de incidência θ . Enquanto isso, um detector mede a intensidade do feixe refletido segundo o mesmo ângulo θ com a superfície da amostra, de modo que há um ângulo 2θ em relação com a direção de propagação do feixe incidente.

Os fótons de raios X incidentes na amostra serão difratados pelos diversos planos atômicos presentes no material, representados pelos índices de Miller (hkl). Estes raios refletidos sofrerão interferência construtiva/destrutiva devido à diferença de comprimento de caminho óptico. Ocorrerá interferência construtiva somente se a diferença entre os caminhos ópticos for um número inteiro de comprimentos de onda. Quando isso ocorrer, observaremos um pico de difração. A lei de Bragg ($2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$) nos mostra que a partir dos ângulos θ de difração podemos encontrar a distância interplanar correspondente, a qual, por sua vez, está relacionada com o parâmetro de rede da estrutura cristalina e com os índices de Miller, de modo que com o conhecimento do d_{hkl} podemos determinar a estrutura cristalina do material (CULLITY, 1978).

As medidas de difração de raios X deste trabalho foram realizadas utilizando um difratômetro SamarLab (Rigaku, Japão), equipado com uma fonte de raios X de Cu, de comprimento de onda λ igual 1,5406 Å, um equipamento multiusuário do Departamento de Física da UFPE.

2.2.2.4 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica termoanalítica que permite o acompanhamento da variação de massa de uma amostra em função do incremento controlado da temperatura. Através dessa técnica, é possível conhecer detalhadamente alterações que o aquecimento pode provocar em um material, permitindo, por exemplo, estabelecer a faixa de temperatura em que sua composição química permanece inalterada, a temperatura em que ela se decompõe, e o acompanhamento do andamento de reações de desidratação, oxidação, e decomposição, entre outras (MACHADO, L. D. B.; MATOS, 2004).

A TGA pode ser classificada como uma técnica: i) isotérmica, em que a massa é registrada em função do tempo à temperatura constante, ii) quase-isotérmica, quando a amostra é aquecida a uma taxa linear enquanto não há variação de massa, e iii) dinâmica, em que as variações de massa são registradas em função da temperatura, quando a mesma está submetida a uma variação linear da temperatura. O equipamento usado na análise é composto basicamente por uma termobalança (associação forno-balança), que permite a pesagem contínua de uma amostra enquanto a mesma é aquecida ou resfriada. Além da balança e do forno com controle de atmosfera, o instrumento deve ainda possuir um suporte para a amostra, um sensor de temperatura, e ser capaz de registrar todas as informações coletadas. Com isso, é possível trabalhar sob as mais variadas condições experimentais, sob diferentes atmosferas, massas, razões de aquecimento, entre outras (MACKENZIE, 1985).

De modo geral, nas análises de TGA são registradas curvas da variação da massa da amostra em função da temperatura ou do tempo. Por exemplo, nessas curvas podem ser observados degraus em relação ao eixo que corresponde às variações de massa, que indicam serem as espécies observadas termicamente estáveis naquela faixa de temperatura. Na análise termogravimétrica diferencial (DTG), as curvas registradas a partir das curvas de TGA correspondem à primeira derivada da variação de massa em relação à temperatura. É importante ressaltar que uma curva de DTG não contém mais informações do que a curva TGA original, mas simplesmente apresenta os dados de uma maneira distinta, mais facilmente visualizável (Mackenzie, 1985; Wendlandt, 1986).

Em nosso trabalho, as curvas de TGA das amostras, colocadas na forma de pó em cadinho de platina, foram obtidas no equipamento TGA-50H (Shimadzu, Japão), do Departamento de Química Fundamental, sob uma atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) em uma faixa de temperatura de 25 °C até 900 °C, utilizando uma rampa de aquecimento a uma taxa de 10 °C/min.

2.2.2.5 Magnetização

As propriedades magnéticas das amostras obtidas foram determinadas a partir das curvas de magnetização, a qual se mede a magnetização da amostra como função do campo magnético externo aplicado. A técnica utilizada foi a magnetometria de amostra vibrante, que se baseia na variação de fluxo magnético em uma bobina quando uma amostra magnetizada vibra em suas proximidades. Nessa técnica, uma amostra de massa conhecida é fixada em uma das extremidades de uma haste rígida, enquanto que a outra extremidade é fixada a membrana de um alto-falante, que faz a amostra vibrar a uma frequência f conhecida em um campo magnético uniforme, induzindo uma corrente alternada nas bobinas coletoras. Esse conjunto,

quando exposto a um campo magnético gerado por um eletroímã, induz uma voltagem alternada nas bobinas de detecção, de acordo com a lei de Faraday, dada por

$$E = \sigma GA(2\pi f)\cos(2\pi ft), \quad (1.1)$$

onde σ é o momento magnético da amostra, G é uma função geométrica das bobinas de detecção, e A é a amplitude de vibração (Foner, 1996; Sampaio *et al.*, 2000).

O equipamento utilizado nas medidas magnéticas foi um magnetômetro EV7 (Microsense, EUA), localizado no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob a responsabilidade do Professor Alexandre Ricalde.

2.2.2.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) é utilizada para obter informação da distribuição de tamanhos de nanopartículas suspensas em meio líquido, permitindo detectar partículas em uma larga faixa de tamanhos. De modo simples, a técnica consiste na incidência de um feixe de luz monocromático, usualmente luz laser, sobre uma amostra em forma de suspensão coloidal, com a detecção ocorrendo nos feixes espalhados. Em uma medida de DLS, a luz de um laser é levada até a amostra através de uma fibra óptica. Na interface da amostra e da fibra há uma janela de safira que tem a função dupla de refletir de volta parte da luz do laser, a qual é direcionada para um fotodetector, e transmitir parte da luz incidente para dentro da solução, onde ela é espalhada em todas as direções pelas partículas em suspensão (BERNE e PECORA, 2000).

As partículas em suspensão estão sujeitas a colisões randômicas com as moléculas do fluido, resultando no chamado movimento Browniano. Apesar de o movimento das partículas ser aleatório, a distribuição de velocidades integrada em um longo intervalo de tempo tem uma forma funcional bem conhecida, a distribuição de Maxwell-Boltzmann. A luz do laser que entra na solução sofre um deslocamento (*shift*) de frequência devido ao efeito Doppler por causa do movimento das partículas. O deslocamento de frequência será tanto maior quanto maior for a velocidade da partícula. Esta luz espalhada, de frequência diferente, é detectada e comparada com o sinal de referência original. O sinal de saída do detector contém, portanto, uma distribuição de frequências relacionadas com os tamanhos das partículas suspensas (HUANG, 1987).

O equipamento utilizado nas medidas de DLS foi o NanoBrook (Brookhaven Instruments, EUA), localizado no Laboratório CHICO do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob a responsabilidade do Professor André

Galembeck. Em nosso trabalho, adotamos como padrão fazer a média de 03 medidas, com o software do equipamento fornecendo um histograma de distribuição de tamanhos.

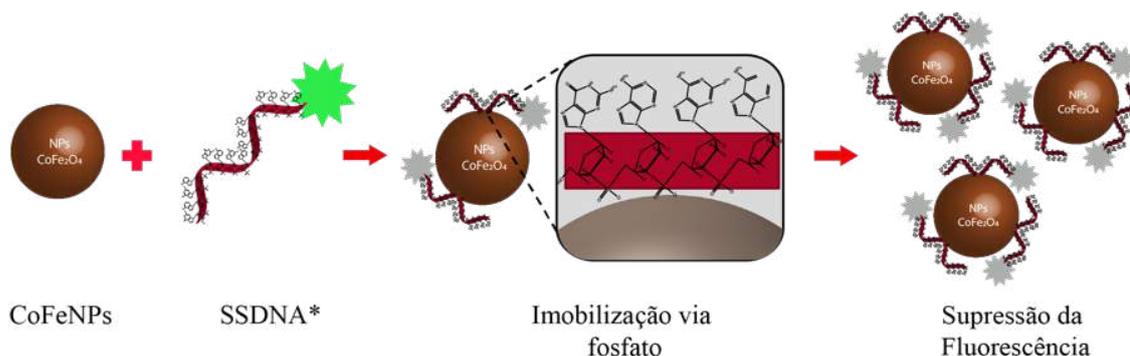
2.2.3 Experimentos de sensoriamento por fluorescência

2.2.3.1 Imobilização das sondas de DNA marcadas (ssDNA*) nas CoFeNPs

Para os estudos da adsorção das sondas de DNA marcadas por fluorescência nas partículas de CoFe_2O_4 , foi preparado 1 L de uma solução tampão contendo 50 mM (6 g) de Tris, 100 mM (420 mL) de HCl e 10 mM (2 g) de MgCl_2 (tampão Tris-HCl/ MgCl_2 , pH 7,4). As sondas de DNA de fita simples marcadas com fluoróforos (denominado de ssDNA*) foram inicialmente preparadas em uma concentração de 2000 ng/ μL , através da diluição em água *free nuclease*, e em seguida diluídas novamente para soluções estoque de 50 ng/ μL . A partir dessas diluições, foram preparadas soluções 1 mL de ssDNA* (com concentração de 30 nM) no tampão Tris-HCl/ MgCl_2 (pH 7,4). É importante ressaltar que a adição do sal MgCl_2 na solução tampão tem por objetivo a redução das interações eletrostáticas (Liu, Biwu;Liu, 2015).

Devido à modificação das sondas de DNA com o fluoróforo, as amostras preparadas apresentam uma elevada fluorescência quando excitadas em $\lambda = 480 \text{ nm}$. Então, à medida que o ssDNA* é adsorvido pelas CoFeNPs, a emissão de fluorescência da sonda é extinta e, conseqüentemente, a intensidade de fluorescência do meio líquido deve ser reduzida; portanto, medindo a supressão progressiva da fluorescência, é possível quantificar de maneira simples e direta o processo de adsorção (Fig. 3). Para isso, foi adicionado 60 μL de uma solução aquosa inicial de 4 g L^{-1} de CoFeNPs a 1 mL da solução ssDNA*/Tris-HCl/ MgCl_2 (pH 7,4), sob agitação constante (300 rpm) por 60 min. Depois disso, com ajuda de um ímã, as partículas com ssDNA* imobilizado (ssDNA*/CoFeNPs) foram confinadas, sendo então o sobrenadante coletado para a análise fluorimétrica.

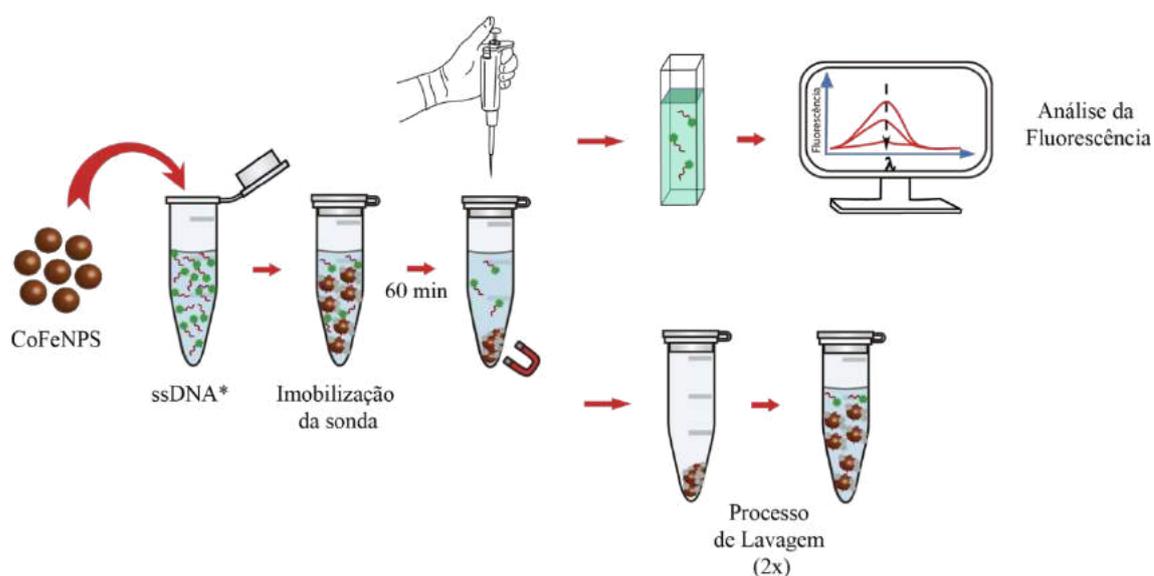
Figura 3 – Representação esquemática do processo de imobilização do ssDNA*.



Fonte: Autoria própria (2020).

Após isso, foi implementada uma etapa de lavagem, com a amostra sendo submetida a duas lavagens sucessivas utilizando 1 mL do tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) sob agitação constante em vórtex por 30 s, para minimizar a presença de sondas pouco imobilizadas e garantir que apenas as sondas de fato imobilizadas permaneçam no substrato. Finalmente, mais uma vez confinamos magneticamente as NPs e removemos o sobrenadante. Na Fig. 4, está representado o método utilizado nos ensaios de imobilização da ssDNA*.

Figura 4 – Representação esquemática do processo de imobilização do ssDNA* e o método utilizado para realizar os ensaios de detecção de fluorescência.



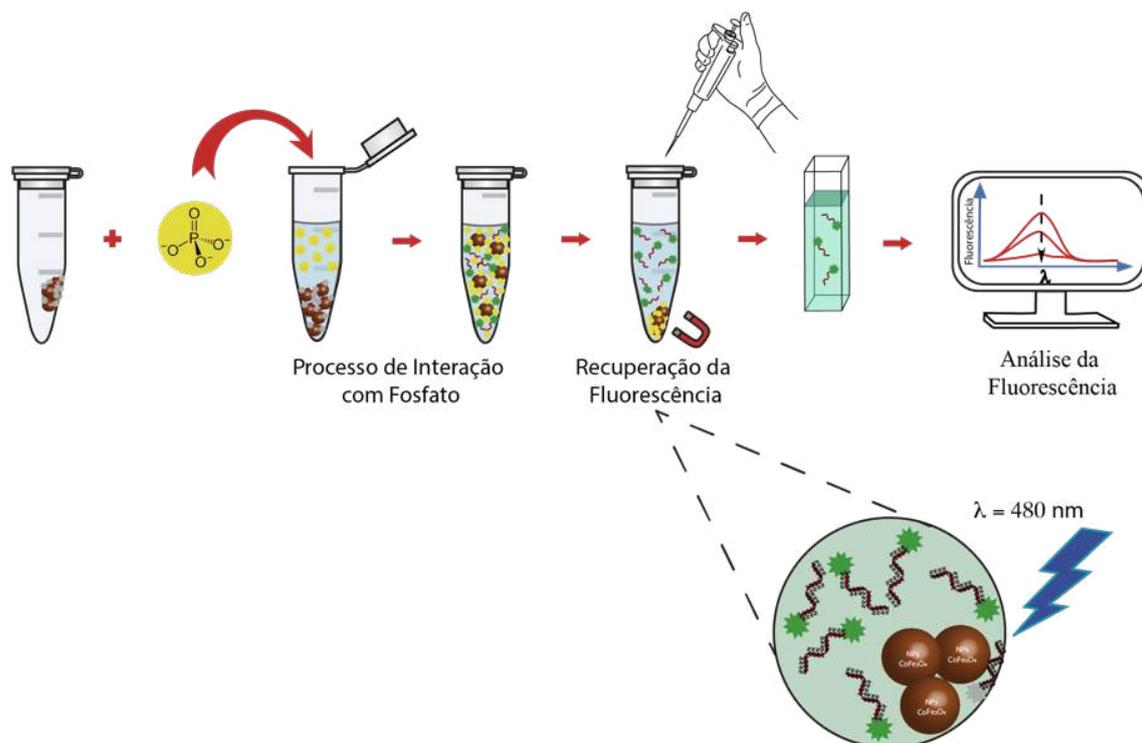
Fonte: Autoria própria (2020).

2.2.3.2 Mecanismo de detecção dos íons de fosfato

Para os ensaios de detecção dos íons fosfato, o sistema ssDNA*/CoFeNPs, preparado conforme descrito na seção anterior, foi colocado em contato com soluções aquosas com diferentes concentrações do íon fosfato durante 120 min em temperatura ambiente ($\sim 23\text{ }^{\circ}\text{C}$), sob agitação constante (300 rpm). Após isso, as CoFeNPs foram confinadas magneticamente, com o sobrenadante sendo coletado para determinar a intensidade de fluorescência correspondente, conforme esquematizado na Fig. 5.

Durante o processo da interação com a solução, a troca das sondas marcadas (ssDNA*) pelos íons de fosfato presentes na solução do sistema ssDNA*/CoFeNPs é favorecida, e como resultado dessa troca tem-se a recuperação da fluorescência.

Figura 5 – Representação esquemática do mecanismo de detecção de fluorescência de íons fosfato usando as CoFe_2O_4 NPs e do método adotado para realizar os ensaios de detecção de fluorescência.



Fonte: Autoria própria (2020).

2.2.3.3 Preparação das amostras de soro de sangue humano

Para verificar a sensibilidade da plataforma sugerida (ssDNA*/ CoFeNPs) para a análise de amostras reais, avaliamos seu comportamento quando interagindo com amostras de soro de sangue humano (HBS). Nestes ensaios, as amostras de HBS originais foram inicialmente pré-tratadas para a eliminação de proteínas. Para isso, 20 μL de Proteinase K (26 mg/mL) foram adicionados em 1 mL de HBS e a mistura obtida foi aquecida a 65 °C durante 10 min e depois centrifugada a 14.000 xg durante 1 min. O sobrenadante obtido foi utilizado para os experimentos de detecção dos íons fosfato, onde os ensaios de detecção por fluorescência foram realizados conforme a metodologia descrita na Seção 1.2.3.2.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização da Nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFeNPs)

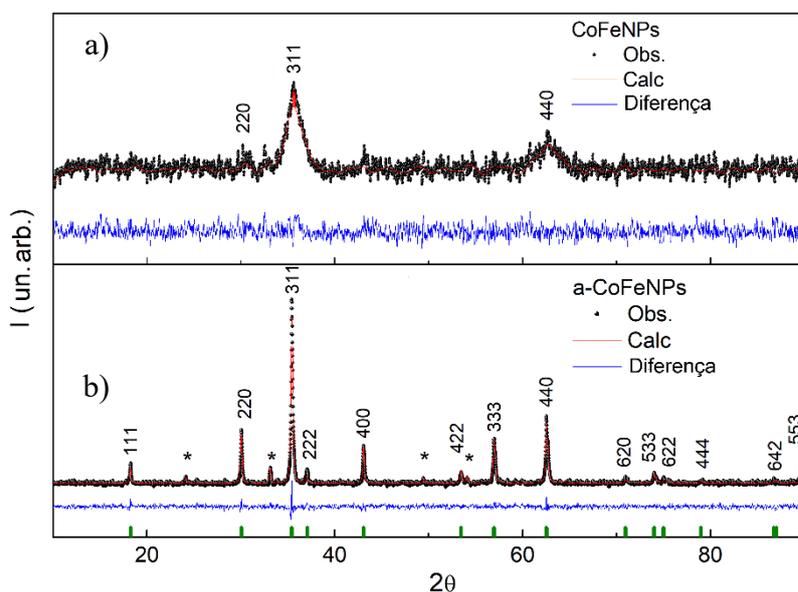
2.3.1.1 Difração de Raios X

Na Fig. 6 são mostrados os difratogramas das nanopartículas de ferrita de cobalto sintetizadas, tanto daquelas na forma inicialmente sintetizadas (CoFeNPs) quanto as submetidas ao tratamento térmico ($\alpha\text{-CoFeNPs}$). Após uma análise estrutural baseada no método de

Rietveld, e usando o software Maud, foi confirmada a formação da ferrita de cobalto, quando verificou-se que a estrutura cristalina das amostras era do tipo espinélio cúbico inverso com o grupo espacial $Fd\bar{3}m$ (número COD-1533163), de acordo com o que anteriormente relatado na literatura (Ferreira *et al.*, 2003; Hosni *et al.*, 2017).

A técnica de refinamento de Rietveld, utilizando o software Maud, é usada para o refinamento de estruturas e para a determinação dos parâmetros de rede através do difratogramas de raios X (Lutterotti *et al.*, 2007; Rietveld, 2002). Através dessa análise, foi possível identificar a fase espinélio $(Co_{0,255}Fe_{0,745})(Co_{0,745}Fe_{1,255})O_4$ e a fase $\alpha-Fe_2O_3$, com o óxido de ferro sendo uma impureza residual da preparação da amostras estimada em 36,5 % e 13,2% para as amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs, respectivamente. Foram determinados os parâmetros de rede a como sendo iguais a 8,368 e 8,389 Å, volumes V da célula unitária de 585,956 e 590,487 Å³ e densidades no valor de 5,219 e 5,179 g/cm³, para as amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs, respectivamente.

Figura 6 – Difratogramas de raios X das amostras CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b).



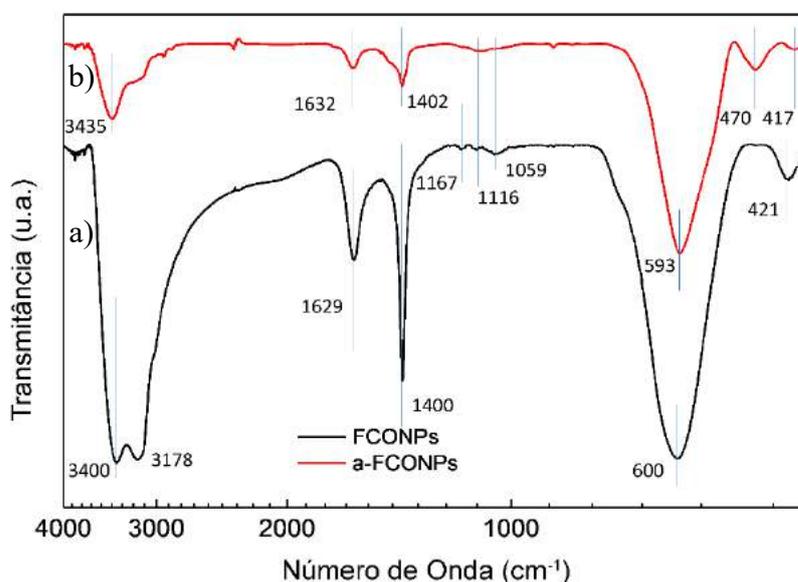
Como pode ser observado na Fig. 6, apenas três picos de difração são identificados na amostra CoFeNPs, situados em $2\theta = 30,2^\circ$, $35,5^\circ$ e $62,7^\circ$, e com os respectivos planos de difração indexados através dos índices de Miller (Fig. 6 a). No entanto, para a amostra a-CoFeNPs foi possível observar o aumento significativo na intensidade dos picos de difração e uma redução na largura total dos mesmos, com os picos situados em $2\theta = 18,2^\circ$, $30,2^\circ$, $35,5^\circ$, $37,1^\circ$, $43,1^\circ$, $53,5^\circ$, $56,9^\circ$, $62,6^\circ$, $71,1^\circ$, $73,9^\circ$, $75,1^\circ$, $79,2^\circ$, $86,8^\circ$ e $89,7^\circ$ (com os respectivos índices de Miller identificados na Fig. 6 b). Isso indica um aumento na cristalinidade da

amostra, que deve ter origem no incremento da razão do volume do cristalito por conta do tamanho da partícula (Goodarz Naseri *et al.*, 2010; Gyergék *et al.*, 2010).

2.3.1.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A composição química das nanopartículas de CoFe_2O_4 foi examinada através da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR). Na Fig. 7 são mostrados os espectros de FTIR para as amostras CoFeNPs (curva a) e a-CoFeNPs (curva b). Como pode ser observado, ambos os espectros apresentam as bandas associadas às vibrações de estiramento das moléculas de água O–H presentes na superfície das nanopartículas, em 3400 e 3178 cm^{-1} para a amostra CoFeNPs e, em menor intensidade, em 3400 e 3178 cm^{-1} para a amostra a-CoFeNPs. As bandas em 1629 cm^{-1} [1632 cm^{-1}] no espectro CoFeNPs [a-CoFeNPs] podem também ser atribuídas à vibração no plano e fora do plano da água absorvida O–H (Feng *et al.*, 2017).

Figura 7 – Espectros infravermelho das amostras CoFeNPs (a), e a-CoFeNPs (b).



Presente em ambas as amostras, a banda em 1400 cm^{-1} corresponde às fortes vibrações das moléculas de NH_4^+ associadas ao agente de co-precipitação usado na síntese das nanopartículas (Sethna *et al.*, 2008). Vale ressaltar que, ao realizarmos o tratamento térmico das partículas, houve uma redução no pico correspondente à amônia, sendo notável a menor relação entre as intensidades das bandas característicos de NH_4^+ e M–O para a amostra a-CoFeNPs. Os picos discretos observados nos dois espectros em 1167 , 1116 e 1090 cm^{-1} são associados a liga Fe–Co (Masrouf, Hamedoun e Benyoussef, 2012; Rana, Philip e Raj, 2010; Verwey e Heilmann, 1947). As bandas em 600 e 421 cm^{-1} , observadas nas amostras CoFeNPs,

estão relacionadas às vibrações de estiramento das ligações metal-oxigênio (M – O), atribuídas aos sítios tetraédricos e octaédricos, respectivamente, que são características da estrutura cristalina das ferritas de espinélio inverso. Para as amostras tratadas, um conjunto semelhante de bandas foi observado em 593, 470 e 417 cm^{-1} . Essas diferenças de posição entre as bandas tetraédrica e octaédrica podem estar associadas aos comprimentos diferentes das ligações M – O em cada sítio (Aliyan *et al.*, 2017; Rana, Philip e Raj, 2010; Shahjuee *et al.*, 2017).

2.3.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

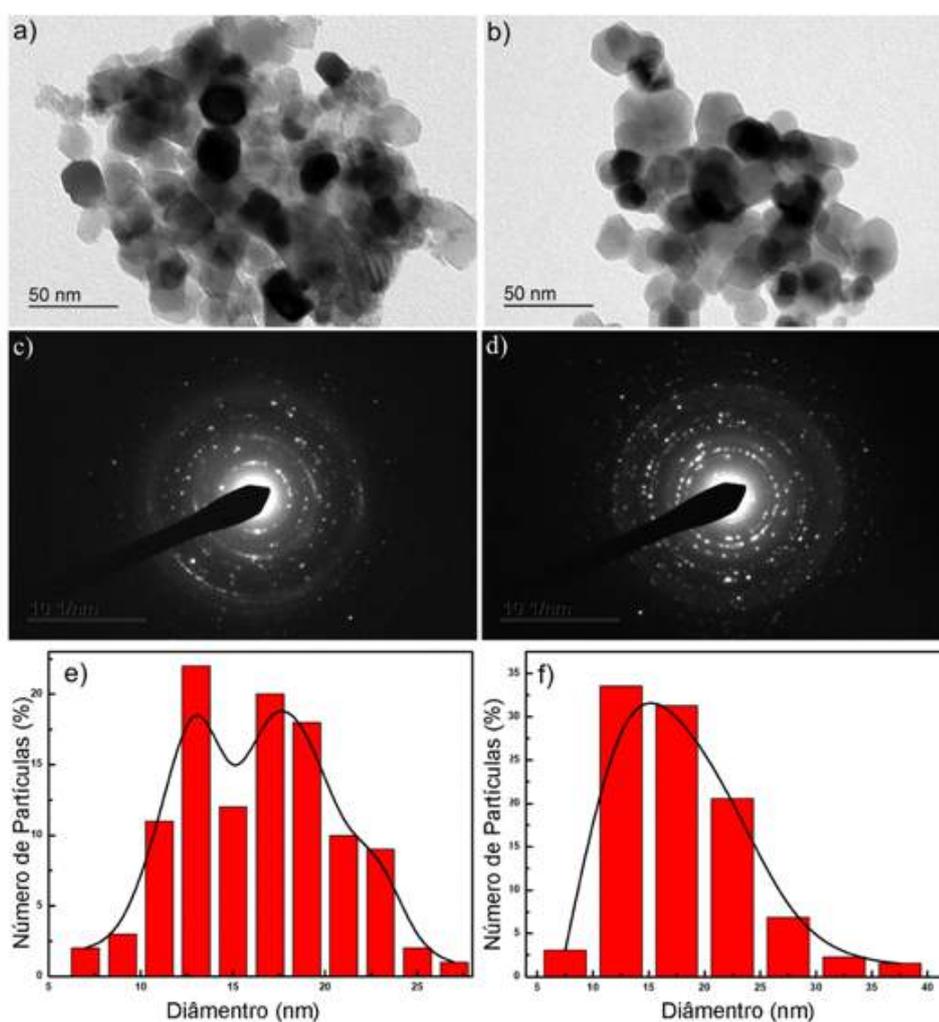
Para avaliar a morfologia e a distribuição de tamanhos das partículas, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão para as amostras com e sem tratamento térmico. Nas imagens (a) e (b) da Fig. 8, é possível observar que ambos tipos de amostras (CoFeNPs e a-CoFeNPs) exibem uma forma hexagonal com tamanhos na escala nanométrica. Também é possível identificar a presença de grandes aglomerados de nanopartículas, o que pode estar associado às interações dipolares entre as nanopartículas magnéticas ou então após terem sido depositadas na grade de cobre, o que pode ser atribuído à tensão superficial da água (devido à diluição na amostra no preparo das análises).

No microscópio de transmissão também foram realizadas medidas de difração de elétrons em área selecionada (SAED). Nas Figs. 1.8(c) e 1.8(d) é possível observar os padrões de difração, compostos por pontos (spots) que indicam a natureza policristalina das amostras. O resultado dessa medida permite o cálculo da estrutura cristalográfica das nanopartículas, sendo a determinação dos planos cristalográficos realizada pela análise da imagem obtida pelo microscópio. As distâncias interplanares das amostras, assim como os planos cristalográficos, determinados através dos os padrões de SAED, podem ser atribuídos as fases de CoFe_2O_4 e $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, o que corrobora com os resultados obtidos nas medidas de Raios-X. Também é importante notar que houve o aumento no número de pontos de difração para as amostras termicamente tratada, confirmando assim o aumento da cristalinidade na amostra.

Para fins de quantificação do tamanho da nanopartículas observadas, utilizando o software livre ImageJ (Schneider, Rasband e Kevin W Eliceiri, 2012) mediu-se o diâmetro das nanopartículas presentes na Fig. 8 (a) e (b). Ressaltamos que as medidas de diâmetro das nanopartículas foram feitas manualmente, uma-a-uma, utilizando uma ferramenta do software, ou seja, não utilizamos nenhum algoritmo automatizado para a obtenção dos tamanhos. Nas Figs. 1.8 (e) e (f) são mostrados os histogramas da distribuição de tamanhos assim obtidos para as amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs, respectivamente, tendo sido medidas um total de 120 nanopartículas. Esses histogramas revelam que a amostra de CoFeNPs [a-CoFeNPs] apresenta uma distribuição de tamanho na faixa de 7 a 28 nm [7,5 a 38 nm], com um diâmetro médio de

(16 ± 4) nm [(18 ± 5) nm]. Embora o tamanho médio das partículas seja semelhante para ambas as amostras, nas amostras a-CoFeNPs, pode-se identificar uma melhor homogeneidade, com a maioria das partículas com tamanhos em torno de 15 nm.

Figura 8 – Micrografias TEM das amostras CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b), os padrões de SAED são mostrados em (c) e (d) para CoFeNPs e a-CoFeNPs, respectivamente. O histograma do tamanho de partícula das amostras foi obtido após a estimativa do diâmetro de 130 [110] partículas, conforme representado em micrografias TEM, para CoFeNPs (e) e a-CoFeNPs (f), respectivamente.



2.3.1.4 Medidas de Magnetização (Histereses)

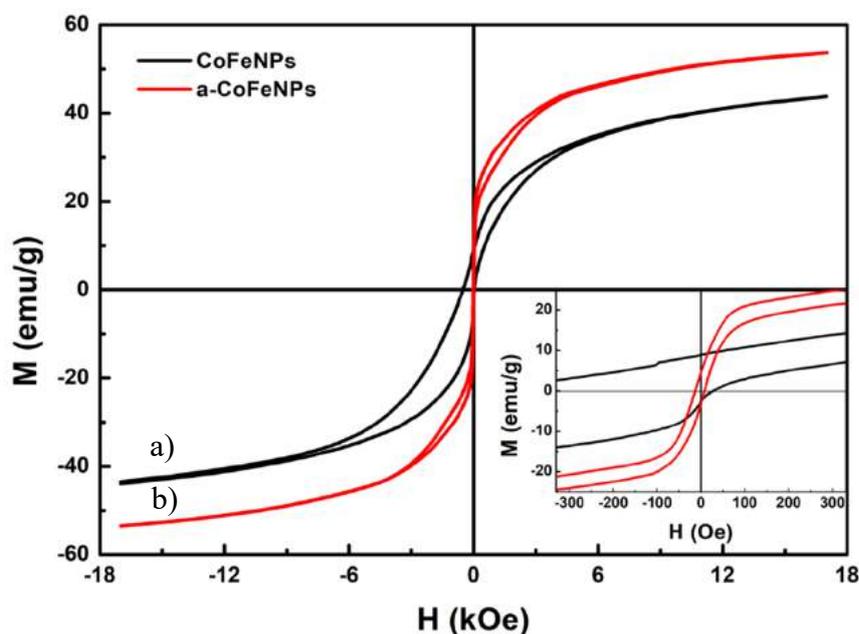
As características magnéticas das amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs foram analisadas através de curvas de magnetização pela técnica de magnetometria de amostra vibrante a temperatura ambiente. Como pode ser visto na Fig. 9, ambas as amostras apresentam ciclos de histerese que correspondem a um comportamento ferrimagnético, um resultado consistente com aqueles reportados literatura para $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{NPs}$ preparadas pela síntese de co-precipitação

(Gyergék *et al.*, 2010; Hosni *et al.*, 2017). Através dessas curvas também foram obtidos os valores de magnetização a campo magnético máximo $H_{\text{max}} = 18$ kOe como sendo iguais a 42,5 e 53,6 emu/g, para as amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs, respectivamente.

As partículas que sofreram um tratamento térmico apresentaram um campo de coercividade menor ($H_C = 12,57$ Oe) quando comparado com aquelas sem tratamento térmico (conforme observado no detalhe da Fig. 9). Essa redução na coercividade pode ser explicada pela diminuição do tamanho dos grãos e uma maior homogeneização na amostra, uma vez que o tamanho do grão da amostra varia de maneira inversa com o valor de H_C . Esse valor de H_C observado na curva a-CoFeNPs é consistente com aquele encontrado na literatura para nanopartículas de ferrita de cobalto com granulometria superior a 10,7 nm (Hosni *et al.*, 2017; Masrour, Hamedoun e Benyoussef, 2012). Para partículas desse tamanho, as temperaturas de bloqueio (ou seja, a temperatura na qual a energia térmica diminui e os momentos magnéticos presentes nos materiais superparamagnéticos ficam bloqueados) devem estar acima da temperatura ambiente (Liu C. *et al.*, 2000; Vázquez-Vázquez *et al.*, 2011).

Através das curvas de histerese foi também possível identificar a presença de duas fases magnéticas, devida à presença de um alargamento nas curvas entre os campos 50 Oe a 3 kOe, como facilmente observado na medida para a amostra a-CoFeNPs, o que corrobora o observado nas análises de Raios-X.

Figura 9 – Curvas de magnetização de amostras de CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b).



2.3.2 Uso das CoFe₂O₄NPs como plataformas para sensoriamento de íons fosfato

2.3.2.1 Imobilização da sonda (ssDNA*) em CoFeNPs e a-CoFeNPs

Como ilustrado na Fig. 3, o uso de partículas de ferrita de cobalto como uma plataforma para a detecção de íons fosfato envolve a imobilização de um DNA de fita simples marcado com um fluoróforo (ssDNA*) na superfície das nanopartículas.

É bem sabido que cadeias de DNA de fita simples podem interagir com outras moléculas por meio de vários mecanismos, como ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas, forças eletrostáticas, empilhamento aromático ($\pi - \pi$) ou coordenação com metais (Pautler *et al.*, 2013). Sabe-se também que as moléculas de DNA podem ser adsorvidas fortemente em óxidos metálicos devido aos grupos fosfato presentes em sua estrutura (Fujiwara *et al.*, 1982; Li *et al.*, 2010). De fato, íons metálicos (como Fe³⁺ e Co³⁺) podem ser considerados como ácidos duros de Lewis, com alta afinidade por ligantes (bases) duros como o fosfato, por meio de uma ligação específica (Liu e Liu, 2014; Pautler *et al.*, 2013).

Conforme o ssDNA* é adsorvido na superfície das NPs de ferrita de cobalto, sua emissão de fluorescência passa a ser gradualmente extinta e, conseqüentemente, a intensidade de fluorescência do meio líquido deve ser reduzida. De fato, pode-se observar (Fig. 10) que, enquanto a solução inicial da sonda exibe uma forte resposta I₀ (curva I), a intensidade I da fluorescência da solução sobrenadante diminui significativamente, por um fator de 90% [80%] após a interação do ssDNA* com a amostra a-CoFeNPs [CoFeNPs] (curva II [III]). Isso indica que as nanopartículas de ferrita de cobalto podem imobilizar uma grande quantidade das cadeias de DNA dissolvida e atuam como um forte inibidor de fluorescência. Também é possível observar que a amostra CoFeNPs causa uma maior supressão de fluorescência, um fato que pode estar associado à amônia ainda remanescente nessas nanopartículas não tratadas, uma vez que os grupos NH podem formar ligações de hidrogênio com as cadeias de DNA.

A supressão da fluorescência requer uma maior proximidade entre o fluoróforo (acoplado na estrutura do ssDNA) e as nanopartículas, após o processo de adsorção. Assim, o doador e o absorvedor devem estar muito próximos, o que favorece a transferência de elétrons e, conseqüentemente, a extinção da fluorescência (Song, Wang e Kong, 2015; Zhang *et al.*, 2012).

Com o objetivo de entender o mecanismo predominante no processo de supressão de fluorescência da ssDNA* pelas amostras, realizamos então medidas de tempo de vida. Nesses ensaios, determinamos inicialmente o tempo de vida de uma solução de 30 nM (1 mL) de ssDNA*, diluída no tampão Tris-HCl/MgCl₂, chamado de τ_0 . Logo então, uma concentração de 0,24 g L⁻¹ de CoFeNPs e a-CoFeNPs (60 μ L de uma solução aquosa inicial de 4 g L⁻¹ de ambas as amostras) foi adicionada a 1 mL da solução de 30 nM de ssDNA*, e determinados os

novos valores de tempo de vida τ correspondentes. Os valores encontrados estão sumarizados na Tabela 1.

Figura 10 – Espectros de emissão de fluorescência normalizados da solução de ssDNA* (30nM) (I) e após interação com CoFeNPs (II) e a-CoFeNPs (III).

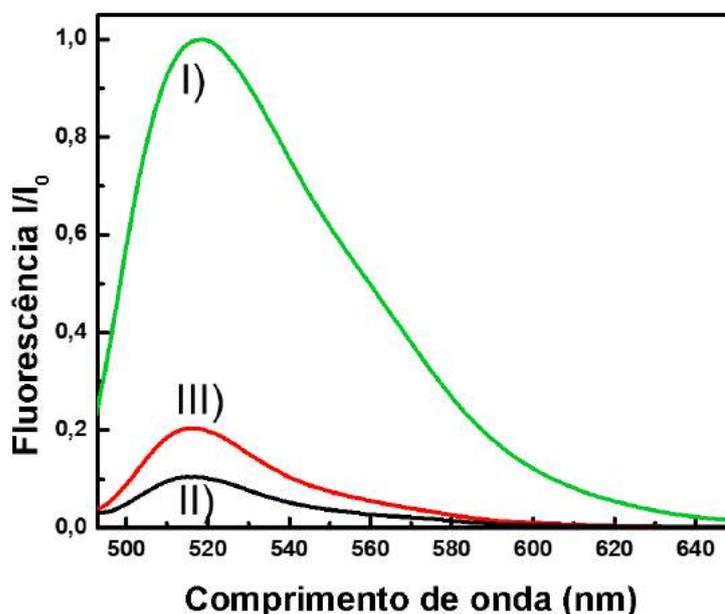


Tabela 1 – Valores estimados do tempo de vida da sonda de DNA (ssDNA*), ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs.

Tempo de Vida	τ_0 (ns)	τ (ns)
ssDNA*	4,26	-
ssDNA*/CoFeNPs	4,25	4,45
ssDNA*/a-CoFeNPs	4,25	4,39

Através dessas medidas, é possível determinar se o mecanismo de supressão de fluorescência é do tipo estático ou dinâmico. A supressão dinâmica de fluorescência consiste na desativação da fluorescência devido à colisão do fluoróforo com o agente supressor no estado excitado, com o fluoróforo retornando ao estado fundamental sem a emissão de um fóton. Já na supressão estática ocorre a formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor no estado fundamental. Assim, quando a supressão é estática, o tempo de vida da fluorescência não se altera, ou seja, $\tau_0/\tau = 1$ (onde τ_0 e τ são os tempos de vida da ssDNA* antes e depois da interação com as amostras, respectivamente). Por outro lado, quando a supressão é dinâmica, tem-se que $F_0/F = \tau_0/\tau$, onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na

ausência e na presença do agente supressor, respectivamente (Anand e Sujatha, 2012). Como é possível observar a partir dos valores de tempo de vida obtidos, o fato de que $\tau_0/\tau \approx 1$ em ambos os casos sugere que o mecanismo de supressão de fluorescência deve ser predominantemente estático.

As cargas superficiais das CoFe_2O_4 NPs também foram avaliadas através de medidas de potencial zeta. Na Tabela 2 estão sumarizados os valores estimados do potencial zeta das amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs na forma original e após terem interagido com as sondas de DNA (ssDNA*). As partículas puras sem tratamento, CoFeNPs, apresentaram uma carga superficial positiva ($10,44 \pm 0,73$ mV), enquanto as partículas tratadas são carregadas negativamente ($-4,89 \pm 0,51$ mV). Essa diferença de carga pode estar associada à maior quantidade de espécies NH_4^+ presentes na superfície da amostra CoFeNPs, conforme já identificado nos espectros de FTIR. Como a superfície do DNA tem um caráter negativo, a imobilização do DNA na superfície dos CoFeNPs deve alterar a carga superficial das nanopartículas, por conta de uma combinação de interações eletrostáticas e/ou ligações específicas entre a ssDNA* e as partículas. Para examinar qual interação poderia estar ocorrendo, medimos o potencial zeta das NPs após a imobilização com sondas ssDNA*, obtendo os valores de ($8,14 \pm 0,35$) mV e ($-10,19 \pm 0,63$) mV para as amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs, respectivamente. Juntamente com as medidas de supressão de fluorescência, esses valores sugerem a adsorção das cadeias de ácidos nucleicos na superfície das nanopartículas. Para dar suporte essa informação, medidas de DLS e TGA foram também realizadas.

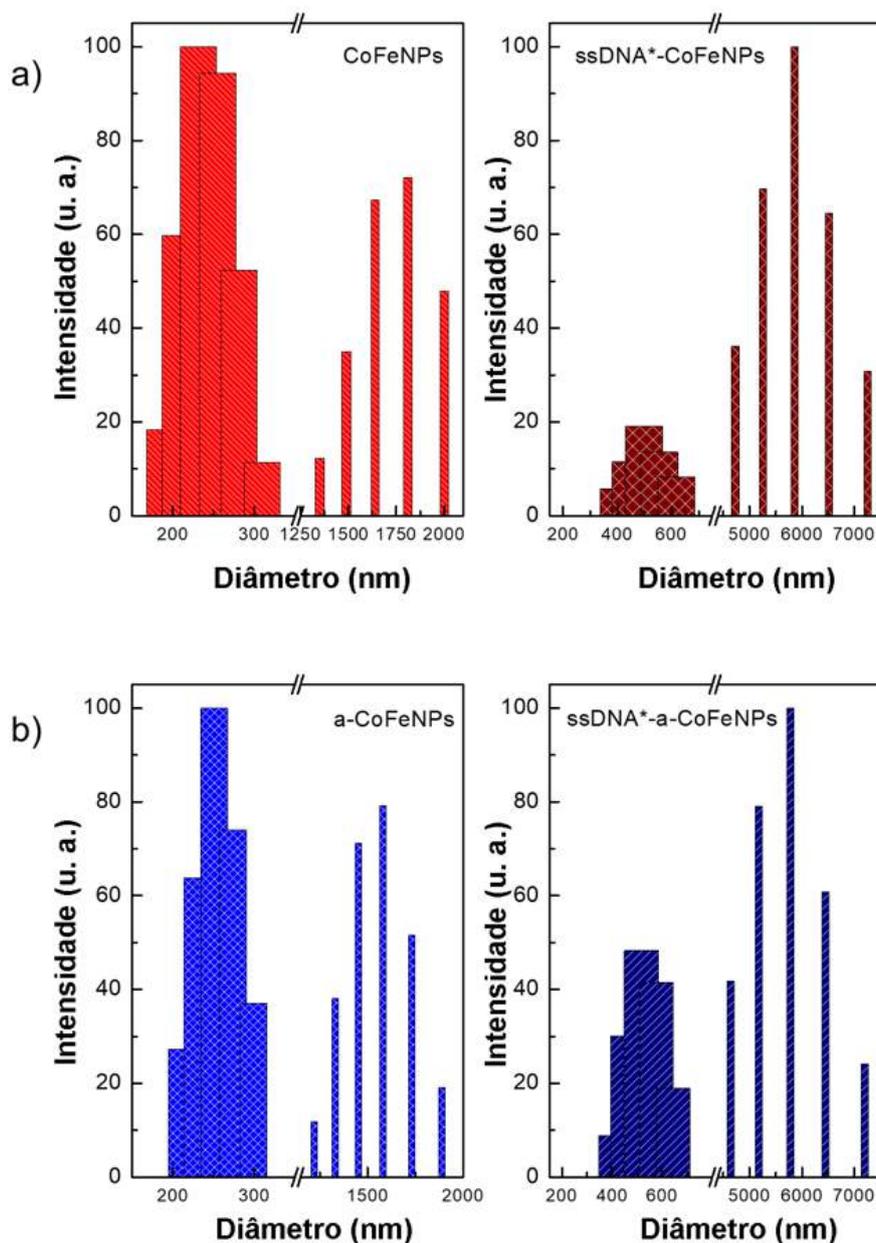
Tabela 2 – Valores estimados do potencial zeta (mV) das amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs com e sem a imobilização da ssDNA*.

Potencial Zeta	CoFeNPs	a-CoFeNPs
NPs	$10,44 \pm 0,73$	$- 4,89 \pm 0,51$
ssDNA*/NPs	$8,14 \pm 0,35$	$- 10,19 \pm 0,63$

As análises de DLS mostradas na Fig. 11 revelam que há um aumento no tamanho médio das nanopartículas após o processo de imobilização da sonda de DNA. Tanto para a amostra CoFeNPs (Fig. 11 a) quanto para a-CoFeNPs (Fig. 11 b), pode-se observar que a distribuição de tamanhos é bimodal, com diâmetros médios centrados em 250 nm e 1600 nm. Esse resultado está de acordo com o que fora observado nas imagens de TEM, ou seja, a ocorrência de aglomeração das nanopartículas, resultando em agregados de grandes dimensões. Essas amostras analisadas após terem sido submetidas à interação com o DNA, nas mesmas condições que as descritas na Seção 1.2.3.1. Novamente, para ambos os casos, é possível observar um

crescimento proporcional nos diâmetros médios das amostras, agora chamadas de ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs, para as duas distribuições, que agora possuem diâmetros médios centrados em 1600 nm e 6000 nm.

Figura 11 – Medidas de DLS para as amostras CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs (b) antes e a imobilização das sondas (ssDNA*).



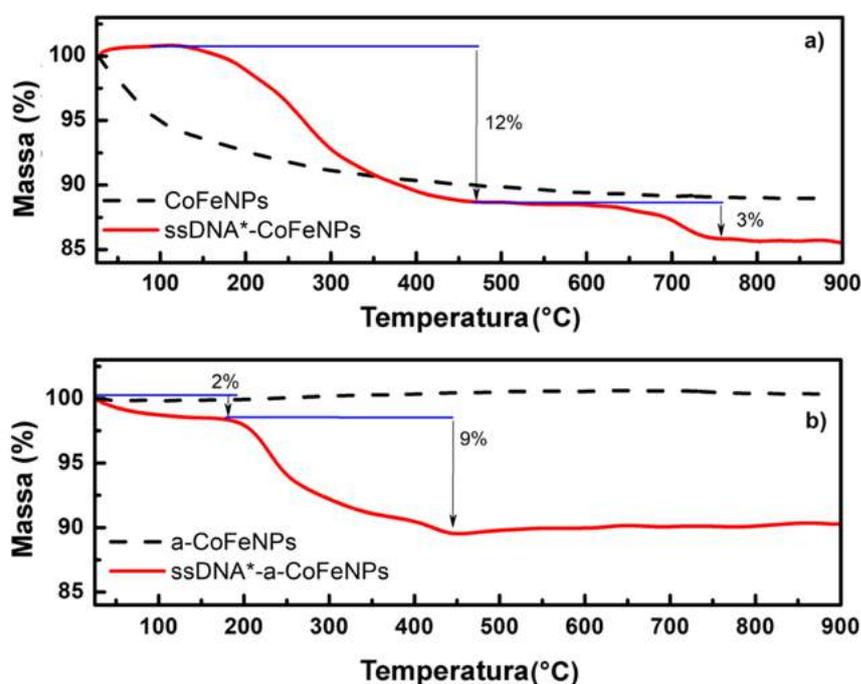
Realizamos ainda análises termogravimétricas para as amostras de CoFeNPs e a-CoFeNPs, tanto em sua forma original quanto após serem usadas para a imobilização de sondas ssDNA*. Na Fig. 12 a), é possível observar a ocorrência de um evento térmico para a amostra CoFeNPs (curva pontilhada), que corresponde a 10% de perda de massa e está

possivelmente associado à presença de água e da amônia remanescente da síntese de preparação. Após a imobilização, a amostra ssDNA*/CoFeNPs exibe dois eventos térmicos (curva contínua): um primeiro observado na faixa de 200 °C a 450 °C, e que corresponde a 12% da perda de massa, associado à degradação das espécies orgânicas das sondas de DNA (Nithiyantham *et al.*, 2014), e um segundo, na faixa de 600 °C a 750 °C, correspondente a 3% de perda de massa e que pode estar associado a uma transição de fase das partículas de ferrita de cobalto (Ajroudi *et al.*, 2014).

Nenhuma perda de massa foi observada para as amostras a-CoFeNPs (curva pontilhada na Fig. 12 b), pelo fato de as espécies orgânicas originalmente presentes na superfície terem sido degradadas durante a etapa de tratamento térmico, em concordância com o que foi observado nas medidas de FTIR. No entanto, para as partículas após a imobilização (ssDNA*/a-CoFeNPs) há uma primeira perda de 2% de massa associada às moléculas de água remanescentes do processo de imobilização (na faixa entre 50 °C e 200 °C), e um segundo evento térmico (na faixa de 200 °C a 450 °C), correspondente à perda de 9% da massa devida à degradação das sondas de DNA (Nithiyantham *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que as amostras CoFeNPs e a-CoFeNPs interagem de maneira diferente com as sondas de DNA, como foi mostrado na Fig. 10, resultando na incorporação de diferentes quantidades de ácidos nucleicos, uma situação que se reflete na variação da perda de massa observada nos experimentos termogravimétricos.

Figura 12 – Curvas de TGA para as amostras de CoFeNPs e ssDNA*/CoFeNPs (a) e a-CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs (b).



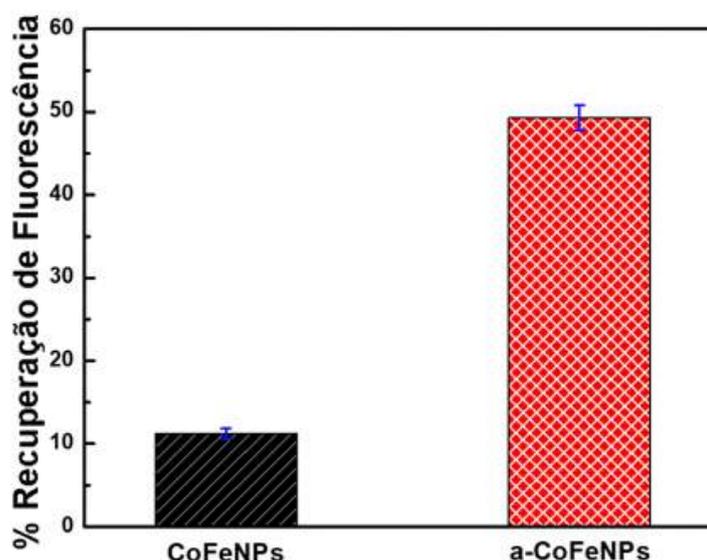
Assim, através das análises de TGA, DLS, potencial zeta e medidas de supressão de fluorescência, pudemos comprovar a efetiva imobilização dos ácidos nucleicos nas superfícies das nanopartículas, em uma indicação de que este material pode apresentar resultados promissores na detecção de fosfato.

2.3.2.2 Eficiência na detecção de íons fosfato das amostras ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs

O procedimento por nós adotado para a detecção de íons fosfato se baseia na troca das sondas de DNA imobilizadas em sua superfície pelos íons fosfatos presentes em uma determinada amostra. Após a exposição das nanopartículas de ferrita de cobalto a uma amostra líquida contendo íons fosfato, o ssDNA* seria delas desligado e entraria novamente na solução, causando a restauração do sinal de fluorescência, como mostrado esquematicamente na Fig. 5. Observe que, nesse processo, não é relevante a sequência nucleotídica específica do ssDNA* usado, pois apenas os grupos fosfato das cadeias de ácidos nucleicos estão envolvidos no processo de ligação e reconhecimento.

Em contraste com o que foi observado nos experimentos de adsorção e supressão da fluorescência, quando os sistemas ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs eram colocados em 1 mL uma solução de íons fosfato (500 μM), diluída em tampão Tris-HCl, uma recuperação significativa na fluorescência foi obtida somente para a amostra a-CoFeNPs, conforme pode ser observado na Fig. 13. Essa alta concentração de íons foi escolhida para garantir uma maior liberação das cadeias ssDNA*.

Figura 13 – Porcentagem da recuperação da fluorescência após a interação do complexo ssDNA*/CoFeNPs e ssDNA*/a-CoFeNPs com uma solução de fosfato de 500 μM .



Embora a recuperação do sinal de fluorescência tenha sido da ordem de 11% para o caso dos CoFeNPs, um maior valor de restauração (~ 49%) foi obtido no caso dos a-CoFeNPs. Sugerimos que esse nível mais alto de recuperação do sinal de fluorescência se deva à ocorrência de uma troca mais favorável entre as cadeias ssDNA* conectadas às a-CoFeNPs, comparativamente ao caso dos CoFeNPs que não sofreram tratamento térmico, nos quais grupos NH estão presentes em um número maior.

Com base nesses resultados, e por conta de sua melhor cristalinidade e de suas propriedades magnéticas, adotamos a amostra a-CoFeNPs como modelo de ferrita a ser usado nas etapas subsequentes de otimização da detecção de fosfato em soluções.

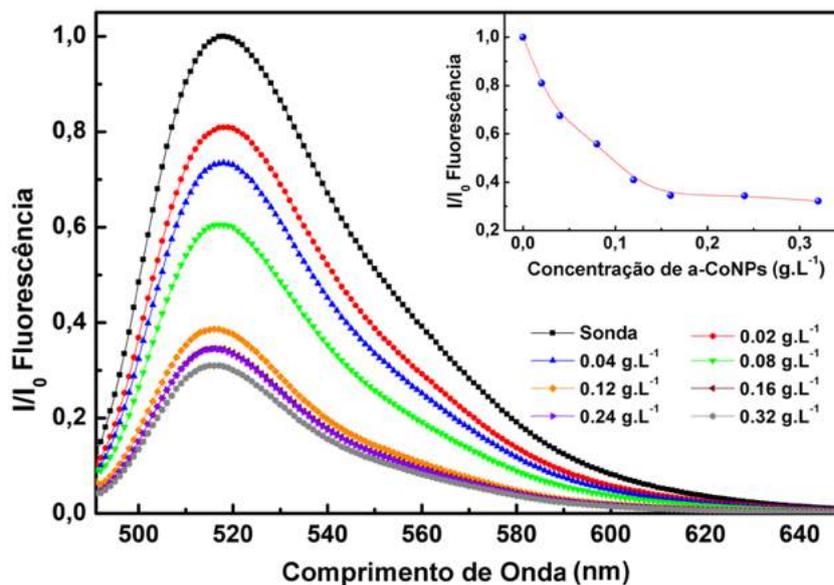
2.3.2.3 Otimização para detecção dos íons fosfato em solução

A fim de encontrar as melhores condições para o uso das partículas a-CoFeNPs como uma plataforma sensorial de íons fosfato, passamos a investigar diferentes parâmetros de preparação, como a concentração das partículas e o tempo necessário para adsorção/supressão e interação/recuperação da fluorescência.

Como primeira análise, investigamos a influência de várias concentrações de a-CoFeNPs na supressão de fluorescência da sonda (ssDNA*). Para isso, foram adicionados diferentes volumes (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60 e 80 μL) de uma solução aquosa inicial de 4 g L^{-1} de a-CoFeNPs em 1 mL de uma solução previamente preparada de ssDNA* (30 nM), diluída em Tris-HCl/MgCl₂, resultando em soluções de NP com concentrações variadas (0, 0,02, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,24 e 0,32 g L^{-1} , respectivamente). Nestes ensaios, um período de 120 min foi utilizado para a adsorção da sonda de DNA sobre a superfície das partículas.

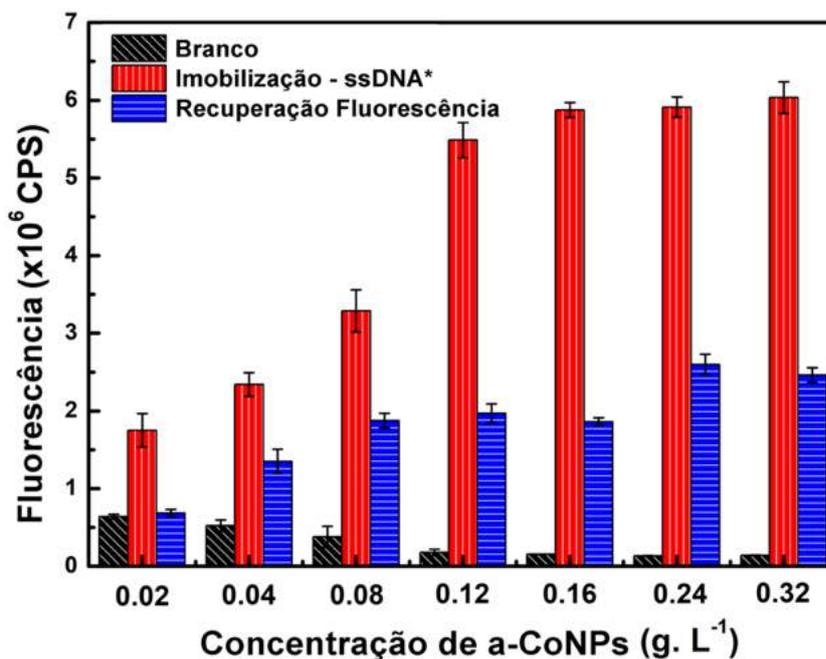
Posteriormente, usamos um ímã para confinar as ssDNA*/a-CoFeNPs, e então medir a fluorescência da solução sobrenadante, conforme esquematizado na Fig. 5. Como se pode observar na Fig. 14, a intensidade do sinal de fluorescência diminui à medida que a concentração de a-CoFeNPs é aumentada, ocorrendo a saturação para concentrações maiores que 0,16 g L^{-1} , como facilmente observado no detalhe dessa figura. Esse resultado pode ser associado à presença de um maior número de sítios disponíveis para adsorção quando concentrações mais elevadas de a-CoFeNPs são empregadas.

Figura 14 – Espectros de emissão de fluorescência da solução sobrenadante ssDNA* e intensidade da emissão da fluorescência em 520 nm (detalhe) após 120 min de interação, para diferentes concentrações iniciais dos a-CoFeNPs. Observe que há a superposição das curvas 0,16 e 0,24 g L⁻¹.



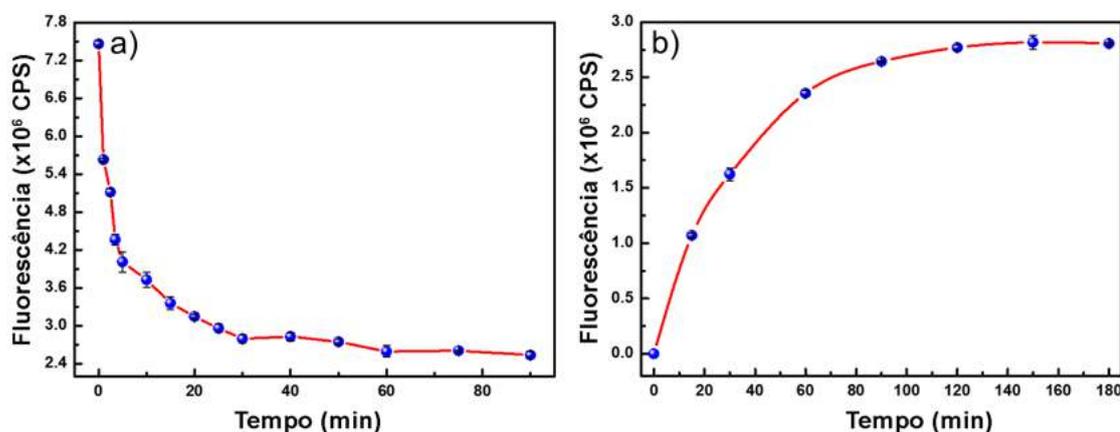
A influência da variação das concentrações de a-CoFeNPs também foram avaliadas em relação à extinção e recuperação da fluorescência da ssDNA* e ao branco. Na Fig. 15 é mostrada a intensidade da fluorescência correspondente a três tipos diferentes de experimentos: (i) imobilização da sonda, (ii) recuperação de fluorescência através da interação com uma solução de íons fosfato e (iii) recuperação da fluorescência usando uma amostra em branco, ou seja, um experimento no qual o complexo ssDNA*/a-CoFeNPs foi exposto a uma solução pura de Tris-HCl. Em cada caso, permitimos que a interação correspondente ocorresse por 3 h, para garantir que o processo atingisse o equilíbrio. A baixa intensidade do sinal de fluorescência nos testes em branco confirma que as sondas ssDNA* foram firmemente adsorvidas nas nanopartículas. Considerando os resultados mostrados nas Figs. 1.14 e 1.15, adotamos a concentração de 0,24 g L⁻¹ para as soluções de a-CoFeNPs como a concentração ótima, por ter sido para essa concentração que o melhor sinal de recuperação de fluorescência foi observado, com uma boa taxa de adsorção das sondas e um menor sinal de branco (sendo esse sinal um parâmetro importante para a avaliação do limite de detecção do sensor proposto).

Figura 15 – Resposta da fluorescência das a-CoFeNPs sob diferentes tipos de experimentos.



Analisamos também a cinética do processo de imobilização da ssDNA* na superfície das nanopartículas de ferrita e a cinética da recuperação da intensidade de fluorescência, à medida que a dessorção induzida por fosfato prossegue. Esse monitoramento ocorreu pelo acompanhamento da intensidade de fluorescência da sonda ssDNA* sobrenadante em função do tempo e, posteriormente, com a solução de íons de fosfato. Como pode ser observado a partir dos dados mostrados na Fig. 16 a), o processo de adsorção da sonda ssDNA* na a-CoFeNPs atinge o equilíbrio após 60 min. No entanto, quando o complexo ssDNA*/a-CoFeNPs é exposto a 1 mL de uma solução de íons fosfato 500 μ M, diluída em um tampão Tris-HCl (pH 7,4), o sinal de fluorescência é gradualmente restaurado, com a saturação sendo alcançada após 120 minutos (Fig. 16 b). Dessa maneira, foi possível a determinação dos tempos ideais para a imobilização da sonda (60 min) e dessorção de ssDNA* (120 min).

Figura 16 – Estudo cinético da diminuição da fluorescência da solução durante a imobilização do ssDNA* na superfície das a-CoFeNPs (a) e do aumento da fluorescência após a exposição do ssDNA*/a-CoFeNPs a uma solução de fosfato (b).



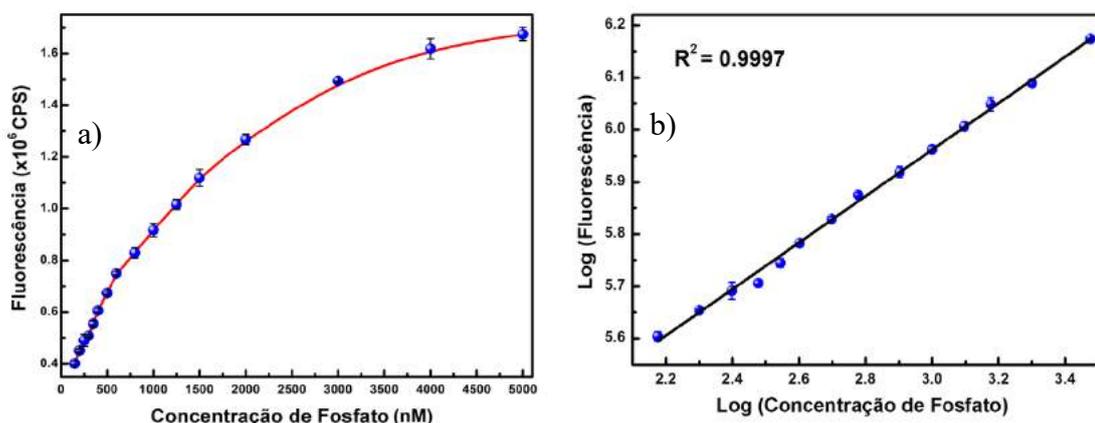
2.3.2.4 Sensibilidade para a detecção dos íons fosfato em solução

Para avaliar o limite de detecção da plataforma proposta, bem como definir o intervalo em que o sensoriamento por fluorescência possibilita sua quantificação, as amostras ssDNA*/a-CoFeNPs (preparadas sob condições otimizadas) foram expostas a diferentes soluções aquosas de íons fosfato, na faixa de concentração de 150 a 5000 nM, com a recuperação da intensidade de fluorescência sendo avaliada.

Na Fig. 17 a) é mostrado como a intensidade da fluorescência do sobrenadante (após as a-CoFeNPs serem magneticamente confinadas) varia em função das diferentes concentrações das soluções de fosfato usadas. Como pode ser observado, a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração da solução de fosfato. Isso permitiu a construção de uma curva de calibração (Fig. 17 b), que, na escala log-log, revela ser linear a relação entre a intensidade da fluorescência e a concentração de fosfato. Por meio dessa curva foi possível estabelecer que o sensor ssDNA*/a-CoFeNP exibe uma resposta confiável na faixa de concentração de fosfato de 150 a 3000 nM, expressa na forma $\log I = 0,445 \log C + 4,62$ (onde I é a intensidade de recuperação de fluorescência e C a concentração de fosfato), com um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9997. Todos os desvios padrão relativos correspondentes (RSD, n = 5) são menores que 6%.

Para a obtenção do limite de detecção (L_d) da amostra a-CoFeNPs foi adotado o método 3σ , o qual analisa a sensibilidade do sistema utilizando a relação $L_d = 3\sigma/S$, onde σ é o desvio padrão da amostra em branco e S é o coeficiente angular obtido no ajuste linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração de fosfato (Jia *et al.*, 2016; Nic *et al.*, 2005). Com isso o limite de detecção obtido para a amostra analisada como sensor de fosfato foi de 1,75 nM.

Figura 17 – Intensidade da resposta de fluorescência dos a-CoFeNPs após a adição de íons fosfato na faixa de 150 a 5000 nM (a) e a faixa de resposta linear do sensor a-CoFeNP (b).



Comparando o resultado obtido neste trabalho com aqueles relatados na literatura para o desempenho de diferentes sensores na quantificação de fosfato (Tabela 3), pode-se observar que tanto o intervalo de quantificação quanto o limiar de detecção L_d desta nova plataforma de detecção se comparam favoravelmente com os dos demais materiais usados anteriormente. É importante ressaltar que o complexo ssDNA*/a-CoFeNPs exibe um bom limite de detecção e pode ser usado em um amplo intervalo de quantificação dos íons fosfato. Outra vantagem dessa plataforma é sua simplicidade de preparação, uma vez que os procedimentos de síntese requeridos não são complicados, demorados ou trabalhosos. Além disso, a característica magnética da a-CoFeNP permite que após a imobilização do ssDNA*, o material seja facilmente confinado com um ímã permanente, e então separado do sobrenadante, o que leva a uma redução considerável do sinal do background da amostra a ser analisada.

Segundo o Conselho Brasileiro do Meio Ambiente, CONAMA, o limite aceitável de concentração de íons fosfato nas águas subterrâneas é de 263 nM. Portanto, devido à sua sensibilidade, o ssDNA*/a-CoFeNPs pode ser usado para avaliar a concentração de íons fosfato dissolvidos em meios aquosos.

Tabela 3 – Desempenho do ssDNA */a-CoFeNPs para detecção de fosfato em comparação com os de diferentes sensores relatados na literatura.

Plataforma	Intervalo analisado (nM)	Intervalo linear (nM)	Limite de Detecção (nM)	Refs.
MONPs	$1,0 \cdot 10^2 - 1,0 \cdot 10^4$	-	$1,0 \cdot 10^3$	(Liu, Biwu;Liu, 2015)
NPs inorgânicas	$5,0 \cdot 10^2 - 5,0 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^2 - 2,0 \cdot 10^3$	29	(Lopez, Zhang e Liu, 2017)
Análise de injeção de fluxo (FIA) – molibdato	-	-	20	(Johnson e Petty, 1982)
Polímero Molecular Impresso (MIP)	-	$7,0 \cdot 10^2 - 8,4 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$	(Warwick <i>et al.</i> , 2014)
Polieletrólito conjugado fluorescente (CPE)	$3,0 \cdot 10^6 - 1,0 \cdot 10^7$	-	$3,0 \cdot 10^6$	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
Polieletrólitos conjugados (CPEs)	-	$2,0 \cdot 10^3 - 1,0 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^2$	(Zhao e Schanze, 2010)
Polímero (P1)	-	-	$2,9 \cdot 10^4$	(Dwivedi, Saikia e Iyer, 2011)
Ciprofloxacina – Eu^{3+}	-	$20 - 1,5 \cdot 10^2$	4,3	(Wu e Tong, 2018)
Transistor de AlGAN/GaN	$2,0 \cdot 10^2 - 2,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^2 - 2,0 \cdot 10^4$	20	(Jia <i>et al.</i> , 2016)
CoFe ₂ O ₄ NPs	$1,5 \cdot 10^2 - 5,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2 - 3 \cdot 10^3$	1,7	Este Trabalho

MONPs: Nanopartículas de óxido de metal; P1: poli[2,7-(9,9-dixilfluoreno)-co-alt-5,5'-(4,4'-didecil-2,2'-bitiofeno)]

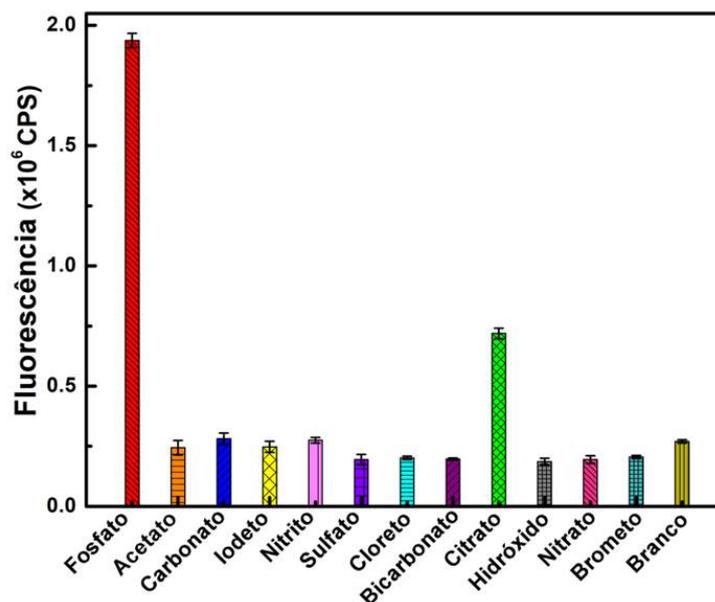
2.3.2.5 Seletividade para a detecção dos íons fosfato em solução

Além da sensibilidade, outro parâmetro importante a se levar em conta na avaliação do desempenho de um novo sistema de sensoriamento é sua seletividade para a detecção da molécula alvo em relação a outras espécies potencialmente competidoras.

Para testar a seletividade da plataforma ssDNA*/a-CoFeNPs em relação aos íons fosfato, o sensor preparado sob condições otimizadas foi exposto a soluções de 10 μM de diferentes ânions (citrato, acetato, carbonato, iodeto, nitrito, sulfato, cloreto, bicarbonato, hidróxido, nitrato e brometo), permitindo que a dessorção de ssDNA* prossiga por ~ 120 min, sendo então

analisada a intensidade de recuperação da fluorescência. Para efeito de comparação, também testamos a resposta do ssDNA*/a-CoFeNPs a uma amostra em branco.

Figura 18 – Resposta do complexo ssDNA*/a-CoFeNPs a diferentes ânions (10 μ M) dissolvidos em uma solução tampão Tris-HCl, pH 7,4.



Ao analisar as respostas correspondentes (Fig. 18), é possível observar que o sensor proposto exibe uma resposta considerável para os íons fosfato, mostrando também um sinal diferenciado, embora substancialmente menor, para o caso do citrato. Nossa sugestão é de que a resposta do citrato pode estar associada ao efeito de quelação entre o grupo COO^- e o íon metálico das nanopartículas, pois os íons citratos são considerados agentes quelantes que atuam como ligantes tridentados em relação ao átomo de metal, como já discutido na literatura (Azelee *et al.*, 2014; Sanpo *et al.*, 2013; Wyrzykowski e Chmurzyński, 2010). A maior resposta para íons fosfato pode ser associada à sua estrutura química, em uma interação ácido-base de Lewis com as partículas de ferrita de cobalto. De fato, para todos os outros ânions examinados, a resposta da fluorescência foi equivalente à da amostra em branco. Estes resultados indicam que o sensor ssDNA*/a-CoFeNPs é de fato seletivo para a detecção de íons fosfato dissolvidos.

2.3.2.6 Análises em amostras mais complexas

Com o objetivo de avaliar o potencial de aplicação da plataforma proposta de sensoriamento de íons fosfato, e diante do potencial observado nos estudos de sensibilidade e seletividade, implementamos seu uso em testes com amostras biológicas. Para isso, foi examinado o desempenho do complexo ssDNA*/a-CoFeNPs usando dois tipos diferentes de

amostras mais complexas: o soro de sangue simulado (SBF – *Serum Blood Fluid*) e o soro de sangue humano (HBS – *Human Blood Serum*).

O SBF é uma solução com uma concentração de íons variados (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} e PO_4^{3-}) semelhante à do plasma sanguíneo humano, que deve ser usada sob as mesmas condições fisiológicas de pH e temperatura. O uso do SBF é conveniente para permitir a construção de uma curva de calibração semelhante à mostrada na Fig. 17, uma vez que seriam necessárias muitas amostras clínicas para uma análise HBS equivalente. Já o HBS é um meio complexo que contém proteínas, globulinas, íons carboxilatos e diferentes eletrólitos. Dentre os eletrólitos presentes no soro encontra-se o fosfato, cujo nível normal está na faixa de concentração de 25 a 45 mg L^{-1} , a depender do paciente.

As amostras de SBF foram preparadas seguindo a literatura (Györi, Fábrián e Lázár, 2017). Nesse método, os autores preparam duas soluções, denominadas como solução A e solução B, que apresentam a composição descrita na Tabela 4. No entanto, como o objetivo deste experimento é quantificar os níveis de fosfato de uma amostra complexa, foram produzidos seis soluções B com diferentes concentrações do íons fosfato, sendo essas seis soluções B misturadas na mesma proporção (v/v) com as soluções A. Com isso, foram preparadas seis amostras diferentes de SBF, com concentrações de fosfato variando na faixa de 0 a 57 mg L^{-1} .

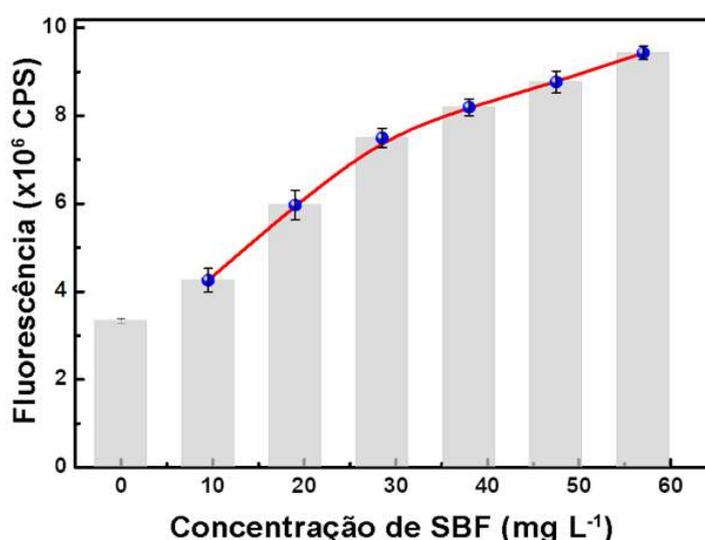
Para examinar a eficácia das nanopartículas de ferrita modificadas na detecção de íons fosfato em amostras biológicas, foi adicionado 1 mL dos diferentes SBF preparados, em eppendorfs contendo as amostras de ssDNA*/a-CoFeNPs previamente preparadas, conforme descrito na Seção 1.2.3.1. Depois de permitir a interação por 120 min, o ssDNA*/a-CoFeNPs foi confinado usando um ímã, sendo então medida a resposta de fluorescência do líquido sobrenadante. Os resultados correspondentes, que são mostrados na Fig. 19, sugerem que o sensor proposto possui a sensibilidade adequada para ser usado no diagnóstico de pacientes com hiperfosfatemia ou hipofosfatemia, uma vez que é possível diferenciar amostras abaixo de 25 mg L^{-1} e acima de 45 mg L^{-1} , respectivamente (Tonelli *et al.*, 2005).

Para as amostras de HBS, foi primeiramente extraído o sangue de um doador adulto anônimo e saudável, que foi depois coletado em um tubo do tipo “vacutainer” sem anticoagulantes. Após o sangue coagular, o tubo foi colocado para centrifugar a 3000 rpm por 15 min e então o soro obtido foi coletado e separado em alíquotas de 1 mL.

Tabela 4 – Compostos químicos do soro de sangue simulado preparado (SBF).

Solução A (100 mL)	(g)	Solução B (100 mL)	(g)
HCl	0,036	NaSO ₄	0,014
NaCl	1,598	NaHCO ₃	0,071
KCl	0,044	Na ₂ HPO ₄	0,001 – 0,008
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,061	Tris	0,060
CaCl ₂	0,055		
Tris	0,060		

Figura 19 – Resposta de recuperação de fluorescência da plataforma ssDNA*/a-CoFeNPs para diferentes concentrações de fosfato em amostras de SBF.

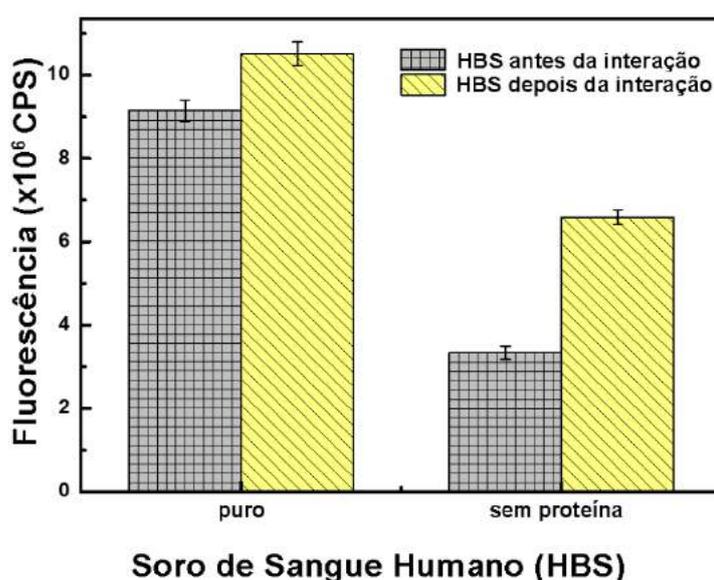


Testamos o ssDNA*/a-CoFeNPs usando amostras de HBS puras (ou seja, sem um tratamento prévio do soro sanguíneo, ou seja, usado como coletado) e outras nas quais removemos proteínas (spHBS), nas quais foram preparadas conforme descrito na Seção 1.2.3.3. Em seguida, foi adicionado 1 mL das amostras de pHBS e spHBS em eppendorfs contendo as amostras de ssDNA*/a-CoFeNPs (previamente preparada – ver Seção 1.2.3.1) e, após 120 min, foi analisada a fluorescência correspondente.

Como os resultados mostrados na Fig. 20 revelam, para ambos os tipos de amostras há uma diferença notável na intensidade da fluorescência da solução após a interação com o ssDNA*/a-CoFeNPs. Mesmo para essas amostras biológicas complexas, para as quais existe um grande sinal de fluorescência basal devido à presença de proteínas (Day e Schaufele, 2008), há uma resposta perceptível associada à liberação do ssDNA* anteriormente imobilizado. Esse

efeito é evidente no caso das amostras de spHBS, nas quais as proteínas estão ausentes. Os resultados obtidos representam uma confirmação importante de que a plataforma de detecção baseada no uso de ssDNA*/a-CoFeNPs é realmente eficaz para a avaliação do íon fosfato presentes em meios biológicos complexos, através de um procedimento simples e que pode ser implementado em um tempo relativamente curto, levando a resultados precisos e altamente sensíveis.

Figura 20 – Resposta da fluorescência da plataforma ssDNA*/a-CoFeNPs após exposição a HBS puro e HBS sem proteínas (spHBS).



2.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, discutimos uma nova plataforma de detecção baseada no uso de ssDNA*/a-CoFeNPs, que se mostrou eficaz para a detecção de íons fosfato presentes tanto em soluções aquosas quanto em amostras biológicas. Quando expostos a diferentes concentrações de íons fosfato, o sistema apresentou uma excelente sensibilidade, com uma ampla faixa de detecção e alta seletividade. Esse sistema pode ser também usado para avaliar o nível de fosfato em meios mais complexos, como o HBS. Os resultados indicam que a plataforma proposta possui um limite de detecção estimado em 1,75 nM, com uma boa relação linear sendo encontrada entre a intensidade de fluorescência e a concentração de fosfato.

Podendo ser obtida de maneira simples e com baixo custo, a plataforma preparada pela imobilização de cadeias de ssDNA ativadas por fluoróforo em nanopartículas de ferrita de cobalto é bastante versátil por conta de suas propriedades magnéticas, o que permite a fácil separação da amostra a ser analisada. Na comparação com outras plataformas de sensoriamento

de íons fosfato previamente reportadas na literatura, o complexo ssDNA*/ α -CoFeNPs se apresentou como um material promissor devido a seu excelente limite de detecção, ampla faixa de detecção e que, mesmo em condições não ideais, exhibe uma resposta perceptível à presença de íons fosfato em cerca de 10 minutos.

A partir destes resultados, acreditamos que o presente trabalho poderia melhorar a compreensão do comportamento de supressão de fluorescência de outros materiais encontrados na literatura e servir como uma base para futuras aplicações práticas de biossensores simples, rápidos e econômicos para diagnósticos.

3 USO DO COMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE (POLIPIRROL/QUITOSANA/ALGINATO/FERRITA DE COBALTO) PARA A REMOÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO DE MEIOS AQUOSOS

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A contaminação dos recursos hídricos é um problema ambiental importante, por seus impactos socioeconômicos e sobre a saúde humana. Com crescimento rápido da humanidade, há o aumento na demanda por suprimento de água de qualidade tanto para a população quanto pelos setores agrícola, industrial e doméstico (Gupta e Suhas, 2009). Cerca de 90% dos recursos de água doce vêm sendo utilizados por esses setores, do que resulta a geração de grandes quantidades de águas residuais e uma desordem ambiental associada ao problema da poluição (Helmer, R., Hespanhol, 1997).

Em especial, o descarte inadequado de águas industriais contendo resíduos de corantes em efluentes se torna preocupante, por ocasionar a diminuição do oxigênio, por conta do bloqueio da penetração da luz, que impede a fotossíntese e, assim, o correto desenvolvimento da vida aquática (VAZOLLER, 1996). Além disso, quando expostos à pele ou ao sistema respiratório os corantes podem ocasionar um risco tóxico na saúde humana, através de irritações na pele (dermatites), alergias e crises de asma e rinite (Clarke e Steinle, 1995). Entretanto, o maior risco se dá quando da ingestão oral desses compostos, pois uma vez catalisados por enzimas específicas dos organismos os corantes podem levar à formação de substâncias com propriedades carcinogênicas e mutagênicas (Guaratini e Zanoni, 2000).

Atualmente, mais 100.000 tipos de corantes comerciais são produzidos pela indústria. A produção anual global de corantes é superior a 100.000 toneladas, com cerca de 10% desse total termina por entrar no meio ambiente sob a forma de resíduos, com os maiores consumidores de corantes sendo as indústrias têxtil, papelreira, tinturaria e de curtumes. Em Pernambuco, ocorre um elevado lançamento de efluentes das indústrias têxteis, principalmente aquelas localizadas nos polos de confecções localizados nas regiões de Toritama, Santa Cruz do Capibaribe e Caruaru, o que causa grande poluição hídrica, um dos grandes problemas enfrentados pela Agência Estadual do Meio Ambiente – CPRH. Dados de fevereiro/2012, levantados pela CPRH, revelaram que na cidade de Toritama-PE existiam 53 empresas do setor têxtil, apenas uma das quais realizava o tratamento de efluente, o que motivou o aumento do grau de fiscalização, monitoramento e controle ambiental por órgãos ambientais, como o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) (Rodrigues Filho, 2012).

Em sua resolução N.º 430, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) regulamenta o descarte de efluentes em cursos hídricos, obrigando as empresas a fazer o

tratamento dos poluentes e estipulando os parâmetros com que cada material pode ser descartado. Esses parâmetros se referem a condições como, por exemplo, pH, temperatura, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), ausência de material flutuantes e sedimentáveis, entre outras.

Assim, a preocupação com o tratamento de efluentes têxteis tem se tornado crescente entre as empresas. Os processos de tratamento mais utilizados pelas indústrias do setor se baseiam em processos de coagulação, flotação ou sedimentação. Tais técnicas, porém, embora eficientes para a remoção do material particulado, são ineficientes para a remoção de corantes e compostos orgânicos dissolvidos na água. Muitos adsorventes têm sido estudados e aplicados para a remoção de corantes presentes em águas residuais, sendo o carvão ativado uns dos materiais adsorventes mais comumente utilizados.

Por isso, se tornou cada vez mais importante a busca de novos materiais de adsorção, que sejam baratos e eficientes e possam ser incorporados em métodos de remediação rápidos e ecologicamente corretos.

No presente trabalho, descrevemos inicialmente a preparação e caracterização de um nanocompósito híbrido em que uma fase de nanopartículas de ferrita de cobalto é introduzida em uma matriz polimérica de alginato e quitosana, cuja superfície é modificada pela incorporação de cadeias de polipirrol. Por fim, avaliamos a capacidade desses nanocompósitos magnéticos híbridos de Polipirrol/Quitosana/Alginato/Ferrita de Cobalto (PPy@Alg/Qui/CoFeNPs), que apresentam propriedades magnéticas, em remover o corante azul de metileno de meios aquosos.

3.1.1 Corantes

Embora o primeiro uso de corantes tenha sido por homens neandertais, o primeiro relato do uso de um corante foi há cerca de 4000 anos atrás, como atestado pela presença do corante índigo (de coloração azul) nos envoltos das múmias em túmulos egípcios (Gupta e Suhas, 2009). Os corantes são compostos químicos, até o século XIX obtidos apenas do processamento de produtos naturais, como plantas, insetos e moluscos. A partir de 1856, com a síntese da mauveína, o primeiro corante sintético, por William Perkin, os corantes passaram a ser produzidos de maneira industrial (Gupta e Suhas, 2009).

Por definição, corantes são todas substâncias ou misturas de substâncias que possuam a propriedade de que, quando aplicadas a um material, lhe conferir cor. De uma maneira geral, eles apresentam estruturas moleculares complexas, compostas por dois componentes principais, os grupos cromóforos, do tipo azo, antraquinona, nitro, entre outros, e grupos auxiliares, que

não só podem complementar o cromóforo como também tornar a molécula solúvel em água, fornecendo a ela maior afinidade para sua fixação em materiais (Hunger, 2003).

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado à fibra têxtil, como, por exemplo:

- Corantes ácidos: apresentam grupos sulfônicos, com caráter aniônico, solubilidade em água, se aderindo à fibra através de troca iônica, possuindo estrutura química envolvendo compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, ketonimina, nitro e nitroso, o que fornece uma ampla faixa de coloração e grau de fixação (Christie, 2007).
- Corantes básicos: também solúveis em água, em solução liberam cátions, sendo por isso são chamados de corantes catiônicos, muito utilizados para colorir celulose e poliacrilonitrila. Suas principais classes químicas são triarilmetano, cianina, hemicianina, tiazina, oxazina e acridina (Christie, 2007; Hunger, 2003).
- Corantes reativos: apresentam grupos eletrofilico (reativo) capaz de formar uma ligação covalente com grupos químicos presentes na fibra, como amino e hidroxila. Apresentam como grupos reativos, cromóforos do tipo azo, antraquinona, triarilmetano, formazan, oxazina, clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila. Este grupo de corantes apresenta alta solubilidade em água, com a ligação covalente lhes conferindo maior estabilidade quando comparados a outros tipos de corantes (Christie, 2007).
- Corantes diretos: apresentando caráter aniônico, são solúveis em água e capazes de tingir fibras de celulose através da interação tipo van der Waals, com a afinidade do corante podendo ser incrementada pelo uso de eletrólitos, que aumenta a adsorção do corante pela fibra. São geralmente constituídos de mais de um grupo azo (diazó, triazo). (Hunger, 2003).

Além dessas, existem outras classes de corantes que são insolúveis em água, como os corantes azoicos, dispersivos, de enxofre e de cuba. Para que esses corantes sejam fixados nas fibras é necessário um tratamento prévio do corante (geralmente a redução do corante) ou o auxílio de outros compostos para a fixação (Christie, 2007; Hunger, 2003), como por exemplo, para a aplicação dos corantes de enxofre, é necessário que esses corantes sejam reduzidos (por um banho de ditonito de sódio), tornando-os solúveis, em seguida, são reoxidados sobre a fibra pelo contato com o ar, o que proporciona uma boa fixação.

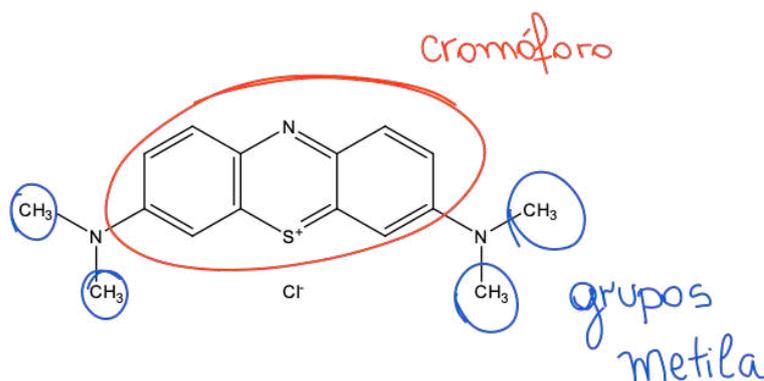
3.1.1.1 Azul de Metileno

O corante azul de metileno (AM) é um corante do tipo básico (catiônico) (Zollinger, 1991) muito usado em laboratórios como indicador redox (soluções dessa substância têm coloração azul quando em um ambiente oxidante, mas se tornam transparentes quando expostas a um agente redutor), na detecção de detergentes aniônicos em águas, e na análise quantitativa de

sulfetos (ISENMANN, 2014) e é frequentemente utilizado para tingir algodão, madeira e papel (Zhang *et al.*, 2011). É também aplicado na área médica para o reconhecimento de tecidos anormais ou modificados por um câncer, no tratamento de doenças, e é até mesmo utilizado como medicamento (devido a suas propriedades redutoras) (WAINWRIGHT, 2011). Pesquisadores como (Ding *et al.*, 2015) obtiveram resultados satisfatórios ao incorporarem o corante na superfície de nanopartículas de sílica para o combate de células cancerígenas.

O AM possui estrutura molecular aromática heterocíclica, sendo classificado como uma fenotiazina, no que se refere a seu grupo cromóforo, devido à presença de um anel contendo um átomo de nitrogênio e um de enxofre, além de dois anéis aromáticos, cada um ligado a um átomo de nitrogênio, o qual interage com dois grupos metila (Fig. 21). Quando armazenado e utilizado de forma correta, ele é um corante estável. No entanto, quando aquecido ele pode gerar óxido de enxofre e óxido nítrico, que possuem efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos e podem interferir na qualidade da água. A ingestão desse corante, pode, por exemplo, produzir sensação de queimação na boca, e causar náusea, vômito e gastrite (POGGERE, P.A.; DAVIS, R.; MONTANHER, S.F.; LOBO, 2011).

Figura 21 – Representação da estrutura química do corante azul de metileno.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.1.2 Métodos de remoção de corantes

Normalmente, os processos de tratamento de águas residuais industriais consistem em diferentes etapas como: i) pré-tratamento, onde as águas passam por um tratamento de neutralização e equalização; ii) tratamento primário, no qual os sólidos são removidos por técnicas de separação física ou química; iii) tratamento secundário, envolvendo um tratamento biológico através de microrganismos, principalmente bactérias, que estabilizam os componentes residuais; iv) tratamento terciário (físico-químico), que incluem os processos de adsorção, troca iônica, oxidação química e separação por membranas; e por fim, v) o passo final, que é o processamento e descarte do lodo formado durante esse processo. É interessante

ressaltar que os tratamentos terciários acrescentam um alto custo ao tratamento, mesmo quando comparados ao tratamento biológico, pois são destinados à remoção de poluentes não facilmente removíveis pelos processos anteriores (Gupta e Suhas, 2009; Rodrigues Filho, 2012).

Dentre as metodologias citadas acima, vale aqui ressaltar os tratamentos de troca iônica e adsorção, que têm sido amplamente utilizados para remoção de corantes. O processo de troca iônica envolve a remoção de íons de efluentes através de forças eletrostáticas sob uma matriz sólida. Basicamente, esse é um processo químico reversível, em que um íon da solução é trocado por um íon carregado de maneira semelhante, originalmente ligado à matriz sólida, e geralmente é muito aplicado para tratamento de efluentes contendo corantes iônicos. Muitos pesquisadores vêm estudando o uso desse processo para a remoção de corantes. Por exemplo, KARCHER e colab., 2001 testaram diferentes adsorventes comerciais (como zeólitas, resinas de poliestireno e hidróxido de ferro) para a remoção de corantes reativos, e encontraram que as resinas foram o adsorvente mais efetivo. LIU e colab., 2007 por sua vez estudaram o uso de membranas comerciais de troca iônica, para a remoção de corantes reativos aniônicos, como Cibacron Blue e Cibacron Red, e demonstraram uma rápida absorção, com uma excelente capacidade adsorvativa.

O processo de adsorção se refere ao processo pelo qual um material é concentrado (aderido) sobre uma superfície sólida a partir do seu ambiente, sendo ele líquido ou gasoso. Esse processo, por sua vez, cria uma película de adsorvato (material a ser adsorvido) na superfície do adsorvente. Embora esse fenômeno seja observado desde o século XVIII, quando da adsorção de gases através dos poros do carvão (Mantell, 1951), foi apenas em 1881 que o físico alemão Heinrich Kayser introduziu o termo adsorção para diferenciar a adesão de material (átomos, íons ou moléculas) por uma superfície, da penetração intermolecular (Kayser, 1881). Adsorção pode ser diferenciada entre dois tipos: se a atração entre a superfície sólida e o adsorvato for de natureza física, como, por exemplo, forças de van der Waals, a adsorção é chamada de fisissorção (ou adsorção física); por outro lado, se as forças de atração resultarem de uma ligação química, o processo é chamado de quimissorção. Tendo em vista a maior força de ligação característica da quimissorção, se faz mais difícil retirar as espécies adsorvidas que aquelas ligadas via fisissorção (Vidal *et al.*, 2014).

Como a adsorção está associada à tensão superficial, esse fenômeno depende essencialmente da temperatura, da natureza e das concentrações do adsorvato e do adsorvente. Para que um adsorvente tenha uma capacidade de adsorção considerável, deve apresentar uma grande área superficial, o que, em muitos casos, implica na existência de uma estrutura porosa.

Assim, podemos ressaltar que as propriedades adsorptivas de um material dependem do tamanho de seus poros, de sua distribuição, e da natureza das superfícies.

Atualmente, os adsorventes mais utilizados em escala industrial são o carvão ativado, a sílica gel, a alumina e zeólitas (como as peneiras moleculares), sendo o carvão ativado o adsorvente mais empregado para a remoção de corantes de soluções aquosas. Entretanto, um fator limitante para é que, em sua maioria, os adsorventes comerciais são dispendiosos, o que dificulta sua larga aplicação para o tratamento de efluentes industriais ou aqueles de difícil regeneração. Tendo isso em vista, muitos pesquisadores têm destinado atenção e recursos para o desenvolvimento de novos adsorventes, capazes de promover a remoção de efluentes e que possam ser aplicados em larga escala, com baixo custo de implementação e manutenção, em tratamentos terciários (Gupta e Suhas, 2009).

Na busca por novos materiais adsorventes, prioridade tem sido dada a aqueles que apresentem elevada área superficial e afinidade por alguns dos mais comuns poluentes. Em especial, atenção tem sido dada à incorporação de polímeros condutores, face a sua capacidade de exibir cargas em sua estrutura, o que pode contribuir para uma mais efetiva remoção de poluentes por meio de interações eletrostáticas.

3.1.3 Polímeros

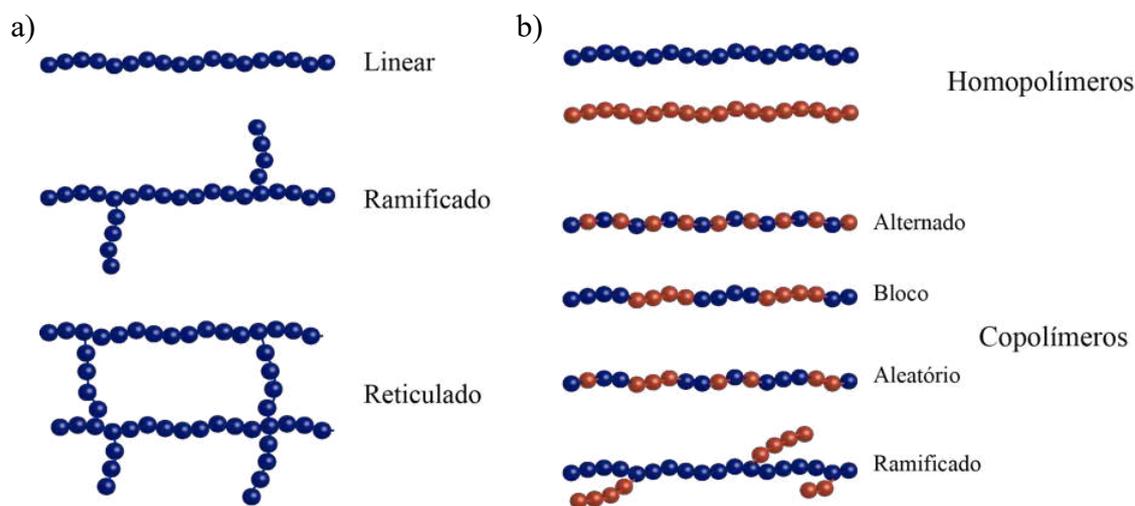
De origem grega, a nome polímero significa muitas partes (“poli” – muitas, “mero” – parte). Os polímeros são moléculas formadas pela união de unidades estruturais menores, denominados de monômeros. Essas unidades menores se repetem ao longo da cadeia polimérica (estrutura) e são essencialmente conectados entre si através de ligações covalentes. O processo de formação de um polímero a partir da união de diversos monômeros é chamado de polimerização (MANO e MENDES, 2004).

Os polímeros de origem natural, ou seja, encontrados na natureza, como a madeira, o couro, a lã, as proteínas, as enzimas e os ácidos nucleicos são chamados de biopolímeros. Aqueles de origem sintética, como o politereftalato de etileno (PET), o poliestireno (PS) e o polimetacrilato de metila (acrílico), são obtidos a partir de reações de polimerização.

Os polímeros podem ser ainda classificados quanto à sua estrutura, composição química e por seu comportamento mecânico a diferentes temperaturas. Em termos de sua estrutura molecular, os polímeros podem ser classificados como lineares, ramificados ou reticulados (Fig. 22 a). Quando formados por apenas um tipo de unidade de repetição (i.e., um mesmo monômero), são conhecidos como homopolímeros, e são chamados de copolímeros (Fig. 22 b) quando formados por dois ou mais tipos de unidade (i.e. diferentes monômeros), de uma maneira que pode ser alternada, aleatória, em blocos ou ramificada (Fig. 22 c). Quanto ao seu

comportamento face um aumento de temperatura, os polímeros podem ser classificados como termoplásticos, quando se fundem e se ressolidificam de maneira reversível, ou termofixos, quando se decompõem irreversivelmente com o aumento da temperatura (Callister, 2008).

Figura 22 – Representação da classificação dos polímeros quanto (a) à estrutura molecular (linear, ramificado e reticulado), e à composição química (homopolímeros ou copolímeros) (b).



Fonte: Autoria própria (2020).

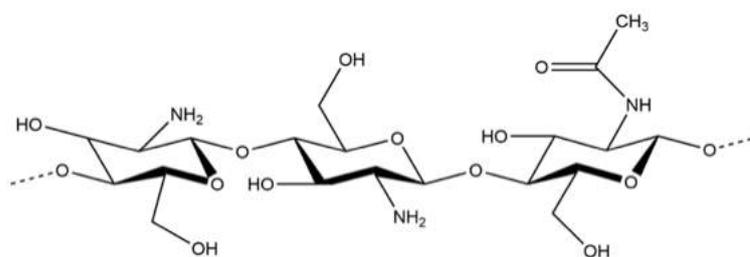
O grande desenvolvimento de materiais poliméricos aconteceu por conta da Segunda Guerra Mundial, uma vez que se via a grande necessidade de novos materiais em virtude da escassez de diferentes tipos de matéria prima. Desde então, cada vez mais novos tipos de materiais poliméricos passaram a ser desenvolvidos como alternativa a materiais convencionais, explorando vantagens competitivas, como facilidade de síntese, baixo custo de processamento, e propriedades mecânicas (baixa densidade, plasticidade, etc.) e de isolamento elétrico.

3.1.3.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero catiônico, composto por duas unidades (o 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e o 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose) (Fig. 23) que pode ser obtido através de um processo de desacetilação da quitina. Encontrada nos exoesqueletos de crustáceos e insetos, a quitina se encontra largamente distribuída na natureza, sendo considerada o segundo biopolímero mais abundante, atrás apenas da celulose. A quitosana, porém, é raramente encontrada na natureza, sendo o processo de desacetilação que ocorre a partir da hidrólise química da quitina, em meio alcalino, a melhor forma de se obter esse polímero industrialmente (Klug *et al.*, 1998; Tonhi, E., Plepis, 2002).

Nesse processo, a quitina pode sofrer vários graus de desacetilação, resultando em derivados diversos da quitosana, com diferentes distribuições de peso molecular. Por sua vez, essas mudanças proporcionam alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas. Por exemplo, embora a quitina seja insolúvel em água e solventes orgânicos, devido à presença da ligação de hidrogênio formada com o grupo acetamida, quando se remove os grupos acetil da quitina e se obtém a quitosana com maior grau de desacetilação a mesma passa a apresentar uma melhor solubilidade devido a possibilidade de protonação dos grupos aminos presentes.

Figura 23 – Estrutura química da quitosana.



Fonte: Autoria própria (2020).

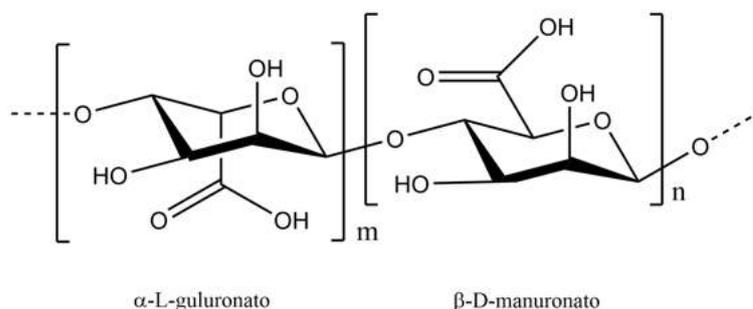
Dentre as propriedades da quitosana, cita-se aqui a bioatividade e biocompatibilidade, a permeabilidade seletiva (dependendo do meio em que ela se encontra, sendo solúvel em pH < 6,5 e insolúvel em pH > 6,5), a reatividade do grupo amino desacetilado, e habilidade de quelação e capacidade adsorptiva (devido à presença dos grupos aminos livres, o que confere cargas positivas a quitosana, tornando-a passível de reagir com moléculas carregadas negativamente e a quelação com vários íons) (Synowiecki e Al-Khateeb, 1997; Tharanathan e Kittur, 2003). Além disso, a quitosana tem sido também muito estudada devido ao fato de poder ser preparada sob diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas, microsferas e nanopartículas, o que conferindo ao polímero uma vasta possibilidade de aplicações. (Campana-Filho *et al.*, 2007; Dutta, 2016; Jayakumar, Reis e Mano, 2007)

3.1.3.2 Alginato

Dentre os polímeros naturais, o alginato é um polímero polianiónico constituído por duas espécies de resíduos uronatos, o β-D-manuronato (M) e o α-L-guluronato (G) (Fig. 24) que se encontram unidos por ligações glicosídicas em proporções e arranjos variáveis. Esses monômeros estão dispostos na forma de blocos alternados e, de acordo de como esses arranjos

são ordenados, a composição e o peso molecular do alginato variam, determinando assim as propriedades do polímero (Mackie *et al.*, 2016).

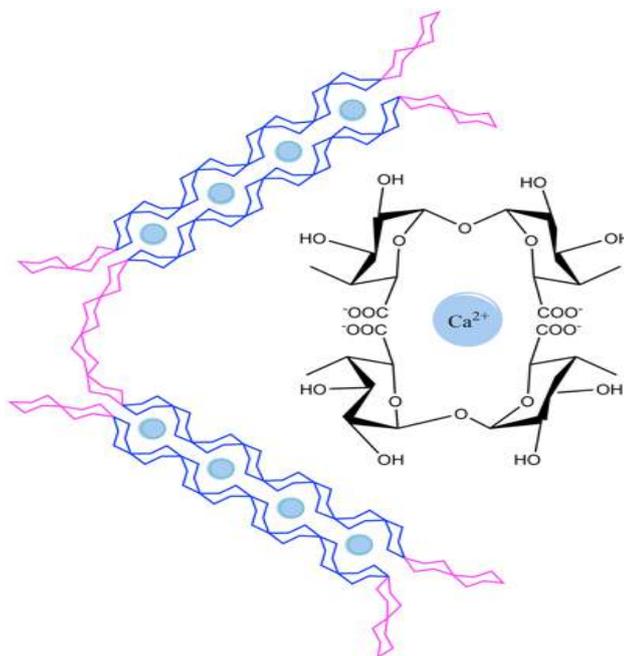
Figura 24 – Representação da estrutura química do alginato de sódio.



Fonte: Autoria própria (2020).

Tipicamente, o alginato é extraído de algas marrons e bactérias, sendo disponível comercialmente sob a forma de sal de sódio do ácido algínico (alginato de sódio). Ele é comumente utilizado nas indústrias farmacêuticas, devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixo custo e pelas suas propriedades de formação de gel na presença de cátions bivalentes ou polivalentes. Isso ocorre quando o alginato interage com cátions bivalentes, como íons de cálcio, o que leva à formação de estruturas ordenadas e tridimensionais através do processo de gelificação ionotrópica. Dissolvido em água, o sal de cátion polivalente inicia a formação de pontes em determinados sítios específicos da cadeia do alginato (através de interações eletrostáticas entre o cátion e os grupos iônicos e polares), e a formação dessa ligação é favorecida pela estrutura em “zigue-zague de suas cadeias, gerando estruturas com ligações cruzadas semelhantes a uma caixa de ovos, conforme observado na Fig. 25. Essas ligações ocorrem preferencialmente nos grupos de monômeros α -L-guluronato (G), devido à presença de ângulos mais favoráveis para a formação das ligações com cátions (Paredes Juárez *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2013).

Figura 25 – Representação esquemática da ligação cruzada dos blocos de homopolímero com os íons de cálcio, formando uma estrutura semelhante a uma “caixa de ovos”.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.1.3.3 Polipirrol

O polipirrol (PPy) é um polímero sintético, obtido pela polimerização do monômero pirrol, que pertence à classe dos polímeros intrinsecamente condutores (PCs). Diferentemente dos polímeros convencionais (isolantes), os PCs apresentam propriedades elétricas, magnéticas e óticas semelhantes às de metais e semicondutores e exibem propriedades como boa condutividade, flexibilidade mecânica, e facilidade no processamento, entre outras (Heeger, 2001). A descoberta do primeiro PCs ocorreu em 1977, quando ao tentar sintetizar poliacetileno pelo uso de uma quantidade elevada de catalisador, H. Shirakawa obteve um filme de aspecto brilhante, cuja condutividade poderia ser extremamente aumentada pela exposição a agentes oxidantes ou redutores.

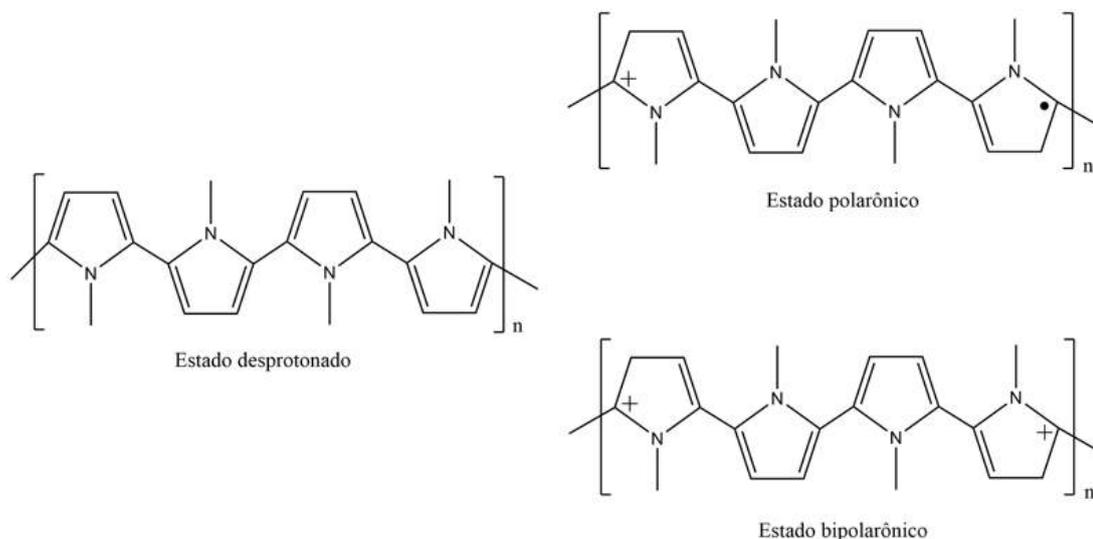
Desde então, os PCs têm sido cada vez mais sintetizados e estudados. De maneira geral, os PCs são formados por longos sistemas π -conjugados, que se caracterizam por uma alternância de ligações simples e duplas ao longo da cadeia, o que permite uma maior deslocalização dos elétrons. Para que ocorra a condutividade nesses polímeros, é preciso que haja defeitos estruturais (sólitons, pólarons e bipólarons) ao longo da cadeia, associados à presença de estados eletrônicos localizados na banda de condução, o que proporciona o transporte de carga. De um modo geral, esses defeitos podem ser introduzidos ao longo da

cadeia através da exposição a agentes oxidantes e redutores, que removem ou adicionam elétrons na cadeia. Dentre as vantagens dos PCs frente aos materiais convencionais, temos o fato de que eles podem ser convenientemente processados para fabricar diferentes dispositivos elétricos, eletrônicos e optoeletrônicos de forma mais prática e econômica, que exibam leveza, flexibilidade, facilidade no processamento, boa condutividade, entre outras propriedades interessantes (Seymour, 1981).

Devido a características como alta condutividade, estabilidade química e ambiental e simplicidade de síntese, o PPy tem sido amplamente estudado na comunidade científica, oferecendo um grande potencial para aplicações como baterias, sensores, e capacitores, entre outras (Medeiros *et al.*, 2012). A polimerização do PPy é frequentemente realizada através de uma síntese química ou eletroquímica; enquanto o processo de oxidação do monômero ocorre na primeira através do uso de um agente oxidante forte, na síntese eletroquímica é aplicado um potencial adequado para produzir a oxidação do monômero. Durante o processo de polimerização, a incorporação de cargas leva à formação de defeitos conformacionais ao longo das cadeias: a remoção (ou adição) de um elétron leva ao aparecimento de um estado eletrônico denominado pólaron, associado com uma distorção da cadeia que pode se deslocar espacialmente. Essa distorção tipicamente compreende um número limitado de anéis que se ajustam em uma estrutura tipo quinoidal, de menor energia que a aromática regular. À medida que mais elétrons são retirados da (ou adicionados à) cadeia do PPy, esses defeitos podem se tornar duplamente carregados (bipolaron). Assim, quando se aplica uma diferença de potencial elétrico, temos como resposta uma corrente gerada pelo movimento de pólarons e/ou bipolarons ao longo das cadeias de PPy, com o rearranjo sucessivo das ligações duplas e simples (Nalwa, 2001; Seymour, 1981).

Na Fig. 26 são mostrados os três estados no qual o PPy pode ser encontrado, a forma desprotonada (não-condutora), e as formas dopadas (condutoras), onde parte da estrutura aromática está oxidada.

Figura 26 – Estados de carga nas quais as estruturas do PPy podem ser encontradas.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.1.4 Compósitos

Dentro dos diferentes tipos de adsorventes utilizados para a remoção de corantes em meios aquosos, muito interesse acadêmico e industrial tem sido dirigido a aqueles de composição híbrida (compósitos), pela ampla gama de distintas propriedades que podem ser obtidas quando da combinação de dois ou mais compostos de natureza diversa.

Um material compósito é definido como aquele constituído por dois ou mais componentes (ou fases), que têm propriedades físicas e químicas distintas. Um desses constituintes é chamado fase-reforço (geralmente, na forma de fibras ou partículas), e o outro de matriz (geralmente polimérica ou cerâmica). Se ao menos uma das fases que compõem o material possui alguma dimensão em escala nanométrica, temos então um nanocompósito (Pereira, 2016). Os materiais compósitos devem ser preparados/projetados com um objetivo que visa (através da combinação de seus constituintes), maximizar a combinação das propriedades das duas fases distintas. Combinando a matriz e reforço, pode-se chegar a características desejadas atendendo às necessidades do projeto (Franzoni, 2017; Jones, 1999).

Não existindo uma classificação universal dos compósitos, alguns pesquisadores os denominam de acordo com sua forma, matriz, reforço, e outras características. Segundo Jones (Jones, 1999), os materiais compósitos podem ser classificados em quatro tipos:

- 1) Compósitos fibrosos – constituídos por fibras em sua matriz;
- 2) Compósitos laminados – formados por várias camadas de materiais;
- 3) Compósitos particulados – constituídos por partículas em sua matriz;

4) Compósitos híbridos – formados pela combinação de dois ou mais tipos de reforço.

Na literatura, é possível notar nas últimas décadas o crescimento no número de estudos sobre compósitos e suas aplicações, com destaque especial para aqueles de natureza híbrida em que uma matriz polimérica é reforçada com fibras e/ou nanopartículas (ou micropartículas), o que leva a uma melhoria das propriedades elétricas, térmicas, óticas, químicas, magnéticas, físicas e mecânicas (Manjunatha *et al.*, 2009).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Para a síntese das partículas de ferrita de cobalto foram usados o cloreto de cobalto (II) hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, EUA), o cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica, Brasil) e o hidróxido de sódio (NaOH , Dinâmica, Brasil). Para o compósito magnético híbrido usamos o pirrol ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$), o dodecilsulfato de sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, Sigma Aldrich, EUA), o cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica, Brasil), o alginato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$, Sigma Aldrich, EUA), a quitosana ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$, Sigma Aldrich, EUA) e o cloreto de cálcio (CaCl_2 , Sigma Aldrich, EUA). Todos os reagentes foram usados sem purificação prévia, com exceção do pirrol, que foi purificado por destilação sob vácuo antes do uso. Todos os experimentos foram realizados com água deionizada obtida após passar por um sistema Synergy 185 (Millipore, EUA).

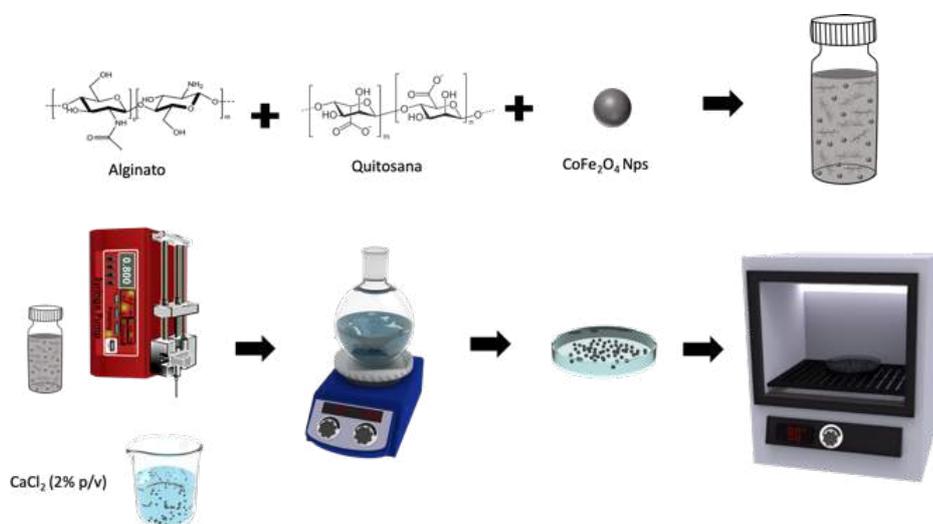
3.2.1.1 Síntese das partículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4 NPs)

As partículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4 NPs) foram produzidas pelo método de coprecipitação química seguindo uma adaptação da técnica adotada por (Medina-Llamas *et al.*, 2014), que envolve um processo de várias etapas onde ocorre a troca de um precursor de ferro por um precursor de cobalto. Primeiramente, em um balão de fundo redondo de 250 mL foram misturados 25 mL de uma solução de CoCl_2 (0,5 M) e 25 mL de uma solução de FeCl_3 (1 M). Após 5 min, foi adicionado 125 mL de uma solução aquosa de NH_4OH (50% v/v), sob vigorosa agitação. A solução final foi mantida a 100°C por 1h, após o que o precipitado foi decantado com a ajuda de um ímã. O material coletado foi repetidamente lavado com água deionizada para reduzir a contaminação e depois seco em um forno a 80°C por 48 h. O pó resultante foi macerado em um almofariz ágata até homogeneidade. Depois disso, as partículas foram tratadas termicamente usando um forno a arco, com o objetivo de melhorar das propriedades cristalinas e magnéticas. Nesse processo, as amostras foram aquecidas a uma taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir 600°C , temperatura que foi mantida por 1 h. Em seguida, a amostra foi resfriada até a temperatura ambiente (RT) a uma taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

3.2.1.2 Preparação do nanocompósito magnético híbrido PPy@Alg/Qui/CoFeNPs

Para preparar o compósito, inicialmente adicionamos 40 mg de partículas magnéticas previamente sintetizadas e 30 mg de alginato em um frasco de vidro contendo 1 mL de uma solução de quitosana, anteriormente preparada pela adição de 200 mg de quitosana a 100 mL em ácido acético (1% v/v). O frasco foi colocado em banho ultrassônico e agitado manualmente, até a completa solubilização da solução. Posteriormente, a mistura de alginato/quitosana/CoFe₂O₄ foi colocada em uma seringa e gotejada por meio de uma bomba de seringa NE-4000 (New Era, EUA) em uma solução aquosa de CaCl₂ (2% v/v) para que ocorresse a formação das pérolas. Deixamos a reação ocorrer por 1h, sendo depois as pérolas lavadas 3 vezes com água deionizada e, subsequentemente, colocadas em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 80 mL de água, 1,4 g de SDS, e 70 µL de pirrol. Após 15 min, foram adicionados 800 µL de FeCl₃ (1 M) para que a polimerização tivesse início. A reação foi realizada sob agitação constante à temperatura ambiente por 6 h. No final, as pérolas foram lavadas várias vezes com metanol e água deionizada e, por fim, colocadas para secar em uma estufa a 60 °C por aproximadamente 24 h. Como resultado, as pérolas de nanocompósito magnético (NCM) PPy@Alg/Qui/CoFeNPs foram obtidas. Na Fig. 27 é representado de forma esquemática as principais etapas seguidas para a obtenção do PPy@Alg/Qui/CoFeNPs.

Figura 27 – Representação esquemática das etapas presentes no processo de preparação do compósito PPy@Alg/Qui/CoFeNPs.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.2.2 Métodos de caracterização

3.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica muito utilizada para investigar as características morfológicas e estruturais e a composição química de materiais em escala nanométrica. Nessa técnica, a amostra a ser analisada é irradiada com um feixe de elétrons, chamados de elétrons primários. A formação da imagem depende da aquisição dos sinais produzidos através da interação desse feixe com a amostra. Essas interações podem ser tanto elásticas, resultantes do desvio do elétron incidente pela interação com o núcleo atômico ou pela colisão com elétrons de camadas externas, quanto inelásticas, que ocorrem devido as interações entre os elétrons de feixe incidente como elétrons dos átomos da amostra. Essas interações com a amostra, dão origem a elétrons secundários e retroespalhados, e raios-X característicos, com essas emissões sendo responsáveis pelas informações que podem ser coletadas sobre a amostra (Maliska, 2003).

Neste trabalho, essas análises foram feitas pela utilização do microscópio eletrônico de varredura FEG-SEM MIRA3 LM (TESCAN, República Checa) do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco. Para o preparo das amostras, uma pérola de compósito foi colocada sobre uma fita de carbono fixada em *stubs* (suporte de alumínio). As amostras foram então metalizadas pela deposição de uma camada de ouro para torná-las mais condutoras.

3.2.2.2 Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia por infravermelho é muito utilizada com o intuito de obter informações sobre a composição química tanto das nanopartículas quanto dos nanocompósitos preparados. Conforme descrito no Capítulo 1, os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (compreendido no infravermelho médio) foram obtidos usando um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão) com resolução de 4 cm^{-1} e uma média de 64 varreduras. As amostras foram preparadas utilizando pastilhas de KBr, obtidas pela maceração de 0,1 mg do material e 50 mg de KBr em um almofariz de ágata e então levadas a um pastilhador por 10 min sob 2 toneladas.

3.2.2.3 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)

A técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis é corriqueiramente utilizada para a obtenção de uma série de informações importantes a respeito de uma amostra, por exemplo, revelar a posição espectral da ressonância de plásmons de partículas metálicas e o gap de energia de partículas semicondutoras. O procedimento de medida se inicia com uma medida do espectro da luz transmitida através do solvente no qual as amostras foram produzidas, que

servirá de sinal de fundo (background). Em seguida, mede-se a absorção da amostra propriamente dita.

A intensidade da luz transmitida através da solução segue a lei de Beer-Lambert (F. Rouessac, 2007), a qual diz que a intensidade cai exponencialmente com a espessura da amostra conforme a equação

$$I = I_0 e^{-\alpha x}.$$

Na equação acima, α é o coeficiente de absorção, x o comprimento do caminho óptico, I_0 a intensidade da luz antes de atravessar a amostra e I a intensidade depois de atravessá-la. Em uma medida de UV-Vis, mede-se a absorbância da amostra, que é definida por (F. Rouessac, 2007)

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}.$$

O equipamento utilizado nas medidas de UV-Vis foi o espectrômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão), composto de uma fonte de luz (lâmpada de Halogênio e Deutério) e um espectrômetro acoplado. Esse sistema permite a obtenção do espectro de absorção de luz desde 185 nm (UV) até 1400 nm (infravermelho próximo) com uma resolução máxima de 0,1 nm.

3.2.2.4 Análise Termogravimétrica

A técnica termoanalítica de análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada com o objetivo de acompanhar da variação de massa de uma amostra em função do incremento controlado da temperatura. Conforme descrito no Capítulo 1, em nosso trabalho, as curvas de TGA das amostras, colocadas na forma de pó em caldinho de platina, foram obtidas no equipamento TGA-50H (Shimadzu, Japão), do Departamento de Química Fundamental, sob uma atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) em uma faixa de temperatura de 25 °C até 900 °C, utilizando uma rampa de aquecimento a uma taxa de 10 °C/min..

3.2.2.5 Determinação do ponto de carga zero

O ponto de carga zero (pH_{pcz}) dos compósitos foi determinado usando o método de adição de sal (Haddad, El *et al.*, 2012). Para isso, foi colocado 5 mL de uma solução de KCl 0,1M em cada tubo falcon, cujo pH inicial foi ajustado em valores diferentes no intervalo de 2 a 9, pela adição apropriada de HCl ou NaOH. Depois disso, duas pérolas do compósito foram colocadas em cada tubo e deixadas em interação por 24 h, para que o equilíbrio seja atingido. Após esse tempo, o pH final de cada solução foi medido, e o valor do pH_{pcz} determinado como

aquele para o qual a variação do pH das soluções interagentes foi nulo, $\Delta\text{pH} = (\text{pH}_{\text{final}} - \text{pH}_{\text{inicial}}) = 0$ (Ahmad e Kumar, 2010).

3.2.2.6 Experimentos de adsorção

Para determinar as melhores condições para as análises de adsorção do corante azul de metileno (AM), foram realizados diversos estudos em que parâmetros como pH, tempo de interação e concentração inicial do corante foram variados. Esses experimentos foram realizados em modo batelada, em que 1 pérola (de aproximadamente 0,8 mg) era colocada em diversos frascos de vidro de borossilicato contendo 20 mL de uma concentração pré-estabelecida de corante, que foram mantidos sob agitação contínua de 300 rpm. Para intuito de comparação, as pérolas foram maceradas em um almofariz de ágata, até a formação de um pó homogêneo. Os mesmos experimentos foram realizados para o compósito híbrido na sua forma em pó, quando uma quantidade de cerca de 0,36 mg foi colocada em 5 mL de uma concentração inicial de azul de metileno, e deixada sob interação a uma agitação contínua de 160 rpm. Utilizando um ímã, compósito foi então separado da solução do contaminante, para permitir a medida da concentração correspondente.

Usando um espectrômetro UV-Vis, foi medida a absorvância da solução antes e depois da interação com o compósito. Como controle, foi medido a absorvância em 664 nm ($\lambda_{\text{máx}}$, ou seja, o comprimento de onda que corresponde à absorção máxima) das soluções antes e após os experimentos de remoção para determinar as concentrações do AM correspondentes. A configuração experimental adotada para os estudos de adsorção é mostrada de forma esquemática na Fig. 28.

A estimativa de adsorção do corante pelas duas formas do compósito (pérola e pó) foi feita através do cálculo de porcentagem de adsorção, na forma

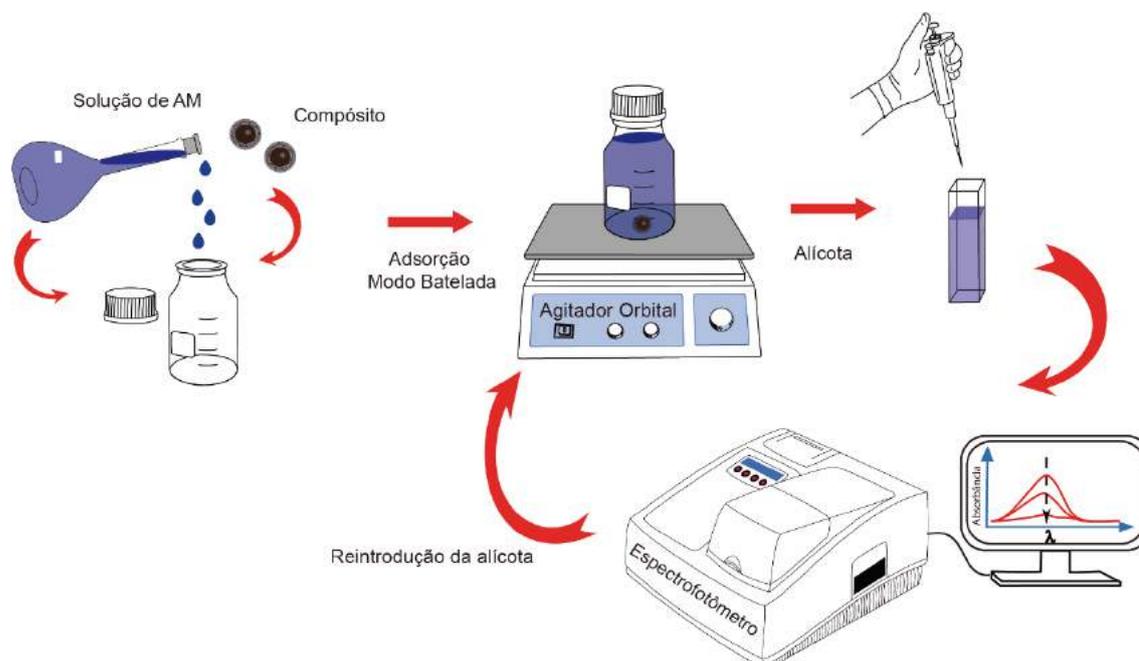
$$\% \text{ Adsorção} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100, \quad (2.1)$$

onde C_0 e C_f são a os valores de concentração inicial e final da solução do corante (mg/L), respectivamente. Foi também estimada a capacidade de adsorção (q_e), conhecida na literatura como a quantidade de massa do contaminante em questão (mg) adsorvido por unidade de massa do adsorvente, no caso o compósito híbrido, através da equação

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_f)}{m}, \quad (2.2)$$

onde V é o volume da solução (L), e m é a massa (g) do adsorvente utilizadas nos ensaios (Gorza *et al.*, 2018).

Figura 28 – Representação esquemática da montagem experimental para os estudos de adsorção do corante AM pelo NCM PPy@Alg/Qui/CoFeNPs em modo batelada.



Fonte: Figura adaptada de (Silva, 2019).

3.2.2.7 Modelos de Isotermas de Adsorção

Por definição, uma isoterma de adsorção é a relação de equilíbrio entre as concentrações do adsorvato (na fase fluida) e do adsorvente, a uma dada temperatura (Vidal *et al.*, 2014). Através da análise de uma isoterma é possível não apenas determinar a quantidade máxima de adsorvato que um adsorvente pode adsorver, mas também entender a natureza da interação entre eles e o mecanismo envolvido nesse processo de adsorção. Essas relações de equilíbrio são apresentadas através de modelos que correlacionam matematicamente as quantidades adsorvidas em equilíbrio com o meio circundante. Para gases, a concentração do adsorvente sempre é dada em porcentagem molar, enquanto que para líquidos expressada através de unidades de massa (quantidade (mg) de adsorvato removido da fase líquida por unidade de massa de massa de adsorvente (g)).

Na literatura (Vidal *et al.*, 2014), são encontrados diferentes modelos teóricos de isotermas de adsorção, tais como os modelos de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Sips, Redlich-Peterson, entre outros, cada um deles mais adequado a um tipo distinto de interação adsorvente-adsorbato. No contexto de adsorção de corantes, os modelos mais comuns são os modelos de Langmuir e Freundlich (Yagub *et al.*, 2014), os quais serão por nós utilizados para

analisar a adsorção de corante em função da concentração inicial presente na solução no equilíbrio nesse trabalho.

O modelo de isoterma de Langmuir está baseado na hipótese simples de que os adsorvatos interagem apenas com um sítio (que existem em um número fixo e são energeticamente equivalentes), e não entre si, e que a adsorção é limitada a uma camada (Langmuir, 1918; Vidal *et al.*, 2014).

O modelo estabelece a relação

$$q_e = \frac{q_{m\acute{a}x}K_L C_e}{(1 + K_L C_e)}, \quad (2.3)$$

onde C_e é a concentração do adsorbato na solução (mg g^{-1}) após o sistema atingir o equilíbrio, K_L é a constante de equilíbrio de adsorção de Langmuir (L mg^{-1}), $q_{m\acute{a}x}$ é a capacidade máxima de adsorção do material (mg g^{-1}) e q_e é a quantidade de soluto absorvida por unidade de massa do adsorvente (mg g^{-1}).

Para facilitar o ajuste do modelo aos dados experimentais, a Eq. (2.3) pode ser escrita em forma linear como

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{m\acute{a}x}K_L} + \frac{C_e}{q_{m\acute{a}x}}. \quad (2.4)$$

Essas equações nos mostram que para baixos valores de C_e o valor de q_e pode ser aproximado na forma $q_e = q_{m\acute{a}x}bC_e$ (uma vez que o denominador bC_e se torna pequeno quando comparado com a unidade). Entretanto, para altas concentrações temos que no equilíbrio o valor de q_e se aproxima do valor de $q_{m\acute{a}x}$, uma vez que o valor de bC_e no denominador será relativamente grande quando comparado à unidade. Para um adsorvente ser classificado como bom, é necessário que seu valor de $q_{m\acute{a}x}$ seja alto e com b sendo de baixo valor; com isso, ele teria uma boa performance frente a baixas concentrações das espécies em solução (Metcalf, Eddy e Tchobanoglous, 2004; Reynolds e Richards, 1996).

Já o modelo de isoterma de Freundlich pode ser aplicado a sistemas não ideais, pois assume a presença de sítios não-uniformes, uma característica de sistemas heterogêneos onde ocorre a adsorção em multicamadas, com a interação entre as moléculas do adsorbato. Esse modelo aplica uma distribuição exponencial para caracterizar os vários tipos de sítios de adsorção, que por sua vez possuem diferentes energias adsortivas) (Febrianto *et al.*, 2009; Freundlich, 1907; Vidal *et al.*, 2014) na forma

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}, \quad (2.5)$$

onde K_f e n são conhecidas como constantes de Freundlich, que indicam respectivamente a capacidade de adsorção ($\text{mg}^{1-(1/n)} \text{g}^{-1} \text{L}^{1/n}$) e o fator de heterogeneidade (adimensional).

Para facilitar o ajuste do modelo aos dados experimentais, a Eq. (2.5) pode ser expressa em uma forma linearizada como

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e. \quad (2.6)$$

É interessante ressaltar que é possível obter informações sobre a adsorção através do valor de n . Quanto maior o valor de n , mais forte será a interação do adsorvato e adsorvente. Se o valor de $1/n$ foi igual a 1, a adsorção é linear e as energias são iguais para todos os sítios de adsorção. Já quando o valor de $1/n$ for superior a 1, o adsorvente tem maior afinidade pelo solvente, o que sugere uma forte atração intermolecular entre eles. Também é importante chamar a atenção para o fato que a equação de Freundlich não é capaz de prever os dados de equilíbrio de adsorção para altas faixas de concentração (Vidal *et al.*, 2014).

3.2.2.8 Modelos Cinéticos de Adsorção

A adsorção é um processo que envolve a transferência de massa do fluido para o interior do adsorvente os quais os adsorvatos devem migrar através dos poros presentes até as regiões mais internas. Esse processo de transferência pode acontecer de diferentes formas, como, por exemplo, através de transferência externa, ou por difusão no poro ou difusão de superfície (Azizian, 2004). O estudo de cinética de adsorção de efluentes tem grande importância no estudo para tratamento de efluentes aquosos, pois nos fornece informações sobre o mecanismo de adsorção. A cinética, que expressa a taxa de remoção do adsorvato em função do tempo, pode ser afetada pela temperatura, pH, agitação, força iônica, concentração inicial, tamanho das partículas e distribuição dos tamanhos dos poros.

Diversos modelos cinéticos podem ser utilizados para fornecer informações sobre o mecanismo dominante no processo de adsorção, bem como parâmetros relevantes como a taxa de adsorção, o coeficiente de difusão, a capacidade máxima, entre outros. Os modelos cinéticos lineares mais utilizados são os de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem (Rocha *et al.*, 2012) e os modelos de difusão intrapartícula de Morris-Weber (Weber e Morris, 1963).

Tradicionalmente descrito pelas expressões desenvolvidas por Lagergren em 1898 (Lagergren, 1898), o modelo de pseudo-primeira ordem é expresso por

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q_e - q_t), \quad (2.7)$$

onde q_t é a quantidade de adsorvato adsorvida no instante de tempo t (mg g^{-1}), t é o tempo de interação do adsorvato e o adsorvente (min), q_e é a quantidade absorvida no equilíbrio (mg g^{-1}), e k_1 é a constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem (min^{-1}). A integração da Eq. (2.7), sob as condições de contorno em que em $t = 0$, $q_t = 0$ e em $t = t$, $q_t = q_t$, dá origem à relação

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1 t}{2,303}. \quad (2.8)$$

Enquanto que, a equação do modelo de pseudo-segunda ordem, proposta por Ho e McKay em 1999 (Ho e McKay, 1999), é dado por

$$\frac{dq}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2, \quad (2.9)$$

onde k_2 é a chamada constante da taxa de adsorção de pseudo-segunda ($\text{g mg}^{-1}\text{min}^{-1}$). A partir da integração da Eq. (2.9), podemos escrever a relação

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}. \quad (2.10)$$

Os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e de pseudo-segunda ordem admitem que força motriz de adsorção resulta da diferença entre as concentrações da fase sólida (C_t), e da fase sólida em equilíbrio (em que o sistema atinge sua saturação máxima) (C_e) ao longo do tempo.

Já um terceiro modelo cinético, o de Morris-Weber, assume que a difusão intrapartícula é a força motriz que comanda os processos de adsorção, com a remoção do adsorvato variando com a raiz quadrada do tempo (Weber e Morris, 1963). Em sua forma linear, a equação que descreve esse modelo é expressa como

$$q_t = k_{id} t^{0,5} + C, \quad (2.11)$$

onde k_{id} e C são a taxa de adsorção (min^{-1}) e a constante de difusão intrapartícula, respectivamente.

Pelo ajuste de cada um desses modelos (em sua forma linear) aos dados experimentais, foi possível obter os parâmetros correspondentes para a cinética de adsorção. A análise dos

respectivos coeficiente de correlação (R^2) serviu como indicativo para a escolha do modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais (Vidal *et al.*, 2014).

3.2.2.9 Estudos termodinâmicos de adsorção

Estudos termodinâmicos foram também realizados, com o objetivo de obtenção de mais informações sobre o processo de adsorção do corante pelos compósitos testados (como, por exemplo, determinar se o processo é ou não espontâneo). Na adsorção, forças atrativas possibilitam o recobrimento de uma dada superfície (adsorvente) por espécies afins (adsorvato), de modo a haver sempre liberação de energia (Vidal *et al.*, 2014). Assim, quando a variação da energia livre de Gibbs (relativa ao processo de adsorção) a uma determinada temperatura for negativa ($\Delta G_{\text{ads}} < 0$), o processo de adsorção ocorrerá espontaneamente, enquanto ele será não espontâneo se essa variação for positiva ($\Delta G_{\text{ads}} > 0$). Para uma dada temperatura, tem-se que

$$\Delta G_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{ads}} - T\Delta S_{\text{ads}}, \quad (2.12)$$

onde ΔH_{ads} e ΔS_{ads} são as variações da entalpia e da entropia do processo de adsorção. Se as forças presentes no processo forem de natureza física, por exemplo, tipo van der Waals, a energia liberada pelo sistema é pequena, ao contrário do que ocorre quando o processo envolve a quebra e formação de ligações químicas (quimissorção).

Os parâmetros termodinâmicos relevantes, a constante de equilíbrio (K_e), a variação da energia livre de Gibbs (ΔG_{ads}), variação da entalpia (ΔH_{ads}) e a variação da entropia (ΔS_{ads}), se relacionam na forma

$$\Delta G_{\text{ads}} = -RT \ln K_{\text{ads}}, \quad (2.13)$$

$$\ln K_{\text{ads}} = \frac{\Delta S_{\text{ads}}}{R} - \frac{\Delta H_{\text{ads}}}{RT}, \quad (2.14)$$

$$\ln K_f - \ln K_i = -\frac{\Delta H_{\text{ads}}}{R} \left(\frac{1}{T_f} - \frac{1}{T_i} \right), \quad (2.15)$$

onde R é a constante universal dos gases ($\text{J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), e T a temperatura em Kelvin. Esses parâmetros podem ser estimados a partir dos dados das isotermas realizadas a temperaturas distintas (Vidal *et al.*, 2014).

Através dos valores de entalpia, é possível identificar os processos de adsorção: se $|\Delta H_{\text{ads}}| \leq 25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, a adsorção pode ser classificada como fisissorção, enquanto que para valores de $|\Delta H_{\text{ads}}| > 40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pode ocorrer o rompimento de ligações químicas, e a adsorção

pode ser classificada como quimissorção (Vidal *et al.*, 2014). No entanto, na prática, esse critério não é absoluto, devendo ser apenas notado que quanto maior a energia liberada, maior a propensão para a formação de ligações químicas entre o adsorvente e o adsorvato (Vidal *et al.*, 2014).

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a capacidade de captura de AM pelo compósito PPy@Alg/Qui/CoFeNPs, foram realizados estudos de adsorção para as temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50 °C. Esses experimentos foram realizados em modo batelada, onde uma única pérola (sendo aproximadamente 0,82 mg) era colocada em um frasco de vidro de borossilicato contendo 20 mL de uma concentração pré-estabelecida de corante. Esses frascos foram mantidos sob agitação contínua de 300 rpm por 72 h. Os mesmos experimentos foram realizados para o compósito híbrido na sua forma em pó, quando uma quantidade igual a 0,36 mg da amostra foi colocada em 5 mL de uma determinada concentração inicial de azul de metileno. Esses frascos foram deixados por 60 min sob agitação contínua de 160 rpm. Após isso, com o recurso de um ímã separamos o compósito da solução de contaminante, quando foram então medidas as respectivas concentrações.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

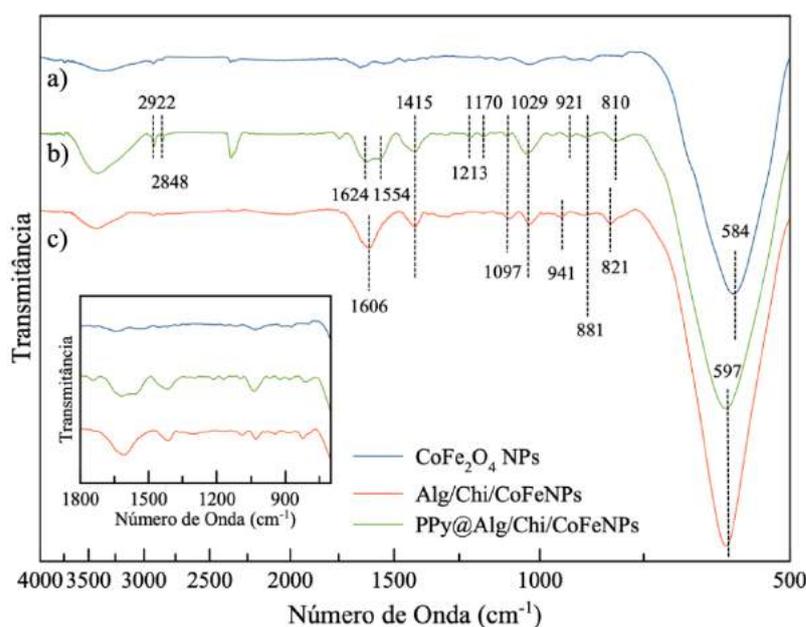
3.3.1 Caracterização dos compósitos

3.3.1.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A composição química dos compósitos preparados foi analisada pela espectroscopia de FTIR. Na Fig. 29, são mostrados os espectros de absorção das nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (curva a), dos compósitos PPy@Alg/Qui/CoFeNPs (curva b) e Alg/Qui/CoFeNPs (curva c). No caso das partículas magnéticas, é possível observar a banda característica da vibração metal-oxigênio (M – O), presente em 584 cm^{-1} para a curva (a), e em 597 cm^{-1} para as curvas (b) e (c) (Aliyan *et al.*, 2017; Rana, Philip e Raj, 2010; Shahjuee *et al.*, 2017). No que diz respeito à composição química dos polímeros alginato e quitosana, vale ressaltar que muitas bandas de absorção no IV serão simultâneas, ocasionando a sobreposição das mesmas e dificultando a diferenciação entre os polímeros. No espectro do compósito PPy@Alg/Qui/CoFeNPs foram identificadas as seguintes bandas: 3414 cm^{-1} , atribuída ao estiramento vibracional do grupo (– OH); 2922 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} , que podem ser atribuídas aos estiramentos simétrico e antissimétrico dos grupos (– CH₂ –) presentes na estrutura do alginato, polipirrol e quitosana; 1624 cm^{-1} , que pertence à vibração do grupo C = O presentes no alginato e na quitosana; 1554 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos C = C nos anéis do pirrol; 1415 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento simétrico C – OH; enquanto que as bandas em 1097

cm^{-1} e 1029 cm^{-1} são características do modo vibracional OC – OH (Chávez-Guajardo *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2010, 2009). Ainda no espectro b, é possível encontrar as bandas em 1213 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento vibracional C – N, 1170 cm^{-1} , atribuída ao modo vibracional C – H no plano, enquanto que as bandas 881 cm^{-1} e 810 cm^{-1} correspondem ao modo vibracional C – H fora do plano, e a banda em 921 cm^{-1} , à deformação no plano C – H (Li *et al.*, 2008; Medina-Llamas *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2013). No caso do Alg/Qui/CoFeNPs, as principais bandas são encontradas em: 3437 cm^{-1} , referente ao estiramento vibracional do grupo (– OH); 1606 cm^{-1} , que pertence à vibração do grupo C = O; 1415 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento simétrico C – OH; 1097 e 1029 cm^{-1} , características do modo vibracional OC – OH; 941 cm^{-1} , associada à deformação C – H no plano e em 881 e 821 cm^{-1} , que correspondem ao modo vibracional C – H fora do plano. O deslocamento de algumas bandas pode ser associado as interações entre as partículas e o PPy na matriz polimérica de alginato e quitosana.

Figura 29 – Espectros de FTIR das CoFe_2O_4 NPs (a), NCM Alg/Qui/CoFeNPs (b) e NCM PPy@Alg/Qui/CoFeNPs (c).

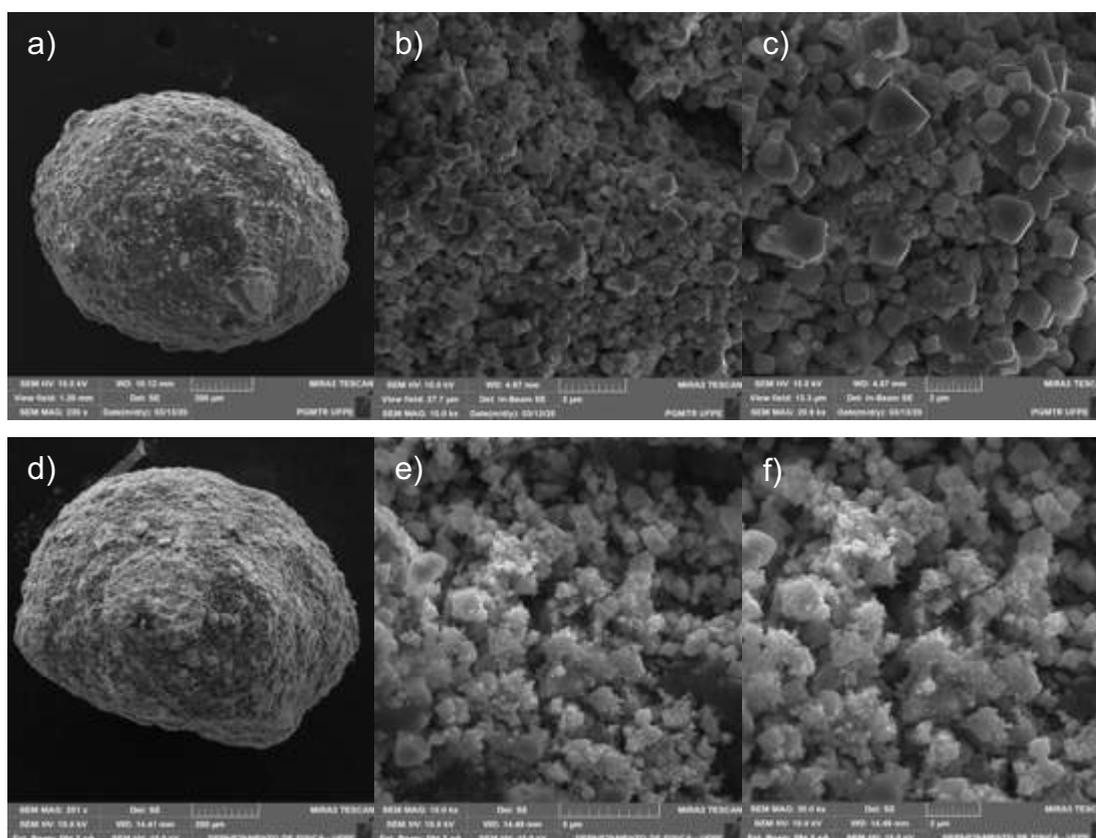


3.3.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de MEV foi utilizada para a investigação das características morfológicas dos compostos Alg/Qui/CoFeNPs e PPy@Alg/Chi/CoFeNPs, assim como das mudanças superficiais associadas à incorporação do PPy. Na micrografia da Fig. 30 a), pode ser observada uma morfologia quase esférica para o NCM Alg/Qui/CoFeNPs, com um diâmetro médio de $(0,9 \pm 0,1) \text{ cm}$, aproximadamente, e uma superfície rugosa e não-uniforme. Com o aumento da magnificação (Figs. 30 b e 30 c), é possível observar que o composto apresenta uma estrutura

octaédrica, com uma porosidade que pode estar associada a interação entre a matriz de alginato e quitosana com os íons de cálcio, que levam a formação de ligações cruzadas por um processo chamado de gelificação ionotrópica (Finotelli *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2010). Nas micrografias do compósito PPy@Alg/Chi/CoFeNPs (Fig. 30 d), pode ser observada a mesma morfologia quase esférica, com um diâmetro médio de $(1,2 \pm 0,1)$ cm. No entanto, é possível observar que há uma modificação na superfície do compósito após a incorporação do PPy. Nas Figs. 30 e) e 30 f), pelo aumento da magnificação podem ser novamente observadas as estruturas octaédricas, mas agora revestidas com nanoestruturas de aspecto granular, que se assemelham à morfologia do PPy (Chougule *et al.*, 2011); isso demonstra que o método de polimerização empregado foi de fato eficaz para a modificação da superfície.

Figura 30 – Micrografias dos compostos Alg/Qui/CoFeNPs (a, b, c) e PPy@Alg/Chi/CoFeNPs (d, e, f).



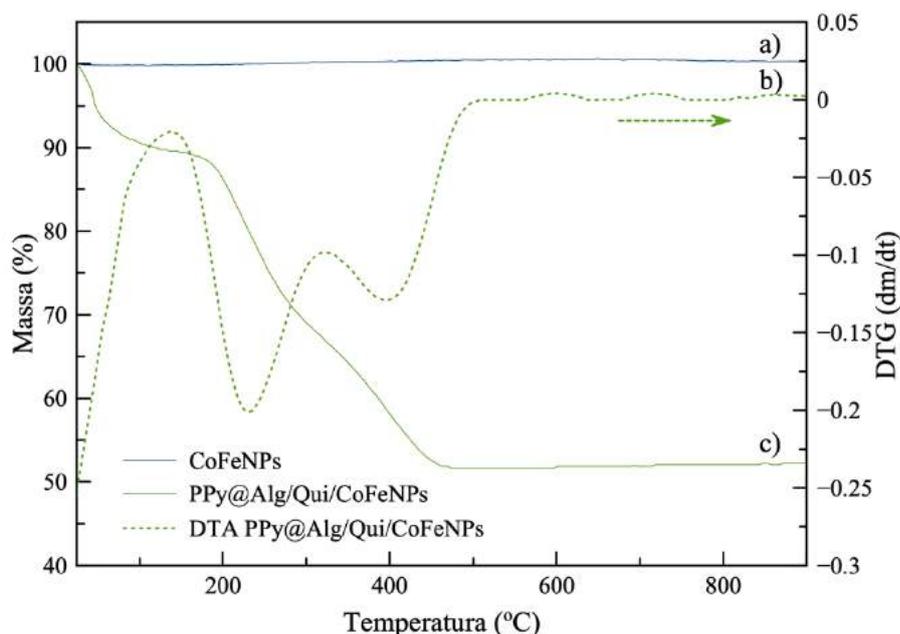
3.3.1.3 Análises Termogravimétricas

Na Fig. 31, apresentamos os resultados da análise TGA para as nanopartículas magnéticas (curva a) e o NCM PPy@Alg/Chi/CoFeNPs (curva b). Na curva a, observamos que não há perda de massa, um comportamento que se deve à eliminação da presença de água e outros componentes da superfície e estrutura das partículas magnéticas pelo tratamento térmico a 700 °C, previamente realizado (Briceño *et al.*, 2012). Já na curva b, pode-se observar a

presença de dois estágios de perda de massa: um primeiro, na faixa entre 25 e 130 °C, que pode ser atribuído à evaporação das moléculas de água, e outro, na faixa de 150 a 500 °C, devido à perda da fase orgânica presente no compósito.

Para uma melhor análise dos dados, realizamos análises termogravimétricas diferenciais para o compósito (curva c). Nessa curva, podem ser observados dois picos correspondentes a dois eventos distintos de degradação, em 232 °C e 394 °C. Esses picos podem ser atribuídos à inserção dos íons de cálcio (Ca^{+2}), que levaria à formação de diferentes estruturas (Hecht e Srebnik, 2016). Parte da matriz de alginato e quitosana pode interagir com os íons Ca^{+2} , formando ligações cruzadas, enquanto outra parte não, ocasionando assim a ocorrência de estruturas com estabilidade térmica distintas, essa hipótese é reforçada uma vez que na literatura apenas um pico em torno de 250 °C é associado a degradação do polímero alginato. Deve ser observado que, além de parte da matriz polimérica de alginato e quitosana não ter interagido fortemente com os íons, temos a presença das cadeias de polipirrol aderidas ao NCM, que apresenta uma degradação da cadeia do polipirrol que inicia em 200 °C (Omastova *et al.*, 2004; Yussuf *et al.*, 2018).

Figura 31 – Curvas de TGA para as NPs CoFe_2O_4 (a) e o compósito $\text{PPy@Alg/Qui/CoFeNPs}$ (b) e sua derivada primeira - DTG (c).

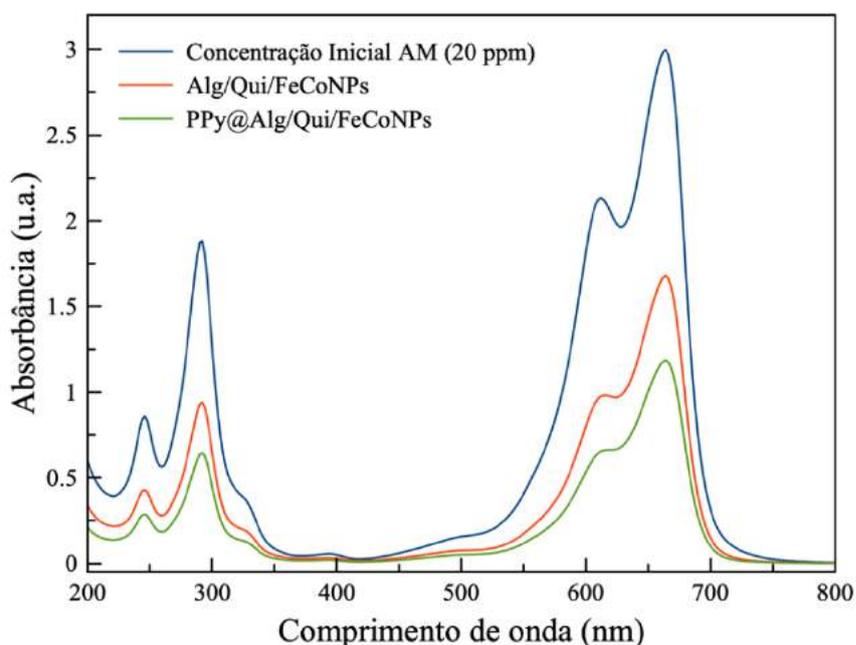


3.3.2 Experimentos de adsorção

Com o intuito de melhor analisar a capacidade dos compósitos Alg/Chi/CoFeNPs e $\text{PPy@Alg/Qui/CoFeNPs}$ de absorverem o corante AM, uma primeira prova de conceito foi

realizada. Para isso, uma pérola de cada composto foi inserida em um recipiente com tampa, que continha 20 mL de uma solução aquosa de AM, com concentração inicial de 20 mg L^{-1} , e a interação foi deixada ocorrer por 24h, sob agitação orbital de 300 rpm. Após esse intervalo de tempo, as soluções iniciais e finais foram analisadas por espectroscopia UV-Vis (Fig. 32). Nesses espectros, é possível observar a ocorrência de uma diminuição de 54 % nas bandas de adsorção do AM após a interação com o NCM Alg/Chi/CoFeNPs, e de 62 % após interação com NCM PPy@Alg/Qui/CoFeNPs (com base na absorbância do azul de metileno em 664 nm, que é o comprimento de onda da máxima absorção do corante, $\lambda_{\text{máx}}$). Desse modo, podemos concluir que, muito embora ocorra a adsorção para ambos os compostos, ela é mais significativa para aquele contendo o PPy em sua composição. Diante disso, neste trabalho o NCM PPy@Alg/Qui/CoFeNPs foi usado para o estudo de remoção do corante AM em meios aquosos.

Figura 32 – Espectros de UV-Vis da solução de AM (curva a) após 24 h de interação com os NCM Alg/Qui/CoFeNPs (b) e PPy@Alg/Chi/CoFeNPs (c).



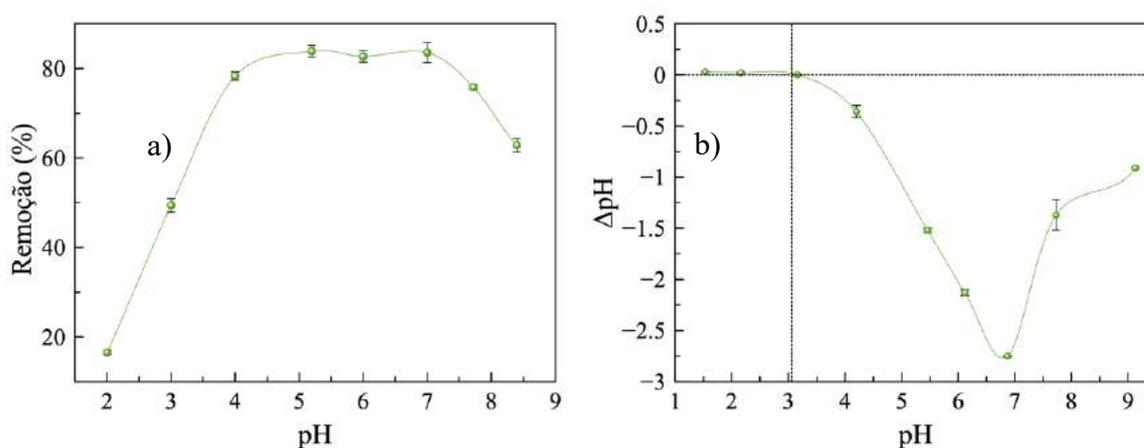
3.3.2.1 Efeito do pH e mecanismo de adsorção

O pH de um meio pode afetar a carga superficial tanto do adsorvente quanto do adsorvato. Na busca de melhor entender o mecanismo de adsorção do AM pelo composto, realizamos análises da eficiência de adsorção em função do pH do meio de modo a encontrar o valor de pH mais favorável.

O efeito do pH sobre a adsorção do corante AM pelo compósito PPy@Alg/Qui/FeCoNPs é mostrado na Fig. 33 a). Enquanto uma baixa eficiência de (16,5 %) de remoção é observada para o pH 2,0, um aumento substancial da adsorção passa a ocorrer com a diminuição da acidez, atingindo um patamar relativamente constante de aproximadamente 80% para a faixa de pH entre 4 e 7. Para valores de pH mais alcalinos, ocorre uma diminuição na eficiência de adsorção do corante, juntamente com a perda da estabilidade estrutural das amostras (que se degradam para pHs acima de 9.0). Isso pode estar associado à quebra das ligações cruzadas entre a matriz de alginato e quitosana e os íons de cálcio, uma vez que a adição de grupos OH⁻ ao meio causa ocorre a degradação das cadeias do alginato (King, 1983).

Realizamos também estudos sobre a carga superficial do NCM PPy@Alg/Qui/FeCoNPs, para estimar seu ponto de carga zero (pH_{pcz}, o valor do pH em que a superfície do material se torna neutra). Na Fig. 33 b), é possível observar que o pH_{pcz} do compósito é 3,2. Assim, para os valores de pH acima [abaixo] desse valor, a carga superficial do NCM deve ser de caráter negativo [positivo] (Haddad, El *et al.*, 2013). Esse comportamento se deve ao fato de que em pH ácidos ocorre a protonação dos dois polímeros (quitosana e polipirrol), que passam a apresentar uma carga positiva. No entanto, como visto no Capítulo 1, as nanopartículas de ferrita de cobalto tratadas possuem carga superficial negativa, o que pode compensar a carga positiva dos polímeros, de modo a que, na combinação dos dois fatores, resultar na neutralidade quando da formação do NCM (como observado no gráfico de pH_{pcz}).

Figura 33 – Efeito da variação do pH sobre a eficiência de adsorção de AM (a) e determinação do ponto zero de carga (b) do compósito PPy@Alg/Qui/FeCoNPs.



Com base nesses resultados, o comportamento da adsorção do corante pelo compósito testado pode ser mais bem compreendido. O AM apresenta um pKa igual a 3,8 (He *et al.*, 2013), ou seja, para valores de pH maiores que esse as espécies catiônicas são predominantes na

estrutura do AM, tornando-o carregado positivamente. Como já mencionado, a adsorção é menor para pHs ácidos (1,0 – 3,0), o que pode ser atribuído à neutralidade de ambas as espécies (isto é, o adsorbato e o adsorvente); isso sugere que a adsorção é limitada, por ocorrer via interações hidrofóbica, empilhamento $\pi-\pi$ e a formação de ligações de hidrogênio. No entanto, à medida que o pH é aumentado, a superfície do compósito passa a exibir uma carga negativa; como o corante apresenta uma carga positiva, o mecanismo de ligação entre as moléculas de AM e o NCM deverá se dar preferencialmente por interações eletrostáticas. Na Tabela 5 estão apresentados os valores estimados da superfície de carga, tanto do AM quanto do compósito, bem como as possíveis interações existentes entre eles. Assim, podemos concluir que a adsorção do AM pelo NCM ocorre por vários mecanismos, como interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, e a formação de ligações de hidrogênio.

Tabela 5 – Valores estimados da superfície de carga do AM pelo NCM PPy@Alg/Qui/FeCoNPs sob variação do pH.

pH	AM	PPy@Alg/Qui/ FeCoNPs	Interações
< 3,8	Neutro	Neutro	Hidrofóbicas
> 3,8	Carregado positivamente	Carregado negativamente	Eletrostáticas

Uma vez que o pH ótimo para a adsorção de moléculas de AM pelo NCM PPy@Alg/Qui/FeCoNPs foi determinado como sendo igual a 6,0, esse foi o valor de pH adotado para todos os estudos subsequentes. O fato da eficiência de remoção se manter constante dentro da faixa de pH (4 – 7) merece ser destacado, uma vez que isso possibilita o tratamento de efluentes sem a necessidade na modificação do pH do meio.

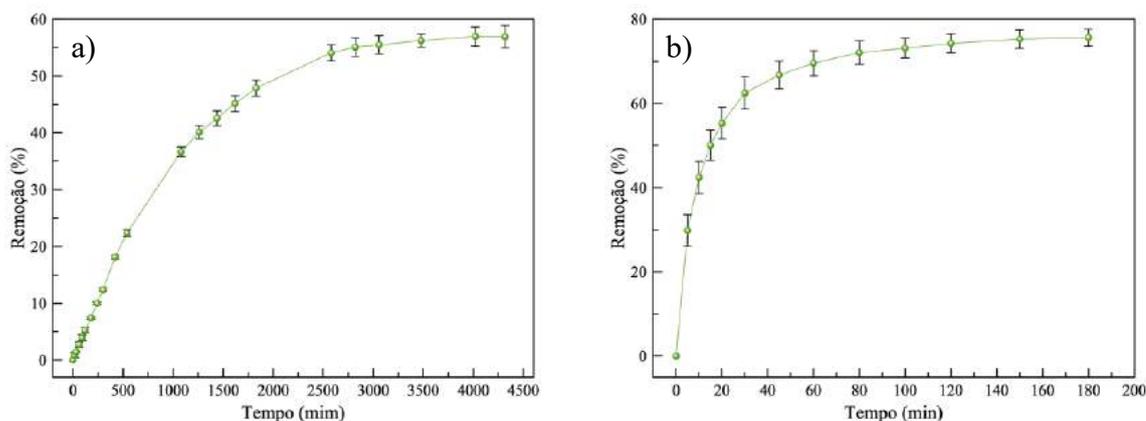
3.3.2.2 Efeito do tempo de interação e da concentração inicial de AM

O estudo dos efeitos do tempo de interação sobre a capacidade de adsorção da pérola do NCM PPy@Alg/Qui/FeCoNPs, a ser denominada a partir de agora de PNCM-PPy, foi conduzido a temperatura ambiente, para um volume de 20 mL e com o pH natural da solução, na concentração inicial de 25 mg L⁻¹. Na Fig. 34 a) é mostrada a porcentagem de remoção (%) em função do tempo. Como pode ser observado, a remoção é um processo lento, que ocorre de maneira gradual até aproximadamente 2500 min. A partir de então, a mudança na eficiência de remoção de AM por unidade de tempo se torna menor, com o sistema alcançando o equilíbrio em 4000 min (aproximadamente 3 dias), o tempo de saturação que foi adotado para os

experimentos posteriores. Tal comportamento pode ser racionalizado ao se supor que ao longo do tempo os sítios de absorção disponíveis no compósito vão sendo gradualmente ocupados como resultado da interação com as moléculas de AM dispersas na solução.

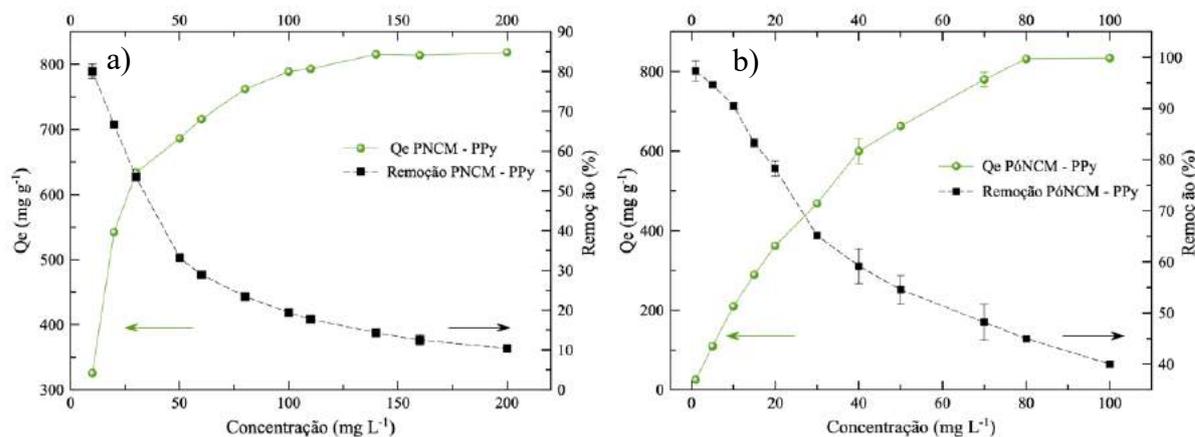
Em virtude do elevado tempo necessário para que ocorresse a saturação da amostra PNCM-PPy, recorreremos então à pulverização da pérola, para reduzir a pó a amostra original, obtendo assim um novo tipo de amostra, denominada de PóNCM – PPy. Com isso, há um aumento a área superficial, facilitando assim uma maior interação entre o compósito e as moléculas de AM. Na Fig. 34 b) é mostrado como a remoção do corante se dá como função do tempo de interação com o PóNCM – PPy, para um processo em que foram adotados os mesmos parâmetros que os descritos na Seção 2.2.3.6. Como pode ser observado, e diferentemente do mostrado na Fig. 34 a), o processo de remoção agora foi rápido. Ele ocorre principalmente nos primeiros 80 min do experimento, apresentando uma taxa de remoção mais lenta após isso (como revelado pela inclinação da curva), com o equilíbrio sendo atingido a partir de 120 min.

Figura 34 – Efeito do tempo de interação na eficiência de remoção de AM pelo compósito PNCM-PPy (a) e PóNCM-PPy.



Uma vez determinado o tempo de saturação, realizamos experimentos em que eram variadas as concentrações iniciais do corante. Na Fig. 35 são mostradas a eficiência (%) e a capacidade de adsorção q_e (mg g^{-1}) em função de diferentes concentrações iniciais do corante, para os compósitos PNCM-PPy e PóNCM-PPy. Como pode ser visto, conforme a concentração inicial aumenta, embora ocorra um decréscimo na eficiência da remoção, se torna maior a capacidade de adsorção das amostras PNCM-PPy e PóNCM-PPy. Esse aumento da capacidade de adsorção pode ser atribuído ao fato de que a força motriz de transferência de massa entre a fase aquosa e a fase sólida é maior quando maiores concentrações do corante são usadas (Ansari *et al.*, 2015).

Figura 35 – Efeito da concentração inicial de AM sobre (■) a quantidade percentual de remoção e (◆) na q_e do nanocompósito magnético.



3.3.2.3 Cinética de adsorção

Com o intuito de compreender o mecanismo dominante na adsorção do AM pelos compósitos utilizados, realizamos análises da cinética pelo ajuste dos dados experimentais a diferentes modelos teóricos (pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Morris-Weber), conforme descrito previamente na Seção 1.4. Nas Figs. 36 – 39 são mostrados os ajustes dos modelos citados acima aos dados obtidos para os compósitos PNCM-PPy e PóNCM-PPy. Pode-se observar que o modelo de Morris-Weber não se ajusta a nenhum dos dados experimentais, o que nos levou a descartar a hipótese de que o mecanismo de adsorção ocorresse por difusão intrapartícula em qualquer um dos dois sistemas. Para a amostra PNCM-PPy, o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de pseudo-primeira ordem, com uma capacidade máxima de adsorção q_e estimada como 640,3 mg g⁻¹, valor que deve ser comparado ao resultado experimental de 616,0 mg g⁻¹. Com isso, é possível concluir que para esse sistema a fisissorção é o mecanismo dominante do processo de adsorção, uma vez que esse modelo considera que a adsorção ocorre através de forças eletrostáticas entre adsorvente e o adsorvato, com sua velocidade sendo proporcional ao número de sítios livres (Mimura *et al.*, 2010).

Figura 36 – Ajuste dos modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem (linha contínua), pseudo-segunda ordem (linha tracejada) e Morris-Weber (linha pontilhada) junto aos dados experimentais de remoção de AM pelo compósito PNCM-PPy.

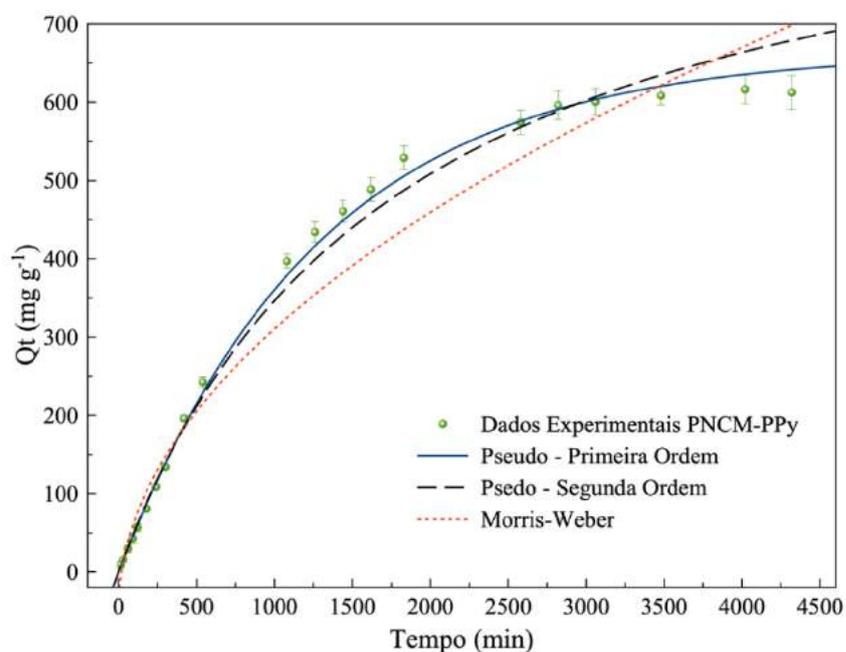
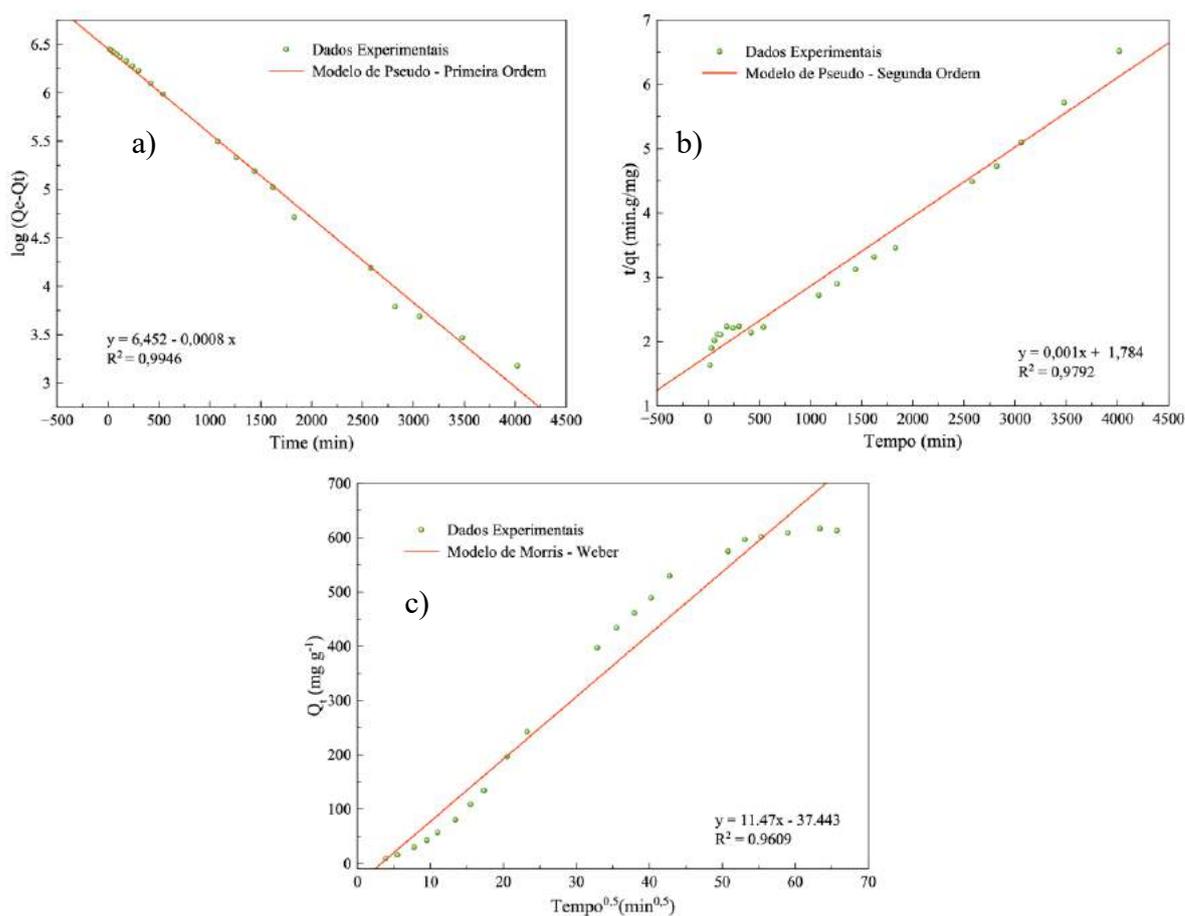


Figura 37 – Ajustes lineares dos dados experimentais de remoção de AM pela amostra PNCM-PPy com os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).



Já para a amostra PóNCM-PPy, o modelo que melhor descreveu a adsorção do corante foi o de pseudo-segunda ordem (com um coeficiente de correlação igual a 0,9999), para o qual a capacidade máxima de adsorção q_e foi calculada como $463,1 \text{ mg g}^{-1}$, para um valor experimental igual a $435,0 \text{ mg g}^{-1}$. Assim, pudemos concluir que o mecanismo de adsorção dominante deve ser o de quimisorção. Na Tabela 6 estão sumarizados os parâmetros cinéticos de adsorção calculados de acordo com os três modelos, bem como os respectivos valores do coeficiente de correlação (R^2).

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos para adsorção de AM pelas amostras PNCM-PPy e PóNCM-PPy.

	Pseudo-primeira ordem			Pseudo-segunda ordem			Morris-Weber		
	$q_{e, \text{ exp}}$ (mg/g)	k_1 (min^{-1})	$q_{e, \text{ calc}}$ (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.min)	$q_{e, \text{ calc}}$ (mg/g)	R^2	k_{id} (min^{-1})	R^2
PNCM-PPy	616,0	$3,8 \times 10^{-4}$	640,3	0,994	$9,4 \times 10^{-7}$	839,5	0,979	11,47	0,960
PóNCM-PPy	435,0	$2,8 \times 10^{-2}$	414,3	0,991	$1,8 \times 10^{-4}$	463,1	0,999	20,81	0,811

Figura 38 – Ajuste dos modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem (linha contínua), pseudo-segunda ordem (linha tracejada) e Morris-Weber (linha pontilhada) junto aos dados experimentais de remoção de AM pelo composto PóNCM-PPy.

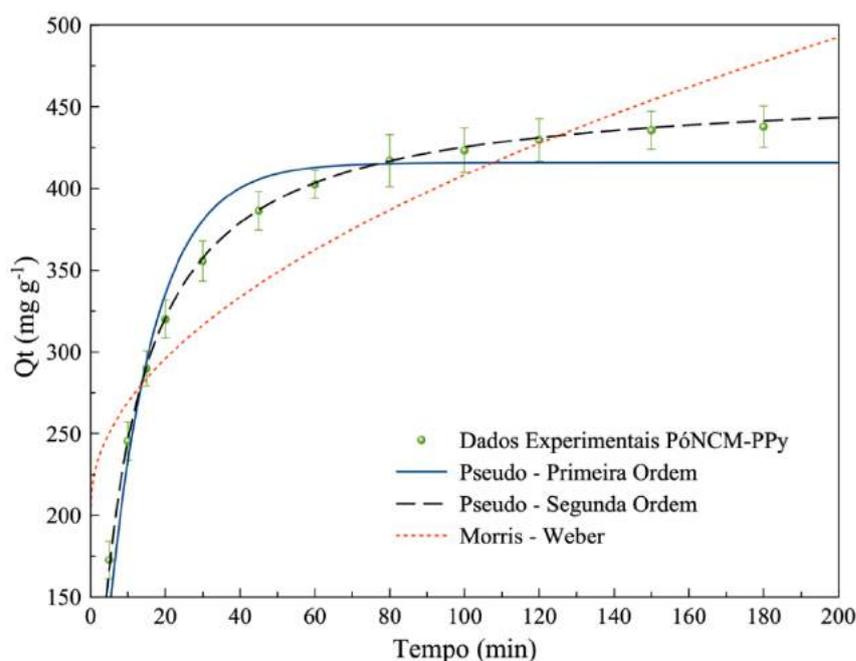
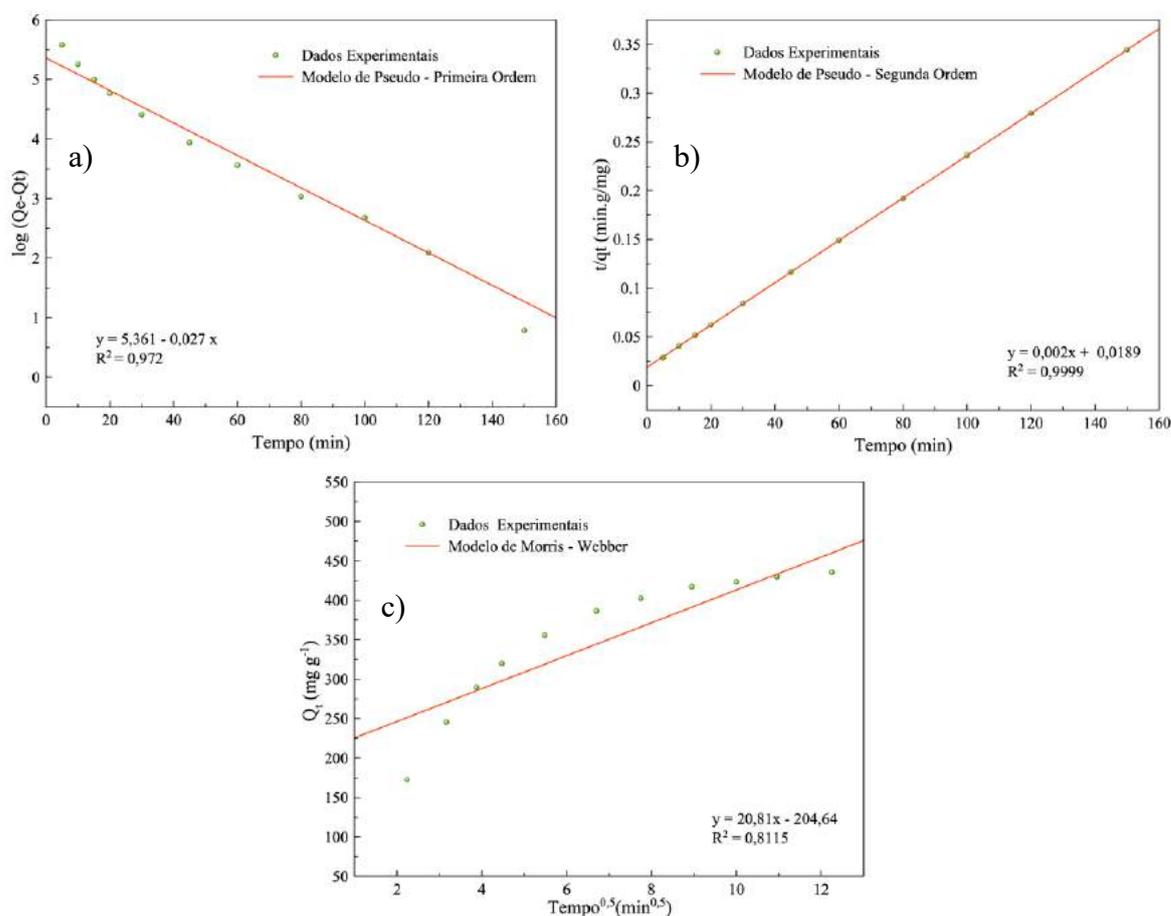


Figura 39 – Ajustes lineares dos dados experimentais de remoção de AM pela amostra PóNCM-PPy com os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).



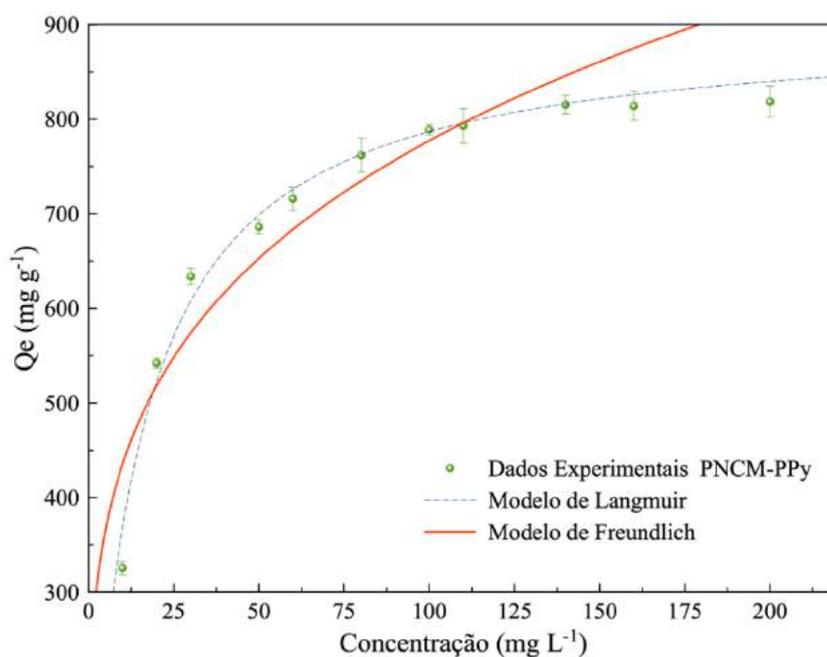
3.3.2.4 Isotermas de Adsorção

Os modelos de isotermas de adsorção não apenas descrevem a natureza das interações que ocorrem entre as moléculas de AM e os compósitos testados, mas também permitem uma estimativa da capacidade máxima da capacidade do adsorvente. Neste trabalho, será utilizado os modelos de Langmuir e Freundlich para ajustar os dados experimentais obtidos no equilíbrio.

Nas Figs. 40 e 42 são apresentados os ajustes desses modelos aos dados experimentais obtidos a temperatura ambiente e no equilíbrio da adsorção de AM pelos compósitos PNCM-PPy e PóNCM-PPy, respectivamente. Para a amostra PNCM-PPy, é possível observar pelos ajustes lineares (apresentados na Fig. 41) que o modelo de Langmuir descreve melhor o sistema, com um coeficiente de correlação de 0,999 e uma capacidade máxima de adsorção q_e calculada de $900,9 \text{ mg g}^{-1}$, um valor próximo daquele obtido experimentalmente $818,5 \text{ mg g}^{-1}$. O mesmo comportamento é observado para a amostra PóNCM-PPy, com o modelo de Langmuir apresentando um coeficiente de correlação de 0,989 e uma capacidade máxima de adsorção q_e calculada como 1280 mg g^{-1} , um valor acima daquele obtido experimentalmente (835 mg g^{-1}).

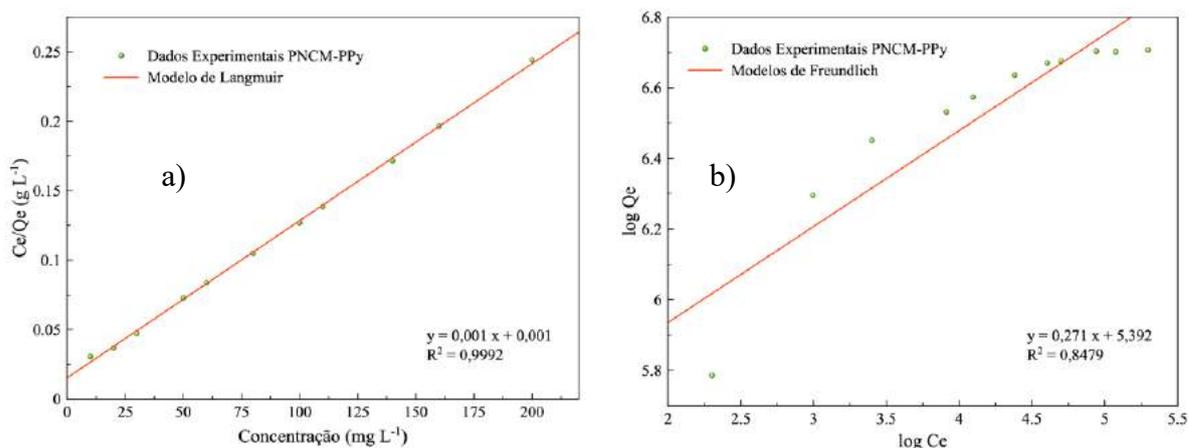
Esses resultados indicam que o processo de adsorção do AM pelos compósitos testados ocorre através da formação de monocamadas, compostas por um número finito de sítios energeticamente idênticos.

Figura 40 – Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha tracejada), e Freundlich (linha contínua) junto aos dados experimentais para a remoção de AM pelo compósito PNCM-PPy.



Nas Figs. 41 e 43 são apresentados os gráficos dos ajustes lineares dos dados experimentais aos modelos de isotermas estudados, para as amostras para os compósitos PNCM-PPy e PóNCM-PPy, respectivamente.

Figura 41 – Ajustes lineares dos modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados experimentais de adsorção de AM pela amostra PóNCM-PPy.



Os parâmetros de isotermas calculado usando os modelos propostos, juntamente com os coeficientes de correlação correspondentes estão apresentados de forma resumida na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros de isoterma de Langmuir e Freundlich para adsorção de AM pelas amostras PNCM-PPy e PóNCM-PPy.

	Langmuir				Freundlich		
	$q_{e, exp}$ (mg/g)	K_L (L/mg)	$q_{e, calc}$ (mg/g)	R^2	n	K_F (mg/g)	R^2
PNCM-PPy	818,5	0,069	900,3	0,999	3,974	243,4	0,847
PóNCM-PPy	835,0	0,020	1280,0	0,989	0,519	42,307	0,977

Figura 42 – Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha tracejada), e Freundlich (linha contínua) junto aos dados experimentais para a remoção de AM pelo compósito PóNCM-PPy.

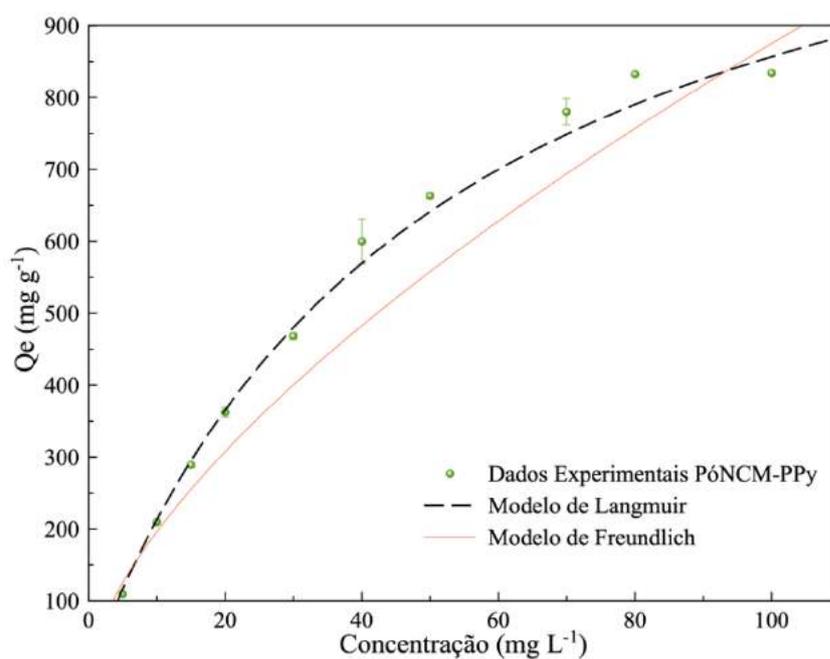
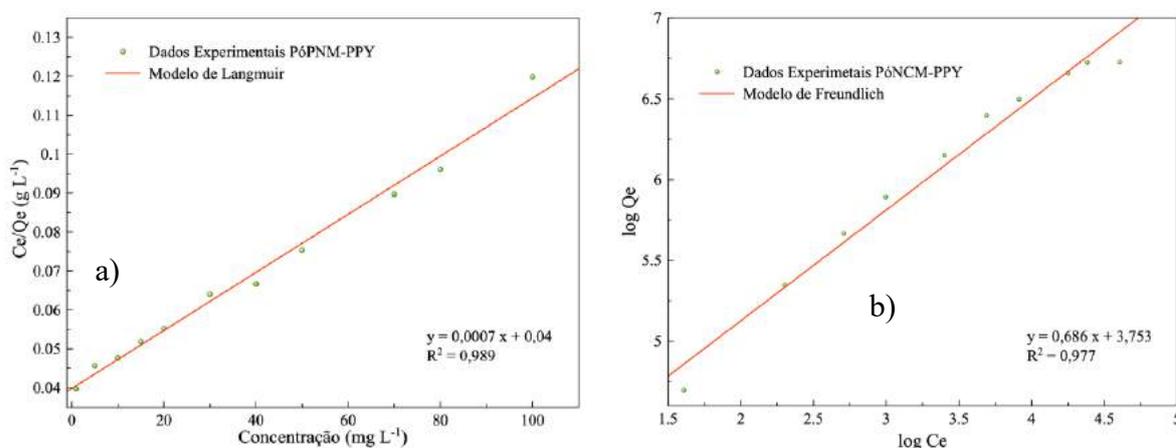


Figura 43 – Ajustes lineares dos modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados experimentais de adsorção de AM pela amostra PóNCM-PPy.



Ao compararmos o valor de q_e calculado com os reportados na literatura para outros adsorventes de AM (Tabela 8), pode-se verificar que tanto o compósito PNCM-PPY quanto o PóPNCM-PPY se apresentam como materiais promissores para uso em protocolos de remediação de água. É interessante ressaltar que a remoção do corante por esses compósitos magnéticos ocorre em um pH natural (neutro), o que simplifica a remoção de contaminantes. Além disso, a presença de do núcleo magnético nesses compósitos facilidade a captura e manuseio do contaminante. Quanto à capacidade de remoção, os compósitos apresentam um valor competitivo face os resultados disponíveis na literatura, como, por exemplo, os reportados por (Hassan, Abdel-Mohsen e Fouda, 2014) e (Zhao *et al.*, 2015). A amostra PóNCM-PPy tem a vantagem adicional de apresentar um tempo de equilíbrio inferior.

Tabela 8 – Capacidade de adsorção de AM em temperatura ambiente pelos compósitos PóNCM-PPY e PNCM-PPY em comparação com diferentes adsorventes reportados na literatura.

Adsorvente	pH	Capacidade de adsorção (mg/g)	Tempo de equilíbrio (min)	Refs.
Compósitos de alginato/óxido de grafeno	5,4	181,8	150	(Li <i>et al.</i> , 2013)
Compósitos de alginato/carvão ativado	7,5	800,0	360	(Hassan, Abdel-Mohsen e Fouda, 2014)
Compósitos de alginato/nanotubos de carbono	-	1189	1440	(Wang <i>et al.</i> , 2018)
Compósitos híbridos de alginato/nanotubos de halloysita	-	222	120	(Liu, L. <i>et al.</i> , 2012)
Fe ₃ O ₄ @PPy/RGO	6,0	270,3	20	(Bai <i>et al.</i> , 2015)
Nanomateriais magnéticos de Níquel/Carbono	-	175,2	40	(Gong <i>et al.</i> , 2013)
Carvão ativado à base de bambu	7,0	454,2	300	(Hameed, Din e Ahmad, 2007)
Fibras à base de β-ciclodextrina	9,0	826,4	250	(Zhao <i>et al.</i> , 2015)
Compósito de PPy/TiO ₂	-	273,2	30	(Li, Feng e Yan, 2013)
Óxido de grafeno modificado com Zeólito	-	82,1	300	(Huang <i>et al.</i> , 2019)
PNCM-PPy	6,0	818,5	2500	Este trabalho
PóNCM-PPy	6,0	835,0	80	Este trabalho

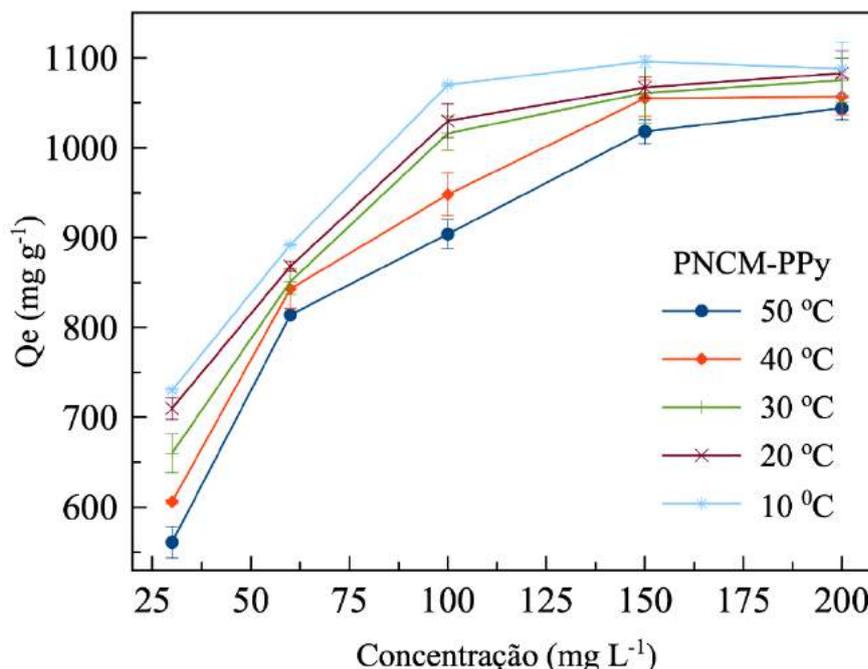
RGO: óxido de grafeno reduzido; **TiO₂**: dióxido de titânio;

3.3.2.5 Estudos termodinâmicos

Para avaliar o efeito da temperatura na capacidade de adsorção do AM pelos compósitos PNCM-PPy e PóNCM-PPy, foram obtidas isotermas de adsorção para diferentes temperaturas. Nas Figuras 44 e 45 é possível observar as curvas de adsorção para as temperaturas 50, 40, 30, 20 e 10 °C, para as amostras PNCM-PPy e PóNCM-PPy, respectivamente. Com comportamento semelhante, ambas as amostras aumentam sua capacidade de adsorção (q_e) ao diminuir a temperatura do sistema; assim, por exemplo, para a concentração de 200 mg L⁻¹, a capacidade máxima passa de 1044 mg g⁻¹, à temperatura de 50 °C, para 1088 mg g⁻¹, à temperatura de 10 °C, para a amostra PNCM-PPy. Para a mesma concentração da amostra PóNCM-PPy, o aumento se torna mais significativo, pois a capacidade máxima passa de 810 mg g⁻¹, à temperatura de 50 °C, para 927 mg g⁻¹, à temperatura de 10 °C. Esse comportamento

indica que o processo de adsorção do corante pelos compósitos testados é de natureza exotérmica, ou seja, ocorre com liberação de calor.

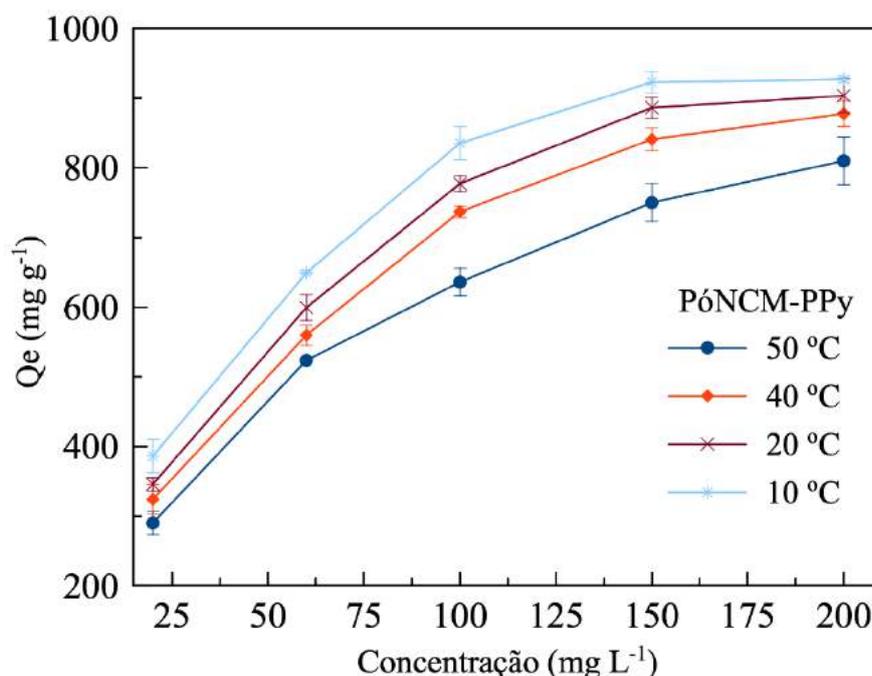
Figura 44 – Efeito da temperatura sobre a capacidade de remoção do compósito PNCM-PPy para diferentes concentrações iniciais de AM.



Para entender melhor esse processo, parâmetros termodinâmicos, como energia livre de Gibbs (ΔG_{ads}), entropia (ΔS_{ads}) e entalpia (ΔH_{ads}), foram obtidos a partir das isotermas de adsorção ao correlacionar com a constante de adsorção K . Conforme estudado na Seção anterior, o modelo de isoterma de Langmuir foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais obtidos. Assim, nesta Seção serão estudados os parâmetros termodinâmicos determinados a partir das isotermas de Langmuir.

Utilizando a Eq. (2.3), definida na Seção 2.2.2.7, é possível obter a constante de Langmuir (K_L), e a partir dela determinar os parâmetros através das Eqs. (2.13), (2.14) e (2.15), definidas na Seção 2.2.2.9.

Figura 45 – Efeito da temperatura sobre a capacidade de remoção do compósito PóNCM-PPy para diferentes concentrações iniciais de AM.



Um método simples de se obter a constante de Langmuir é através da análise do gráfico de C_e/q_e em função de C_e , que fornecerá os parâmetros $q_{\text{máx}}$ e K_{ads} , a partir dos coeficientes angular e linear, respectivamente. Por métodos gráficos, a partir do valor estimado para K_{ads} é possível determinar os parâmetros termodinâmicos (ΔG_{ads} , ΔH_{ads} e ΔS_{ads}), através da equação de Van't Hoff (Eq. 2.14). Isso permite a estimativa direta dos parâmetros termodinâmicos ΔS_{ads} e ΔH_{ads} a partir dos coeficientes linear e angular do gráfico de $\ln(K_{\text{ads}})$ versus T^{-1} . Na Fig. 46 é mostrado esse ajuste linear para as amostras avaliadas.

Na Tabela 9 são apresentados de forma resumida os valores dos parâmetros termodinâmicos, obtidos a partir das isotermas de adsorção do corante. Como pode ser visto, os valores negativos da variação da energia livre de Gibbs (ΔG_{ads}) e da variação da entalpia (ΔH_{ads}) para as diferentes amostras estudadas indicam a natureza espontânea e exotérmica do processo. Além disso, os valores de -15,419 e -13,251 kJ/mol para os compósitos PNCM-PPy e PóNCM-PPy, respectivamente, indicam que a natureza da adsorção de AM pelos compósitos testados é uma fisissorção (Vidal *et al.*, 2014). Por sua vez, os valores positivos da variação da entropia (ΔS_{ads}) mostram um aumento da aleatoriedade na superfície do sólido/solução e a afinidade dos compósitos com o corante AM (Hassan, Abdel-Mohsen e Fouda, 2014).

Figura 46 – Ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir em função da temperatura de adsorção para as amostras PNCM-PPy (a) e PóNCM-PPy (b).

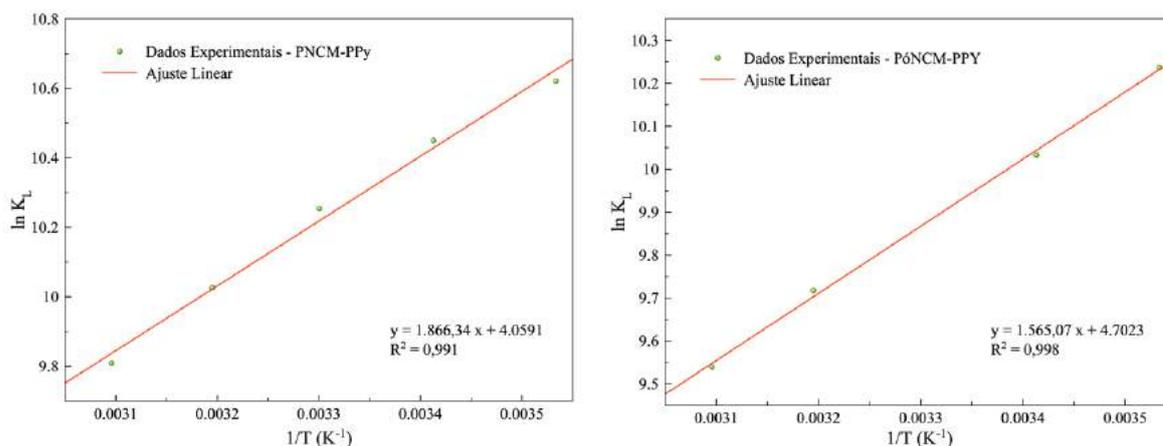


Tabela 9 – Parâmetros termodinâmicos para adsorção de AM pelas amostras
a)PNCM-PPy e PóNCM-PPy. b)

	T (°C)	ΔG_{ads} (kJ/mol)	ΔH_{ads} (kJ/mol)	ΔS_{ads} (J/mol.K)
PNCM-PPy	10	-24,997		
	20	-25,444		
	30	-25,818	-15,419	129,195
	40	-26,078		
	50	-26,328		
PóNCM-PPy	10	-24,074		
	20	-24,204		
	40	-25,274	-13,251	120,278
	50	-25,604		

3.4 CONCLUSÕES

No presente capítulo, apresentamos a metodologia para a obtenção do compósito magnético híbrido PPY@Alg/Qui/CoFeNPs através da utilização da técnica de gelificação ionotrópica. Em todos os testes realizados, o compósito exibiu uma excelente performance para remoção de moléculas de AM dissolvidas em meio aquoso. As caracterizações utilizadas mostraram que, através da modificação da superfície do compósito com a adição do PPy, é possível melhorar sua capacidade de adsorção do corante.

Os resultados de adsorção mostraram que a eficiência do compósito para a remoção de AM ocorre de forma mais satisfatória quando o valor do pH do meio está na faixa entre 4,5 e

7,0; esse fato contribui, por exemplo, para uma maior aplicabilidade do compósito para a remoção de contaminantes têxtil em efluentes, uma vez que não se faz necessária a acidificação ou alcalinização do meio; além disso, a presença do núcleo magnético nas amostras possibilita uma maior facilidade no manuseio das mesmas. Nossos dados experimentais de cinética revelaram a adsorção lenta para o compósito na sua forma pérola (PNCM-PPy); no entanto, aumentando a área superficial do compósito através da pulverização do mesmo, foi possível observar uma mudança no comportamento, com a redução do tempo de equilíbrio de 4000 min para 80 min, para as amostras PNCM-PPy e PóNCM-PPy, respectivamente. Essa última característica se destaca como singular, uma vez que os adsorventes semelhantes à base de alginato encontrados na literatura apresentaram um maior tempo de equilíbrio.

Os modelos que melhor se adaptaram aos dados experimentais de cinética de adsorção foram os de pseudo-primeira ordem para a amostra PNCM-PPy, e de pseudo-segunda ordem para PóNCM-PPy. No entanto, para os dados de isotermas, ambas as amostras seguiram o modelo de Langmuir, indicando assim que o processo de adsorção ocorre através da formação de uma monocamada em um número finito de sítios. Além disso, os dados dos estudos termodinâmicos revelam que o processo de adsorção ocorre de forma espontânea e exotérmica, e é de natureza física (fisissorção), com a capacidade no equilíbrio aumentando com o decréscimo da temperatura de adsorção do sistema.

Na comparação com outros adsorventes de corantes previamente reportados na literatura, os compósitos PNCM-PPy e PóNCM-PPy se apresentam como materiais promissores devido a sua alta capacidade de adsorção, e baixo tempo de interação para o compósito na sua forma pó. Assim, através desses resultados, é razoável esperar que os compósitos possam vir a ser utilizados em sistemas para a remoção de corantes. Temos ainda como principais perspectivas a aplicação dos mesmos para a remoção de outros contaminantes e íons de metais pesados.

4 USO DO NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO (FERRITA DE COBALTO)/POLIPIRROL PARA A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os ácidos nucleicos são moléculas fundamentais para todos os organismos, por desempenharem papéis importantes na manutenção de processos vitais, como, por exemplo, a síntese das proteínas (pelo RNA) e a transmissão das informações genéticas (pelo DNA) (Hall, 2011). Na área da biologia molecular, é de grande importância a extração com bom rendimento de amostras de ácidos nucleicos de grande pureza, uma vez que a qualidade e a quantidade de DNA e/ou RNA obtidos são determinantes para a eficácia de diversos procedimentos, em áreas tão variadas quanto criminologia forense, indústria farmacêutica, sequenciamento genético, o diagnóstico molecular de doenças, epidemiologia, entre outras (KONNICK, YEUNG e WU, 2006; Manna, Dello *et al.*, 2016; Prüfer *et al.*, 2014; Rittich e Španová, 2013; Wink, 2011). No cenário atual (2020), em que o mundo enfrenta a pandemia COVID-19, é possível observar a contínua dificuldade dos países para a testagem em massa da população. Isso se deve a que, usualmente, as técnicas/protocolos utilizados nas várias etapas da produção dos testes de diagnósticos são custosos, laboriosos e demorados, além de exigirem pessoal qualificado e equipamentos especializados para sua implementação. Segundo documento disponibilizado pelo Ministério da Saúde (“Diretrizes Para Diagnóstico e Tratamento da COVID – 19”, o diagnóstico molecular para a doença da COVID-19 se baseia na coleta por swab de material da nasofaringe ou orofaringe do paciente, que é então submetido a protocolos de extração e purificação da fração de RNA; em seguida, caso presentes, as sequências de RNA do vírus são amplificadas pela técnica PCR (Polymerase Chain Reaction), o que permite sua identificação.

Inúmeros protocolos de extração e purificação de ácidos nucleicos foram desenvolvidos/usados ao longo dos anos, com o objetivo de reduzir etapas e custos do processo. Aqueles mais tradicionais são baseados em extração líquido-líquido e extração em fase sólida (Tan e Yiap, 2009). A extração em fase líquida, desenvolvida para o isolamento do ácido nucleico de interesse, geralmente envolve a realização de um grande número de etapas (como centrifugação, filtração e precipitação), além do uso de solventes orgânicos tóxicos. Os métodos de extração em fase sólida foram desenvolvidos como alternativa que permitisse contornar essas dificuldades e melhorar a qualidade do ácido nucleico extraído.

Na busca de metodologias mais eficientes, os protocolos em fase sólida vêm ganhando inúmeras variantes nos últimos anos, como o uso de técnicas de microfluídica, e de materiais como polímeros aniônicos, nanoestruturas, e partículas magnéticas, entre outras. Em especial,

o uso de nanopartículas magnéticas tem mostrado muitas vantagens, como a simplicidade na separação do complexo partícula/molécula, através do uso de um ímã, um baixo custo, e rapidez (Hou *et al.*, 2013). Essas vantagens fizeram com que diversos kits comerciais tenham sido introduzidos por várias empresas para a purificação de ácidos nucleicos, com base em protocolos de purificação magnética.

Nos últimos anos, o grupo de Polímeros não Convencionais (PNC) desenvolveu diferentes materiais, baseados em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e polímeros condutores, para a extração e purificação de DNA. Dentre eles, destaca-se os nanocompósitos magnéticos de γ -NPs/PEDOT, γ -NPs/PANI e γ -Fe₂O₃/Quitosana/PANI, que foram aplicados a sistema modelo (DNA de esperma de salmão) e amostras reais (sangue humano) (Maciel *et al.*, 2018; Medina-Llamas *et al.*, 2014; Silva, 2019). Além disso, vale ressaltar, o desenvolvimento dos protocolos de extração e purificação de DNA desenvolvido pelo grupo, os quais apresentaram competitividade com os métodos de extração convencionais e até mesmo com os kits comerciais disponíveis no mercado.

Nessa perspectiva, a nossa proposta aqui foi a de realizar a síntese e caracterização de um novo nanocompósito magnético composto por nanopartículas de ferrita de cobalto, recobertas com o polímero condutor polipirrol, e seu uso como um adsorvente de fase sólida para a purificação de DNA extraído de amostras reais. A modificação de superfície das partículas tem por objetivo o aumento da afinidade com a biomolécula-alvo, no caso, os ácidos nucleicos. A expectativa seria de que esse nanocompósito viesse a ser usado não apenas na simples manipulação e separação de ácidos nucleicos, mas também possibilitasse o desenvolvimento de protocolos mais simples e eficientes para a purificação de DNA.

4.1.1 Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos são uma classe de biopolímeros, formados por nucleotídeos (monômeros) que se repetem ao longo da molécula. Eles são responsáveis por funções importantes nos seres vivos, devido a sua capacidade de armazenar e transmitir informações genéticas e de controlar as atividades celulares pela regulação da síntese de proteínas (Alberts, 2019).

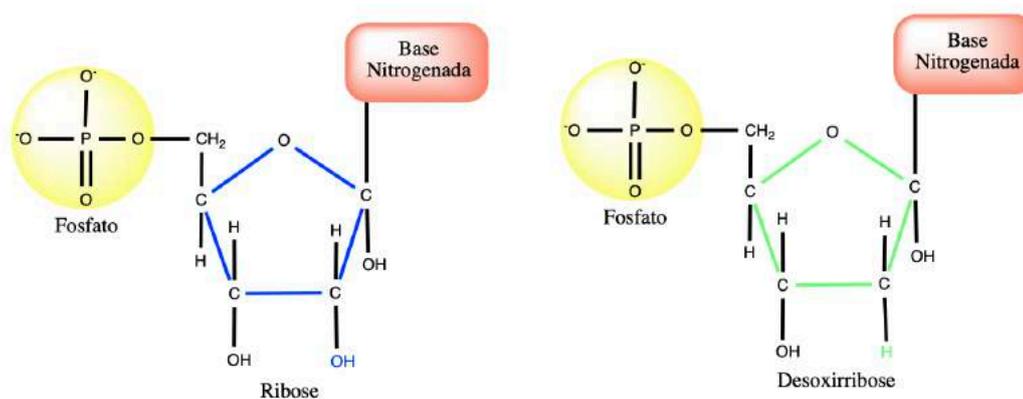
O nome ácido nucleico se origina das substâncias ácidas encontradas no núcleo celular, sendo o ácido desoxirribonucleico (DNA – *Deoxyribonucleic Acid*) e o ácido ribonucleico (RNA – *Ribonucleic Acid*), os grandes representantes desse grupo (Nelson e Cox, 2013). O DNA, que é responsável por carregar e transmitir informações genéticas nele codificadas, pode ser encontrado no núcleo das células, para o caso das células eucariontes (em animais, plantas, fungos e protozoário), ou no citoplasma, para o caso das células de procariontes (bactérias)

(Calladine, 2004; Fitzgerald, 2003). Já o RNA, que é responsável por transportar as informações contidas no DNA para o citoplasma, onde os ribossomos se ligam ao RNA e codificam as proteínas, é geralmente encontrado no citoplasma (Brown, LeMay e Bursten, 2014).

Os nucleotídeos, as unidades básicas dos ácidos nucleicos, são moléculas compostas pela união de três componentes, um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada (Fig. 47). Os açúcares encontrados nos ácidos nucleicos podem ser de dois tipos, a ribose, para o RNA, e a desoxirribose, para o DNA, que se diferenciam pela presença/ausência do grupo hidroxila, conforme também mostrado na Fig. 47.

As bases nitrogenadas são moléculas aromáticas e heterocíclicas, que podem ser classificadas de acordo com o número de anéis aromáticos; aquelas que possuem dois anéis, denominadas de purinas (como as bases adenina e guanina), e aquelas que apresentam um único anel, chamadas de pirimidinas (as bases citosina, timina e uracila) (Alberts, 2019; Sinden, 1994). As bases nitrogenadas que compõem a estrutura do DNA [RNA] são a adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) [adenina, citosina, guanina e a uracila (U)].

Figura 47 – Composição dos nucleotídeos.



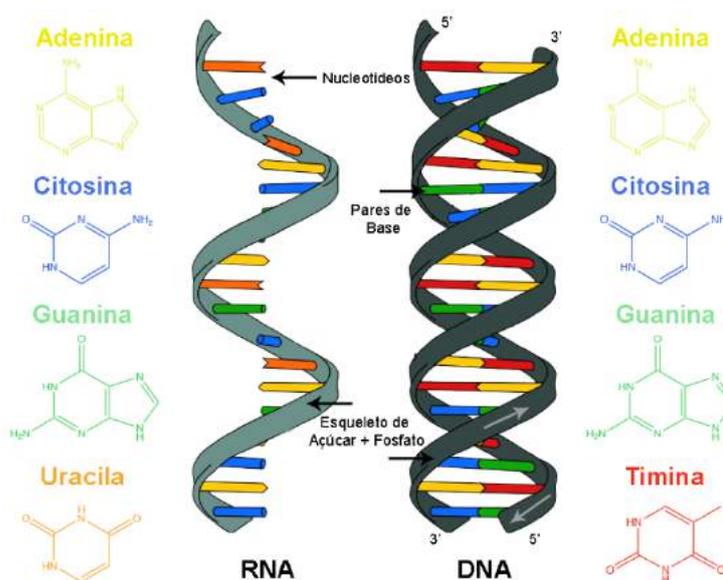
Fonte: Autoria própria (2020).

A junção dos nucleotídeos para a formação da estrutura DNA e RNA é feita pela ligação covalente fosfodiéster, que ocorre entre os açúcares e os grupos fosfatos, conectados entre o carbono 5' e 3' dos açúcares adjacentes (Watson, 2014); os grupos fosfatos ficam posicionados na extremidade da cadeia, e são seguidos dos açúcares e das bases nitrogenadas localizadas no interior, conforme pode ser observado na Fig. 48. Essas ligações fosfodiéster possuem a mesma orientação ao longo da cadeia, um fator que confere à molécula uma polaridade específica e propicia à cadeia duas terminações diferentes, denominadas de 5' e 3'. A terminação 5' é marcada pela presença do grupo fosfato, enquanto que a 3' por uma hidroxila, o que origina

polaridades opostas nas extremidades, as quais, por sua vez, são fundamentais, por exemplo, para a replicação, transcrição e recombinação do DNA (Alberts, 2019; Sinden, 1994).

Além da composição química, o DNA e o RNA também se diferenciam quanto à sua estrutura, com o DNA sendo composto pela união de duas cadeias polinucleotídicas de sentido opostos (uma direcionada de 5' para 3', a outra orientada de 3' para 5') que se conformam em uma hélice dupla, enquanto que o RNA se encontra na forma de uma única cadeia (Alberts, 2019; Watson, 2014). As duas cadeias do DNA se acoplam através de ligações de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas de cadeias opostas (Fig. 48). Essas ligações entre as bases nitrogenadas são específicas, de modo que a adenina só se liga à timina e a guanina à citosina, e vice-versa. Como resultado dessa especificidade, tem-se que para uma dada sequência de uma fita simples de DNA há sempre uma única sequência complementar, permitindo assim a duplicação e a transmissão das informações genéticas para novas cadeias de nucleotídeos (Alberts, 2019; Nelson e Cox, 2013).

Figura 48 – Estrutura dos ácidos nucleicos (RNA e DNA) e estrutura química das bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos.



Fonte: Autoria própria (2020).

4.1.2 Métodos de purificação de ácidos nucleicos

A extração de biomoléculas a partir de tecidos, fluidos, células ou vírus é muito importante para a biologia molecular, uma vez que a obtenção de amostras com qualidade é essencial para as mais variadas aplicações, como, por exemplo, a extração e purificação de ácidos nucleicos para estabelecer diagnósticos, testes de paternidade, clonagem,

sequenciamento, estudos fenótipos e mutagênicos, e terapias genéticas, entre outras (Berensmeier, 2006).

De uma forma geral, os métodos para a extração de ácidos nucleicos usados em laboratórios clínicos e de pesquisa incluem basicamente quatro etapas: i) a lise, caracterizada pelo rompimento da parede celular ou de tecidos para exposição dos ácidos nucleicos a partir do uso de soluções surfactantes (detergentes), como o SDS, Triton X-100, sais de guanidina, ureia e sais de isotiocianato; ii) a desnaturação de complexo proteicos e nucleases, através do uso de enzimas digestoras, como a proteinase K, a RNase ou DNase; iii) a separação do ácido nucleico de interesse, que pode ser realizada por meio de adsorção, separação de fase, precipitação, entre outras técnicas; e iv) a ressuspensão do ácido nucléico em uma solução tampão adequada (estabilizante).

A extração em fase líquida e em fase sólida são os métodos mais comumente utilizados para a extração (Berensmeier, 2006; Tan e Yiap, 2009). Os protocolos de extração em fase líquida, também denominados métodos convencionais, são baseados no uso de solventes orgânicos (como fenol e clorofórmio) ao longo das várias etapas do processo, além do uso de grandes concentrações de sais como agentes desnaturantes das proteínas. Para a separação dos ácidos nucleicos dos demais componentes presentes no sistema biológico, o método se utiliza da separação de fases entre o meio orgânico e aquoso, e das diferentes propriedades de desnaturação das moléculas envolvidas. A principal desvantagem desses métodos é o grande tempo envolvido (Berensmeier, 2006; Shan *et al.*, 2010), pois várias etapas (como centrifugação, filtração ou análise cromatográfica) devem ser executadas com o uso de uma variedade de equipamentos (Berensmeier, 2006; Shan *et al.*, 2010). Além disso, esses protocolos requerem grandes quantidades da amostra e de reagentes, que em muitos casos são tóxicos tanto para quem os manipula, quanto para o meio ambiente.

Já os métodos de fase sólida envolvem a utilização de um suporte sólido (como sílica, partículas de vidro, matriz trocadora de íons, nanopartículas magnéticas e entre outras), com a adsorção dos ácidos nucleicos dependendo de parâmetros físico-químicos, como o pH e a concentração de sal, do meio a que as amostras são submetidas (Tan e Yiap, 2009). Normalmente, esses protocolos são realizados em colunas de centrifugação, para que a ligação entre o ácido nucleico e o substrato seja favorecida. Na sequência, a fase sólida é lavada com um solvente normalmente um álcool (ou mistura de solventes), e o ácido nucleico é desorvido e eluído com um tampão de baixa força iônica (ou água). A vantagem desse método é a redução significativa das etapas, fazendo com que os ácidos nucleicos sejam purificados mais rapidamente e com um bom grau de pureza, além de geralmente necessitar de quantidades

menores de amostras e reagentes. Assim, ele é muito utilizado para a confecção de kits comerciais para a purificação de ácidos nucleicos (Gimenez, 2016; Tan e Yiap, 2009).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Na Tabela 10 estão listados os reagentes utilizados tanto na síntese e caracterização do nanocompósito de Ferrita de cobalto/Polipirrol, bem como em cada experimento realizado para avaliar a capacidade do compósito para a adsorção de ácidos nucleicos. Todos os reagentes usados eram de grau analítico ou molecular e foram utilizados como adquiridos. Em todos os experimentos foi usada água ultrapura obtida após tratamento em um sistema Synergy 185 (Millipore, EUA).

Tabela 10 – Lista de reagentes utilizados.

Reagente	Fabricante/Fornecedor
Tris Base	Promega, EUA
EDTA	Dinâmica, Brasil
Ácido Clorídrico	Química Moderna, Brasil
RNase A	Promega, EUA
DNA de esperma de salmão	Sigma-Aldrich, EUA
Hidróxido de Sódio	Química Moderna, Brasil
Acetato de Potássio	AppliChem, Alemanha
Ácido Acético	Dinâmica, Brasil
Glicina	Promega, EUA
Fosfato monossódico	Nuclear, Brasil
Fosfato dissódico	Nuclear, Brasil
Dodecil sulfato de sódio	Sigma-Aldrich, EUA
Metanol	Química Moderna, Brasil
Etanol	Química Nova, Brasil
TAE 40X	Promega, EUA
Agarose	Promega, EUA
Diamond	Promega, EUA
Syber green	Invitrogen, EUA
Blue/Orange Loading	Promega, EUA
Cloreto de Sódio	Química Nova, Brasil
Pirrol	Sigma-Aldrich, EUA
Cloreto de Ferro (III)	Dinâmica, Brasil
Cloreto de Cobalto (II)	Sigma-Aldrich, EUA

4.2.1.1 Síntese das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄ NPs)

As partículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄ NPs) foram produzidas pelo método de coprecipitação química, seguindo uma adaptação da técnica adotada por (Medina-Llamas *et al.*, 2014) que envolve um processo de várias etapas para a troca de um precursor de ferro por um precursor de cobalto. Primeiramente, em um balão de fundo redondo de 250 mL foram misturados 25 mL de uma solução de CoCl₂ (0,5 M) e 25 mL de uma solução de FeCl₃ (1 M). Após 5 min, foi adicionado 125 mL de uma solução aquosa de NH₄OH (50% v/v), sob vigorosa agitação. A solução final foi mantida a 100°C por 2h (ou seja, uma duração diferente daquela adotada para a síntese das ferritas descrita no Capítulo 1). O precipitado obtido foi então decantado com a ajuda de um imã, repetidamente lavado com água deionizada para reduzir a contaminação, e depois seco em um forno a 80 ° C por 48 h. O pó resultante foi macerado em um almofariz de ágata até homogeneidade.

4.2.1.2 Síntese do nanocompósito magnético de ferrita de cobalto e polipirrol (CoFe/PPy)

Para a obtenção do nanocompósito magnético (NCM) formado pelo recobrimento das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄ NPs) por uma camada de Polipirrol (PPy), denominadas CoFe/PPy, foi adotada a rota de polimerização em fase vapor do monômero de pirrol. Assim, 60 mg de CoFe₂O₄ NPs foram dispersados em 3 mL de uma solução 0,4 M de FeCl₃ em metanol. Em seguida, essa dispersão foi colocada em uma placa petri de vidro (60 mm de diâmetro) e deixadas secar por 180 min em temperatura ambiente (~ 23 °C). Após a completa evaporação do solvente, a placa foi transferida para um dessecador, e um volume de 300 µL do monômero de Pirrol foi colocado na parte inferior do dessecador. O sistema foi então fechado, e a reação de polimerização deixada ocorrer por um período de 24 h. Após esse tempo, a placa é retirada do dessecador e deixada secar por 24 h na capela, para que o polímero se fixe melhor na superfície das nanopartículas. Depois, o nanocompósito (CoFe/PPy) foi lavado uma vez com metanol (150 mL), e três vezes com água deionizada, sendo a cada lavagem o nanocompósito confinado magneticamente, com o descarte do sobrenadante obtido. Por fim, o nanocompósito obtido foi deixado secar por 12 h na estufa a 60 °C, para então ser pulverizado com ajuda de um almofariz. Na Fig. 49 são representadas de forma esquemática as principais etapas seguidas para a obtenção do CoFe/PPy.

Figura 49 – Representação esquemática das principais etapas da síntese por fase-vapor do nanocompósito CoFe/PPy.



Fonte: Autoria própria (2020).

4.2.2 Métodos de caracterização

4.2.2.1 Difração de Raios X

A técnica de difração de Raios X (XRD) foi utilizada com o intuito de obter informações sobre a estrutura cristalina, o parâmetro de rede, e o tamanho médio do cristalito das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4 NPs). Conforme descrito anteriormente (Capítulo 1), as medidas de difração de raios X deste trabalho foram realizadas utilizando o difratômetro SamarLab (Rigaku, Japão), equipado com uma fonte de raios X de Cu (de comprimento de onda λ igual 1,5406 Å), um equipamento multiusuário localizado no Departamento de Física da UFPE.

4.2.2.2 Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia por infravermelho é muito utilizada para a obtenção de informações sobre a composição química tanto das nanopartículas quanto dos nanocompósitos preparados. Conforme descrito no Capítulo 1, os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no intervalo de 4000 – 400 cm^{-1} (na região do infravermelho médio) foram obtidos usando um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão), com resolução de 4 cm^{-1} e uma média de 64 varreduras. As amostras foram preparadas utilizando pastilhas de KBr obtidas pela maceração de 0,1 mg do material e 50 mg de KBr em um almofariz de ágata e o uso de um pastilhador por 10 min sob 2 toneladas.

4.2.2.3 Magnetização

As propriedades magnéticas das amostras obtidas foram determinadas a partir de curvas de magnetização em função do campo remanente, conforme descrito no capítulo anterior. O equipamento utilizado nas medidas magnéticas foi um magnetômetro EV7 (Microsense, EUA), localizado no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob responsabilidade do Professor Alexandre Ricalde, do Departamento de Física da UFPE.

4.2.2.4 Experimento de adsorção de DNA

A capacidade do nanocompósito magnético CoFe/PPy para adsorver DNA a partir de soluções aquosas foi examinada usando como sistema modelo uma solução de DNA de esperma de salmão. Para isso, foi utilizado um DNA de salmão de cadeia dupla de aproximadamente 2000 pares de base, com massa molar de $1,3 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, EUA).

Realizamos uma série de experimentos com o intuito de otimizar a adsorção de DNA pelos nanocompósitos magnéticos pela determinação dos valores mais adequados de parâmetros físico-químicos relevantes, como o pH do meio, o tempo de interação, e a concentração inicial de DNA, para e entre outros. Para esses experimentos, preparamos soluções aquosas com diferentes concentrações de DNA de salmão. Em seguida, em diferentes frascos de vidro contendo 4 mg do NCM CoFe/PPy adicionamos 3 mL da solução de ligação (Tris – HCl/MgCl₂, pH 2,5) e 3 mL de uma das soluções de DNA. Em seguida, os frascos foram colocados sob agitação a 300 rpm (em modo batelada), com a eficiência de adsorção sendo monitorada ao longo do tempo pela retirada de pequenas alíquotas (2 μL) para a obtenção de espectros de absorção (260 nm) UV-Vis.

A estimativa de adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPy foi feita por meio do cálculo de porcentagem de adsorção, na forma

$$\% \text{ Adsorção} = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100,$$

onde C_0 e C_f são os valores de concentração inicial e final da solução de DNA (mg/L), respectivamente. Foi também estimada a capacidade de adsorção (q_e) de DNA do nanocompósito, ou seja, a quantidade de DNA (mg) adsorvido por unidade de massa do material adsorvente (o NCM), através da equação

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_f)}{m},$$

onde V é o volume da solução (L), e m é a massa (g) do adsorvente utilizadas nos ensaios (Gorza *et al.*, 2018).

- **Quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria**

A técnica de espectroscopia UV-Vis é muito utilizada para a identificação e a análise quantitativa e qualitativa de espécies orgânicas e inorgânicas. Em especial, vale a pena destacar a utilização dessa técnica em biologia molecular, por conta de sua praticidade e baixo custo, para a determinação da concentração e pureza de soluções de ácidos nucleicos.

Tanto o DNA como o RNA apresentam um pico de absorção máximo no comprimento de onda de 260 nm, que é atribuído às transições $\pi - \pi^*$ dos anéis aromáticos das bases nitrogenadas pirimidina e purina, sendo essa absorção máxima em 260 nm igual ao somatório da adsorção de cada base nitrogenada (Schmid e Beer, 2001). No entanto, essa absorção máxima depende da forma estrutural em que os ácidos nucleicos são encontrados; por exemplo, os nucleotídeos isolados apresentam maior absorbância do que quando presentes no RNA ou em DNA de cadeia única (fita simples), os quais, por sua vez, apresentam absorbância maior que uma dupla cadeia de DNA. Essa diminuição nas intensidades de absorção conforme o aumento do grau de interação entre as bases dos ácidos nucleicos é atribuída às interações entre elas, pelas ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações de dipolo-dipolo, que limitam a ressonância dos anéis aromáticos (Medina-Llamas, 2015; Schmid e Beer, 2001)

Outro fator importante na medição dos ácidos nucleicos por UV-Vis é a determinação da pureza das amostras, uma vez que é muito comum a contaminação dessas amostras com outras moléculas, tais como proteínas e compostos orgânicos (Desjardins e Conklin, 2010). Essas impurezas podem não só apenas levar a um resultado impreciso, como também prejudicar a utilização de amostras de ácidos nucleicos em diversas aplicações em biologia molecular (Kieleczawa, 2006). Por essa razão, para avaliar a pureza dos ácidos nucleicos são utilizadas as razões entre as absorbâncias em 260 e 280 nm ($A_{260/280}$), onde é geralmente aceito um valor de $\sim 1,8$ para amostras de DNA puro e ~ 2 para o caso de RNA puro. Valores substancialmente menores que esses podem indicar a presença de proteínas, fenol e outros compostos na solução (Thermo Scientific, 2010). Além da razão $A_{260/280}$, a razão entre as absorbâncias de 230 e 260 nm ($A_{230/260}$) é também utilizada como uma medida secundária para a estimativa da pureza dos ácidos nucleicos, com valores de $A_{230/260}$ esperados na faixa entre 2,0 e 2,2 para o DNA e o RNA. Um valor consideravelmente menor dessa razão pode ser um indicativo de contaminação de compostos como EDTA, carboidratos e fenol (Thermo Scientific, 2010). Essa contaminação pode ocorrer por conta dos métodos de extração do DNA/RNA utilizado, por exemplo, devido

ao meio biológico no qual o ácido nucléico foi extraído, ou pela contaminação residual dos compostos utilizados no processo.

4.2.2.5 Experimentos de dessorção de DNA

Após definidos os parâmetros importantes para o processo de adsorção, realizamos experimentos de dessorção do DNA da superfície do CoFe/PPy, uma vez que a eficiência dessa etapa é fundamental para possibilitar o uso posterior das cadeias de DNA assim eluídas em protocolos de purificação. Dessa forma, em um eppendorf de 2 mL contendo 4 mg do CoFe/PPy, adicionamos 500 μ L da solução de ligação (Tris – HCl/MgCl₂, pH 2,5) e 500 μ L de uma solução de DNA de esperma de salmão com concentração de 200ng/ μ L, de modo a obter no final uma solução com volume de 1 mL, com uma concentração de DNA de aproximadamente 100 ng/ μ L. O NCM CoFe/PPy foi então deixado interagir por 10 min com a solução, sendo que nos primeiros 15 s de cada minuto o eppendorf foi colocado em agitação em vórtex, e depois submetido a inversões manuais sucessivas nos 45 s restante, até o próximo minuto, em um processo repetido por 10 vezes. Em seguida, o nanocompósito foi confinado magneticamente, com o sobrenadante sendo transferido para um outro eppendorf limpo. Em seguida, 1 mL das soluções de eluição avaliadas foi adicionado ao eppendorf contendo o compósito CoFe/PPy, e então agitado no vórtex por 30 s e deixado para interagir em repouso por 10 min. Após isso, o compósito foi separado novamente com a ajuda de um ímã e o sobrenadante novamente transferido para um novo eppendorf, sendo então realizadas as análises dos espectros de UV-Vis das soluções (tanto aquela separada previamente na etapa de adsorção, quanto a obtida na etapa de dessorção).

4.2.2.6 Purificação de DNA de amostra de sangue real

Após a realização dos experimentos de adsorção/dessorção do nanocompósito usando o sistema modelo, desenvolvemos um protocolo para que o CoFe/PPy pudesse ser utilizado na purificação de DNA extraído de amostras de sangue humano, tomando por base procedimentos já bem estabelecidos em trabalhos anteriores do Grupo PNC. O processo consiste em 4 etapas principais, envolvendo a lise celular das amostras obtidas, a captura do DNA, a lavagem do compósito e, por fim, a eluição do DNA extraído. O protocolo, com suas determinadas etapas, é mostrado a seguir:

- 1° Etapa: Lise celular – Em um eppendorf de 2 mL, foram adicionadas as seguintes soluções:
 - 1) 5 μ L de Proteinase K (26 mg/mL) – no fundo do tubo,
 - 2) 50 μ L do sangue coletado,

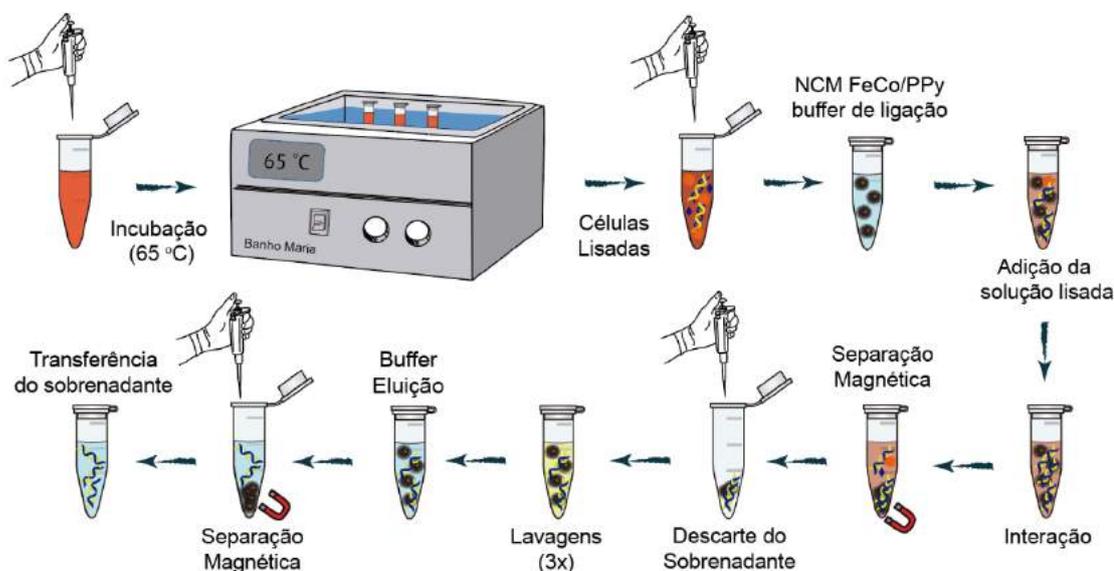
3) 500 μ L da solução de lise (Triton 1%).

Essas soluções foram misturadas e homogeneizadas no vórtex por 30 s, e então colocadas em banho-maria a 65 °C por 10 min, para que a lise celular pudesse ocorrer. A cada 5 min, a amostra era retirada, colocada para agitar no vórtex por 30 s, e recolocada no banho-maria.

- 2° Etapa: Captura do DNA – Após a lise, 4 mg do NCM CoFe/PPy foram adicionados juntamente com 1,2 mL de uma solução tampão de ligação (glicina/HCl/NaCl, pH 3,2) em um eppendorf de 2 mL, e então colocados para agitar no vórtex por 30 s. Após isso, o material lisado obtido na etapa anterior foi adicionado nessa solução de ligação/NCM. A interação foi deixada ocorrer por 10 min à temperatura ambiente sob agitação, sendo que, em cada minuto, o eppendorf era submetido ao vórtex por 15 s e a inversões manuais sucessivas por 45 s, até uma nova repetição do processo.
- 3° Etapa: Lavagem do nanocompósito – Em seguida, com o auxílio de um ímã, os NCM foram confinados, com o descarte da solução sobrenadante. Após isso, os compósitos foram submetidos a 3 etapas de lavagens, onde em lavagem foram adicionados 900 μ L de uma solução composta pela mistura de 1,7 mL de etanol e 1 mL de tampão acetato de potássio-Tris/HCl/EDTA (pH 8,5). Em cada etapa de lavagem, após o NCM CoFe/PPy ser submetido a agitação por 30 s no vórtex, o compósito era novamente confinado e as soluções de lavagem descartadas. Ao final das lavagens, o eppendorf foi deixado aberto por 5 min para permitir a evaporação do etanol. Note que agora o compósito contém o DNA imobilizado em sua superfície, sendo então chamado de CoFe/PPy/DNA.
- 4° Etapa: Eluição do DNA – Para a eluição do DNA, 100 μ L da solução de eluição (tampão fosfato/fosfato, pH 7,8) foi adicionado no eppendorf contendo o complexo CoFe/PPy/DNA. Em seguida, o eppendorf foi agitado no vórtex por 15 s, confinado com a ajuda de um ímã na parte inferior do tudo, e deixado em incubação por 10 min. Após esse tempo, foi realizada uma outra agitação por 15 s. Por fim, o NCM foi novamente confinado magneticamente e o sobrenadante transferido para um novo eppendorf esterilizado.

Na Fig. 50 é possível observar, de forma esquemática, as etapas descritas anteriormente do protocolo de purificação magnética desenvolvido pelo Grupo com base no uso dos nanocompósitos. As amostras obtidas foram então utilizadas para os estudos de biologia molecular descritos a seguir, com o objetivo de aferir a quantidade e a qualidade das amostras de DNA obtidas através desse protocolo de purificação.

Figura 50 – Representação esquemática das principais etapas do protocolo de purificação de DNA a partir de amostras de sangue total humano.



Fonte: Figura adaptada de (Silva, 2019).

4.2.2.7 Reação em Cadeia de Polimerase

Dentre as técnicas de diagnóstico molecular baseadas na detecção, identificação e quantificação de ácidos nucleicos (DNA/RNA), destaca-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), por conta de suas altas sensibilidade, confiabilidade e reprodutibilidade (Pelt-Verkuil, Belkum e Hays, 2017). Por permitir cerca de 1 bilhão de cópias de uma região da cadeia delimitada pelos primers a partir de uma única molécula do DNA alvo, a técnica de PCR se tornou o padrão ouro no diagnóstico laboratorial, na genotipagem, e em análises forenses e de identificação de paternidade, entre outros procedimentos (Erlich, Gelfand e Sninsky, 1985).

A técnica consiste na amplificação exponencial do DNA alvo através de diversos ciclos de desnaturação (sendo o processo no qual o DNA de dupla cadeia se desenrola e se separa em duas cadeias simples), hibridização (no qual sequências de DNA de cadeia única, complementares, se associam e formam cadeias duplas), e amplificação do DNA por meio do uso da enzima Taq DNA polimerase (uma enzima estável ao calor capaz de catalisar a reação) (Erlich, Gelfand e Sninsky, 1985).

Para esses ciclos ocorrerem, a amostra é inicialmente aquecida a 95 °C, para que se inicie a etapa de desnaturação do DNA alvo; em seguida, para a etapa de hibridização (na temperatura de 60 °C), são utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos, denominados de “primers”, que apresentam uma sequência de 20 a 40 bases nitrogenadas que são específicas

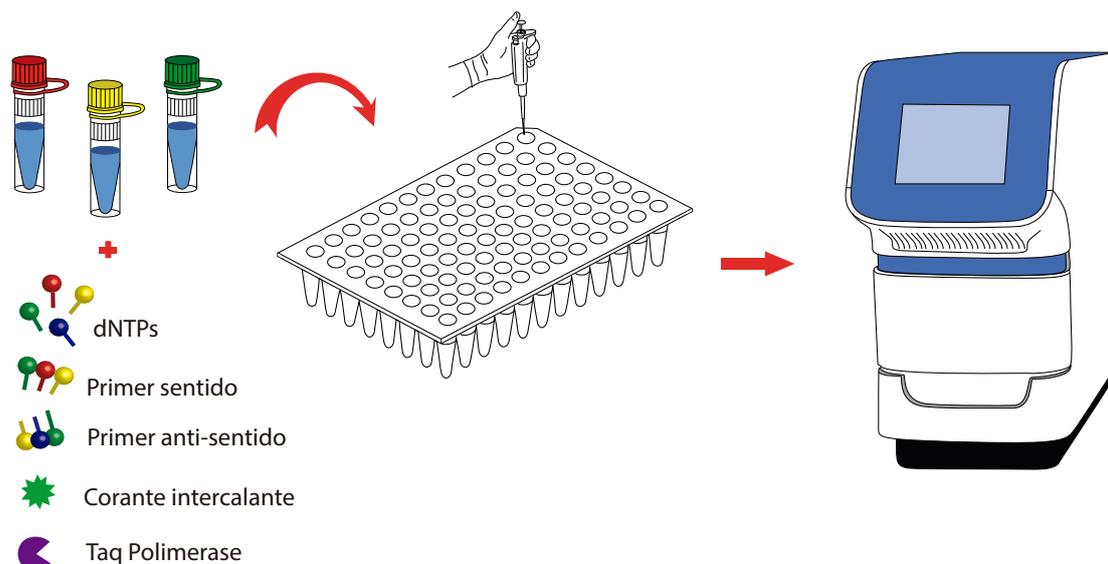
para o DNA do organismo que se pretende identificar. São os primers que desempenham o papel fundamental para o processo da PCR, pois eles se hibridizam (exatamente na região que contém os pares de bases que se deseja amplificar) com a cadeia do DNA alvo, já desnaturado, e atuam como indicador para que a Taq DNA polimerase crie uma cadeia de DNA complementar. Nesse passo, em uma temperatura de 72 °C, a DNA polimerase sintetiza uma nova cadeia complementar à cadeia de matriz de DNA por adição pela adição sequencial de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs). (Erlich, Gelfand e Sninsky, 1985; Pelt-Verkuil, Belkum e Hays, 2017). Na Fig. 51 é possível observar uma representação esquemática do processo da PCR convencional e da PCR em tempo real.

Na PCR convencional, um número fixo de ciclos de amplificação é inicialmente determinado e, após terem sido completados, são realizadas as análises do produto da reação que fornecem uma informação qualitativa a respeito da presença ou ausência de um determinado gene na amostra de DNA alvo. Já na PCR em tempo real, também denominada de qPCR, a amplificação e a detecção do produto da PCR ocorrem simultaneamente, a partir do uso de sondas ou corantes intercalantes para DNA e RNA; como consequência, o resultado é visualizado em tempo real através da fluorescência emitida pelos produtos da reação (Kubista *et al.*, 2006; Mackay, 2007).

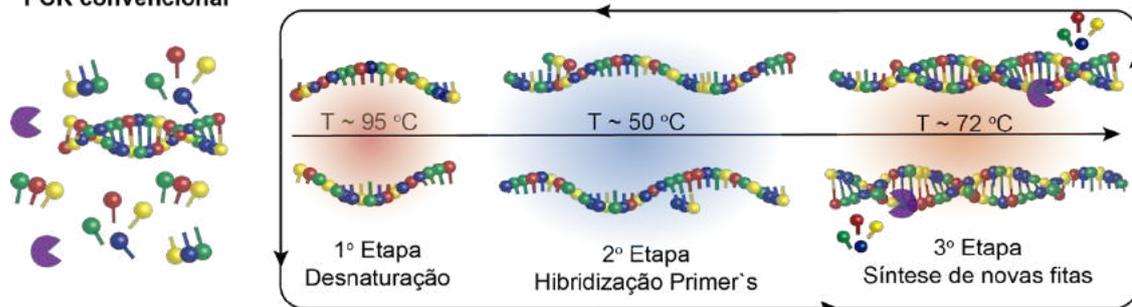
É importante ressaltar que a PCR em tempo real é uma das técnicas de diagnósticos mais sensíveis e rápidas dentre aquelas que têm por base a reação em cadeia da polimerase, pois nela a detecção dos produtos da PCR não precisa ser realizada a partir de outros procedimentos para a marcação do DNA amplificado. Dentre os métodos de marcação, o mais conhecido e utilizado é a eletroforese em gel de agarose, com o uso de marcadores fluorescentes, tais como o brometo de etídio ou SYBR Green, SYBR Safe, Diamond, entre outros (Kubista *et al.*, 2006). Na Tabela 11 são apresentados, de forma resumida, uma comparação entre as técnicas de PCR convencional e em tempo real.

A técnica de PCR também é bastante sensível às condições das amostras, ou seja, é susceptível a inúmeros interferentes que podem impedir que a reação ocorra. Dessa forma, ela serve também como uma análise importante para a validação da qualidade das amostras de DNA purificado a partir do uso do nanocompósito proposto nesse trabalho.

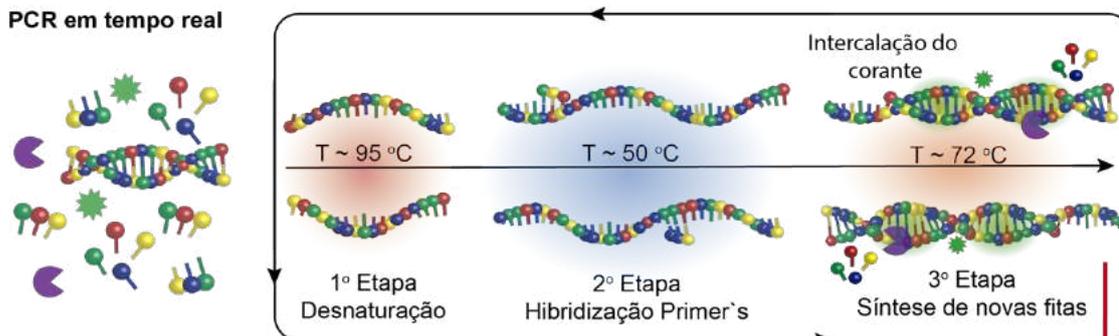
Figura 51 – Representação esquemática das principais etapas da PCR.



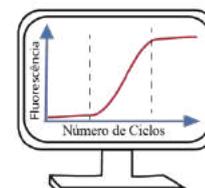
PCR convencional



PCR em tempo real



Acompanhamento em tempo real



Fonte: Silva, 2019 (p.53)

Tabela 11 – Comparação entre a técnica de PCR convencional e a PCR em tempo real.

PCR Convencional	PCR em tempo real
Análises de dados na fase final da reação	Análises de dados durante a reação
Manipulação dos resultados pós-PCR (Preparação de gel em agarose)	Sem manipulação dos resultados pós-PCR
Resultados qualitativos	Resultados quantitativos
Requer maior concentração de amostras	Requer menor concentração de amostras
–	Melhor reprodutibilidade, sensibilidade e precisão.

• Estudo de inibição da reação de PCR

Para validar a da qualidade do DNA purificado, as amostras coletadas utilizando o NCM CoFe/PPy foram submetidas a ensaios de amplificação de PCR. Além disso, com o objetivo de verificar se o compósito utilizado como material adsorvente iria de algum modo impedir a reação em cadeia da polimerase, realizamos experimentos nos quais, após a etapa de adsorção do DNA, submetemos uma pequena quantidade de CoFe/PPy com o DNA capturado (CoFe/PPy/DNA) diretamente ao procedimento de amplificação por PCR. Desse modo, é possível examinar se a etapa de eluição do DNA poderia ser eliminada.

A técnica PCR usada nesses experimentos foi a da reação em tempo real (qPCR), uma vez que com ela é possível o monitoramento durante todo o processo da reação através da fluorescência. A amplificação foi realizada em um termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA). O conjunto de primers utilizado foi um padrão do gene da β -actina, adquiridos comercialmente (Invitrogen, EUA). O protocolo a seguir descreve o procedimento de preparação da solução da mastermix (solução de reação qPCR).

Em um eppendorf de 500 μ L, foi adicionado:

1. 100 μ L de fast SYBR Green (AppliedBiosystems, EUA),
2. 50 μ L de água livre de RNase (Promega, EUA),
3. 15 μ L do primer sentido (Forward) – com concentração de 10 pmol e sua sequência sendo 5' – CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC – 3',
4. 15 μ L do primer anti-sentido (Reverse) – com concentração de 10 pmol e sua sequência sendo 5' – CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT – 3'.

Após as soluções terem sido adicionadas, o eppendorf foi submetido ao vórtex por 10 s, para a homogeneização, e então uma quantidade igual a 23,5 μ L foi transferida para cada um dos poços da placa ótica de reação PCR. Em seguida, foi adicionado em quatro poços 1,5 μ L de DNA purificado e eluído com o nanocompósito CoFe/PPy; com o auxílio da ponteira da

micropipeta, adicionou-se uma pequena quantidade de CoFe/PPy/DNA nos quatro poços restantes, e 1,5 μL de água livre de RNase nos dois últimos poços, a serem utilizados como controle negativo.

As condições de ciclagem empregadas para a realização da amplificação são detalhadas a seguir:

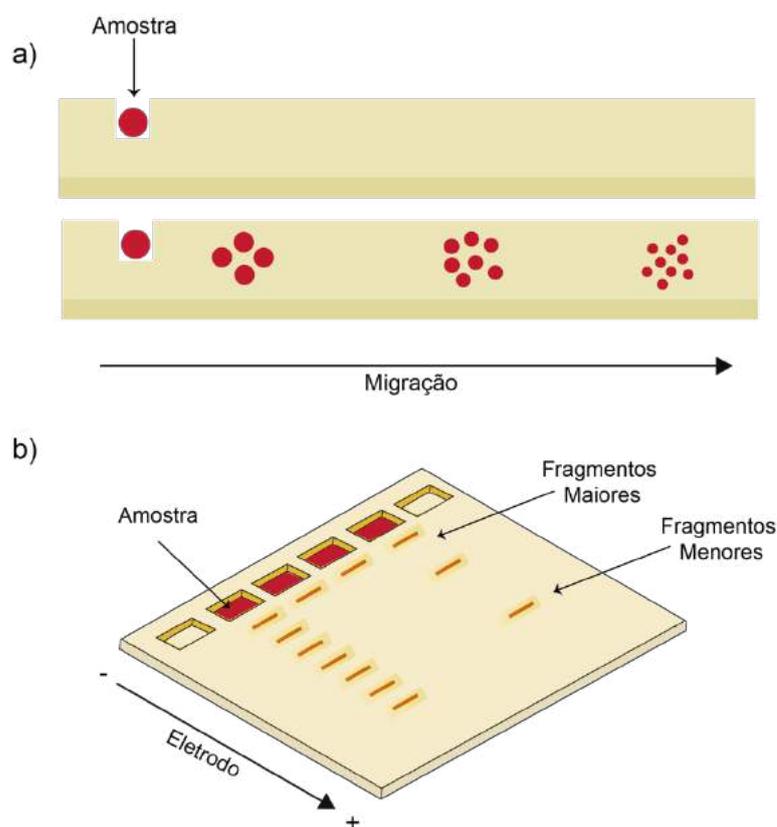
1. Aquecimento para 50 °C por 2 min,
2. Aquecimento para 95 °C por 3 min,
3. 40 ciclos sequenciais de 95 °C por 3 s, 60 °C por 30 s,
4. Arrefecimento a 4 °C.

4.2.2.8 Eletroforese

A técnica de eletroforese é muito utilizada para a separação, purificação e identificação de macromoléculas, principalmente ácidos nucleicos e proteínas (Makovets, 2013; Wilson e Walker, 2000). Nesse método, ao serem submetidas a um campo elétrico as macromoléculas migram para um polo (positivo ou negativo, de acordo com a sua carga), através de um meio poroso (gel) selecionado para oferecer resistência à migração. Assim, uma macromolécula com carga positiva seguirá para o polo negativo, enquanto, se sua carga for negativa, ela irá na direção do polo positivo.

O fluxo migratório depende essencialmente do peso molecular das macromoléculas, e assim, à medida que uma amostra percorre o gel em direção ao polo, as moléculas menores migram mais rápido do que aquelas com maior peso (conforme ilustrado na Fig. 52 a). Desse modo, moléculas com tamanhos semelhantes se agrupam e formam bandas características, que serão visualizadas posteriormente (Fig. 52 b). O gel pelo qual a amostra percorre é constituído de agarose (um polissacarídeo) ou de poliacrilamida (um polímero) e apresenta característica porosa, com o tamanho dos poros podendo ser ajustado por meio da concentração do gel. Normalmente, os géis de agarose são utilizados para separar fragmentos de DNA (200 a 5000 pares de base), enquanto os géis de poliacrilamida são utilizados para as proteínas (5 a 2000 kDa) (Makovets, 2013; Wilson e Walker, 2000).

Figura 52 – Esquema da técnica de eletroforese em gel de agarose para a identificação da integridade e tamanho de fragmentos de DNA.



Fonte: Figura adaptada de (Silva, 2019).

Para a visualização das moléculas através das bandas formadas, é necessário a coloração das mesmas através de um corante marcador (normalmente fluorescente), com a escolha do marcador dependendo da natureza da molécula. No caso específico da visualização de moléculas de DNA em um gel de agarose, usa-se um marcador fluorescente, que é adicionado quando o gel é preparado. Entre os marcadores encontrados comercialmente para essa finalidade, pode-se citar o brometo de etídio, GelRed, Diamond, Sybr Green, Sybr Safe, entre outros (Sheehan, 2009). Esses marcadores também são chamados de intercalantes, pois se ligam entre as bases nitrogenadas das cadeias de DNA e, quando isso ocorre, causam um aumento na intensidade de fluorescência (Makovets, 2013; Sheehan, 2009). Desse modo, após algum tempo de aplicação de uma diferença de potencial, ocorre a migração das amostras pelo gel e a formação de bandas dos fragmentos de DNA, que podem ser observadas ao se fazer incidir radiação ultravioleta no comprimento de excitação do corante utilizado. Também é possível determinar de forma comparativa o tamanho dos fragmentos de DNA da amostra em análise, sendo que para isso se faz necessário adicionar amostras padrões (com tamanhos de fragmentos

conhecidos – geralmente obtidas comercialmente) em poços adjacentes a aqueles utilizados para as amostras.

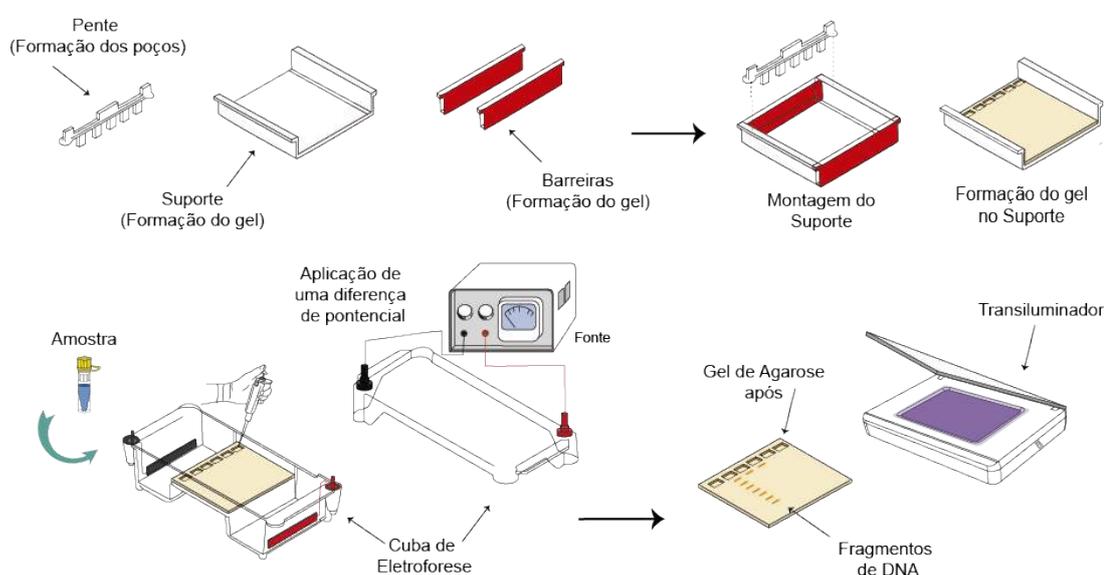
- **Preparação da eletroforese em gel de agarose**

A técnica de eletroforese foi utilizada para monitorar o grau de pureza do DNA obtido através do compósito CoFe/PPy e para identificar o tamanho dos fragmentos obtidos após as ampliações por PCR. Para a realização dos experimentos de eletroforese, foi usado um aparato experimental que consiste em uma cuba (recipiente de suporte que acomoda o gel), um eletrólito (solução tampão de Tris-Acetato-EDTA ou Tris-Borato-EDTA), que permite a passagem de corrente, suportes para a preparação do gel (pentes, barreiras), uma fonte de tensão e, por fim, um transiluminador, utilizado para revelar as bandas características. Os experimentos foram realizados em uma cuba de eletroforese horizontal K33-15H (Kasvi, Brasil), através da seguinte metodologia:

1. Montar separadamente todos os acessórios (barreiras e pente) no suporte (15x15 cm) para a formação do gel de agarose, conforme ilustrado na Fig. 53.
2. Preparar 1 L de uma solução de TAE de 0,5 X, a partir de uma solução estoque de TAE 40 X (Promega, EUA).
3. Pesar 1 g de agarose e transferir para um frasco erlenmeyer de 250 mL.
4. No erlenmeyer contendo a agarose, adicionar 100 mL da solução de TAE 0,5 X preparada no Passo 2.
5. Levar o erlenmeyer ao forno de micro-ondas por 1 min, para ocorrer a completa dissolução da agarose.
6. Agitar o erlenmeyer em movimentos circulares suaves, para homogeneizar a solução.
7. Esperar a solução atingir uma temperatura por volta de 37 – 40 °C.
8. Adicionar 10 µL do corante de ácidos nucleicos Diamond (Promega, EUA) e homogeneizar a solução, conforme descrito no Passo 6.
9. Colocar a solução de agarose, cuidadosamente para não formar bolhas, dentro do suporte (15 x 15 cm) contendo o pente.
10. Esperar 30 min para a formação do gel de agarose (pela polimerização da agarose).
11. Retirar as barreiras do suporte.
12. Colocar o suporte dentro da cuba de eletroforese.
13. Encher a cuba com a solução de TAE 0,5 X preparada no Passo 2, até completo recobrimento do gel de agarose.
14. Retirar com muito cuidado o pente do suporte que contém o gel de agarose. Note: neste passo são formados os poços em que serão colocadas as amostras a serem analisadas.

15. Preparação das amostras:
 - i. Depositar em um parafilm 2 μL do carregador Blue/Orange 6X (Promega, EUA) e, em seguida, adicionar 8 μL da amostra de DNA.
 - ii. Com o auxílio de uma micropipeta, misturar as amostras com o carregador.
16. Colocar as amostras nos poços formados no gel de agarose.
17. Tampar a cuba, conectar os cabos à fonte de tensão, e aplicar uma diferença de potencial de 60 Volts por 10 min.
18. Após este período, aumentar a diferença de potencial para 100 Volts, por um período de tempo entre 1 – 2 h, até que a parte amarela (visível) do carregador esteja no fim do gel.
19. Cuidadosamente, transferir o gel para um transiluminador ultravioleta (302 nm) (Maestrogen, EUA).
20. Por fim, capturar as imagens com o uso de uma câmera digital.

Figura 53 – Esquema ilustrativo das principais etapas em um protocolo de eletroforese em gel de agarose.



Fonte: Figura adaptada de (Silva, 2019).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização das Nanopartículas

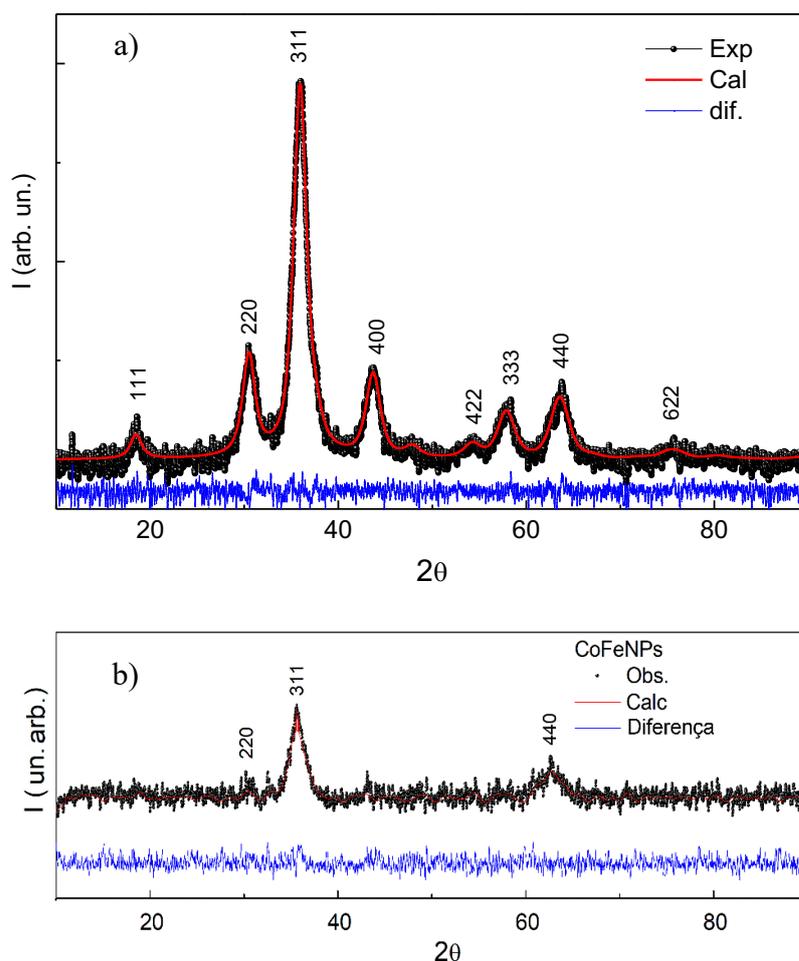
4.3.1.1 Difração de Raios X

Na Fig. 54 é mostrado o difratograma das nanopartículas de ferrita de cobalto sintetizadas, conforme descrito na Seção 3.2.1.2. Após uma análise estrutural baseada no método de Rietveld (usando o software Maud), foi confirmada a formação da ferrita de cobalto, e verificou-se que

a formação da estrutura cristalina das amostras era do tipo espinélio cúbico inverso, com o grupo espacial $Fd\bar{3}m$ (número COD-1533163), de acordo com o relatado no capítulo anterior.

Através do refinamento, foi possível identificar a fase espinélio da ferrita de cobalto como $(Co_{0,255}Fe_{0,745})(Co_{0,745}Fe_{1,255})O_4$. No entanto, não foi observada a fase $\alpha-Fe_2O_3$ encontrada anteriormente nas nanopartículas preparadas conforme a síntese descrita no Capítulo 1, o que indica a formação de nanopartículas com maior grau de pureza. Determinamos assim o parâmetro de rede a , igual a $8,2771 \text{ \AA}$, o volume V da célula unitária, $567,067 \text{ \AA}^3$, e a densidade, no valor de $5,6065 \text{ g/cm}^3$, para a amostra $CoFe_2O_4$ NPs (Lutterotti *et al.*, 2007; Rietveld, 2002).

Figura 54 – Difratogramas de raios X das amostras e $CoFe_2O_4$ NPs (a) e $CoFe$ NPs (b).



Para a $CoFe_2O_4$ NPs, os picos de difração foram identificados em $2\theta = 18,48^\circ, 30,51^\circ, 35,88^\circ, 43,73^\circ, 54,31^\circ, 57,98^\circ, 63,69^\circ$ e $75,61^\circ$, com os respectivos planos de difração indexados pelos índices de Miller, como mostrado na Fig. 54 a). Isso indica que houve um aumento na cristalinidade da amostra preparada, relativamente a aquelas obtidas anteriormente, mostrando que o tempo de preparação das nanopartículas é um parâmetro importante, conforme

já observado na literatura (Amirabadizadeh *et al.*, 2017). A título de comparação, e para um melhor fluxo de leitura, o difratograma das amostras preparadas no Capítulo 1 (chamadas CoFeNPs) é reapresentado na Fig. 54 b).

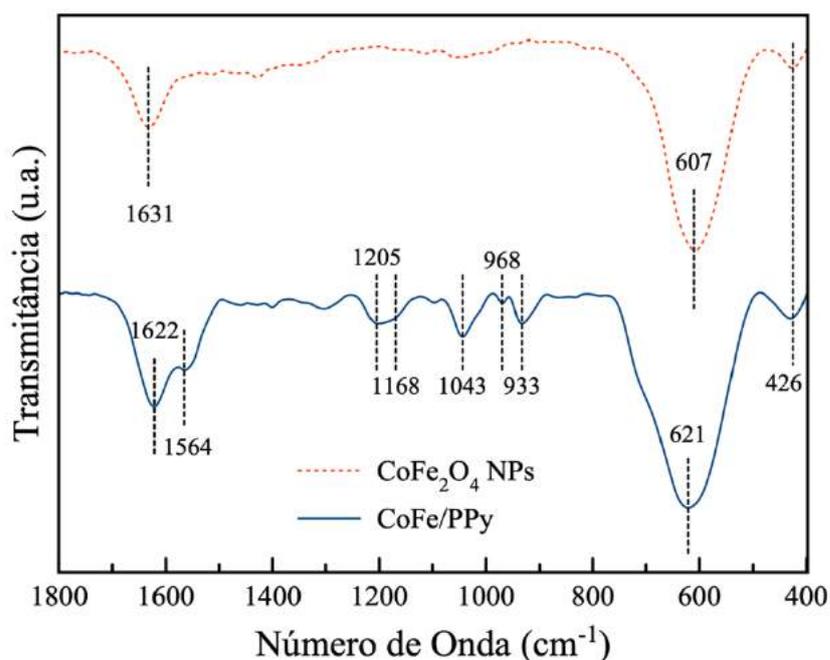
4.3.1.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Para analisar a composição química das amostras preparadas e verificar se de fato foi realizado o recobrimento das nanopartículas magnéticas pela deposição do polímero polipirrol, implementamos análises de espectroscopia de FTIR. Na Fig. 55 são mostrados os espectros de absorção das CoFe₂O₄ NPs (linha tracejada) e do nanocompósito CoFe/PPy (linha contínua). Como discutido no Capítulo 1, para a amostra CoFe₂O₄ NPs, ou seja, as nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto, pode-se verificar a presença de duas bandas, observadas em 426 cm⁻¹ e 607 cm⁻¹, características das vibrações de estiramento das ligações metal-oxigênio (M – O) (Aliyan *et al.*, 2017; Rana, Philip e Raj, 2010; Shahjuee *et al.*, 2017) e de uma banda em 1631 cm⁻¹, que pode ser atribuída à vibração no plano e fora do plano da água absorvida O – H (Feng *et al.*, 2017).

No espectro do nanocompósito CoFe/PPy, foram identificados tanto a presença dos picos referentes às CoFe₂O₄ NPs, observadas em 426 cm⁻¹ e 621 cm⁻¹, quanto as bandas de vibrações referentes ao polipirrol, observadas em: 1564 cm⁻¹ e 1213 cm⁻¹, as quais correspondem às vibrações de estiramento C = C e C – N dos anéis do pirrol, respectivamente (Guo *et al.*, 2009); 1168 cm⁻¹ e 933 cm⁻¹, devidas às vibrações C – H no plano de flexão e à deformação dos anéis do pirrol, respectivamente; 1043 cm⁻¹ e 966 cm⁻¹, atribuídas às vibrações = C – H dentro e fora do plano, respectivamente (Alves *et al.*, 2013; Zhao e Nan, 2012).

Dessa maneira, fica evidente a presença dos dois constituintes, de modo que podemos confirmar que através da síntese em fase vapor houve de fato o revestimento das CoFe₂O₄ NPs com polipirrol.

Figura 55 – Espectros infravermelho das CoFe_2O_4 NPs (linha tracejada), e do nanocompósito CoFe/PPy (linha contínua).

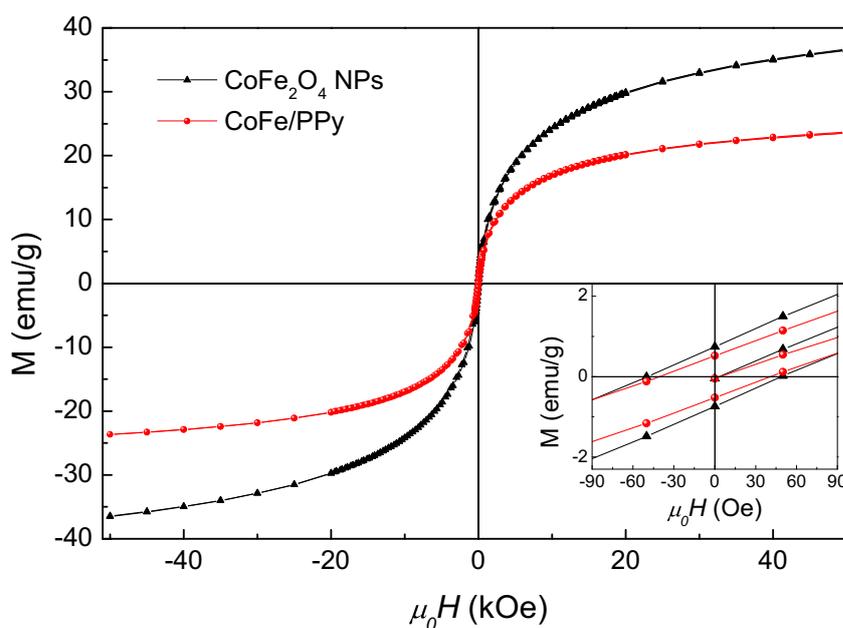


4.3.1.3 Medidas de Magnetização em função do campo remanente (Histereses)

As características magnéticas das amostras CoFe_2O_4 NPs e CoFe/PPy foram analisadas através de curvas de magnetização, obtidas pela técnica de magnetometria de amostra vibrante à temperatura ambiente. Como pode ser visto na Fig. 56, ambas as amostras apresentam ciclos de histerese que correspondem a um comportamento ferrimagnético, um resultado consistente com os reportados literatura para as nanopartículas de CoFe_2O_4 preparadas por uma síntese de co-precipitação (Gyergék *et al.*, 2010; Hosni *et al.*, 2017). Ambas as partículas apresentaram um campo de coercitividade de ($H_C = 50$ Oe). Como já mencionado no Capítulo 1, o valor de H_C encontrado é consistente com aquele relatado na literatura para nanopartículas de ferrita de cobalto com granulometria superior a 10,7 nm (Hosni *et al.*, 2017; Masrour, Hamedoun e Benyoussef, 2012).

Através dessas curvas, foram também obtidos os valores de magnetização a campo magnético máximo de 36,6 emu/g e 23,6 emu/g para um $H_{\text{max}} = 50$ kOe, para as amostras CoFeNPs e CoFe/PPy , respectivamente. Uma diferença dessa ordem já era esperada, uma vez que essa medida leva em consideração a massa total da amostra; como o polímero não apresenta resposta magnética, o valor de H_{max} é reduzido, o que comprova o revestimento das CoFe_2O_4 NPs com polipirrol. Apesar dessa redução na magnetização, o nanocompósito CoFe/PPy exibe ainda uma resposta magnética elevada, o que torna viável seu uso como um material adsorvente.

Figura 56 – Curvas de magnetização à temperatura ambiente (293 K) para as CoFe_2O_4 NPs (\blacktriangle), e o nanocompósito CoFe/PPY (\bullet).

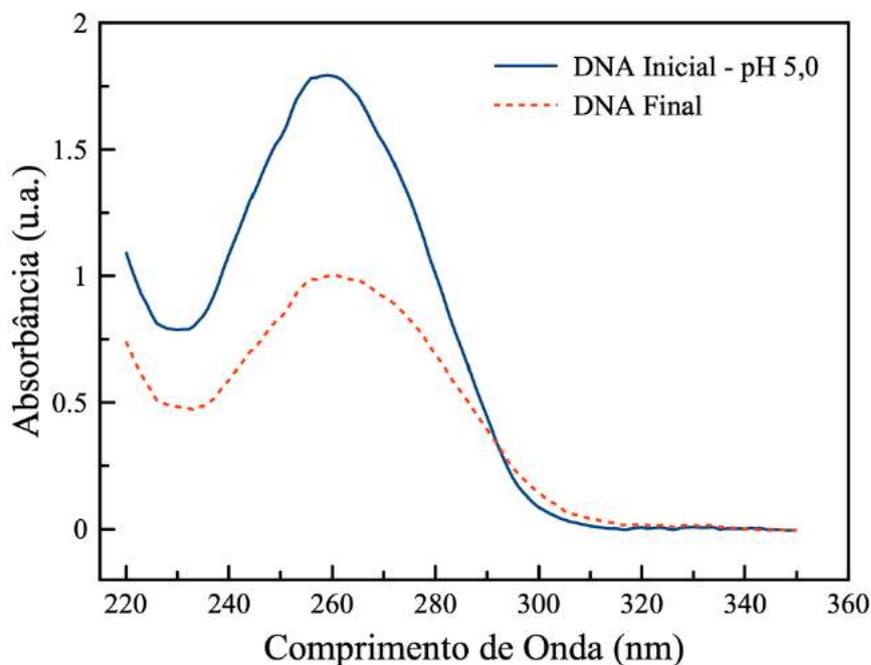


4.3.2 Uso do nanocompósito CoFe/PPy como material adsorvente de ácidos nucleicos.

4.3.2.1 Estudos de adsorção em sistema modelo

Uma vez estabelecido o procedimento de síntese do nanocompósito CoFe/PPy e realizada sua caracterização, passamos a investigar a viabilidade de sua utilização para a adsorção de DNA de salmão dissolvido em uma solução aquosa. Para isso, realizamos uma primeira prova de conceito em que 3 mL da solução de ligação (Tris-HCl/MgCl₂) com pH 5,0 e 3 mL de uma solução aquosa de DNA (200 ng/ μ L) foram adicionados em frascos que continham 4 mg do compósito CoFe/PPy. Esse sistema foi mantido sob agitação constante por 2 h a 300 rpm, a fim de que ocorresse a interação. Após esse tempo, com o auxílio de um ímã, o compósito foi separado e uma pequena alíquota ($\sim 4 \mu$ L) foi retirada para a caracterização por UV-Vis. Na Fig. 57, são apresentados os espectros obtidos da solução, antes e depois da interação com o CoFe/PPy. Como pode ser observado, a banda característica do DNA localizada 260 nm apresentou uma significativa redução, com o valor de concentração inicial passando de um valor inicial de 90,5 ng/ μ L para 50 ng/ μ L após a interação com o compósito (ou seja, caracterizando uma adsorção de 44,1 %). Com isso, foi possível demonstrar que, mesmo sob condições não otimizadas, o nanocompósito é capaz de adsorver DNA. Tendo em vista esse resultado, passamos a implementar um estudo mais detalhado do processo de adsorção do DNA pelo nanocompósito, cujos resultados são apresentados a seguir.

Figura 57 – Espectros UV-Vis para a solução de DNA de esperma de salmão antes (linha contínua), e depois de interagir por 10 min com o nanocompósito CoFe/PPy (linha tracejada).

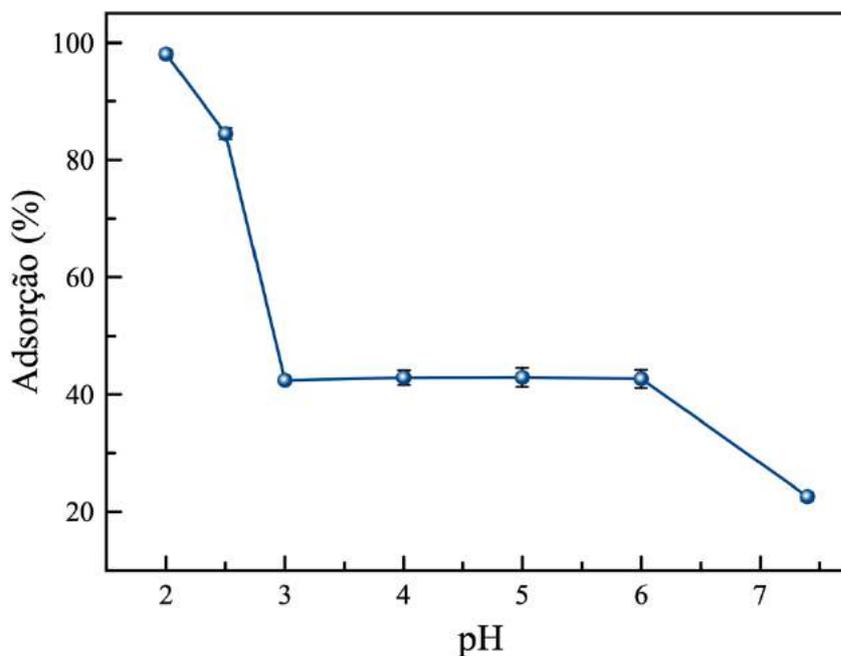


i) Influência do pH e mecanismo de adsorção

É bem estabelecida na literatura a influência do pH no processo de adsorção, uma vez que o pH de um meio pode afetar a carga superficial do adsorvente e do adsorvato (Tewari, 1981). Por essa razão, realizamos experimentos para avaliar a eficiência do NCM estudado nesse trabalho para a adsorção de DNA. Para isso, preparamos soluções de ligação (Tris-HCl/MgCl₂) com diferentes valores de pH (2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,4). Em seguida, em um frasco de vidro contendo 4 mg do nanocompósito, adicionamos 3 mL da solução de ligação e 3 mL de uma solução aquosa de DNA (200 ng/μL). Esse sistema foi deixado para interagir, sob agitação constante a 300 rpm, por 2 h, sendo depois o CoFe/PPy confinado e uma alíquota retirada para determinar a concentração de DNA após a interação.

Os resultados da influência do pH do meio na adsorção do DNA pelo CoFe/PPy são apresentados na Fig. 58. Como se pode observar, a adsorção do DNA ocorre para todos os valores de pH examinados. Enquanto uma baixa eficiência (22,6 %) de adsorção é observada para o pH 7,4, um aumento substancial da adsorção passa a ocorrer com o aumento da acidez do meio em um patamar relativamente constante de aproximadamente 42 % para a faixa de pH entre 6,0 e 3,0, e uma máxima adsorção ocorrendo para a faixa de pH entre 3,0 e 2,0, com um pico de 98% para o pH 2,0.

Figura 58 – Porcentagem de adsorção de DNA de esperma de salmão pelo CoFe/PPy em função do pH da solução tampão de ligação.



Em pH ácidos, as moléculas de polipirrol sofrem protonação, adquirindo cargas positivas e passando a atuar como polications (Pei e Qian, 1991). Por sua vez, a molécula de DNA pode ser considerada como um poliânion (Medina-Llamas *et al.*, 2014), uma vez que grupos fosfatos, carregados negativamente, se encontram em sua borda mais externa. Desse modo, a adsorção do DNA sobre a superfície do nanocompósito CoFe/PPy deve ocorrer principalmente por troca iônica; ou seja, em pHs ácidos, as cadeias de PPy são protonadas, enquanto contraíons se posicionam entre as cadeias para estabilizar a carga (Pei e Qian, 1991; Saoudi *et al.*, 2000; Zhang e Bai, 2003). Na solução tampão empregada neste trabalho, o ânion cloreto atua como contraíon. Assim, durante a interação DNA-NCM, os ânions cloreto são substituídos pelos grupos fosfato, que passam a atuar como contraíons (Pei e Qian, 1991). Em menor intensidade, as cargas positivas das nanopartículas de ferrita de cobalto podem também contribuir para a adsorção do DNA, por meio de interações eletrostáticas e ligações específicas, como visto no Capítulo 1. O fato de que uma maior quantidade de DNA é adsorvida em pHs mais baixos (como pH 2,5) se deve a que, nesses valores de pH, o composto apresenta mais grupos aminos protonados (NH_3^+) capazes para interagir (Pei e Qian, 1991; Saoudi *et al.*, 2000).

Face esses resultados, passamos a usar soluções de ligação com pH igual 2,5 para a realização do demais experimentos de adsorção de DNA em meio aquoso. Esse valor adotado, levemente superior a aquele em que a maior eficiência de adsorção é observada, foi escolhido para que fosse minimizada a interação do DNA com íons de cloro e H^+ . Isso ocorre porque

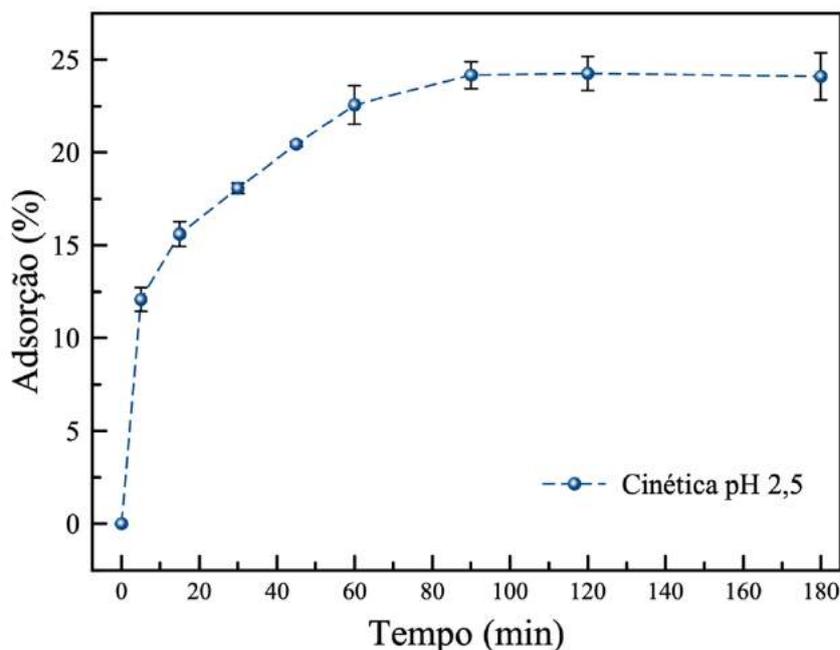
durante a preparação da solução, a quantidade de HCl (1M) utilizada para reduzir o valor do pH de 2,5 para 2,0 era considerável. Com isso, também minimizamos uma possível degradação das moléculas de DNA ao longo do nosso protocolo.

ii) **Influência do tempo de interação**

Após estabelecermos o valor de pH mais adequado para o meio, conduzimos o estudo da influência do tempo de interação sobre a capacidade de adsorção de DNA pelo compósito estudado. Esses estudos foram realizados à temperatura ambiente, em modo batelada e sob agitação constante a 300 rpm. Para esses experimentos, adicionamos 3 mL da solução de ligação (Tris-HCl/MgCl₂) e 3 mL da solução aquosa de DNA de salmão (500 ng/μL) em pequenos frascos de vidro (com capacidade máxima de ~ 12 mL) contendo 4 mg do compósito CoFe/PPy. Em seguida, os frascos foram colocados sob agitação, sendo a eficiência de adsorção monitorada ao longo do tempo através da retirada de pequenas alíquotas (2μL) para a obtenção dos espectros de absorção.

Como se pode observar na Fig. 59, a adsorção de DNA ocorre mais de modo mais rápido nos primeiros 60 min, com uma eficiência de remoção de 23%. A partir desse ponto, a taxa de adsorção de DNA pelo compósito se torna mais lenta (como revelado pela inclinação da curva), com o equilíbrio sendo atingido a partir de 120 min. Tal comportamento pode ser atribuído à disposição da grande maioria dos sítios ativos, localizados na superfície e, por isso, rapidamente ocupados nos primeiros minutos de experimento. Após essa etapa, a eficiência de adsorção se torna mais lenta, uma vez que passa a diminuir o número de sítios ativos, ao que se acresce o fato de que impedimentos estéricos e de repulsão devem tornar mais difícil o acesso das moléculas de DNA aos sítios ainda remanescentes.

Figura 59 – Cinética do processo de adsorção do DNA de esperma de salmão pelos nanocompósitos CoFe/PPy.

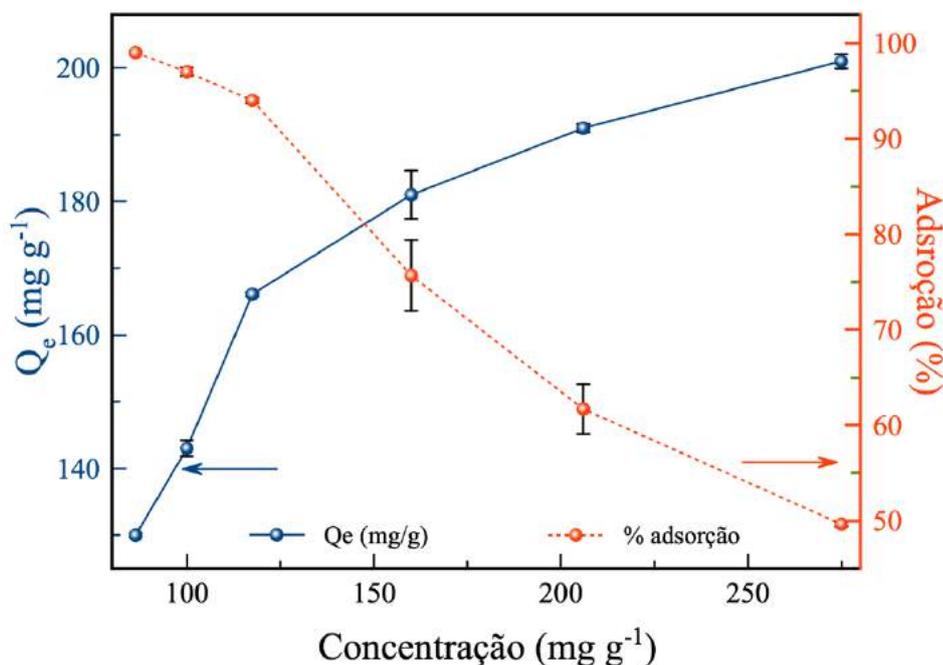


iii) Influência da concentração inicial de DNA

Uma vez conhecida a influência do tempo na saturação da adsorção de DNA pelo CoFe/PPy, realizamos experimentos para identificar a influência da concentração inicial de DNA sobre a capacidade de adsorção do nanocompósito. Para isso, preparamos soluções aquosas com diferentes concentrações de DNA de salmão (160, 200, 300, 360, 400, e 500 ng/ μ L). Em seguida, adicionamos 3 mL da solução de ligação (Tris-HCl/MgCl₂) e 3 mL de uma das soluções de DNA em diferentes frascos de vidro contendo 4 mg do compósito estudado, que foram então submetidos a agitação orbital por 180 min a 300 rpm, para que ocorresse a interação. Após esse tempo, o nanocompósito foi separado magneticamente da solução com o auxílio de um ímã, com a solução sobrenadante sendo retirada para análise.

Na Fig. 60 são mostradas a eficiência (%) e a capacidade de adsorção q_e (mg/g) em função de diferentes concentrações iniciais de DNA. Como pode ser visto, conforme a concentração inicial aumenta, ocorre um decréscimo na eficiência da remoção, mas se torna maior a capacidade de adsorção do compósito CoFe/PPy, que passa de 126,5 mg/g, para uma concentração inicial de 86,3 mg/L, para 201 mg/g, para uma concentração de 269,2 mg/L. Esse aumento da capacidade de adsorção pode ser atribuído ao fato de que a força motriz de transferência de massa entre a fase aquosa e a fase sólida é maior quando maiores concentrações de DNA são usadas (Ansari *et al.*, 2015).

Figura 60 – Efeito da concentração inicial de DNA sobre a quantidade percentual de adsorção (---) e capacidade de adsorção q_e (—) do CoFe/PPy.

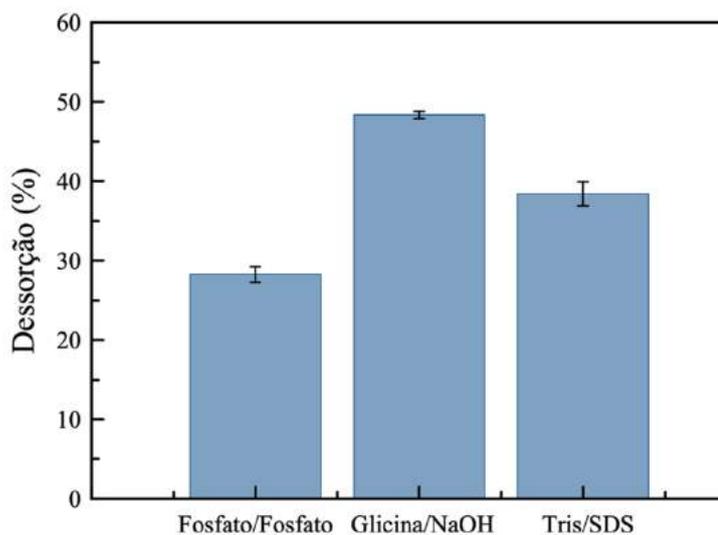


iv) Estudos para a dessorção de DNA

Experimentos de dessorção, que podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de adsorção, foram realizados com o objetivo de examinar a eficiência da recuperação do DNA adsorvido pelo compósito. Para esses estudos, realizamos os experimentos de dessorção usando três soluções-tampão diferentes: Fosfato monobásico/Fosfato bibásico (pH 7,6), Tris-SDS (pH 8,0) e Glicina/NaOH (pH 9,0). A escolha dessas soluções foi baseada no método de dessorção através da alteração do pH do meio, uma vez que o uso de soluções básicas leva à desprotonação das cadeias do PPy, responsável pela interação com os grupos fosfatos do DNA (Pei e Qian, 1991; Saoudi *et al.*, 2000). Por sua vez, a perda das cargas positivas do PPy pode resultar no desprendimento do ácido nucleico para o interior da solução.

Na Fig. 61 são mostrados os resultados obtidos para os experimentos de dessorção de DNA discutidos na Seção 3.2.2.7. Como se pode observar, para todas as soluções testadas há a liberação de DNA após 10 min de interação, com valores de dessorção de 29 % quando é utilizada a solução de fosfato/fosfato, 48 % para a solução de Glicina/NaOH, e de 38 % para a solução de Tris/SDS. Dessa maneira, é possível afirmar que o processo de dessorção ocorre com uma eficiência considerável, e de maneira simples e rápida.

Figura 61 – Dessorção do DNA adsorvido pelo NCM CoFe/PPy para as soluções-tampão: Fosfato/Fosfato (pH 7,8), Glicina/NaOH (pH 9,0) e Tris/SDS (pH 8,0).



4.3.2.2 Isotermas de Adsorção

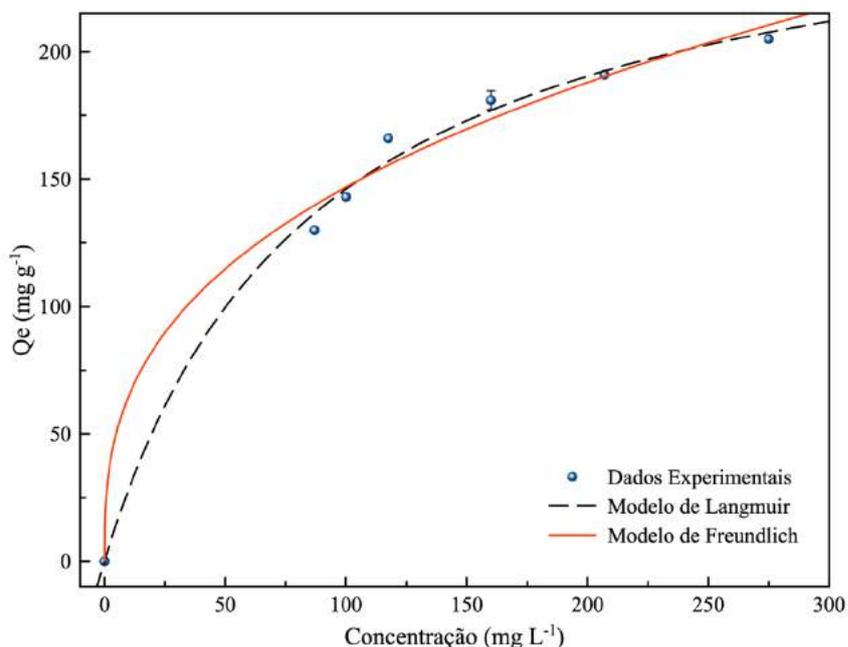
O ajuste de nossos dados a modelos de adsorção teóricos pode não apenas fornecer informações para a compreensão da natureza dos processos que regem a interação entre o adsorvente e o adsorvato a uma dada temperatura, mas também permite uma estimativa da capacidade máxima da capacidade do adsorvente. Por essa razão, neste trabalho usamos os modelos de Langmuir e Freundlich para ajustar os dados experimentais do equilíbrio da adsorção de DNA pelo compósito CoFe/PPy.

Conforme previamente discutido, o modelo de Langmuir descreve fenômenos de adsorção que ocorrem em monocamada por um número finito de sítios (energeticamente homogêneos) em uma superfície homogênea, enquanto o modelo de Freundlich descreve fenômenos de adsorção que ocorrem em multicamadas (energeticamente heterogêneas) em uma superfície heterogênea. As equações linearizadas, variáveis para cada modelo, e a descrição fenomenológica de adsorção, foram previamente descritas na Seção 2.2.2.7. do Capítulo 2.

Na Fig. 62 são apresentados os ajustes dos dados experimentais obtidos a temperatura ambiente e no equilíbrio da adsorção do DNA pelo compósito estudado a cada um dos dois modelos. Como se pode observar pelos ajustes lineares (apresentados na Fig. 63), o modelo de Langmuir é o que melhor descreve o sistema (com um coeficiente de correlação de 0,991), com uma capacidade máxima de adsorção q_e estimada em $270,2 \text{ mg g}^{-1}$, um valor acima daquele obtidos experimentalmente ($205,0 \text{ mg g}^{-1}$). O fato de que esse valor está um pouco acima daquele obtido experimentalmente pode ser um indicativo de que os dados experimentais não teriam atingido o equilíbrio da adsorção. Esses resultados sugerem que o processo de adsorção

do DNA pelo compósito ocorre através da formação de monocamadas compostas por um número finito de sítios energeticamente idênticos.

Figura 62 – Ajuste dos dados experimentais para a adsorção de DNA pelo compósito CoFe/PPy às isotermas de adsorção dos modelos de Langmuir (linha tracejada) e Freundlich (linha contínua).



Na Fig. 63 são apresentados os gráficos dos ajustes lineares dos dados experimentais aos modelos de isotermas estudados. Os valores dos parâmetros de isotermas obtidos para os modelos correspondentes são apresentados de forma resumida na Tabela 12.

Figura 63 – Ajustes lineares dos modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados experimentais de adsorção de DNA pelo CoFe/PPy.

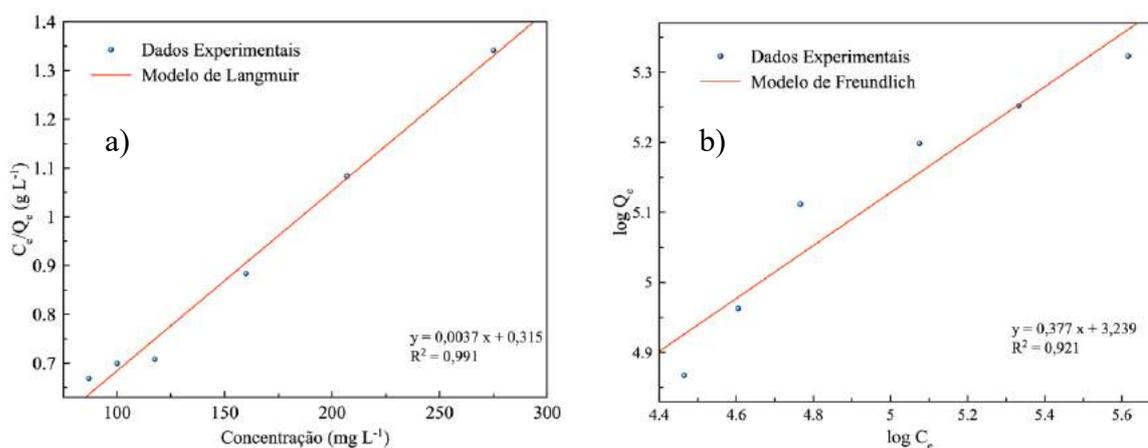


Tabela 12 – Parâmetros de isoterma de Langmuir e Freundlich para adsorção de DNA de salmão pelo CoFe/PPy.

$q_{e, exp}$ (mg/g)	Langmuir			Freundlich		
	K_L (L/mg)	$q_{e, calc}$ (mg/g)	R^2	n	K_F (mg/g)	R^2
205,3	0,011	270,2	0,991	2,652	25,526	0,921

4.3.2.3 Cinéticas de Adsorção

Os ajustes dos dados experimentais obtidos aos modelos teóricos têm por objetivo auxiliar na compreensão dos mecanismos dominantes (sejam eles físicos, químicos ou de difusão) para a adsorção do DNA na superfície do compósito estudado. Para isso, foi utilizado os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Morris-Weber, conforme descrito previamente no Capítulo 2 (Seção 2.2.2.8.)

Nas Figs. 64 e 65 são mostrados os ajustes dos modelos citados acima aos dados obtidos para o compósito CoFe/PPy. Como pode ser visto, o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de pseudo-segunda ordem, com uma capacidade máxima de adsorção q_e estimada como $106,5 \text{ mg g}^{-1}$, que é um valor muito próximo do resultado experimental ($112,3 \text{ mg g}^{-1}$). Com isso, é possível concluir que é a quimissorção o mecanismo dominante do processo de adsorção (Kim *et al.*, 2018), uma vez que ocorre a troca de elétrons entre o compósito e as moléculas de DNA (Ahmad e Kumar, 2010; Wang *et al.*, 2017).

Na Tabela 13 estão sumarizados os parâmetros cinéticos de adsorção calculados de acordo com os três modelos, bem como os respectivos valores do coeficiente de correlação (R^2).

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para a adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPy.

$q_{e, exp}$ (mg/g)	Pseudo-primeira ordem			Pseudo-segunda ordem			Morris-Weber	
	k_1 (min^{-1})	$q_{e, calc}$ (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.min)	$q_{e, calc}$ (mg/g)	R^2	k_{id} (min^{-1})	R^2
106,5	$3,2 \times 10^{-2}$	100,7	0,941	$9,7 \times 10^{-5}$	112,3	0,998	7,51	0,798

Figura 64 – Ajuste dos dados experimentais de adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPy aos modelos cinéticos de adsorção de pseudo-primeira ordem (linha contínua), pseudo-segunda ordem (linha tracejada) e Morris-Weber (linha pontilhada).

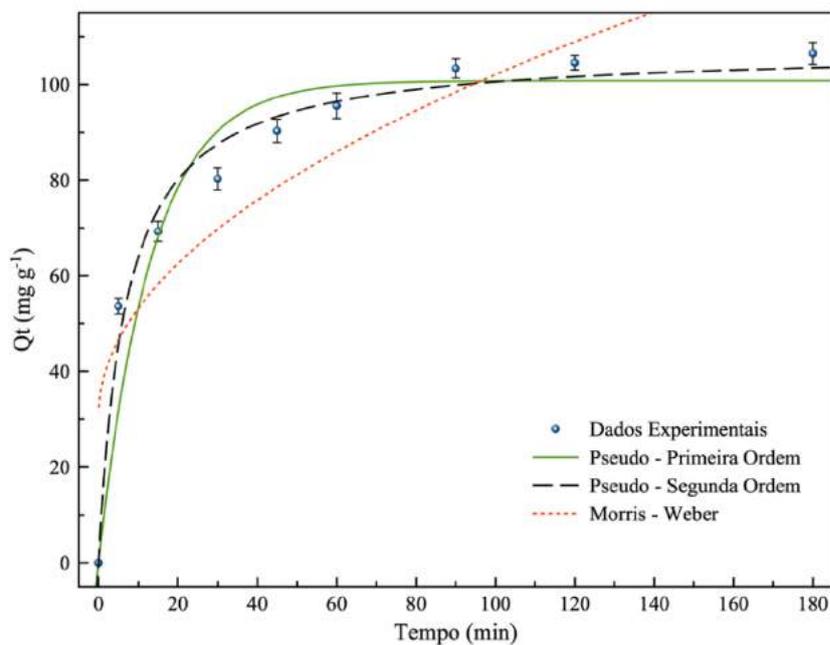
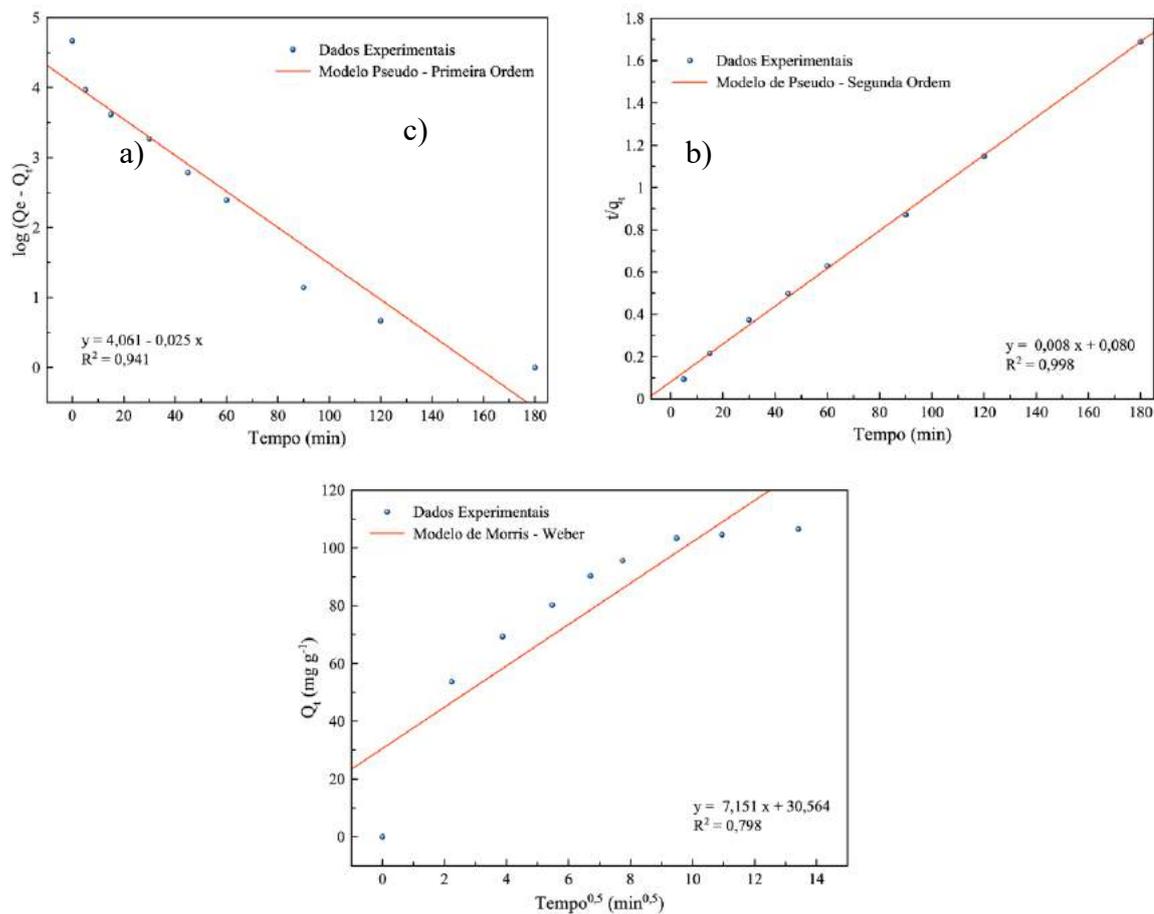


Figura 65 – Ajustes lineares dos dados experimentais de adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPt aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (a), pseudo-segunda ordem (b) e Morris-Weber (c).



4.3.2.4 Comparação do uso das CoFe/PPy com outros adsorventes de DNA

Na Tabela 14, é mostrada de forma resumida uma comparação da capacidade de adsorção do compósito estudado, CoFe/PPy com a de diferentes adsorventes baseados em nanopartículas magnéticas já reportados na literatura. Outros fatores, como o pH do meio em que o processo de adsorção ocorre e o tempo de adsorção, são também listados nessa tabela. Como pode ser observado, o uso do compósito CoFe/PPy em protocolos de extração e purificação de DNA (sistema modelo) se mostra promissor. Mais ainda, o compósito apresentou um valor da capacidade de remoção bastante competitivo face os resultados disponíveis na literatura, como, por exemplo, os reportados por (Sahoo e Liu, 2015; Silva, 2019). No que diz respeito ao tempo de equilíbrio de adsorção e dessorção, podemos observar que, muito embora o compósito não tenha apresentado os melhores resultados, mesmo assim se mostrou vantajoso, com resultados semelhantes aos dos trabalhos reportados por (Maciel *et al.*, 2018; Silva, 2019) e superior ao de (Hu *et al.*, 2015), com tempos de equilíbrio de adsorção de 1200 min. No que diz respeito ao valor de pH da solução de ligação utilizada, deve ser notado ainda que alguns dos outros adsorventes também requerem o uso de pHs mais ácidos (Cai *et al.*, 2006; Saraji, Yousefi e Talebi, 2017; Silva, 2019)

Tabela 14 – Capacidade de adsorção de AM em temperatura ambiente pelo compósito PóNCM-PPY em comparação com diferentes adsorventes reportados na literatura.

Adsorvente	pH	Capacidade de adsorção (mg/g)	Tempo de adsorção/dessorção (min)	Refs.
Au/Fe ₃ O ₄ /PEI	5,0	90	1/20	(Sun <i>et al.</i> , 2010)
MNPs (Ácido bromoacético/acridina)	6,2	181,1	30/ -	(Sahoo e Liu, 2015)
Montmorilonita	2,0	54,3	140/140	(Cai <i>et al.</i> , 2006)
Silica mesoporosa/Fe ₃ O ₄	7,6	121,6	1200/60	(Li, Zhang e Gu, 2011)
NCM de Zircônia	2,0	53,5	5/5	(Saraji, Yousefi e Talebi, 2017)
Polietilenimina/FePO ₄	4,0	61,8	0,5/5	(Hu <i>et al.</i> , 2015)
NCM PEDOT/γ-Fe ₂ O ₃	2,5	248	360/5	(Silva, 2019)
NCM Quitosana/PANI/γ-Fe ₂ O ₃	3,6	45	60/10	(Maciel <i>et al.</i> , 2018)
NCM PANI/γ-Fe ₂ O ₃	3,8	75,2	10/2	(Medina-Llamas <i>et al.</i> , 2014)
CoFe/PPy	2,5	205,3	60/10	Este trabalho

MNPs: nanopartículas com superfície modificadas; PEI: Polietilenimina.

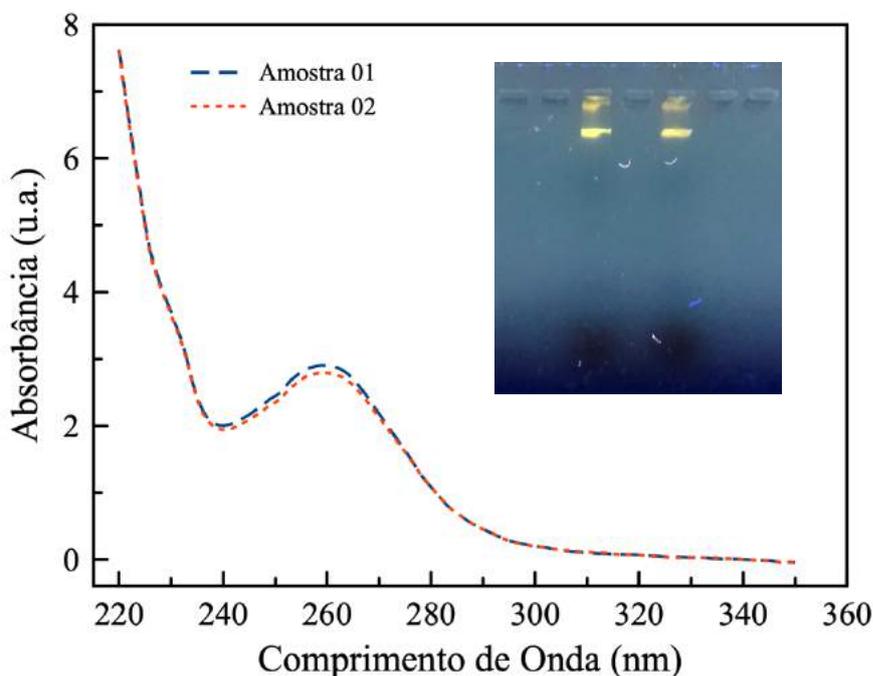
4.3.2.5 Estudos da adsorção de DNA a partir de amostras biológicas complexas

Diante dos resultados de adsorção de DNA pelo NCM CoFe/PPy obtidos para o sistema modelo de uma solução aquosa de esperma de salmão, consideramos então sua utilização como material adsorvente de fase sólida para protocolos de purificação de DNA extraído de amostras reais de natureza mais complexas, como o sangue total humano. O sangue é um fluido biológico composto por plasma e soro, com componentes sólidos que consistem em células vermelhas, glóbulos brancos e plaquetas (Butler, 2009). São amostras complexas, que possuem componentes como a hemoglobina, imunoglobulina e a lactoferrina, que são chamados de inibidores por impedirem a ação da enzima DNA polimerase, o que inviabiliza a utilização direta do sangue total na técnica de PCR (Kermekchiev *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 1990).

Com o intuito de definir um protocolo viável para a purificação de DNA com amostras de sangue, realizamos inicialmente uma busca na literatura associada ao conhecimento anterior do grupo PNC, de modo a desenvolver o protocolo a ser descrito na Seção 3.2.2.8. Com isso, uma primeira prova do conceito foi realizada para verificar a viabilidade da utilização do nanocompósito CoFe/PPy estudado para a purificação de DNA a partir de sangue total.

Na Fig. 66 são apresentados os espectros obtidos após a purificação do DNA com o NCM CoFe/PPy. Pela presença da banda característica do DNA em 260 nm, é possível observar que de fato conseguimos extrair amostras de DNA a partir do sangue humano. Além disso, através dos experimentos de eletroforese (ver detalhe da Fig. 66) pode-se concluir que o DNA purificado se encontra em bom estado, uma vez que uma única banda bem definida é observada. Caso o DNA estivesse degradado ou contaminado, não teríamos a presença de uma banda estreita e bem definida, mas sim uma banda muito larga, ou seja, um rastro, devido à grande distribuição de tamanhos de cadeias de DNA e também à presença de proteínas (Makovets, 2013).

Figura 66 – Espectros UV-Vis para amostras de DNA purificado a partir de sangue total humano utilizando o nanocompósito CoFe/PPy como adsorvente de fase sólida. No detalhe, experimento de eletroforese em gel de agarose (1%) para as mesmas amostras.

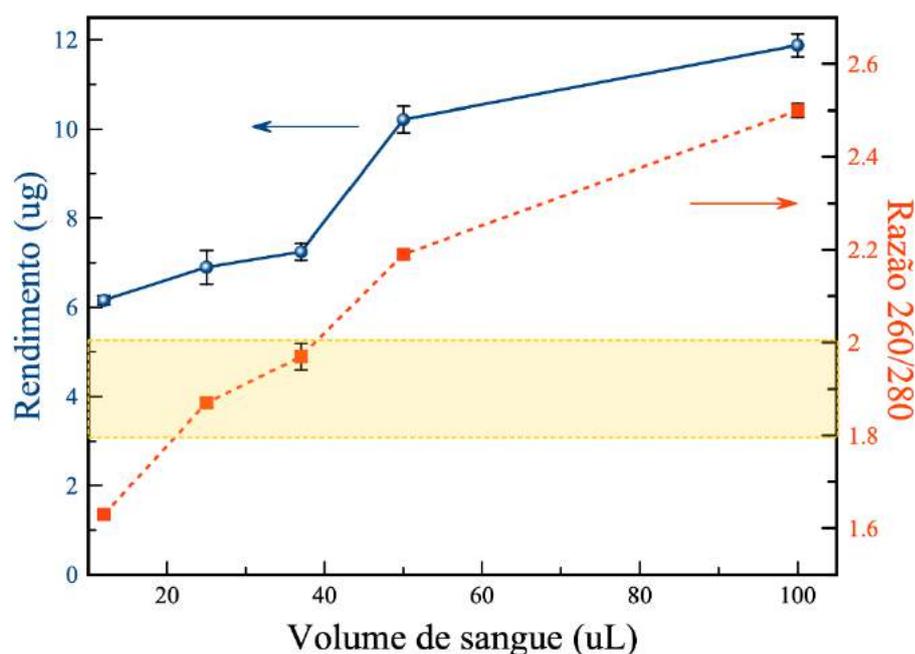


Uma vez verificado que o protocolo proposto permite a purificação de DNA, realizamos a seguir um estudo mais detalhado para sua otimização, cujos resultados são apresentados a seguir.

i) Efeito do volume inicial da amostra

Na Fig. 67 são mostrados os resultados obtidos para o rendimento de DNA purificado e a razão 260/280 em função da quantidade inicial de amostra (volume de sangue). Como se pode observar, conforme o volume de amostra usado aumenta, se torna maior o rendimento de DNA (curva contínua). No entanto, com relação à razão 260/280 (curva pontilhada), vemos que apenas volumes na faixa entre 20 e 40 μL apresentam valores de razão entre 1,8 e 2,0. Como visto anteriormente, essa relação é um indicativo da pureza do DNA, sendo uma amostra de DNA considerada pura quando essa razão se encontra na faixa de 1,8 – 2,0 (Scientific, 2008). Com isso, para volumes de sangue superiores a 40 μL , pode-se começar a observar indícios de contaminação, com a razão 260/280 alcançando valores acima da faixa aceitável de pureza (no caso 2,2 para 50 μL de amostra de sangue). Esse fato pode estar associado à adsorção simultânea de outras moléculas, como RNA, proteínas, carboidratos e entre outros (que absorvem na mesma região), uma vez que, conforme se aumenta a concentração da amostra, aumenta também a concentração de moléculas contaminantes.

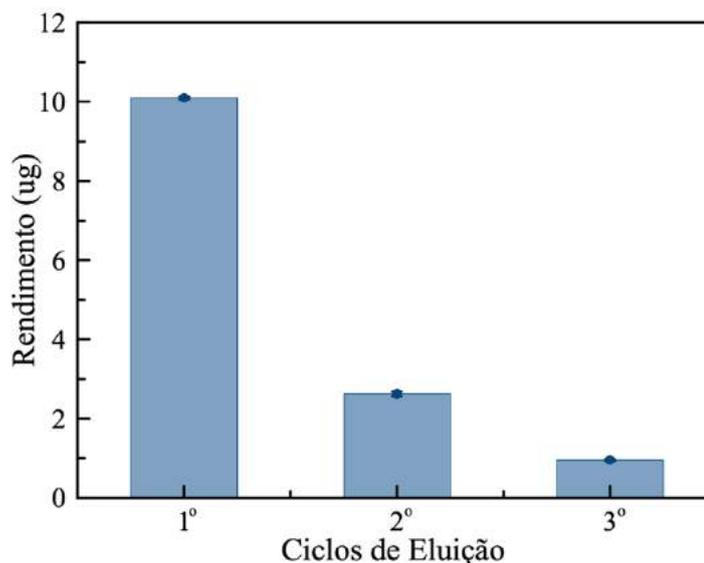
Figura 67 – Variação do rendimento (●) e da razão 260/280 (■) da amostra de DNA em função do volume inicial de sangue humano.



ii) Ciclos de Eluição

Realizamos ainda um estudo complementar correspondente à análise do efeito de múltiplas eluições consecutivas do NCM CoFe/PPy, anteriormente usado no processo de adsorção. Para isso, seguimos o protocolo de purificação de DNA anteriormente descrito, sendo que, três eluições sucessivas da mesma amostra foram realizadas na etapa de dessorção, utilizando um volume de 100 μ L de solução tampão a cada vez. Na Fig. 68, é apresentado o rendimento obtido em cada uma das eluições. Como pode ser observado, os rendimentos totais de DNA são de 10,1 μ L, 2,6 μ L e 0,9 μ L, para o primeiro, segundo e terceiro ciclo de eluição, respectivamente. Muito embora o segundo e terceiro ciclo apresentem um rendimento individual muito menor que o primeiro, ainda levam à coleta de quantidades de DNA que são significativas e podem ser utilizados de forma satisfatória em análises moleculares. Note que nesse experimento o rendimento total passou de 10,1 para 13,6 μ L. Esses resultados nos permitem concluir que quando uma única etapa de eluição é adotada não ocorre a liberação de todas as cadeias de DNA adsorvidas na superfície do NCM CoFe/PPy, e que, pela realização de múltiplas eluições o rendimento final de um único experimento de purificação de DNA pode ser expressivamente aumentado.

Figura 68 – Evolução do rendimento de DNA purificado após múltiplas eluições para uma mesma adsorção.



iii) Ensaios de biologia molecular (PCR)

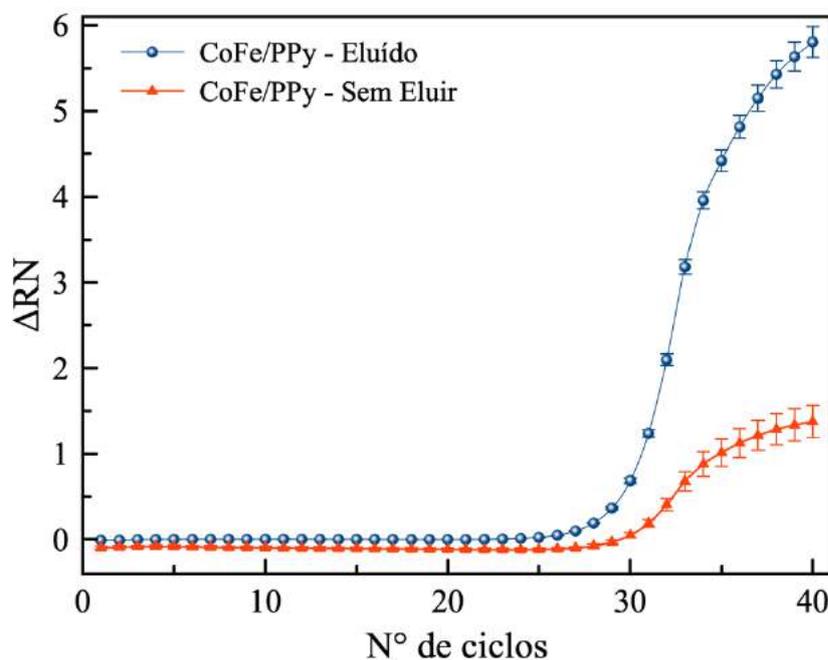
Como mencionado anteriormente, a purificação de moléculas de DNA a partir de amostras biológicas pode encontrar diversas aplicações, como o uso dessas amostras em ensaios e técnicas de biologia molecular para diagnósticos, identificação, sequenciamento, clonagem e pesquisa, para os quais a técnica de PCR é considerada como padrão ouro, devido a sua alta sensibilidade e especificidade. No entanto, essa técnica necessita partir de amostras de boa qualidade, uma vez que existem diversos interferentes que podem impedir o desenvolvimento da reação de amplificação.

Para verificar a eficácia do protocolo de purificação de DNA proposto neste trabalho, utilizamos a técnica de PCR para a comprovação da qualidade do DNA extraído. Para esses experimentos, optou-se pela utilização da técnica de PCR em tempo real para a amplificação de dois tipos de amostras: a primeira, a partir do DNA purificado de acordo com o protocolo da Seção 3.2.2.9 (chamado de CoFe/PPy – eluído), e outra, em que foi adicionada uma pequena quantidade de CoFe/PPy (com o DNA adsorvido), sem que se tenha realizado a etapa prévia de eluição (chamado de CoFe/PPy – sem eluir). Essa técnica de PCR permite acompanhar, em tempo real, a quantidade dos amplicons (produtos da amplificação) na solução de reação por meio do aumento da fluorescência.

Na Fig. 69, apresentamos a curva de amplificação para as amostras citadas (com e sem a etapa da eluição). Como pode ser observado, a amplificação ocorreu com sucesso para ambas as amostras, com um aumento exponencial da intensidade de fluorescência característico ao longo da reação, a partir do ciclo 25 (CoFe/PPy – eluído) para a amostra eluída, e do ciclo 30, para a amostra sem a etapa de eluição (CoFe/PPy – sem eluir). Essa diferença, tanto no início

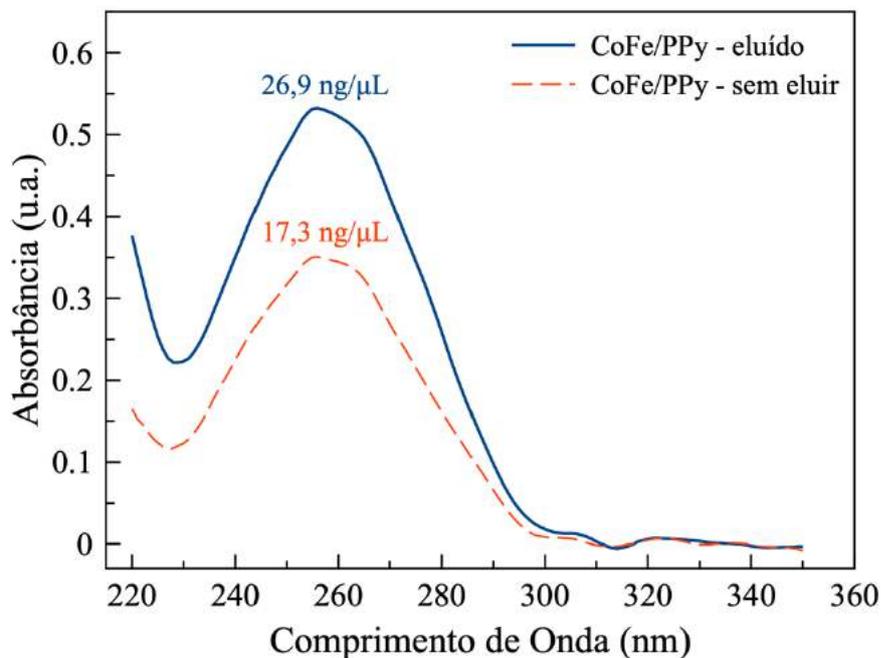
da amplificação quanto a intensidade de fluorescência entre as amostras, está associada com a quantidade de DNA adicionada na reação, uma vez que, para o caso da reação da amostra sem eluição não se teve o controle da concentração inicial.

Figura 69 – Curva de amplificação PCR em tempo real para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano com o NCM CoFe/PPy para as amostras CoFe/PPy – eluído (●) e CoFe/PPy – sem eluir (▲).



Após o término da reação de PCR, as amostras foram purificadas (pelo uso de um kit comercial) e então quantificadas por espectroscopia UV-Vis. Como pode ser observado na Fig. 70, ambas as amostras apresentaram o espectro característico para a adsorção de moléculas de DNA, com uma banda bem definida na região de 260 nm. Além disso, também se observa uma maior concentração de DNA para a amostra que foi submetida à etapa de eluição (CoFe/PPy – eluído), o que corrobora o resultado observado nos experimentos de PCR.

Figura 70 – Espectros UV-Vis para as amostras de CoFe/PPy – eluído (curva contínua) e CoFe/PPy – sem eluir (curva pontilhada) após a amplificação PCR.



Diante dos resultados obtidos, é possível confirmar a boa qualidade e integridade do DNA extraído usando o compósito CoFe/PPy, o que assegura a viabilidade de seu uso em procedimentos de biologia molecular. Outro ponto importante a ressaltar é que o material proposto como adsorvente (CoFe/PPy) não atuou como inibidor da reação de PCR. Dessa forma, a etapa de eluição do protocolo de extração de DNA poderia ser eliminada e, com isso, do ponto de vista operacional, poder-se-ia ter um ganho considerável de tempo.

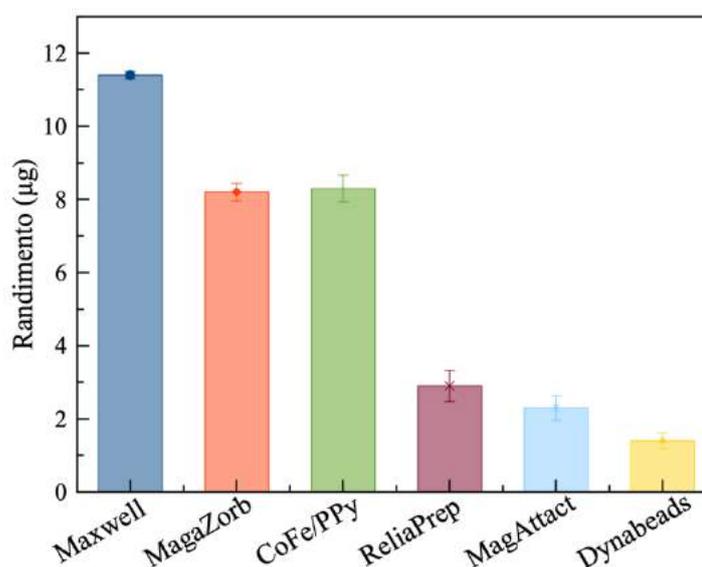
iv) Estudo comparativo com kits comerciais

Resolvemos implementar um comparativo do rendimento e da qualidade do DNA purificado a partir de amostras de sangue com o compósito CoFe/PPy com o de kits comerciais. Para isso, adquirimos cinco kits comerciais para a purificação de DNA a partir de amostra de sangue total. Os kits utilizados foram o Maxwell (Promega, EUA), MagaZorb (Promega, EUA), MagAttract (Qiagen, Alemanha), Dynabeads (Thermo Fisher, EUA) e o Reliaprep (Promega, EUA). Para uma melhor comparação, todos os experimentos foram realizados com o mesmo volume da amostra de sangue (100 μ L), sendo os protocolos utilizados de acordo com as instruções de cada fabricante.

Na Fig. 71, são mostrados os rendimentos obtidos para a extração de DNA a partir de amostras de sangue humano pelo uso dos kits comerciais e do compósito estudado. Como é possível observar, o melhor rendimento foi obtido usando o kit Maxwell, seguido do kit

MagaZorb e do compósito estudado (CoFe/PPy). Os kits MagAttact, Dyaabeads e Realiapreb apresentaram rendimentos os menores, que ficou abaixo de 3 μg . Com isso, pode-se concluir que o compósito CoFe/PPy se mostrou um material competitivo, estando entre os três melhores adsorventes testados.

Figura 71 – Comparação do rendimento do DNA obtido pelo uso do nanocompósito CoFe/PPy com os kits comerciais de purificação de DNA.



4.4 CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados, podemos concluir que foi de fato possível obter uma metodologia eficaz não só para a preparação do nanocompósito magnético híbrido (CoFe/PPy), mas também para sua utilização na extração e purificação de moléculas de DNA, tanto para as moléculas dissolvidas em meio aquoso quanto para amostras biológicas complexas, como o sangue humano. Mostramos que o protocolo proposto é eficiente e que o DNA alvo não se degrada durante os procedimentos adotados.

Neste capítulo, mostramos que o compósito adsorve moléculas de DNA dissolvidas em meio aquoso através de interações dos grupos fosfatos e as cargas positivas presentes nas cadeias do PPy. Através dos estudos de adsorção, nos quais foi variada uma série de parâmetros (como o tempo de interação, o pH do meio, e a concentração inicial de DNA na solução), encontramos que a adsorção ocorre preferencialmente em valores de pH mais baixos, devido à protonação das cadeias poliméricas, onde obtemos uma capacidade de adsorção de 205 mg/g para um período de tempo de 60 min. Além disso, ao compararmos nossos resultados com o de outros adsorventes similares reportados na literatura, verificamos que por sua alta capacidade

de adsorção o compósito estudado se mostrou um material promissor para a extração e purificação de ácidos nucleicos. Os dados experimentais de adsorção foram mais bem descritos pelos modelos de cinética de pseudo-segunda ordem e da isoterma de Langmuir. Pela mudança do pH do meio, verificamos ainda que é possível a dessorção do DNA da superfície do compósito, em um processo simples que leva apenas 10 min.

Por fim, quando se utilizou o compósito CoFe/PPy para a purificação de DNA a partir de amostras de sangue total humano, foi possível comprovar a eficiência do protocolo proposto, em que não se faz necessária a utilização de reagentes tóxicos ou de equipamentos sofisticados. Através das técnicas de PCR e eletroforese, comprovamos que o DNA purificado tem boa qualidade e pureza, o que nos sugere que as amostras purificadas podem ser utilizadas com sucesso em protocolos de biologia molecular, como aqueles baseados no uso de PCR, em procedimentos voltados para diagnósticos moleculares, ou para o desenvolvimento de kits comerciais de purificação de ácidos nucleicos.

Considerando esses resultados, dentre as principais perspectivas em relação a aplicação do compósito de CoFe/PPy, temos:

- i. A implementação de protocolos para outros tipos de amostras biológicas, como saliva, urina, bactérias, vírus e tecido vegetal.
- ii. A implementação protocolos para a extração e purificação de RNA.

5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE UM COMPÓSITO FLUORESCENTE DE PRATA/POLIANILINA

5.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nos últimos anos, uma atenção considerável tem sido dedicada pelos pesquisadores aos polímeros condutores (PCs), devido a suas propriedades únicas, como, por exemplo, combinar as propriedades mecânicas de polímeros com a capacidade de conduzir eletricidade ou exibir fluorescência (Margolis, 1989; Seymour, 1981). Por conta da facilidade de sua síntese e a flexibilidade em seu processamento, os PCs têm sido utilizados para a criação de novos materiais com grande potencial para aplicações variadas. Exemplos importantes são o uso desses polímeros para o desenvolvimento de sensores, capacitores, revestimentos anticorrosivos, eletrodos analíticos, baterias, diodos orgânicos emissores de luz (OLEDS), e até mesmo como agentes terapêuticos (Ates, 2013; Bagotsky, Skundin e Volfkovich, 2015; Janata e Josowicz, 2003; Kim *et al.*, 2013; Medeiros *et al.*, 2012; Medina-Llamas *et al.*, 2014; Nezakati *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva, muitos pesquisadores têm avaliado não apenas as propriedades dos PCs como também seu uso em conjunto com outros tipos de materiais, de modo a otimizar as propriedades resultantes e levar a uma ampliação de sua aplicabilidade. Dentre os materiais utilizados, destaca-se a combinação dos PCs (tal como, a polianilina e o polipirrol) com nanopartículas metálicas, para a formação de materiais compósitos híbridos (metal/PCs) cujas propriedades térmicas, óticas, e elétricas podem vir a ser substancialmente alteradas em virtude da sinergia resultante da interação entre as cadeias poliméricas e as nanopartículas metálicas (Liu *et al.*, 2013; Stejskal, 2013). De fato, essas mudanças nas propriedades, relativamente a aquelas dos componentes quando em separado, possibilitam a utilização dos compósitos metal/PC em sensores e biossensores, com atividade catalítica ou eletrocatalítica, no diagnóstico molecular, e em imageamento biológico, marcadores biológicos e eletrônica em nanoescala (Baker *et al.*, 2011; Gorza *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2014; Liu, A. *et al.*, 2012; O'mullane *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2013; Uyguna e Aslan, 2010).

A polianilina (PANI) tem sido frequentemente escolhida para a preparação de compósitos híbridos devido a seu baixo custo, facilidade de síntese, boa estabilidade química e ambiental, e possibilidade de alterar suas propriedades de transporte de carga por meio de um processo de protonação. Na literatura, é possível encontrar estudos que investigam a interação da PANI com diferentes nanopartículas metálicas, como cobre, prata, ouro, níquel e lítio, entre outros. Como exemplo, podemos citar os trabalhos desenvolvidos por (Hassan, Ajeel e Mohammed, 2019; M. Reda e M. Al-Ghannam, 2012), que avaliaram mudanças resultantes da incorporação de

diferentes nanopartículas de prata em uma matriz de polianilina, e que dependem do tamanho e da forma da nanoestrutura obtida. Um estudo semelhante, realizado por (Uygun e Aslan, 2010), avaliou a condutividade dos compósitos de Cobre/Polianilina e Níquel/Polianilina, preparados por diferentes métodos de síntese.

De modo geral, a preparação desses compósitos se faz pela incorporação de nanopartículas metálicas (previamente sintetizadas) em uma matriz polimérica (Hung, Wen e Wei, 2010). No entanto, alguns estudos revelavam que é possível obter compósitos de metal/PCs através da síntese em uma única etapa, na qual a formação das nanopartículas metálicas e a polimerização do monômero ocorrem de forma simultânea (Lorestani *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2013; Stejskal, 2013). Na metodologia descrita por (Santos *et al.*, 2013), por exemplo, a redução do ácido tetracloroáurico (HAuCl_4^-) ocorre ao mesmo tempo que a anilina é oxidada, o que resulta na formação simultânea das nanopartículas de ouro e a matriz polimérica. Por sua vez, no trabalho de (Bober *et al.*, 2014) a oxidação da anilina ocorre pela redução de sais de prata, de modo que a formação do compósito de Ag/Polipirrol se origina da oxidação bem-sucedida da anilina com os íons de prata.

Neste capítulo, mostraremos em detalhes os procedimentos para a preparação e caracterização de compósitos Ag/Polianilina que exibem propriedades fluorescentes significativas na região do visível, com um rendimento quântico na ordem de 10%. Além disso, com base nos estudos anteriores do grupo, nos propusemos a verificar alguns aspectos de biocompatibilidade do compósito estudado, para que assim fosse possível direcionar uma aplicação biológica segura.

5.1.1 Polímeros Condutores – Polianilina

Como mencionando anteriormente no Capítulo 2, os polímeros condutores têm sido amplamente estudados devido as suas propriedades elétricas, magnéticas e óticas, que se assemelham às dos metais e semicondutoras, o que permite sua aplicação nas mais variadas áreas. Nos capítulos anteriores, estudamos as propriedades dos polímeros Polipirrol, Quitosana e Alginato, bem como o comportamento dos mesmos na produção e aplicação de compósitos híbridos. Neste capítulo, serão estudadas as propriedades da polianilina, com o intuito de melhor compreender e aperfeiçoar a produção, caracterização e a aplicação do compósito (Ag/Polianilina).

5.1.1.1 Polianilina

A polianilina (PANI) é um polímero condutor obtido através da polimerização do monômero de anilina. Nos últimos anos, tem-se destacado entre os polímeros condutores

devido a sua facilidade de síntese, baixo custo de seu monômero, boa estabilidade química e ambiental, elevada condutividade e facilidade de dopagem (Mattoso, 1996). Estas propriedades fazem da polianilina um polímero promissor para inúmeras aplicações tecnológicas, sendo inclusive, já empregado há muito tempo na indústria, como em transistores de efeito de campo, separação de biomoléculas, sensores, supercapacitores, e células solares, entre outros exemplos (Bhadra *et al.*, 2009; França e Dall'Antonia, 2007; Mendes *et al.*, 2017; Mostafaei e Zolriasatein, 2012).

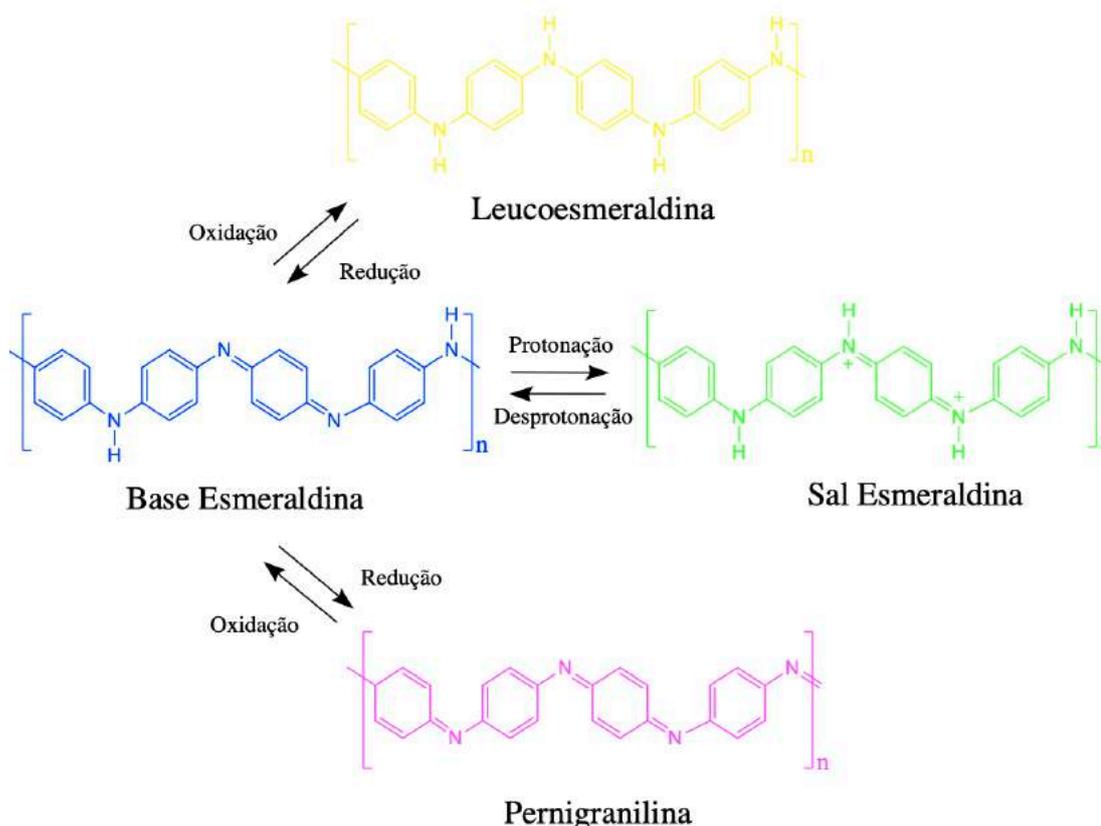
Como o polipirrol, a PANI pode ser sintetizada através da oxidação química ou eletroquímica, com a escolha do método a ser utilizado a depender da aplicação pretendida. Na síntese química, a polimerização da anilina se dá pelo uso de agentes oxidantes, como o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, MnO_2 , Cr_2O_4 , H_2O_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KClO_3 , e meios ácidos. Já na síntese eletroquímica, um potencial é aplicado na solução, através de um eletrodo de metal, para produzir a oxidação dos monômeros de anilina (Boeva e Sergeyev, 2014).

A polianilina é formada por unidades repetidas das espécies reduzidas e oxidadas, sendo essas unidades compostas por anéis aromáticos e/ou quinonas, ligados entre si por átomos de nitrogênio. Diferentemente dos demais polímeros condutores, a PANI pode apresentar diferentes estados de oxidação em sua cadeia (Fig. 72), sendo eles o: i) totalmente reduzido (leucoesmeraldina), em que os anéis benzênicos estão ligados entre si pelos nitrogênios amina em sua composição; ii) totalmente oxidado (pernigranilina), formado por anéis benzênicos e quinoides ligados por meio de iminas; e iii) parcialmente oxidado (sal e base esmeraldina), em que coexistem o mesmo número de grupos reduzidos e oxidados (Chiang e MacDiarmid, 1986; Epstein *et al.*, 1987).

É interessante ressaltar que, em sua forma base esmeraldina, a polianilina pode ser dopada sem que ocorra alteração no número de elétrons associados à cadeia polimérica pelo processo de protonação, através do uso de ácidos protônicos (como o HCl), onde os contraíons (X^-) se posicionam entre as cadeias poliméricas, de modo a estabilizar a carga. Esse processo altera o estado de oxidação da polianilina, transformando-a de base esmeraldina (isolante) em sal esmeraldina (condutora). Como pode ser observado na Fig. 72, essa reação de protonação ocorre nos grupos iminas ($-\text{N}=\text{}$) ao longo da cadeia e é responsável pela formação dos portadores de carga (pólarons e bipólarons) (Boeva e Sergeyev, 2014; Medeiros *et al.*, 2012). Isso ocorre porque a protonação provoca uma despopulação parcial do sistema de elétrons π , o que, por sua vez, cria estados eletrônicos localizados no meio do "band gap" devido a distorções na cadeia polimérica em torno das cargas geradas (Huang e MacDiarmid, 1993). Desse modo, quando um campo elétrico é aplicado, o transporte de carga pode ocorrer através do deslocamento dos pólarons e bipólarons ao longo da cadeia, o que se faz possível pela fácil

reorganização das ligações alternadas (Margolis, 1989). Em seu estado não dopado, a polianilina é considerada um isolante, com um gap da ordem de 3,8 eV; no entanto, após o processo de protonação (dopagem), sua condutividade pode ter um aumento de 10 a 12 ordens de magnitude (Epstein *et al.*, 1987; Sariciftci *et al.*, 1989).

Figura 72 – Estrutura química da polianilina em seus estados de oxidação.



Fonte: Autoria própria (2020).

Outra característica interessante da PANI é que não apenas suas propriedades elétricas, mas também suas propriedades óticas, mudam de acordo com os estados de oxidação. Assim, as formas leucoesmeraldina, pernigranilina, base esmeraldina e sal esmeraldina apresentam cores específicas, sendo elas amarelo, violeta, azul e verde, respectivamente (Watanabe *et al.*, 1987). Devido a essas propriedades e, principalmente, pelo simples processo de dopagem e desdopagem (protonação/desprotonação), a polianilina vem sendo objeto de diversos estudos e pesquisas, possibilitando não só o completo entendimento de suas propriedades, mas também a sua aplicação nas mais variadas áreas.

5.1.2 Fenômeno da Fotoluminescência

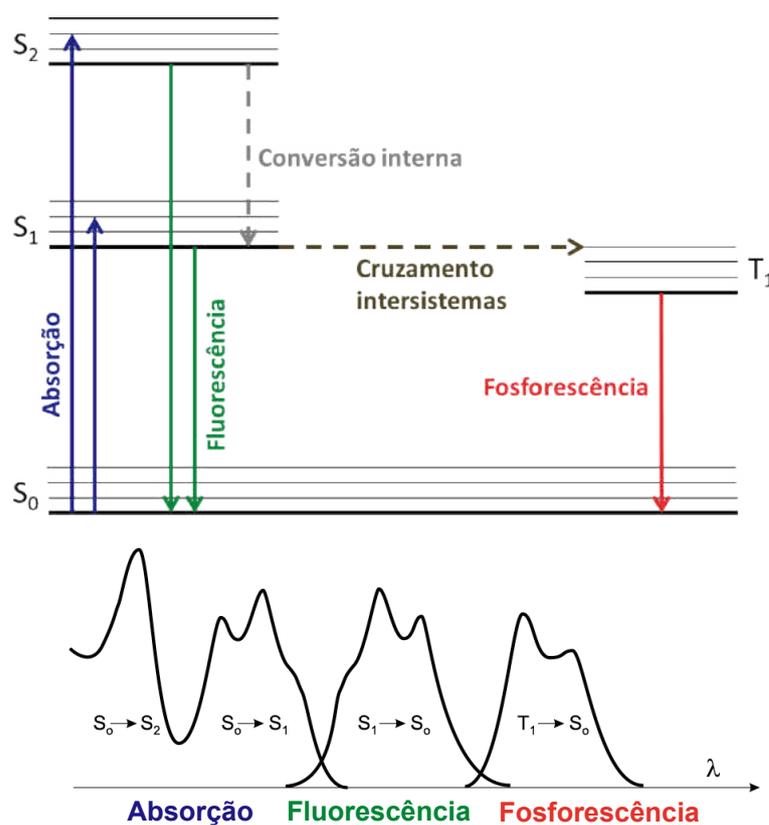
Luminescência é o fenômeno no qual um material (ou substância), sob condições específicas, emite luz quando submetido a algum estímulo de excitação, como luz, reação química, radiação ionizante. Em condições normais, a maior parte das moléculas se encontra no nível energético vibracional mais baixo, seu estado fundamental. No entanto, ao ocorrer a excitação por um dado estímulo, a energia absorvida promove elétrons de um nível de menor energia para um outro nível de mais alta energia. Como a molécula excitada é energeticamente instável e o sistema tende a permanecer em seu estado de menor energia, os elétrons que foram excitados buscam retornar ao seu estado fundamental de menor energia. Durante o retorno, parte da energia absorvida pode ser reemitida através da liberação de um fóton de luz (Valeur, 2001). Por sua vez, os fótons emitidos possuem energia menor ou igual a aquela do fóton recebido, devido a processos de dissipação de energia.

A luminescência pode ser classificada de acordo com o estímulo envolvido. São exemplos dessa classificação, a quimioluminescência (estímulo químico), a bioluminescência (estímulo bioquímico), a termoluminescência (estímulo térmico), a sonoluminescência (estímulo sonoro), a eletroluminescência (estímulo elétrico) e a fotoluminescência (estímulo luminoso) (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001; Valeur e Berberan-Santos, 2011).

A fotoluminescência é o fenômeno no qual os elétrons são excitados por fótons, usualmente fontes de luz monocromáticas (como lasers e lâmpadas seguidas de monocromadores). De maneira geral, a fotoluminescência pode ser classificada de acordo a duração do fenômeno, sendo chamada de fosforescência quando a emissão de luz se dá por um tempo prolongado, de uma ordem entre 10^{-3} a 10^0 s, e de fluorescência, quando o tempo de decaimento da intensidade de emissão é pequeno, da ordem de 10^{-9} a 10^{-7} s (Lakowicz, 2006). Essa diferença pode ser atribuída aos diferentes processos que ocorrem entre a absorção e emissão de luz, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo (Mondal e Diaspro, 2014; Murthy e Virk, 2014).

Para melhor entendimento deste fenômeno, geralmente se utiliza o Diagrama de Jablonski, descrito pela primeira vez no ano de 1935 por Alexandre Jablonski, que mostra de forma conveniente os vários processos quânticos que ocorrem em estados excitados, tais como a conversão interna, o cruzamento intersistema, a fosforescência, as transições tripleto-tripletto e a fluorescência (Murthy e Virk, 2014; Valeur, 2001). Por sua vez, esses processos podem ser divididos em radioativos e não radioativos.

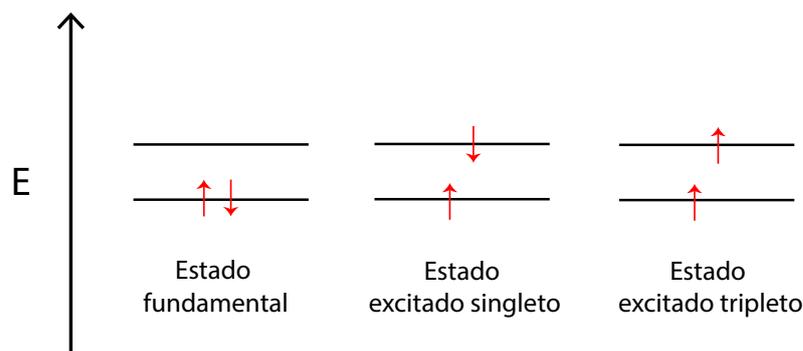
Figura 73 – Diagrama simplificado de Jablonski.



Fonte: Adaptado de (Lakowicz, 2006).

Como pode ser observado na Fig. 73, o diagrama é composto pelos estados eletrônicos singletos, representados por S₀ (estado eletrônico fundamental), S₁ (primeiro estado eletrônico singlete excitado), e S₂ (segundo estado eletrônico singlete excitado), os estados eletrônicos tripletos (T₁, T₂) e os níveis vibracionais associados a cada estado (também chamados de subníveis). Os estados singlete e tripleto são definidos de acordo com sua multiplicidade, a qual pode ser representada pela equação $m = 2S + 1$, onde S é definido como o momento angular total de spin ($S = \sum S_i$, com $S_i = +\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$). Se a orientação do spin do elétron excitado permanece inalterada (ou seja, ele continua emparelhado com o elétron que permaneceu no estado fundamental), o momento de spin resultante é igual a zero e a multiplicidade nesse estado igual a 1, o que caracteriza o chamado estado excitado singlete. No entanto, se ao ser promovido para um orbital de maior energia o elétron excitado tem sua orientação do spin alterada (por exemplo, um elétron com orientação “down” ($-\frac{1}{2}$) ao ser excitado passa para a orientação “up” ($+\frac{1}{2}$)), o momento de spin resultante é igual a 1 e multiplicidade igual a 3, constituindo o chamado estado excitado tripleto. Na Fig. 74 é possível observar a representação dos estados singletos e tripletos (Lakowicz, 2006; Valeur, 2001).

Figura 74 – Representação dos estados fundamental, excitado singlete e excitado tripleto.



Fonte: Autoria própria (2020).

Quando há absorção de fótons, o que é representado no diagrama por setas verticais, os elétrons localizados no nível de mais baixa energia (S_0) da molécula ganham energia e passam a ocupar um estado excitado singlete S_n , onde, a depender da intensidade de energia absorvida, n pode assumir valores iguais a 1, 2, 3, etc. Esse excesso de energia pode ser dissipado por diferentes processos de desexcitação (Lakowicz, 2006; Turro, 1991; Valeur, 2001):

- **Relaxamento Vibracional:** Após a molécula ser excitada para níveis mais elevados (S_n), a energia excedente é dissipada de maneira não radiativa. A molécula se desativa, por relaxamento, de modo que os elétrons excitados decaem através dos níveis vibracionais do estado eletrônico de mesma multiplicidade até atingir o primeiro nível vibracional do estado excitado de mais baixa energia. Esse processo tem a duração típica de aproximadamente 10^{-12} s e independe do comprimento de onda de excitação. Em solução, o excesso de energia vibracional se dissipa através das colisões entre as moléculas excitadas e as do solvente.
- **Conversão Interna (CI):** É uma transição não radiativa entre dois estados de mesma multiplicidade de spin. Como os elétrons excitados se encontram agora no menor nível vibracional do estado S_n , a molécula pode passar para o estado S_{n-1} de menor energia. Por exemplo, se a diferença de energia entre o primeiro estado excitado singlete (S_1) e o estado singlete fundamental (S_0) não for muito grande, de modo que seus níveis vibracionais se sobreponham, a molécula pode ser levada ao mais baixo nível vibracional de S_1 por relaxamento vibracional sem emissão de radiação eletromagnética, ou seja, ocorre uma CI. No entanto, se a diferença energética entre S_1 e S_0 for relativamente grande, a desativação para o estado fundamental ocorre pela emissão de radiação na forma de fluorescência.
- **Fluorescência:** É a emissão de luz a partir da transição de um estado excitado singlete (no qual o elétron excitado não muda de orientação de spin) para um do estado singlete fundamental. Essa transição respeita a regra de simetria de spin, sendo por isso permitida, e ocorre rapidamente via emissão de um fóton, com uma taxa de emissão de fluorescência

tipicamente da ordem de 10^{-8} s. Geralmente, essa transição ocorre a partir do primeiro estado singleto excitado (S_1) e suas características independem da temperatura e do comprimento de onda de excitação. Como pode ser observado na Fig. 73, a energia de absorção é maior que a energia de emissão, o que ocorre por causa da perda de energia no estado excitado devido à relaxação vibracional. Esse comportamento, observado de maneira universal para todas as moléculas fluorescentes em solução, foi relatado primeiramente por George Stokes, nos anos 1880, e é chamado de deslocamento Stokes (Murthy e Virk, 2014).

- **Cruzamento Intersistema (CIS):** Uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes. Nesse processo, uma molécula excitada no nível vibracional mais baixo de S_1 pode se rearranjar em um nível vibracional de mesma energia, mas correspondente a um estado tripleto T_n . Por sua vez, estando no estado vibracional mais energético T_n , a molécula pode passar para o nível vibracional mais baixo (T_1) através de processos de conversão interna e relaxação vibracional. Os processos de CIS podem ser rápidos o suficiente ($10^{-7} - 10^{-9}$ s) para competir com os outros caminhos de desexcitação a partir de S_1 (como a fluorescência e a CI). Muito embora o cruzamento entre estados de multiplicidade diferentes seja em princípio proibido, quando o acoplamento spin-orbita entre o momento magnético orbital e o momento magnético do spin é grande, esse processo pode vir a acontecer.
- **Fosforescência:** É a emissão de luz a partir de um estado excitado tripleto (no qual o elétron excitado muda a orientação de spin). Deste modo, as transições do estado excitado para o estado fundamental são proibidas pela regra de multiplicidade de spin, e só são observadas devido ao acoplamento spin-órbita. Por isso, as taxas de emissão de fosforescência são mais lentas, estando compreendidas na faixa entre 10^3 e 10^0 s. Em temperatura ambiente, a emissão de fluorescência não é comumente observada em solução, quando os processos de desexcitação não radioativos são favorecidos. No entanto, em temperaturas baixas ou em meios rígidos, a fosforescência pode ser observada, uma vez que o tempo de vida do estado tripleto pode ser longo o suficiente para que a emissão ocorra.

Como podemos observar na Fig. 74, quando comparado com o espectro de fluorescência, o espectro de fosforescência é localizado em comprimentos de onda maiores. Isso ocorre porque a energia do nível vibracional mais baixo do estado tripleto (T_1) é menor que a do estado singleto S_1 (Turro, 1991; Valeur, 2001). Além disso, também é possível concluir que a fluorescência é um fenômeno luminescente mais comum do que a fosforescência, uma vez que os processos de desativação não radiativos do estado excitado competem com a emissão da fosforescência. Como consequência, é possível observar mais facilmente a aplicação da técnica de fluorescência em áreas como a biotecnologia, citometria de fluxo, diagnósticos médicos,

sequenciamento de DNA, forense, imagem celular, análise genética e entre outras (Lakowicz, 2006; Mondal e Diaspro, 2014).

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

Os reagentes utilizados para a síntese e a caracterização do compósito de Ag/Polianilina estão listados na Tabela 15. Todos os reagentes, de grau analítico ou molecular, foram utilizados como adquiridos, com exceção da anilina que foi destilada sob pressão reduzida antes do uso. Em todos os experimentos foi usada água ultrapura obtida após tratamento em um sistema Synergy 185 (Millipore, EUA). Quando necessário, o pH das soluções do compósito foi ajustado pela adição de quantidades apropriadas de hidróxido de sódio e ácido clorídrico.

Tabela 15 – Lista de reagentes utilizados.

Reagente	Fabricante/Fornecedor
Anilina	Nuclear, Brasil
MPTS	Sigma-Aldrich, EUA
Nitrato de Prata	Sigma-Aldrich, EUA
Etanol	Química Moderna, Brasil
HCl	Química Moderna, Brasil
NaOH	Química Moderna, Brasil
Sulfato de Quinina	Sigma-Aldrich, EUA
Ludox	Sigma-Aldrich, EUA

5.2.1.1 Síntese do compósito Ag/Polianilina

O compósito de Ag/Polianilina foi produzido pelo método de oxidação química *in situ* da anilina, segundo o processo estabelecido por (Santos *et al.*, 2013), com modificações no que concerne ao tipo de agente metálico utilizado. Com o objetivo de estudar e otimizar as propriedades físico-químicas do compósito, foi implementando um planejamento fatorial (2^3) no qual as concentrações dos três reagentes, nitrato de prata (AgNO_3), anilina, e 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTS), foram variadas de maneira controlada. Para cada reagente utilizado, foram atribuídos dois níveis, relativos à menor (-) e à maior (+) concentração escolhida, como disposto na Tabela 16. No planejamento fatorial de 2^3 , são testadas as combinações de dois níveis com os três fatores escolhidos (neste caso, a Prata, a Anilina e o MPTS), resultando em 8 possíveis experimentos, conforme listado na Tabela 17, sendo então avaliadas as respostas correspondentes ao produto da reação. A escolha do planejamento

fatorial se deveu à possibilidade que essa técnica oferece de permitir a avaliação das influências das variáveis experimentais escolhidas, e dos efeitos de suas interações, sobre as respostas de interesse.

Tabela 16 – Fatores e níveis adotados no planejamento para a síntese do compósito de Ag/Polianilina.

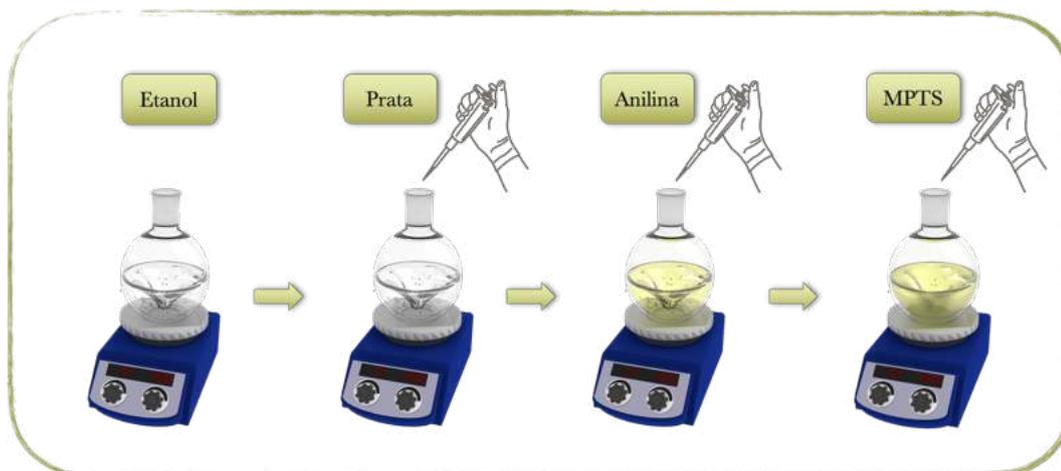
Fatores	Nível de volume adicionado (μL)		Nível de concentração (mol/L)	
	-	+	-	+
Prata	18	36	0,00027	0,00055
Anilina	14	28	0,015	0,031
MPTS	50	100	0,027	0,054

Tabela 17 – Matriz de coeficiente de contraste do planejamento fatorial 2^3 para a síntese do compósito de Ag/Polianilina.

Experimento	Prata	Ani	MPTS
Amostra 01	-	-	-
Amostra 02	+	-	-
Amostra 03	-	+	-
Amostra 04	+	+	-
Amostra 05	-	-	+
Amostra 06	+	-	+
Amostra 07	-	+	+
Amostra 08	+	+	+

Para a síntese, 10 mL de etanol P.A. foram colocados em um balão de fundo redondo de 25 mL, ao qual foram adicionados o nitrato de prata (AgNO_3), a anilina (ANI), e o MPTS, nessa ordem e nas quantidades listadas na Tabela 17. Essa mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 72h. Na Fig. 75 são mostradas as etapas de preparação do compósito Ag/Polianilina.

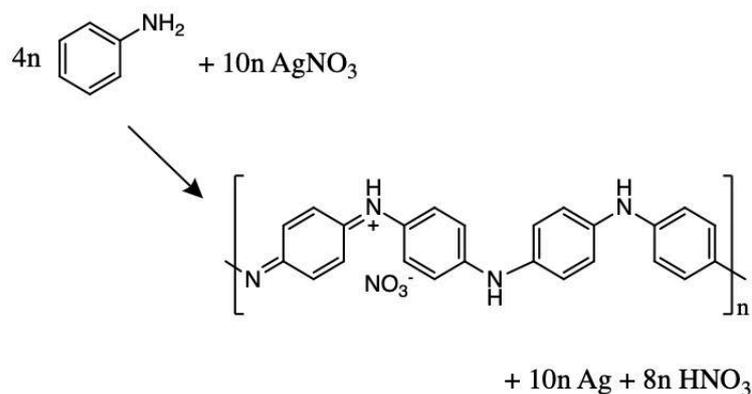
Figura 75 – Representação esquemática da preparação do compósito Ag/Polianilina.



Fonte: Autoria própria.

Nessa síntese, a formação do compósito de Ag/Polianilina ocorre através da oxidação dos monômeros da anilina pelo nitrato de prata, como mostrado na Fig. 76 (Stejskal, 2013). Inicialmente, a oxidação da anilina origina oligômeros de anilina, como dímeros e tetrâmeros, os quais, por sua vez, atuam como centros de iniciação para o crescimento das cadeias da PANI. Desse modo, o nitrato de prata atua como agente oxidante da anilina (com potencial de oxidação de + 0,8 V) e como precursor metálico, conduzindo a formação das nanopartículas de prata (através da redução do íon $\text{Ag}^{+2} \rightarrow \text{Ag}^0$) e da PANI simultaneamente (Bober *et al.*, 2014; Stejskal, 2013; Stejskal e Trchová, 2012). Devido ao baixo potencial oxidativo, a formação dos compósitos de Ag/Polianilina é lenta, de modo que o período de indução pode variar de dias a semanas (Blinova *et al.*, 2009; M. Reda e M. Al-Ghannam, 2012); no entanto, muitos autores sugerem a utilização da irradiação da luz UV para acelerar o processo (M. Reda e M. Al-Ghannam, 2012).

Figura 76 – Mecanismo de síntese do compósito Ag/Polianilina.



Ao serem formadas, as nanopartículas de prata tendem a se agregar devido às interações eletrostáticas. Por essa razão, se faz necessário um agente estabilizador para separá-las, de modo que as nanopartículas metálicas fiquem dispersas dentro da matriz polimérica. Na síntese adotada neste trabalho, o 3-mercaptopropiltrimetoxisilane (MPTS) foi utilizado como agente estabilizador das NPs, devido à alta afinidade entre os grupos tiol ($-SH$), presentes na composição do composto, e os metais (como o ouro, a prata, e o cobre) (Hatton *et al.*, 2003).

5.2.2 Métodos de Caracterização

5.2.2.1 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)

Após as amostras do compósito de Ag/Polianilina terem sido obtidas através do planejamento fatorial, seus espectros de absorção na região do ultravioleta-visível foram coletados em um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão), na faixa de 200 – 1200 nm e com resolução de 2 nm. Para as análises, uma alíquota de 30 μ L de amostra foi diluída em 3 mL de etanol P.A. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

5.2.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O equipamento NanoBrook (Brookhaven Instruments, EUA), sob a responsabilidade do Professor André Galembeck (DQF-UFPE) foi usado para a determinação do tamanho médio do compósito Ag/Polianilina sintetizados, através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Para as análises, as amostras foram diluídas em etanol P.A., onde uma alíquota de 10 μ L de amostra foi adicionada em 3 mL de etanol P.A. e homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de poliestireno com caminho ótico de 1 cm.

5.2.2.3 Potencial Zeta (ζ)

Ao entrar em contato com um líquido, os materiais macroscópicos ou particulados adquirem carga elétrica em sua superfície, devido à adsorção e dessorção de íons. A presença destas cargas dá origem a uma dupla camada elétrica, que consiste numa região de contra-íons adsorvidos e uma região denominada difusa, com a distribuição dos íons sendo determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico (Vasconcelos, Pereira e Fonseca, 2005).

Devido a essas cargas, quando um campo elétrico (E) é aplicado, as partículas se movem em direção ao eletrodo de carga oposta, com velocidade (V_s) proporcional ao campo elétrico aplicado e a mobilidade eletroforética (μ_e), conforme a equação

$$V_s = \mu_e E. \quad (4.16)$$

Com isso, ao se aplicar o campo elétrico obtém-se uma medida de velocidade e, a partir desta, a mobilidade. Por sua vez, de posse dos valores da mobilidade das partículas, é possível obter uma relação com seu potencial zeta, através do uso de modelos como o de Huckel e o de Smoluchowski (Vasconcelos, Pereira e Fonseca, 2005). Estes modelos (que resultam de dois limites clássicos) dependem do produto kR entre o parâmetro de Debye (k , a espessura da dupla camada elétrica) e o raio da partícula (R) (Cerrutti, 2005; Vasconcelos, Pereira e Fonseca, 2005). O modelo de Huckel é utilizado para partículas esféricas, quando $kR < 0$, ou seja, é pequena a espessura da camada elétrica, há baixa concentração de eletrólitos, e as partículas são pequenas; para esse caso, o potencial de uma superfície carregada decresce gradualmente com a distância. Já o modelo de Smoluchowski é utilizado para partículas coloidais, dispersas em água ou em líquidos polares, quando $kR > 0$, e as partículas são maiores, de formas variadas e para altas concentrações de eletrólitos. Portanto, existem duas expressões para descrever a relação entre a mobilidade da partícula (μ_e) e o potencial zeta (ζ), que podem ser escritas como

$$\mu_e = C \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}, \quad (4.17)$$

onde η é a viscosidade do fluido, ε é a permissividade do meio e C é uma constante cujo valor numérico depende da magnitude de kR .

A determinação da carga superficial do compósito estudado foi realizada através de medidas de potencial zeta (ζ). As análises foram realizadas a partir das soluções de Ag/Polianilina, pelo uso do equipamento NanoBrook (Brookhaven Instruments, EUA), do Professor André Galembeck. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de poliestireno com caminho ótico de 1 cm e usando um eletrodo para sistemas aquosos.

5.2.2.4 Espectroscopia de transformada de Fourier

A técnica de espectroscopia por infravermelho pode ser utilizada para obter informações sobre a composição química tanto das nanopartículas quanto dos nanocompósitos preparados. Conforme descrito no Capítulo 1, os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (compreendida no infravermelho médio) foram obtidos usando um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão) com resolução de 4 cm^{-1} e uma média de 64 varreduras. As amostras foram preparadas utilizando pastilhas de KBr; para isso, foi depositado um volume $10 \mu\text{L}$ de amostra em 50 mg de KBr e, após a completa evaporação

do solvente, a amostra foi homogeneizada e macerada com o auxílio de um almofariz de ágata. Por fim, a amostra misturada com o KBr foi levada a um pastilhador por 10 min sob 2 toneladas.

5.2.2.5 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência do compósito estudado (Ag/Polianilina) foram obtidos usando um espectrofotômetro de fluorescência FluoroLog-3 (Horiba, EUA) com fonte de excitação de lâmpada contínua de xenônio (450 W). Para as análises, o comprimento de onda de excitação foi variado no intervalo de 200 – 400 nm, com o com o espectro de emissão sendo coletado no intervalo de 200 – 800 nm. As fendas de excitação e emissão tiveram abertura de 2 mm, e as varreduras foram efetuadas com passo de 1 nm. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm, sendo as medidas coletadas à temperatura ambiente ($T = 23^{\circ}\text{C}$).

5.2.2.6 Rendimento Quântico

O rendimento quântico de um material é definido como a razão entre o número de fótons emitidos (n_{em}) e o número total de fótons absorvidos (n_{abs}). Dentre as técnicas descritas na literatura para a determinação do rendimento quântico, o método óptico relativo (Crosby e Demas, 1971; Grabolle *et al.*, 2009; Williams, Winfield e Miller, 1983) é o mais utilizado, por conta de sua simplicidade. Proposto por (Williams, Winfield e Miller, 1983), esse método consiste na determinação do rendimento quântico de um material através da comparação com um composto específico cujo rendimento quântico seja precisamente conhecido e que atenda alguns critérios como estabilidade, amplos espectros de absorção e emissão, emissão não polarizada, entre outras características (Grabolle *et al.*, 2009).

Neste método, os valores do rendimento quântico são calculados através de uma relação matemática que permite relacionar as propriedades espectroscópicas do material desconhecido com o material conhecido (padrão), de acordo com a equação

$$\phi_A = \frac{n_{em}}{n_{abs}} = \phi_{ref} \left(\frac{A_{ref}(\lambda_{exc})F}{A(\lambda_{exc})F_{ref}} \right) \frac{\eta^2}{\eta_{ref}^2}, \quad (4.18)$$

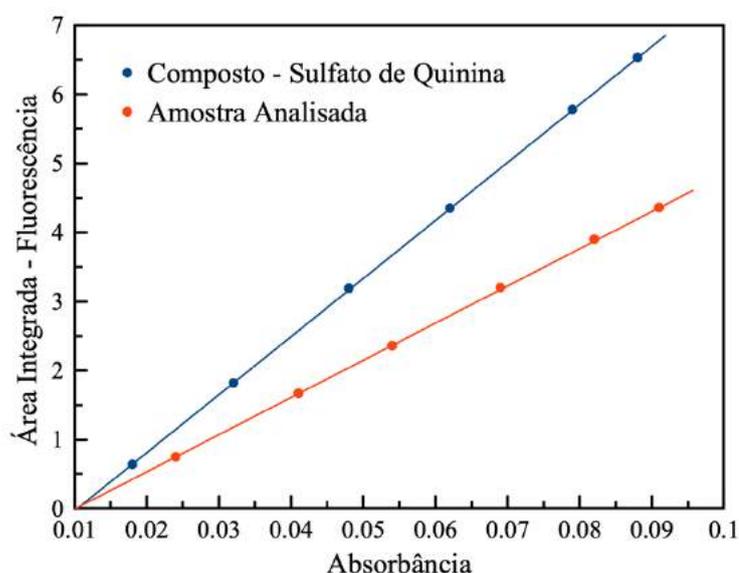
onde ϕ_{ref} é o rendimento quântico conhecido do material padrão, η_{ref} [η] é o índice de refração do material padrão [amostra], F_{ref} [F] é a área integrada da fluorescência do material padrão [amostra] e A_{ref} [A] é o valor de absorvância do material padrão [amostra] (Crosby e Demas, 1971).

Para as análises de rendimento quântico do composto Ag/Polianilina, utilizamos o sulfato de quinina, diluído em uma solução de ácido sulfúrico a 0,1 M, como material padrão, cujo valor do rendimento quântico é $\varphi = 0,54$ (Crosby e Demas, 1971). O protocolo utilizado, com suas determinadas etapas, é mostrado a seguir:

- 1) Inicialmente, para o composto Ag/Polianilina, encontrou-se o comprimento de onda de excitação de $\lambda = 300$ nm, para o qual se obteve a melhor resposta da emissão de fluorescência. Para isso, variou-se o comprimento de onda de excitação na faixa de 290 - 420 nm, com os espectros de emissão sendo coletados de 300 a 800 nm.
- 2) Com isso, realizou-se diluições fracionadas do composto, em etanol P.A., com o objetivo de se obter amostras cujo valor da absorbância no comprimento de onda excitação fosse menor que 0,1. Ao todo, foram realizadas 5 diluições, obtendo-se assim 5 novas amostras.
- 3) As amostras diluídas foram levadas ao fluorímetro para a obtenção dos respectivos espectros de emissão de fluorescência.
- 4) Com o auxílio de um software, foram obtidos os valores da integral de área da intensidade da fluorescência para cada espectro de emissão coletado no item 3.
- 5) Foi construído um gráfico da área integrada da fluorescência em função da absorbância.
- 6) Uma vez completadas essas etapas para o composto Ag/Polipirrol, os procedimentos do item 2 a 5 foram repetidos usando o material padrão; em nosso caso, o sulfato de quinina.
- 7) Por fim, realizou-se os ajustes lineares com os dados obtidos.

Na Fig. 77 estão ilustrados os dados utilizando os procedimentos descritos até a etapa 6.

Figura 77 – Gráficos lineares para o composto padrão e amostra a ser analisada. O gradiente para cada amostra é proporcional ao campo quântico de fluorescência da amostra.



Através de um ajuste linear, o coeficiente angular pode ser obtido por $\alpha_i = F_i/A_i$, com o coeficiente linear sendo igual a zero. Desse modo, o coeficiente angular pode ser substituído na Eq. (4.3), que se torna

$$\phi_A = \phi_{ref} \left(\frac{\alpha}{\alpha_{ref}} \right) \frac{\eta^2}{\eta_{ref}^2}, \quad (4.19)$$

onde α_{ref} e α são, respectivamente, os coeficientes angulares do composto padrão e da amostra. Como as soluções utilizadas são muito diluídas, pode-se afirmar que o índice de refração da mesma é praticamente igual ao do solvente puro.

5.2.2.7 Espectroscopia Eletroquímica de Impedância

Medidas de espectroscopia eletroquímica de impedância elétrica (Z) foram realizadas com o intuito de se obter informações acerca da condutividade elétrica do composto Ag/Polianilina. Para isso, 1 mL de uma solução do composto (onde uma alíquota de 10 μ L de amostra foi adicionada em 1 mL de etanol P.A.), sob diferentes pHs, foram colocados no porta amostra, cuja disposição consiste em eletrodos na forma de placas paralelas (Lima, Oliveira e Melo, 2016). As medidas foram realizadas sob uma tensão de 100 mV e varrendo a frequência de 10^6 até 0,1 Hz.

A impedância elétrica de um material, definida como a oposição que ele oferece ao fluxo de uma corrente alternada a uma dada frequência, é uma medida inversamente proporcional à condutância (Barsoukov e Macdonald, 2005). De maneira geral, a técnica de medida consiste em colocar a amostra estudada entre dois eletrodos e, em seguida, aplicar um estímulo elétrico, no caso uma tensão alternada senoidal. Após o estímulo, é possível medir as partes reais e imaginárias da resposta complexa da impedância em função da frequência. A partir desse espectro, são modelados circuitos ou equações matemáticas, de modo a ter uma estimativa de propriedades do material como sua condutividade, a mobilidade das cargas e a constante dielétrica, ou propriedades relacionadas à interface eletrodo-material, como a capacitância dessa região, e o coeficiente de difusão (Barsoukov e Macdonald, 2005).

Para o nosso sistema, inicialmente foram plotados gráficos de Nyquist (Impedância Real x Impedância Imaginária) e, utilizando o software ZView2, foi realizado o melhor ajuste de cada curva (Barsoukov e Macdonald, 2005; Lvovich, 2012). O circuito de Randles foi o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais. A partir dessas análises, obteve-se informações sobre a resistência de transporte de carga (R_{ct}) do material, que está relacionada com a

mobilidade de elétrons entre o eletrodo e o líquido. Dessa forma, a partir dos valores obtidos da resistência é possível calcular a condutividade do material (Barsoukov e Macdonald, 2005).

5.2.2.8 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o objetivo de analisar a biocompatibilidade do compósito Ag/Polianilina frente a células mamárias. Essas análises foram feitas através de uma colaboração com o Laboratório de Biologia Celular de Patógenos (Instituto Aggeu Magalhaes – FIOCRUZ/PE), sob a responsabilidade da Professora Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo, pelo aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação de Ciências de Materiais, Elton Marlon de Araújo Lima.

Para a realização dos ensaios foram utilizados dois modelos celulares, o macrófago J774 (ATCC® TIB-67™) e as células Vero (ATCC® CCL-81™), conforme descrito na literatura (Aranda-Souza *et al.*, 2018). Para isso, os modelos foram colocados em uma placa de 96 poços, com uma concentração de $5 \cdot 10^5$ células por poço. Além das células, cada poço contém 100 μ L do meio de cultura necessário, sendo utilizado para essas células o meio RPMI (solução tampão contendo aminoácidos e vitaminas que nutrem as células), suplementando com 10 % de soro fetal bovina (SBF) (Moore e Woods, 1977). As placas foram incubadas por 3 horas, à temperatura de 37° C e em atmosfera de 5 % de CO₂, para o ocorresse a adesão das células nos poços. Após esse período, as células foram submetidas a um processo de lavagem, usando o meio de cultura. Em seguida, diferentes concentrações do compósito Ag/Polianilina (31,2 – 500 μ g/mL) foram colocadas para interagir com as células plaqueadas por 24 h. Após o período de incubação, em cada poço o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) com concentração de 0,5 mg/mL.

O MTT é um teste colorimétrico desenvolvido para ensaios de viabilidade celular em testes conduzidos em placas de 96 poços. Basicamente, o teste consiste na conversão do reagente MTT em um produto de coloração roxa, pelo contato do mesmo com as enzimas desidrogenases (presentes na mitocôndria celular), onde se formam cristais púrpuras de Formazan. Apenas células viáveis, com metabolismo ativo, conseguem converter o reagente e, dessa forma, a partir da solubilização desses cristais, a coloração roxa obtida será utilizada como um quantificador de viabilidade celular (Präbst *et al.*, 2017; Riss *et al.*, 2013).

Para a formação dos cristais de Formazan, a placa foi incubada à temperatura de 37° C e em atmosfera de 5 % de CO₂, por um período de 3 horas. Após esse período, uma vez verificada a ocorrência da reação, os cristais foram solubilizados pelo uso de uma solução de isopropanol com 1 % de HCl. Para a análise do produto colorimétrico, a placa foi submetida a uma análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 570 nm (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Ao

todo, foram realizados dois experimentos independentes de citotoxicidade, e cada concentração utilizada foi avaliada em quadruplicata.

5.2.2.9 Ensaio de Atividade Antitumoral *in vitro*

Os ensaios de atividade antitumoral do compósito estudado foram realizados *in vitro*. Nesse estudo, foi analisada a viabilidade de células de câncer cervical humano (HeLa) diante de diferentes concentrações do compósito Ag/Polianilina (31,2 – 500 µg/mL). Para as análises, o protocolo utilizado foi adaptado de (Han *et al.*, 2017), com algumas modificações nos quesitos concentração de células por poços e a solução de solubilização dos cristais de Formazan utilizados.

Para o cultivo das células HeLa, utilizou-se DMEM (um sistema composto de aminoácidos, vitaminas e glicose) com 10 % de SBF como meio de cultura. Para isso, utilizou-se uma placa de 96 poços, com 100 µL do meio de cultura e uma concentração de $5 \cdot 10^5$ células em cada poço. Após o cultivo, as placas foram incubadas por 24 h, à temperatura de 37° C e em atmosfera de 5 % de CO₂, para que ocorresse a adesão das células no fundo dos poços. Passado o período de adesão, as células foram lavadas com o meio de cultura, e em seguida realizamos o tratamento com as diferentes concentrações do compósito por 24 h. Células que não receberam tratamento foram consideradas como grupo controle. Após o período de incubação, em cada poço, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL.

Para verificar a viabilidade celular, através da formação dos cristais de Formazan, a placa foi novamente incubada à temperatura de 37° C e em atmosfera de 5 % de CO₂, por um período de 3 horas. Uma vez verificada a formação dos cristais, os mesmos foram solubilizados através de uma solução de isopropanol com 1% de HCl. Conforme descrito anteriormente (Seção 4.2.2.10), o produto colorimétrico foi submetido a uma análise espectrofotométrica para fins de quantificação. Ao todo, foram realizados dois experimentos independentes de citotoxicidade, e cada concentração utilizada foi avaliada em quadruplicata.

5.2.2.10 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados obtidos nas medidas de cada experimento, e suas respectivas replicatas, foi utilizado o software Statistica 10 (Stasoft, EUA). A partir desse software, foi possível obter a matriz de coeficiente de contrastes (Tabela 17), a estimativa dos efeitos, a estimativa do erro, os gráficos de Pareto e sua interpretação geométrica. Com isso, foi possível identificar quais variáveis apresentavam influência estatística significativa nos respectivos experimentos analisados, dentro de um intervalo de confiança de 95 %. Para tal

identificação, foi utilizado o gráfico de Pareto, o qual mostra através de uma linha vertical vermelha o valor mínimo dos efeitos estatisticamente significativos (isto é, apenas aqueles efeitos cujos valores estão à direita da linha vermelha são de fato significativos). Os valores dos efeitos de cada variável estão apresentados à direita de cada barra. Um efeito que apresenta valor positivo mostra que o uso da variável no nível superior (+) resulta em um ganho positivo para a variável resposta, enquanto que um efeito negativo mostra que a variável utilizada em um nível inferior (-) deverá apresentar uma melhor resposta (Lima, 2019). Para este trabalho, foram calculados os efeitos estatisticamente significativos para a intensidade de fluorescência, o tamanho e potencial zeta do compósito Ag/Polianilina.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização do compósito Ag/Polianilina

As amostras foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na Seção 4.2.1.1, baseando-se nas composições estabelecidas no planejamento fatorial mostrado na Tabela 17. Assim, oito sistemas diferentes foram obtidos pela variação controlada das concentrações dos reagentes AgNO_3 , Anilina e MPTS. As técnicas de espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis), espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fluorescência, determinação do tamanho da partícula por espalhamento dinâmico de luz (DLS), Potencial Zeta e Espectroscopia Eletroquímica de Impedância foram usadas para investigar as propriedades do compósito estudado.

5.3.1.1 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)

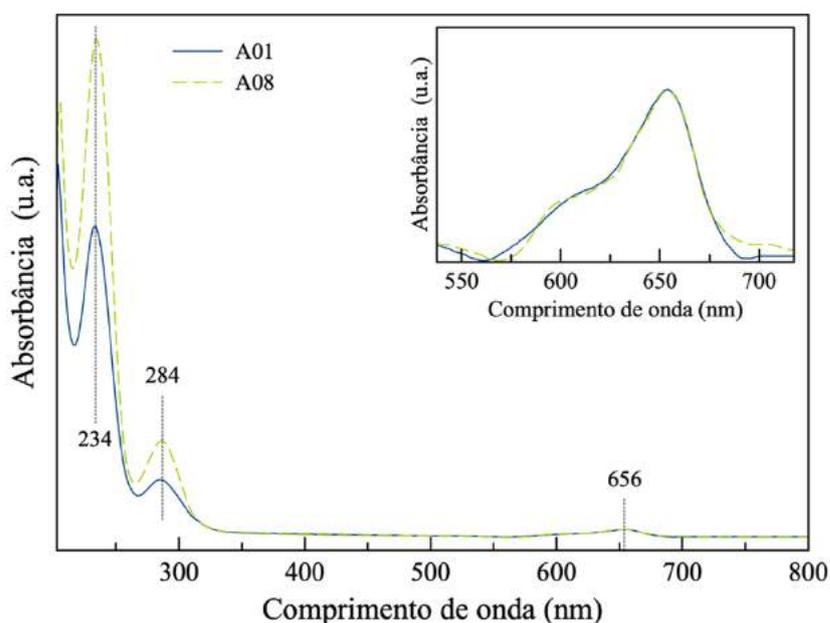
Medidas de espectroscopia de absorção no UV-Vis foram realizadas para identificar a formação do compósito de Ag/Polianilina, avaliando se de fato teria ocorrido a formação da polianilina de acordo com o mecanismo de síntese proposto, no qual a redução do metal e a oxidação da anilina ocorrem de maneira simultânea, levando à formação das nanopartículas metálicas e da PANI.

Na Fig. 78 são mostrados os espectros de absorção para as amostras com as menores (---) e as maiores (+++) concentrações dos fatores, denominadas de A01 e A08, respectivamente. Como se pode observar, ambos os espectros apresentam as mesmas bandas de absorção, localizadas em 234, 284 e 656 nm. A banda localizada em 284 nm, pode ser atribuída à transição do elétron entre o orbital molecular mais alto ocupado (HOMO) e o orbital molecular mais baixo ocupado (LUMO), ou seja, transição eletrônica $\pi - \pi^*$, dos anéis benzenóides presentes na polianilina (Khan, Akhtar e Nabi, 2015). Já a banda em 656 nm, de pouca intensidade, pode

ser atribuída à transição do éxciton do anel benzeno para o anel quinoide ao longo da cadeia PANI (Khan *et al.*, 2010; Stejskal, 2013). No entanto, na literatura a banda em 234 nm é associada à absorção dos monômeros de anilina (Thompson *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2013). Com isso, pode-se concluir que mesmo havendo indícios da formação da PANI, não houve a completa oxidação da anilina pela redução dos íons de prata durante o processo da síntese.

Por sua vez, o pico característico das nanopartículas de prata, causado pela ressonância plasmônica superficial, aparece geralmente entre 410 – 440 nm (E. Silva-De Hoyos *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018). No entanto, nos espectros obtidos não foi possível observar essa banda característica, o que pode estar associado tanto com a redução da intensidade de adsorção das Ag NPs pela PANI circundante quanto com a baixa concentração do metal no meio. Esse resultado então sugere que as Ag NPs foram de fato adsorvidas de forma eficiente na estrutura da PANI (Abdulla *et al.*, 2015).

Figura 78 – Espectro de UV-Vis do compósito de Ag/Polipirrol das amostras A01 (linha contínua) e A08 (linha tracejada).



5.3.1.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

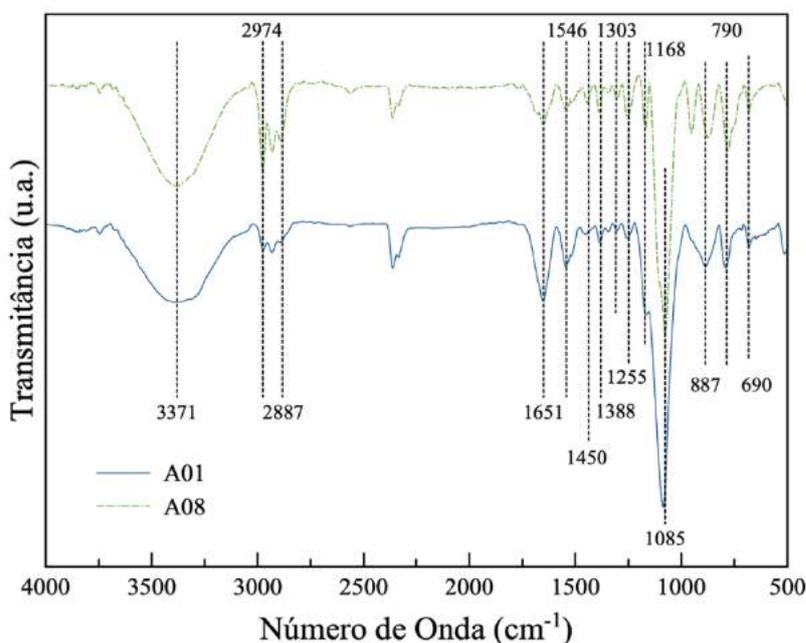
A composição química do compósito de Ag/Polianilina foi examinada através da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR). Na Fig. 79 são mostrados os espectros de FTIR para as amostras com as menores (---) e as maiores (+++) concentrações dos fatores, denominadas de A01 (curva contínua) e A08 (curva tracejada), respectivamente.

Como pode ser observado, ambos os espectros apresentam bandas localizadas em 3371 cm^{-1} , que podem ser associadas às vibrações de estiramento da ligação N – H presentes nas

aminas secundárias (Stejskal e Trchová, 2012). Os picos que aparecem em 2974 cm^{-1} e 2887 cm^{-1} são atribuídos, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação $-\text{CH}_2-$ (Alves *et al.*, 2012), o pico em 1651 cm^{-1} é correspondente às vibrações angulares simétricas ao plano (tesoura) da ligação $\text{N}-\text{H}$ presentes nas aminas aromáticas (Stejskal e Trchová, 2012), o de 1546 cm^{-1} é referente ao estiramento dos anéis quinoides e o pico em 1450 cm^{-1} se deve ao estiramento dos anéis benzenóides (Khan *et al.*, 2010). A banda localizada em 1388 cm^{-1} é atribuída às vibrações de estiramento da ligação $\text{C}-\text{N}$ presentes na vizinhança de um anel quinóide, aquela em 1303 cm^{-1} às vibrações de estiramento $\text{C}-\text{N}$ de uma amina aromática secundária e, a centrada em 1255 cm^{-1} às vibrações de estiramento $\text{C}-\text{N}$ em um agrupamento $\text{B}-\text{NH}-\text{B}-\text{NH}-\text{B}$ (onde B é o anel benzênico) (Stejskal e Trchová, 2012). É importante ressaltar que a presença das bandas localizadas em 1303 e 1255 cm^{-1} caracteriza a formação da polianilina em seu estado condutor (Kuczynska *et al.*, 2010). Já a banda em 1168 cm^{-1} pode estar associada tanto ao modo $\text{N}=\text{Q}=\text{N}$ (onde Q é o anel quinóide) quanto à deformação aromática $\text{C}-\text{H}$ no plano (Stejskal e Trchová, 2012).

Por sua vez, a banda localizada em 1085 cm^{-1} pode ser associada à deformação no plano da ligação $\text{C}-\text{H}$ dos anéis aromáticos (Santos *et al.*, 2013), a centrada em 887 cm^{-1} às vibrações de flexão fora do plano $\text{C}-\text{H}$ dos átomos de hidrogênio adjacentes a um anel benzeno e, por último, os picos em 790 e 690 cm^{-1} são associados à deformação da ligação $\text{C}-\text{H}$ do anel fora do plano e à vibração dos anéis de benzeno monosubstituído, respectivamente (Stejskal e Trchová, 2012).

Figura 79 – Espectro do FTIR do composto Ag/Polianilina das amostras A01 (linha contínua) e A08 (linha tracejada).



Desse modo, após realizar as análises de FTIR das amostras pode-se concluir que de fato ocorreu a formação da polianilina em sua forma condutora. Esses resultados, juntamente com as análises de UV-Vis, corroboram o mecanismo de síntese proposto anteriormente, indicando assim a formação do compósito de Ag/Polianilina.

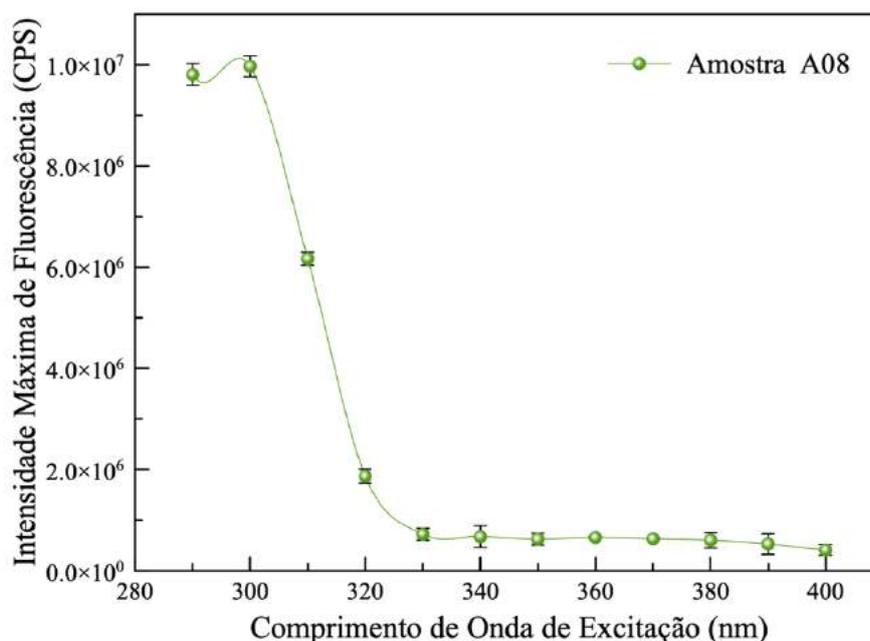
5.3.1.3 Espectroscopia de Fluorescência

Resultados anteriores do grupo, nos quais compósitos de Ag/Polipirrol, Cu/Polianilina e Au/Polianilina indicaram uma sinergia da interação entre as cadeias de polímeros condutores e nanopartículas metálicas, da qual resultava uma intensificação da emissão de fluorescência do compósito (Almeida, 2019; Lima, 2019; Santos *et al.*, 2013). Por essa razão, a fluorescência do compósito Ag/Polianilina foi investigada.

Para isso, medidas de fluorescência foram realizadas para todas as amostras do compósito obtidas através do planejamento fatorial especificado na Seção 4.2.1.1. Em cada medida, foi realizado um mapeamento 3D, no qual foram variados diferentes comprimentos de onda de excitação (290 – 400 nm, com incremento de 10 nm) com as intensidades de emissão sendo registrados na faixa de 300 – 800 nm. A partir desses dados, foi possível construir para cada amostra um gráfico da intensidade máxima de fluorescência em função do comprimento de onda de excitação (λ_{exc}).

Na Fig. 80 é possível observar que a maior intensidade de fluorescência da amostra A08 é obtida para o espectro de emissão resultante da excitação em 300 nm. Dessa maneira, como todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo comportamento de emissão quando variados os λ_{exc} (com algumas variações no que concerne ao valor da intensidade de fluorescência) foi possível determinar o comprimento de onda de excitação ótimo como sendo igual a 300 nm para todas as amostras. Por essa razão, no presente trabalho passamos a adotar $\lambda_{exc} = 300$ nm para a avaliação da fluorescência do material em diferentes experimentos, como a avaliação da intensidade de fluorescência em função do pH, o cálculo de rendimento quântico e as medidas do tempo de vida.

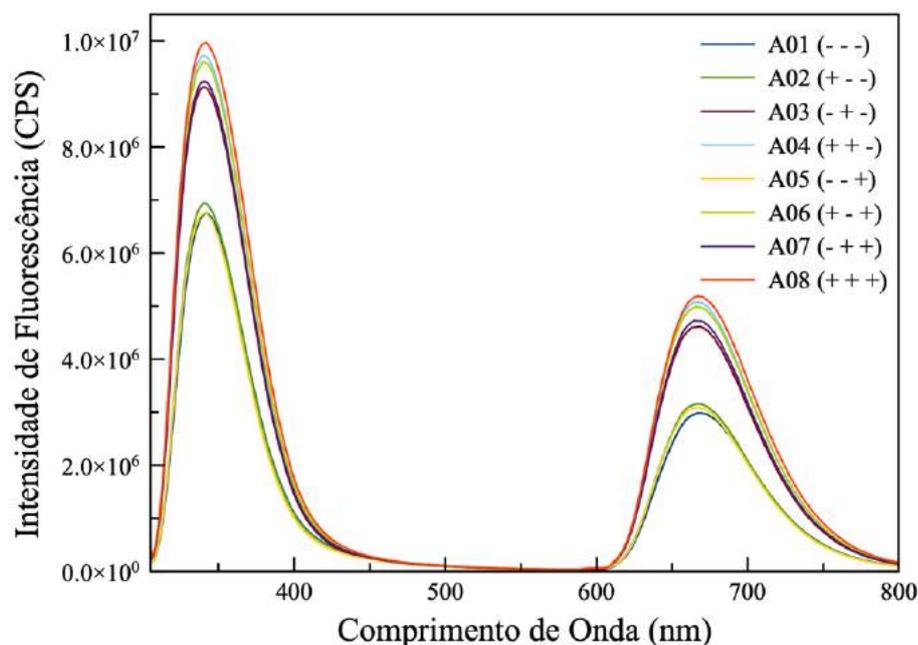
Figura 80 – Intensidade máxima de fluorescência do compósito Ag/Polianilina para diferentes comprimentos de onda de excitação.



Uma vez determinado o comprimento de onda de excitação, foram coletados os espectros de emissão dos compósitos correspondentes aos 8 experimentos do planejamento. Como pode ser observado na Fig. 81, todas as amostras apresentaram dois picos máximos de emissão de fluorescência em 342 e 667 nm, que correspondem a duas bandas distintas de emissão compreendidas na região do ultravioleta (342 nm) e na região do vermelho (667 nm). É importante ressaltar que a relação entre os dois picos de emissão do compósito descarta a existência de artefatos experimentais (como efeito Raman, espalhamento Rayleigh e progressão vibracional), uma vez que ao variar o λ_{exc} ocorre uma mudança na energia e na intensidade dos picos (Andrews, 1999).

Na Tabela 18 estão dispostas as intensidades máximas de fluorescência para as amostras do compósito Ag/Polianilina obtidas através do planejamento fatorial e suas respectivas replicatas. Dentre as amostras analisadas, é possível perceber que o nanocompósito obtido pelo experimento A08 foi aquele que apresentou maior intensidade de fluorescência. A partir desses resultados, utilizou-se o programa Statistica 10 para se obter os efeitos de cada variável (concentrações de MPTS, Anilina e $AgNO_3$) e suas interações sobre a intensidade de fluorescência.

Figura 81 – Espectro de emissão do compósito Ag/Polianilina para todos os experimentos analisados (A01 a A08) com $\lambda_{exc} = 300$ nm.



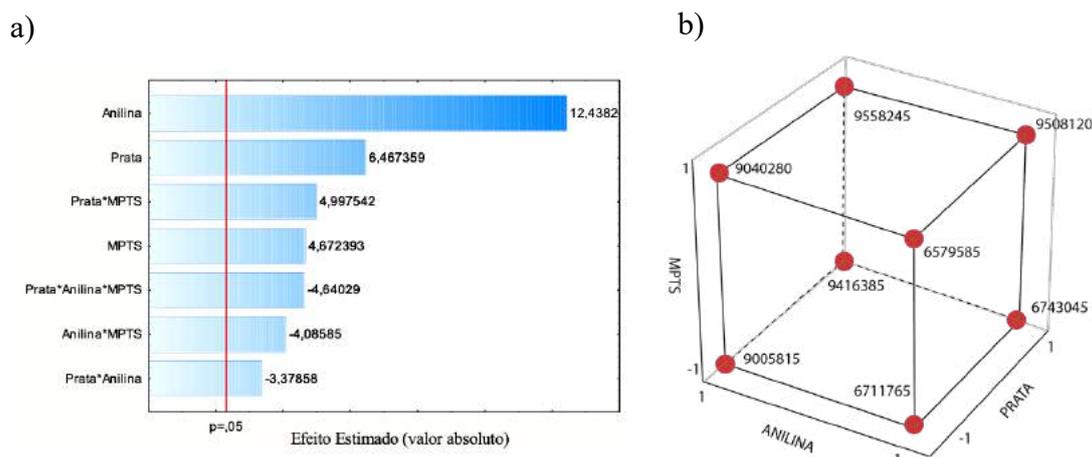
A partir da construção do gráfico de Pareto, é possível observar quais efeitos são estatisticamente significativos nas respostas de intensidade de fluorescência do compósito de Ag/Polianilina. Como podemos observar na Fig. 82 a), todos os componentes (Ag, Anilina e MPTS) utilizados na síntese, bem como as interações entre eles são estatisticamente significativos para a intensidade de fluorescência (com 95% de confiança). Os valores dos efeitos foram positivos para as variáveis de concentração de anilina (monômero), de prata e de MPTS, e para a interação entre a prata e o MPTS, e negativos para as interações entre a anilina e o MPTS, a anilina e a prata e a interação entre a anilina, a prata e o MPTS.

Para uma melhor interpretação dos dados, uma representação geométrica foi usada, como mostrado na Fig. 82 b). Nesse gráfico, cada vértice do cubo representa a resposta da intensidade de fluorescência para cada um dos oito ensaios realizados (A01 a A08). Desse modo, podemos constatar visualmente que o maior valor de intensidade de fluorescência é obtido quando as concentrações da anilina, da prata e do MPTS estão no nível superior (+ + +), ou seja, o experimento A08. Note que esse é o vértice do cubo a apresentar o maior valor de intensidade de fluorescência (9558245 u.a.).

Tabela 18 – Planejamento fatorial e intensidade de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 342 nm) dos compósitos Ag/Polianilina.

Experimento	Prata	Ani	MPTS	Replicatas		Média	Erro
A01	-	-	-	6,75 x 10 ⁶	6,66 x 10 ⁶	6,70 x 10 ⁶	6,36 x 10 ⁴
A02	+	-	-	6,92 x 10 ⁶	6,56 x 10 ⁶	6,74 x 10 ⁶	2,54 x 10 ⁵
A03	-	+	-	9,11 x 10 ⁶	8,90 x 10 ⁶	9,00 x 10 ⁶	1,48 x 10 ⁵
A04	+	+	-	9,12 x 10 ⁶	9,70 x 10 ⁶	9,41 x 10 ⁶	4,10 x 10 ⁵
A05	-	-	+	6,74 x 10 ⁶	6,40 x 10 ⁶	6,57 x 10 ⁶	2,40 x 10 ⁵
A06	+	-	+	9,57 x 10 ⁶	9,44 x 10 ⁶	9,50 x 10 ⁶	9,19 x 10 ⁴
A07	-	+	+	8,86 x 10 ⁶	9,21 x 10 ⁶	9,03 x 10 ⁶	2,47 x 10 ⁵
A08	+	+	+	9,96 x 10 ⁶	9,14 x 10 ⁶	9,55 x 10 ⁶	5,79 x 10 ⁵

Figura 82 – Representações gráficas da análise estatística para a intensidade de fluorescência dos compósitos de Ag/Polianilina: (a) Gráfico de Pareto e (b) gráfico cúbico.



Além disso, no gráfico de Pareto podemos também observar que a concentração da anilina foi a variável a apresentar o maior efeito sob os resultados. Isso pode ser atribuído ao fato de que, quanto maior a concentração do monômero, maiores deverão ser os tamanhos das cadeias poliméricas obtidas (Sannigrahi *et al.*, 2009), o que pode levar a um aumento da conjugação da cadeia e ao favorecimento da observado do fenômeno da fluorescência. A importância da contribuição da anilina para a manifestação da fluorescência já fora relatada por (Santos *et al.*, 2013). Em suas análises, esses autores observaram que à medida que a cadeia da PANI era degradada (pela adição de NaClO), a intensidade da fluorescência diminuía, até sua totalmente

supressão, comprovando assim o papel da cadeia polimérica para a ocorrência do fenômeno da fluorescência.

i) Medidas de Fluorescência em função do pH

Com o objetivo de verificar a importância do polímero na luminescência do compósito de Ag/Polianilina, realizamos medidas de fluorescência em função do pH do meio. Para isso, adicionamos quantidades apropriadas de hidróxido de sódio e ácido clorídrico para ajustar o pH das soluções diluídas (3 mL de etanol para 30 μ L de amostra) da amostra A08, que resultara do planejamento fatorial do compósito de Ag/Polianilina. A amostra A08 foi a escolhida para essa análise por ter apresentado o melhor resultado de fluorescência (Tabela 18).

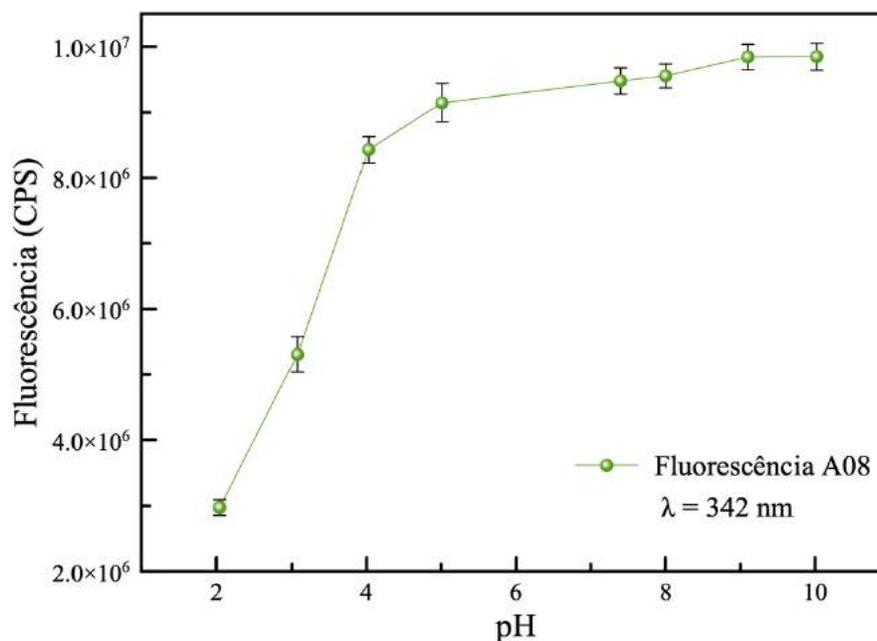
As intensidades medidas para os espectros de fluorescência do compósito de Ag/Polianilina para valores de pH variando entre 2,0 e 11,00 são apresentadas na Fig. 83. Como pode ser observado, à medida que diminui o valor do pH do meio (ou seja, o meio se torna mais ácido) há a diminuição da intensidade da emissão de fluorescência do compósito. Para valores de pHs $> 5,0$, nota-se um ligeiro aumento na intensidade de fluorescência quando o meio se torna mais alcalino. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que a polianilina muda seu estado oxidativo com a variação do pH do meio. À medida que ocorre a redução do pH do meio, a cadeia vai se tornando mais protonada, o que, por sua vez, ocasiona o aumento da condutividade do polímero.

Conforme discutido na Seção 4.1.2., a PANI na sua forma base (não dopada) consiste de y unidades repetitivas reduzidas (benzenóides) para $(y - 1)$ unidades oxidadas (quinoídes) (Huang, Humphrey e MacDiarmid, 1986). No entanto, ao ser oxidada (em um pH mais baixo), a proporção de unidades benzenóicas diminui, levando a uma mudança nas propriedades óticas e elétricas da molécula. A protonação da base causa uma distorção na cadeia polimérica da polianilina na vizinhança das cargas introduzidas, o que ocasiona a criação de estados eletrônicos localizados no meio do “band gap”, com conseqüente alteração do perfil de absorção ótica do material (Huang e MacDiarmid, 1993).

Na literatura (Antonel, Molina e Andrade, 2007; Chen *et al.*, 1996), tem sido mostrado que as unidades benzenóides contribuem para o fenômeno da fluorescência, diferentemente do observado para os grupos quinoídes, que chegam até mesmo a agir como supressores da fluorescência das unidades benzenóides adjacentes (Shimano e MacDiarmid, 2001). Com isso, conforme ocorre a diminuição do número de unidades benzenóicas (e a maior presença de unidades quinoídes), por conta da protonação das cadeias poliméricas (tornando-as mais condutoras), há a redução da intensidade da fluorescência. Portanto, era esperado que a variação

no pH do meio resultasse em alterações nas propriedades ópticas e elétricas dos compósitos Ag/Polianilina.

Figura 83 – Variação da intensidade de fluorescência da amostra A08 em função do pH do meio.

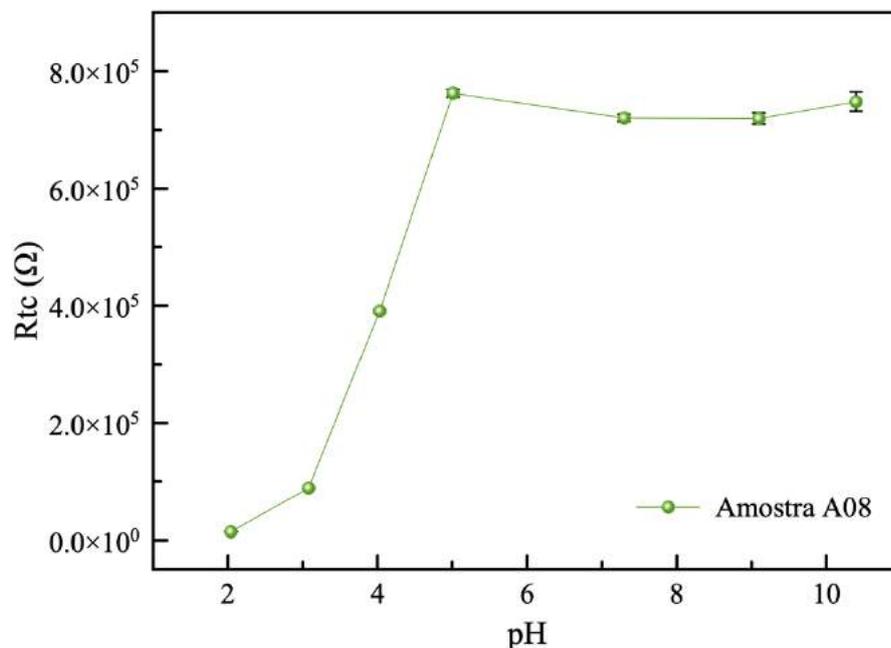


ii) Medidas de Condutividade

Como mencionado anteriormente, é fato bem conhecido que sistemas fluorescentes não costumam exibir um alto grau de condutividade (Antonel, Molina e Andrade, 2007). Desse modo, com o objetivo de determinar as mudanças de condutividade do compósito de Ag/Polianilina associadas à variação da intensidade de fluorescência, realizamos medidas de espectroscopia de impedância elétrica.

A variação do valor da resistência de transporte de carga do compósito estudado como função do pH do meio é mostrada na Fig. 84. Como podemos observar, enquanto é pequena a resistência de transporte de carga para soluções cujo pH se encontra entre 2,0 e 3,0 (meio ácido), seu valor sofre um aumento substancial com a diminuição da acidez, atingindo um patamar relativamente constante para a faixa de pH entre 5,0 e 10,0. O comportamento na região de pH entre 4,0 a 2,0 pode ser atribuído à progressiva protonação dos grupos imina da PANI, do que resulta o aumento da condutividade da PANI; já na região de pH > 5,0 há menor presença de cargas livres na cadeia polimérica, levando a uma redução da condutividade (Santos *et al.*, 2013).

Figura 84 – Variação da resistência de transporte de carga da amostra A08 em função do pH do meio.



Em conjunto, os resultados apresentados nas Figs. 83 e 84 podem ser tomados como uma evidência clara de que o polímero condutor desempenha um papel ativo na determinação da fluorescência do compósito Ag/Polianilina, confirmando a relação inversa entre a fluorescência e a condutividade na PANI.

5.3.1.4 Potencial Zeta (ζ)

Os experimentos obtidos através do planejamento fatorial foram caracterizados por meio de medidas de potencial zeta (ζ) com o intuito de identificar as cargas superficiais do compósito de Ag/Polianilina. A partir da magnitude do potencial zeta também é possível avaliar a estabilidade do compósito, uma vez que quanto maior o valor absoluto de ζ , maior será a estabilidade eletrostática da solução. Isso ocorre porque, quanto mais carregadas, maior a repulsão entre as partículas, o que reduz sua agregação e, conseqüentemente, a separação de fases.

Na Tabela 19 são mostradas as respostas das medidas de potencial zeta para as amostras do planejamento fatorial, e suas replicatas. De acordo com esses resultados, verifica-se que todas as amostras apresentaram valores de potencial zeta negativos. Além disso, pode-se observar que as amostras que possuem quantidades de anilina e prata no nível superior (+) apresentaram maiores valores de potencial zeta, de modo que as condições de síntese para as amostras A04 e A08 foram favoráveis para a obtenção de soluções mais estáveis. Assim, é possível concluir que as nanopartículas de prata inseridas devem manter uma forte interação

com as cadeias poliméricas da polianilina, uma vez que houve uma diminuição do potencial zeta quando a quantidade de anilina era mantida no nível superior, mas a quantidade de prata adicionada era diminuída. Esse comportamento fica mais evidentemente ao compararmos os experimentos A04 com o A03, quando pode ser notado que a variação da concentração de Ag do nível superior para o inferior torna o potencial zeta se torna menos negativo, ao passar de -17,26 para -13,96 mV.

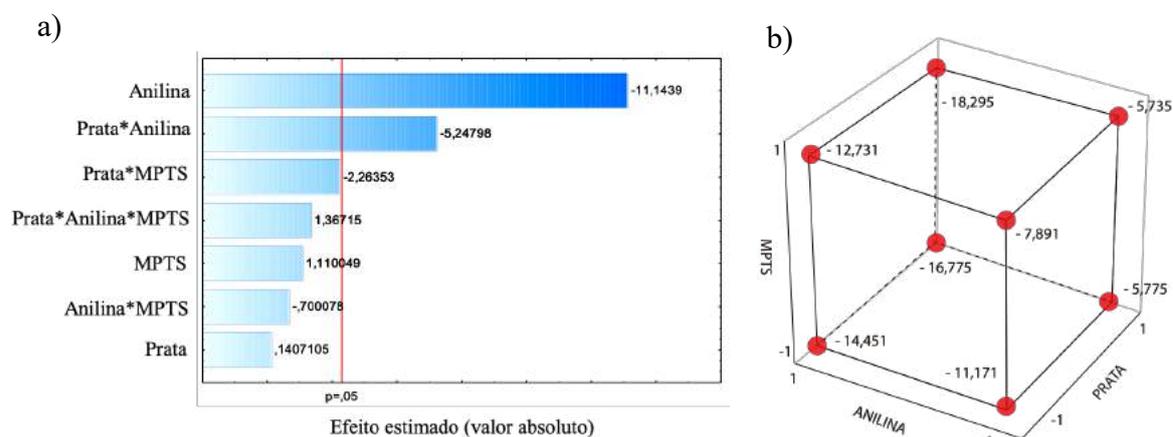
Tabela 19 – Planejamento fatorial e medidas de potencial zeta dos compósitos Ag/Polianilina.

Experimento	Prata	Ani	MPTS	Replicatas (mV)		Média (mV)
A01	-	-	-	- 11,66	- 11,56	- 11,61
A02	+	-	-	- 4,61	- 5,96	- 5,28
A03	-	+	-	- 13,79	- 14,13	- 13,96
A04	+	+	-	- 16,77	- 17,76	- 17,26
A05	-	-	+	- 7,32	- 7,48	- 7,41
A06	+	-	+	- 6,42	- 6,03	- 6,25
A07	-	+	+	- 13,57	- 12,87	- 13,22
A08	+	+	+	- 15,02	-20,59	- 17,80

Pela análise do gráfico cúbico das respostas das medidas de potencial zeta (Fig. 85 b), podemos verificar que o maior valor absoluto do potencial é obtido para a amostra A08. Além disso, pode ser notado que essa mesma amostra, para a qual as concentrações de anilina, prata e MPTS estão em seus níveis superiores (+), exibe maior intensidade de fluorescência, o que indica que essas são condições de síntese que levam a soluções mais fluorescentes e mais estáveis.

No entanto, deve ser observado que, sem o conhecimento das condições da solução, o valor absoluto do potencial zeta é apenas um número, sem maior significado, uma vez que o sinal e magnitude do potencial zeta dependem principalmente do pH da solução. Em vista disso, medidas de potencial zeta (ζ) em função do pH do meio foram realizadas com o objetivo de identificar as possíveis modificações nas cargas superficiais do compósito com a variação da acidez do meio. Para isso, adicionamos quantidades apropriadas de hidróxido de sódio e ácido clorídrico para ajustar o pH das soluções diluídas (3 mL de etanol para 30 μ L de amostra) da amostra A08. Os resultados desse ensaio serão apresentados a seguir

Figura 85 – Representações gráficas da análise estatística do potencial zeta dos compósitos de Ag/Polianilina. (a) Gráfico de Pareto e (b) gráfico cúbico.



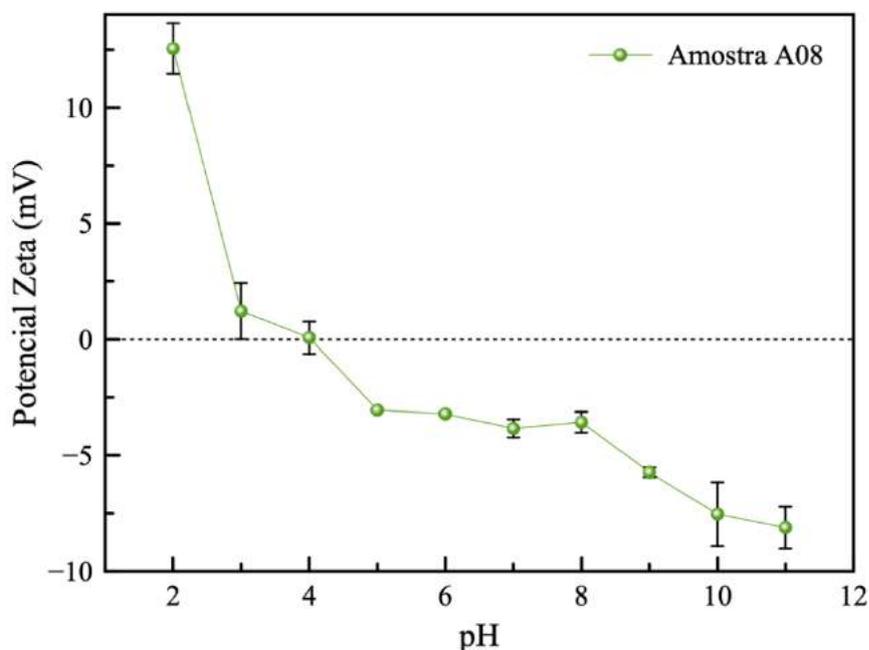
i) Medidas de Potencial Zeta (ζ) em função do pH

Na Fig. 86 são mostrados os valores de medida de potencial zeta para uma solução do compósito (experimento A08) em função da variação do pH do meio. Como pode ser observado, em meios mais ácidos ($2,0 \leq \text{pH} \leq 4,0$) o compósito de Ag/Polianilina apresenta carga positiva. No entanto, ocorre uma diminuição nos valores de ζ à medida em que aumenta o pH do meio, com a alteração nas cargas superficiais do compósito, que passam a ser mais negativas.

Como já mencionado anteriormente, esse comportamento pode ser novamente atribuído ao processo de protonação/desprotonação da Polianilina, cujas cadeias apresentam cargas positivas [negativas] em meios ácidos [básicos], resultando em valores positivos [negativos] para o potencial zeta, tornando, com isso, o polímero mais [menos] condutor (Huang, Humphrey e MacDiarmid, 1986). Autores como (Medeiros, De *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2013) encontraram resultados semelhantes aos mostrados na Fig. 86, que foram por eles atribuídos ao fato de que para menores valores de pH, mais íons H^+ estariam presentes na fase dispersa e, com isso, mais cadeias de PANO estariam dopadas, o que implicaria em um aumento da carga na superfície das partículas.

É interessante notar que, para o compósito estudado, o ponto isoelétrico (que corresponde ao valor de pH no qual a carga elétrica da solução é nula) é observado para o pH igual a 4,0, indicando que o compósito de Ag/Polianilina apresenta carga nula nesse meio. Com isso as repulsões eletrostáticas entre as partículas passam a ser desprezíveis, aumentando assim a tendência à sua agregação.

Figura 86 – Variação do potencial zeta da amostra A08 em função do pH do meio.



5.3.1.5 Diâmetro médio das partículas

Para obter uma estimativa do tamanho médio do composto de Ag/Polianilina, nos utilizamos da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Com isso, foi possível determinar o diâmetro hidrodinâmico da partícula (que, nesse caso, corresponde ao conjunto formado pelo estabilizante (MPTS), o polímero (ANI) e as nanopartículas de Ag). Os resultados correspondentes são apresentados na Tabela 20.

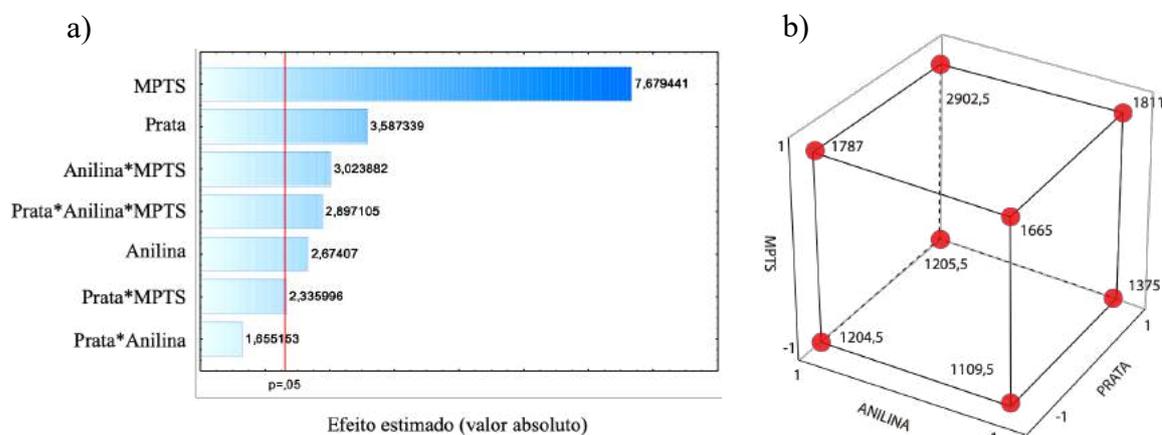
A partir da construção do gráfico de Pareto, foi possível avaliar quais fatores eram os estatisticamente mais significativos para a determinação do diâmetro médio das partículas do composto estudado. Como pode ser notado (Fig. 87 a), tanto as concentrações de MPTS, Prata e Anilina, como as interações entre a Anilina e o MPTS, e entre a Anilina, a Prata e o MPTS, apresentaram uma influência estatística significativa, ao nível de confiança de 95%. No entanto, pode-se notar uma maior influência da concentração do MPTS, para a qual o efeito tem um valor positivo. Dessa forma, quando esse reagente é utilizado em seu nível superior (+) teremos a dispersão de tamanho do composto favorecida, da mesma forma que sua utilização em nível inferior favorece a diminuição do tamanho do composto. O MPTS é um importante constituinte da reação, pois atua como agente estabilizador do composto, uma vez que seus grupos tiol (-SH) se ligam nas superfícies de nanopartículas metálicas, contribuindo desse modo para diminuição da aglomeração das mesmas (Bourgeat-Lami, 2002).

Tabela 20 – Planejamento fatorial e medidas de diâmetro médio de partículas dos compósitos Ag/Polianilina.

Experimento	Prata	Ani	MPTS	Replicatas (nm)	Média (nm)
A01	-	-	-	1129	1090
A02	+	-	-	1289	1461
A03	-	+	-	1221	1188
A04	+	+	-	1374	1037
A05	-	-	+	1928	1402
A06	+	-	+	2057	1565
A07	-	+	+	1684	1890
A08	+	+	+	2834	2971

O gráfico cúbico das respostas de diâmetro médio, mostrado na Fig. 87 b), auxilia na melhor visualização dos resultados. Como é possível observar, compósitos de diâmetros menores são obtidos quando o MPTS, a anilina e a prata estão em seus níveis inferiores (experimento A01); no entanto, ao se utilizar as concentrações dos reagentes nos níveis superiores, o compósito resultante apresentará o maior diâmetro médio (experimento A08). Vale lembrar que a intensidade de fluorescência e o potencial zeta são também favorecidos quando utilizados as concentrações em nível superior (+) dos reagentes, como constatado nas Seções 4.3.1.3 e 4.3.1.4.

Figura 87 – Representações gráficas da análise estatística para o tamanho de partícula dos compósitos de Ag/Polianilina. (a) Gráfico de Pareto e (b) Gráfico cúbico.



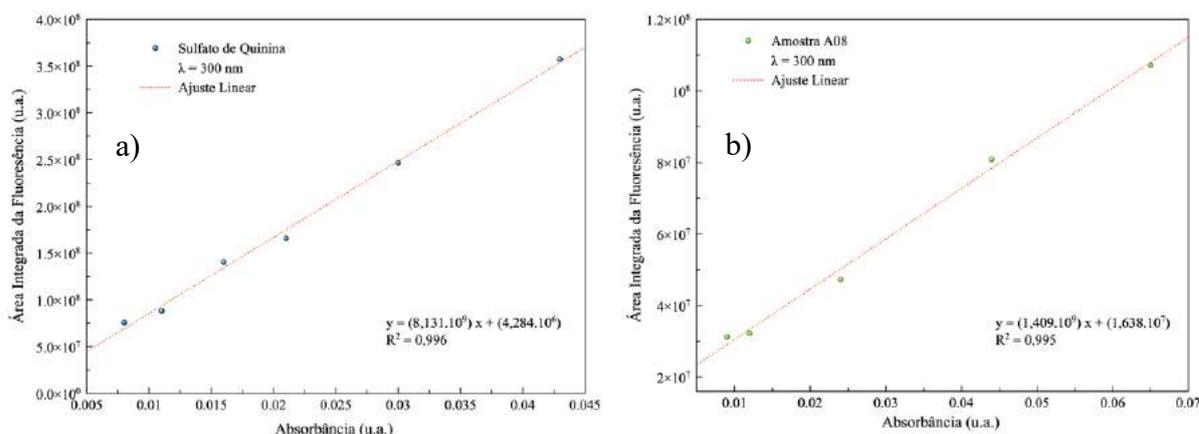
5.3.1.6 Rendimento Quântico Relativo de Fluorescência

O rendimento quântico (ϕ) relativo da amostra A08 do compósito de Ag/Polianilina foi determinado com base no método comparativo proposto por (Williams, Winfield e Miller, 1983). Conforme descrito na Seção 4.2.2.6, os valores de ϕ foram obtidos pela comparação com a fluorescência do sulfato de quinina, um fluoróforo de intensidade padrão conhecida ($\phi = 0,54$) (Crosby e Demas, 1971). Para isso, foi necessário obter os espectros de absorção na região do UV-Vis, e calcular as áreas integradas abaixo dos espectros de emissão de fluorescência do sulfato de quinina e das amostras de interesse.

A partir desses dados, foi possível construir um gráfico da área integrada da fluorescência em função da absorbância, conforme mostrado na Fig. 88. Note que foi preciso a construção de dois gráficos, um para o composto padrão (Fig. 88 a) e outro para a amostra analisada (Fig. 88 b). Assim, utilizando a Eq. (4.4) (Seção 4.2.2.6), foi possível calcular o rendimento quântico da amostra A08 como sendo $\phi = (10,05 \pm 0,49) \%$, para um comprimento de onda de excitação de 300 nm. Esse rendimento quântico de fluorescência é maior que os valores para outros compósitos de polímero condutor/NPs metálica, como Pani/NPs de Au ($\phi = 7,81 \%$), Pani/NPs de Cu ($\phi = 8,8 \%$) e Pani/NPs de Ni ($\phi = 7,72 \%$), observados por (Santos *et al.*, 2013), (Almeida, 2019) e (Rafiqi e Majid, 2016), respectivamente.

É importante ressaltar que os cálculos de rendimento quântico foram realizados sem que fosse feita a alteração do pH do meio. No entanto, os resultados observados anteriormente (Fig. 83) relevam que a intensidade de fluorescência do compósito de Ag/Polianilina aumenta ligeiramente a partir do pH 5,0 (essencialmente o pH natural do compósito), um fato que justifica o uso do compósito no pH natural.

Figura 88 – Gráficos lineares da área integrada de fluorescência em função do valor da absorbância no comprimento de onda de excitação ($\lambda = 300$ nm) para a) o sulfato de quinina e b) a amostra A08 do compósito de Ag/Polianilina.



5.3.2 Uso do nanocompósito CoFe/PPy para ensaios de citotoxicidade e atividade antitumoral *in vitro*

Diante dos resultados obtidos na caracterização dos compósitos de Ag/Polianilina obtidos por meio do planejamento fatorial, consideramos a utilização da amostra A08, aquela que apresentou melhores respostas para a intensidade de fluorescência, potencial zeta e maiores diâmetros médio de partículas, para análises de biocompatibilidade e atividade antitumoral do material.

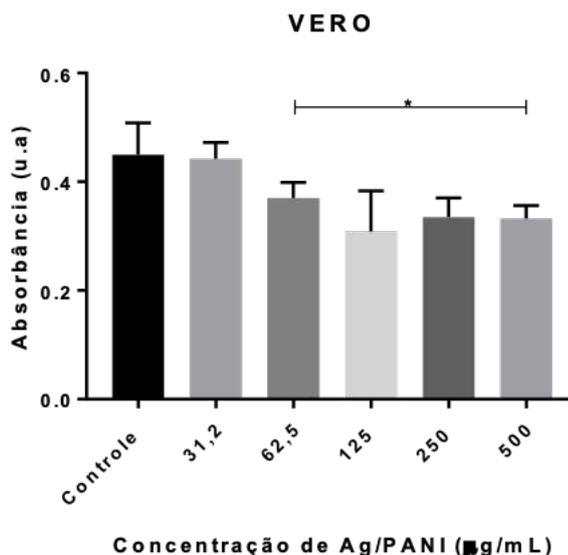
i) Ensaios de Citotoxicidade

O potencial citotóxico do compósito foi investigado a partir em ensaios *in vitro* de células Vero (oriundas do rim de macacos africanos), inicialmente cultivadas na ausência (Controle) e na presença do compósito, em diferentes concentrações. Posteriormente, as amostras foram submetidas a análises de viabilidade celular pelo método MTT. Os resultados obtidos foram coletados e analisados pelo programa SPSS 18.0, a fim de avaliar a regressão linear e determinar a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) – aquela para a qual a viabilidade celular é reduzida em 50%.

Como podemos observar na Fig. 89, nas diferentes concentrações testadas (31,2 a 500 µg/mL) o compósito de Ag/Polianilina não demonstrou efeito tóxico para as células investigadas, uma vez que não ter sido observada diminuição significativa da absorbância nas concentrações testadas durante as 24 horas de incubação. Além disso, no ensaio de citotoxicidade utilizando as células Vero, observou-se que a CC₅₀ obtida foi maior que 500 µg/mL, e que não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle. Entretanto, para concentrações a partir de 62,5 µg/mL houve um maior efeito na redução da viabilidade das células.

Na literatura, autores como (Humpolíček *et al.*, 2018) demonstraram que a biocompatibilidade da PANI varia de acordo com seu estado de oxidação, sendo a forma de base aquela que apresenta maior biocompatibilidade. No entanto, é sabido que os precursores utilizados nas sínteses dos polímeros, bem com os oligômeros presentes, podem também modificar a citotoxicidade do polímero (Humpolíček *et al.*, 2012; Maráková *et al.*, 2017). (Yslas *et al.*, 2015) demonstraram que citotoxicidade de nanopartículas de polianilina frente a diferentes células mamárias variava com a dependência do tamanho e da forma da partícula. Outros estudos realizados por (Maráková *et al.*, 2017) revelaram que a inserção de nanopartículas de Ag em estruturas poliméricas, como o polipirrol e a polianilina, também contribuiu para a modificação da citotoxicidade, com o aumento da biocompatibilidade.

Figura 89 – Efeito do Ag/Polipirrol sobre células Vero de mamíferos.



Os resultados obtidos sugerem que o compósito de Ag/Polianilina apresenta um bom potencial para uso em aplicações biomédicas (a nível celular). No entanto, testes mais completos precisam ser realizados para que o material seja de fato estabelecido como biocompatível, como, por exemplo, análises em outros modelos celulares, como fibroblastos e macrófagos. Isso ocorre porque o uso de diferentes linhagens de células na análise de citotoxicidade ajuda a estabelecer a resposta que o material pode vir desempenhar frente aos diferentes tipos de estruturas celulares, o que, por sua vez, poderia resultar em sua aplicação mais segura (Humpolíček *et al.*, 2018; Lima, 2019).

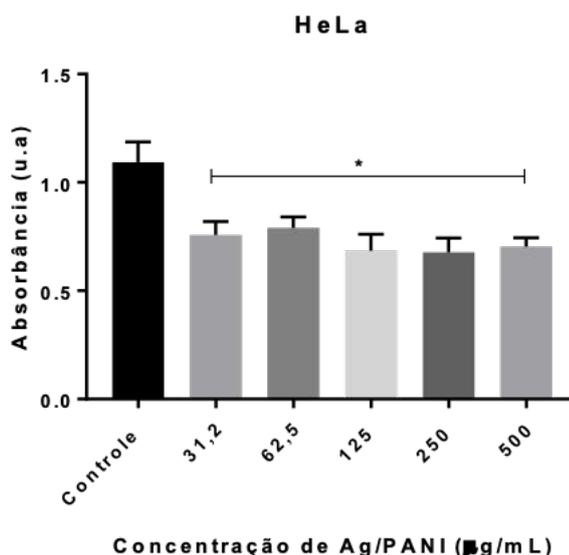
ii) HeLa

Na busca por novos materiais que possam atuar como agente terapêuticos para a ação direcionado de contra células cancerígenas, os materiais compósitos que combinam nanopartículas metálicas e polímeros condutores têm se mostrado bastante promissores, devido à fotoabsorção atenuada das nanopartículas metálicas e sua biocompatibilidade (Stewart *et al.*, 2012; Vaitkuvienė *et al.*, 2013). Por sua vez, a capacidade de absorção de radiação no NIR de alguns polímeros condutores favorece a aplicação desses compósitos em um tratamento fototérmico (Stewart *et al.*, 2012).

Nesse contexto, investigou-se a atividade antitumoral do compósito de Ag/Polianilina através da análise do efeito de diferentes concentrações (31,2 a 500 µg/mL) sobre células HeLa – um tipo de célula imortal oriundas de uma linhagem de células de adenocarcinoma do colo do útero humano. Como pode ser visto na Fig. 90, após 24 horas, as células HeLa que estavam sob tratamento apresentaram uma redução nos valores de absorbância para concentrações de

Ag/Polianilina a partir de 31,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Essa redução na absorbância pode ser atribuída à presença de células danificadas e em estágio de morte celular, indicando a diminuição da viabilidade celular das células HeLa. No entanto, nesse experimento não foi possível determinar qual a concentração que levaria a uma redução de 50% da viabilidade das células (CC_{50}), o que torna necessária uma investigação mais detalhada com esse objetivo.

Figura 90 – Efeito do compósito Ag/Polianilina sobre células de carcinoma cervical humano.



Mesmo que preliminares, esses resultados indicam a possibilidade da utilização do compósito de Ag/Polianilina como um agente terapêutico, o que é reforçado pelo fato de que o efeito antitumoral do compósito ocorreu sem a aplicação de uma fonte externa de energia (como a incidência de radiação IR ou UV). No entanto, a otimização do processo deve ainda ser feita e, para isso, parâmetros importantes como a concentração do compósito deverão ser investigados.

Na literatura, a diminuição da viabilidade celular de células cancerígenas após o tratamento com materiais à base de polianilina e compósitos híbridos polianilina/(nanopartículas metálicas) já foi previamente reportada. Um estudo desenvolvido por (Yslas *et al.*, 2015) demonstrou o potencial do uso de nanopartículas de polianilina (NPs PANI) na terapia de células cancerígenas. Nesse estudo, os autores justificaram o potencial das NPs PANI como agente terapêutico devido a sua alta absorbância óptica na região do infravermelho próximo, o que possibilita a geração de calor e, com isso, a destruição seletiva das células cancerígenas. Além disso, também se observou ser necessária uma maior concentração de NPs de PANI para o tratamento de células cancerígenas, relativamente ao caso

de células mamárias, devido à sua maior taxa metabólica e atividade endolítica. Outro estudo, reportado por (Boomi *et al.*, 2019), revelou o aumento no potencial antitumoral de compósitos de polianilina e NPs de ouro e platina (PANI/Au-Pt NPs), quando comparado com o compósito de polianilina e NPs de ouro (PANI/Au NPs) e a polianilina pura; para a mesma concentração de material, a redução da viabilidade celular foi de 85, 60 e 15 %, respectivamente.

5.3.3 Uso do nanocompósito CoFe/PPy como material antibacteriano

Tento em vista os resultados obtidos, e sabendo do potencial bactericida das nanopartículas de prata, decidimos investigar a possibilidade de se utilizar o compósito de Ag/Polianilina como um material antibacteriano. Para isso, realizou-se uma prova do conceito, na qual uma quantidade definida (~ 500 µg/mL) do compósito estudado foi colocada para interagir com bactérias de *Escherichia coli* (*E. coli*) Gram negativas, da estirpe DH5α e vetor plasmidial pUC19, adquirida do repositório Addgene (EUA). Como anteriormente mencionado, optamos por utilizar a amostra A08 do compósito de Ag/Polianilina para as análises de atividade bactericida, por conta de suas propriedades otimizadas.

A viabilidade celular após o tratamento com o compósito foi avaliada usando o kit de viabilidade bacteriana Live/Dead® BacLight™ (Invitrogen), com a visualização sendo feita utilizando o microscópio Axio ImagerA2 equipado com uma câmera digital AxioCam 503 color (Zeiss, Alemanha). O kit consiste em dois compostos fluorescentes, o Syto9 e o iodeto de propídio (PI), que se ligam aos ácidos nucleicos. Estes compostos variam entre si pela capacidade de penetração nas membranas das células de bactérias e em suas características de emissão de fluorescência no espectro. O Syto9 penetra nas bactérias independente da integridade de sua membrana, gerando fluorescência de cor verde (com excitação em 483 nm e emissão em 503 nm), enquanto que o iodeto de propídio penetra apenas em células que apresentam alteração na integridade de sua membrana, uma condição que geralmente é associada com a morte celular, gerando fluorescência de cor vermelha (com excitação em 535 nm e emissão em 617 nm). Esse é um método que permite uma visualização rápida de células de bactérias viáveis e não viáveis.

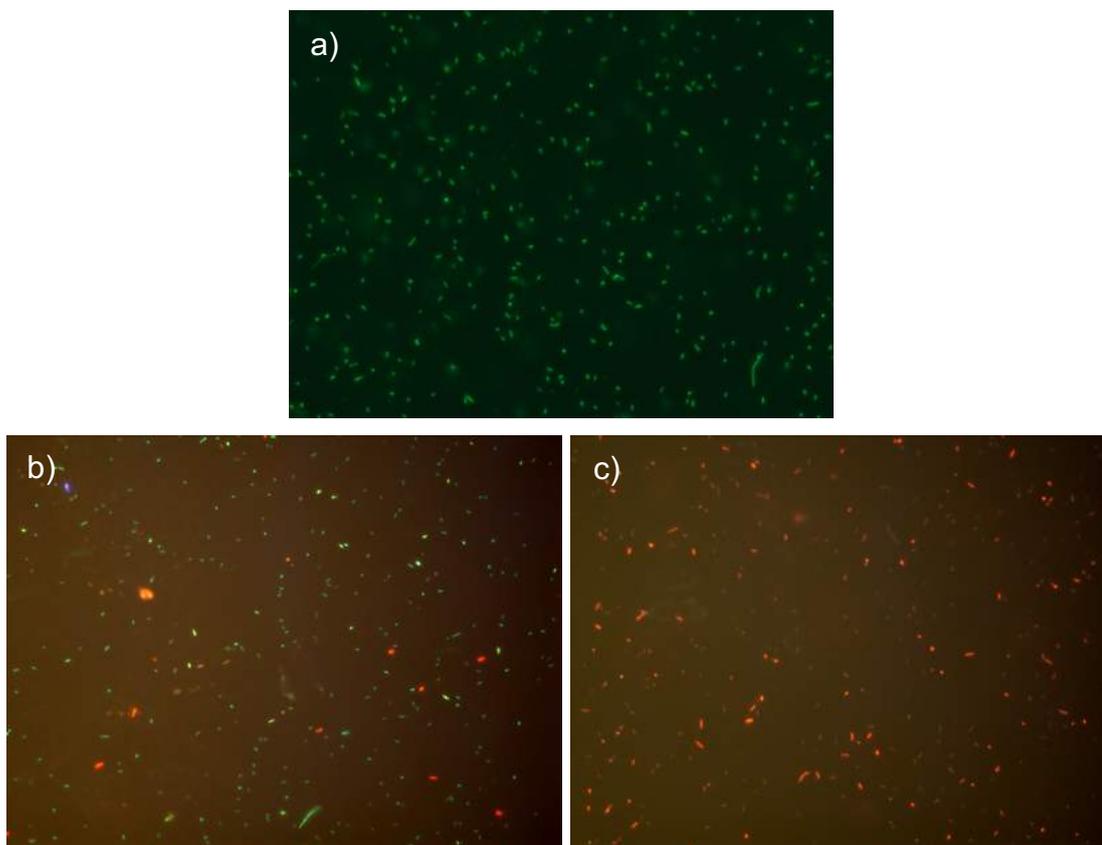
Para o cultivo celular das bactérias, o procedimento adotado foi o protocolo padrão descrito na literatura (Addgene, 2012; Silva, 2019). Após o período de incubação e crescimento, foram realizados a quantificação e o ajuste da concentração das células por meio da densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) com o uso de um espectrofotômetro. Para isso, um precipitado de bactérias (pellets), obtidos através da centrifugação dos tubos cultivados, foi suspenso em solução fisiológica com a concentração sendo ajustada até o valor de 0,5 para a absorvância no comprimento de onda de 600 nm. De acordo com a escala de

turbidez de Macfarland (Balouiri, Sadiki e Ibnsouda, 2016), este ajuste corresponde a uma concentração de 10^8 células por mililitro de solução de bactéria (Sutton, 2011).

Para o teste de atividade bactericida, inicialmente preparamos a amostra A08, a qual foi submetida a um processo de secagem, uma vez que o meio no qual a amostra estava dispersa (etanol) poderia vir a interferir no experimento proposto. Após a completa evaporação do solvente, 0,5 mg do pó resultante foi resuspenso em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (50% v/v) – obtendo uma nova amostra, agora denominada de Ag/Pani/DMSO. Em dois tubos eppendorfs de 1,5 mL, contendo 500 μ L da suspensão bacteriana, foram adicionados i) 50 μ L de DMSO (50 % v/v) e ii) 50 μ L do compósito de Ag/Pani/DMSO. Células que não receberam tratamento foram consideradas como grupo controle. Esses tubos foram mantidos sob agitação constante de 300 rpm por 60 min. Após esse tempo, as células foram marcadas utilizando os marcadores fluorescentes do kit Live/Dead[®] BacLight[™], para a análise da viabilidade celular. Para isso, volumes iguais de Syto9 (3 μ L) e de iodeto de propídio (3 μ L) foram adicionados em um tubo eppendorf. Após isso, adicionamos 1,5 μ L da mistura de corantes para cada 500 μ L de suspensão bacteriana. Essa suspensão foi homogeneizada e mantida abrigada da luz, sob temperatura ambiente, por 15 minutos. Para a avaliação microscópica, 10 μ L da solução foram colocadas sobre uma lâmina microscópica e recobertos com uma lamínula para visualização da fluorescência.

Os resultados da interação do compósito de Ag/Polianilina com as bactérias de *E. coli* são apresentados na Fig. 91. Como é possível observar visualmente na Fig. 91 a), as células que não foram submetidas ao tratamento com o compósito estudado, denominadas de grupo controle, apresentaram a fluorescência apenas na região do verde, indicando a presença de células viáveis, ou seja, vivas. Já na Fig. 91 b), podemos observar que o tratamento das células com o solvente (DMSO) utilizado na diluição do compósito estudado resultou em uma pequena porcentagem na redução da viabilidade das células, o que é indicado pela emissão de fluorescência na região do vermelho. No entanto, ao analisarmos o efeito causado pelo tratamento das células com o compósito proposto, através da imagem da Fig. 91 c), podemos ver uma redução significativa do número de células viáveis, uma vez que a grande maioria das células apresentou a coloração do iodeto de propídio, indicando perda de integridade da membrana celular e conseqüente morte bacteriana.

Figura 91 – Imagens do microscópio de fluorescência de células de *E. coli*. a) sem tratamento (controle) b) sob ação do solvente (DMSO) e c) sob ação do composto Ag/Pani/DMSO.



Embora ainda preliminares, esses resultados indicam que o composto de Ag/Polianilina se mostra eficiente e promissor para uso como material bactericida. No entanto, estudos mais completos precisam ainda vir a ser realizados, a fim de determinar parâmetros relevantes (tais como a concentração ideal do composto, o tempo de morte, a determinação da concentração bactericida mínima e entre outros) e o mecanismo correspondente da ação.

O comportamento bactericida de compostos formados por polímero/metálico já foi reportado previamente. Pesquisadores como (Boomi *et al.*, 2019) mostraram que o efeito antibactericida de compostos de PANI/NPs Au, PANI/NPs Au-Pt eram superiores ao da própria Polianilina. Esse efeito foi atribuído à introdução de NPs metálicas na matriz PANI, o que, por sua vez, aumentou a atividade antibacteriana devido ao efeito combinado de NPs metálicas com a matriz PANI. Outro estudo, realizado por (Jia *et al.*, 2012), demonstrou que o composto de Ag NPs/PANI apresentava um maior potencial antibactericida (e antimicrobiano) em comparação com as NPs de Ag e a PANI puro, nas mesmas condições de teste. O mecanismo atribuído a esse efeito antimicrobiano foi a sinergia estabelecida entre nanopartículas e o polímero durante a formação do composto, a qual, por sua vez, leva à alteração da morfologia

e estrutura da PANI e das NPs de Ag. Essa interação sinérgica foi também explorada por (Kucekova *et al.*, 2013) para a criação de filmes de Polianilina/Ag, que também apresentaram excelentes propriedades antibacterianas. Além disso, estes filmes também demonstraram potencial para aplicações biomédicas, uma vez que ao serem aplicados na superfície da pele humana (na parte superior do braço), não causaram nenhuma irritação ou sensibilização.

5.4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados ao longo deste capítulo comprovam ter sido possível alcançar os objetivos de sintetizar compósitos de Ag/Polianilina com rendimento quântico de 10,05 %. Através do planejamento fatorial foi possível a otimização das condições de síntese, de modo a maximizar a intensidade de fluorescência dos compósitos, e ajustar o valor do potencial zeta e o tamanho do compósito. Dentre as amostras analisadas, a A08 (+ + +) foi aquela para a qual foram obtidos os melhores valores de intensidade de fluorescência, que alcançou a ordem de 10^7 (u.a.) na região do visível, após a excitação em 300 nm.

A partir das técnicas de UV-Vis e FTIR a formação da polianilina foi confirmada e, através das análises das medidas de fluorescência, impedância, e potencial zeta, em função do pH, foi possível verificar a influência da polianilina sobre a condutividade e a fluorescência do compósito estudado. Desse modo, acreditamos que o fenômeno de fluorescência observado no compósito resulta de uma interação sinérgica entre as propriedades da superfície da partícula (NPs de Ag) e as cadeias poliméricas vizinhas que as envolvem por completo.

Análises *in vitro* da biocompatibilidade do compósito de Ag/Polianilina foram realizadas através da técnica de citotoxicidade em células de mamíferos (Vero). Nesses ensaios, foi possível concluir que a viabilidade das células testadas não foi afetada pela ação do compósito estudado. Mesmo que ainda preliminares, esses resultados reforçam a possibilidade de aplicação do compósito em sistemas biológicos. No entanto, análises mais completas precisam ser realizadas para possibilitar uma melhor definição da biocompatibilidade do compósito de Ag/Polianilina, como, por exemplo, o estudo em outros modelos celulares (como fibroblastos e macrófagos).

Além disso, estudos iniciais indicaram que o compósito apresentou uma redução na viabilidade de células de carcinoma cervical humano (células HeLa) e de células de bactérias de *E. coli* Gram negativas. Com base nesses resultados, mesmo que preliminares, podemos ver que o compósito apresenta bom potencial para uso como agente terapêutico e bactericida. No entanto, estudos mais aprofundados se fazem ainda necessários, a fim de determinar os melhores parâmetros e o mecanismo correspondente da ação.

Considerando esses resultados, dentre as principais perspectivas em relação a aplicação do compósito de Ag/Polianilina, temos:

- i. Investigar o efeito citotóxico do compósito Ag/Polianilina frente a diferentes células mamárias.
- ii. Otimização das condições de uso do compósito Ag/Polianilina como um agente terapêutico contra células cancerígenas e bacterianas.
- iii. Determinar um possível mecanismo de ação do compósito sobre as células de HeLa, o que por sua vez poderá permitir uma melhor compreensão sobre o tipo de morte celular que estaria sendo induzido.

6 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

No decorrer deste trabalho discutimos métodos de preparação e caracterização de materiais híbridos e nanoestruturados para aplicações em sensoriamento de íons fosfato, remoção de contaminantes em meios aquosos, purificação de biomoléculas, e como agentes terapêuticos e antibacterianos. Os materiais aqui desenvolvidos foram CoFe_2O_4 , NCM de $\text{PPy@Alg/Qui/CoFeNPs}$, NCM de CoFe/PPy e o compósito fluorescente de Ag/Polianilina .

1. **Nanopartículas de ferrita de cobalto** (CoFe_2O_4 NPs), preparadas pelo método de coprecipitação, foram utilizadas com sucesso como uma nova plataforma sensorial para a detecção sensível e seletiva de íons fosfato. Nossos resultados de sensoriamento indicaram que o sistema por CoFeNPs/ssDNA^* apresentou um excelente limiar de sensibilidade, com limite de detecção estimado de 1,75 nM. Também se verificou uma linearidade na intensidade de resposta da fluorescência para concentrações de íons de fosfato na faixa de (150 a 5000) nM. Dessa forma, é possível usar a mesma plataforma em sistemas com variações extremas na concentração de fosfato. Por conta disso, utilizamos a plataforma para a detecção de íons fosfatos em meios mais complexos, como o soro de sangue humano. Esse sensor apresentou uma alta seletividade, sendo capaz de distinguir o íon fosfato dos demais eletrólitos presentes no soro sanguíneo, e dos demais íons presentes em um meio aquoso. Deste modo, sugerimos que a plataforma CoFeNPs/ssDNA^* pode encontrar aplicações práticas na detecção rápida e sensível de íons fosfato por fluorescência. Assim, dentre as principais perspectivas relacionadas com a aplicação das nanopartículas temos:

- * Realizar experimentos a fim de explorar a estabilidade da plataforma CoFeNPs/ssDNA^* , verificando por quanto tempo o material pode ser estocado em temperatura ambiente e em baixa temperatura (10° C);
- * Verificar a resposta da plataforma CoFeNPs/ssDNA^* frente a amostras reais de rios e lagos, na quantificação da concentração dos íons de fosfato.

2. Os **nanocompósitos magnéticos híbridos** ($\text{PPy@Alg/Qui/CoFeNPs}$) apresentaram uma excelente performance para a remoção do corante azul de metileno em meios aquosos, exibindo uma capacidade máxima de 818,5 e 835,0 mg/g à temperatura ambiente, para o compósito na forma de pérola (PNCM-PPy) e pó (PóNCM-PPy), respectivamente. Esses compósitos também mostraram uma maior eficiência para a remoção de AM em meios em pHs na faixa entre 4,5 e 7,0, o que aumenta a possibilidade de utilização do compósito para a remoção de contaminantes têxtil em efluentes por exemplo, uma vez que não se faz necessária

a acidificação ou alcalinização do meio. Além disso, o uso do NCM é simples devido à presença do núcleo magnético, o que confere uma maior facilidade no manuseio delas. Dessa forma, acreditamos que as principais perspectivas em relação a aplicação do NCM de PPy@Alg/Qui/CoFeNPs, seria:

- * O uso do NCM como agente de remoção eficiente de outros contaminantes, tais como íons de metais pesados (como o cobre, cromo, manganês, chumbo, mercúrio), outros corantes catiônicos (como o vermelho do congo e o índigo carmim), e biomoléculas (como hormônios e proteínas);
- * O uso do NCM para a remoção de contaminantes em amostras reais, provenientes de indústrias têxteis, para que possam vir a ser aplicados em tratamentos terciários em sistemas de descontaminação de efluentes.

3. Os **nanocompósitos magnéticos** (CoFe/PPy), obtidos através da rota de polimerização em fase-vapor, apresentaram excelentes resultados quando utilizados como adsorventes de fase sólida para a extração e purificação de DNA a partir de amostras de sangue total. Nossos resultados revelaram que o uso do NCM CoFe/PPy no protocolo de purificação desenvolvido se mostrou eficaz, levando à obtenção de rendimentos de DNA e pureza semelhantes aos de kits comerciais de purificação magnética de DNA, a partir de amostras de sangue. Mostramos ainda que esse nanocompósito não inibiu a reação de PCR, o que possibilita a aplicação do material diretamente na reação, tornando desnecessária uma etapa prévia de eluição. Desse modo, acreditamos que o NCM CoFe/PPy desenvolvido possa encontrar aplicações variadas na área de biologia molecular. Dentre as principais perspectivas em relação à aplicação do compósito de CoFe/PPy, temos:

- * Buscar o desenvolvimento e a implementação de protocolos para a purificação de DNA a partir de outros tipos de amostras biológicas, como saliva, urina, bactérias, vírus e tecido vegetal.
- * Realizar experimentos com intuito de explorar a aplicação desse material em protocolos de purificação de outras biomoléculas como RNA e proteínas;

4. Por sua vez, **os compósitos fluorescentes de metal/PCs** (Ag/Polianilina), desenvolvidos a partir da síntese de uma reação redox simultânea entre o metal e o polímero condutor, mostraram boa biocompatibilidade, uma vez que a viabilidade das células testadas não foi afetada pela ação do compósito. Ainda que preliminares, esses resultados reforçam a possibilidade de uma aplicação mais ampla do compósito Ag/Polianilina em sistemas

biológicos. Nossos estudos também revelaram uma diminuição significativa da viabilidade das células de carcinoma cervical humano (HeLa) e das células de bactérias Gram-negativas (*E. coli*), indicando um potencial terapêutico e antibacteriano para o compósito estudado. Além disso, análises realizadas por espectroscopia de fluorescência mostraram que a metodologia empregada para a preparação do compósito é efetiva para a formação de duas bandas distintas de emissão, compreendidas na região do ultravioleta (342 nm) e na região do vermelho (667 nm). Com isso, como principais perspectivas relacionadas com a aplicação dos compósitos Ag/Polianilina, temos:

- * Avaliar o efeito citotóxico do compósito Ag/Polianilina frente a diferentes células mamárias, como as células de fibroblastos (células primárias da pele) e macrófagos (células do sistema de defesa). Esses modelos celulares são amplamente utilizados para avaliar a citotoxicidade de novos materiais devido à possibilidade da sua interação com compostos candidatos ao uso na terapia de doenças.
- * Otimização das condições de uso do compósito Ag/Polianilina como um agente terapêutico contra células cancerígenas. Além disso, há ainda a alternativa da utilização do compósito em conjunto a incidência de radiação eletromagnética para possibilitar uma maior potencialização da sua ação antitumoral,
- * Realizar experimentos com intuito de explorar e otimizar a atividade antibacteriana do compósito.

Finalmente, deve ser mencionado que alguns dos projetos relatados nesta tese levaram a desdobramentos e resultados que não foram aqui discutidos. Este é o caso, por exemplo, do desenvolvimento de um sistema, baseado na imobilização de sondas de DNA na superfície do **nanocompósito de CoFe/PPy**, para a detecção sensível e seletiva de sequências de DNA associadas a bactéria de *E. coli*. Ainda que preliminares, nossos resultados indicaram o potencial do compósito para o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico molecular que poderia vir a ser utilizada tanto para a detecção de *E. coli*, quanto de outros agentes infecciosos (como Sars-Cov-2, Zika, HPV-18). Contudo, estudos devem ser ainda realizados para otimizar as condições da imobilização do DNA sobre o compósito, bem como a determinação de valores de sensibilidade, limite de detecção, seletividade e estabilidade para este sistema de sensoriamento.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, S.; DHAKSHANAMOORTHY, J.; DINESH, V.; PULLITHADATHIL, B. Controlled Fabrication of Highly Monodispersed, Gold Nanoparticles Grafted Polyaniline (Au@PANI) Nanospheres and their Efficient Ammonia Gas Sensing Properties. **Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 06, n. 02, p. 2–6, 2015.
- ADAMS, J. G. **Emergency Medicine**. [s.l.] Elsevier Health Sciences., 2018.
- ADDGENE. **Inoculating a Liquid Bacterial Culture**. Disponível em: <www.addgene.org/protocols/inoculate-bacterial-culture/>.
- AHMAD, R.; KUMAR, R. Adsorptive removal of congo red dye from aqueous solution using bael shell carbon. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 5, p. 1628–1633, 2010.
- AJROUDI, L.; MLIKI, N.; BESSAIS, L.; MADIGOU, V.; VILLAIN, S.; LEROUX, C. Magnetic, electric and thermal properties of cobalt ferrite nanoparticles. **Materials Research Bulletin**, v. 59, p. 49–58, 2014.
- ALBERTS, B. **Essential cell biology**. 5 ed. ed. New York: W.W. Norton & Company, 2019.
- ALIYAN, N.; MIRKAZEMI, S. M.; MASOUDPANAH, S. M.; AKBARI, S. The effect of post-calcination on cation distributions and magnetic properties of the coprecipitated MgFe₂O₄ nanoparticles. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 123, n. 6, p. 1–7, 2017.
- ALMEIDA, H. N. **Síntese e Caracterização de Compósitos Fluorescentes de Pani/Cobre**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2019.
- ALVES, K. G. .; FELIX, J. F.; MELO, E. F. DE; SANTOS, C. G. DOS; ANDRADE, C. A. S.; MELO, C. P. DE. Characterization of ZnO/polyaniline nanocomposites prepared by using surfactant solutions as polymerization media. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. S1, p. 141–147, 2012.
- ALVES, K. G. B.; ANDRADE, C. A. S.; CAMPELLO, S. L.; SOUZA, R. E. DE; MELO, C. P. DE. Magnetite/polypyrrole hybrid nanocomposites as a promising magnetic resonance imaging contrast material. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 5, p. 3170–3176, 2013.
- AMIRABADIZADEH, A.; SALIGHE, Z.; SARHADDI, R.; LOTFOLLAHI, Z. Synthesis of ferrofluids based on cobalt ferrite nanoparticles: Influence of reaction time on structural, morphological and magnetic properties. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 434, p. 78–85, 2017.
- ANAND, B. S. S.; SUJATHA, N. Fluorescence quenching effects of hemoglobin on simulated tissue phantoms in the UV-Vis range. **Measurement Science and Technology**, v. 23, n. 2, 2012.
- ANDREWS, D. L. **Rayleigh scattering and Raman**. In: TRANTE ed. New York: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. Academic Press, 1999.
- ANSARI, M. O.; KUMAR, R.; PARVEEN, N.; BARAKAT, M. A.; CHO, M. H. Facile strategy for the synthesis of non-covalently bonded and para-toluene sulfonic acid-

functionalized fibrous polyaniline@graphene-PVC nanocomposite for the removal of Congo red. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 7004–7011, 2015.

ANTONEL, P. S.; MOLINA, F. V.; ANDRADE, E. M. Fluorescence of polyaniline films on platinum surfaces. Influence of redox state and conductive domains. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 599, n. 1, p. 52–58, 2007.

ARANDA-SOUZA, M. Â.; LORENA, V. M. B. DE; SANTOS CORREIA, M. T. DOS; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. DE. In vitro effect of Bothrops leucurus lectin (BLL) against Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 431–439, 2018.

ARAÚJO, I.; GUILHEN, J.; MARQUES, J.; PAVANETTI, L.; ZANOLLI, M.; FERREIRA, R.; ALASMAR, V. Correção da hipofosfatemia grave com dialisato enriquecido de fósforo em paciente hemodialisado. **Arq. ciênc. saúde**, v. 13, n. 4, p. 221–223, 2006.

ARELARO, A. D. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferritas. **Dissertação**, p. 89, 2008.

ASKAR, A. M. Hyperphosphatemia: The hidden killer in chronic kidney disease. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 1, p. 13–19, 2015.

ATES, M. A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1853–1859, 2013.

AZELEE, I. W.; ISMAIL, R.; ALI, R.; BAKAR, W. A. W. A. Chelation technique for the removal of heavy metals (As, Pb, Cd and Ni) from green mussel, *Perna viridis*. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 43, n. 3, p. 372–376, 2014.

AZIZIAN, S. Kinetic models of sorption: A theoretical analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, n. 1, p. 47–52, 2004.

BAGOTSKY, V. S.; SKUNDIN, A. M.; VOLFKOVICH, Y. M. Electrochemical Power Sources: Batteries, Fuel Cells, and Supercapacitors. **Electrochemical Power Sources: Batteries, Fuel Cells, and Supercapacitors**, n. 4, p. 1–374, 2015.

BAI, L.; LI, Z.; ZHANG, Y.; WANG, T.; LU, R.; ZHOU, W.; GAO, H.; ZHANG, S. Synthesis of water-dispersible graphene-modified magnetic polypyrrole nanocomposite and its ability to efficiently adsorb methylene blue from aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 757–766, 2015.

BAKER, C. O.; SHEDD, B.; TSENG, R. J.; MARTINEZ-MORALES, A. A.; OZKAN, C. S.; OZKAN, M.; YANG, Y.; KANER, R. B. Size control of gold nanoparticles grown on polyaniline nanofibers for bistable memory devices. **ACS Nano**, v. 5, n. 5, p. 3469–3474, 2011.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R. **Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications**. 2 ed. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 495–504, 2006.

BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: with applications to chemistry, biology, and physics.** New York: Dover Publications, 2000.

BHADRA, S.; KHASTGIR, D.; SINGHA, N. K.; LEE, J. H. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 8, p. 783–810, 2009.

BÍBLIA. **BÍBLIA. Português. A Bíblia Sagrada: Antigo e Novo Testamento.** Tradução ed. Brasília: Sociedade Bíblia do Brasil, 1969.

BLINOVA, N. V.; STEJSKAL, J.; TRCHOVÁ, M.; SAPURINA, I.; ČIRIĆ-MARJANOVIĆ, G. The oxidation of aniline with silver nitrate to polyaniline-silver composites. **Polymer**, v. 50, n. 1, p. 50–56, 2009.

BOBER, P.; STEJSKAL, J.; TRCHOVÁ, M.; PROKEŠ, J. In-situ prepared polyaniline-silver composites: Single- and two-step strategies. **Electrochimica Acta**, v. 122, p. 259–266, 2014.

BOEVA, Z. A.; SERGEYEV, V. G. Polyaniline: Synthesis, properties, and application. **Polymer Science - Series C**, v. 56, n. 1, p. 144–153, 2014.

BOOMI, P.; POORANI, G. P.; PALANISAMY, S.; SELVAM, S.; RAMANATHAN, G.; RAVIKUMAR, S.; BARABADI, H.; PRABU, H. G.; JEYAKANTHAN, J.; SARAVANAN, M. Evaluation of Antibacterial and Anticancer Potential of Polyaniline-Bimetal Nanocomposites Synthesized from Chemical Reduction Method. **Journal of Cluster Science**, v. 0123456789, 2019.

BOURGEAT-LAMI, E. Organic-Inorganic Nanostructured Colloids. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1–24, 2002.

BRICEÑO, S.; BRÄMER-ESCAMILLA, W.; SILVA, P.; DELGADO, G. E.; PLAZA, E.; PALACIOS, J.; CAÑIZALES, E. Effects of synthesis variables on the magnetic properties of CoFe 2O₄ nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 18, p. 2926–2931, 2012.

BROWN, T. L.; LEMAY, H. E.; BURSTEN, B. E. **Chemistry : the central science.** 10 ed. ed. [s.l.] Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall., 2014.

BUTLER, J. M. **Fundamentals of forensic DNA typing.** Maryland: [s.n.]. v. 53

CAI, P.; HUANG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, H. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 471–476, 2006.

CALLADINE, C. R. **Understanding DNA the molecule & how it works.** San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2004.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução.** 7. ed. [s.l.] LTC S.A., 2008.

CAMARERO, L.; CATALAN, J. Atmospheric phosphorus deposition may cause lakes to revert from phosphorus limitation back to nitrogen limitation. **Nature Communications**, v. 3, n. May, p. 1115–1118, 2012.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D. DE; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CERRUTTI, B. **Estabilização de Suspensões Aquosas de Alumina pela Adição de Taninos e Quitosana Quaternizada**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.

CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MEDINA-LLAMAS, J. C.; MAQUEIRA, L.; ANDRADE, C. A. S.; ALVES, K. G. B.; MELO, C. P. DE. Efficient removal of Cr (VI) and Cu (II) ions from aqueous media by use of polypyrrole/maghemite and polyaniline/maghemite magnetic nanocomposites. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, n. Vi, p. 826–836, 2015.

CHEN, S. A.; CHUANG, K. R.; CHAO, C. I.; LEE, H. T. White-light emission from electroluminescence diode with polyaniline as the emitting layer. **Synthetic Metals**, v. 82, n. 3, p. 207–210, 1996.

CHIANG, J. C.; MACDIARMID, A. G. “Polyaniline”: Protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime. **Synthetic Metals**, v. 13, n. 1–3, p. 193–205, 1986.

CHOI, J.; OH, B.; KIM, Y.; MIN, J. Nanotechnology in Biodevices. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 5–14, 2007.

CHOUGULE, M. A.; PAWAR, S. G.; GODSE, P. R.; MULIK, R. N.; SEN, S.; PATIL, V. B. Synthesis and Characterization of Polypyrrole (PPy) Thin Films. **Soft Nanoscience Letters**, v. 01, n. 01, p. 6–10, 2011.

CHRISTIE, R. M. **Environmental Aspects of Textile Dyeing**. Woodhead, Boca Raton. [s.l: s.n.].

CLARKE, E. A.; STEINLE, D. Health and environmental safety aspects of organic colorants. **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, v. 25, n. 1, p. 1–5, 1995.

CROSBY, G. A.; DEMAS, J. N. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 991–1024, 1971.

CULLITY, B. D. **Elements of X-ray Diffraction**. 2. ed. Massachusetts: Addison-Wesley, 1978.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials**. 2nd editio ed. New Jersey: Wiley, 2009.

DAY, R. N.; SCHAUFLELE, F. Fluorescent protein tools for studying protein dynamics in living cells: a review. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, n. 3, p. 031202, 2008.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments**, n. 45, p. 1–5, 2010.

DING, T. S.; HUANG, X. C.; LUO, Y. L.; HSU, H. Y. In vitro investigation of methylene blue-bearing, electrostatically assembled aptamer-silica nanocomposites as potential photodynamic therapeutics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 217–224, 2015.

DUTTA, P. K. **Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine**. [s.l: s.n.].

DWIVEDI, A. K.; SAIKIA, G.; IYER, P. K. Aqueous polyfluorene probe for the detection and estimation of Fe³⁺ and inorganic phosphate in blood serum. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 2502–2507, 2011.

E. SILVA-DE HOYOS, L.; SÁNCHEZ-MENDIETA, V.; R. VILCHIS-NESTOR, A.; A. CAMACHO-LÓPEZ, M. Biogenic Silver Nanoparticles as Sensors of Cu²⁺ and Pb²⁺ in Aqueous Solutions. **Universal Journal of Materials Science**, v. 5, n. 2, p. 29–37, 2017.

EPSTEIN, A. J.; GINDER, J. M.; ZUO, F.; WOO, H. S.; TANNER, D. B.; RICHTER, A. F.; ANGELOPOULOS, M.; HUANG, W. S.; MACDIARMID, A. G. Insulator-to-metal transition in polyaniline: Effect of protonation in emeraldine. **Synthetic Metals**, v. 21, n. 1–3, p. 63–70, 1987.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. 1985.

F. ROUESSAC, A. R. **Chemical Analysis. Modern Instrumentation Methods and Techniques**. [s.l.: s.n.]. v. 24

FEBRIANTO, J.; KOSASIH, A. N.; SUNARSO, J.; JU, Y. H.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 2–3, p. 616–645, 2009.

FENG, J.; XIONG, R.; CHENG, L.; LIU, Y. Effect of Chromium Substitution on Structural and Magnetic Properties of Nickel-Cobalt Ferrite Nanoparticles Synthesized by Coprecipitation Method. **Journal of Superconductivity and Novel Magnetism**, v. 30, n. 12, p. 3513–3521, 2017.

FERREIRA, T. A. S.; WAERENBORGH, J. C.; MENDONÇA, M. H. R. M.; NUNES, M. R.; COSTA, F. M. Structural and morphological characterization of FeCo₂O₄ and CoFe₂O₄ spinels prepared by a coprecipitation method. **Solid State Sciences**, v. 5, n. 2, p. 383–392, 2003.

FINOTELLI, P. V.; SILVA, D. DA; SOLA-PENNA, M.; ROSSI, A. M.; FARINA, M.; ANDRADE, L. R.; TAKEUCHI, A. Y.; ROCHA-LEÃO, M. H. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 206–211, 2010.

FITZGERALD, F. Clinical Hypophosphatemia. **Annual Review of Medicine**, v. 29, n. 1, p. 177–189, 2003.

FONER, S. The vibrating sample magnetometer: Experiences of a volunteer (invited). **Journal of Applied Physics**, v. 79, n. 8, p. 4740, 1996.

FRANÇA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Novos compósitos de polianilina e exopolissacarídeos com aplicações em biomateriais: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 1, p. 37, 2007.

FRANZONI, P. A. **Um Estudo Da Influência Da Quantidade De Pinos Em União Híbrida Metal-Compósito**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

FREUNDLICH, H. Über die Adsorption in Lösungen. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 57, n. 1, 1907.

FUJIWARA, K.; LEI, W.; UCHIKL, H.; SHIMOKOSHI, F.; FUWA, K.; KOBAYASHI, T. Determination of Phosphorus at the Parts per Trillion Level by Laser-Induced Thermal Lensing Colorimetry. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 2026–2029, 1982.

GIMENEZ, T. D. **Extração e amplificação de RNA do vírus da dengue em microchips de Poliéster-Toner (PeT)**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2016.

GONG, J.; YAO, K.; LIU, J.; WEN, X.; CHEN, X.; JIANG, Z.; MIJOWSKA, E.; TANG, T. Catalytic conversion of linear low density polyethylene into carbon nanomaterials under the combined catalysis of Ni₂O₃ and poly(vinyl chloride). **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 339–347, 2013.

GOODARZ NASERI, M.; SAION, E. B.; ABBASTABAR AHANGAR, H.; SHAARI, A. H.; HASHIM, M. Simple synthesis and characterization of cobalt ferrite nanoparticles by a thermal treatment method. **Journal of Nanomaterials**, v. 2010, n. July 2014, 2010.

GORZA, F. D. S.; PEDRO, G. C.; SILVA, R. J. DA; MEDINA-LLAMAS, J. C.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MELO, C. P. DE. Electrospun polystyrene-(emeraldine base) mats as high-performance materials for dye removal from aqueous media. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 82, p. 300–311, 2018.

GRABOLLE, M.; SPIELES, M.; LESNYAK, V.; GAPONIK, N.; EYCHMÜLLER, A.; RESCH-GENGER, U. Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: Suitable procedures and achievable uncertainties. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 6285–6294, 2009.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Revisão: corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.

GUO, L.; LIU, G.; HONG, R. Y.; LI, H. Z. Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 2212–2222, 2010.

GUO, Z.; SHIN, K.; KARKI, A. B.; YOUNG, D. P.; KANER, R. B.; HAHN, H. T. Fabrication and characterization of iron oxide nanoparticles filled polypyrrole nanocomposites. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 6, p. 1441–1452, 2009.

GUPTA, V. K.; SUHAS. Application of low-cost adsorbents for dye removal - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2313–2342, 2009.

GYERGEK, S.; MAKOVEC, D.; A., K.; ARCON, I.; JAGODIC, M.; DROFENIK, M. Influence of synthesis method on structural and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. **J Nanopart Res**, v. 12, p. 1263–1273, 2010.

GYÓRI, E.; FÁBIÁN, I.; LÁZÁR, I. Effect of the Chemical Composition of Simulated Body Fluids on Aerogel-Based Bioactive Composites. **Journal of Composites Science**, v. 1, n. 2, p. 15, 2017.

HADDAD, M. EL; MAMOUNI, R.; SLIMANI, R.; SAFFAJ, N.; RIDAOUI, M.; ELANTRI, S.; LAZAR, S. Adsorptive removal of reactive Yellow 84 dye from aqueous solutions onto animal bone meal. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 3, n. 6, p. 1019–1026, 2012.

HADDAD, M. EL; SLIMANI, R.; MAMOUNI, R.; ELANTRI, S.; LAZAR, S. Removal of two textile dyes from aqueous solutions onto calcined bones. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences**, v. 14, n. 1, p. 51–59, 2013.

HALL, L. E. **DNA and RNA. Understanding genetics**. 1 ed. ed. New York: Rosen Pub., 2011.

HAMEED, B. H.; DIN, A. T. M.; AHMAD, A. L. Adsorption of methylene blue onto bamboo-based activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 3, p. 819–825, 2007.

HAN, L.; ZHANG, YANG; ZHANG, YUE; SHU, Y.; CHEN, X. W.; WANG, J. H. A magnetic polypyrrole/iron oxide core/gold shell nanocomposite for multimodal imaging and photothermal cancer therapy. **Talanta**, v. 171, n. March, p. 32–38, 2017.

HASSAN, A. F.; ABDEL-MOHSEN, A. M.; FOUUDA, M. M. G. Comparative study of calcium alginate, activated carbon, and their composite beads on methylene blue adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 192–198, 2014.

HASSAN, T. A. A.; AJEEL, M. A.; MOHAMMED, A. J. The preparing of polyaniline- silver composites by oxidation in comparison with polyaniline -carbon nanotube composites prepared by electro-oxidation for hydrogen sensors. **AIP Conference Proceedings**, v. 2190, 2019.

HATTON, R. A.; WILLIS, M. R.; CHESTERS, M. A.; BRIGGS, D. A robust ultrathin, transparent gold electrode tailored for hole injection into organic light-emitting diodes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 722–726, 2003.

HE, X.; MALE, K. B.; NESTERENKO, P. N.; BRABAZON, D.; PAULL, B.; LUONG, J. H. T. Adsorption and desorption of methylene blue on porous carbon monoliths and nanocrystalline cellulose. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 17, p. 8796–8804, 2013.

HECHT, H.; SREBNIK, S. Structural Characterization of Sodium Alginate and Calcium Alginate. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 6, p. 2160–2167, 2016.

HECK, A. L.; TAFFAREL, S. R.; HOFFMANN, R.; JAHN, S. L.; FOLETTO, E. L.; MARIA, S. Synthesis of MgAl₂O₄ spinel via “sol-gel”. **Magnesium**, v. 51, p. 117–120, 2005.

HEEGER, A. J. Semiconducting and metallic polymers: The fourth generation of polymeric materials. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 36, p. 8475–8491, 2001.

HELMER, R., HESPANHOL, I. **Water Pollution Control – A Guide to the Use of Water Quality Management Principles**. [s.l: s.n.].

HERGT, R.; HIERGEIST, R.; ZEISBERGER, M.; GLÖCKL, G.; WEITSCHIES, W.; RAMIREZ, L. P.; HILGER, I.; KAISER, W. A. Enhancement of AC-losses of magnetic nanoparticles for heating applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 280, n. 2–3, p. 358–368, 2004.

HO, Y. S.; MCKAY, G. A kinetic study of dye sorption by biosorbent waste product pith. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 25, n. 3–4, p. 171–193, 1999.

HOSNI, N.; ZEHANI, K.; BARTOLI, T.; BESSAIS, L.; MAGHRAOUI-MEHERZI, H. Semi-

hard magnetic properties of nanoparticles of cobalt ferrite synthesized by the co-precipitation process. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 694, p. 1295–1301, 2017.

HOU, Y.; HAN, X.; CHEN, J.; LI, Z.; CHEN, X.; GAI, L. Isolation of PCR-ready genomic DNA from *Aspergillus niger* cells with Fe₃O₄/SiO₂ microspheres. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 101–106, 2013.

HU, L. L.; HU, B.; SHEN, L. M.; ZHANG, D. D.; CHEN, X. W.; WANG, J. H. Polyethyleneimine-iron phosphate nanocomposite as a promising adsorbent for the isolation of DNA. **Talanta**, v. 132, p. 857–863, 2015.

HUANG, K. **Statistical Mechanics**. New York: John Wiley & Sons, 1987.

HUANG, K. J.; LIU, Y. J.; WANG, H. B.; WANG, Y. Y. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on silver nanoparticles-polydopamine@graphene composite. **Electrochimica Acta**, v. 118, p. 130–137, 2014.

HUANG, T.; YAN, M.; HE, K.; HUANG, Z.; ZENG, G.; CHEN, A.; PENG, M.; LI, H.; YUAN, L.; CHEN, G. Efficient removal of methylene blue from aqueous solutions using magnetic graphene oxide modified zeolite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 543, p. 43–51, 2019.

HUANG, W.-S.; HUMPHREY, B. D.; MACDIARMID, A. G. Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions v.1**, v. 82, n. 8, p. 2385, 1986.

HUANG, W. S.; MACDIARMID, A. G. Optical properties of polyaniline. **Polymer**, v. 34, n. 9, p. 1833–1845, 1993.

HUMPOLÍČEK, P.; KAŠPÁRKOVÁ, V.; PACHERNÍK, J.; STEJSKAL, J.; BOBER, P.; CAPÁKOVÁ, Z.; RADASZKIEWICZ, K. A.; JUNKAR, I.; LEHOČKÝ, M. The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, n. 2017, p. 303–310, 2018.

HUMPOLICEK, P.; KASPARKOVA, V.; SAHA, P.; STEJSKAL, J. Biocompatibility of polyaniline. **Synthetic Metals**, v. 162, n. 7–8, p. 722–727, 2012.

HUNG, C. C.; WEN, T. C.; WEI, Y. Site-selective deposition of ultra-fine Au nanoparticles on polyaniline nanofibers for H₂O₂ sensing. **Materials Chemistry and Physics**, v. 122, n. 2–3, p. 392–396, 2010.

HUNGER, K. **Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications**. Wiley-VCH, Weinheim. [s.l.: s.n.].

ISENMANN, A. F. **Corantes**. 2. ed. [s.l.] Timóteo: CEFET, 2014.

JANATA, J.; JOSOWICZ, M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. **Nature Materials**, v. 2, n. 1, p. 19–24, 2003.

JAYAKUMAR, R.; REIS, R. L.; MANO, J. F. Synthesis and characterization of pH-sensitive thiol-containing chitosan beads for controlled drug delivery applications. **Drug Delivery**, v. 14, n. 1, p. 9–17, 2007.

JIA, Q.; SHAN, S.; JIANG, L.; WANG, Y.; LI, D. Synergistic antimicrobial effects of polyaniline combined with silver nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 5, p. 3560–3566., 2012.

JIA, X.; CHEN, D.; BIN, L.; LU, H.; ZHANG, R.; ZHENG, Y. Highly selective and sensitive phosphate anion sensors based on AlGaIn/GaN high electron mobility transistors functionalized by ion imprinted polymer. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–7, 2016.

JOHNSON, K. S.; PETTY, R. L. Determination of Phosphate in Seawater by Flow Injection Analysis with Injection of Reagent. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 1185–1187, 1982.

JONES, R. M. **Mechanics of Composite Materials. (Materials Science & Engineering Series) Robert M.** 2nd. ed. EUA: [s.n.].

KARCHER, S.; KORNMÜLLER, A.; JEKEL, M. Screening of commercial sorbents for the removal of reactive dyes. **Dyes and Pigments**, v. 51, n. 2–3, p. 111–125, 2001.

KAYSER, H. Ueber die Verdichtung von Gasen an Oberflächen in ihrer Abhängigkeit von Druck und Temperatur. **Annalen Der Physik**, v. 4, n. 248, p. 526–537, 1881.

KERMEKCHIEV, M. B.; KIRILOVA, L. I.; VAIL, E. E.; BARNES, W. M. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 5, p. 1–14, 2009.

KHAN, A.; ALDWAYYAN, A. S.; ALHOSHAN, M.; ALSALHI, M. Synthesis by in situ chemical oxidative polymerization and characterization of polyaniline/iron oxide nanoparticle composite. **Polymer International**, v. 59, n. 12, p. 1690–1694, 2010.

KHAN, M. D. A.; AKHTAR, A.; NABI, S. A. Investigation of the electrical conductivity and optical property of polyaniline-based nanocomposite and its application as an ethanol vapor sensor. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 3728–3735, 2015.

KIELECZAWA, J. **DNA sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup.** [s.l.] Jones and Bartlett Publishers, 2006.

KIM, T. S.; SONG, H. J.; DAR, M. A.; LEE, H. J.; KIM, D. W. Fast adsorption kinetics of highly dispersed ultrafine nickel/carbon nanoparticles for organic dye removal. **Applied Surface Science**, v. 439, p. 364–370, 2018.

KIM, Y. H.; LEE, J.; HOFMANN, S.; GATHER, M. C.; MÜLLER-MESKAMP, L.; LEO, K. Achieving high efficiency and improved stability in ITO-free transparent organic light-emitting diodes with conductive polymer electrodes. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 30, p. 3763–3769, 2013.

KIM, Y. IL; KIM, D.; LEE, C. S. Synthesis and characterization of CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. **Physica B: Condensed Matter**, v. 337, n. 1–4, p. 42–51, 2003.

KING, A. H. **Brow seaweed extracts (Alginates).** In GLICKSMAN, M. **Food hydrocolloids.** [s.l.] CRC Revivals, 1983.

KLUG, M.; SANCHES, M. N. M.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; RODRIGUES,

C. A. Analysis of adsorption isotherms of Cu(II), Ni(II), Pb(II) and Zn(II) by N-(3,4-dihydroxybenzyl) chitosan using nonlinear regression method. **Quimica Nova**, v. 21, n. 4, p. 410–413, 1998.

KNUTSSON, J.; RAUCH, S.; MORRISON, G. M. Performance of a passive sampler for the determination of time averaged concentrations of nitrate and phosphate in water. **Environmental Sciences: Processes and Impacts**, v. 15, n. 5, p. 955–962, 2013.

KOHLES, S. S.; BRADSHAW, S.; MASON, S. S.; LOOFT, F. J. A multivariate logistical model for identifying the compressive sensitivity of single rat tactile receptors as nanobiosensors. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2011.

KONNICK, E. Q.; YEUNG, C. C. S.; WU, D. Neoplastic Disease Diagnosis, DNA in. **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**, v. 2, n. 3, p. 163–199, 2006.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

KUCEKOVA, Z.; KASPARKOVA, V.; HUMPOLICEK, P.; SEVCIKOVA, P.; STEJSKAL, J. Antibacterial properties of polyaniline-silver films. **Chemical Papers**, v. 67, n. 8, p. 1103–1108, 2013.

KUCZYNSKA, A.; UYGUN, A.; KAIM, A.; WILCZURA-WACHNIK, H.; YAVUZ, A. G.; ALDISSI, M. Effects of surfactants on the characteristics and biosensing properties of polyaniline. **Polymer International**, v. 59, n. 12, p. 1650–1659, 2010.

KUMAR, R. Phosphate Sensing. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 18, n. 4, p. 281–284, 2009.

LAGERGREN, S. Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens.**, v. 24, n. Handlingar, p. 1–39, 1898.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. University ed. Maryland, USA: Springer, 2006.

LANGMUIR, I. The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Mica. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 0, p. 1361–14–3, 1918.

LAW AL, A. T.; ADELOJU, S. B. Progress and recent advances in phosphate sensors: A review. **Talanta**, v. 114, p. 191–203, 2013.

LI, C. M.; LI, Y. F.; WANG, J.; HUANG, C. Z. Optical investigations on ATP-induced aggregation of positive-charged gold nanoparticles. **Talanta**, v. 81, n. 4–5, p. 1339–1345, 2010.

LI, G. YIN; JIANG, Y. REN; HUANG, K. LONG; DING, P.; CHEN, J. Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 466, n. 1–2, p. 451–456, 2008.

LI, J.; FENG, J.; YAN, W. Excellent adsorption and desorption characteristics of polypyrrole/TiO₂ composite for Methylene Blue. **Applied Surface Science**, v. 279, p. 400–

408, 2013.

LI, X.; ZHANG, J.; GU, H. Adsorption and desorption behaviors of DNA with magnetic mesoporous silica nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 10, p. 6099–6106, 2011.

LI, Y.; DU, Q.; LIU, T.; SUN, J.; WANG, Y.; WU, S.; WANG, Z.; XIA, Y.; XIA, L. Methylene blue adsorption on graphene oxide/calcium alginate composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 501–507, 2013.

LIMA, E. M. DE A. **Compósito Ag/Polipirrol: Síntese, Propriedades e Atividade Antitumoral**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

LIMA, S. V.; OLIVEIRA, H. P.; MELO, C. P. Electrical impedance monitoring of protein unfolding. **RSC Advances**, v. 6, n. 109, p. 107644–107652, 2016.

LIU, BIWU; LIU, J. Comprehensive Screen of Metal Oxide Nanoparticles for DNA Adsorption, Fluorescence Quenching, and Anion Discrimination. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 44, p. 24833–24838, 2015.

LIU, A.; BAC, L. H.; KIM, J. S.; KIM, B. K.; KIM, J. C. Synthesis and characterization of conducting polyaniline-copper composites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, n. 11, p. 7728–7733, 2013.

LIU, A.; BAC, L. H.; KIM, J. S.; KIM, J. C. Preparation and comparative study of polyaniline/copper and polyaniline/silver composites by electrical explosion of wire. **Proceedings - 2012 7th International Forum on Strategic Technology, IFOST 2012**, 2012.

LIU, B.; LIU, J. DNA adsorption by magnetic iron oxide nanoparticles and its application for arsenate detection. **Chemical Communications**, v. 50, n. 62, p. 8568–8570, 2014.

LIU, C. H.; WU, J. S.; CHIU, H. C.; SUEN, S. Y.; CHU, K. H. Removal of anionic reactive dyes from water using anion exchange membranes as adsorbers. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1491–1500, 2007.

LIU C.; ZOU B.; RONDINONE A. J.; ZHANG Z. J. Chemical Control of Superparamagnetic Properties of Magnesium and Cobalt Spinel Ferrite Nanoparticles through Atomic Level Magnetic Couplings. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 6, p. 6263–6267, 2000.

LIU, L.; WAN, Y.; XIE, Y.; ZHAI, R.; ZHANG, B.; LIU, J. The removal of dye from aqueous solution using alginate-halloysite nanotube beads. **Chemical Engineering Journal**, v. 187, p. 210–216, 2012.

LOPEZ, A.; ZHANG, Y.; LIU, J. Tuning DNA adsorption affinity and density on metal oxide and phosphate for improved arsenate detection. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 493, p. 249–256, 2017.

LORESTANI, F.; NIA, P. M.; ALIAS, Y.; MANAN, N. S. A. One-Step Synthesis of Different Silver-Polyaniline Composite Morphologies for Enzymless Hydrogen Peroxide Detection. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 162, n. 7, p. B193–B200, 2015.

LUTTEROTTI, L.; BORTOLOTTI, M.; ISCHIA, G.; LONARDELLI, I.; WENK, H. R.

Rietveld texture analysis from diffraction images. **Zeitschrift fur Kristallographie, Supplement**, v. 1, n. 26, p. 125–130, 2007.

LVOVICH, V. F. **Impedance spectroscopy with application to electrochemical and dielectric phenomena**. New Jersey: [s.n.].

M. REDA, S.; M. AL-GHANNAM, S. Synthesis and Electrical Properties of Polyaniline Composite with Silver Nanoparticles. **Advances in Materials Physics and Chemistry**, v. 02, n. 02, p. 75–81, 2012.

MACHADO, L. D. B.; MATOS, J. R. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: [s.n.].

MACIEL, B. G.; SILVA, R. J. DA; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; MEDINA-LLAMAS, J. C.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; MELO, C. P. DE. Magnetic extraction and purification of DNA from whole human blood using a γ -Fe₂O₃@Chitosan@Polyaniline hybrid nanocomposite. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 100–108, 2018.

MACKAY, I. M. **Real-time PCR in microbiology: From diagnosis to characterization**. Norfolk, United Kingdom: Academic Press.: [s.n.].

MACKENZIE, R. C. NOMENCLATURE FOR THERMAL ANALYSIS—IV. v. 57, n. 11, p. 137–1340, 1985.

MACKIE, A. R.; MACIERZANKA, A.; AARAK, K.; RIGBY, N. M.; PARKER, R.; CHANNEL, G. A.; HARDING, S. E.; BAJKA, B. H. Sodium alginate decreases the permeability of intestinal mucus. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 749–755, 2016.

MAKOVETS, S. **DNA electrophoresis : methods and protocols**. Methods in ed. New York: Humana Press., 2013. v. 4

MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura**. [s.l.] UFSC, 2003.

MANJUNATHA, C. M.; TAYLOR, A. C.; KINLOCH, A. J.; SPRENGER, S. The effect of rubber micro-particles and silica nano-particles on the tensile fatigue behaviour of a glass-fibre epoxy composite. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 1, p. 342–345, 2009.

MANNA, A. DELLO *et al.* Developmental validation of the DNAscan™ Rapid DNA Analysis™ instrument and expert system for reference sample processing. **Forensic Science International: Genetics**, v. 25, p. 145–156, 2016.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. São Paulo: [s.n.].

MANTELL, C. L. **Adsorption**. 2. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1951.

MARÁKOVÁ, N.; HUMPOLÍČEK, P.; KAŠPÁRKOVÁ, V.; CAPÁKOVÁ, Z.; MARTINKOVÁ, L.; BOBER, P.; TRCHOVÁ, M.; STEJSKAL, J. Antimicrobial activity and cytotoxicity of cotton fabric coated with conducting polymers, polyaniline or polypyrrole, and with deposited silver nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 396, p. 169–176, 2017.

MARGOLIS, J. M. **Conductive polymers and plastics**. New York: Chapman and Hall, 1989. MASROUR, R.; HAMEDOUN, M.; BENYOUSSEF, A. The magnetic properties of diluted

CoFe 2O₄ nanomaterials. **Chinese Physics B**, v. 21, n. 4, 2012.

MATTOSO, L. H. C. Polianilia: Síntese, estruturas e propriedades. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 388–399, 1996.

MEDEIROS, D. W. O. DE; SANTOS, D. S. DOS; DANTAS, T. N. C.; PEREIRA, M. R.; GIACOMETTI, J. A.; FONSECA, J. L. C. Zeta potential and doping in polyaniline dispersions. **Materials Science- Poland**, v. 21, n. 2, p. 251–257, 2003.

MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 2, p. 62–77, 2012.

MEDINA-LLAMAS, J. C. **Uso de nanocompósitos magnéticos de polianilina/maghemita e polipirrol/maghemita para recuperação de dna presente em sistemas biológicos ou em meios aquosos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

MEDINA-LLAMAS, J. C.; CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E.; ANDRADE, C. A. S.; ALVES, K. G. B.; MELO, C. P. DE. Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 434, p. 167–174, 2014.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Analytical Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1113–1126, 2004.

MENDES, J. B. S.; ALVES SANTOS, O.; GOMES, J. P.; ASSIS, H. S.; FELIX, J. F.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, R. L.; REZENDE, S. M.; AZEVEDO, A. Efficient spin transport through polyaniline. **Physical Review B**, v. 95, n. 1, p. 1–8, 2017.

MERCIER, B.; GAYCHER, C.; FEUGEAS, O.; MAZURIER, C. Direct PCR from dried blood without DNA extraction. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 19, p. 5908, 1990.

METCALF, L.; EDDY, H. P.; TCHOBANOGLIOUS, G. **Wasewater Engineering: treatment and reuse**. New York ed. [s.l.] McGraw-Hill, 2004.

MIMURA, A. M. S.; ALMEIDA VIEIRA, T. V. DE; MARTELLI, P. B.; FÁTIMA GORGULHO, H. DE. Aplicação da casca de arroz na adsorção dos íons Cu²⁺, Al³⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1279–1284, 2010.

MONDAL, P. .; DIASPRO, A. **Fundamentals of Fluorescence Microscopy**. [s.l.] Springer Netherlands, 2014.

MOORE, G. E.; WOODS, L. K. Culture media for human cells-RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 and GEM 1717. **Tissue Culture Association Manual**, v. 3, n. 1, p. 503–509, 1977.

MOSTAFAEI, A.; ZOLRIASATEIN, A. Synthesis and characterization of conducting polyaniline nanocomposites containing ZnO nanorods. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 22, n. 4, p. 273–280, 2012.

MURTHY, K. V. R.; VIRK, H. S. Luminescence phenomena: An introduction. **Defect and Diffusion Forum**, v. 347, p. 1–34, 2014.

NALWA, H. S. **Advanced Functional Molecules & Polymers, Electronic & Photonic Properties**. [s.l.] Gordon and Breach Science Publishers, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 6 ed. ed. Porto Alegre: Lehninger, 2013.

NEZAKATI, T.; SEIFALIAN, A.; TAN, A.; SEIFALIAN, A. M. Conductive Polymers: Opportunities and Challenges in Biomedical Applications. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 14, p. 6766–6843, 2018.

NIC, M.; HOVORKA, L.; JIRAT, J.; KOSATA, B.; ZNAMENACEK, J. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology 2nd ed. (the “Gold Book”). **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. Version 2., p. 1281–1282, 2005.

NITHIYANANTHAM, U.; RAMADOSS, A.; EDE, S. R.; KUNDU, S. DNA mediated wire-like clusters of self-assembled TiO₂ nanomaterials: Supercapacitor and dye sensitized solar cell applications. **Nanoscale**, v. 6, n. 14, p. 8010–8023, 2014.

O’HANDLEY, R. **Modern Magnetic Materials: Principles and Applications**. [s.l.] Wiley., 2000.

O’MULLANE, A. P.; DALE, S. E.; MACPHERSON, J. V.; UNWIN, P. R. Fabrication and electrocatalytic properties of polyaniline/Pt nanoparticle composites. **Chemical Communications**, v. 4, n. 14, p. 1606–1607, 2004.

OMASTOVA, M.; RYCHLÝ, J.; TRCHOVÁ, M.; KOVÁŘOVÁ, J. Properties and thermal decomposition of polypyrrole prepared in the presence of sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate. **Designed Monomers and Polymers**, v. 7, n. 6 SPEC. ISS., p. 633–646, 2004.

PAREDES JUÁREZ, G. A.; SPASOJEVIC, M.; FAAS, M. M.; VOS, P. DE. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, n. AUG, p. 1–15, 2014.

PAUTLER, R.; KELLY, E. Y.; HUANG, P. J. J.; CAO, J.; LIU, B.; LIU, J. Attaching DNA to nanoceria: Regulating oxidase activity and fluorescence quenching. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 15, p. 6820–6825, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia**. [s.l.] Cengage Learning, 2010.

PEI, Q.; QIAN, R. Protonation and deprotonation of polypyrrole chain in aqueous solutions. **Synthetic Metals**, v. 45, n. 1, p. 35–48, 1991.

PELT-VERKUIL, E. VAN; BELKUM, A. VAN;; HAYS, J. P. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. [s.l.: s.n.]. v. 91

PEREIRA, F. A. A. **COMPÓSITOS POLIMÉRICOS HÍBRIDOS REFORÇADOS COM FIBRAS DE PET RECICLADAS E PARTÍCULAS DE SÍLICA**. [s.l.] UFSJ, 2016.

POGGERE, P.A.; DAVIS, R.; MONTANHER, S.F.; LOBO, V. S. **Azul de Metileno: Propriedades e tratamentos**. [s.l.] UTFPR, 2011.

PRÄBST, K.; ENGELHARDT, H.; RINGGELER, S.; HÜBNER, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. **Cell Viability Assays**, v. 1601, p. 1–17, 2017.

PRÜFER, K. *et al.* The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 43–49, 2014.

PURNAMA, B.; RAHMAWATI, R.; WIJAYANTA, A. T.; SUHARYANA. Dependence of structural and magnetic properties on annealing times in co-precipitated cobalt ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism**, v. 20, n. 3, p. 207–210, 2015.

QUINTANA, J. B.; RODIL, R.; REEMTSMA, T. Determination of phosphoric acid mono- and diesters in municipal wastewater by solid-phase extraction and ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 5, p. 1644–1650, 2006.

RAFIQI, F. A.; MAJID, K. Synthesis, characterization, luminescence and magnetic properties of composite of polyaniline with nickel bisacetylacetonate complex. **Polymer Science - Series B**, v. 58, n. 3, p. 371–383, 2016.

RANA, S.; PHILIP, J.; RAJ, B. Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry. **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, n. 1, p. 264–269, 2010.

REYNOLDS, T. D.; RICHARDS, P. A. **Unit operation and process in environmental engineering**. Boston: [s.n.].

RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 2, n. 2, p. 65–71, 2002.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual**. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 15, p. 2472–2485, 2013.

ROCHA, O. R. S.; NASCIMENTO, G. E. DO; CAMPOS, N. F.; SILVA, V. L. DA; DUARTE, M. M. M. B. Avaliação do processo adsorptivo utilizando mesocarpo de coco verde para remoção do corante cinza reativo BF-2R. **Quimica Nova**, v. 35, n. 7, p. 1369–1374, 2012.

RODRIGUES FILHO, G. M. **ADSORÇÃO DO CORANTE AMARELO REATIVO BF-4G 200% por argila esmectita**. [s.l.: s.n.].

SAHOO, S. L.; LIU, C. H. Adsorption behaviors of DNA by modified magnetic nanoparticles: Effect of spacer and salt. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 184–194, 2015.

SAMPAIO, L. C.; GARCIA, F.; CERNICCHIARO, G. R. C.; TAKEUCHI, A. Y. Técnicas de Magnetometria. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 406–410, 2000.

SANNIGRAHI, A.; GHOSH, S.; LALNUNTLUANGA, J.; JANA, T. How the monomer concentration of polymerization influences various properties of polybenzimidazole: A case

study with poly(4,4'-diphenylether-5,5'-bibenzimidazole). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, n. 5, p. 2194–2203, 2009.

SANPO, N.; BERNDT, C. C.; WEN, C.; WANG, J. Transition metal-substituted cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 3, p. 5830–5837, 2013.

SANTOS, R. F. S.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS, C. G. DOS; MELO, C. P. DE. Visible luminescence in polyaniline/(gold nanoparticle) composites. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, 2013.

SAOUDI, B.; DESPAS, C.; CHEHIMI, M. M.; JAMMUL, N.; DELAMAR, M.; BESSIÈRE, J.; WALCARIUS, A. Study of DNA adsorption on polypyrrole: Interest of dielectric monitoring. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 62, n. 1, p. 35–42, 2000.

SARAJI, M.; YOUSEFI, S.; TALEBI, M. Plasmid DNA purification by zirconia magnetic nanocomposite. **Analytical Biochemistry**, v. 539, p. 33–38, 2017.

SARICIFTCI, N. S.; BARTONEK, M.; KUZMANY, H.; NEUGEBAUER, H.; NECKEL, A. Analysis of various doping mechanisms in polyaniline by optical, FTIR and Raman spectroscopy. **Synthetic Metals**, v. 29, n. 1, p. 193–202, 1989.

SCHMID, F.; BEER, L. Biological Macromolecules : Spectrophotometry Concentrations. **Methods**, p. 1–4, 2001.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; KEVIN W ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SCIENTIFIC, T. 260/280 and 260/230 Ratios. **T009-Technical Bulletin**, p. 1, 2008.

SETHNA, P. P.; DOWNING, H. D.; PINKLEY, L. W.; WILLIAMS, D. Infrared band intensities in ammonium hydroxide and ammonium salts*. **Journal of the Optical Society of America**, v. 68, n. 4, p. 429, 2008.

SEYMOUR, R. B. **Conductive Polymers**. Series: Po ed. [s.l.] Springer US, 1981.

SHAHJUEE, T.; MASOUDPANAH, S. M.; MIRKAZEMI, S. M.; MORTEZA MASOUDPANAH, S.; MOHAMMAD MIRKAZEMI, S. Coprecipitation Synthesis of CoFe₂O₄ Nanoparticles for Hyperthermia. **Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials**, v. 50, n. 2, p. 105–110, 2017.

SHAN, Z.; WU, Q.; WANG, X.; ZHOU, Z.; OAKES, K. D.; ZHANG, X.; HUANG, Q.; YANG, W. Bacteria capture, lysate clearance, and plasmid DNA extraction using pH-sensitive multifunctional magnetic nanoparticles. **Analytical Biochemistry**, v. 398, n. 1, p. 120–122, 2010.

SHEEHAN, D. **Physical biochemistry : principles and applications**. 2 ed. ed. Chichester, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2009.

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

SILVA, R. J. **Desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados baseados em**

polímeros condutores e suas aplicações na purificação de dna, remediação ambiental, e em dispositivos eletrônicos flexíveis. [s.l.] UFPE, 2019.

SINDEN, R. R. **DNA structure and function.** San Diego: Academic Press., 1994.

SLATOPOLSKY, E. The intact nephron hypothesis: the concept and its implications for phosphate management in CKD-related mineral and bone disorder. **Kidney International**, v. 79, n. SUPPL. 121, p. 3–8, 2011.

SMIT, J.; WIJN, H. P. J. **Ferrites.** Eindhoven: The Netherlands, Philips Technical Library, 1959.

SONG, C.; WANG, G. Y.; KONG, D. M. A facile fluorescence method for versatile biomolecular detection based on pristine α -Fe₂O₃ nanoparticle-induced fluorescence quenching. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 239–244, 2015.

SONG, D.; PARK, SEONG-JIK; KANG, H. W.; PARK, SEUNG BIN; HAN, J. Recovery of Lithium (I), Strontium (II), and Lanthanum (III) Using Ca – Alginate Beads. n. I, 2013.

STEJSKAL, J. Conducting polymer-silver composites. **Chemical Papers**, v. 67, n. 8, p. 814–848, 2013.

STEJSKAL, J.; TRCHOVÁ, M. Aniline oligomers versus polyaniline. **Polymer International**, v. 61, n. 2, p. 240–251, 2012.

STEWART, E. M.; LIU, X.; CLARK, G. M.; KAPSA, R. M. I.; WALLACE, G. G. Inhibition of smooth muscle cell adhesion and proliferation on heparin-doped polypyrrole. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 194–200, 2012.

SUN, H.; ZHU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; WANG, D. Capture and release of genomic DNA by PEI modified Fe₃O₄/Au nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 2, p. 311–315, 2010.

SUN, K.; ZHANG, S.; LI, P.; XIA, Y.; ZHANG, X.; DU, D.; ISIKGOR, F. H.; OUYANG, J. Review on application of PEDOTs and PEDOT:PSS in energy conversion and storage devices. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 26, n. 7, p. 4438–4462, 2015.

SUN, L.; LV, P. C.; YIN, Y. C.; LI, H. N.; WANG, F. Green synthesis of silver nanoparticles using wolfberry fruits extract and their photocatalytic performance. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 292, n. 1, 2018.

SUTTON, S. Measurement of microbial cells by optical density. **J. Validation Techn**, v. 17, n. 1, p. 46–49, 2011.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 605–610, 1997.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

TANG, C. Y.; YANG, Z. **Transmission Electron Microscopy (TEM).** [s.l.] Elsevier B.V., 2017.

- TEWARI, P. H. **Adsorption from aqueous solutions**. New York: Plenum Press., 1981.
- THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61–87, 2003.
- THERMO SCIENTIFIC. NanoDrop Nucleic Acid Technical Guide. v. Revised 11, p. 1–30, 2010.
- THOMPSON, J. O. F.; SAALBACH, L.; CRANE, S. W.; PATERSON, M. J.; TOWNSEND, D. Ultraviolet relaxation dynamics of aniline, N, N -dimethylaniline and 3,5-dimethylaniline at 250 nm. **Journal of Chemical Physics**, v. 142, n. 11, 2015.
- TONELLI, M.; SACKS, F.; PFEFFER, M.; GAO, Z.; CURHAN, G. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2627–2633, 2005.
- TONHI, E., PLEPIS, A. M. DE G. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BLENDS COLÁGENO-QUITOSANA. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943–948, 2002.
- TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. USA: University Science Books, 1991.
- UYGUNA, A.; ASLAN, E. Comparative study of conducting polyaniline/copper and polyaniline/nickel composites in the presence of surfactants. **Polymer International**, v. 59, n. 8, p. 1162–1167, 2010.
- VAITKUVIENE, A.; KASETA, V.; VORONOVIC, J.; RAMANAUSKAITE, G.; BIZIULEVICIENE, G.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250–251, p. 167–174, 2013.
- VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Weinheim.: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 6, p. 731–738, 2011.
- VASCONCELOS, C. L.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Polyelectrolytes in solution and the stabilization of colloids. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 59–70, 2005.
- VAZOLLER, R. F. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas, Microbiologia e saneamento ambiental**. Campinas, 1996.
- VÁZQUEZ-VÁZQUEZ, C.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A.; BUJÁN-NÚÑEZ, M. C.; RIVAS, J. Finite size and surface effects on the magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 4, p. 1663–1676, abr. 2011.
- VERWEY, E. J. W.; HEILMANN, E. L. Physical properties and cation arrangement of oxides with spinel structures I. Cation arrangement in spinels. **The Journal of Chemical Physics**, v. 15, n. 4, p. 174–180, 1947.

VIDAL, C. B.; MELO, D. Q.; LIMA, A. C. A.; BARROS, A. L.; RAULINO, G. S. C.; NASCIMENTO, R. F. **Adsorção: Aspectos Teóricos e Aplicações Ambientais**. [s.l: s.n.].

WAINWRIGHT, M. **Dyes for the medical industry**. In: **Handbook of textile and industrial dyeing: Volume 2: Applications of dyes**. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2011.

WANG, B.; GAO, B.; ZIMMERMAN, A. R.; LEE, X. Impregnation of multiwall carbon nanotubes in alginate beads dramatically enhances their adsorptive ability to aqueous methylene blue. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 133, p. 235–242, 2018.

WANG, J. SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 16, p. 3011–3016, 2000.

WANG, N.; JIN, R. N.; OMER, A. M.; OUYANG, X. KUN. Adsorption of Pb(II) from fish sauce using carboxylated cellulose nanocrystal: Isotherm, kinetics, and thermodynamic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, n. 1i, p. 232–240, 2017.

WANG, X.; LIU, L. H.; RAMSTRÖM, O.; YAN, M. Engineering nanomaterial surfaces for biomedical applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 10, p. 1128–1139, 2009.

WANG, X.; LOPEZ, A.; LIU, J. Adsorption of Phosphate and Polyphosphate on Nanoceria Probed by DNA Oligonucleotides. **Langmuir**, v. 34, n. 26, p. 7899–7905, 2018.

WANG, Y.; GUAN, X. N.; WU, C. Y.; CHEN, M. T.; HSIEH, H. H.; TRAN, H. D.; HUANG, S. C.; KANER, R. B. Processable colloidal dispersions of polyaniline-based copolymers for transparent electrodes. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 17, p. 4814–4820, 2013.

WARWICK, C.; GUERREIRO, A.; WOOD, E.; KITSON, J.; ROBINSON, J.; SOARES, A. A molecular imprinted polymer based sensor for measuring phosphate in wastewater samples. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 1, p. 48–54, 2014.

WATANABE, A.; MORI, K.; IWASAKI, Y.; NAKAMURA, Y.; NIIZUMA, S. Electrochromism of Polyaniline Film Prepared by Electrochemical Polymerization. **Macromolecules**, v. 20, n. 8, p. 1793–1796, 1987.

WATSON, J. D. **Molecular biology of the gene**. 7 ed. ed. Boston: Pearson., 2014.

WEBER, W. J.; MORRIS, J. C. Kinetics of adsorption carbon from solutions. **Journal Sanitary Engineering Division Proceedings. American Society of Civil Engineers**, v. 89, p. 31- 60, 1963.

WENDLANDT, W. W. M. **Thermal Analysis**. [s.l: s.n.].

WILLIAMS, A. T. R.; WINFIELD, S. A.; MILLER, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a Computer-controlled luminescence spectrometer. **The Analyst**, v. 108, n. 1290, p. 1067–1071, 1983.

WILSON, K.; WALKER, J. M. **Principles and techniques of practical biochemistry**. 5 ed. ed. [s.l.] Cambridge University Press, 2000.

WINK, M. **An introduction to molecular biotechnology: fundamentals, methods, and**

applications. 2 ed. ed. [s.l.] Weinheim: Wiley-Blackwell., 2011.

WU, H.; TONG, C. A Specific Turn-On Fluorescent Sensing for Ultrasensitive and Selective Detection of Phosphate in Environmental Samples Based on Antenna Effect-Improved FRET by Surfactant. **ACS Sensors**, v. 3, n. 8, p. 1539–1545, 2018.

WU, W.; LIN, R.; SHEN, L.; LIANG, R.; YUAN, R.; WU, L. Highly efficient visible-light-induced photocatalytic hydrogenation of nitrobenzene to aniline in water. **RSC Advances**, v. 3, n. 27, p. 10894–10899, 2013.

WYRZYKOWSKI, D.; CHMURZYŃSKI, L. Thermodynamics of citrate complexation with Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} ions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 61–64, 2010.

YAGUB, M. T.; SEN, T. K.; AFROZE, S.; ANG, H. M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 172–184, 2014.

YANG, J.; ACHARYA, R.; ZHU, X.; KÖSE, M. E.; SCHANZE, K. S. Pyrophosphate Sensor Based on Principal Component Analysis of Conjugated Polyelectrolyte Fluorescence. **ACS Omega**, v. 1, n. 4, p. 648–655, 2016.

YSLAS, E. I.; IBARRA, L. E.; MOLINA, M. A.; RIVAROLA, C.; BARBERO, C. A.; BERTUZZI, M. L.; RIVAROLA, V. A. Polyaniline nanoparticles for near-infrared photothermal destruction of cancer cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 10, 2015.

YU, T.; LIU, B.; LIU, J. Adsorption of Selenite and Selenate by Metal Oxides Studied with Fluorescent DNA Probes for Analytical Application. **Journal of Analysis and Testing**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2017.

YUSSUF, A.; AL-SALEH, M.; AL-ENEZI, S.; ABRAHAM, G. Synthesis and Characterization of Conductive Polypyrrole: The Influence of the Oxidants and Monomer on the Electrical, Thermal, and Morphological Properties. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 2018.

ZHANG, W.; DONG, L.; YAN, H.; LI, H.; JIANG, Z.; KAN, X.; YANG, H.; LI, A.; CHENG, R. Removal of methylene blue from aqueous solutions by straw based adsorbent in a fixed-bed column. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, n. 2, p. 429–436, 2011.

ZHANG, X.; BAI, R. Surface electric properties of polypyrrole in aqueous solutions. **Langmuir**, v. 19, n. 26, p. 10703–10709, 2003.

ZHANG, Y.; LIU, S.; WANG, L.; LUO, Y.; TIAN, J.; ASIRI, A. M.; AL-YOUBI, A. O.; SUN, X. Novel use of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticles for fluorescent nucleic acid detection. **ACS Combinatorial Science**, v. 14, n. 3, p. 191–196, 2012.

ZHAO, B.; NAN, Z. Formation of self-assembled nanofiber-like Ag@PPy core/shell structures induced by SDBS. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 7, p. 1971–1975, 2012.

ZHAO, R.; WANG, Y.; LI, X.; SUN, B.; WANG, C. Synthesis of β -cyclodextrin-based electrospun nanofiber membranes for highly efficient adsorption and separation of methylene

blue. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 48, p. 26649–26657, 2015.

ZHAO, X.; SCHANZE, K. S. Fluorescent ratiometric sensing of pyrophosphate via induced aggregation of a conjugated polyelectrolyte. **Chemical Communications**, v. 46, n. 33, p. 6075–6077, 2010.

ZOLLINGER, H. **Colour Chemistry Synthesis Properties and Application of Organic Dyes and Pigments**. [s.l.] VCH New York, 1991.

APÊNDICE A – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO

Neste Apêndice serão apresentadas a preparação das soluções usadas nos protocolos de sensoriamento de íons de fosfato, e de lise, extração e purificação de DNA, discutidos em capítulos anteriores. Como os protocolos desenvolvidos compartilham do mesmo tipo de soluções, elas serão apresentadas em ordem cronológica, sem repetições das soluções ao longo do texto.

A.1. Soluções utilizadas no Capítulo 1

- Solução tampão (Tris – HCl/MgCl₂)
 1. Pesar 2,03 mg de cloreto de magnésio,
 2. Adicionar em um balão volumétrico de 100 mL e aferir com água deionizada,
 3. Pesar 3,028 g de Tris base,
 4. Adicionar em um balão de 500 mL o Tris, 210 mL de HCl (0,2M) e 50 mL da solução de cloreto de magnésio (passo 2),
 5. Aferir com água deionizada.

A.2. Soluções utilizadas no Capítulo 3

- Solução de lise (Triton 1%)
 1. Adicionar 1 mL de Triton X – 100x em um balão volumétrico de 100 mL,
 2. Aferir com água deionizada.

- Solução de ligação (Glicina – HCl – NaCl, pH 3,2)
 1. Pesar 375,3 mg de glicina,
 2. Colocar em um balão volumétrico de 25 mL e aferir
 3. Pesar 17,5 g de NaCl,
 4. Adicionar em um balão volumétrico de 100 mL o NaCl, a solução de glicina (etapa 2) e 2,5 mL de HCl (0,2M),
 5. Aferir com água deionizada.

- Solução de lavagem (CH₃COOK – Tris – EDTA – Etanol, pH 8,5)
 1. Pesar 798,7 mg de acetato de potássio,
 2. Pesar 136,9 mg de Tris base,
 3. Pesar 1,6 mg de EDTA,
 4. Adicionar o EDTA, o Tris e acetato de potássio em um balão volumétrico de 50 mL,

5. Aferir com água deionizada.

Para os experimentos, adicionamos 1,7 mL de etanol para cada 1 mL da solução de lavagem.

- Solução de eluição fosfato/fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,8)
 1. Pesar 239,6 mg de fosfato monossódico,
 2. Colocar em um balão volumétrico de 10 mL e aferir com água deionizada,
 3. Pesar 1,4 g de fosfato disfórico,
 4. Colocar em um balão volumétrico de 50 ml e aferir com água deionizada,
 5. Adicionar 6,5 mL da solução de fosfato monossódico e 43,5 mL da solução de fosfato dissódico em um balão volumétrico de 100 mL
 6. Aferir com água deionizada.

- Solução de eluição Tris/SDS (pH 8,0)
 1. Pesar 0,605 g de Tris,
 2. Colocar em um balão de 50 mL e aferir com água deionizada,
 3. Pesar 272,3 mg de SDS
 4. Adicionar a solução de Tris (passo 2) e o SDS em um balão volumétrico de 100 mL,
 5. Aferir com água destilada

- Solução de eluição Glicina/NaOH (pH 8,8)
 1. Pesar de 375,3 mg de glicina,
 2. Colocar em um balão de 25 mL e aferir com água deionizada,
 3. Adicionar 25 mL da solução de glicina e 3 mL de NaOH em um balão volumétrico de 100 mL,
 4. Aferir com água deionizada.

- Solução de TAE 0,5 X (Eletroforese)
 1. Adicionar 12,5 mL de TAE 40x em um balão volumétrico de 1000 mL,
 2. Aferir com água destilada.

APÊNDICE B – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

• Artigos Publicados

LANGMUIR

pubs.acs.org/Langmuir

Article

Spinel Cobalt Ferrite Nanoparticles for Sensing Phosphate Ions in Aqueous Media and Biological Samples

Gabriela P. Ratkovski, Kamila T. O. do Nascimento, Graciela C. Pedro, Danilo R. Ratkovski, Filipe D. S. Gorza, Romário J. da Silva, Bruna G. Maciel, Lizeth C. Mojica-Sánchez, and Celso P. de Melo*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.Langmuir.9b02901>

Read Online

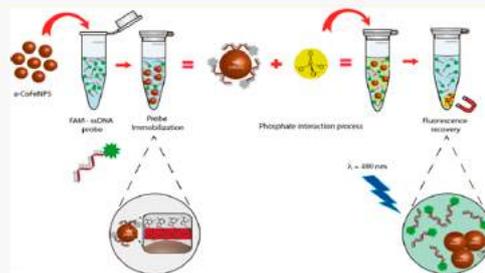
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Phosphate ions perform a variety of functions in metabolic processes and are essential for all living organisms. The determination of the concentration of phosphate ions is useful in clinical diagnosis of various diseases as an inadequate phosphate level could lead to many health problems. In the search for a cost-effective method of fast monitoring, we investigated the use of cobalt ferrite nanoparticles (CoFeNPs) in the selective recognition of phosphate ions dissolved in aqueous media and more complex samples, such as human blood serum. We prepared these NPs by a chemical coprecipitation route and subjected them to annealing at 600 °C for 1 h. The successful formation of the NPs was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, transmission electron microscopy, and hysteresis loop measurements. The NPs exhibited a ferrimagnetic behavior, a spinel-type crystalline structure, and hexagonal shape in the nanoscale range. We demonstrated that CoFeNPs containing immobilized fluorescent-labeled single-chain DNA (ssDNA*) probes can be applied for the fast selective detection of phosphate ions dissolved in a liquid medium. We have explored the fact that phosphate groups can displace ssDNA* probes attached to the nanoparticles, therefore causing a perceptible change in the fluorescence signal of the supernatant liquid. This detection method has been tested for the sensing of phosphate ions present both in aqueous solutions and in biological samples, with excellent selectivity and a low limit of detection (~1.75 nM).



■ INTRODUCTION

Phosphate groups are an essential component of all living organisms, performing a variety of functions in metabolic processes.¹ As examples of their ubiquity, one can cite their presence in phospholipids, molecules essential for the formation of cell membranes, in adenosine triphosphate, the power supply for all cellular processes, and in nucleic acids,^{2,3} as well as the role played by calcic phosphate salts in structures that confer mechanical rigidity to bones and teeth.³

It is important to develop methods for a practical assessment of the phosphate level in biological samples. An inadequate phosphate level in body fluids could lead to many health problems, and therefore, determining the concentration of phosphate ions is essential for the clinical diagnosis of various diseases, such as kidney failure,⁴ hypertension, vitamin D deficiency, bone disorders, and hyperparathyroidism.^{4,5} Hyperphosphatemia, that is, an elevated level (>45 mg L⁻¹) of phosphate in blood serum, could lead to the formation of calcium deposits in soft tissues, hypoparathyroidism, diabetic ketoacidosis, and tumor lysis syndrome.^{3,6,7} On the other hand, low levels of phosphate in the blood (hypophosphatemia) correspond to an electrolyte disorder that can cause bone

softening, heart and respiratory failure, and even coma. This syndrome, which has a positive diagnosis¹ when the phosphate concentration in blood serum becomes lower than 25 mg L⁻¹, is classified as severe^{8,9} when these levels are below 10 mg L⁻¹.

In addition, phosphate is commonly used in fertilizers as a precursor of phosphorus, an essential plant nutrient. However, their extensive use in agriculture makes phosphate ions an important contaminant of both soil and water. The World Health Organization recommends a maximum phosphate concentration of 1 mg L⁻¹ in drinking water.³ High phosphate levels in lakes and coastal water can induce excessive growth of plants and algae (eutrophication), disrupting aquatic life cycles,^{10–12} in a process that is accelerated by intensive animal husbandry and anthropogenic discharges into the environment.¹² Hence, there is also a need for practical sensors that

Received: September 26, 2019

Revised: February 28, 2020

Published: March 2, 2020

ACS Publications

© XXXX American Chemical Society

A

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.Langmuir.9b02901>
Langmuir XXXX, XXX, XXX–XXX



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtice

Use of PMMA/(rice husk ash)/polypyrrole membranes for the removal of dyes and heavy metal ions



Hérica D. da Rocha^a, Edson S. Reis^a, Gabriela P. Ratkovski^b, Romário J. da Silva^a, Filipe D.S. Gorza^a, Graciela C. Pedro^a, Celso P. de Melo^{a,b,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 7 October 2019

Revised 11 February 2020

Accepted 4 March 2020

Available online 31 March 2020

Keywords:

Adsorbent composite membranes

Conductive polymers

Industrial waste

Water remediation

Heavy metal ions

Organic dyes

ABSTRACT

We describe the preparation of polymethylmethacrylate/(rice husk ash)/polypyrrole (PMMA/RHA/PPy) composite membranes and their use as active agents for the removal of hexavalent chromium (Cr(VI)) and the organic dyes tartrazine (E102) and indigo carmine (IC). We prepared the membranes following a two-step process: initially, using the electrospinning technique, we obtained PMMA/RHA mats with various relative concentrations, and afterward we used an *in situ* chemical polymerization to incorporate polypyrrole chains onto the surface of the membrane fibers. We characterized the membranes by SEM, water contact angle and fiber diameter measurements, tensile tests, UV–Vis and FTIR spectroscopy. We have found that the incorporation of RHA in the ratio 1:0.1 led to an enhanced mechanical strength of the polymeric fibers. At pH 2, the PMMA/RHA/PPy membranes exhibited a good removal capacity for all three contaminants, estimated as 360.5 mg/g (after 150 min), 165.7 mg/g (after 60 min) and 142.9 mg/g (after 70 min), for Cr(VI), E102 and IC, respectively. We suggest that the PMMA/RHA/PPy membrane is a promising active material for application in efficient water remediation protocols, for combining advantages as a simple preparation methodology and a high adsorption capacity toward different types of contaminants.

© 2020 Taiwan Institute of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

After decades of accelerated industrial and agricultural progress that have contributed to a significant increase in environmental disorder and pollution, contamination of water bodies has become one of the most important problems of the 21st Century [1]. Industrial processes usually generate a large amount of residual water, which must be submitted to appropriate treatment before its disposal into the environment [2,3]. The food, pharmaceutical, cosmetic, textile dyeing, garment preparation, and leather tanning industries make extensive use of heavy metal ions and organic dyes in their processes [4,5]. These substances, which are toxic contaminants that can cause liver damage, pulmonary congestion and allergic reactions [6,7], are highly carcinogenic when present in excess.

The search for new materials for wastewater treatment continues to be of interest, in terms of making the corresponding processes more economical and energy-efficient. Adsorptive substances have been widely exploited for allowing easy removal of contaminants [8,9], by mass transfer mechanisms in which the active agent (the

adsorbent) is a solid material able to capture the interest targets (the adsorbate) present in a fluid medium [10].

Among the adsorbent materials, the use of membranes capable of an efficient adsorption/desorption of contaminants has deserved special attention [11,12]. Highly porous adsorbent membranes may allow for excellent adhesion of the target molecules, and so great efforts have been made to investigate different compositions of these materials aiming to optimize their use in the remediation of aqueous media [13,14]. As a special interest exists for composite membranes containing polymers, polymethylmethacrylate and polypyrrole deserve attention for their simplicity of synthesis, good biocompatibility, and high environmental and thermal stability [15,16].

Agricultural waste is an abundant source of porous materials rich in active functional groups. Hence, an interesting alternative would be the use of this type of residue in low-cost and eco-friendly remediation processes. Waste materials have been used either as natural adsorbents or in composite agents for the capture of dissolved molecules and ions [17,18]. For instance, it is known that calcination of rice husk produces a silica particle network that, once incorporated in a polymeric matrix, results in nanocomposites with enhanced mechanical properties [19,20].

We have previously examined the use of polystyrene/polyaniline composite membranes for removal of dyes from aqueous media [21] and the efficiency of polypyrrole/maghemite and polyaniline/maghemite

* Corresponding author at: Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

E-mail address: celso@df.ufpe.br (C.P. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2020.03.003>

1876–1070/© 2020 Taiwan Institute of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.



Kinetics and thermodynamic studies of methyl orange removal by polyvinylidene fluoride-PEDOT mats

Romário J. da Silva^a, Lizeth Carolina Mojica-Sánchez^b, Filipe D.S. Gorza^a, Graciela C. Pedro^a, Bruna G. Maciel^a, Gabriela P. Ratkovski^b, Hérica D. da Rocha^a, Kamila T.O. do Nascimento^a, Juan C. Medina-Llamas^c, José J. Alcaraz-Espinoza^c, Alicia E. Chávez-Guajardo^d, Celso P. de Melo^{1,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50070-900 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50070-900 Recife, PE, Brazil

^c Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No.16, Instituto Politécnico Nacional, 9850 Zautzucan, Yuc, Mexico

^d Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98050 Zacatecas, Zac, Mexico

¹ Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 December 2019
Revised 21 April 2020
Accepted 21 April 2020
Available online xxx

Keywords:
Electrospinning
Composite mats
PEDOT
PVDF mats
Dye removal
Water remediation

ABSTRACT

We report the preparation of poly(3,4-ethylene dioxothiophene) (PEDOT)-modified polyvinylidene fluoride electrospun fibers and their use as a novel adsorbent material for the removal of the anionic dye Methyl Orange (MO) from aqueous media. This novel adsorbent material can be used to selectively remove MO on a wide pH range (3.0–10.0), with a maximum capacity of 143.8 mg/g at pH 3.0. When used in a recirculating filtration system, the maximum absorption capacity was reached in a shorter time (20 min) than that observed for batch mode experiments (90 min). Based on the analyses of the kinetics and adsorption isotherm data, one can conclude that the predominant mechanism of interaction between the membrane and the dissolved dye molecules is electrostatic. Besides, considering the estimated values for the Gibbs energy, and entropy and enthalpy changes, it was established that the adsorption process is spontaneous and occurs in an endothermic manner. The good mechanical and environmental stability of these membranes allowed their use in at least 20 consecutive adsorption/desorption cycles, without significant loss of their characteristics. We suggest that the physical-chemical characteristics of PEDOT make these hybrid mats a promising adsorbent material for use in water remediation protocols and effluent treatment systems.

© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences.

1. Introduction

Nowadays, access to a good water supply is a major social problem. In the past decades, water consumption at a global level increased at a faster rate than population growth. The production of a large number of effluents contaminated by organic matter, heavy metal ions, hormones, dyes, and agrochemicals, among others, is inherent to many human activities, such as industries, mining, and agriculture. According to the World Health Organization (WHO), 2.3 billion people around the world did not have access to safe drinking water in 2017 (Organization, 2017). Each year, water contamination causes the death of 1.6 million people

(Schwarzenbach et al., 2010), including more than 360,000 children (Organization, 2017).

In 1865, William Perkin revolutionized the food, textile, cosmetic, paper, leather, and paint industries by preparing the first synthetic organic dyes (Sharma et al., 2011). Since then, the large-scale use of synthetic dyes has made these compounds a recurring contaminant of industrial waters. Most of these chemical residues are stable under light exposure and environmental oxidation (Gong et al., 2013) and do not undergo biodegradation processes, remaining reactive during years.

Azo dyes, which represent the class of compounds most used in textile and food processes (Sharma et al., 2011) and account for 50%–70% of the world production of synthetic dyes (Gong et al., 2013), are characterized by the presence of one or more azo groups (-N=N-) attached to aromatic rings, substituted by different radical groups (Khaniabadi et al., 2016). These compounds not only

* Corresponding author.

E-mail address: celso@lqz.ufpe.br (C.P. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.014>

1001-0742/© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of The Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences.

- Depósitos de Patentes Nacionais



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 020805 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_cine.propeq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FILMES NANOESTRUTURADOS DE POLÍMEROS CONDUTORES, PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEU USO COMO PLATAFORMAS PARA O SENSORIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Resumo: A presente invenção estende-se à síntese de filmes finos de polímeros condutores (PC) sobre substratos flexíveis de polietileno tereftalato (PET) e a seu uso como uma plataforma para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos (isto é, o sensoriamento molecular) de agentes infecciosos, como Leishmania infantum, o vírus da Zika, o vírus do Papiloma Humano tipo 18 (HPV-18), dentre outras doenças de importância para a saúde pública. A presente metodologia é baseada na detecção de ácidos nucleicos (por meio de sua hibridização com sondas de caráter específico) e tem como objetivo permitir a incorporação do substrato polimérico assim preparado em protocolos simples, rápidos, e de baixo custo para o diagnóstico simplificado de doenças infecciosas ou genéticas em pontos primários de atendimento (possibilitando, em especial, maneiras de prevenção ou tratamento dessas doenças ainda em um estágio inicial), para o monitoramento ambiental e para uma rápida identificação de patógenos pela indústria alimentar.

Figuras a publicar: 6

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/10/2019 às 17:08. Petição 87019008982



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 073701 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 24134488000108
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Órgão Público
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 50670-901
País: Brasil
Telefone: (81)2126 8959
Fax: (81)2126 8959
Email: patentes_dire.propeq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE ÓXIDO DE FERRO E POLITIOFENO E SEUS DERIVADOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS

Resumo: A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético híbrido (NCMH) composto por partículas magnéticas revestidas pelo polímero condutor polítiofeno (PI), ou algum de seus derivados, como material adsorvente de fase sólida em uma série de metodologias para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas presentes em amostras biológicas ou em meios aquosos.

Figura a publicar: 8

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/11/2018 às 17:41, Petição 870180152384

- **Artigos em Preparação**

- **Ratkovski, G.P.**, Ratkovski, D.R., Silva, R.J, Reis, E. S., Rocha, H.D., Gorza, F.D.S., Maciel, B.G., Nascimento, K.T.O., Pedro, G.C., Melo, C.P., Chitosan/Alginate beads@Polypyrrole encapsulated Cobalt Ferrite nanoparticles for Methylene Blue removal.
- **Ratkovski, G.P.**, Lima, E. M. A., Nobrega, H.A., Melo, C.P., (Metal nanoparticles)/(conducting polymer) composites: properties and possible biomedical applications.
- Nascimento, K.T.O., **Ratkovski, G.P.**, Pedro, G.C., Gorza, F.D.S., Silva, R.J, Melo, C.P., Use of intrinsically conductive polymer bilayer films for the fluorescence-based molecular diagnosis of the Zika virus.
- Silva, R.J., Pedro, G.C., Gorza, F.D.S., Maciel, B.G., **Ratkovski, G.P.**, Mojica-Sánchez, L.C., Medina-Llama, J.C., Chávez-Guajardo, A.E, Melo, C.P., Synthesis of the nanocomposite γ -Fe₂O₃/PEDOT and its application for the purification of DNA from biological samples.
- Maciel, B.G., Silva, R.J., Pedro, G.C., Gorza, F.D.S., **Ratkovski, G.P.**, L.C., Medina-Llama, J.C., Chávez-Guajardo, A.E, Melo, C.P., DNA extraction from human blood using commercial kits and γ -Fe₂O₃/Pani and γ -Fe₂O₃/Chi/Pani magnetic nanocomposites: a comparative study.
- Graciela C. Pedro, Filipe D.S. Gorza, Hérica D. da Rocha, **Gabriela P. Ratkovski**, Edson S. Reis, Romário J. da Silva, Bruna G. Maciel, Celso P. de Melo. Multipurpose use of the PEDOT/Fe₂O₃ magnetic nanocomposite for simple “turn-on”.
- Mojica-Sánchez, L.C., **Ratkovski, G.P.**, Silva, R.J, Maciel, B. G., Melo, C.P., Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles (AgFeO₂) as hybrid platforms for the development of diagnostic sensors.

- **Patentes em Preparação**

RATKOVSKI, G. P.; PEDRO, G. C.; NASCIMENTO, K. T. O.; SILVA, R. J.; GORZA, F. D. S.; MELO, C. P. " Detecção de fosfato em soro de sangue humano e meio aquoso por nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄)". Patente em preparação para depósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.