



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE
MEMBRANAS DE ALUMINA ANÓDICA**

Givanildo Bezerra de Oliveira

Recife-PE / Brasil

Maio / 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Aplicações Biotecnológicas de Membranas de Alumina Anódica

Givanildo de Bezerra de Oliveira*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.

Co-Orientador: Prof. Dr. Walter Mendes de Azevedo

***Bolsista CNPq**

Recife-PE / Brasil

Maior / 2008

Oliveira, Givanildo Bezerra de.

Aplicações biotecnológicas de membranas de alumina anódica / Givanildo Bezerra de Oliveira. – Recife : O Autor, 2008.

xix, 91 folhas: il. fig. tab.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2008.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Nanotecnologia. 2. Enzimas imobilizadas.
3. Polímeros. 4. Membranas de alumina anódica. I. Título

620.5

CDD (22.ed.)

FQ 2009-045

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:



Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
(Orientador)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco



Profa. Ana Lucia Figueiredo Porto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Prof. Helio de Lucena Lira
Departamento de Engenharia de Materiais
Universidade Federal de Campina Grande



Profa. Valdinete Lins da Silva
Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Paulo Henrique Menezes da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

“Aplicações Biotecnológicas de Membranas de Alumínio Anodizado”

por

Givanildo Bezerra de Oliveira

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
15 maio de 2008

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Luiz Carvalho, pelo seu apoio, orientações, conselhos e pela amizade. A finalização deste trabalho só foi possível devido ao seu desprendimento. Se houve algum “chef” esse foi você, de minha parte fui apenas o cozinheiro.

Ao meu co-orientador, Prof. Walter Mendes de Azevedo, por ter me acolhido em seu laboratório, encaminhado-me a conhecer um pouco sobre nanotecnologia e ser o idealizador da proposta que aqui tentei desenvolver.

Aos Professores e à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química, pelo empenho e dedicação para manter o programa entre os melhores do país.

Aos secretários da pós-graduação Maurílio e Patrícia, pela enorme disposição em ajudar.

A equipe da Central analítica, em especial a Eliete e Ricardo pela simpatia e presteza de sempre.

Aos colegas e amigos de curso, pela parceria nos estudos e a boa convivência. Citar nomes pode ser arriscado, assim meu agradecimento é para todos que compartilharam comigo o dia-a-dia.

A todos que fazem o Departamento de Química Fundamental, pela contribuição para o bom andamento das atividades.

Aos colegas do Laboratório de Química do Estado Sólido, especialmente Robson Barros, Daniel Dickens e Cristiane Martins, pela agradável convivência.

Ao Diretor do LIKA, Prof. José Luiz de Lima Filho, pela batalha diária em busca de meios para manter e reestruturar o LIKA, tornando-o mais visível à comunidade e melhorando nossas condições de trabalho.

Ao pessoal técnico-administrativo do LIKA, que estão sempre na labuta para tornar o nosso dia-a-dia possível: Sr. Otaviano, Vera, Cleide, Paulo, Moisés, Rafael, Paulina, Ilma, Conceição, Isabel, Kilma, Felipe, Carmelita, Sérgio (CPqAM).

A turma do Laboratório de Bioquímica do LIKA, pela excepcional convivência e especialmente pela companhia às sextas-feiras no Jorginho e no Pai D'égua.

Aos professores que compõem o LIKA, principalmente Elizabeth Chaves, Maria da Paz, Eduardo Beltrão e Rosa Dutra, por serem professores próximos e sensíveis aos nossos problemas.

Ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Instituição da qual agora faço parte, pelo consentimento de horário especial para que pudesse me dedicar a finalização desse trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo grande apoio e por fazerem parte da minha vida.

A minha esposa, Luciana e minha filha, Heloísa, pela compreensão, estímulo, ajuda, carinho e amor dispensados a mim, e que tornaram mais fácil minha caminhada até aqui.

Ao CNPq pelo apoio financeiro indispensável, que possibilitou dedicação exclusiva aos estudos de doutoramento e, portanto, o aprimoramento dos meus conhecimentos.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente.

RESUMO

Na elaboração de materiais nanoestruturados, a anodização do alumínio para obtenção de membranas de alumina anódica auto-organizadas tem se revelado ferramenta útil. Elas apresentam elevado grau de ordenamento que se configuram em arranjo de células hexagonais, com poros centrais e individualizados, não interconectados. Este trabalho propôs-se empregar as membranas como parte de um compósito nanoestruturado com vistas ao seu emprego como matriz para imobilização de proteínas. As membranas foram sintetizadas pela anodização de fitas de alumínio de alta pureza, verificando-se que para sua obtenção com alto padrão de organização era necessário um controle rígido do acabamento superficial do alumínio e da temperatura de anodização. O polimento eletroquímico, em uma mistura de ácido perclórico/etanol, foi superior ao químico em relação ao desbastamento da superfície, dando um aspecto espelhado à fita de alumínio (eletrodo). Filmes com bom ordenamento foram obtidos empregando-se eletrodos polidos eletroquimicamente e anodizados a baixas temperaturas. Nanocompósitos de membranas de alumina anódica com polianilina (PANI) e polietilenimina (PEI) foram sintetizados e a eles foram covalentemente imobilizadas duas enzimas importantes biotecnologicamente: peroxidase e tripsina. O compósito com PANI foi obtido tratando-se a membrana com permanganato de potássio, com vistas a depositar o dióxido de manganês sobre sua superfície, que serviu como agente oxidante na polimerização da anilina sobre a superfície da membrana. Ao microscópio eletrônico de varredura observou-se que a síntese deste polímero não obstruiu os poros da membrana. Peroxidase foi imobilizada ao compósito via glutaraldeído. O derivado da imobilização manteve suas propriedades catalíticas e apresentou-se razoavelmente estável ao reuso, bem como quando ensaiado em um sistema em fluxo. Outra funcionalização da membrana foi realizada com PEI, polímero altamente catiônico contendo aminas primárias, secundárias e terciárias, bastante utilizado na imobilização de proteínas devido às suas propriedades hidrofílicas e de fisissorção. Este processo foi conseguido fazendo-se passar pelos poros da membrana uma solução de PEI e em seguida tratando-se a mesma com glutaraldeído. Avaliou-se a porosidade do compósito resultante através de micrografias eletrônicas de varredura e observou-se que a grande maioria dos poros havia sido bloqueada pela presença do polímero e este formou uma camada sobre a superfície da membrana. O compósito alumina anódica/PEI fixou a tripsina de forma que ela permaneceu cataliticamente ativa. Também se apresentou estável ao uso em fluxo e em batelada. Observou-se que quanto maior o diâmetro do poro maior

foi a atividade enzimática encontrada da tripsina. Também foi constatado que a membrana sem funcionalização fixou a tripsina, contudo a lixiviação da mesma foi evidente, demonstrando a importância do polímero para uma imobilização efetiva desta proteína.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Enzimas imobilizadas; Polímeros; Membranas de alumina anódica.

ABSTRACT

In the design of nanostructured materials the anodization of aluminum to obtain anodic aluminum oxide membranes has been shown to be a useful tool. They present highly organized structures containing an arrangement of hexagonal cells with individual central pores. This work aimed to employ these membranes as the basis of a composite for protein immobilization. The membranes were synthesized by the anodization of highly pure aluminum strips. To achieve membranes with high level of organization it was found that strict control should be done for the surface polishing and the anodization temperature control. Electrochemical polishing using a mixture of perchloric acid and ethanol was superior to the chemistry treatment. Highly organized films were obtained using electrochemically polished substrate at low temperatures. Nanocomposites of anodic aluminum oxide (AAO) membranes and polyaniline (PANI) and polyethylenimine (PEI) were synthesized and biological important enzymes (trypsin and peroxidase) were covalently fixed onto them. The AAO-PANI was synthesized using surface chemical polymerization, where manganese dioxide was used as oxidizing agent for aniline polymerization. Scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that the polymer did not clog the membranes pores. Peroxidase was immobilized on the AAO-PANI via glutaraldehyde. The derivative retained the enzyme catalytic properties and showed to be stable, reusable and allowed flow circulation through it. The AAO was also functionalized by coating with PEI a highly cationic polymer containing primary, secondary and tertiary amine groups widely used in protein immobilization due to its hydrophilic and physisorption properties. This coating process was carried out by filtration of the polymer solution through the AAO and afterwards treating with glutaraldehyde. The SEM of the AAO-PEI showed that the membrane was coated with the polymer and most of the pores were clogged. Trypsin was covalently immobilized onto the AAO-PEI remaining catalytic active. The AAO-PEI-trypsin derivative showed stable using either as batch or column reactor. Also, it was found that the pore size of the membranes directly influenced the enzyme activity. Finally, the AAO membrane alone was capable to fix the trypsin but its lixiviation was evident showing the relevance of the AAO functionalization.

Keywords: Nanotechnology; Immobilized enzymes; Polymers; Anodic alumina membranes.

ÍNDICE

	Pág
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
1- INTRODUÇÃO	01
2- OBJETIVOS	03
2.1- OBJETIVO GERAL	03
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
3- REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1- A NANOTECNOLOGIA	04
3.1.1. A Bio-nanotecnologia	09
3.2- FABRICAÇÃO DE NANOMATERIAIS POR TÉCNICAS NÃO-LITOGRAFICAS	14
3.2.1- As membranas de alumina anódica	15
3.3- MÉTODOS GERAIS PARA PREPARAÇÃO DE NANOMATERIAIS ATRAVÉS DO USO DE MEMBRANAS MOLDES	18
3.4- APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MEMBRANAS NANOPOROSAS E SEUS DERIVADOS	23
3.4.1- Biomoléculas imobilizadas: características e aplicações	29
3.4.1.1- Horseradish peroxidase (HRP)	30
3.4.1.2- Tripsina	31
4- MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1- REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS	32
4.2- EQUIPAMENTOS	33
4.3- MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DO ALUMÍNIO PARA ANODIZAÇÃO	33
	IX

4.3.1- Polimento químico.....	33
4.3.1.1- Pré-tratamento.....	33
4.3.1.2- Polimento.....	34
4.3.2.- Polimento eletroquímico.....	34
4.3.2.1- Desengorduramento.....	34
4.3.2.2- Polimento.....	34
4.4- ANODIZAÇÃO.....	34
4.5- RETIRADA DO SUBSTRATO DE ALUMÍNIO PARA PRODUÇÃO DA MEMBRANA.....	37
4.6- COMPÓSITO DE ALUMINA ANÓDICA E POLIANILINA (AAO-PANI): SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE.....	38
4.6.1- Deposição de polianilina na membrana de alumina anódica.....	38
4.6.1.1 Permanganato de potássio.....	38
4.6.1.2. Persulfato de amônio.....	38
4.6.1.3- Fotoquímica.....	38
4.6.2- Imobilização de peroxidase sobre o compósito AAO-PANI.....	39
4.7- COMPÓSITO DE ALUMINA ANÓDICA E POLIETILENIMINA (AAO-PEI): SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA.....	39
4.8- DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	39
4.9- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	41
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1- SÍNTESE DAS MEMBRANAS DE ALUMINA ANÓDICA.....	42
5.2- APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MEMBRANAS DE ALUMINA ANÓDICA.....	56
5.2.1- Caracterização do Compósito AAO-PEI/PG-Tripsina.....	56
5.2.2- Caracterização do AAO-PANI-Peroxidase.....	62
5.3- SÍNTESE DE NANOFIBRILAS DE ALUMINA.....	66
6- CONCLUSÕES.....	70
7- PERSPECTIVAS.....	71
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAO: óxido de alumínio anódico
- AAO-PANI: compósito de alumina anódica e polianilina
- AAO-PEI: compósito de alumina anódica e polietilenimina
- AAO-PG: compósito de alumina anódica e polietilenimina-glutaraldeído
- AFM: microscópio de força atômica
- BAPNA: N- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitro-anilida
- DAP: 2,3-diaminofenazina
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- GOx: glicose oxidase
- HBV: vírus da hepatite B
- HPV: vírus do papiloma humano
- HRP C: horseradish peroxidase isoenzima C
- HRP: horseradish peroxidase
- IgG: imunoglobulina G
- IgM: imunoglobulina M
- j: densidade de corrente
- K_m : constante de Michaelis-Menten
- NFM: microscópio de campo próximo
- OPD: *o*-fenilenediamina
- PANI: polianilina
- PEI: polietilenimina
- RNA: ácido ribonucléico
- SPM: microscópio de varredura por sonda
- STM: microscópio de varredura por tunelamento
- TMV: vírus do mosaico do tabaco

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 - Efeitos predominantes com a redução da escala desde dimensões de metros até angstroms (Durán et al., 2006).....	07
Tabela 2 - Condições de anodização utilizadas para a obtenção dos filmes de alumina anódica.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Região de domínio da nanotecnologia, comparada com uma faixa que compreende desde a macroestrutura até dimensões subatômicas (escala logarítmica) (Durán et al., 2006).....	05
Figura 2: Possível via de migração para a tecnologia do nanochip – a partir da utilização simultânea da nanotecnologia em semi-condutores <i>top-down</i> ao futuro da nanotecnologia molecular auto-montável <i>bottom-up</i> (Yu & Meyyappan, 2006).....	08
Figura 3: Hierarquia estrutural na organização molecular das células. Nessa célula vegetal, o núcleo é uma organela contendo vários tipos de complexos supramoleculares, incluindo os cromossomos. Os cromossomos consistem de macromoléculas de DNA e muitas proteínas diferentes. Cada tipo de macromolécula é construído de subunidades simples – DNA dos nucleotídeos (desoxirribonucleotídeos), por exemplo (Nelson & Cox, 2006).....	09
Figura 4: Mecanismo molecular do bombeamento de próton (H^+) da bacteriorrodopsina. O todo- <i>trans</i> -retinal absorve um próton e sofre fotoisomerização para 13- <i>cis</i> -retinal. A restauração do todo- <i>trans</i> -retinal é acompanhada pela liberação de prótons para fora da célula através da membrana plasmática (Kühlbrandt, 2000).....	11
Figura 5: Capsídeo de poliovírus. As proteínas da capa montam-se em um icosaedro de 300 Å de diâmetro. A simetria icosaédrica é um tipo de simetria de rotação. À esquerda está uma imagem da superfície de contorno do capsídeo do poliovírus. Na imagem da direita, as linhas foram superpostas para mostrar os eixos de simetria (Nelson & Cox, 2006).....	12
Figura 6: Capsídios virais. Vírus do mosaico do tabaco. Esse vírus em forma de bastão possui 3.000 Å de comprimento e 180 Å de diâmetro; ele possui simetria helicoidal (Nelson & Cox, 2006).....	12
Figura 7: Fiandeiras de uma aranha. As fibras usadas para fazer um tecido de seda ou a teia de uma aranha são constituídas da proteína fibroína. A fibroína consiste de camadas de folhas β antiparalelas ricas em resíduos de alanina e glicina. A micrografia mostra as fitas de fibroína emergindo das fiandeiras de uma aranha (Nelson & Cox,	

2006).....	13
Figura 8: Modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA. O modelo original proposto por Watson e Crick possuía 10 pares de bases, ou 34 Å (3,4 nm) por volta da hélice. (a) Representação esquemática mostrando as dimensões da hélice. (b) Representação em bastão mostrando o esqueleto e as bases empilhadas. (c) Modelo espaço cheio (Nelson & Cox, 2006).....	14
Figura 9: Expansão do filme de alumina durante a anodização do alumínio (Jessensky et al., 1998).....	16
Figura 10: Formação de filme de alumina anódica em duas etapas. Retirado de Yuan et al., 2004.....	17
Figura 11: Membranas porosas e as diferentes tecnologias de filtração (Mierzwa et al., 2008)	19
Figura 12: Ilustração de um filme de alumina porosa. Pode ser observado que os poros são perpendiculares à superfície do filme e que estes formam um arranjo de células hexagonais (Patermarakis et al., 1999).....	22
Figura 13: Imobilização de glicose oxidase (GOx) em membranas de alumina nanoporosa (Darder et al., 2006).....	27
Figura 14: Ilustração esquemática da confecção do biossensor (Darder et al., 2006).....	27
Figura 15: Eletrodo <i>screen-printed</i> de ródio-grafite funcionalizado com alumina porosa anódica. Visão esquemática ilustrando a transferência direta de elétrons entre o citocromo P450 _{SCC} e o eletrodo modificado com alumina porosa anódica (Stura et al., 2007).....	27
Figura 16: Configuração de um sensor piezoelétrico separado do eletrodo com sistema de análise por injeção em fluxo (Yang et al., 2007).....	28
Figura 17: Esquema da cuba utilizada para obtenção de membranas retangulares de alumina anódica. Dimensões: 7 cm x 15 cm x 6 cm (altura x comprimento x largura). Os eletrodos foram mergulhados no eletrólito com o auxílio de conexões tipo garra (jacaré). Os ânodos de alumínio utilizados possuíam 0,3 mm x 10 mm x 30 mm (espessura x largura x comprimento), mas mergulhava-se apenas 20 mm dos mesmos no eletrólito, originando-se uma superfície anódica de 4 cm ² . Os 10 mm restantes eram utilizados para fixação nas garras ligadas aos pólos negativo ou positivo da fonte por meio de conexões tipo plugue (banana) – cabos de conexão plugue/garra. Foi utilizado	

como cátodo uma fita de alumínio com as mesmas dimensões do ânodo. A anodização foi realizada sob agitação com o auxílio de um agitador magnético.....	36
Figura 18: Cuba de acrílico para obtenção de membranas circulares de alumina anódica. Dimensões: 4,8 cm x 10,4 cm x 4,8 cm (altura x comprimento x largura). Os eletrodos foram conectados a fonte com o auxílio de cabos de conexão plugue/garra. O cátodo possuía as seguintes dimensões: 0,3 mm x 30 mm x 45 mm (espessura x largura x comprimento) e área ativa de 18 cm ² . O ânodo circular utilizado possuía diâmetro de 2,5 cm e área ativa de 3,46 cm ² . A anodização foi realizada sob agitação com o auxílio de um agitador magnético.....	37
Figura 19: Esquema do sistema montado para determinação das atividades enzimáticas em fluxo. Nos experimentos com recirculação do substrato utilizou-se apenas um recipiente que funcionava como alimentador e coletor. Nos experimentos com fluxo ascendente alterou-se a direção do fluxo no mecanismo da bomba peristáltica.....	40
Figura 20: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M a 27 V por 10 horas sem controle de temperatura. As letras ao lado das figuras representam diferentes aumentos.....	43
Figura 21: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M a 27 V por 21 horas sem controle de temperatura. As letras ao lado das figuras representam diferentes aumentos.....	43
Figuras 22: Filmes de alumina anódica formados em ácido oxálico 0,3 M sem controle de temperatura. 22a-c: 1 ^a anodização, (j) = 50 mA/cm ² por 20 minutos; 2 ^a anodização, (j) = 50 mA/cm ² por 60 minutos. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As letras ao lado das figuras indicam diferentes aumentos.....	45
Figuras 23: Filmes de alumina anódica formados em ácido oxálico 0,3 M sem controle de temperatura. 23a-c: 1 ^a anodização, (j) = 20 mA/cm ² por 30 minutos; 2 ^a anodização, (j) = 20 mA/cm ² por 10 minutos. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As letras ao lado das figuras indicam diferentes aumentos.....	46
Figura 24: Filmes de alumina anódica formados em ácido oxálico 0,3 M. a: sem controle de temperatura; 1 ^a anodização, (j) = 23 mA/cm ² por 60 minutos; 2 ^a	

<i>anodização, (j) = 23 mA/ cm² por 196 minutos. b: temperatura entre 5 a 6°C; 1^a anodização, (j) = 17 mA/cm² por 60 minutos; 2^a anodização, (j) = 17 mA/cm² por 60 minutos. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos.....</i>	47
Figura 25: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M. 1 ^a anodização, (j) = 22 mA/cm ² por 120 minutos entre 4 – 9°C; 2 ^a anodização, (j) = 22 mA/ cm ² por 120 minutos a 7°C. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As figuras 25b e h são aumentos de 25a e g , respectivamente; c , d , e e f são micrografias de regiões distintas.....	48
Figura 26: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M. 1 ^a anodização: 80 V, 60 minutos e 3°C; 2 ^a anodização: 100 V, 60 minutos e 7°C. Após cada anodização, submeteu-se a amostra a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 60 minutos. A figura 26d é uma ampliação de 26a ; b e c são de regiões distintas.....	49
Figura 27: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M. A anodização foi conduzida a uma voltagem constante de 63 V por 120 minutos e à temperatura de 3°C. Em seguida, a amostra foi mergulhada em uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 60 minutos.....	50
Figura 28: Filme de alumina anódica formado em ácido sulfúrico 0,5 M. 1 ^a anodização: (j) = 20 mA/cm ² por 30 minutos a 8°C; 2 ^a anodização, (j) = 20 mA/ cm ² por 60 minutos, entre 7 – 8°C. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As figuras 28c , d e e são ampliações de 28b ; a figura 28a foi obtida de uma região distinta, mas do mesmo filme.....	51
Figura 29: Filme de alumina anódica formado em ácido sulfúrico 0,5 M. 1 ^a anodização: 25V, 60 minutos entre 6 – 7°C; 2 ^a anodização, (j) = 10 mA/ cm ² por 60 minutos a 6°C. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. A figura 29b é uma ampliação de 29a	52
Figura 30: Membrana filtrante ANODISC da Whatman com poros de 0,2µm de diâmetro. As figuras 30b e c são ampliações de 30a ; d é um corte transversal da	

mesma membrana.....	53
Figura 31: Fotos de membranas de alumina anódica. Da esquerda para direita: alumínio circular (I), membranas obtidas em ácido oxálico (II) e em ácido sulfúrico (III), Anodisc (IV).....	54
Figura 32: Superfície (a) e camada de barreira (b) de uma membrana de alumina anódica formada em ácido oxálico 0,3 M e densidade de corrente constante de 25 mA.cm ⁻² por 2 horas a 15°C.....	54
Figura 33: Micrografia eletrônica de varredura da seção transversal de compósito AAO-PG sintetizado com membrana Anodisc com poros de 0,1 µm de diâmetro.....	57
Figura 34: Micrografia eletrônica de varredura da superfície (a) e da seção transversal (b) do compósito AAO-PEI sintetizado com membranas Anodisc com poros de 0,1 µm de diâmetros.....	58
Figura 35: Atividade em batelada da tripsina imobilizada no compósito AAO-PG. Experimento realizado em batelada alimentada usando 3mL de solução de BAPNA 600nM e compósito AAO-PG sintetizado com uma membrana de tamanho de poro de 0,1 µm. A cada tempo foi retirado 400 µL da mistura reacional e um volume igual de substrato foi adicionado. A <i>p</i> -nitroanilina liberada foi medida a 405nm e a quantidade determinada utilizando o coeficiente de absorvidade de 9,1mM ⁻¹ cm ⁻¹	59
Figura 36: Atividade em batelada da tripsina imobilizada no compósito AAO-PEI. Experimento realizado em batelada alimentada usando 3mL de solução de BAPNA 600nM e um compósito AAO - PEI sintetizado com uma membrana de tamanho de poro de 0,1 µm. A cada tempo foi retirado 400 µL da mistura reacional e um volume igual de substrato foi adicionado. A <i>p</i> -nitroanilina liberada foi medida a 405nm e a quantidade determinada utilizando o coeficiente de absorvidade de 9,1mM ⁻¹ cm ⁻¹	59
Figura 37: Atividade em fluxo da tripsina imobilizada no compósito AAO-PEI. Experimento realizado em um reator montado com um suporte para filtros de seringa acoplado a uma bomba peristáltica com velocidade de 0,46 mL.min ⁻¹ (ver Figura 19). Compósito AAO-PEI sintetizado com uma membrana Anodisc com tamanho de poro de 0,1 µm. 20 mL de BAPNA 600nM foram utilizados para a recirculação e a cada tempo 400 µL da mistura reacional foram colhidas para quantificação conforme descrito na Figura 35.....	60
Figura 38: Efeito do diâmetro do poro das membranas na atividade da tripsina	

imobilizada nos compósitos AAO-PEI. Experimento realizado em batelada usando 3mL da solução de BAPNA 600nM. A cada intervalo de tempo foram retirados 200 μ L da mistura reacional para a determinação do produto gerado. Diâmetro dos poros da membrana: 0,02 μ m com (■) e sem revestimento PEI com PEI (●); 0,1 μ m. (○) e 0,2 μ m (□), com revestimento..... 61

Figura 39: Membranas filtrantes ANODISC da Whatman com poros de 0,2 μ m de diâmetro após: **a)** imersão numa solução de anilina 0,5 M em ácido clorídrico 1,0 M e adição de persulfato de amônio para síntese química de PANI; **b)** passagem por filtração de uma solução composta de anilina 0,5 M em ácido nítrico 1,0 M e nitrato de prata 0,5 M (1:2) e exposição à luz ultravioleta de 365 nm para síntese fotoquímica de PANI..... 63

Figura 40: Micrografia eletrônica de varredura da membrana Anodisc obtida da homepage da Whatman (Anopores[®] membranas inorgânicas) mostrando o arranjo regular dos poros (**a**) e do compósito AAO-PANI (**b**) mostrando que o processo de revestimento não afeta a característica em forma de favo de mel da membrana..... 64

Figura 41: Atividade em fluxo da peroxidase imobilizada em AAO-PANI. Experimento realizado em um reator montado com um suporte para filtro de seringa acoplado a uma bomba peristáltica com velocidade de 0,28 mL.min⁻¹. Dez mililitros de OPD 13 mM acrescidos com 0,333 mL de H₂O₂ 28 mM foram circulados pelo compósito e alíquotas de 1 mL foram coletadas para determinação do produto a 490 nm. A 2,3-diaminofenazina produzida foi determinada usando o coeficiente de absorvidade de 1,578 mM⁻¹cm⁻¹ (Romano et al., 2000)..... 65

Figura 42: Atividade residual da peroxidase imobilizada em AAO-PANI. Experimento realizado em batelada usando 3 mL de solução de OPD após a adição de 0,1 mL de H₂O₂ 28 mM. Depois de cada ciclo da batelada (2 minutos), os derivados foram lavados antes do novo ensaio. A 2,3-diaminofenazina produzida foi quantificada espectrofotometricamente a 490 nm em triplicata..... 65

Figura 43: Membrana Anodisc **0,1 μ m** após tratamento com KMnO₄ e posterior síntese de PANI, seguida por abrasão de sua superfície com lixa d'água 1200 e tratamento com hidróxido de sódio. A figura **43b** é uma ampliação de **43a**; **43c** foi obtida a partir da região fraturada da membrana..... 67

Figura 44: Membrana Anodisc **0,1 μ m** após abrasão de sua superfície com lixa d'água

1200 e tratamento com hidróxido de sódio. As figuras 44b e c são ampliações de 44a...	68
Figura 45: Membrana Anodisc 0,1µm após abrasão de sua superfície com lixa d'água 1200 e tratamento com hidróxido de sódio. As figuras 45b , c e d são ampliações de 45a.....	69

1- INTRODUÇÃO

Nano- que significa “anão”, em grego – é o prefixo usado na notação científica para expressar um bilionésimo (10^{-9}). Um nanômetro equivale a 10^{-9} m, ou seja, um bilionésimo de metro. Nessa escala de tamanho, um minúsculo vírus, invisível a olho nu, apresenta-se como uma incrível entidade com cerca de 200nm. Apesar da dimensão ínfima, ele camufla, na realidade, uma complexa máquina molecular aparelhada com todos os dispositivos para invadir as células de organismos superiores e utilizá-las em sua reprodução, proporcionando um exemplo típico de tecnologia nanométrica colocada em prática pela natureza (Oliveira & Vieira, 2007).

O desenvolvimento de novos materiais com propriedades específicas e controláveis ao nível molecular é objeto de estudo de muitos pesquisadores, tópico importante do que se convencionou chamar de nanociência e nanotecnologia. Nessas áreas, as propriedades dos materiais são investigadas na escala de uma a dezenas de nanômetros, o que corresponde ao nível atômico e molecular. Tais materiais podem ser usados na construção de sistemas miniaturizados, nanorrobôs e nanorreatores, mas a nanociência engloba também os estudos de interações moleculares que acabam servindo para qualquer ramo tecnológico, onde o desempenho do produto final possa depender das propriedades do material de partida em escala nanométrica. Assim, nanociência e nanotecnologia são áreas multidisciplinares, uma vez que a produção de novos materiais com propriedades especiais requer a participação de químicos, físicos, engenheiros, biólogos e cientistas de materiais (Durán et al., 2006).

Nos últimos anos as membranas de alumina anódica porosa, com um arranjo hexagonal de nanoporos monodispersos, têm tornado-se um molde popular para a síntese de várias nanoestruturas funcionais (Kim et al., 2004; Lee et al., 2006; Yang et al., 2007). Essas membranas auto-organizadas são sintetizadas pela anodização do alumínio.

A técnica de anodização do alumínio parece ao primeiro contato algo bastante trivial. Deve-se apenas mergulhar o alumínio no eletrólito em questão, estabelecer uma diferença de potencial ou fazer passar uma determinada corrente pelo circuito e deixar que o processo ocorra ao longo do tempo. Entretanto, o processo pode ser um tanto mais complexo e isto pode ser ratificado pelo fato de que o processo de anodização industrial do alumínio existe há décadas e, no entanto, nos dias de hoje, século XXI, ainda pode-se encontrar trabalhos científicos que tratam única e exclusivamente da descrição de como se conseguir filmes e/ou membranas anódicas, não

para aplicações arquitetônicas ou outros materiais do cotidiano, mas para fins mais nobres como aplicações na produção de nanomateriais.

Na literatura internacional são encontrados muitos relatos de materiais nanométricos criados a partir destes filmes/membranas para as mais diversas aplicações. Muitos destes relatos científicos se limitam a usar as membranas filtrantes de alumina anódica comerciais (membranas ANODISC da Whatman). Contudo, outros também incluem como parte da sua comunicação científica a síntese destas membranas, uma vez que as disponíveis comercialmente não permitem muitas variações em suas características. Sendo assim, pesquisadores interessados em dar uma característica própria ao seu invento, preferem sintetizá-las. Entretanto, estes nem sempre expõem com clareza e precisão o método de síntese dessas membranas. Além disso, torna-se ainda mais difícil avaliar qual método é o melhor, visto que há uma grande diversidade de protocolos, como pode ser depreendido da tabela que se encontra nos Anexos, a qual traz exemplos de condições de anodização descritas na literatura.

Da mesma maneira que existem muitos caminhos para se encontrar a síntese dessas membranas, de forma a se obter um arranjo regular de poros, suas aplicações são as mais diversas possíveis. Um uso promissor desses materiais nanoestruturados é a imobilização de biomoléculas para obtenção de biocompósitos com características nanométricas, que podem ser empregados em processos de separação, catálise e no desenvolvimento de sensores.

A imobilização é uma etapa importante na enzimologia fundamental e comercial, para possibilitar uma utilização economicamente viável das enzimas. Além disso, a fixação de biomoléculas a materiais inorgânicos combina a alta seletividade das reações enzimáticas com as propriedades químicas e mecânicas do suporte. O desenvolvimento destes materiais compostos tem trazido a luz novas aplicações nas áreas de sensores químicos e biocatálise (Díaz & Balkus Jr., 1996). Também as membranas artificiais têm interessado os biotecnologistas em sua busca por carreadores para imobilização de biocatalisadores (Gekas, 1986). As razões para isto parecem ser suas propriedades interessantes, tais como a grande área superficial e a possibilidade de combinar separação com reação química. Dentre as várias membranas desenvolvidas até agora, as de óxido de alumínio sintetizadas eletroquimicamente parecem ser as mais atrativas como matriz multifuncional com superfície nanoestruturada (Takhistov, 2004).

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Sintetizar e funcionalizar membranas de alumina anódica para imobilização de biomoléculas.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar membranas de alumina anódica;
- Propor métodos para funcionalização da superfície destas membranas;
- Imobilizar biomoléculas de interesse na química e biologia.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1- A NANOTECNOLOGIA

Há quase meio século atrás, o físico norte-americano, Richard Feynman (1918-1988), proferiu uma palestra intitulada: “There’s plenty of room at the bottom”. Nela descreveu um novo domínio da ciência sobre uma pequena escala, onde novas propriedades seriam descobertas e coisas poderiam ser feitas a nível molecular e atômico como a natureza faz diariamente. E foi a partir daí que o termo *bottom-up* (de baixo para cima) nasceu. Hoje a filosofia do pequeno é realizada particularmente na indústria eletrônica e é formalizada na lei de Moore. Assim, nunca o tão pequeno se tornou tão grande. De fato, conforme vislumbrado por Feynman, o impacto da nanociência e da nanotecnologia nos setores acadêmico, empresarial e na própria sociedade já é bastante marcante (Oliveira & Vieira, 2007; Wade & Wegrowe, 2005).

Avanços significativos em nanotecnologia não foram notados até o início da década de 1980, devido à ausência de novos instrumentos que permitissem a manipulação, como por exemplo, os microscópios de varredura por sonda (SPM), de varredura por tunelamento (STM), de campo próximo (NFM) e de força atômica (AFM). Esses instrumentos vêm fornecendo os “olhos” e os “dedos” necessários para medir e manipular materiais em escala nanométrica (Durán et al., 2006).

Portanto, foi só a partir de 1982, com a invenção do STM, que a nanotecnologia deixou de ser tratada como ficção e assumiu realmente o seu papel na história. Em especial em 1989, quando um pesquisador da IBM escreveu a sigla dessa empresa com 35 átomos de xenônio. O STM, com suas inúmeras modalidades e recursos, acabou tornando-se uma das ferramentas mais importantes da nanotecnologia. Em 2000, as sondas dos microscópios de tunelamento passaram a ser usadas como “canetas-tinteiro”, para realizar desenhos e escritas nanométricas com moléculas. Três anos depois, a IBM anunciou o Milliped, um complexo sistema com milhares dessas sondas, projetadas para gravar e ler informações em escala nanométrica (Oliveira & Vieira, 2007).

Nos últimos anos grandes avanços têm sido alcançados na obtenção e caracterização de nanoestruturas. Além da microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de varredura por tunelamento, ferramentas novas e melhoradas também foram desenvolvidas na microscopia eletrônica, espectrometria de massas, microscopia eletrônica de

transmissão com filtro de energia, litografia suave, microscopia de fluorescência com reflexão interna total, técnica da armadilha laser de alta resolução para moléculas individuais, difração de raios-X de baixo tempo, raios-X síncrotron, pinças óticas, entre outros (Cui & Gao, 2003).

O espaço tridimensional do mundo macroscópico vai se restringindo nos nanossistemas, torna-se bidimensional nos filmes de espessura nanométrica, unidimensional nos nanofios e chega até a dimensão “zero” nos chamados pontos quânticos (em inglês, *quantum dots*) (Figura 1) (Oliveira & Vieira, 2007).

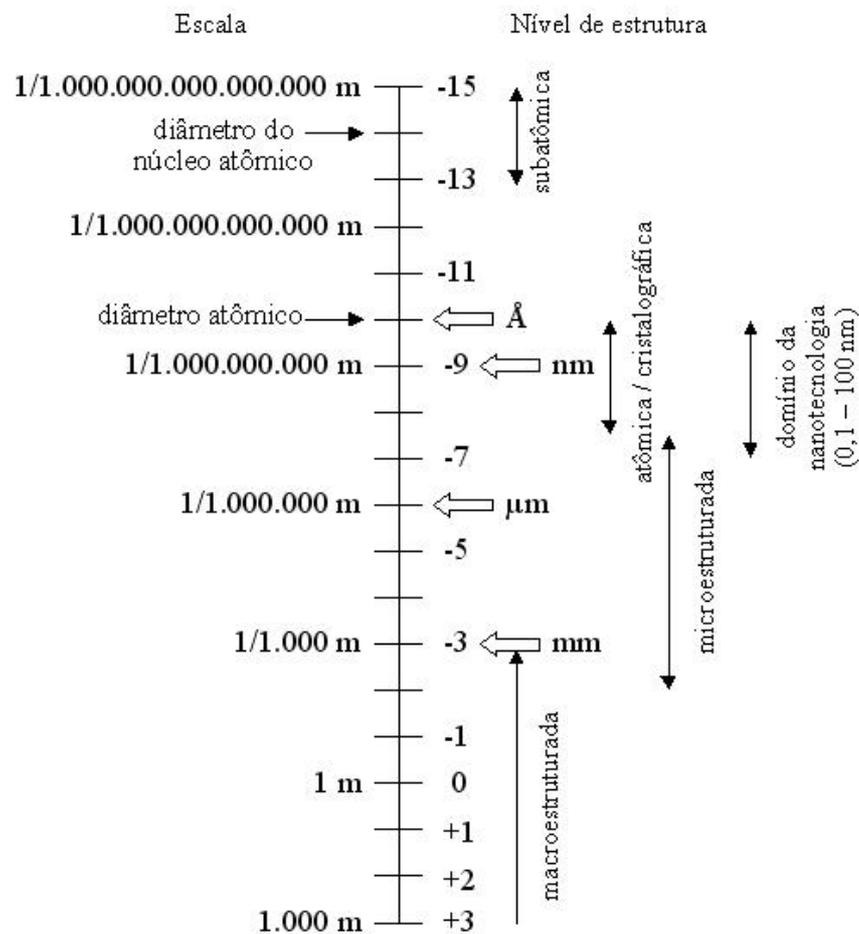


Figura 1: Região de domínio da nanotecnologia, comparada com uma faixa que compreende desde a macroestrutura até dimensões subatômicas (escala logarítmica) (Durán et al., 2006).

Portanto, na nanoescala surgem novos fenômenos que não aparecem na macroescala. As mudanças mais importantes de comportamento são causadas não apenas pela ordem de magnitude da redução de tamanho, mas por novos fenômenos intrínsecos, observados ou que se

tornam predominantes em nanoescala e que não são necessariamente previsíveis a partir do comportamento observável em escalas maiores. Esta alteração de comportamento está relacionada com as forças naturais fundamentais (gravidade, atrito, eletrostática, etc) que mudam de importância quando a escala é reduzida (Durán et al., 2006). Dessa forma, próximo da escala atômica encontram-se fenômenos que contrariam o bom senso: elétrons movimentando-se em torno do núcleo atômico sem perder energia; partículas capazes de estar em vários pontos ao mesmo tempo e de atravessar “barreiras” sem ter energia suficiente para isso (Oliveira & Vieira, 2007).

Assim, à medida que as dimensões dos corpos diminuem, as forças de atrito, gravitacional e de combustão tornam-se de menor importância, enquanto novas forças, como por exemplo, a força eletrostática, tornam-se mais evidentes (Tabela 1). Em escala subatômica, a força de atração eletrostática entre dois prótons é cerca de 10^{36} vezes mais forte que a força gravitacional. A força gravitacional começa a dominar o universo dos corpos e partículas apenas quando uma quantidade significativa de matéria se faz presente e, em escala mais ampla, é a força dominante (Durán et al., 2006). Outros efeitos observados na escala nanométrica e que podem não ser apresentados pela forma macroscópica do material são: resistência não usual, alta energia de superfície, reatividade de superfície, alta condutividade térmica e elétrica de nanofibras tecidas (fiadas) eletricamente (He et al., 2007).

A nanotecnologia surge como consequência prática de eventos científicos ocorridos há longas datas que permitiram que os pesquisadores vislumbrassem a matéria em seu nível fundamental, derrubando conceitos obsoletos e lançando as pilastras para um mundo anteriormente inimaginável (Pereira et al., 2006). Ela tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa em todo o mundo, devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico. Neste contexto, existe uma infinidade de áreas onde a nanotecnologia pode oferecer uma contribuição significativa, algumas das quais, inclusive, já possuem produtos sendo comercializados. O Brasil tem procurado não ficar de fora da corrida por esta tecnologia, e o governo começou um esforço conjunto nesta área em 2001, conhecido como Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia, formando uma rede de pesquisa cooperativa neste tema, que conta com a participação de mais de uma centena de instituições de pesquisa e ensino em todo o País, as quais, por sua vez, têm expandido suas fronteiras para se integrar no estabelecimento de parcerias

com institutos e grupos de excelência em nanotecnologia nos Estados Unidos, na Europa, China, na América Latina e no Japão (Durán et al., 2006).

Tabela 1 - Efeitos predominantes com a redução da escala desde dimensões de metros até angströms (Durán et al., 2006).

Unidade de medida	Do tamanho de	Efeitos predominantes
Metro (m) 1,0 m	Criança pequena, bicicleta, etc.	Gravidade, atrito, combustão
Centímetro (cm) 0,01 m	Polegar humano, moedas, etc.	Gravidade, atrito, combustão
Milímetro (mm) 0,001 m	Grão de açúcar, etc.	Gravidade, atrito, combustão, força eletrostática
Micrômetro (μm) 0,000001 m	1/40 do diâmetro do cabelo humano	Força eletrostática, van der Waals, movimento browniano
Nanômetro (nm) 0,000000001 m	Comprimento de uma fila de 5 a 10 átomos	Força eletrostática, van der Waals, movimento browniano, mecânica quântica
Angström (Å) 0,0000000001 m	1 átomo, 10 vezes o comprimento de onda de um elétron	Mecânica quântica

A nanotecnologia é claramente uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, uma vez que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais), estruturados em escala nanométrica – nano estruturados – de modo a formar blocos de construção (*building blocks*) como *clusters*, nanopartículas, nanotubos e nanofibras, que por sua vez são formados a partir de átomos ou moléculas. Dessa forma, a síntese controlada desses blocos de construção e seu subsequente arranjo para formar materiais e/ou dispositivos nanoestruturados constituem os objetivos centrais da nanotecnologia (Durán et al., 2006).

A nanotecnologia oferece um novo paradigma para a manufatura de materiais utilizando a manipulação em escala submicrométrica com o objetivo de criar dispositivos a partir de unidades estruturais fundamentais ou blocos de construção, por meio da construção de baixo para cima (*bottom-up technology*) ou de cima para baixo (*top-down technology*) até chegar a nanodispositivos (Figura 2). No entanto, esta ciência está apenas começando a aprender a

manipular e construir nanodispositivos de forma eficiente e economicamente viável (Durán et al., 2006).

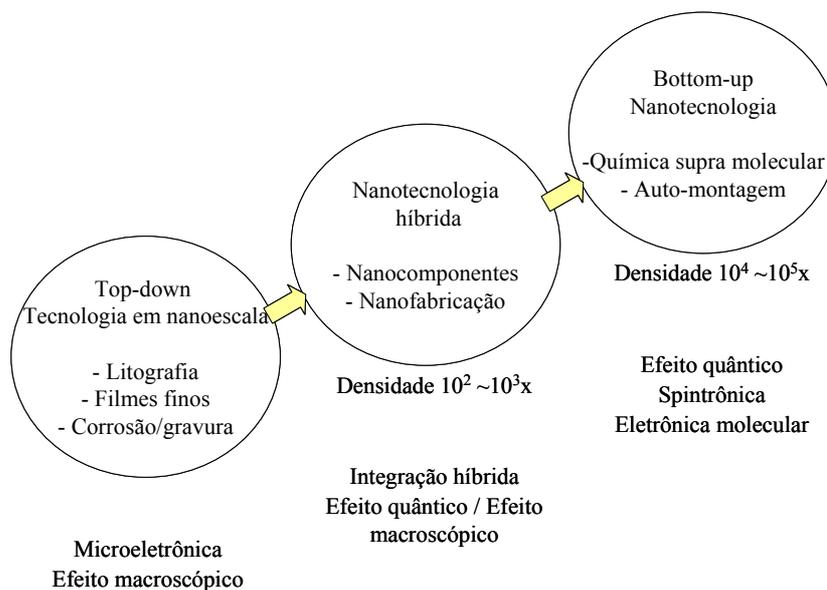


Figura 2: Possível via de migração para a tecnologia do nanochip – a partir da utilização simultânea da nanotecnologia em semi-condutores *top-down* ao futuro da nanotecnologia molecular auto-montável *bottom-up* (Yu & Meyyappan, 2006).

Enquanto os efeitos de tamanho descrevem as propriedades físicas dos materiais nanoestruturados, os efeitos induzidos pelo aumento na área superficial desempenham um papel eminente em processos químicos, especialmente em catálise heterogênea e em sensores (Durán et al., 2006).

Assim, a nanotecnologia é a criação de novos materiais, dispositivos e sistemas a nível molecular, cujas interações atômicas e moleculares influenciam fortemente as propriedades macroscópicas do material, como as propriedades mecânicas, óticas, químicas, elétricas, entre outras (Chong, 2004). Os defensores da nanotecnologia têm feito muitas previsões sobre seu potencial revolucionário na elaboração de supermateriais, drogas “inteligentes”, máquinas e computadores moleculares. Entretanto, vive-se em e interage-se com o mundo em uma escala macroscópica de centímetros e metros. Assim, para aproveitar-se dos benefícios das nanoestruturas deve-se ser capaz de contornar estas diferenças de escala com a mesma seletividade e elegância que é utilizada no desenvolvimento e construção das próprias nanoestruturas (Mir et al., 2007).

Se a tarefa de qualquer tecnologia é estabelecer as leis da física, química, mecânica e outras leis com o propósito de descobrir e implementar processos de fabricação mais eficientes, então tem-se que admitir que a nanotecnologia está ainda nos seus primórdios do desenvolvimento (Guz et al., 2007).

3.1.1. A Bio-nanotecnologia

Uma característica singular dos materiais sintetizados pelos sistemas biológicos é a organização hierárquica de estruturas em várias dimensões, com controle do tamanho, forma, alinhamento e orientação. Assim a natureza tem feito e aperfeiçoado tecnologias nanométricas ao longo de bilhões de anos e é, certamente, a maior fonte de inspiração para a era da nanotecnologia molecular a ser desenvolvida pelo homem. As células e, conseqüentemente, os seres vivos são feitos a partir das quatro principais biomoléculas, as quais são utilizadas como blocos de construção no processo de montagem da microestrutura celular (Figura 3).

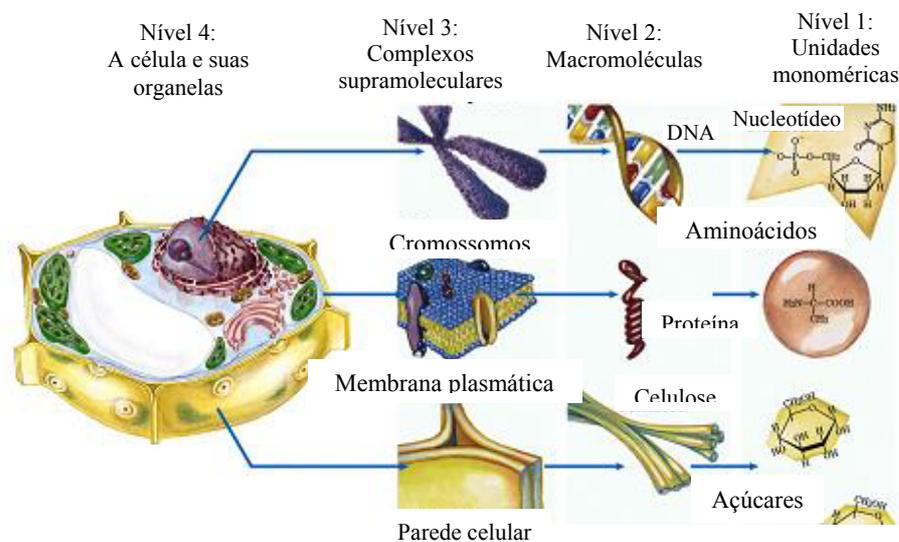


Figura 3: Hierarquia estrutural na organização molecular das células. Nessa célula vegetal, o núcleo é uma organela contendo vários tipos de complexos supramoleculares, incluindo os cromossomos. Os cromossomos consistem de macromoléculas de DNA e muitas proteínas diferentes. Cada tipo de macromolécula é construído de subunidades simples – DNA dos nucleotídeos (desoxirribonucleotídios), por exemplo (Nelson & Cox, 2006).

Há vários exemplos de bio-nanomáquinas e bio-nanomateriais que podem ilustrar como as interações moleculares são canalizadas para obtenção de determinadas funções importantíssimas para manutenção da vida de muitos seres. Abaixo são descritos alguns desses exemplos.

A bacteriorrodopsina é uma proteína pequena e robusta da membrana celular de microrganismos halófilos, que bombeia prótons para fora da célula e, dessa forma, fornece energia para sua sobrevivência. Ela é um protótipo de um transportador de membrana que faz uma espantosa façanha de transportar íons contra um potencial eletroquímico de até 250 milivolts, o que se traduz em uma diferença de 10.000 vezes na concentração de prótons entre o meio externo e o interior da célula. A bacteriorrodopsina contém sete hélices trans-membrana ligadas por pequenas alças em ambos os lados da membrana celular. Cada bacteriorrodopsina contém uma molécula de retinal e é esta molécula que muda de conformação quando absorve um fóton, resultando em uma mudança conformacional da proteína circundante e na ação de bombeamento do próton (Kühlbrandt, 2000) (Figura 4).

Um passo fundamental na replicação de uma partícula viral é a auto-montagem do seu capsídeo a partir de suas proteínas constituintes (Figura 5). Há pouca dúvida que a montagem dos capsídeos virais a partir de suas proteínas é um processo termodinâmico, se não para todos, certamente para grande maioria dos vírus. Além disso, para muitas viroses, incluindo o vírus da hepatite B (HBV), o vírus do papiloma humano (HPV), o vírus do mosaico do tabaco (TMV) (Figura 6), entre outros, as proteínas da capa formam espontaneamente capsídeos em soluções aquosas sob condições adequadas de concentração, salinidade, pH e temperatura (Hagan & Chandler, 2006; Mao et al., 2003; Xu et al., 2007; Sun et al., 2007; Zandi et al., 2006).

A formação de capsídeos virais é um prodígio da engenharia da vida. Suas proteínas são nano blocos de construção particularmente úteis, pois elas formam capsídeos altamente simétricos que podem ser manipulados para apresentar propriedades físicas e químicas previsíveis. Capsídeos virais têm sido apontados como promissores vetores terapêuticos e diagnósticos, agentes de imagem e como moldes e microrreatores para a síntese de nanomateriais. Portanto, a exploração da estrutura auto-montável e biologicamente evoluída dos capsídeos virais é uma forma possível para o ordenamento de materiais tecnologicamente importantes (Hagan & Chandler, 2006; Mao et al., 2003; Xu et al., 2007; Sun et al., 2007; Zandi et al., 2006).

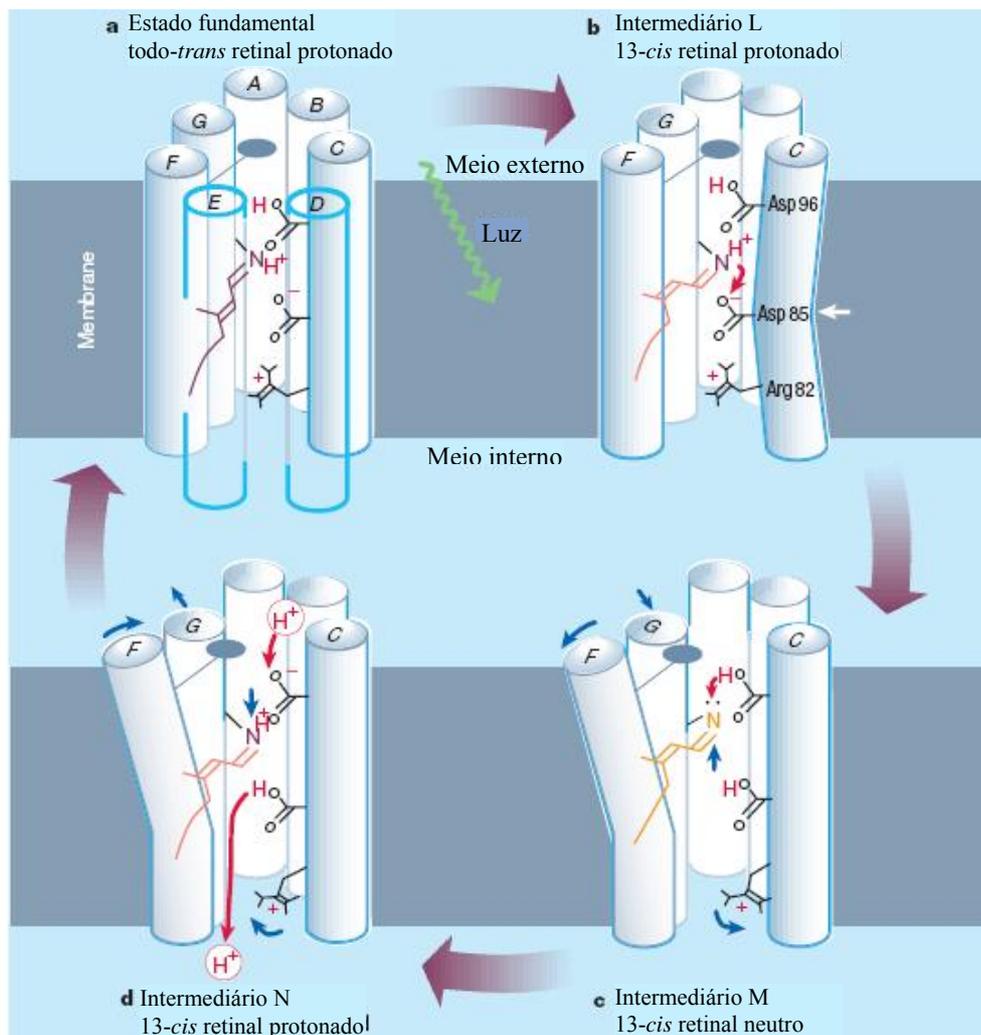


Figura 4: Mecanismo molecular do bombeamento de próton (H^+) da bacteriorrodopsina. O *todo-trans*-retinal absorve um próton e sofre fotoisomerização para *13-cis*-retinal. A restauração do *todo-trans*-retinal é acompanhada pela liberação de prótons para fora da célula através da membrana plasmática (Kühlbrandt, 2000).

Após 400 milhões de anos de evolução, a natureza ainda provê aranhas com a capacidade de tecer fibras flexíveis e leves (Figura 7), as quais têm a maior resistência dentre os materiais conhecidos. Estas fibras são pelo menos cinco vezes mais fortes por peso do que o aço, e tem notável elasticidade. Mesmo atualmente é difícil sintetizar um material com estas propriedades, exceto pelas fibras de nanotubos de carbono, as quais são fiadas a partir de uma solução em temperatura muito elevada e sob pressão, enquanto os fios da teia da aranha são produzidos a temperatura e pressão próximas as ambientes usando água como solvente. Estes fios são

filamentos de proteínas secretados como concentrado de precursores solúveis, de seqüência primária altamente repetitiva, por células epiteliais especializadas (He et al., 2007).

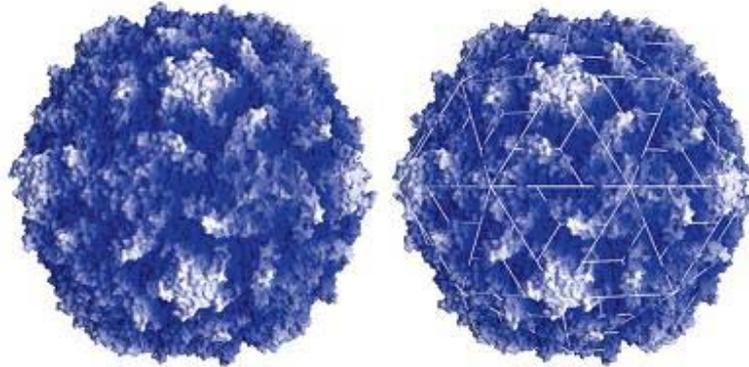


Figura 5: Capsídio de poliovírus. As proteínas da capa montam-se em um icosaedro de 300 Å de diâmetro. A simetria icosaédrica é um tipo de simetria de rotação. À esquerda está uma imagem da superfície de contorno do capsídio do poliovírus. Na imagem da direita, as linhas foram superpostas para mostrar os eixos de simetria (Nelson & Cox, 2006).

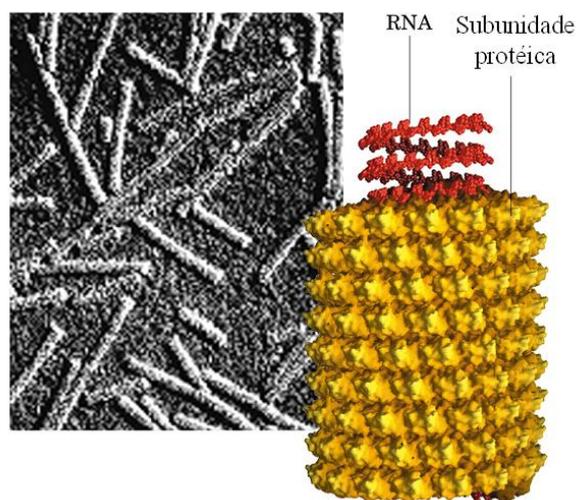


Figura 6: Capsídio do vírus do mosaico do tabaco. Esse vírus em forma de bastão possui 3.000 Å de comprimento e 180 Å de diâmetro; ele possui simetria helicoidal (Nelson & Cox, 2006).



Figura 7: Fiandeiras de uma aranha. As fibras usadas para fazer um tecido de seda ou a teia de uma aranha são constituídas da proteína fibroína. A fibroína consiste de camadas de folhas β antiparalelas ricas em resíduos de alanina e glicina. A micrografia mostra as fitas de fibroína emergindo das fiandeiras de uma aranha (Nelson & Cox, 2006).

Nos últimos 25 anos, moléculas de DNA têm sido utilizadas como poderosos blocos de construção para criar arquiteturas em nanoescala e como moldes programáveis versáteis para montagem de nanomateriais. Paralelamente, as funções das moléculas de DNA têm sido expandidas de puro repositório de informação genética para funções catalíticas semelhantes àquelas das enzimas (DNA-enzimas) e funções de ligação específica semelhante aquelas dos anticorpos (aptâmeros). Recentemente, um novo campo interdisciplinar tem surgido que objetiva combinar a biologia funcional do DNA com a nanotecnologia, para gerar nanoestruturas mais dinâmicas e controláveis baseadas no DNA ou nanomateriais modelados pelo DNA, que são sensíveis a estímulos químicos (Lu & Liu, 2006) (Figura 8).

Portanto, existem vários exemplos de nanomateriais e nanomáquinas funcionantes. Ao se realizar uma regressão estrutural-bioquímica de nossos corpos é possível perceber quão harmoniosa e eficientemente trabalha este mundo nanométrico. Assim, reproduzindo as palavras de Feynman em sua famosa palestra: “Um sistema biológico pode ser extraordinariamente pequeno. A grande maioria das células é muito pequena, mas elas são muito ativas; elas fabricam várias substâncias; elas movem-se; elas meneiam-se; e elas fazem todo tipo de coisas maravilhosas – tudo em uma escala muito pequena”.

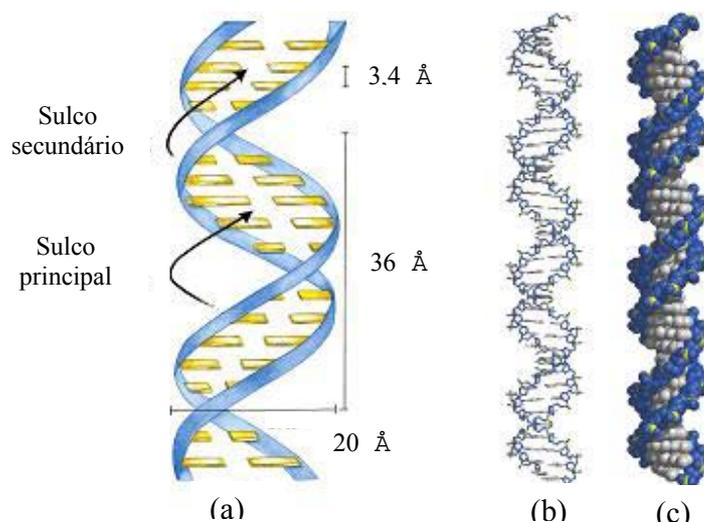


Figura 8: Modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA. O modelo original proposto por Watson e Crick possuía 10 pares de bases, ou 34 Å (3,4 nm) por volta da hélice. (a) Representação esquemática mostrando as dimensões da hélice. (b) Representação em bastão mostrando o esqueleto e as bases empilhadas. (c) Modelo espaço cheio (Nelson & Cox, 2006).

3.2- FABRICAÇÃO DE NANOMATERIAIS POR TÉCNICAS NÃO-LITOGRAFICAS

Tecnologicamente, a fabricação em escala nanométrica tem sido movida pela litografia moderna e técnicas de impressão por contato, e em sua maioria concentrada na exploração de nanoestruturas individuais. Como um primeiro passo dentro da esfera nanométrica, a investigação de nanoestruturas isoladas e a caracterização de nanodispositivos individuais são de grande importância e naturalmente de forte apelo para os pesquisadores. No entanto, um desafio maior e talvez de grande potencial para novas aplicações é o comportamento coletivo de nanoestruturas em um grande conjunto e a manipulação de nanoestruturas múltiplas dentro de unidades funcionalmente integradas, na qual as propriedades do sistema como um todo, podem ser alteradas fundamentalmente e não apresentar características clássicas ou estabelecidas individualmente. Assim, é natural e desejável procurar por caminhos que avancem com as capacidades de fabricação e a exploração científica além do domínio de nanoestruturas individuais (Chik & Xu, 2004).

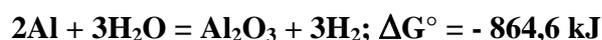
O comportamento coletivo é mais complexo do que as propriedades dos elementos isolados, pois ele envolve interações únicas de um grupo de nanoelementos agindo juntos, portanto, um melhor entendimento das complexidades pode ser altamente vantajoso para os

princípios de modelagem de sistemas físicos robustos, flexíveis e descentralizados, que sejam resistentes a erros, adaptáveis, auto-organizados e capazes de adquirir e processar informações (Chik & Xu, 2004).

A fabricação de nanoestruturas e a adaptação de suas propriedades em uma escala de tamanho menor do que 50 nm, através de métodos de litografia convencional, é um tanto desafiador. E, sua confecção dentro de grandes arranjos uniformes e altamente ordenados, para possibilitar e aumentar o comportamento coletivo desejado, é igualmente mais difícil. Uma abordagem não litográfica para a nanofabricação utiliza-se de um arranjo de nanoporos altamente ordenado de células hexagonais, formado via auto-organização, em um processo cuidadosamente controlado de anodização de alumínio de alta pureza. Utilizando-se a membrana de alumina anódica como um molde, um conjunto de métodos não litográficos para nanofabricação tem sido desenvolvido e aplicado na formação de uma ampla variedade de super-retículos (*superlattices*) nanométricos incluindo pontos (*nanodots*), fios (*nanowire*), pilares (*nanopillars*) e poros (*nanopores*). A fabricação destas nanoestruturas tem sido demonstrada com metais, semicondutores e polímeros (Chik & Xu, 2004).

3.2.1- As membranas de alumina anódica

A alumina anódica porosa tem sido estudada em detalhes nas últimas cinco décadas. No processo de anodização, um circuito elétrico é estabelecido entre um cátodo e um filme fino de alumínio o qual serve como ânodo, de acordo com a seguinte reação:



Durante a anodização, inicialmente forma-se um filme barreira plano, seguido pelo desenvolvimento dos poros, levando a formação do filme anódico poroso relativamente regular, o qual cresce com o tempo. Este filme barreira é mantido durante o crescimento do filme como uma camada de óxido semi-esférica na base do poro. A formação da estrutura de nanoporos regulares na verdade significa que, por alguma razão, surgem micro-heterogeneidades no óxido, resultando numa dissolução natural do mesmo em alguns pontos do que noutros, assim implicando numa constante de velocidade de dissolução variada sobre a sua superfície. Um estado estacionário no regime de crescimento do poro é alcançado, o qual é caracterizado pelo balanço entre a dissolução do óxido intensificada pelo campo elétrico na interface óxido/eletrólito

na base dos poros e a formação do óxido na interface metal/óxido devido à migração de íons O^{2-}/OH^- através da camada de barreira (Figura 9). Os diâmetros da célula e do poro e a espessura da camada de barreira são diretamente proporcionais a voltagem de formação (Chik & Xu, 2004).

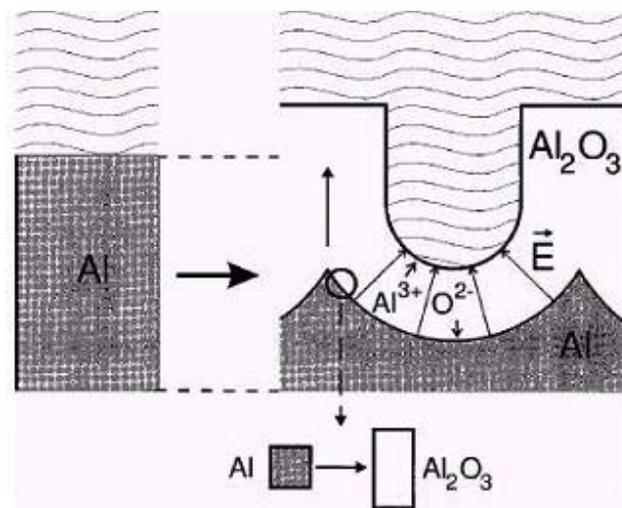


Figura 9: Expansão do filme de alumina durante a anodização do alumínio (Jessensky et al., 1998).

Embora não haja evidência direta até o momento, que defeitos no arranjo dos poros podem ser originados de desvios ou outros defeitos no alumínio, é claro que a correlação de auto-organização é ao menos perturbada por um grande número de regiões cristalinas na folha de alumínio não recozida. A alta rugosidade superficial leva a uma rápida formação do óxido de barreira e poros nas depressões da superfície, comparada às outras localizações planas. Os poros que nucleiam em tais depressões, num estágio inicial, crescerão mais rápido do que em outros sítios. A rugosidade superficial é assim transferida para a fachada de anodização, na interface entre o alumínio e a camada de óxido, e previne a auto-organização. Contudo, a agitação do eletrólito pode contribuir para condições de corrosão espacialmente homogêneas. O recozimento do substrato de alumínio pode aumentar o tamanho da região cristalina, enquanto a agitação do eletrólito durante a oxidação e o uso de superfícies lisas de alumínio polidas eletroquimicamente são necessários para obtenção de estruturas hexagonais ordenadas com uma ampla faixa típica de ordenamento de $100\mu m^2$ (Chik & Xu, 2004).

A alumina anódica porosa tem um arranjo empacotado de células hexagonais colunares, com poros cilíndricos centrais, de tamanhos uniformes, na faixa de 4 a 200nm de diâmetro e uma densidade de poros tão grande quanto 10^8 - 10^{11} poros/cm², e a espessura do filme varia de 0,1 a

300µm. Estas dimensões são ajustadas pelas condições de anodização do alumínio. Assim, tem sido relatado que a densidade de poros e o tamanho destes podem ser controlados pela voltagem de anodização e a composição do eletrólito, enquanto que a espessura da membrana pode ser ajustada pela carga passada na eletrólise anódica. Portanto, muitos métodos têm sido desenvolvidos para preparar ou aprimorar essas membranas de alumina porosa. Masuda & Fukuda (1995) desenvolveram uma técnica de anodização em dois passos para obtenção de membranas porosas altamente ordenadas e utilizaram estas como moldes para síntese de materiais nanoestruturados. O primeiro passo envolve o crescimento e subsequente dissolução (corrosão) da alumina. O segundo passo (segunda anodização) leva à formação de filmes altamente ordenados (Figura 10) (Brevnov et al., 2004). Entretanto, três fatores principais devem ser pensados para uma fabricação bem sucedida de uma alumina anódica porosa perfeita. O primeiro fator envolve um pré-tratamento que consiste em recozimento e polimento da folha de alumínio, etapas consideradas como essenciais para a preparação de poros ordenados. O segundo fator que influencia a qualidade da alumina anódica porosa são os passos de multi-anodização, usualmente requeridos para se obter um conjunto de poros altamente ordenados. O terceiro fator é a remoção da camada barreira que bloqueia a base dos poros (Yuan et al., 2004).

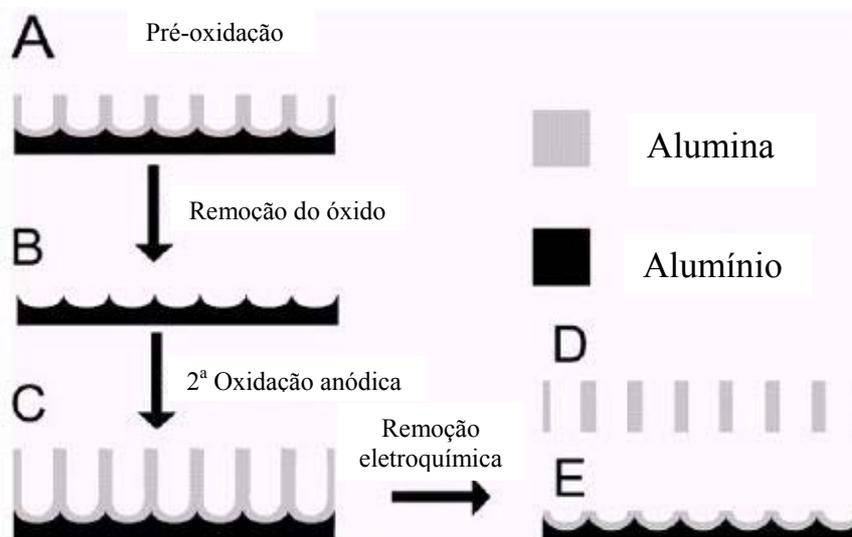


Figura 10: Formação de filme de alumina anódica em duas etapas. Retirado de Yuan et al., 2004.

Apesar da aparente simplicidade do método de fabricação, o processo de anodização para gerar um filme poroso é complexo. O material resultante consiste de três camadas distintas:

alumínio residual, a fina camada de barreira e a camada de óxido poroso relativamente espessa. O crescimento da camada de óxido poroso durante a anodização ocorre na interface metal/camada de barreira. Para voltagens de 10-70 volts, a razão de anodização é limitada pela razão de migração de íons através da camada de barreira. A espessura desta camada depende linearmente da voltagem de anodização. Durante a anodização à voltagem constante, a espessura da camada de barreira permanece constante, porque a razão de dissolução da alumina no lado do eletrólito é igual à razão de produção de alumina no lado do metal, isto caracteriza o estado estacionário de formação do filme poroso (Brevnov et al., 2004).

Eletrólitos normalmente utilizados para o crescimento de óxidos porosos bem ordenados são ácido sulfúrico, ácido oxálico e ácido fosfórico, onde arranjos de poros auto-organizados são obtidos em potenciais muito diferentes, tipicamente 25 volts para ácido sulfúrico, 40 volts para o ácido oxálico e 195 volts para o ácido fosfórico, levando a diâmetros de poros de 65 nm, 100 nm e 400 – 500 nm, respectivamente. Isto é o resultado da relação linear entre o diâmetro da célula e a voltagem de formação, bem como do campo elétrico necessário para a penetração de íons através da estrutura do óxido (Tsuchiya et al., 2007).

Geralmente há dois métodos bem descritos de síntese de moldes de alumina anódica: anodização auto-organizada em duas etapas que origina uma estrutura quase-monodomínio e anodização guiada por um pré-moldado que resulta em um perfeito retículo triangular de poro. Embora o processo de auto-organização na formação dos nanoporos pode ocorrer em uma área de superfície macroscópica, ele sempre resulta em nanoestruturas não idealmente ordenadas. A anodização com alumínio pré-texturizado dá um arranjo de nanoporos idealmente hexagonal sobre toda a superfície, mas o tamanho da amostra depende das dimensões da estampa (molde) preparada previamente (Sulka & Parkola, 2007). Contudo, apesar da perfeita uniformidade encontrada por tal método, ele permanece uma alternativa cara ao método mais simples, que é apenas baseado no fenômeno de auto-organização (Mátéfi-Tempfli et al., 2008).

3.3- MÉTODOS GERAIS PARA PREPARAÇÃO DE NANOMATERIAIS ATRAVÉS DO USO DE MEMBRANAS MOLDES

A camada de alumina tem boas propriedades mecânicas e certa estabilidade química e térmica. Várias aplicações desta estrutura estão sendo correntemente testadas, incluindo

membranas de tamanhos de poros bem definidos, catalisadores, meio para mídia com alta densidade de armazenamento, nanomateriais funcionais exibindo efeitos quânticos, sensores químicos de alta sensibilidade, dispositivos nanoeletrônicos e membranas bioquímico funcionais (Sheintuch & Smagina, 2007).

Membranas porosas podem exibir poros com raios de micrômetros a nanômetros, que determinam seu uso em diferentes tecnologias de filtração (Figura 11). A maior parte destas membranas exibe porosidade heterogênea, mas umas poucas podem ser preparadas com poros de forma bem definida e faixa estreita de diâmetro. Dentre essas estão as membranas de alumina preparadas pela anodização de alumínio ultrapuro. Membranas de alumina anódica comerciais são membranas de microfiltração restritas a um número muito limitado de diâmetros de poros. Em geral estas membranas têm sido empregadas como moldes para a preparação de nanopartículas, nanotubos, nanofibrilas e nanofios, a partir de diferentes materiais incluindo polímeros, óxido de metais e outros sólidos nanoestruturados (Darder et al., 2006).

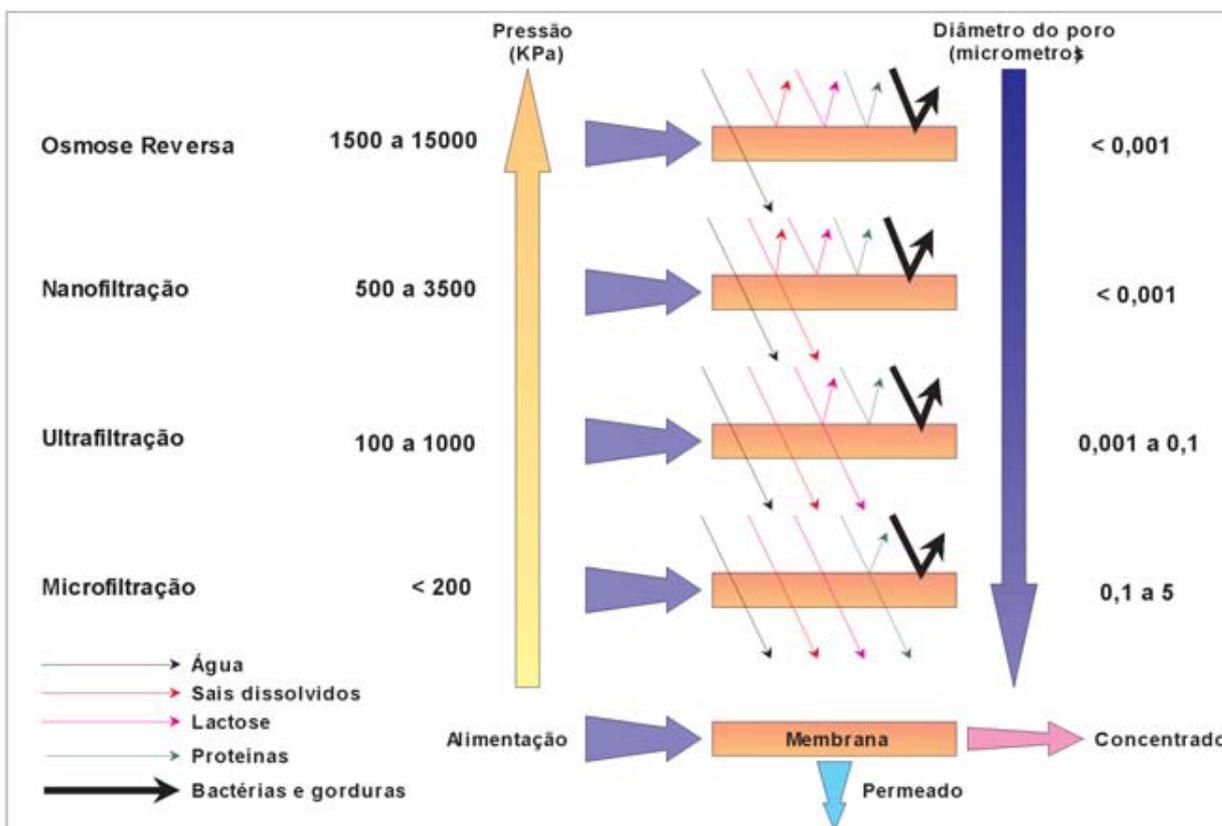


Figura 11: Membranas porosas e as diferentes tecnologias de filtração (Mierzwa et al., 2008).

Os nanomateriais têm uma gama de aplicações em diversas áreas, incluindo química, física, eletrônica, óptica, ciências dos materiais e ciências biomédicas. Essas aplicações incluem o uso em dispositivos eletrônicos, ópticos, mecânicos, liberação de drogas e bioencapsulação (Martin, 1994).

Devido ao grande desenvolvimento da nanotecnologia, a preparação e caracterização das membranas de alumina anódica têm recebido bastante atenção. Além disso, os nanoporos auto-organizados e altamente ordenados são ajustáveis e esta propriedade faz da alumina anódica um importante material de partida para muitas aplicações, incluindo pontos quânticos, materiais magnéticos e fotocatalisadores. Ademais, membranas de alumina anódica são um dos moldes mais populares para o crescimento de nanobastões, nanofios e nanotubos, os quais usualmente exibem propriedades físico-químicas singulares (Bai et al., 2008).

Muitos métodos para fabricação de nanopartículas têm sido desenvolvidos, desde técnicas litográficas a métodos químicos. Vários grupos de pesquisa têm explorado um método de fabricação chamado de síntese por molde (*template synthesis*), para a preparação de uma variedade de micro e nanomateriais. Este processo envolve a síntese do material desejado dentro dos poros de uma membrana porosa. Devido às membranas usadas terem poros cilíndricos de tamanho uniforme, um nanocilindro do material desejado é obtido em cada poro. Dependendo das propriedades do material e da química da parede do poro, este nanocilindro pode ser sólido (nanofibrila) ou oco (nanotúbulo) (Hulteen & Martin, 1997).

A síntese por molde pode fornecer à nanotecnologia um caminho significativo e fundamental. O molde tem duplo papel: primeiro ele permite a produção da estrutura com a melhor reprodutibilidade possível e, segundo, desempenha o papel de um esqueleto por possibilitar a organização das diferentes funções do dispositivo, componentes ativos e diferentes interfaces (blocos de construção, contatos elétricos, sensores óticos, entre outros) sobre um corpo rígido. Por exemplo, o papel do molde é permitir a manipulação dos blocos de construção sem a necessidade de uma ponteira (*tip*) microscópica (sem o uso sistemático do microscópio de força atômica ou do microscópio de varredura por tunelamento) ou sem a necessidade de processos *top-down* (litografia). Segundo Wade & Wegrowe (2005) ele é usado para ligar a estrutura ao mundo macroscópico, ou seja, os contatos.

Há vários interesses e características úteis associados com a síntese por molde. Provavelmente a característica mais útil deste método é que ele é extremamente geral com

relação ao tipo de materiais que podem ser preparados. Também porque as membranas empregadas contêm poros cilíndricos de diâmetro uniforme o que possibilita a obtenção de nanocilindros monodispersos do material desejado, cujas dimensões podem ser cuidadosamente controladas. Finalmente, estas nanoestruturas fibrilares ou tubulares podem ser agrupadas de várias formas. Elas podem permanecer dentro dos poros da membrana molde ou podem ser liberadas e coletadas como um conjunto de nanopartículas livres. Alternativamente, se a nanoestrutura contida na membrana é aderida a uma superfície e a membrana é removida, um conjunto de micro ou nanoestruturas que sobressai da superfície como cerdas de uma escova pode ser obtido. A maioria dos trabalhos de síntese por molde tem sido feito pelo uso de dois tipos de membranas nanoporosas: *track-etch* e alumina porosa (Hulteen & Martin, 1997).

Várias companhias, tais como Nucleopore e Poretics, vendem membranas poliméricas para filtração, micro ou nanoporosas, que são preparadas por *track-etch*. Este método de fabricação de membranas envolve uma etapa inicial de irradiação de filmes densos de policarbonato ou poliéster com partículas α . Estas partículas atravessam o filme quebrando ligações da cadeia polimérica. A seguir o filme sofre lixiviamento químico. O ataque ocorre preferencialmente nas regiões atravessadas pelas partículas e o diâmetro dos poros aumenta com o tempo de imersão no banho de lixiviamento. A membrana resultante contém poros cilíndricos de diâmetro uniforme distribuídos randomicamente. As membranas comerciais são disponíveis com diâmetros de poros tão pequenos quanto 10 nm (densidade de poros de cerca de 10^9 poros.cm⁻²). Devido à natureza randômica do processo de produção dos poros, o ângulo dos poros em relação à superfície pode ser tão grande quanto 34°. Portanto, dependendo do diâmetro do poro e de sua densidade na membrana *track-etch*, vários poros podem sofrer intersecção dentro da membrana. As membranas de alumina porosa são preparadas eletroquimicamente a partir do alumínio metálico. Estas membranas contêm poros cilíndricos de diâmetro uniforme em um arranjo hexagonal (Figura 12). Contudo, diferentemente das membranas *track-etch*, os poros nestas membranas têm pequena ou nenhuma inclinação em relação à superfície normal, resultando em uma estrutura de poros não-conectados e individuais. Embora tais membranas sejam vendidas comercialmente pela Whatman, um número muito limitado de diâmetros de poro é disponível. Densidades de poros tão elevadas quanto 10^{11} poros.cm⁻² podem ser encontradas e espessuras típicas para a membrana de 10 a 100µm. Portanto, as membranas de alumina possuem cerca de 65% de poros enquanto que a porosidade das membranas Nucleopore é de aproximadamente 15%. Assim, uma quantidade maior de tubos ou filamentos por área de matéria

prima (membrana) pode ser preparada a partir de membranas de alumina. Isto pode ser importante do ponto de vista de aplicações comerciais (Hulteen & Martin, 1997).

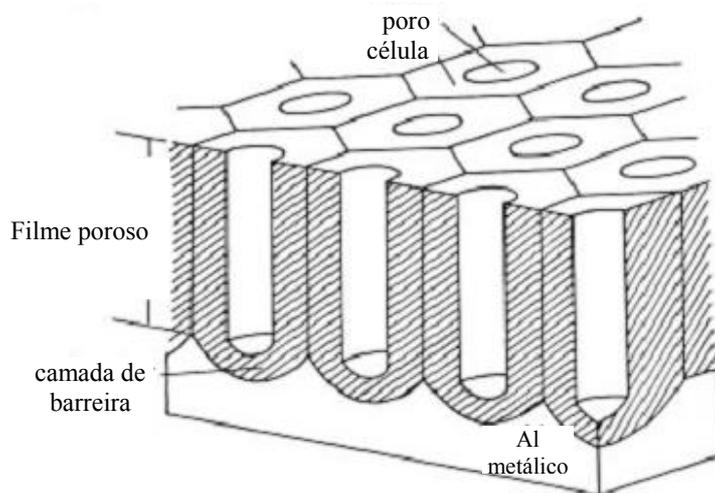


Figura 12: Ilustração de um filme de alumina porosa. Pode ser observado que os poros são perpendiculares à superfície do filme e que estes formam um arranjo de células hexagonais (Patermarakis et al., 1999).

A limitação da síntese por molde é definida pela química requerida para sintetizar o material. A princípio qualquer material pode ser sintetizado dentro destas membranas nanoporosas, desde que uma via química apropriada seja desenvolvida. Precauções que necessitam ser observadas quando se desenvolvem novos métodos sintéticos incluem: 1- a solução do precursor a ser usada para preparar o material penetra o poro (hidrofóbico/hidrofílico); 2- a reação de deposição ocorre rapidamente resultando na obstrução do poro na superfície da membrana antes que ocorra o crescimento de túbulos ou fibras dentro dos poros; 3- a estabilidade térmica ou química da membrana em relação às condições de reação (Hulteen & Martin, 1997).

A deposição eletroquímica de um material dentro dos poros é acompanhada pelo recobrimento de uma face da membrana com um filme metálico, usualmente via deposição iônica ou evaporação térmica, e este filme metálico é utilizado como cátodo para eletrodeposição. Este método tem sido usado para preparar uma variedade de nanofios metálicos incluindo cobre, platina, ouro, prata e níquel. A deposição eletroquímica pode ser usada também para síntese de polímeros condutores tais como polipirrol, polianilina ou politiofeno, dentro dos poros destas membranas (Hulteen & Martin, 1997).

A deposição não-eletroquímica de metais envolve o uso de agentes químicos redutores para depositar o metal em solução sobre a superfície. Neste método a superfície a ser revestida não necessita ser condutora. Um aspecto chave do processo de deposição não-eletroquímica é que esta começa nas paredes dos poros. Portanto, após um curto intervalo de tempo, um túbulo oco de metal é obtido dentro de cada poro, enquanto longos tempos de reação resultam em nanofios sólidos de metal. Diferentemente do método de deposição eletroquímica, onde o comprimento do nanofio metálico pode ser controlado, o método não-eletroquímico origina estruturas que percorrem toda a espessura da membrana molde (Hulteen & Martin, 1997).

A síntese química de polímeros nos moldes pode ser efetuada pela simples imersão da membrana dentro de uma solução contendo o monômero e um reagente de polimerização. Este processo tem sido usado para sintetizar uma variedade de polímeros condutores dentro dos poros de várias membranas moldes. Os polímeros preferencialmente nucleiam e crescem sobre as paredes dos poros, resultando em túbulos em curtos tempos de reação e fibras em longos tempos (Hulteen & Martin, 1997).

3.4- APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE MEMBRANAS NANOPOROSAS E SEUS DERIVADOS

Avanços recentes em separações por membranas incluem: separações quirais, nanofiltração, permissividade iônica, separação gasosa e pervaporação. Novas separações quirais com uso de enzimas e surfactantes quirais como carreadores têm sido encontradas através de transporte facilitado por membranas. Membranas de copolímeros têm sido construídas as quais possuem seletividade iônica controlada pelo pH, e também membranas feitas de nanotubos de ouro que exibem permissividade controlada eletroquimicamente (Jirage & Martin, 1999).

Muitas drogas, compostos farmacêuticos e flavorizantes são misturas racêmicas. Contudo, frequentemente apenas um dos dois enantiômeros produz a ação biológica requerida. O enantiômero não desejado é considerado uma impureza e pode causar efeitos secundários desagradáveis. As separações quirais são feitas comumente por técnicas cromatográficas e eletroforéticas. Há várias tentativas de uso de métodos de separação com membranas devido as suas vantagens de efetividade de custo e baixo consumo de energia (Jirage & Martin, 1999).

Para a utilização de enzimas/proteínas como carreadoras quirais em processos de separação por membranas faz-se necessária a imobilização destas biomoléculas dentro dos poros da

membrana. A imobilização de enzimas é a ligação ou incorporação de moléculas de enzimas sobre ou dentro de grandes estruturas, via adsorção, ligação covalente ou encapsulação. Esta técnica tem sido uma estratégia popular para muitas aplicações em larga escala devido à fácil reciclagem do catalisador, a operação contínua e a purificação do produto. A baixa eficiência catalítica das enzimas imobilizadas, contudo, freqüentemente limita o desenvolvimento de bioprocessos em grande escala que possam competir com processos químicos tradicionais. O aprimoramento da eficiência biocatalítica pode ser obtido pela manipulação da estrutura do material suporte de imobilização da enzima. Materiais não-porosos, nos quais as enzimas são ligadas à superfície, são sujeitos à limitação difusional mínima, enquanto a quantidade de enzima imobilizada por unidade de massa do suporte é usualmente baixa. Por outro lado, materiais porosos podem fornecer alta imobilização de enzimas, mas apresentam uma grande limitação difusional do substrato. Materiais mesoporosos têm obtido atenção significativa como suportes excelentes para catálise. O método de adsorção enzimática tem sido mais freqüentemente utilizado para imobilização nesses materiais, entretanto, a estabilidade operacional pode ser seriamente afetada pela lixiviação da enzima do material (Kim et al., 2006).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma técnica comum que permite fazer uso deste valioso biocatalisador. Suportes porosos fornecem uma grande área superficial por unidade de volume do reator a qual não é possível com suportes não-porosos. Contudo, a área superficial aumentada é contrabalançada por resistências difusionais para as moléculas de substrato e produto. Entretanto, limitações difusionais podem aumentar a estabilidade enzimática, diminuir a sensibilidade ao pH e diminuir o efeito de inibidores (Dalvie & Baltus, 1992).

A imobilização de glicose oxidase e glicose oxidase-biotina sobre membranas de alumina porosa foi investigada experimentalmente (Dalvie & Baltus, 1992). Os dados de deposição da enzima foram correlacionados com cálculos teóricos para determinar a constante de velocidade de imobilização e a distribuição da enzima no poro. Os estudos de imobilização foram feitos para enzimas adsorvidas e ligadas covalentemente. A ligação covalente apresentou alta taxa de imobilização e uma distribuição menos uniforme quando comparada à imobilização por adsorção. Além disso, a quantidade de enzima ativa e sua distribuição na membrana foram comparadas àquelas previstas pela teoria.

Biossensores estão sendo desenvolvidos rapidamente e empregados amplamente em um grande número de aplicações médicas e ambientais importantes. As enzimas, devido à sua alta seletividade e reatividade em condições normais, são utilizadas na fabricação de biossensores.

Entretanto, suas aplicações são correntemente limitadas devido às suas sensibilidades ao pH e a temperatura, alto custo e pobre reutilização. Para contornar estes problemas e expandir seu uso, métodos de imobilização têm sido aplicados, pois é bem conhecido que a imobilização tem as seguintes vantagens: (1) aumenta a estabilidade das espécies bioativas por proteger a biomolécula da inativação; (2) proporciona uma redução significativa nos custos operacionais; (3) possibilita a reutilização (Yang et al., 2007).

Embora a estabilização de enzimas tem sido de interesse por muitos anos, novas oportunidades que visam à melhoria das estabilidades intrínseca e operacional têm surgido com o desenvolvimento de nanomateriais e materiais nanoestruturados. Estes materiais podem oferecer grandes áreas de superfície, poros com tamanho projetados para as dimensões da proteína, superfícies funcionalizadas, sítios múltiplos para interação ou ligação e menores limitações de transferência de massa (Kim et al., 2006).

A aplicação de materiais nanoporosos como suporte para biossensores tem várias vantagens. Devido à grande área superficial, a imobilização de componentes bio-específicos como enzimas, pode ser feita por adsorção e não por método de ligação covalente. Adicionalmente, a superfície nanoestruturada melhora significativamente a região de medida dinâmica do sensor, desde que a miniaturização do elemento sensível diminui seu tempo de resposta. O interesse por suportes para biossensores nanoestruturados é estimulado pela produção destes materiais com propriedades bio-magnéticas e bioelétricas únicas e a fabricação de estruturas quânticas menores do que uma centena de angstroms. Materiais com grande área superficial em dimensões nanométricas, ou seja, pequenas partículas ou agrupamentos com a razão superfície/volume muito grande, podem ser encontrados pela criação de materiais onde a área de superfície vazia (poros) é grande comparada a quantidade do material como um todo. Óxidos inorgânicos nanoporosos podem ser um exemplo de tais materiais. As propriedades destes materiais tais como reatividade química, momento magnético, polarizabilidade e estrutura geométrica exibem uma forte dependência das dimensões superficiais (Takhistov, 2004).

A alumina anódica nanoporosa tem sido usada como um suporte para construção de um biossensor enzimático para operar em soluções aquosas. Este suporte com enzimas adsorvidas foi usado como um eletrodo enzimático e sensor de pH. A enzima penicilinase foi imobilizada por adsorção e, devido à grande área do sensor, a imobilização da enzima foi aumentada, o que melhorou a sensibilidade do eletrodo. A caracterização da interação entre enzima e suporte foi feita através de espectroscopia por impedância eletroquímica. Uma dependência quase linear da

parte imaginária da impedância sobre a concentração de penicilina foi encontrada para concentrações abaixo de 10^{-5} mol/L, as quais são adequadas aos requerimentos de sensibilidade de sensores convencionais para penicilina (Takhistov, 2004).

Um formato bem conhecido de biossensores amperométricos é baseado na aderência de membranas, contendo o elemento biologicamente ativo, à superfície do eletrodo. Membranas são excelentes suportes para a retenção de grande quantidade de composto bioativo em um filme fino, o que é importante para aumentar a sensibilidade do biossensor e facilitar a difusão de espécies eletroativas em direção à superfície do eletrodo. Assim, membranas de alumina porosa podem ser também empregadas na construção de biossensores provendo uma área de superfície relativamente grande para retenção de enzimas ou compostos bioativos relacionados, permitindo o desenvolvimento de biossensores com boa estabilidade operacional (Darder et al., 2006).

Um agrupamento de nanotubos de ouro foi preparado por deposição não-eletroquímica do metal dentro dos poros de membranas de policarbonato *track-etch*. A enzima glicose oxidase foi imobilizada sobre monocamadas auto-organizadas (mercaptoetanolamina ou ácido mercaptopropiônico) pré-formadas sobre o ouro depositado, via ligação cruzada com glutaraldeído ou ligação covalente mediada pela carbodiimida. A efetividade dos diferentes passos no procedimento de imobilização foi avaliada por medidas de ângulo de contato, voltametria cíclica e espectroscopia fotoeletrônica de raios-X. A sensibilidade para a β -D-glicose dos diferentes biossensores foi avaliada e respostas tão grandes quanto $400 \text{ nA} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ foram obtidas (Delvaux & Demoustier-Champagne, 2003).

Biossensores enzimáticos, particularmente aqueles que utilizam fenômenos eletrônicos (potenciométricos e amperométricos), necessitam de distribuição regular dos elementos sensitivos, para que possam fornecer um sinal de saída correto e homogêneo. Este fato freqüentemente torna-se um problema na construção do sensor, introduzindo a necessidade de métodos sofisticados para deposição da biomolécula. A alumina anódica porosa pode ser útil para solucionar o problema relativo à distribuição regular da macromolécula na área sensitiva (Stura et al., 2007) (Figuras 13 a 16).

Membranas sintéticas de bio-nanotubos foram desenvolvidas e usadas para separar dois enantiômeros de uma droga quiral. Estas membranas foram obtidas a partir de filmes de alumina anódica onde nanotubos de sílica foram sintetizados quimicamente dentro dos poros destes filmes, e um anticorpo seletivo para um dos enantiômeros da droga foi ligado à parede interna dos nanotubos de sílica. Estas membranas transportaram seletivamente o enantiômero

reconhecido especificamente pelo anticorpo, relativamente ao enantiômero para o qual o anticorpo tem menor afinidade. O coeficiente de seletividade do enantiômero aumentou quando o diâmetro do nanotubo de sílica diminuiu (Lee et al, 2002).

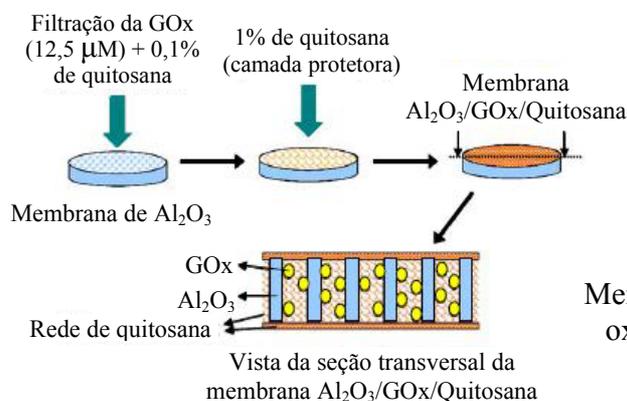


Figura 13: Imobilização de glicose oxidase (GOx) em membranas de alumina nanoporosa (Darder et al., 2006).

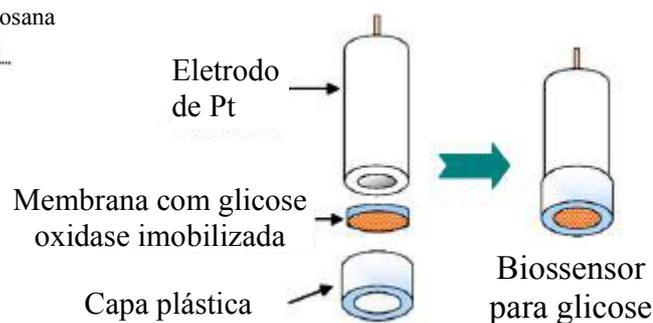


Figura 14: Ilustração esquemática da confecção do biossensor (Darder et al., 2006).

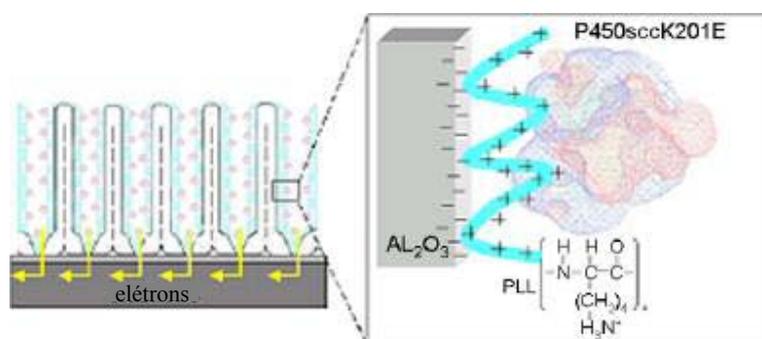


Figura 15: Eletrodo *screen-printed* de ródio-grafite funcionalizado com alumina porosa anódica. Visão esquemática ilustrando a transferência direta de elétrons entre o citocromo P450_{scc} e o eletrodo modificado com alumina porosa anódica (Stura et al., 2007).

Várias outras aplicações de nanomateriais produzidos a partir da síntese molde têm sido descritas na literatura. Lakshmi & Martin (1997) imobilizaram apoenzimas em membranas poliméricas porosas com vistas à separação quiral. A membrana enantiosseletiva consistia de um filtro de policarbonato microporoso sobre o qual foram crescidos filmes finos de polipirrol como em um sanduíche. Assim as apoenzimas foram depositadas dentro dos poros e em seguida os mesmos foram lacrados por um filme de polipirrol. Este filme foi permeável a pequenas

moléculas como água, eletrólitos e os substratos das enzimas. Com o uso deste sistema os autores conseguiram um transporte cinco vezes maior do enantiômero específico. Uma abordagem semelhante foi adotada por Parthasarathy & Martin (1994). Estes autores trabalharam com a mesma membrana de policarbonato e construíram microcápsulas de polipirrol dentro dos microporos destas membranas. Assim, eles sintetizaram eletroquimicamente os túbulos de polipirrol e depositaram várias enzimas no interior destes, e em seguida fecharam suas aberturas originando as microcápsulas contendo as enzimas no seu interior.

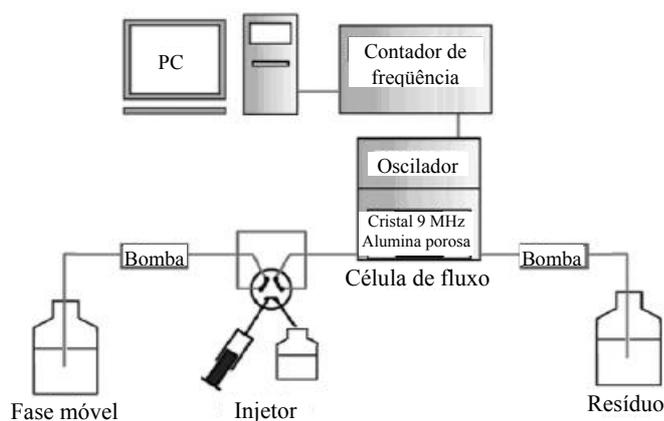


Figura 16: Configuração de um sensor piezoelétrico separado do eletrodo com sistema de análise por injeção em fluxo (Yang et al., 2007).

As membranas de alumina anódica nanoporosa também têm sido usadas como modelo de membranas biológicas para observação de fenômenos de transporte de elétrons. Nestes estudos, os autores depositaram fosfolipídios dentro dos poros e ancoraram enzimas óxidorredutases no filme lipídico formado. Os estudos foram realizados eletroquimicamente, o que foi possível devido a uma camada de ouro depositada em um dos lados da membrana porosa (Marchal et al, 2001; Proux-Delrouyre et al, 2001; Parpaleix et al, 1992).

Mitchell et al. (2002) desenvolveram nanotubos de sílica para usos em biosseparação e biocatálise. Um aspecto interessante é que estes tubos foram modificados internamente ou externamente para conter grupamentos químicos de interesse. Esta modificação da superfície dos tubos foi feita através da química dos silanos. Dessa forma, os autores puderam imobilizar biomoléculas na face interna ou externa dos tubos as quais foram usadas para separação quiral e biocatálise.

Uma outra proposta interessante foi desenvolvida por Reiss et al (2002). Estes autores sintetizaram códigos de barras nanoscópicos através da deposição seqüencial de dois ou mais metais dentro dos poros, formando assim verdadeiros códigos de barras. Estes nano-códigos foram propostos como ferramentas de marcação de espécimes biológicos para estudos ao microscópio.

3.4.1- Biomoléculas imobilizadas: características e aplicações

A princípio, as membranas de alumina anódica podem ser utilizadas como suporte para imobilização de quaisquer biomoléculas. Contudo, diferentemente das membranas poliméricas, elas carecem dos grupos químicos freqüentemente usados nos processos de imobilização. Assim, uma etapa de funcionalização é requerida quando se deseja obter uma ligação covalente entre a membrana e a biomolécula.

Biomoléculas imobilizadas podem ser usadas como catalisadores insolúveis ou reagentes de modificação para inúmeras transformações bioquímicas. Enzimas imobilizadas podem funcionar como reagentes reutilizáveis na preparação de fragmentos de proteínas ou na análise da pureza destas. Proteínas imobilizadas podem ser usadas de várias formas para separar e medir analitos específicos. Anticorpos, antígenos e outros ligantes de afinidade podem ser úteis como adsorventes de fase sólida em imunoenaios. Além disso, a detecção eletrônica de interações de afinidade facilita o desenvolvimento de poderosos eletrodos de afinidade e biossensores, que não apenas medem a concentração do analito, mas também determinam as características quantitativas dessas interações bioespecíficas (Hermanson et al., 1992).

A produção de bio-nanocompósitos ainda é principiante, especialmente quando se trata das membranas de alumina anódica. Em geral, os biocompósitos produzidos utilizam enzimas de conhecidas propriedades, o que facilita a avaliação do derivado obtido. Então, o que normalmente ocorre é que se utilizam biomoléculas amplamente descritas na literatura, tais como: glicose oxidase, peroxidase, urease, tripsina, anticorpos, entre outras.

A seguir estão descritas algumas características da *horseradish* peroxidase e da tripsina, enzimas utilizadas como modelo no presente estudo.

3.4.1.1- *Horseradish peroxidase (HRP)*

A *horseradish* peroxidase (HRP) é uma glicoproteína de massa molecular 44 kDa e que contém 308 resíduos de aminoácidos e um grupo prostético heme (protoporfirina IX). Ela catalisa a reação de oxidação de compostos orgânicos pelo peróxido de hidrogênio. A presença do grupo heme é responsável pela coloração característica dessa enzima e por sua absorção máxima a 403 nm. O pH ótimo dessa peroxidase é 7,0, muito embora a literatura descreva uma faixa de atividade de 4,0 a 8,0. O nome *horseradish* é utilizado de forma um tanto genérica, contudo, as raízes da planta *horseradish* possuem várias isoenzimas, sendo a isoenzima C (HRP C) a mais abundante (Hermanson, 1996; Ryan et al., 2006).

Devido à grande quantidade de carboidratos dessa enzima, esses são normalmente oxidados com periodato de sódio para originar grupos aldeídos reativos, os quais possibilitam sua conjugação com outras proteínas ou moléculas contendo grupamento amino. Entretanto, agentes bifuncionais, como o glutaraldeído, também são utilizados para produção de conjugados. HRP é de longe a enzima mais popular utilizada em conjugados enzima-anticorpo, sendo parte de aproximadamente 80% de todos os conjugados de anticorpos, muitos deles utilizados em sistemas de ensaios diagnósticos (Hermanson, 1996).

Na reação com seu substrato fundamental, H_2O_2 , a HRP forma um intermediário estável que se dissocia na presença de certos doadores de elétrons, oxidando-os e normalmente levando a uma mudança de cor. Os doadores de elétrons podem ser moléculas estáveis como ascorbato, citocromo c, ferrocianato, ou a forma leuco de muitos corantes. Uma grande variedade de substratos corantes é comercialmente disponível para uso como reagentes de detecção de HRP. Alguns deles formam produtos solúveis, para uso em sistemas de detecção espectrofotométrica, enquanto outros formam produtos insolúveis que são especialmente apropriados para técnicas de coloração (Hermanson, 1996; Veitch, 2004).

Horseradish peroxidase (predominantemente HRP C) é utilizada como um reagente para síntese orgânica e biotransformações, bem como em ensaios enzima-conjugados, ensaios quimiluminescentes, imunoenaios e no tratamento de efluentes. Contudo, duas aplicações dessa enzima são proeminentes: biossensores e imunoenaios. Nos biossensores a peroxidase pode participar em sistemas mono- ou bi-enzimáticos. Nos primeiros, a determinação de peróxido de hidrogênio é o objetivo, no segundo caso, a HRP atua como enzima secundária que catalisa uma reação redox entre o peróxido de hidrogênio gerado por outra enzima presente no sistema e uma molécula doadora de elétrons. Este é o caso dos biossensores para glicose. Assim, a HRP é uma

enzima de presença indispensável em muitos tipos de biossensores (Ryan et al., 2006; Veitch, 2004; Burton, 2003).

3.4.1.2- *Tripsina*

A tripsina é uma protease da família das serinoproteases. É uma das enzimas mais bem estudadas, cujo mecanismo catalítico tem sido descrito. Ela é uma proteína monomérica de massa molecular 23,8 kDa, consistindo de 229 resíduos de aminoácidos e 6 pontes dissulfeto. Análises de raios-X demonstraram que 55% dos seus resíduos formam folhas beta, 13% alfa-hélice e 32% são estruturas indefinidas. A tripsina é uma proteína muito básica, pI 10,5, que possui uma faixa de atividade ótima entre os pH 7 e 9, com uso típico em pH 8,0. Essa enzima cliva ligações peptídicas no lado carboxila de resíduos de arginina e lisina. Além disso, ela pode existir em 2 formas: alfa-tripsina e beta-tripsina. A beta-tripsina possui uma cadeia polipeptídica única e é mais ativa do que a alfa-tripsina. Esta última é formada pela autólise limitada da primeira, o que divide a cadeia polipeptídica em duas, mas que permanecem unidas pelas pontes dissulfeto (Hermanson et al., 1992; Forbes et al., 2007).

A tripsina é uma das proteases mais utilizadas na área acadêmica e industrial. Ela tem sido usada como ferramenta em numerosos estudos, incluindo o isolamento e purificação de peptídeos, formulação de biodetergentes, processamento de carnes e produção de derivados de leite. Ela também é uma protease utilizada amplamente na determinação de seqüências de peptídeos e proteínas. Isto é feito usualmente em solução, o que pode acarretar numa variabilidade importante devido à presença de peptídeos gerados a partir da autodigestão da tripsina. Assim, uma estratégia para reduzir a autólise é a imobilização desta enzima em suportes sólidos para realizar a digestão protéica em sistema de fluxo contínuo (Nicoli et al., 2008; Caramori & Fernandes, 2008; Calleri et al., 2004). Um uso muito bem estabelecido para essa enzima é a preparação de fragmentos de imunoglobulina, particularmente de anticorpos IgM e IgG (Hermanson et al., 1992).

Portanto, as aplicações da tripsina são várias, mas ultimamente tem sobressaído sua função no seqüenciamento de proteínas, como ferramenta da proteômica. E, nesse campo, um derivado cataliticamente inativo da tripsina, chamado anidrotripsina, tem se mostrado útil. Esse derivado imobilizado é um suporte de afinidade bioespecífico e versátil para o fracionamento de fragmentos trípticos de polipeptídeos (Korechá et al., 2008; Che et al., 2001; Sechi & Chait, 2000).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

Acetona PA (C₃H₆O) 99,5%, F. MAIA;

Ácido cítrico (C₆H₈O₇.H₂O) 99,5 - 100,5% MERCK;

Ácido clorídrico (HCl) 36,5-38%, QUIMEX;

Ácido fosfórico (H₃PO₄) 85%, SYNTH;

Ácido nítrico (HNO₃) 65%, CINÉTICA;

Ácido oxálico dihidratado (H₂C₂O₄.2H₂O) 99,5%, VETEC;

Ácido perclórico (HClO₄) 70-72%, MERCK;

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95-97%, MERCK;

Álcool etílico PA (C₂H₆O) 95%, REAGEN;

Alumínio em fita Merck 250g: 0,3mm X 30 mm (1.01057.0250) 99,9%;

Anilina (C₆H₅NH₂) 99%, VETEC;

Cloreto cúprico (CuCl₂) 99%, VETEC;

Cloreto de mercúrio (HgCl₂) 99,5-100,5% MERCK;

Fosfatos de sódio mono (NaH₂PO₄) 99% e dibásico (Na₂HPO₄) 98% anidros, VETEC;

Glutaraldeído (C₅H₈O₂) 25%, VETEC;

Hidróxido de sódio (NaOH) 99,5%, Riedel-de Haën;

Horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7; Sigma);

Membranas filtrantes ANODISC 25 mm – poros com diâmetros de 20, 100 e 200nm (Whatman);

Nitrato de prata (AgNO₃) 99,5%, PLAT-LAB;

N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitro-anilida (BAPNA) 98%, Sigma;

o-fenilenediamina (OPD) 99%, Sigma;

Permanganato de potássio (KMnO₄) 99%, VETEC;

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%, MERCK;

Persulfato de amônio (NH₄)₂S₂O₈ 98% MERCK;

Polietilenimina 50% p/v (PM ~ 750.000, Sigma);

Tripsina de pâncreas de porco (EC 3.4.21.4; Sigma);

Tris(hidroximetil) aminometano (C₄H₁₁NO₃) 99,8%, VETEC.

4.2- EQUIPAMENTOS

Agitadores magnéticos YAMATO (Mag-mixer M-41);

Câmara fria SANYO, temperatura operacional ~ 4°C;

Fontes de corrente contínua - DC:

- Dawer modelo FCC-3010D (10 A, 27 V);

- ATTA modelo AE-3131 (0,2 A, 3000 V, 200 W);

Lavadora ultra-sônica Cleaner, UNIQUE, modelo USC 750, frequência operacional 25 kHz;

Leitor de microplacas Biorad modelo 550;

Metalizador JEOL (Fine coat ion sputter) modelo JFC – 1100;

Microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM – 5600 LV;

Multímetro digital TOYO modelo TY – 1000;

Suporte de policarbonato para filtros 25 mm da SARTORIUS AG.

4.3- MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DO ALUMÍNIO PARA ANODIZAÇÃO

As fitas de alumínio foram submetidas aos tratamentos descritos abaixo para a retirada do óxido pré-existente, bem como para a obtenção de uma superfície polida, condições descritas como essenciais para síntese de membranas de alumina anódica porosa.

4.3.1- Polimento químico

4.3.1.1- Pré-tratamento

A fim de retirar-se alguma gordura existente, as amostras de alumínio foram tratadas durante 3 minutos em acetona. Posteriormente passaram pela decapagem, eliminando-se assim pequenas impurezas e óxidos existentes na superfície do alumínio. A solução de decapagem consistia de 100 g de NaOH /L de solução. As amostras permaneceram nessa solução durante 6 minutos, sendo lavadas a cada 3 minutos com água destilada. Então foram colocadas numa solução com 40% de HNO₃ durante 1 minuto, para neutralizar algum vestígio de alcali remanescente. Entre uma etapa e outra as amostras foram lavadas com água destilada (Pedroso, 1987).

4.3.1.2- Polimento

O polimento químico das amostras foi feito em uma solução contendo 50% de ácido sulfúrico e 50% de ácido fosfórico (v/v) aquecida a aproximadamente 100°C. As amostras foram deixadas na solução de polimento por 1,5 minutos realizando-se lavagens em água destilada a cada 30 segundos (Pedroso, 1987).

4.3.2.- Polimento eletroquímico

4.3.2.1- Desengorduramento

Para a remoção da gordura, os espécimes foram mergulhados em acetona e colocados em banho de ultra-som por aproximadamente 5 minutos (Rahman & Yang, 2003).

4.3.2.2- Polimento

O polimento eletroquímico das amostras foi feito numa solução contendo 30% de ácido perclórico e 70% de etanol (v/v) por aproximadamente 4 minutos a 7 V, utilizando uma fonte de corrente contínua Dawer modelo FCC-3010D (10 A, 27 V) (Rahman & Yang, 2003).

4.4- ANODIZAÇÃO

Diversas condições de anodização foram utilizadas, as quais serão relatadas para cada caso apresentado (Tabela 2). Esquemas dos sistemas de anodização utilizados podem ser vistos nas Figuras 17 e 18. Como pode ser observado na Tabela 2, para algumas amostras realizou-se um tratamento em solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 ou 60 minutos. Este procedimento foi utilizado para alargar os poros e também para livrá-los de algum óxido de alumínio que pudesse bloquear a abertura dos mesmos.

Tabela 2 – Condições de anodização utilizadas para a obtenção dos filmes de alumina anódica.

Figura	Condição de anodização	Sistema de anodização
20	Ácido oxálico 0,3 M a 27 V por 10 horas sem controle de temperatura.	Figura 17
21	Ácido oxálico 0,3 M a 27 V por 21 horas sem controle de temperatura.	Figura 17
22	Ácido oxálico 0,3 M sem controle de temperatura. <i>1^a anodização</i> , (j) = 50 mA/cm ² por 20 minutos; <i>2^a anodização</i> , (j) = 50 mA/cm ² por 60 minutos.	Figura 17
23	Ácido oxálico 0,3 M sem controle de temperatura. <i>1^a anodização</i> , (j) = 20 mA/cm ² por 30 minutos; <i>2^a anodização</i> , (j) = 20 mA/cm ² por 10 minutos. ^a	Figura 17
24	Ácido oxálico 0,3 M. a : sem controle de temperatura; <i>1^a anodização</i> , (j) = 23 mA/cm ² por 60 minutos; <i>2^a anodização</i> , (j) = 23 mA/cm ² por 196 minutos. b : temperatura entre 5 a 6°C; <i>1^a anodização</i> , (j) = 17 mA/cm ² por 60 minutos; <i>2^a anodização</i> , (j) = 17 mA/cm ² por 60 minutos. ^a	Figura 17
25	Ácido oxálico 0,3 M. <i>1^a anodização</i> , (j) = 22 mA/cm ² por 120 minutos entre 4 – 9°C; <i>2^a anodização</i> , (j) = 22 mA/cm ² por 120 minutos a 7°C. ^a	Figura 17
26	Ácido oxálico 0,3 M. <i>1^a anodização</i> : 80 V, 60 minutos e 3°C; <i>2^a anodização</i> : 100 V, 60 minutos e 7°C. ^b	Figura 17
27	Ácido oxálico 0,3 M. A anodização foi conduzida a uma voltagem constante de 63 V por 120 minutos e à temperatura de 3°C. ^b	Figura 17
28	Ácido sulfúrico 0,5 M. <i>1^a anodização</i> : (j) = 20 mA/cm ² por 30 minutos a 8°C; <i>2^a anodização</i> , (j) = 20 mA/cm ² por 60 minutos entre 7 – 8°C. ^a	Figura 17
29	Ácido sulfúrico 0,5 M. <i>1^a anodização</i> : 25V, 60 minutos entre 6 – 7°C; <i>2^a anodização</i> , (j) = 10 mA/cm ² por 60 minutos a 6°C. ^a	Figura 17
32	Ácido oxálico 0,3 M e densidade de corrente constante de 25 mA.cm ⁻² por 2 horas a 15°C.	Figura 18

Após cada anodização, a amostra foi mergulhada em uma solução de H₃PO₄ 0,3 M em banho de ultra-som por ^a 30 minutos ou ^b 60 minutos.

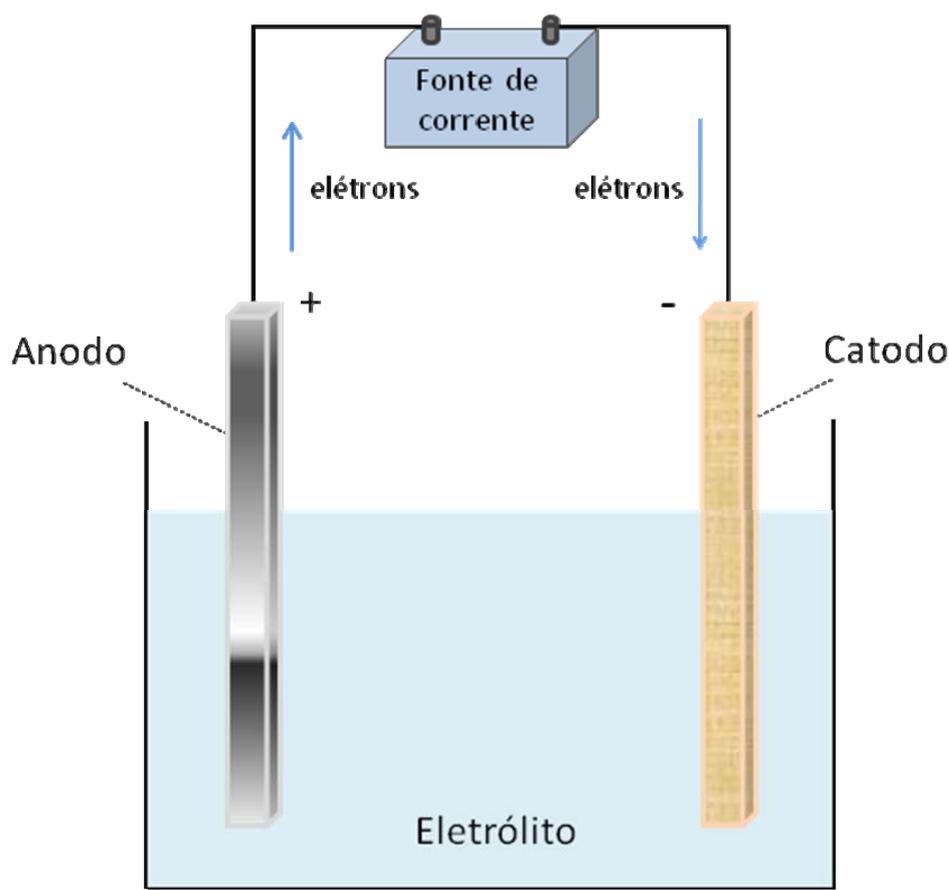
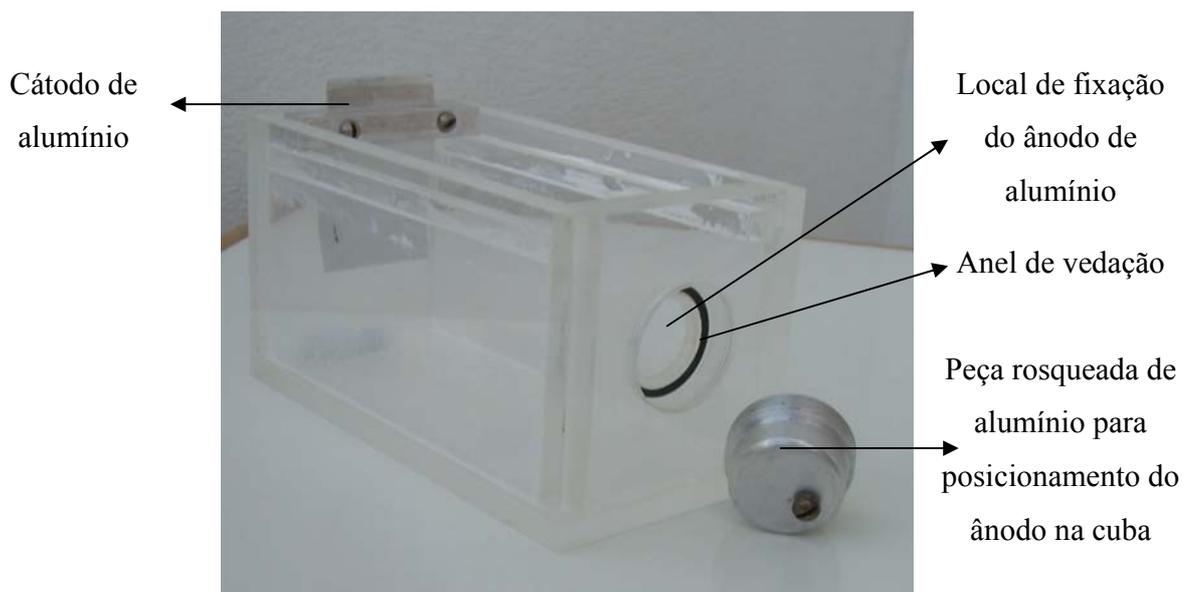


Figura 17: Esquema da cuba utilizada para obtenção de membranas retangulares de alumina anódica. Dimensões: 7 cm x 15 cm x 6 cm (altura x comprimento x largura). Os eletrodos foram mergulhados no eletrólito com o auxílio de conexões tipo garra (jacaré). Os ânodos de alumínio utilizados possuíam 0,3 mm x 10 mm x 30 mm (espessura x largura x comprimento), mas mergulhava-se apenas 20 mm dos mesmos no eletrólito, originando-se uma superfície anódica de 4 cm². Os 10 mm restantes eram utilizados para fixação nas garras ligadas aos pólos negativo ou positivo da fonte por meio de conexões tipo plugue (banana) – cabos de conexão plugue/garra. Foi utilizado como cátodo uma fita de alumínio com as mesmas dimensões do ânodo. A anodização foi realizada sob agitação com o auxílio de um agitador magnético.



Figuras 18: Cuba de acrílico para obtenção de membranas circulares de alumina anódica. Dimensões: 4,8 cm x 10,4 cm x 4,8 cm (altura x comprimento x largura). Os eletrodos foram conectados a fonte com o auxílio de cabos de conexão plugue/garra. O cátodo possuía as seguintes dimensões: 0,3 mm x 30 mm x 45 mm (espessura x largura x comprimento) e área ativa de 18 cm². O ânodo circular utilizado possuía diâmetro de 2,5 cm e área ativa de 3,46 cm². A anodização foi realizada sob agitação com o auxílio de um agitador magnético.

4.5- RETIRADA DO SUBSTRATO DE ALUMÍNIO PARA PRODUÇÃO DA MEMBRANA

Após a anodização, os filmes obtidos foram mergulhados em uma solução de cloreto cúprico 1,7% em ácido clorídrico 0,6 M para retirada do alumínio remanescente (Zhao et al., 2005). Após este processo de retirada do alumínio residual, a membrana apresentou-se transparente e foi lavada em bastante água destilada e seca a temperatura ambiente.

4.6- COMPÓSITO DE ALUMINA ANÓDICA E POLIANILINA (AAO-PANI): SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE

4.6.1- Deposição de polianilina na membrana de alumina anódica

4.6.1.1 Permanganato de potássio

A síntese do polímero na superfície de alumina anódica foi similar ao procedimento desenvolvido por Nadruz et al.(1996) e Coêlho et al. (2001). As membranas foram imersas em uma solução 0,1 M de KMnO_4 preparada em água destilada e deixadas a 50°C por um período de 16 a 20 horas. Em seguida foram lavadas com água destilada e mergulhadas em uma solução 0,5 M de anilina em 1,0 M de ácido sulfúrico. A polimerização da anilina foi realizada por aproximadamente 2 horas e depois desta etapa o AAO-PANI foi lavado sucessivamente com água destilada, ácido cítrico 0,1 M e água destilada.

4.6.1.2. Persulfato de amônio

Esta síntese foi realizada de acordo com os procedimentos adotados por Wang et al. (2002). Inicialmente a membrana foi imersa em uma solução a 4°C de anilina 0,5 M em ácido clorídrico 1,0 M por cerca de 15 minutos. Depois foi adicionada uma solução de igual volume do agente oxidante, persulfato de amônio 0,25 M em HCl 1,0 M, e deixou-se que ocorresse a polimerização por 2 horas a 4°C . O compósito resultante foi lavado em água destilada.

4.6.1.3- Fotoquímica

Este processo foi feito de acordo com o procedimento desenvolvido por Barros et al. (2003). A uma solução de nitrato de prata 0,5 M adicionou-se igual volume de uma solução de anilina 0,5 M em ácido nítrico 1,0 M. A solução resultante foi passada através de uma membrana Whatman (ANODISC 0,2 μm) e esta membrana foi tratada com luz ultravioleta, originada por uma lâmpada de mercúrio germicida de 20 W e que emite a 365 nm, por aproximadamente 30 minutos. O compósito resultante foi lavado em água destilada.

4.6.2- Imobilização de peroxidase sobre o compósito AAO-PANI

A ativação do compósito AAO-PANI foi realizada em solução aquosa de glutaraldeído 2,5% p/v durante 2 horas. Em seguida foram realizadas dez lavagens em água destilada e o compósito ativado foi incubado com 3 mL de peroxidase 16 µg/mL (EC 1.11.1.7; de *horseradish*; Sigma) em tampão fosfato pH 6,0 por 16 horas a 4°C. Decorrido esse tempo, o derivado foi então lavado 10 vezes com tampão fosfato e armazenado no mesmo tampão a 4°C até o uso.

4.7- COMPÓSITO DE ALUMINA ANÓDICA E POLIETILENIMINA (AAO-PEI): SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA

Membranas Anodisc (Whatman, Inc., Clifton, NJ) com diâmetros de 25 mm e tamanhos de poros de 0,02, 0,1 ou 0,2 µm foram colocadas em suportes para filtros de seringa (Sartorius) e uma solução de polietilenimina 0,1% (PM ~ 750.000), preparada em tampão fosfato 0,1M pH 8,0, foi passada através da membrana com o auxílio de uma seringa. Em seguida, as membranas assim tratadas foram retiradas do suporte e colocadas em uma solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato pH 8,0. Antes de proceder-se com a imobilização, os compósitos AAO-PEI foram lavados dez vezes com tampão. Uma variação desta técnica, para obtenção do derivado chamado PG-membrana, consistiu em juntar volumes iguais das soluções de PEI 0,1% e glutaraldeído 2,5% e depois fazer a mistura resultante circular através da membrana. Este compósito foi utilizado na próxima etapa sem tratamentos/lavagens adicionais. Para imobilização adicionou-se 3,0 mL de uma solução de tripsina 500 µg/mL (EC 3.4.21.4; de pâncreas de suíno; Sigma), preparada no mesmo tampão, às membranas e incubou-se por aproximadamente 16 horas a 4°C. Decorrido esse tempo, os derivados AAO-PEI-tripsina e AAO-PG-tripsina foram lavados 10 vezes e armazenados em tampão a 4°C.

4.8- DETERMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para determinação da atividade da tripsina, os compósitos AAO-PEI-tripsina e AAO-PG-tripsina foram incubados com 3,0 mL de 0,6 mM N- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitro-anilida (BAPNA; Sigma) preparados em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 e o produto liberado (*p*-

nitroanilina) foi monitorado a 405 nm em leitor ótico de microplaca (Bio-rad, model 550). O derivado AAO-PANI-peroxidase foi incubado com 3,0 mL de *o*-fenilenodiamina (OPD; Sigma) contendo H₂O₂ 0,9 M preparados em tampão fosfato 0,1M, pH 6,0, e o produto de oxidação 2,3-diaminofenazina foi detectado a 490 nm.

As atividades dessas enzimas também foram determinadas em fluxo, onde os compósitos foram acondicionados em suportes para filtros de seringa e então acoplados a uma bomba peristáltica que foi responsável pela circulação dos substratos através destes derivados (Figura 19).

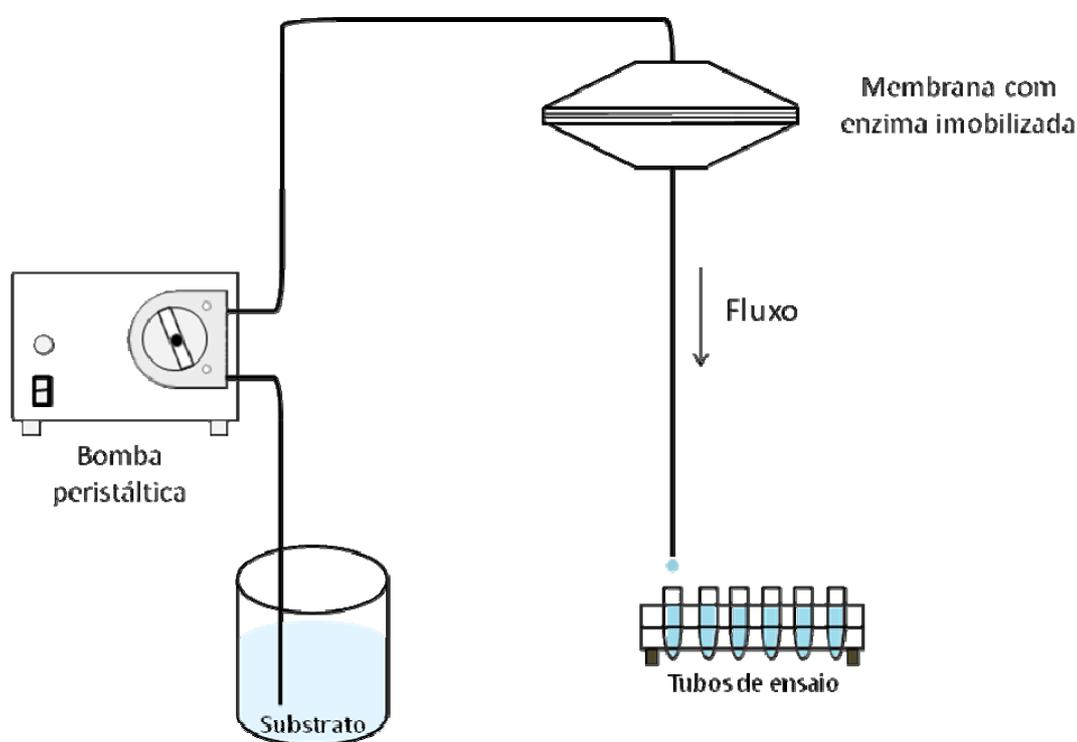


Figura 19: Esquema do sistema montado para determinação das atividades enzimáticas em fluxo. Nos experimentos com recirculação do substrato utilizou-se apenas um recipiente que funcionava como alimentador e coletor. Nos experimentos com fluxo ascendente alterou-se a direção do fluxo no mecanismo da bomba peristáltica.

4.9- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As estruturas microscópicas dos filmes e membranas de alumina anódica e de seus compósitos foram analisadas com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Inicialmente as amostras foram fraturadas, quando necessário, e fixadas ao suporte de cobre ou alumínio através do uso de fita condutora (dupla-face) à base de carbono. Para garantir boa condutividade as amostras foram tratadas com grafite coloidal nas bordas. Em seguida procedeu-se com a metalização. Esta foi feita no metalizador JEOL modelo JFC-1100 com os seguintes parâmetros: corrente contínua de 11 mA, 1,2 kV e pressão reduzida de 0,1 torr durante 4 ou 6 minutos, originando uma camada de ouro de aproximadamente 200 a 300 Å, respectivamente. Após metalização, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM – 5600 LV. Os parâmetros usados durante a análise, em geral, foram: voltagem de 10 ou 20 kV, distância de trabalho entre 8 a 22 mm e abertura do feixe (spot size) de 20 nm.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- SÍNTESE DAS MEMBRANAS DE ALUMINA ANÓDICA

A maioria das anodizações foram executadas de forma a produzir filmes anódicos em ambos os lados da folha de alumínio. Os filmes assim preparados formavam um “sanduíche” com o alumínio residual ao meio. Estes filmes aderidos à folha de alumínio não apresentavam uma característica filtrante, ou seja, poros atravessando toda a sua espessura e abertos em ambas as extremidades.

O protocolo inicial de anodização sofreu várias modificações, dentre elas o tratamento superficial do alumínio antes da anodização. Inicialmente fazia-se um polimento químico, mas este não resultava em uma superfície espelhada como é esperado para um bom polimento. Assim, mudou-se para o polimento eletroquímico. O modo de anodização também foi alterado, pois se trabalhava em modo potencioestático e depois se passou a utilizar o modo galvanostático. As anodizações foram realizadas a temperatura de 4°C em câmara fria. E, embora esse método não impedisse o aumento da temperatura, a mesma manteve-se na faixa de 3 a 9°C. A maior parte dos resultados apresentados é de amostras anodizadas em vasilhas de plástico retangulares, onde se mergulhava os eletrodos e ambos os lados dos mesmos formavam uma camada anódica, produzindo os filmes “sanduíches” (ver esquema da Figura 17). Outra modificação de protocolo foi o desenvolvimento de uma da cuba de anodização apropriada para obtenção de membranas anódicas circulares semelhantes às membranas filtrantes Anodisc. Posteriormente à construção da cuba de acrílico foi possível a anodização de apenas um lado da folha de alumínio e como consequência, a retirada do alumínio residual foi facilitada. Além disso, esta nova cuba acarretou uma homogeneidade maior das amostras produzidas, uma vez que variações em relação ao tamanho da amostra foram eliminadas (ver esquema da Figura 18).

A Figura 20 mostra um filme obtido em ácido oxálico 0,3 M a 27 V por 10 horas sem controle de temperatura. Este filme apresenta uma estrutura em forma de labirinto e de tamanho microscópico, o que indica que o processo de anodização não ocorreu como esperado, ou seja, formando as células hexagonais com poros centrais perpendiculares à superfície do filme como descrito amplamente na literatura. Aspecto semelhante pode ser visto na Figura 21, onde a anodização prolongou-se por 21 horas. Na Figura 21b, em aumento maior, vê-se que este filme adquire uma forma filamentosa semelhante aquela vista em 20c-d. Mais à frente pôde-se observar

que, na verdade, estes filmes sofreram uma dissolução química auxiliada pelo campo elétrico resultando em nanofios ou nanofibrilas de alumina.

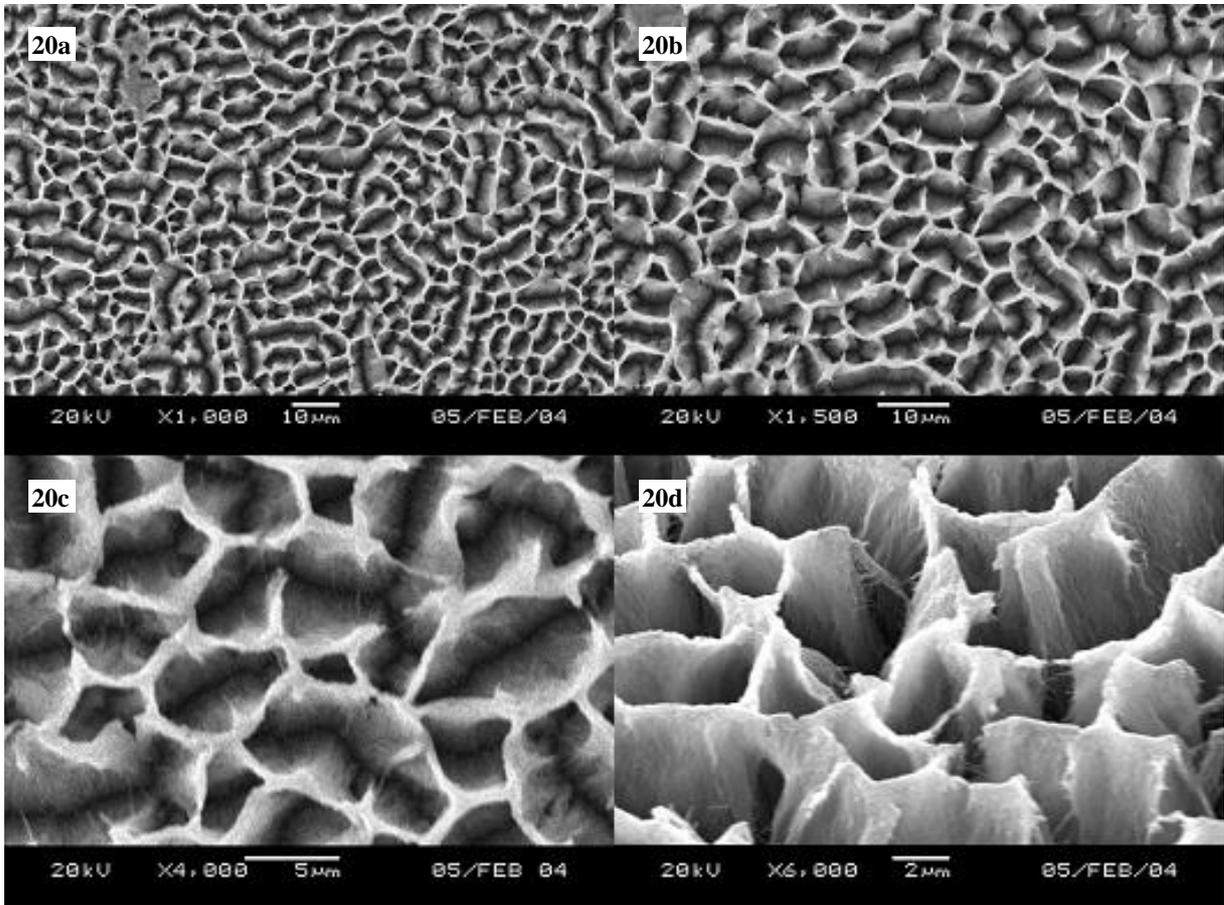
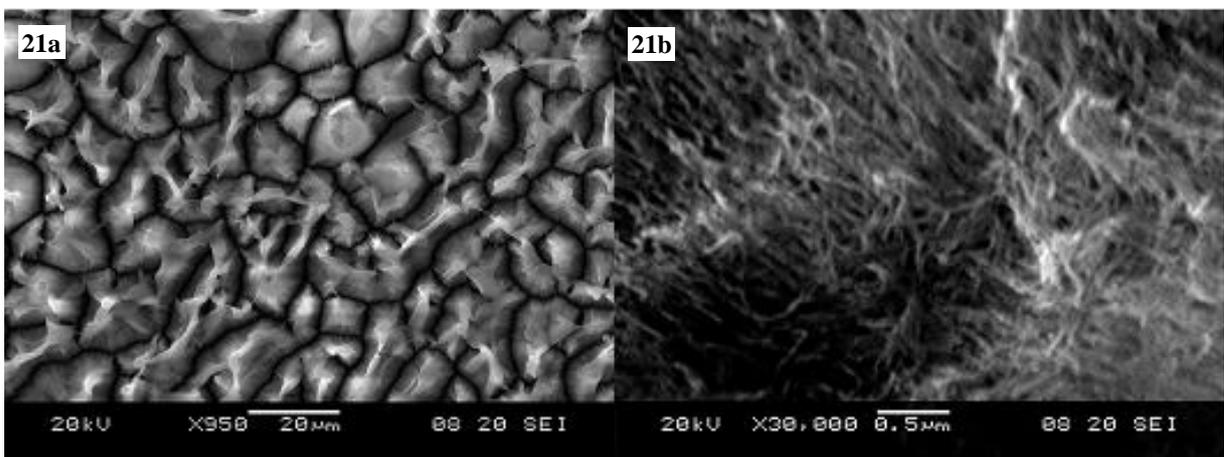


Figura 20: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M a 27 V por 10 horas sem controle de temperatura. As letras ao lado das figuras representam diferentes aumentos.



Figuras 21: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M a 27 V por 21 horas sem controle de temperatura. As letras ao lado das figuras representam diferentes aumentos.

Uma microestrutura similar àquela das Figuras 20 e 21 pode ser visualizada nas Figuras 22a, b e c. No entanto, as primeiras foram polidas quimicamente em uma mistura de ácido fosfórico/sulfúrico, já a amostra cuja micrografia é a Figura 22, foi polida eletroquimicamente em ácido perclórico/etanol. E, embora sua anodização não tenha sido feita com o controle da temperatura do eletrólito, a mesma foi conduzida em banho de gelo, galvanostaticamente e num curto intervalo de tempo. Além disso, a voltagem ficou em torno de 60 Volts ($j = 50 \text{ mA/cm}^{-2}$). Um filme ordenado próximo ao que se buscava é mostrado na Figura 23. A anodização desta amostra também foi feita em banho de gelo sem controle da temperatura, mas à densidade de corrente de 20 mA.cm^{-2} e num tempo ainda menor. A importância do polimento sobre a morfologia dos filmes foi observada por Wu et al. (2002). Eles constataram que os substratos polidos não-eletroquimicamente apresentavam uma estrutura porosa com pequenos domínios ordenados, entretanto, quando o polimento realizado foi o eletroquímico, um arranjo hexagonal quase perfeito pôde ser obtido.

A presença de poros razoavelmente ordenados é também vista nas Figuras 24a e 24b. A Figura 24a apresenta-se um tanto diferente da 24b, pois há algumas regiões destituídas de poros, enquanto que a 24b apresenta-se bem homogênea. Assim, a partir destes dados, pode-se supor que para se obter um óxido poroso, deve-se trabalhar com uma densidade de corrente onde a geração de calor seja reduzida e/ou que a temperatura seja mantida baixa e isto pode ser aliado ao tempo de anodização, ou seja, quando não houver o controle da temperatura a níveis aceitáveis o tempo deve ser reduzido. Bocchetta et al. (2003b) encontraram que a porosidade de membranas preparadas em 0,4 M de H_3PO_4 foi dependente da temperatura, enquanto que em 0,04 M de H_3PO_4 a porosidade foi independente da temperatura. Assim, em 0,4 M de H_3PO_4 entre -1 a 5°C a morfologia da superfície externa foi dependente da temperatura e da densidade de corrente e ambas determinaram a extensão da dissolução química do óxido (Bocchetta et al., 2003a).

Além dos eletrólitos comumente utilizados na anodização outros têm sido propostos. Um exemplo disso pode ser encontrado no trabalho publicado por Tsuchiya et al. (2007). Eles desenvolveram uma nova rota de formação de filmes de alumina anódica utilizando soluções neutras de sulfato de amônio contendo fluoretos. E observaram que a presença do fluoreto é indispensável no banho de anodização, pois sua ausência resultou na produção de filmes irregulares.

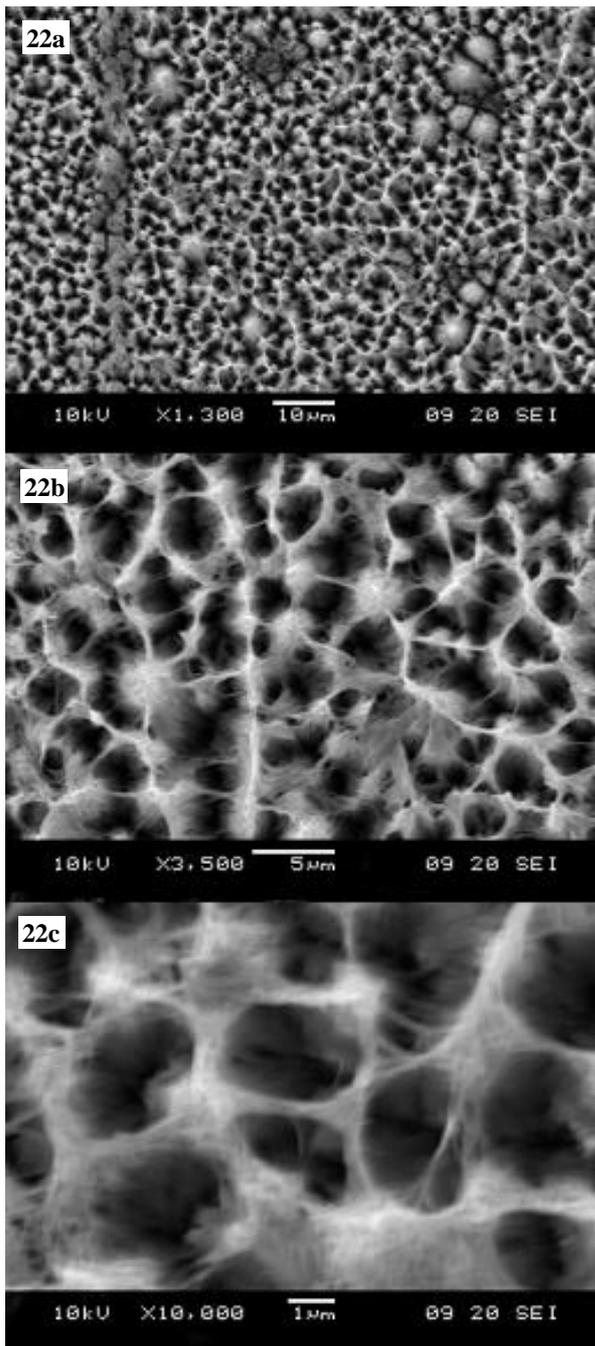


Figura 22: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M sem controle de temperatura. *1^a anodização*, (*j*) = 50 mA/cm² por 20 minutos; *2^a anodização*, (*j*) = 50 mA/cm² por 60 minutos. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As letras ao lado das figuras indicam diferentes aumentos.

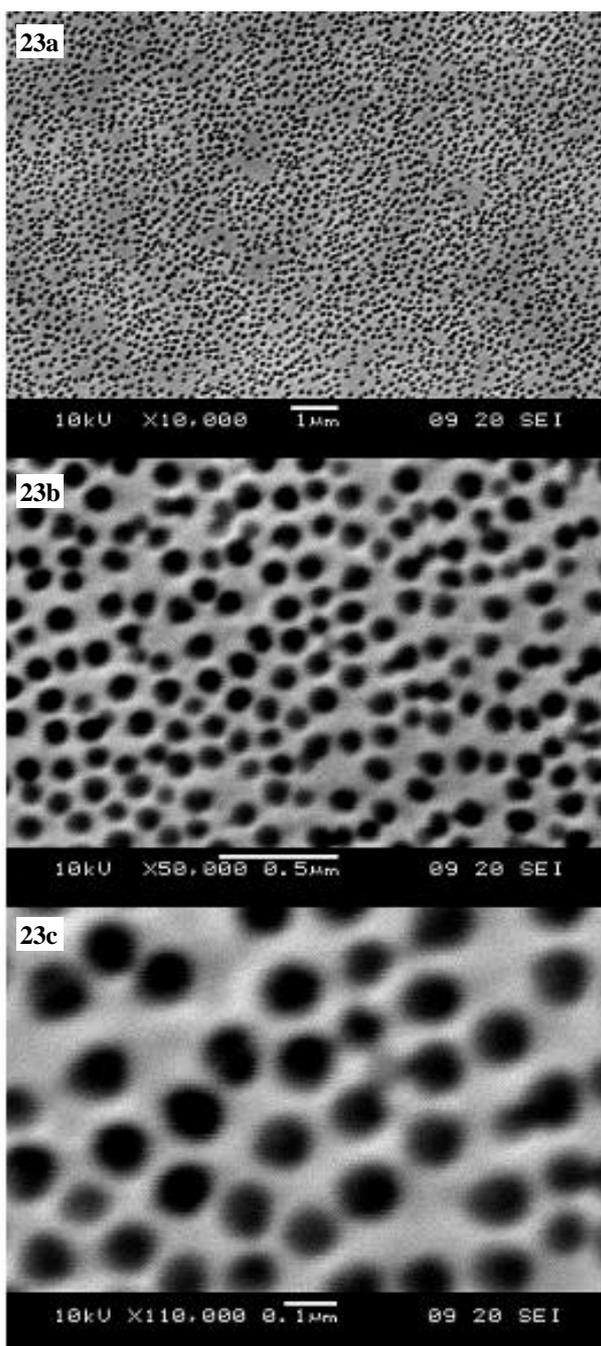


Figura 23: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M sem controle de temperatura. 1^a anodização, (j) = 20 mA/cm² por 30 minutos; 2^a anodização, (j) = 20 mA/cm² por 10 minutos. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As letras ao lado das figuras indicam diferentes aumentos.

As Figuras 25a-h são de um mesmo filme e foram obtidas de regiões distintas e com ampliações diferentes. Em 25a pode-se notar quão irregular é a superfície vista em pequeno aumento, no entanto, em maior aumento, 25b, já se pode ver uma estrutura porosa. As Figuras 25 c-d são regiões próximas ao local onde se fez o corte transversal do filme, elas mostram camadas mais internas expostas após o corte e isto pode ser visualizado melhor na Figura 25d. Estas regiões parecem apresentar uma porosidade maior do que a camada superior, 25d. As Figuras 25

e-f são secções transversais e mostram a estrutura tubular dos poros e como eles se estendem por todo o filme de óxido. Em 25g-h pode-se observar melhor o arranjo dos poros e ter idéia do diâmetro dos mesmos. Com relação à auto-organização dos poros, Masuda & Fukuda (1995) afirmaram que para se obter um arranjo de células idealmente hexagonal deve-se proceder a anodização por longos períodos a zero grau Celsius. As regiões bem ordenadas apareceriam como grandes domínios, enquanto que os defeitos seriam encontrados nas regiões de contato entre estes domínios.

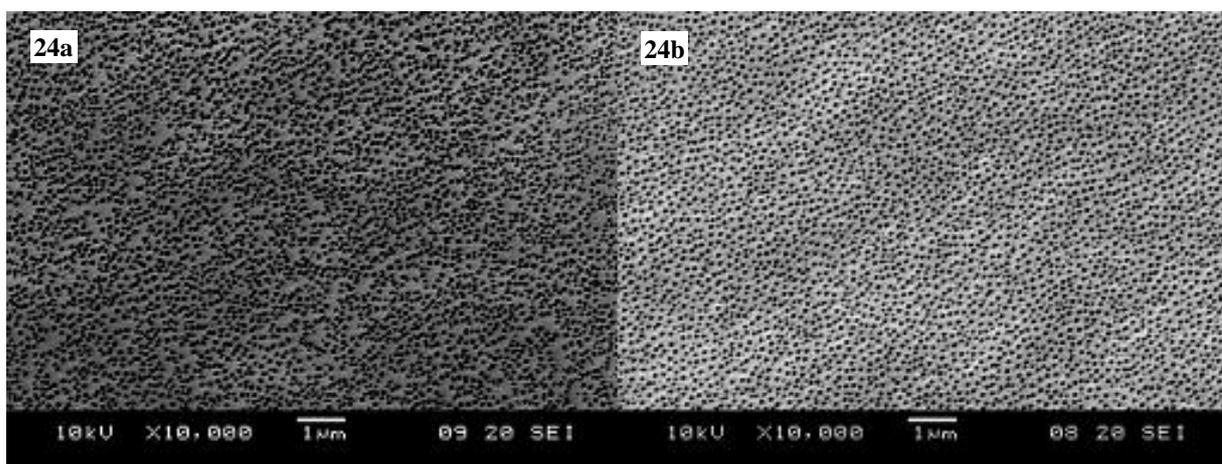


Figura 24: Filmes de alumina anódica formados em ácido oxálico 0,3 M. **a:** sem controle de temperatura; 1ª anodização, (j) = 23 mA/cm² por 60 minutos; 2ª anodização, (j) = 23 mA/cm² por 196 minutos. **b:** temperatura entre 5 a 6°C; 1ª anodização, (j) = 17 mA/cm² por 60 minutos; 2ª anodização, (j) = 17 mA/cm² por 60 minutos. Após cada anodização, as amostras foram submetidas a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos.

A Figura 26 apresenta um filme obtido à voltagem constante. Nota-se na Figura 26d que os poros do mesmo encontram-se interconectados. Contudo, este parece ser um efeito de dissolução apenas superficial durante a anodização e/ou devido ao tratamento com a solução de ácido fosfórico. Pois a Figura 26c, que é um corte transversal do filme, demonstra que os poros permanecem individualizados por toda a extensão da espessura do filme. Este mesmo aspecto do corte transversal é observado na Figura 27, que mostra um filme obtido a 63 volts. Entretanto, ao microscópio eletrônico de varredura não foram delineados poros na sua superfície, possivelmente devido ao seu pequeno diâmetro e conseqüente obstrução pela camada de ouro do processo de metalização.

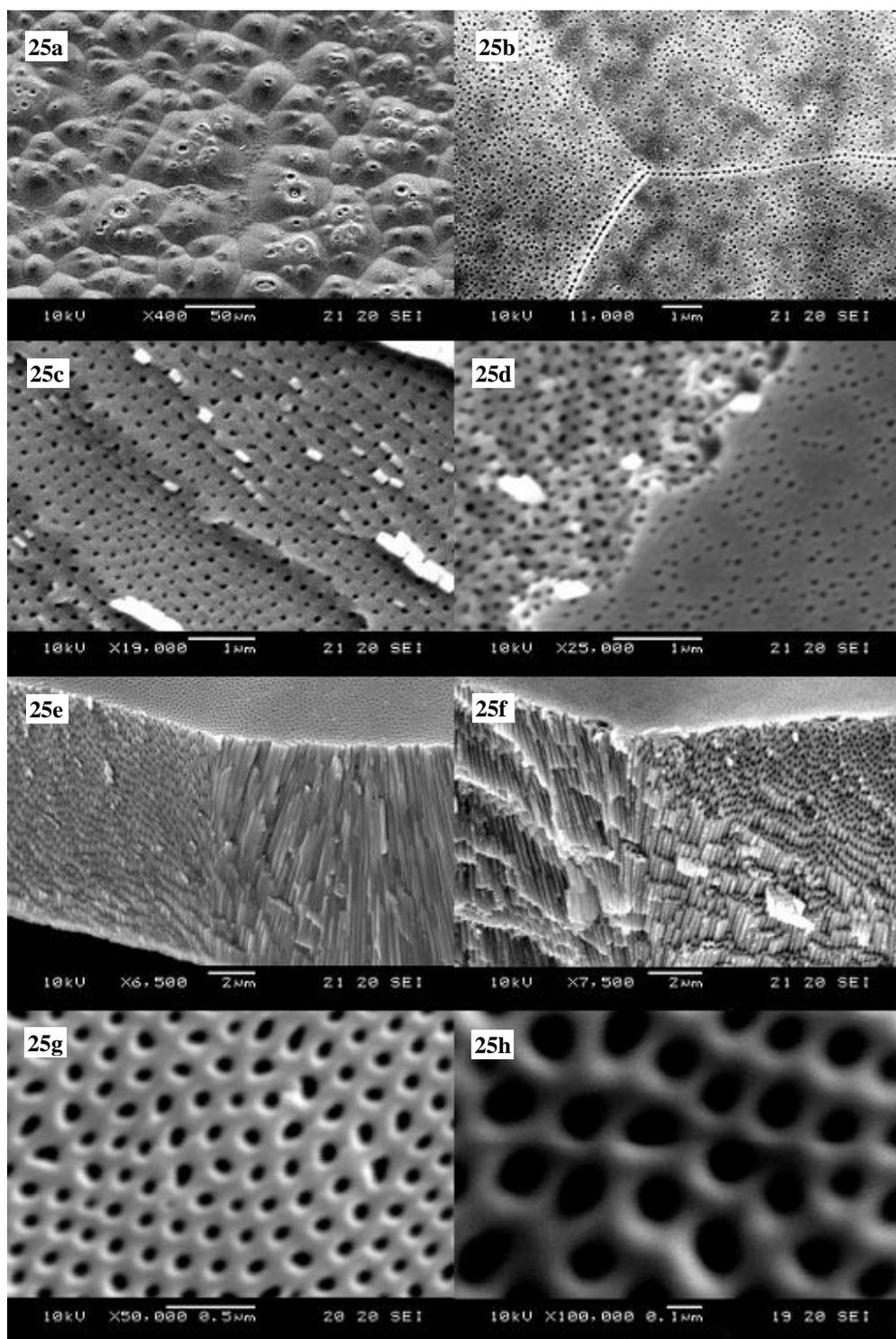


Figura 25: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M. *1^a anodização*, (*j*) = 22 mA/cm² por 120 minutos entre 4 – 9°C; *2^a anodização*, (*j*) = 22 mA/ cm² por 120 minutos a 7°C. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As figuras **25b** e **h** são aumentos de **25a** e **g**, respectivamente; **c**, **d**, **e** e **f** são micrografias de regiões distintas.

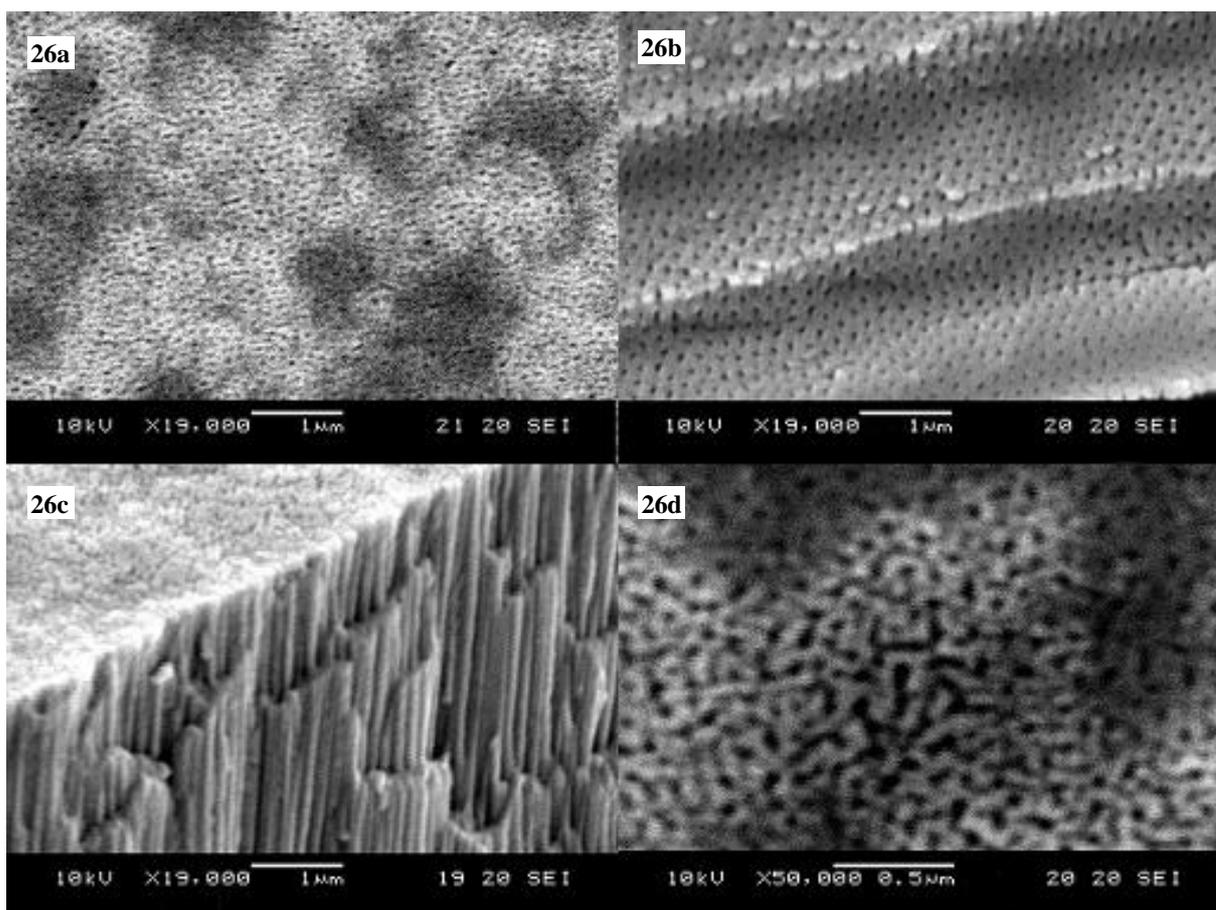


Figura 26: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M. *1ª anodização:* 80 V, 60 minutos e 3°C; *2ª anodização:* 100 V, 60 minutos e 7°C. Após cada anodização, submeteu-se a amostra a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 60 minutos. A figura **26d** é uma ampliação de **26a**; **b** e **c** são de regiões distintas.

Relatos na literatura afirmam que o tamanho dos poros é determinado pela condição de anodização, uma combinação da voltagem, eletrólito e temperatura, e que este ainda pode ser alargado, após a anodização, por dissolução de suas paredes em determinadas soluções de ácidos (Cai et al., 2002).

A anodização em ácido sulfúrico é comumente realizada até 30 volts, pois devido à alta condutividade do eletrólito, seriam necessárias densidades de corrente muito elevadas para se obter maiores diferenças de potencial. As micrografias 28a-e foram obtidas de um mesmo filme, anodizado em ácido sulfúrico 0,5 M à densidade de corrente de 20 mA.cm⁻² e temperatura entre 7 e 8°C. A Figura 28a apresenta uma morfologia semelhante aquelas das Figuras 20, 21 e 22 e pode ter sido originada devido a uma distribuição de corrente não homogênea, levando a uma

dissolução localizada do filme. A Figura 28b é uma visão geral do filme, onde se observam vários pontos brancos sobre a superfície, os quais podem ser óxido de alumínio não dissolvido pelo eletrólito durante a anodização e que permaneceram dentro dos poros ou na sua abertura, obstruindo-os. As Figuras 29 a-b são micrografias de um mesmo filme obtido em duas etapas diferentes: inicialmente a voltagem constante de 25volts e depois a densidade de corrente constante de 10 mA.cm⁻². Neste filme os pontos brancos parecem ser mais numerosos e os poros menores.

A literatura está repleta de descrições de como se conseguir um filme ordenado, entre estas, Cai et al. (2002) relataram que o melhoramento na ordem da estrutura dos nanoporos de filmes de alumina anódica pode ser conseguido pelo recozimento do alumínio, que promove o crescimento da região cristalina, originando após a anodização, amostras com grandes domínios de células hexagonais ordenadas.

Embora a anodização de folhas de alumínio em ambos os lados não produza membranas filtrantes, dois grupos independentes publicaram recentemente trabalhos nos quais a anodização foi conduzida até que virtualmente todo o alumínio foi consumido. A transparência dessas membranas foi dependente da voltagem de anodização, quanto maior a voltagem menor a transmitância. Portanto, o processo de produção de membranas de alumina anódica ainda não está definido e novas técnicas de produção bem como suas finalidades certamente serão descritas (Li & Huang, 2007; Mehmood et al., 2007).

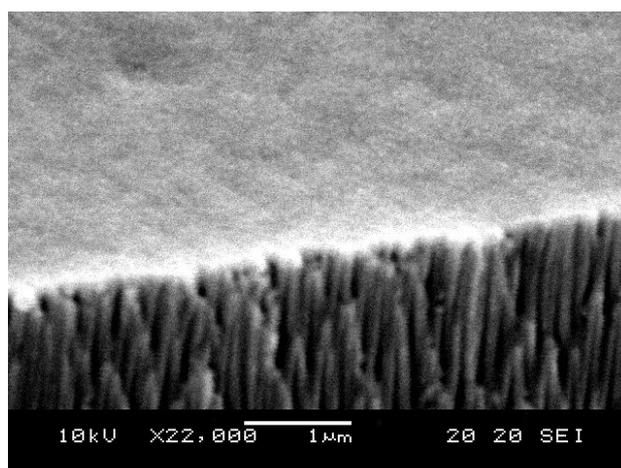


Figura 27: Filme de alumina anódica formado em ácido oxálico 0,3 M. A anodização foi conduzida a uma voltagem constante de 63 V por 120 minutos e à temperatura de 3°C. Em seguida, a amostra foi mergulhada em uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultrassom por 60 minutos.

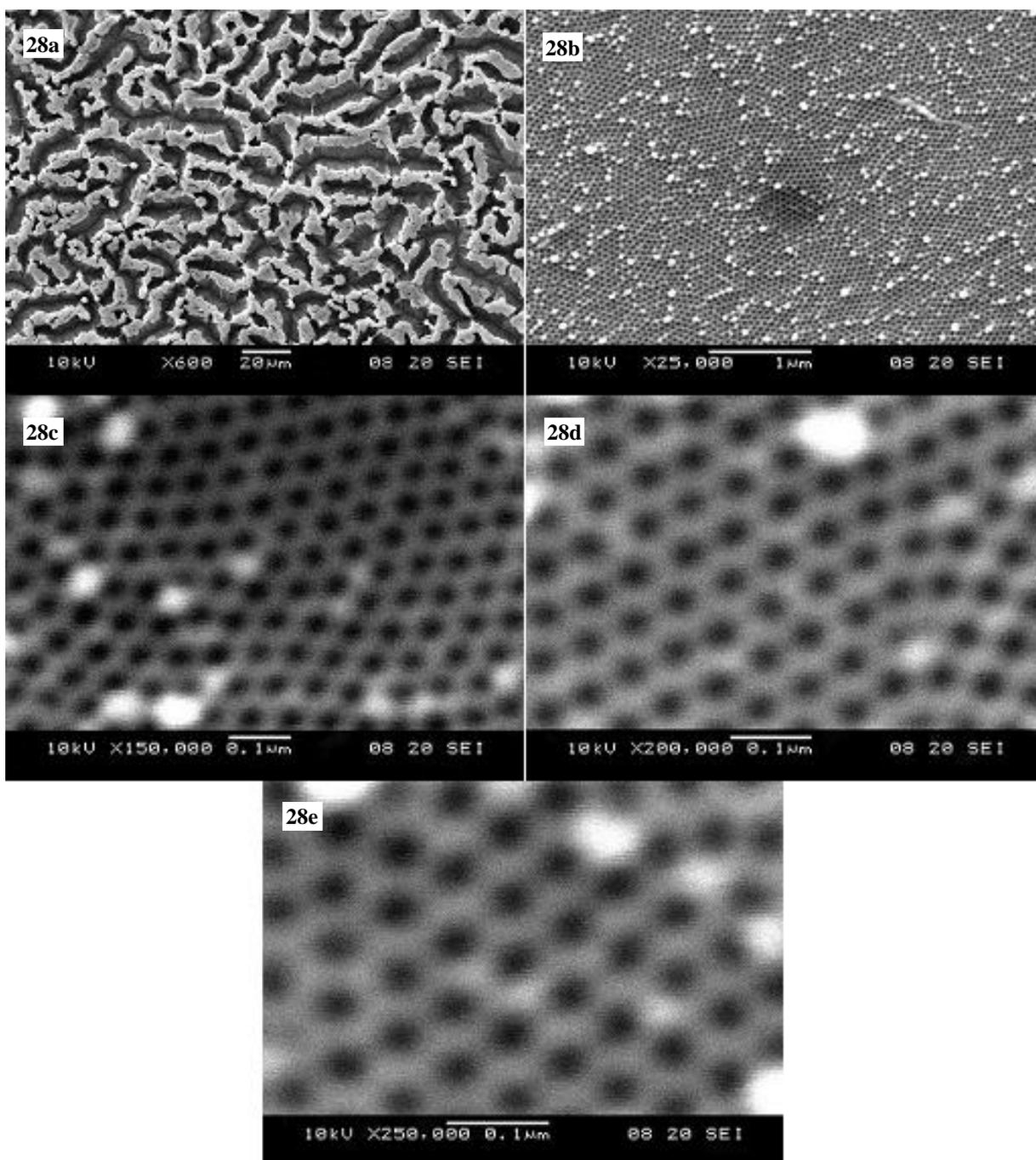


Figura 28: Filme de alumina anódica formado em ácido sulfúrico 0,5 M. 1^a anodização: (j) = 20 mA/cm² por 30 minutos a 8°C; 2^a anodização, (j) = 20 mA/ cm² por 60 minutos, entre 7 – 8°C. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultra-som por 30 minutos. As figuras 28c, d e e são ampliações de 28b; a figura 28a foi obtida de uma região distinta, mas do mesmo filme.

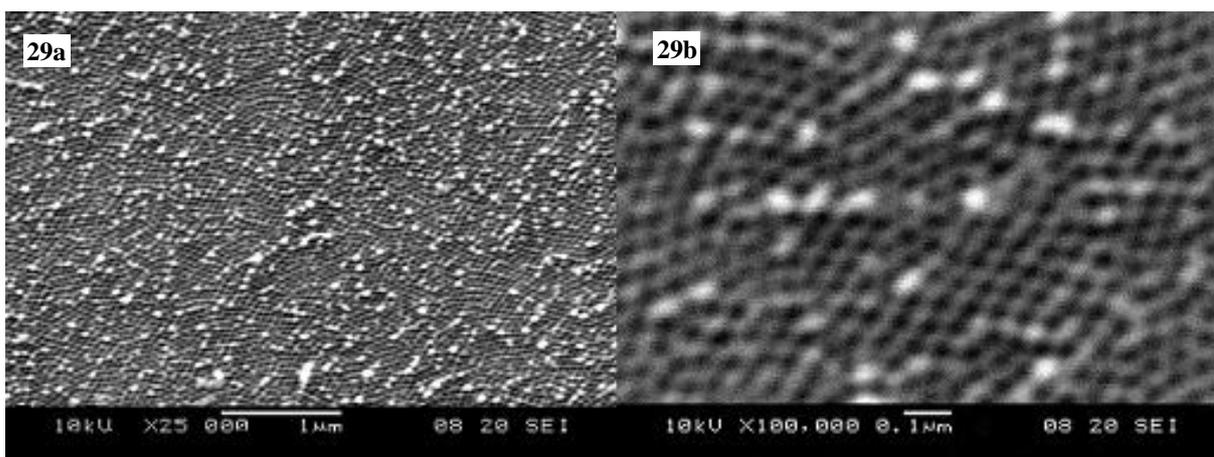


Figura 29: Filme de alumina anódica formado em ácido sulfúrico 0,5 M. 1ª anodização: 25V, 60 minutos entre 6 – 7°C; 2ª anodização, (j) = 10 mA/ cm² por 60 minutos a 6°C. Após cada anodização, submeteu-se as amostras a uma solução de ácido fosfórico 0,3 M em banho de ultrassom por 30 minutos. A figura **29b** é uma ampliação de **29a**.

A Whatman comercializa membranas filtrantes de alumina anódica chamadas de ANODISC, que podem ser encontradas com três porosidades diferentes e poros com diâmetros de 0,2, 0,1 e 0,02μm. As Figuras 30a-d são micrografias da membrana ANODISC com poros de 0,2μm. Como pode ser visto, os poros não têm um formato circular e não há um padrão de células hexagonais. Entretanto, o corte transversal mostrado na Figura 30d confirma a individualidade dos poros.

Na literatura pode-se encontrar informações sobre a transparência das membranas de alumina anódica na região compreendida entre 300 nm e 6000 nm (Foss Jr et al., 1994). Hornyak et al. (1997), determinaram os coeficientes de absorção e os índices de refração de membranas produzidas em ácidos sulfúrico e oxálico. Os coeficientes de absorção para todas as membranas foram um tanto baixos, o que era esperado devido a alta transparência ótica destas membranas. Para membranas obtidas em ácido sulfúrico os coeficientes foram menores e independentes do comprimento de onda, ao passo que para o ácido oxálico eles foram maiores e diminuem com o aumento do comprimento de onda. Já os índices de refração para ambas as membranas foram independentes do comprimento de onda e a média para o ácido oxálico foi de 1,50 e para o ácido sulfúrico 1,54.

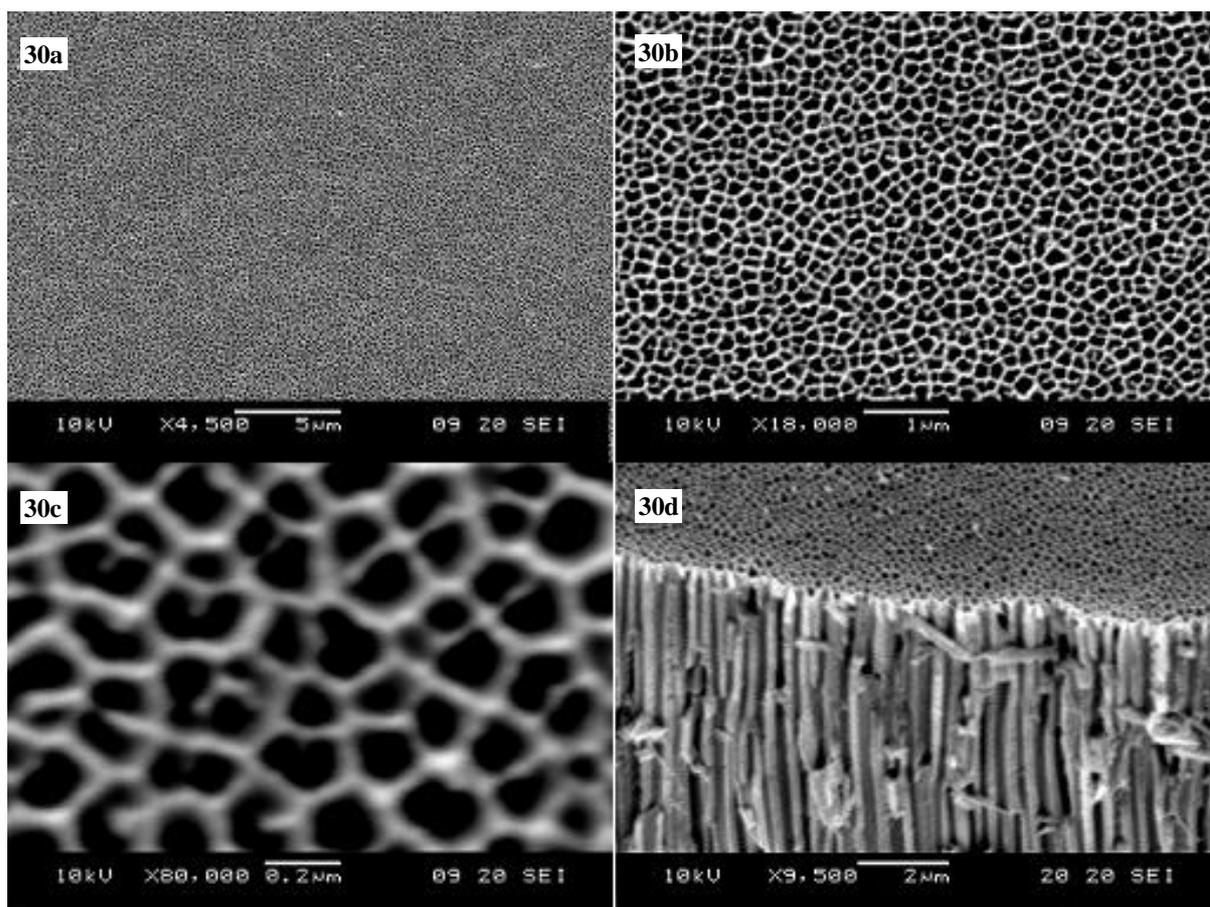


Figura 30: Membrana filtrante ANODISC da Whatman com poros de $0,2\mu\text{m}$ de diâmetro. As figuras **30b** e **c** são ampliações de **30a**; **d** é um corte transversal da mesma membrana.

A Figura 31 mostra membranas de alumina anódica sintetizadas em ácido sulfúrico e em ácido oxálico e também a Anodisc, adquirida da Whatman. Pode-se notar que estas membranas têm boa transparência. A Anodisc tem um aro de polipropileno e as sintetizadas por nós possuem um aro de alumínio. O alumínio circular, que é o ponto de partida na síntese destas membranas, também é mostrado para fins comparativos.

As membranas da Figura 31 possuem um aro de alumínio e elas foram feitas após a descrição da técnica por Zhao et al. (2005). Estas membranas de alumina anódica contendo um aro de alumínio são muito mais resistentes ao manuseio e, portanto, mais adequadas para algumas aplicações. Esta técnica também dispensa o uso de camada protetora no momento da retirada do alumínio residual.

A Figura 32 mostra a superfície e a camada de barreira de uma membrana de alumina anódica, obtida (ver Figura 31 para uma fotografia desta) utilizando a cuba de acrílico projetada

para anodização de apenas um lado do filme de alumínio (Figura 18). A superfície apresenta poros esparsos e pequenos, sem nenhuma regularidade, e a base dos poros apresenta a convexidade característica dessa camada. Contudo, a falta de um arranjo ordenado provavelmente advém do fato de que essa membrana foi obtida sem o polimento da superfície do alumínio.

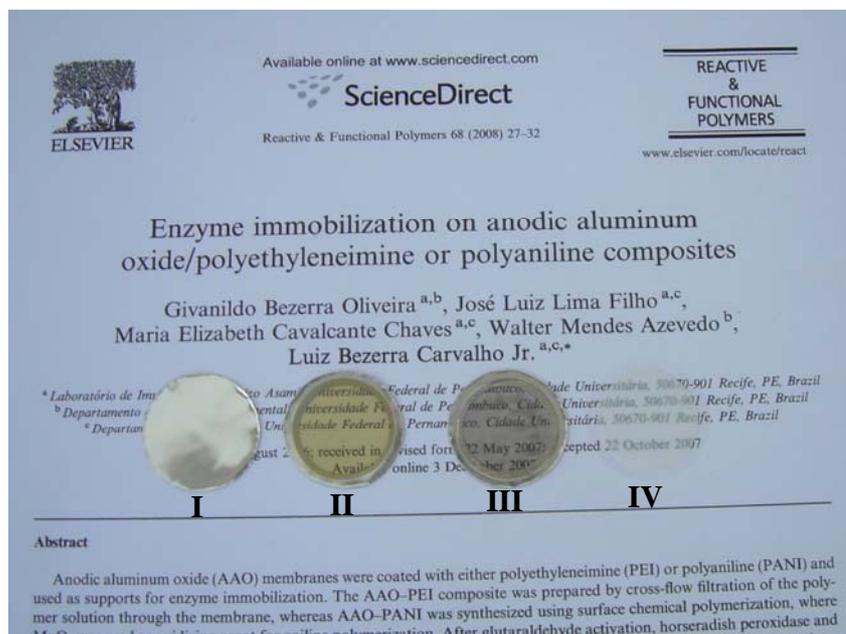


Figura 31: Fotos de membranas de alumina anódica. Da esquerda para direita: alumínio circular (I), membranas obtidas em ácido oxálico (II) e em ácido sulfúrico (III), Anodisc (IV).

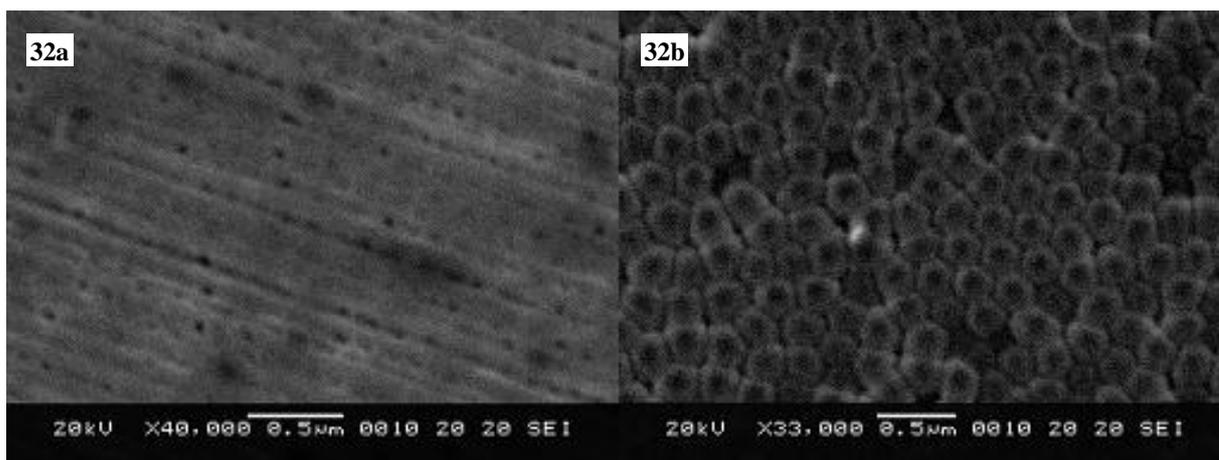


Figura 32: Superfície (a) e camada de barreira (b) de uma membrana de alumina anódica formada em ácido oxálico 0,3 M e densidade de corrente constante de $25 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ por 2 horas a 15°C .

Pode-se concluir, a partir dos resultados experimentais apresentados para a preparação das membranas, que as mesmas não possuem as características ideais desejadas como: regularidade no arranjo poroso e poros vazados em ambos os lados. Portanto, a metodologia carece de ajustes. Contudo, devido a limitações de tempo, não se persistiu com a síntese dessas membranas. Assim, a produção dos compósitos para fins de imobilização de biomoléculas foi feita com as membranas Anodisc.

Há vários protocolos para se obter membranas vazadas com arranjos regulares de poros. Zhao et al. (2005) descreveram que para se obter a alumina anódica porosa altamente ordenada, e com poros vazados de ambos os lados, ela deve ser fabricada usando uma anodização em duas etapas e em apenas um dos lados da folha de alumínio. Processos de pré-tratamento incluindo recozimento e polimento eletroquímico do alumínio não foram necessários, apenas um desgorduramento simples seguido pela remoção do óxido pré-formado foi suficiente para se conseguir uma distribuição simétrica do campo elétrico aplicado durante o processo de anodização e obter poros ordenados.

Lee et al. (2006) inovaram na produção e utilizaram o método da anodização dura (altas voltagens), que é realizado nas indústrias de alumínio. Eles demonstraram que este método leva a um rápido crescimento do filme e este apresentou uma auto-organização semelhante aquela dos filmes obtidos pela anodização suave. Contudo, a anodização dura é acompanhada por uma grande evolução de calor, devido à alta corrente anódica associada com um forte campo elétrico no óxido de barreira. E, como é sabido, o calor excessivo promove a dissolução ácida da membrana pelo eletrólito. Assim, para se trabalhar com este método, faz-se necessário um controle rígido da temperatura. Caso contrário, a anodização prolongada pode levar a um colapso completo da estrutura porosa das membranas de alumina.

Uma inovação na síntese das membranas foi proposta por Bai et al. (2008). Eles propuseram a utilização de alumínio de pureza industrial (99,5%) como substrato de forma a reduzir os custos. Seus resultados são compatíveis com aqueles que utilizaram alumínio de alta pureza. Portanto, isso pode tornar ainda mais atrativa a produção destas membranas industrialmente para elaboração de nanomateriais.

5.2- APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MEMBRANAS DE ALUMINA ANÓDICA

As membranas de alumina anódica têm sido empregadas na construção de uma série de materiais para usos biológicos/biomédicos. Assim, fitas de DNA têm sido imobilizadas, utilizando amino-silanos e glutaraldeído, para detecção e separação/purificação de DNA alvos. A transparência moderada do filme anódico nas regiões ultravioleta e infravermelho permitiu a detecção direta da hibridização do DNA pela absorção sem qualquer modificação no DNA alvo (Vlassiuk et al., 2004).

Estas membranas também têm sido revestidas com polietilenoglicol (PEG) para diminuir a adsorção de proteínas e conseqüentemente o entupimento de seus poros. Esta característica é importante para aplicações em sistemas de liberação de drogas, pois as membranas com PEG imobilizado covalentemente apresentaram uma redução de aproximadamente 70 % na adsorção de proteínas (Popat et al., 2004). Um sistema para liberação de drogas localmente foi demonstrado pelo uso de *stents* revestidos com alumina anódica nanoporosa (Kang et al., 2007).

Nanotubos de polipirrol funcionalizados com heparina têm sido sintetizados utilizando membranas de alumina anódica como moldes, com vistas à produção de superfícies biocompatíveis. Esses nanotubos podem combinar a bioafinidade da heparina com as propriedades elétricas do polipirrol e melhorar o crescimento celular através de estímulos elétricos (Moreno et al., 2008). Também, biocápsulas de alumina nanoporosa podem agir efetivamente como um dispositivo para isolamento imunológico, para manter a viabilidade e funcionalidade de células β encapsuladas (Flamme et al., 2007).

Como pode ser visto, este tipo de membrana tem sido aplicado na elaboração de uma variedade de dispositivos biotecnológicos. Abaixo se descreve a contribuição do presente trabalho nesse campo, que consta da produção de compósitos para imobilização de enzimas.

5.2.1- Caracterização do Compósito AAO-PEI/PG-Tripsina

Para a produção dos compósitos AAO-PEI, utilizou-se uma técnica baseada no uso de um sistema de filtração manual, e que leva ao desenvolvimento de membranas dinâmicas formadas pela deposição de polietilenimina a partir de uma solução diluída sobre as membranas de alumina anódica (AAO).

A polietilenimina (PEI) possui uma alta concentração de grupos aminos e tem sido bem aceita como carreador em vários sistemas de imobilização industrial (Bahulekar et al., 1991). Este polímero é uma poliamina ramificada bem conhecida por suas propriedades de fisissorção e é usualmente ativada por derivatização, antes ou durante a adsorção, para possibilitar a ligação covalente das enzimas. Glutaraldeído, o agente mais comum para promover ligações cruzadas, foi utilizado para reticular a PEI e fornecer os grupos reativos para a imobilização.

A Figura 33 mostra a oclusão dos poros de uma membrana de 0,1 μm após tratamento com uma solução composta de PEI 0,1% e glutaraldeído 2,5% na proporção 1:1 (AAO-PG). Assim, embora esse derivado tenha um bom potencial para imobilização de enzimas, o método de funcionalização AAO-PG elimina a característica mais importante da membrana que são seus poros. Dessa forma, inviabiliza-se o derivado para usos nos quais a porosidade da membrana seja essencial.

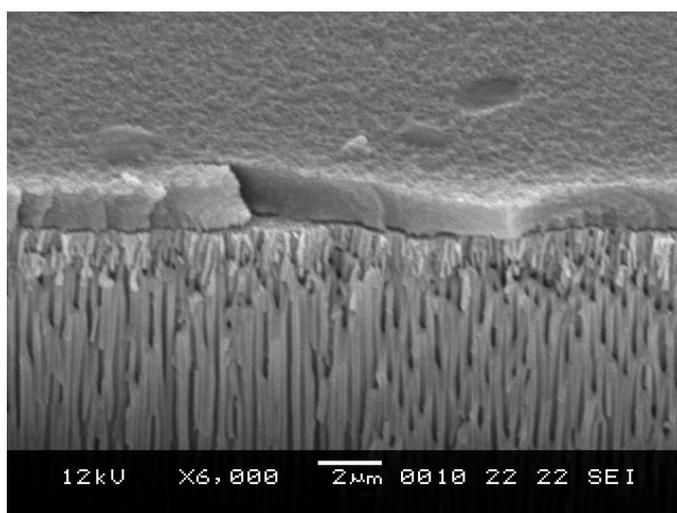


Figura 33- Micrografia eletrônica de varredura da seção transversal de compósito AAO-PG sintetizado com membrana Anodisc com poros de 0,1 μm de diâmetro.

A Figura 34 mostra micrografias eletrônicas de varredura da superfície e da seção transversal do compósito AAO-PEI reticulado com glutaraldeído. Nela pode ser observada a estrutura de poros paralelos e perpendiculares à superfície, que é característica dessas membranas, nota-se ainda que uma camada do polímero recobre a superfície da membrana bloqueando parcialmente os poros da mesma, o que foi evidenciado também pela resistência ao fluxo, mas que foi contornada utilizando-se um fluxo ascendente. Assim, embora o compósito

AAO-PEI também tenha apresentado o bloqueio dos poros, a camada de polímero sobre sua superfície foi menor e, dessa forma, ele foi escolhido para dar continuidade aos experimentos. A atividade da tripsina imobilizada no compósito AAO-PG também foi menor do que a do AAO-PEI (Figuras 35 e 36).

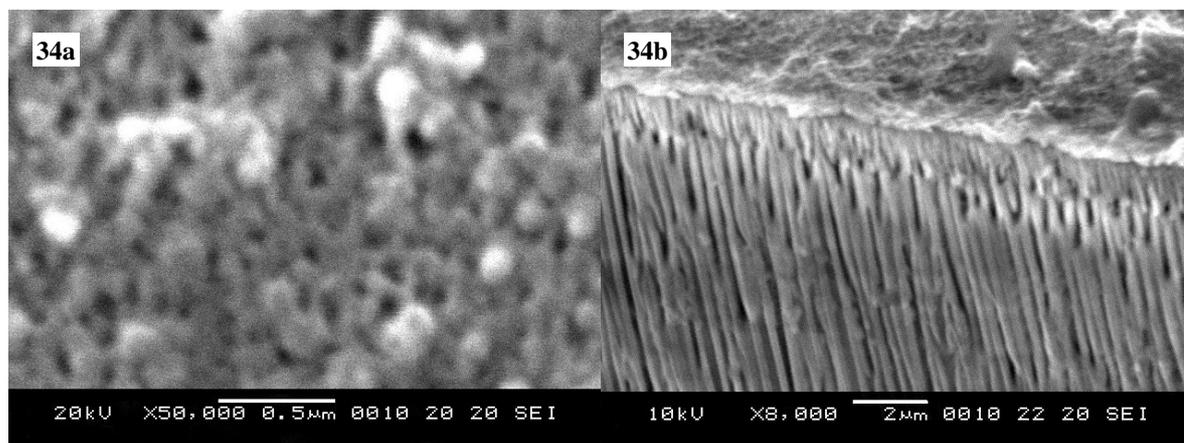


Figura 34: Micrografia eletrônica de varredura da superfície (a) e da seção transversal (b) do compósito AAO-PEI sintetizado com membranas Anodisc com poros de 0,1 μm de diâmetros.

O uso de PEI em conjunto com membranas de alumina anódica tem sido utilizado para outros fins. Dessa forma, um conjunto monolítico de nanobastões de ouro foi crescido pela eletrodeposição em membranas de alumina anódica recobertas com ouro, utilizando PEI como uma camada de adesão. A PEI serviu como camada de adesão não-metálica para a deposição térmica de ouro e para controlar o tamanho e a razão de crescimento no processo de eletrodeposição (Moon & Wei, 2005). Os autores também observaram que houve uma penetração limitada da PEI de alto peso molecular dentro dos poros de AAO devido às restrições difusionais. Contudo, quando foi usado uma PEI de baixo peso molecular e a técnica de filtração sob pressão, este problema foi contornado (Tian et al., 2006). Técnica esta adotada no presente trabalho, mas utilizando PEI de alto peso molecular.

As Figuras 35 e 36 mostram a ação da tripsina imobilizada nos compósitos AAO-PG e AAO-PEI sobre a hidrólise do substrato sintético BAPNA em batelada e a Figura 37 apresenta sua atividade catalítica em reator sob um fluxo de 0,46 mL.min⁻¹ e com recirculação do substrato. A partir destes resultados foram estimadas as velocidades de hidrólise em batelada e em fluxo: 1,28 nmol. min⁻¹, 2,95 nmol.min⁻¹ e 3,80 nmol.min⁻¹ de *p*-nitroanilina, respectivamente.

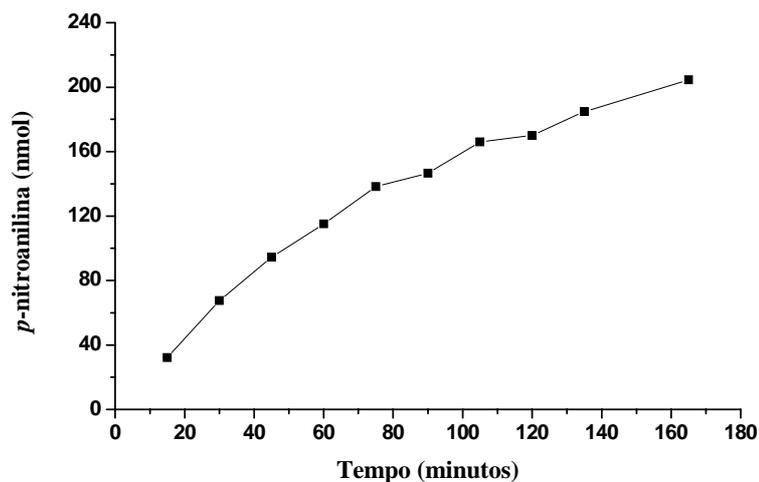


Figura 35: Atividade em batelada da tripsina imobilizada no composto AAO-PG. Experimento realizado em batelada alimentada usando 3mL de solução de BAPNA 600nM e composto AAO-PG sintetizado com uma membrana de tamanho de poro de 0,1 μm . A cada tempo foi retirado 400 μL da mistura reacional e um volume igual de substrato foi adicionado. A *p*-nitroanilina liberada foi medida a 405nm e a quantidade determinada utilizando o coeficiente de absorvidade de $9,1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

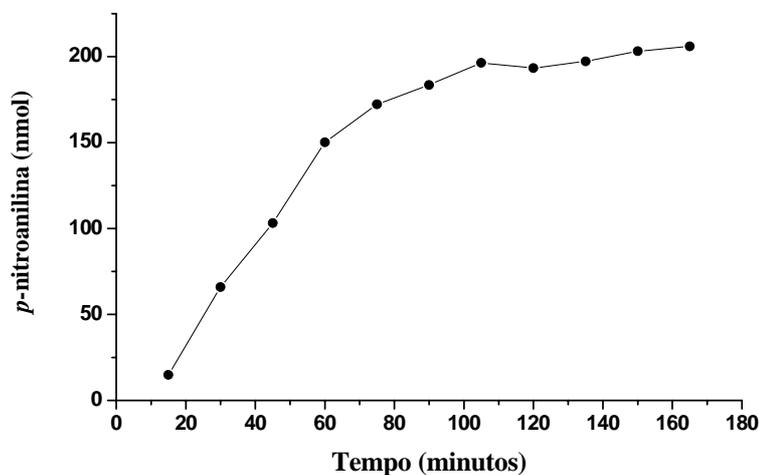


Figura 36: Atividade em batelada da tripsina imobilizada no composto AAO-PEI. Experimento realizado em batelada alimentada usando 3mL de solução de BAPNA 600nM e um composto AAO - PEI sintetizado com uma membrana de tamanho de poro de 0,1 μm . A cada tempo foi retirado 400 μL da mistura reacional e um volume igual de substrato foi adicionado. A *p*-nitroanilina liberada foi medida a 405nm e a quantidade determinada utilizando o coeficiente de absorvidade de $9,1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

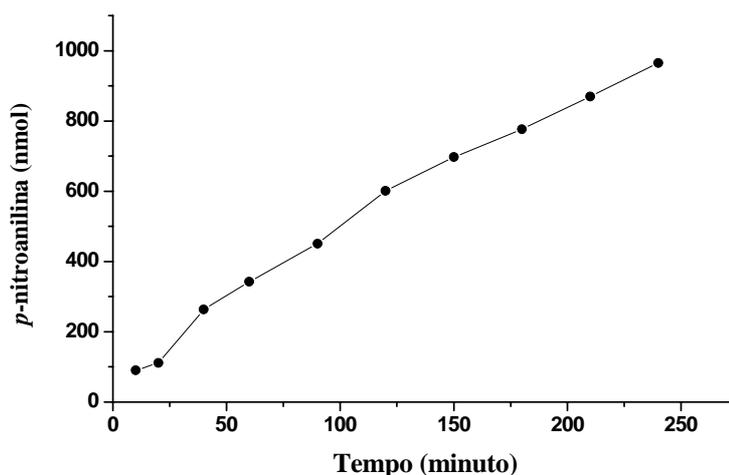


Figura 37: Atividade em fluxo da tripsina imobilizada no compósito AAO-PEI. Experimento realizado em um reator montado com um suporte para filtros de seringa acoplado a uma bomba peristáltica com velocidade $0,46 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (ver Figura 19). Compósito AAO-PEI sintetizado com uma membrana Anodisc com tamanho de poro de $0,1 \mu\text{m}$. 20 mL de BAPNA 600nM foram utilizados para a recirculação e a cada tempo 400 μL da mistura reacional foram colhidos para quantificação conforme descrito na Figura 35.

Na Figura 38 pode ser visto a influência do diâmetro dos poros da membrana sobre a ação da tripsina. O derivado AAO-PEI-tripsina obtido usando membranas com poros de $0,02 \mu\text{m}$, $0,1 \mu\text{m}$ e $0,2 \mu\text{m}$ apresentaram atividades de $0,83 \pm 0,05 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$, $0,96 \pm 0,15 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ e $1,50 \pm 0,06 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Assim, observou-se que a atividade enzimática aumenta com o aumento do diâmetro dos poros, o que claramente reflete a influência da limitação difusional sobre a atividade da tripsina imobilizada.

Lee et al. (2002), descreveram o uso de membranas de alumina anódica para separação enantiomérica de uma droga. Eles imobilizaram um anticorpo específico para um dos enantiômeros da droga e observaram que o coeficiente de seletividade aumentou quando o diâmetro do poro diminuiu.

Ainda na Figura 38, pode-se observar diferenças na atividade apresentada por uma membrana de $0,02 \mu\text{m}$ com ($0,87 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$) e sem revestimento com PEI ($0,28 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$). Como esperado a atividade da tripsina imobilizada por adsorção foi 2,9 vezes menor do que aquela onde se buscou a imobilização covalente. Além disso, é sabido que o método de imobilização por adsorção origina derivados que tendem a perder sua atividade durante o uso por

causa do lixiviamento da enzima, sendo o principal problema deste tipo de imobilização (Takhistov, 2004).

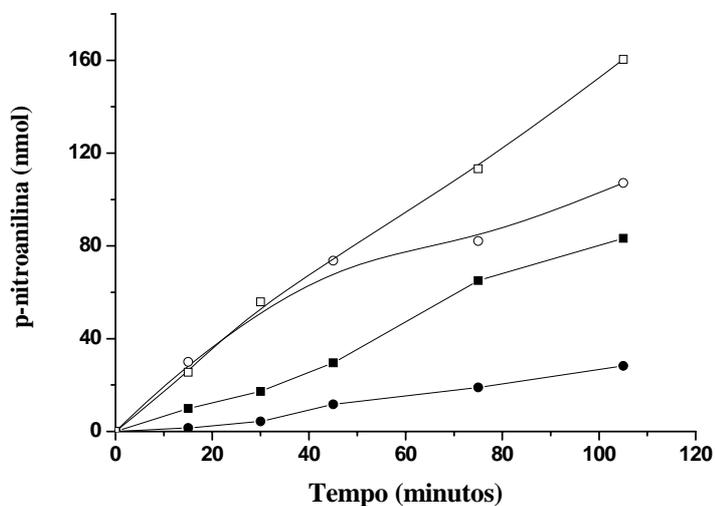


Figura 38: Efeito do diâmetro do poro das membranas na atividade da tripsina imobilizada nos compósitos AAO-PEI. Experimento realizado em batelada usando 3mL da solução de BAPNA 600nM. A cada intervalo de tempo foram retirados 200 μ L da mistura reacional para a determinação do produto gerado. Diâmetro dos poros da membrana: 0,02 μ m com (■) e sem revestimento com PEI (●); 0,1 μ m (○) e 0,2 μ m (□) com revestimento.

Métodos um tanto quanto similares ao desenvolvido nesse trabalho têm sido usados para imobilização de glicose oxidase e urease nessas membranas. Entretanto os autores utilizaram a quitosana ao invés da polietilenimina. Darder et al. (2006) empregaram estas membranas no desenvolvimento de biossensores amperométricos para glicose e estudaram como as dimensões da membrana afetam as qualidades dos biossensores, ou seja, a velocidade de resposta e a faixa de concentração com resposta linear. Eles encontraram que o K_m da glicose oxidase imobilizada foi função tanto do diâmetro do poro quanto da profundidade do mesmo, sendo observado um aumento no K_m com a diminuição do diâmetro e com o aumento da profundidade dos poros. No caso da urease, quatro diferentes protocolos de imobilização foram testados, que variaram de adsorção física a reticulação com quitosana e glutaraldeído. Os efeitos do diâmetro dos poros, da profundidade e dos métodos de imobilização sobre a atividade e estabilidade da urease imobilizada foram analisados. Os resultados mostraram que as enzimas imobilizadas em alumina porosa com diâmetros de poros grandes apresentaram alta atividade e pobre estabilidade quando comparada ao poro de pequeno diâmetro. Também a enzima imobilizada pelo revestimento com

quitosana e reticulação com glutaraldeído exibiu uma boa estabilidade quando comparada aquela imobilizada apenas por adsorção física (Yang et al., 2008).

5.2.2- Caracterização do AAO-PANI-Peroxidase

Compósitos de polianilina com membranas têm sido descritos na literatura. Um exemplo são as membranas comerciais de polipropileno poroso que foram quimicamente modificadas com polianilina, usando o persulfato de amônio como agente oxidante (Piletsky et al., 2003). Os autores observaram que estas membranas apresentaram alta afinidade para proteínas, as quais podiam ser imobilizadas através de adsorção física ou imobilização covalente com glutaraldeído. O último foi responsável por apenas 10% da quantidade de enzimas imobilizadas. Acredita-se que uma carbonila do glutaraldeído possa reagir com o grupo amino do polímero e a outra seria responsável por ligar à enzima. Entretanto, há a possibilidade que o glutaraldeído possa polimerizar dentro da estrutura da polianilina e o derivado seja responsável pelo processo de imobilização (Melo et al., 1999).

Para produção dos compósitos de polianilina e membrana de alumina anódica utilizou-se três estratégias de síntese deste polímero. Inicialmente utilizou-se como agente oxidante o persulfato de amônio, pois este é mais comumente utilizado para síntese de nanotúbulos e nanofibrilas de polianilina dentro dos poros da membrana anódica (Wang et al., 2002; Xiong et al., 2004). Contudo, não se obteve êxito em revestir a membrana de forma que as características porosas se mantivessem (Figura 39a). Assim, tentou-se uma técnica de polimerização fotoquímica desenvolvida por nosso grupo (Barros et al., 2003). Neste método, utiliza-se o nitrato de prata como agente oxidante e a luz ultravioleta como catalisador. Imaginava-se que esse método forneceria melhores resultados, em vistas de não depender da difusão dos reagentes pelos poros, uma vez que a solução do monômero juntamente com o nitrato de prata era introduzida nos poros da membrana usando-se um sistema de filtração. Entretanto a oclusão dos poros tornou a ocorrer, como pode ser visualizado na Figura 39b. Portanto, seguiu-se para uma terceira rota de síntese utilizando o permanganato de potássio como descrito abaixo.

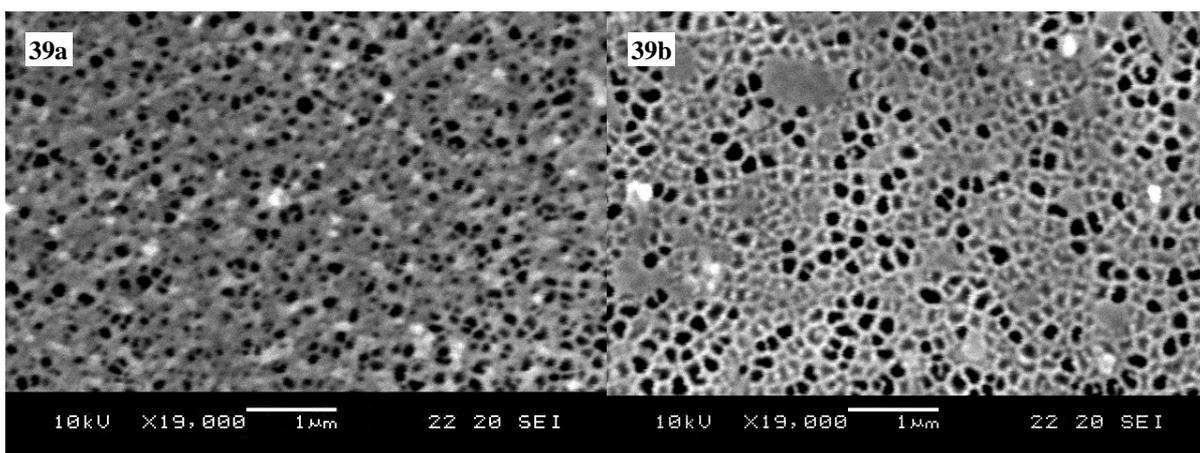


Figura 39: Membranas filtrantes ANODISC da Whatman com poros de $0,2\mu\text{m}$ de diâmetro após: **a)** imersão numa solução de anilina $0,5\text{ M}$ em ácido clorídrico $1,0\text{ M}$ e adição de persulfato de amônio para síntese química de PANI; **b)** passagem por filtração de uma solução composta de anilina $0,5\text{ M}$ em ácido nítrico $1,0\text{ M}$ e nitrato de prata $0,5\text{ M}$ (1:2) e exposição à luz ultravioleta de 365 nm para síntese fotoquímica de PANI

A proposta de síntese utilizando o permanganato é que este oxidaria componentes da membrana, formando uma fina camada de dióxido de manganês sobre a superfície da mesma, a qual oxidaria a anilina originando a polianilina (PANI). Esta metodologia já tem sido usada pelo nosso grupo para síntese de PANI sobre polietilenotereftalato (Coêlho et al, 2001) e tubos de silicone (Nadrusz et al., 1996). Mazeikienė & Malinauskas (1996) também descreveram um método semelhante. Eles depositaram dióxido de manganês eletroquimicamente sobre um eletrodo de platina a partir de uma solução alcalina de permanganato de potássio, e em seguida realizaram a síntese química da PANI, mergulhando o eletrodo recoberto com o agente oxidante em uma solução de anilina em ácido sulfúrico.

A imagem de microscopia de varredura de uma membrana de alumina anódica, disponibilizada na homepage da Whatman, consistindo de um arranjo razoavelmente ordenado de poros é mostrada na Figura 40a. Na Figura 40b é possível visualizar a superfície de uma membrana com poros de $0,2\ \mu\text{m}$ de diâmetro após deposição de polianilina utilizando a metodologia do permanganato de potássio. A deposição de polianilina na membrana pôde ser seguida visualmente pela mudança na coloração da mesma, que é incolor e torna-se verde escura após a reação. Na figura pode ser visto que a porosidade da membrana permanece virtualmente inalterada e nenhuma limitação de fluxo foi observada. Portanto, a funcionalização de

membranas de alumina anódica com polianilina por esta rota de síntese é adequada para produzir compósitos que mantêm as características filtrantes similares à membrana original.

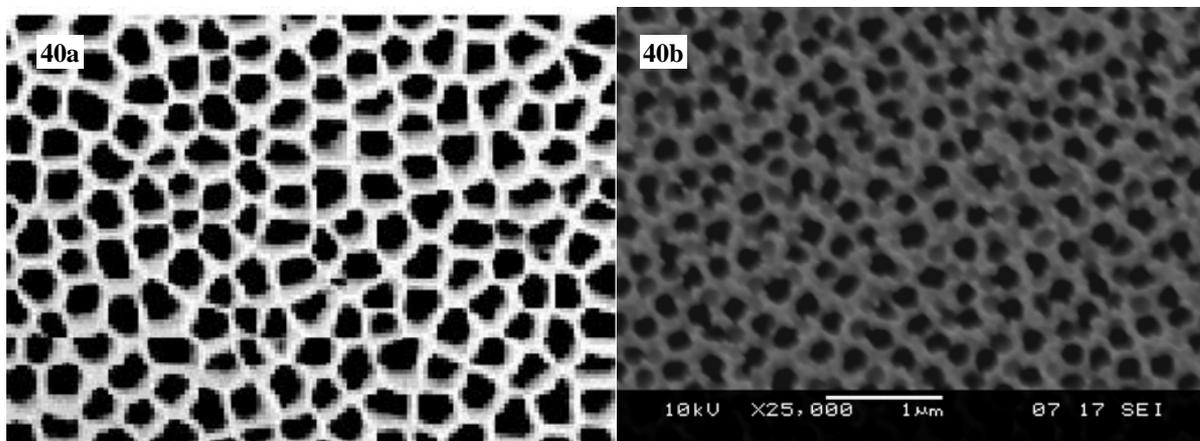


Figura 40: Micrografia eletrônica de varredura da membrana Anodisc obtida da homepage da Whatman (Anopore® membranas inorgânicas) mostrando o arranjo regular dos poros (a) e do compósito AAO-PANI (b) mostrando que o processo de revestimento não afeta a característica em forma de favo de mel da membrana.

A oxidação da *o*-fenilenodiamina (OPD) a 2,3-diaminofenazina (DAP) pelo AAO-PANI-peroxidase foi também estudada em batelada e em fluxo. Na Figura 41 é mostrada a atividade da peroxidase utilizando-se uma solução composta de OPD (13 mM) e H₂O₂ (0,9 mM) numa velocidade de fluxo de 0,28 mL.min⁻¹. Após 24 minutos de catálise contínua o derivado manteve 98% da atividade inicial. Por outro lado, no ensaio em batelada, 74% da atividade foi mantida após 5 ciclos (Figura 42). A *horseradish* peroxidase foi utilizada como enzima modelo para este estudo por que ela é uma enzima bem conhecida pelos biotecnologistas e tem sido imobilizada em vários suportes à base de polianilina (Piletsky et al., 2003; Caramori et al., 2004; Fernandes et al., 2003; Morrin et al., 2003).

Várias das propriedades de polianilina tornam este polímero atrativo como um suporte para oxidorreduções, tais como a fácil reversibilidade dos estados de protonação, a excelente reversibilidade redox, a condutividade e as propriedades eletroquímicas e óticas, juntamente com sua boa estabilidade química (Nadruz et al., 1996). Entretanto, a dificuldade de manipular a polianilina, na forma de um filme fino, é um empecilho para sua aplicação tecnológica. Assim, este novo compósito descrito aqui pode combinar as propriedades da polianilina com as da matriz

hospedeira, permitindo o desenvolvimento de várias configurações de reatores apropriados para processos de separação, catálise e no desenvolvimento de sensores.

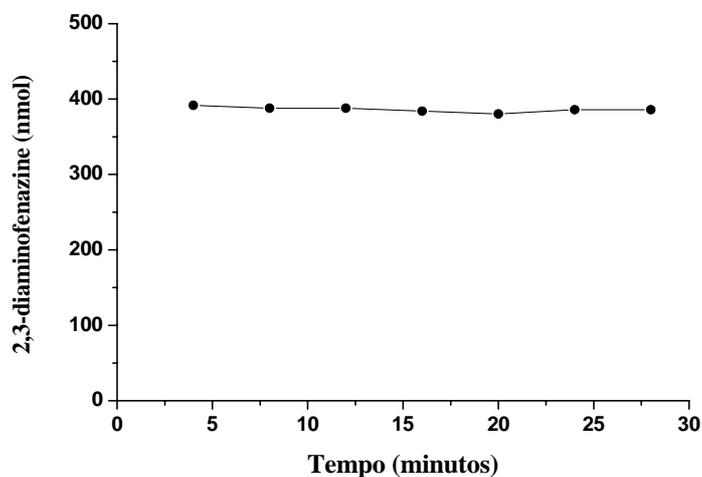


Figura 41: Atividade em fluxo da peroxidase imobilizada em AAO-PANI. Experimento realizado em um reator montado com um suporte para filtro de seringa acoplado a uma bomba peristáltica com velocidade de $0,28 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Dez mililitros de OPD 13 mM acrescidos com 0,333 mL de H_2O_2 28 mM foram circulados pelo compósito e alíquotas de 1 mL foram coletadas para determinação do produto a 490 nm. A 2,3-diaminofenazina produzida foi determinada usando o coeficiente de absorvidade de $1,578 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Romano et al., 2000).

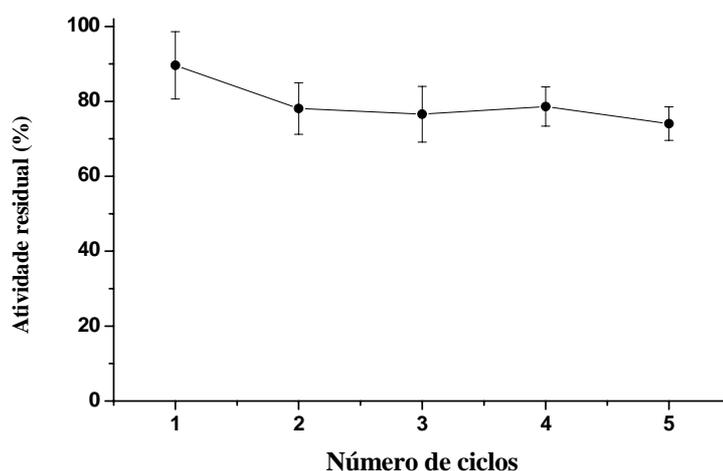


Figura 42: Atividade residual da peroxidase imobilizada em AAO-PANI. Experimento realizado em batelada usando 3 mL de solução de OPD após a adição de 0,1 mL de H_2O_2 28 mM. Depois de cada ciclo da batelada (2 minutos), os derivados foram lavados antes do novo ensaio. A 2,3-diaminofenazina produzida foi quantificada espectrofotometricamente a 490 nm em triplicata.

5.3- SÍNTESE DE NANOFIBRILAS DE ALUMINA

A Figura 43 mostra uma micrografia de uma membrana que foi revestida com PANI pelo método do permanganato e em seguida teve sua superfície lixada com uma lixa d'água 1200, tratada com hidróxido de sódio para dissolução da alumina, para a exposição de possíveis estruturas de PANI formadas no seu interior. O aspecto observado lembra aqueles das nanofibrilas encontradas na literatura (Zhao et al., 2005; Xiong et al., 2004; Wang et al., 2003; Wang et al., 2001). Todavia, essas mesmas estruturas foram observadas nas Figuras 20, 21 e 22. Essa estrutura adquirida pela membrana de alumina anódica após dissolução com álcali requer ainda maiores investigações, entretanto, segue descrição da síntese dessas nanofibrilas.

O experimento cujo resultado é mostrado na Figura 43 tinha por objetivo observar se a deposição de polianilina na membrana levava à formação de nanotubos como descrito na literatura (Wang et al., 2002; Xiong et al., 2004). Ao observa-se a Figura 43, a primeira impressão é que a imagem trata-se de um aglomerado de nanotubos. Sabendo-se que a membrana de alumina anódica é rígida, não se podia esperar que ela origina-se estas estruturas fibrilares e flexíveis. O microscópio eletrônico utilizado para a aquisição dessas imagens não possuía recursos que pudessem ajudar na identificação. Assim, para auxiliar no esclarecimento da imagem, submeteu-se uma membrana sem polianilina às mesmas condições. O resultado é mostrado nas Figuras 44 e 45.

De posse dessas informações, consultou-se a bibliografia e encontrou-se artigos que tratam da produção de nanofibrilas de alumina a partir de membranas de alumina anódica. A fabricação destas fibrilas de alumina tem sido feita através da anodização por longos períodos ou por dissolução química de filmes de alumina (Jagminas et al, 2007).

Portanto, a fabricação de nanofios utilizando moldes de alumina anódica, onde a membrana é dissolvida com hidróxido de sódio para liberar os nanofios, requer especial atenção na caracterização das nanoestruturas visualizadas ao MEV, pois os nanotubos e nanofios de alumina podem induzir a erros de caracterização (Xiao et al., 2002). Assim, diferentes tipos de medidas devem ser realizadas para conferir duplamente a existência dos nanofios desejados. Embora seja algumas vezes difícil focar sobre espécimes pequenos, devido a efeitos de descarga, a técnica de microanálise por espectrometria de energia dispersiva de raios-X (EDXS) pode ser útil (Xiao et al., 2002).

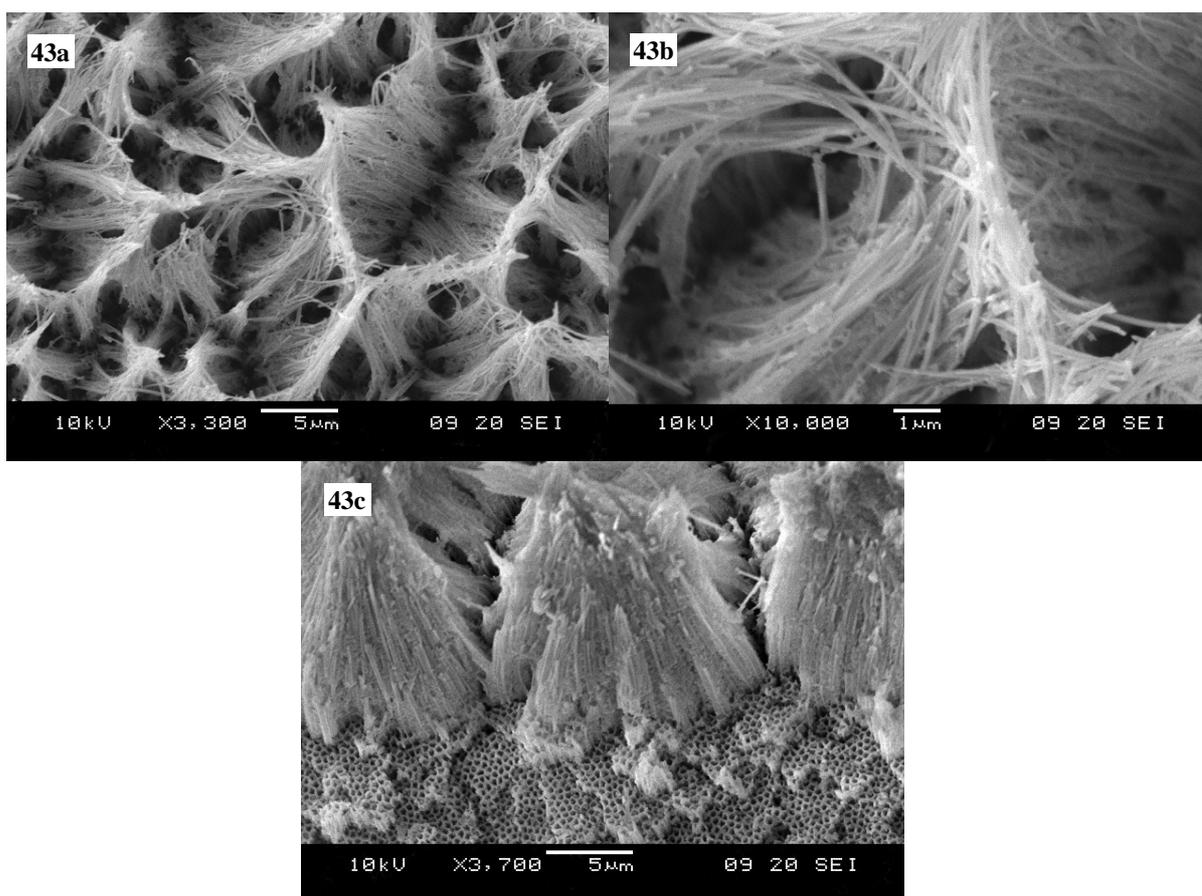


Figura 43: Membrana Anodisc $0,1\mu\text{m}$ após tratamento com KMnO_4 e posterior síntese de PANI, seguida por abrasão de sua superfície com lixa d'água 1200 e tratamento com hidróxido de sódio. A figura **43b** é uma ampliação de **43a**; **43c** foi obtida a partir da região fraturada da membrana.

Han et al. (2007), relataram a estrutura de nanofios de alumina sintetizados pela dissolução com hidróxido de sódio de uma membrana de alumina anódica. Os nanofios obtidos parecem ter uma estrutura formada por 2 camadas de óxido, uma interna, supostamente formada de alumina relativamente pura e uma externa, resultante do processo de dissolução, formada possivelmente de alumina e subprodutos da anodização. Antes da dissolução, a membrana de alumina anódica foi recozida a 650°C para remover grupos hidroxilas. Os nanofios obtidos tinham uma natureza flexível. O mecanismo de formação destes foi explicado pela diferente velocidade de dissolução das várias camadas de óxido da membrana de alumina anódica. Esta dupla camada é corroborada pelo fato das membranas de alumina anódica possuírem uma estrutura dupla, a qual resulta do diferente grau de contaminação por ânion durante o processo de

anodização. A camada interna é conhecida por ser composta de alumina relativamente pura e a camada externa contém outros elementos como carbono e hidrogênio, no caso de anodização em ácido oxálico (Han et al., 2007). Estes dados justificam a formação dos nanotubos se a velocidade de dissolução da alumina pura for muito maior do que aquela da alumina contaminada em uma solução de NaOH (Xiao et al., 2002).

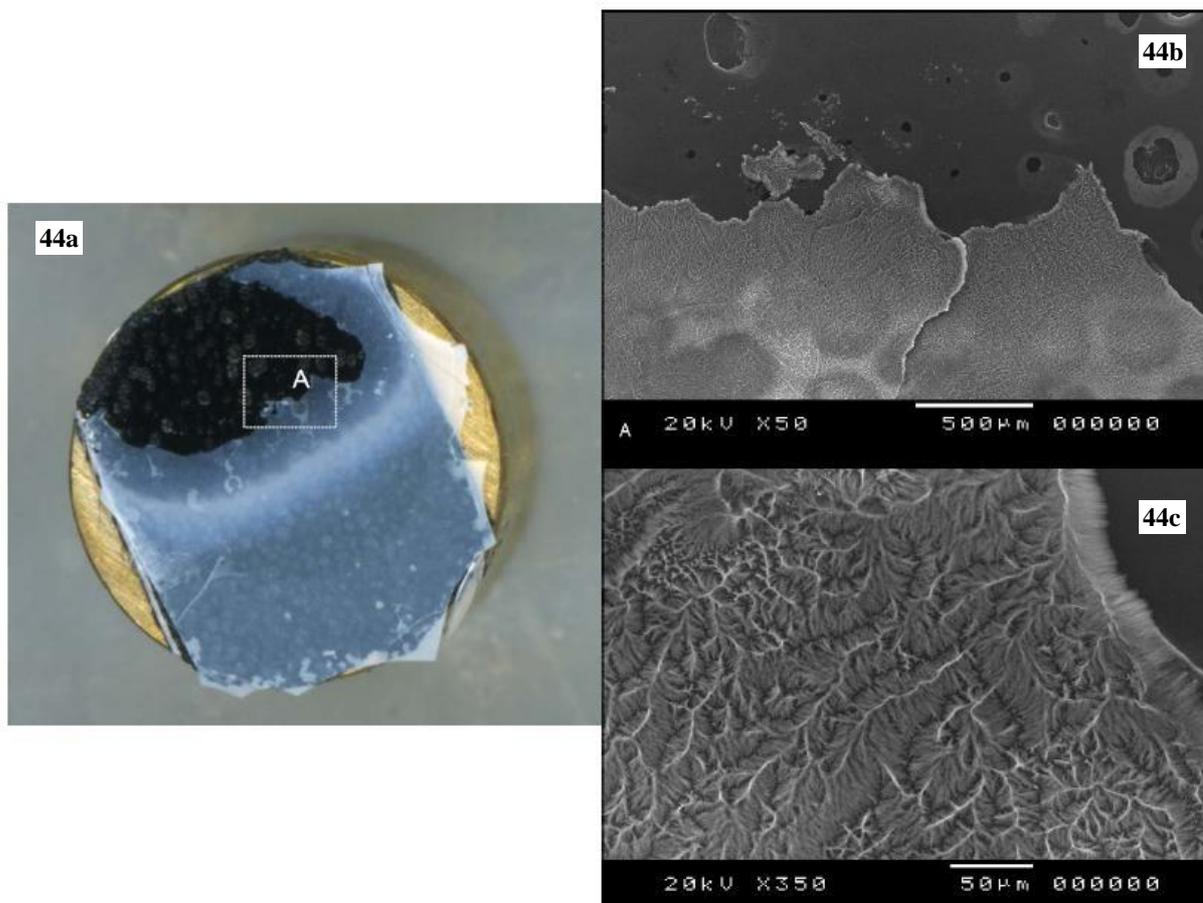


Figura 44: Membrana Anodisc **0,1µm** após abrasão de sua superfície com lixa d'água 1200 e tratamento com hidróxido de sódio. As figuras **44b** e **c** são ampliações de **44a**.

Assim, os resultados da literatura indicam que a dissolução da membrana de alumina começa na superfície e gradualmente espalha-se em direção ao fundo dos poros (Xiao et al., 2002). A presença de feixes de nanofios de alumina, naturalmente formados, indica que eles são criados no curso natural de dissolução, de acordo com a penetração da solução de NaOH na direção de cima para baixo nos poros. A força mais provável que distribui a solução aquosa de

NaOH na membrana é o efeito capilar (capilaridade) e, em contraste com as cerâmicas de alumina convencionais, nanofios de alumina são altamente flexíveis (Han et al., 2007).

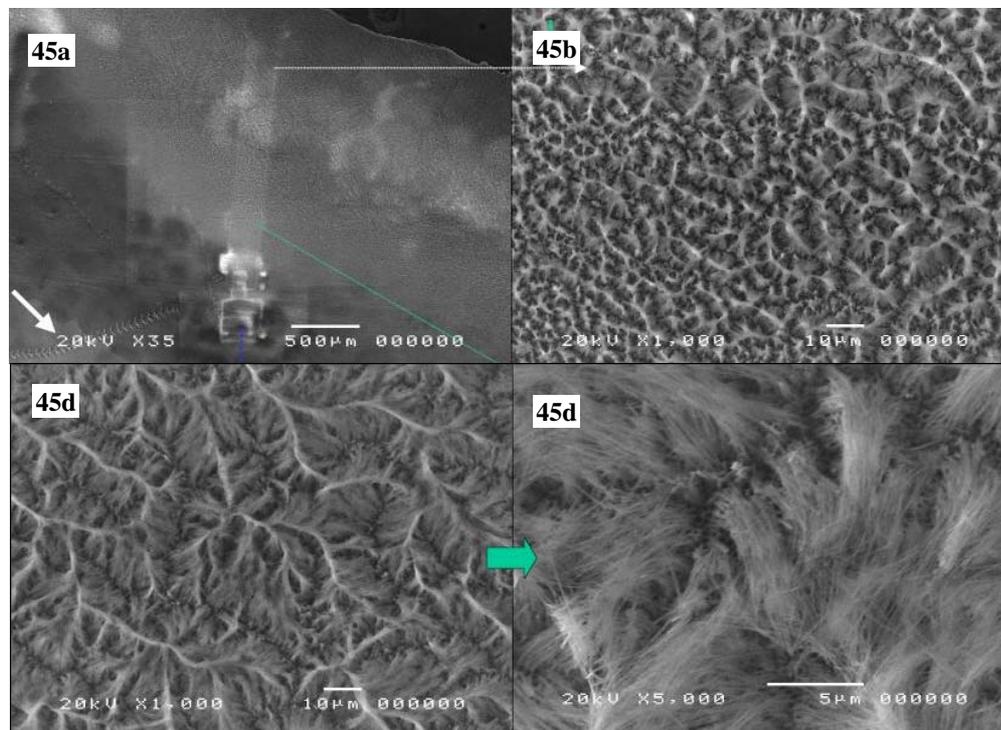


Figura 45: Membrana Anodisc $0,1\mu\text{m}$ após abrasão de sua superfície com lixa d'água 1200 e tratamento com hidróxido de sódio. As figuras 45b, c e d são ampliações de 45a.

6- CONCLUSÕES

- ✓ As anodizações a corrente constante, realizadas após o polimento eletroquímico, resultaram em filmes porosos e estes se apresentaram mais ordenados, com células hexagonais, quando o eletrólito utilizado foi o ácido sulfúrico;
- ✓ Os melhores filmes foram obtidos após polimento eletroquímico e anodização a baixas temperaturas. Assim, os resultados aqui obtidos corroboram os descritos na literatura e apontam que estas sejam as melhores condições para obtenção de filmes com uma estrutura regular;
- ✓ Os compósitos obtidos a partir das membranas Anodisc com os polímeros polianilina e polietilenimina foram adequados à imobilização de enzimas;
- ✓ As membranas funcionalizadas com PANI apresentaram as melhores características relacionadas à manutenção da porosidade;
- ✓ A funcionalização com polietilenimina necessita ser aprimorada para preservar as características nanoestruturadas e filtrantes das membranas;
- ✓ A funcionalização das membranas com os polímeros é essencial para a obtenção de um derivado enzimático estável, pelo menos para o compósito AAO-PEI-tripsina;
- ✓ Os resultados permitem vislumbrar o emprego potencial dos compósitos em campos da biotecnologia como: separações, catálise e produção de biossensores.

7- PERSPECTIVAS

- Sintetizar membranas filtrantes com o aro de alumínio, de forma a conferir maior estabilidade mecânica ao manuseio;
- Aprimorar o processo de síntese dos compósitos de forma a preservar a propriedade filtrante das membranas;
- Imobilizar biomoléculas nestes compósitos com vistas à produção de biossensores;
- Desenvolver nanomateriais para biocatálise e/ou para purificação de biomoléculas a partir dos derivados obtidos pelos procedimentos e/ou técnicas descritos acima.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ASOH, H.; ONO, S.; HIROSE, T.; NAKAO, M.; MASUDA, H. Growth of anodic alumina with square cells. **Electrochimica Acta**, 48: 3171-3174, 2003.

BAHULEKAR, R.; AYYANGAR, N.R.; PONRATHNAM, S. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. **Enzyme and Microbial Technology**, 13: 858-868, 1991.

BAI, A.; HU, C.C.; YANG, Y.F.; LIN, C.C. Pore diameter control of anodic aluminum oxide with ordered array of nanopores. **Electrochimica Acta**, 53: 2258-2264, 2008.

BARROS, R.A.; AZEVEDO, W.M.; AGUIAR, F.M. Photo-induced polymerization of polyaniline. **Materials Characterization**, 50: 131-134, 2003.

BELCA, I.; KASALICA, B.; ZEKOVIC, Lj.; JOVANIC, B.; VASILIC, R. The galvanoluminescence spectra of porous oxide layers formed by aluminium anodization in oxalic acid. **Electrochimica Acta**, 45: 993-996, 1999.

BOCCHETTA, P.; SUNSERI, C.; BOTTINO, A.; CAPANNELLI, G.; CHIAVAROTTI, G.; PIAZZA, S.; DI QUARTO, F. Asymmetric alumina membranes electrochemically formed in oxalic acid solution. **Journal of Applied Electrochemistry**, 32: 977-985, 2002.

BOCCHETTA, P.; SUNSERI, C.; MASI, R.; PIAZZA, S.; DI QUARTO, F. Influence of initial treatments of aluminium on the morphological features of electrochemically formed alumina membranes. **Materials Science and Engineering C**, 23: 1021-1026, 2003a.

BOCCHETTA, P.; SUNSERI, C.; CHIAVAROTTI, G.; DI QUARTO, F. Microporous alumina membranes electrochemically grown. **Electrochimica Acta**, 48: 3175-3183, 2003b.

BREVENOV, D.A.; RAMA RAO, G.V.; LOPEZ, G.P.; ATANASSOV, P.B. Dynamics and temperature dependence of etching processes of porous and barrier aluminium oxide layers. **Electrochimica Acta**, 49: 2487-2494, 2004.

BURTON, S.G. Oxidizing enzymes as biocatalysts. **Trends in Biotechnology**, 21: 543-549, 2003.

CAI, A.; ZHANG, H.; HUA, H.; ZHANG, Z. Direct formation of self-assembled nanoporous aluminium oxide on SiO₂ and Si substrates. **Nanotechnology**, 13: 627-630, 2002.

CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; PERANI, E.; STELLA, C.; RUDAZ, S.; LUBDA, D.; MELLERIO, G.; VEUTHEY, J.-L.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Development of a bioreactor based on trypsin immobilized on monolithic support for the on-line digestion and identification of proteins. **Journal of Chromatography A**, 1045: 99-109, 2004.

CARAMORI, S.S.; FERNANDES, K.F. Covalent immobilization of horseradish peroxidase onto poly (ethylene terephthalate)-poly (aniline) composite. **Process Biochemistry**, 39: 883-888, 2004.

CARAMORI, S.S.; FERNANDES, K.F. The use of poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite for trypsin immobilisation. **Materials Science and Engineering**, 28: 1159-1163, 2008.

CHE, F.-Y.; YAN, L.; LI, H.; MZHAVIA, N.; DEVI, L.A.; FRICKER, L.D. Identification of peptides from brain and pituitary of Cpe^{fat}/Cep^{fat} mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 9971-9976, 2001.

CHEN, Z.; LEI, Y.; CHEW, H.G.; TEO, L.W.; CHOI, W.K.; CHIM, W.K. Synthesis of germanium nanodots on silicon using an anodic alumina membrane mask. **Journal of Crystal Growth**, 268: 560-563, 2004.

CHENGWEI, W.; MENKE, L.; SHANLIN, P.; HULIN, L. Well-aligned carbon nanotube array membrane synthesized in porous alumina template by chemical vapor deposition. **Chinese Science Bulletin**, 45: 1373-1376, 2000.

CHIK, H.; XU, J.M. Nanometric superlattices: non-lithographic fabrication, materials, and prospects. **Materials Science and Engineering R**, 43: 103-138, 2004.

CHONG, K.P. Nanoscience and engineering in mechanics and materials. **Journal of Physics and Chemistry os Solids**, 65: 1501-1506, 2004.

CHU, S.Z.; WADA, K.;INOUE, S.; TODOROKI, S. Fabrication of oxide nanostructures on glass by aluminium anodization and sol-gel process. **Surface And Coatings Technology**, 169-170, 190-194, 2003.

COÊLHO, R.A.L.; SANTOS, G.M.P.; AZEVÊDO, P.H.S.; JAQUES, G.A.; AZEVEDO, W.M.; CARVALHO-JUNIOR, L.B. Polyaniline-dacron composite as solid phase in enzyme linked immunosorbent assay for *Yersinia pestis* antibody detection. **Journal of Biomedical and Materials Research**, 56: 257-260, 2001.

CUI, D.; GAO, H. Advance and prospect of bionanomaterials. **Biotechnology progress**, 19: 683-691, 2003.

DALVIE, S.D.; BALTUS, R.E. Distribution of immobilized enzymes on porous membranes. **Biotechnology and Bioengineering**, 40: 1173-1180, 1992.

DARDER, M.; ARANDA, P.; HERNÁNDES-VÉLEZ, M.; MANOVA, E.; RUIZ-HITZKY, E. Encapsulation of enzymes in alumina membranes of controlled pore size. **Thin Solid Films**, 495: 321-326, 2006.

DE LAET, J.; SCHEERS, J.; TERRYN, H.; VEREECKEN, J. Characterization of aluminium surface treatments with electrochemical impedance spectroscopy and spectroscopic ellipsometry. **Electrochimica Acta**, 38, 2103-2109, 1993.

DE LAET, J.; TERRYN, H.; VEREECKEN, J. Development of an optical model for steady state porous anodic films on aluminium formed in phosphoric acid. **Thin Solid Films**, 320: 241-252, 1998.

DELVAUX, M.; DEMOUSTIER-CHAMPAGNE, S. Immobilization of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 18: 943-951, 2003.

DÍAZ, J.F.; BALKUS Jr, K.J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2: 115-126, 1996.

DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. (Coord.) **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006. 208p.

FERNADES, K.F.; LIMA, C.S.; PINHO, H.; COLLINS, C.H. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. **Process Biochemistry**, 38: 1379-1384, 2003.

FLAMME, K.E.; POPAT, K.C.; LEONI, L.; MARKIEWICZ, E.; TEMPA, T.J.; ROMAN, B.B.; GRIMES, C.A.; DESAI, T.A. Biocompatibility of nanoporous alumina membranes for immunoisolation. **Biomaterials**, 28: 2638-2645, 2007.

FORBES, R.T.; BARRY, B.W.; ELKORDY, A.A. Preparation and characterisation of spray-dried and crystallised trypsin: FT-Raman study to detect protein denaturation after thermal stress. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 30: 315-323, 2007.

FOSS Jr, C.A.; HORNYAK, G.L.; STOCKERT, J.A.; MARTIN, C.R. Template-synthesized nanoscopic gold particles: optical spectra and the effects of particle size and shape. **Journal of Physical Chemistry**, 98: 2963-2971, 1994.

FURNEAUX, R.C.; RIGBY, W.R.; DAVIDSON, A.P. The formation of controlled-porosity membranes from anodically oxidized aluminium. **Nature**, 337: 147-149, 1989.

GÂLCĂ, A.C.; KOUIJ, E.S.; WORMEESTER, H.; SALM, C.; LECA, V.; RECTOR, J.H.; POELSEMA, B. Structural and optical characterization of porous anodic aluminium oxide. **Journal of Applied Physics**, 49: 4296-4304, 2003.

GEKAS, V.C. Artificial membranes as carriers for the immobilization of biocatalysts. **Enzyme and Microbial Technology**, 8: 450-460, 1986.

GUZ, I.A.; RODGER, A.A.; GUZ, A.N.; RUSHCHITSKY, J.J. Developing the mechanical models for nanomaterials. **Composites: Part A**, 38: 1234-1250, 2007.

HAGAN, M.F.; CHANDLER, D. Dynamic pathways for viral capsid assembly. **Biophysical Journal**, 91: 42-54, 2006.

HAN, J.K.; KIM, J.; CHOI, Y.C.; CHANG, K.-S.; LEE, J.; YOUN, H.J.; BU, S.D. Structure of alumina nanowires synthesized by chemical etching of anodic alumina membrane. **Physica E**, 36: 140-146, 2007.

HE, J.H.; WAN, Y.Q., XU, L. Nano-effects, quantum-like properties in electrospun nanofibers. **Chaos Solitons & Fractals**, 33, 26-37, 2007.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate techniques**. California: Academic Press, 1996, 785p.

HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; SMITH, P.K. **Immobilized affinity ligand techniques**. California: Academic Press, 1992, 454p.

HORNYAK, G.L.; PATRISSI, C.J.; MARTIN, C.R. Fabrication, characterization, and optical properties of gold nanoparticle/porous alumina composites: the nonscattering Maxwell-Garnett limit. **Journal of Physical Chemistry B**, 101: 1548-1555, 1997.

HULTEEN, J.C.; MARTIN, C.R. A general method for the preparation of nanomaterials. **Journal of Materials Chemistry**, 7: 1075-1087, 1997.

JAGMINAS, A.; KUZMARSKYTÉ, J.; MALFERRARI, L.; CUFFIANI, M. A new route of alumina template modification into dense-packed fibrilous material. **Materials Letters**, 61: 2896-2899, 2007.

JEONG, S-H.; LEE, K-H. Fabrication of the aligned and patterned carbon nanotube field emitters using the anodic aluminium oxide nano-template on a Si wafer. **Synthetic Metals**, 139: 385-390, 2003.

JESSENSKY, O.; MULLER, F; GOSELE, U. Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina. **Applied Physics Letters**, 72: 1173-1175, 1998.

JIRAGE, K.B.; MARTIN, C.R. New developments in membrane-based separations. **Trends in Biotechnology**, 17: 197-200, 1999.

KALBUS, G.E.; LIEU, V.T.; KALBUS, L.H. A spectrophotometric study of the permanganate-oxalate reaction. **Journal of Chemical Education**, 81: 100-102, 2004.

KANG, H.J.; KIM, D.J.; PARK, S.J.; YOO, J.B.; RYU, Y.S. Controlled drug release using nanoporous anodic aluminum oxide on stent. **Thin Solid Films**, 515: 5184-5187, 2007.

KIM, J.; GRATE, J.W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, 61: 1017-1026, 2006.

KIM, L.; YOON, S.M.; KIM, J.; SUH, J.S. Controllable fabrication of tube-in-tubes using anodic aluminium oxide templates. **Synthetic Metals**, 140: 135-138, 2004.

KORECHÁ, L.; JANKOVICOVÁ, B.; KRENKOVÁ, J.; HERNYCHOVÁ, L.; SLOVÁKOVÁ, M.; LE-NELL, A.; CHMELIK, J.; FORET, F.; VIOVY, J.-L.; BILKOVÁ, Z. Bioaffinity magnetic reactor for peptide digestion followed by analysis using bottom-up shotgun proteomics strategy. **Journal of Separation Science**, 31: 507-515, 2008.

KÜHLBRANDT, W. Bacteriorhodopsin – the movie. **Nature**, 406: 569-570, 2000.

LAKSHMI, B.B.; MARTIN, C.R. Enantioseparation using apoenzymes immobilized in a porous polymeric membrane. **Nature**, 388: 758-760, 1997.

LEE, S.B.; MITCHELL, D.T.; TROFIN, L.; NEVANEN, T.K.; SÖDERLUND, H.; MARTIN, C.R. Antibody-based bio-nanotube membranes for enantiomeric drug separations. **Science**, 296: 2198-2200, 2002.

LEE, W.; JI, R.; GÖSELE, U.; NIELSCH, K. Fast fabrication of long-range ordered porous alumina membranes by hard anodization. **Nature**, 5: 741-747, 2006.

LI, J.; MOSKOVITS, M.; HASLETT, T.L. Nanoscale electroless metal deposition in aligned carbon nanotubes. **Chemistry of Materials**, 10: 1963-1967, 1998.

LI, Z.J.; HUANG, K.L. Electrochemical fabrication of sandwich nanostructures based on anodic alumina. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18: 406-409, 2007.

LU, Y.; LIU, J. Functional DNA nanotechnology: emerging applications of DNazymes and aptamers. **Current Opinion in Biotechnology**, 17: 580-588, 2006.

MAO, C.; FLYNN, C.E.; HAYHURST, A. SWEENEY, R.; QI, J.; GEORGIU, G.; IVERSON, B.; BELCHER, A.M. Viral assembly of oriented quantum dot nanowires. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100: 6946-6951, 2003.

MARCHAL, D.; PANTIGNY, J.; LAVAL, J.M.; MOIROUX, J.; BOURDILLON, C. Rate constants in two dimensions of electron transfer between pyruvate oxidase, a membrane enzyme, and ubiquinone (coenzyme Q₈), its water-insoluble electron carrier. **Biochemistry**, 40: 1248-1256, 2001.

MARDILOVICH, P.P.; GOVYADINOV, A.N.; MUKHUROV, N.I.; RZHEVSKII, A.M.; PATERSON, R. New and modified anodic alumina membranes part 1. Thermotreatment of anodic alumina membranes. **Journal of Membrane Science**, 98, 131-132, 1995.

MARTIN, C.R. Nanomaterials: a membrane-based synthetic approach. **Science**, 266: 1961-1966, 1994.

MASUDA, H.; FUKUDA, K. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. **Science**, 268: 1466-1468, 1995.

MASUDA, H.; NISHIO, K.; BABA, N. Preparation of microporous metal membranes by two-step replication of microstructure of anodic alumina. **Thin Solid Films**, 223: 1-3, 1993.

MASUDA, H.; YAMADA, H.; SATOH, M.; ASOH, H.; NAKAO, M.; TAMAMURA, T. Highly ordered nanochannel-array architecture in anodic alumina. **Applied Physics Letters**, 71: 2270-2272, 1997.

MÁTÉFI-TEMPFLI, S.; MÁTÉFI-TEMPFLI, M.; PIRAUX, L. Characterization of nanopores ordering in anodic alumina. **Thin Solid Films**, 516: 3735-3740, 2008.

MAZEIKIENE, R.; MALINAUSKAS, A. Electrochemical behaviour of polyaniline film polymerized by the use of a chemical oxidation step. **Electrochimica Acta**, 41: 1587-1591, 1996.

MEHMOOD, M.; RAUF, A.; RASHEED, M.A.; SAEED, S.; AKHTER, J.I.; AHMAD, J.; ASLAM, M. Preparation of transparent anodic alumina with ordered nanochannels by through-thickness anodic oxidation of aluminum sheet. **Materials Chemistry and Physics**, 104: 306-311, 2007.

- MELO, J.V.; BELLO, M.E.; AZEVEDO, W.M.; SOUZA, J.M.; DINIZ, F.B. The effect of glutaraldehyde on the electrochemical behavior of polyaniline. **Electrochimica Acta**, 44: 2405-2412, 1999.
- MIERZWA, J.C.; SILVA, M.C.C.; RODRIGUES, L.B.; HESPANHOL, I. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia Sanitária Ambiental**, 13 (1): 78-87, 2008.
- MILES, B.; NYARKU, S.K. The effects of crown ethers on the rate of oxidation of oxalic acid by permanganate ion. **Journal of Chemical Education**, 67: 269-270, 1990.
- MIR, M.; DONDAPATI, S.; VREEKE, M.; KATAKIS, I. Enzymatic self-wiring. **Electrochemistry Communications**, 9: 1715-1718, 2007.
- MITCHELL, D.T.; LEE, S.B.; TROFIN, L.; LI, N.; NENANEN, T.K.; SÖDERLUND, H.; MARTIN, C.R. Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis. **Journal of American Chemical Society**, 124: 11864-11865, 2002.
- MOON, J.M.; WEI, A. Uniform gold nanorod arrays from polyethylenimine-coated alumina templates. **Journal of Physical Chemistry B**, 109: 23336-23341, 2005.
- MORENO, J.S.; PANERO, S.; SCROSATI, B. Electrochemical polymerization of polypyrrole-heparin nanotubes: kinetics and morphological properties. **Electrochimica Acta**, 53: 2154-2160, 2008.
- MORRIN, A.; GUZMAN, A.; KILLARD, A.J.; PINGARRON, J.M.; SMYTH, M.R. Characterization of horseradish peroxidase immobilization on an electrochemical biosensor by colorimetric and amperometric techniques. **Biosensor and Bioelectronics**: 18, 715-720, 2003.
- MOZALEV, A.; MAGAINO, S.; IMAI, H. The formation of nanoporous membranes from anodically oxidized aluminium and their application to Li rechargeable batteries. **Electrochimica Acta**, 46: 2825-2834, 2001.

NADRUZ JR., W.; MARQUES, E.T.A.; AZEVEDO, W.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CARVALHO JR., L.B. Immobilization of xanthine oxidase on a polyaniline silicone support. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 29: 347-350, 1996.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NICOLI, R.; GAUD, N.; STELLA, C.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Trypsin immobilization on three monolithic disks for on-line protein digestion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 48: 398-407, 2008.

OLIVEIRA, I.S.; VIEIRA, C.L.(Coord.). **Física hoje, uma aventura pela natureza: dos átomos ao universo**. Rio de Janeiro: Instituto Ciência Hoje: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 2007. 175p.

ONO, S.; MASUKO, N. Evaluation of pore diameter of anodic porous films formed on aluminum. **Surface And Coatings Technology**, 169-170: 139-142, 2003.

PARPALEIX, T.; LAVAL, J.M.; MAJDA, M.; BOURDILLON, C. Potentiometric and voltammetric investigations of H_2/H^+ catalysis by periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* immobilized at the electrode surface in a amphiphilic bilayer assembly. **Analytical Chemistry**, 64: 641-646, 1992.

PARTHASARATHY, R.V.; MARTIN, C.R. Synthesis of polymeric microcapsule arrays and their use for enzyme immobilization. **Nature**, 369: 298-301, 1994.

PATERMARAKIS, G.; CHANDRINOS, J.; MOUSSOUTZANIS, K. Interface physicochemical processes controlling sulphate anion incorporation in porous anodic alumina and their dependence on the thermodynamic and transport properties of cations. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 570: 59-66, 2001.

PATERMARAKIS, G.; MOUSSOUTZANIS, K.; CHANDRINOS, J. Preparation of ultra-active alumina of designed porous structure by successive hydrothermal treatments of porous anodic Al_2O_3 films. **Applied Catalysis A: General**, 180: 345-358, 1999.

PEDROSO, C.B. Alumínio anodizado colorido: alguns aspectos fundamentais. Tese de mestrado em Física, Instituto de Física Gleb Wataghin, UNICAMP, 1987.

PEREIRA, F.C.; BERGAMO, E.P.; ZANONI, M.V.B.; MORETTO, L.M.; UGO, P. Aplicações de nanoeletrodos como sensores na química analítica. **Química Nova**, 29: 1054-1060, 2006.

PILETSKY, S.; PILETSKA, E.; BOSSI, A.; TURNER, N.; TURNER, A. Surface functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, 82: 86-92, 2003.

POPAT, K.C.; MOR, G.; GRIMES, C.A.; DESAI, T.A. Surface modification of nanoporous alumina surfaces with poly(ethylene glycol). **Langmuir**, 20: 8035-8041, 2004.

PROUX-DELROUYRE, V.; LAVAL, J.M.; BOURDILLON, C. Formation of streptavidin-supported lipid bilayers on porous anodic alumina: electrochemical monitoring of triggered vesicle fusion. **Journal of American Chemical Society**, 123: 9176-9177, 2001.

QIN, D.H.; LU, M.; LI, H.L. Magnetic force microscopy of magnetic domain structure in highly ordered Co nanowire arrays. **Chemical Physics Letters**, 350: 51-56, 2001.

RAHMAN, S.; YANG, H. Nanopillar arrays of glassy carbon by anodic aluminium oxide nanoporous templates. **Nano Letters**, 3, 439-442, 2003.

RAZPET, A.; POSSNERT, G.; JOHANSSON, A.; HALLÉN, A.; HJORT, K. Ion transmission and characterization of ordered nanoporous alumina. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, 222: 593-600, 2004.

REISS, B.D.; FREEMAN, R.G.; WALTON, I.D.; NORTON, S.M.; SMITH, P.C.; STONAS, W.G.; KEATING, C.D.; NATAN, M.J. Electrochemical synthesis and optical readout of striped metal rods with submicron features. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 522: 95-103, 2002.

ROMANO, M.; BARALLE, F.E.; PATRIARCA, P. Expression and characterization of recombinant human eosinophil peroxidase. Impact of the R286H substitution on the biosynthesis and activity of the enzyme. **European Journal of Biochemistry**, 267: 3704-3711, 2000.

RYAN, B.J.; CAROLAN, N.; Ó'FÁGÁIN, C. Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? **Trends in Biotechnology**, 24: 355-363, 2006.

SECHI, S.; CHAIT, B.T. A method to define the carboxyl terminal of proteins. **Analytical Chemistry**, 72: 3374-3378, 2000.

SHEINTUCH, M.; SMAGINA, Y. Nanopore formation dynamics during aluminum anodization. **Physica D**, 226: 95-105, 2007.

SHIMIZU, K.; HABAZAKI, H.; SKELDON, P.; THOMPSON, G.E.; WOOD, G.C. Migration of oxalate ions in anodic alumina. **Electrochimica Acta**, 46: 4379-4382, 2001.

STEIN, N.; ROMMELFANGEN, M.; HODY, V.; JOHANN, L.; LECUIRE, J.M. In situ spectroscopic ellipsometric study of porous alumina film dissolution. **Electrochimica Acta**, 47: 1811-1817, 2002.

STOJADINOVIC, S.; ZEKOVIC, Lj.; BELCA, I.; KASALICA, B.; NIKOLIC, D. The influence of anodizing conditions on the galvanoluminescence spectra of porous oxide films on aluminium formed in phosphoric acid solution. **Electrochemistry Communications**, 6: 708-712, 2004a.

STOJADINOVIC, S.; ZEKOVIC, Lj.; BELCA, I.; KASALICA, B. Galvanoluminescence of oxide films formed by anodization of aluminium in phosphoric acid. **Electrochemistry Communications**, 6: 427-431, 2004b.

STURA, E.; BRUZZESE, D.; VALERIO, F.; GRASSO, V.; PERLO, P.; NICOLINI, C. Anodic porous alumina as mechanical stability enhancer for LDL-cholesterol sensitive electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, 23, 655-660, 2007.

SUH, J.S.; LEE, J.S.; KIM, H. Linearly joined carbon nanotubes. **Synthetic Metals**, 123: 381-383, 2001.

SUI, Y.C.; CUI, B.Z.; MARTINEZ, L.; PEREZ, R.; SELLMYER, D.J. Pore structure, barrier layer topography and matrix alumina structure of porous anodic alumina film. **Thin Solid Films**, 406: 64-69, 2002.

SUI, Y.C.; SANIGER, J.M. Characterization of anodic porous alumina by AFM. **Materials Letters**, 48: 127-136, 2001.

SULKA, G.D.; PARKOLA, K.G. Temperature influence on well-ordered nanopore structures grown by anodization of aluminium in sulphuric acid. **Electrochimica Acta**, 52: 1880-1888, 2007.

SUN, J.; DUFORT, C.; DANIEL, M.C.; MURALI, A.; CHEN, C.; GOPINATH, K.; STEIN, B.; DE, M.; ROTELLO, V.M.; HOLZENBURG, A.; KAO, C.C.; DRAGNEA, B. Core-controlled polymorphism in virus-like particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104: 1354-1359, 2007.

TAJIMA, S. Luminescence, breakdown and colouring of anodic oxide films on aluminium. **Electrochimica Acta**, 22: 995-1011, 1977.

TAKHISTOV, P. Electrochemical synthesis and impedance characterization of nano-patterned biosensor substrate. **Biosensors & Bioelectronics**, 19: 1445-1456, 2004.

TIAN, Y.; HE, Q.; TAO, C.; LI, J. Fabrication of fluorescent nanotubes based on layer-by-layer assembly via covalent bond. **Langmuir**, 22: 360-362, 2006.

TIAN, Y.T.; MENG, G.W.; GAO, T.; SUN, S.H.; XIE, T.; PENG, X.S.; YE, C.H.; ZHANG, L.D. Alumina nanowire arrays standing on a porous anodic alumina membrane. **Nanotechnology**, 15: 189-191, 2004.

TSUCHIYA, H.; BERGER, S.; MACAK, J.M.; MUÑOZ, A.G.; SCHMUKI, P. A new route for the formation of self-organized anodic porous alumina in neutral electrolytes. **Electrochemistry Communications**, 9: 545-550, 2007.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, 65: 249-259, 2004.

VLIASSIOUK, I.; KRASNOSLOBODTSEV, A.; SMIRNOV, S.; GERMANN, M. "Direct" detection and separation of DNA using nanoporous alumina filters. **Langmuir**, 20: 9913-9915, 2004.

WADE, T.L.; WEGROWE, J.E. Template synthesis of nanomaterials. **The European Physical Journal Applied Physics**, 29: 3-22, 2005.

WANG, C.; WANG, Z.; LI, M.; LI, H. Well-aligned polyaniline nano-fibril array membrane and its field emission property. **Chemical Physics Letters**, 341: 431-434, 2001.

WANG, X.; HAN, G-R. Fabrication and characterization of anodic aluminium oxide template. **Microelectronic Engineering**, 66: 166-170, 2003.

WANG, Z.; CHEN, M.; LI, H.L. Preparation and characterization of uniform polyaniline nano-fibrils using the anodic aluminium oxide template. **Materials Science and Engineering A**, 328: 33-38, 2002.

WU, M.T.; LEU, I.C.; HON, M.H. Effect of polishing pretreatment on the fabrication of ordered nanopore arrays on aluminium foils by anodization. **Journal of Vacuum Science and Technology B**, 20: 776-782, 2002.

XIAO, Z.L.; HAN, C.Y.; WELP, U.; WANG, H.H.; KWOK, W.K.; WILLING, G.A.; HILLER, J.M.; COOK, R.E.; MILLER, D.J.; CRABTREE, G.W. Fabrication of alumina nanotubes and nanowires by etching porous alumina membranes. **Nano Letters**, 2: 1293- 1297, 2002.

XIONG, S.; WANG, Q.; XIA, H. Preparation of polyaniline nanotubes array based on anodic aluminum oxide template. **Materials Research Bulletin**, 39: 1569-1580, 2004.

XU, T.; ZHANG, N.; NICHOLS, H.L.; SHI, D.; WEN, X. Modification of nanostructured materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, 27: 579-594, 2007.

YAKOVLEVA, N.M.; YAKOVLEV, A.N.; CHUPAKHINA, E.A. Structural analysis of alumina films produced by two-step electrochemical oxidation. **Thin Solid Films**, 366: 37-42, 2000.

YAMAMOTO, Y.; BABA, N. Nature of the carboxylate species incorporated in anodic alumina films formed in oxalic acid solution. **Thin Solid Films**, 101: 329-338, 1983.

YANG, S.; ZHU, H.; YU, D.; JIN, Z.; TANG, S.; DU, Y. Preparation and magnetic property of Fe nanowire array. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 222: 97-100, 2000.

YANG, S.G.; LI, T.; HUANG, L.S.; TANG, T.; ZHANG, J.R.; GU, B.X.; DU, Y.W. Stability of anodic aluminium oxide membranes with nanopores. **Physics Letters A**, 318: 440-444, 2003.

YANG, Y.; CHEN, H.; MEI, Y.; CHEN, J.; WU, X.; BAO, X. CdS nanocrystallites prepared by chemical and physical templates. **Acta Materialia**, 50: 5085-5090, 2002a.

YANG, Y.; CHEN, H.; MEI, Y.; CHEN, J.; WU, X.; BAO, X. Anodic alumina template on Au/Si substrate and preparation of CdS nanowires. **Solid State Communications**, 123: 279-282, 2002b.

YANG, Z.; SI, S.; DAI, H.; ZHANG, C. Piezoelectric urea biosensor based on immobilization of urease to nanoporous alumina membranes. **Biosensors and Bioelectronics**. 22: 3283-3287, 2007.

YANG, Z.; SI, S.; ZHANG, C. Study on the activity and stability of urease immobilized onto nanoporous alumina membranes. **Microporous and Mesoporous Materials**, 111: 359-366, 2008.

YU, B.; MEYYAPPAN, M. Nanotechnology: Role in emerging nanoelectronics. **Solid-State Electronics**, 50: 536-544, 2006.

YUAN, J.H.; HE, F.Y.; SUN, D.C.; XIA, X.H. A simple method for preparation of through-hole porous anodic alumina membrane. **Chemistry of Materials**, 16: 1841-1844, 2004.

ZANDI, R.; van der SCHOOT, P.; REGUERA, W.; KEGEL, W.; REISS, H. Classical nucleation theory of virus capsids. **Biophysical Journal**, 90: 1939-1948, 2006.

ZHANG, J.; HONG, G. Synthesis and photoluminescence of the $Y_2O_3: Eu^{3+}$ phosphor nanowires in AAO template. **Journal of Solid State Chemistry**, 177: 1292-1296, 2004.

ZHAO, Y.; CHEN, M.; LIU, W.; LIU, X.; XUE, Q. Preparation and self-lubrication treatment of ordered porous anodic alumina film. **Materials Chemistry and Physics**, 82: 370-374, 2003.

ZHAO, Y.; CHEN, M.; XU, T.; LIU, W. Electrochemical synthesis and electrochemical behavior of highly ordered polyaniline nanofibrils through AAO templates. *Colloids and Surfaces: Physicochemical Engineering Aspects*. 257-258: 363-368, 2005.

ZHOU, P.; XUE, D.; LUO, H.; CHEN, X. Fabrication, structure, magnetic properties of highly ordered prussian blue nanowire arrays. **Nano Letters**, 2: 845-847, 2002.

* parte das referências bibliográficas não está contemplada no texto, mas sim na Tabela dos anexos.

ANEXOS

Condições de anodização descritas na literatura

Tipo de Polimento	Eletrólito de anodização	Temperatura (°C)	Galvanostático/ Potenciostático	Tempo (minutos)	Referência
Eletroquímico					
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 1:6	Ácido fosfórico 0,4 M	-1 a 5 °C	160 V (0,2 V.s ⁻¹)	300 a 660	Bocchetta et al., 2003a
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 20 V por 5 min	Ácido fosfórico 0,04 e 0,4 M	-1 a 16 °C	160 V (0,2 V.s ⁻¹)	80	Bocchetta et al., 2003b
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 3 min	Ácido fosfórico 1,0 M	0 °C	160 V		Chik & Xu, 2004
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 1:4 100 mA.cm ⁻²	Ácido fosfórico 0,1-1,25 M	8 a 36 °C	4-12 mA.cm ⁻² (80-140 V)	27 a 133	Stojadinovic et al., 2004a
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 1:4	Ácido fosfórico 0,1 M	10 a 30 °C	2,5-10 mA.cm ⁻²	10	Stojadinovic et al., 2004b
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH (1:4); 20 s	Ácido fosfórico 0,5 M		80 V	120	Wang et al., 2002
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 20 V por 5 min	Ácido oxálico 0,15 M	-1 a 16 °C	70 V (0,2 V.s ⁻¹)	80	Bocchetta et al., 2003b
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH (1:6) 20 V por 5 min	Ácido oxálico 0,15 M	-1 a 16 °C	70 V (0,2 V.s ⁻¹)	80	Bocchetta et al., 2002
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 3 min	Ácido oxálico 0,3 M	0 °C	40 V (2 passos)		Chik & Xu, 2004
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH (1:9); 0 °C	Ácido oxálico 0,3 M	0,2 °C	40 V	5,5	Chen et al., 2004

HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH (1:4) 20 V por 3 min	Ácido oxálico 0,3 M	1 °C	40 V	60 a 300	Razpet et al., 2004
H ₃ PO ₄ , H ₂ SO ₄ , H ₂ O (4:4:2)	Ácido oxálico 0,3 M	1 °C	30-60 V	2880 a 5760	Jessensky et al., 1998
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 1:5	Ácido oxálico 0,3 M	1 °C	60 V	180 a 360	Zhao et al., 2003
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH (1:5); 0,45 A.cm ⁻² por 3 min, 5-15 °C	Ácido oxálico 0,3 M	1-3 °C	40V	600	Zhang &Hong, 2004
70 % v CH ₃ CH ₂ OH, 13,8% v H ₂ O, 10%v 2-butoxietanol, 6,2% v HClO ₄ ; 40 V por 50 s a 10 °C	Ácido oxálico 0,3 M	< 5 °C	40 V	10	Takhistov, 2004
H ₃ PO ₄ /H ₂ SO ₄ (2:3) + 1% glicerol; 75 mA.cm ⁻² por 10 min entre 70 e 80 °C	Ácido oxálico 0,33 M	5 °C	30 V	720	Hornyak et al., 1997
95% v H ₃ PO ₄ (85%), 5 % v H ₂ SO ₄ (97%) e 20 g.L ⁻¹ CrO ₃ ; 20V por 20 s a 84°C	Ácido oxálico 0,44 M	8 °C	40 V	80 a 344	Cai et al., 2002
Ácido acético glacial/ 88% H ₃ PO ₄ 1:1	Ácido oxálico 0,33 M	10-11 °C	2,5-50 mA.cm ⁻² e 10-160 V		Mardilovich et al., 1995
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH (1:5) 20 V por 3 min	Ácido oxálico 0,16 M	15 °C	40-110V	25	Sui et al., 2002
H ₃ PO ₄ /H ₂ SO ₄ concentrados	Ácido oxálico 0,3 M	15 °C	30-50 V		Wang &Han, 2003
	Ácido oxálico 0,3 M	16 °C	6-12 mA.cm ⁻²	15	Belca et al., 1999
	Ácido oxálico 0,04 M	17 °C	80 V	36	Masuda et al., 1997
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH	Ácido oxálico 0,3 M	17 °C	40 V	300 a 1440	Suh et al., 2001

	Ácido oxálico 0,3 M	17 °C	40-60 V	36	Masuda et al., 1997
CrO ₃ /H ₃ PO ₄ (2:8) 0,2 A.cm ⁻² , 8 min	Ácido oxálico 0,4 M	25 °C	18 mA.cm ⁻² (46-47 V)	111	Mozalev et al., 2001
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH	Ácido oxálico 1,00 M	25 °C	5 mA.cm ⁻²		Shimizu et al., 2001
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 1:4	Ácido oxálico ??? M	25 °C	40 V (4-12 mA.cm ⁻²)	720	Wu et al., 2002
	Ácido oxálico 0,3 M	T ambiente	15-50 V	600	Qin et al., 2001
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 0,1 A.cm ⁻² por 4 min; < 10 °C	Ácido oxálico 0,3 M	30 °C	60 V (10-30 mA/cm ²)		Asoh et al., 2003
	Ácido oxálico 0,5 M	30 °C	30 mA.cm ⁻²	60	Yamamoto & Baba, 1983
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 30%:70% 7 V por 4 min	Ácido oxálico 0,3 M		55 V (40-75 V)	1 + 1,5	Rahman & Yang, 2003
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH (1:4); 50s	Ácido oxálico 0,3 M; Ácido sulfúrico 1,2 M	T ambiente	15-45 V	120 a 240	Chengwei et al., 2000
	Ácido sulfúrico 1,2 M; Ácido oxálico 0,3 M		15-50 V	120 a 240	Wang et al., 2001
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 3 min	Ácido sulfúrico 0,5 M	0 °C	25 V (2 passos)		Chik & Xu, 2004
H ₃ PO ₄ , H ₂ SO ₄ , H ₂ O (4:4:2)	Ácido sulfúrico 2,0 M	1 °C	18-25 V	1440 a 2880	Jessensky et al., 1998

H ₃ PO ₄ /H ₂ SO ₄ (2:3) + 1% glicerol; 75 mA.cm ⁻² por 10 min entre 70 e 80 °C	Ácido sulfúrico 1,0M	5 °C	20 V	240	Hornyak et al., 1997
	Ácido sulfúrico 1,0M		15 V	360	
	Ácido sulfúrico 1,7M		10 V	600	
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH	Ácido sulfúrico 0,5 M	10 °C	25 V	720	Kim et al., 2004
HClO ₄ /CH ₃ CH ₂ OH 1:5	Ácido sulfúrico 1,00 M	10 °C	20 V	60	Sui e Saniger, 2001
Químico					
NaOH a quente	Ácido fosfórico 0,4 M	25 °C	1-40 V		Ono & Masuko, 2003
NaOH a quente	Ácido oxálico 0,3 M	30 °C	1-40 V		Ono & Masuko, 2003
2%CrO ₃ + 4,5% H ₃ PO ₄	Ácido oxálico 0,56 M		10 mA.cm ⁻² (30 V)		Yakovleva et al., 2000
NaOH a quente	Ácido sulfúrico 1,5 M	20 °C	1-20 V		Ono & Masuko, 2003
Não citado					
	Ácido fosfórico 0,4 M	0 °C	140 V		Yang et al., 2003
	Ácido fosfórico 1,0 M	4-10 °C	60-150 V	25	Chu et al., 2003
	Ácido fosfórico 0,4 M	15 °C	3,5 mA.cm ⁻²		De Laet et al., 1998
	Ácido fosfórico 0,4 M	20 °C	2 mA.cm ⁻²		Stein et al., 2002
	Ácido fosfórico 0,4 M	25 °C	160 V		Furieux et al., 1989
	Ácido fosfórico 0,4 M		65 V	50	Parpaleix et al., 1992
	Ácido fosfórico 0,87 M		40 V	100	Yang et al., 2002a

	Ácido oxálico 0,3 M	0 °C	26 V	1200	Yang et al., 2000
	Ácido oxálico 0,3 M	0 °C	40 V	9600	Masuda & Fukuda, 1995
	Ácido oxálico 0,4 M	0 °C	60 V		Yang et al., 2003
	Ácido oxálico 0,33 M	0-1 °C	30 V (0,8 mA.cm ⁻²)		Brevnov et al., 2004
	Ácido oxálico 0,22 M	0 e 7 °C	70 e 90 V		Foss Jr. et al., 1994
	Ácido oxálico 0,33 M	0 e 7 °C	40 e 50 V		Foss Jr. et al., 1994
	Ácido oxálico 0,3 M	10 °C	40 V	180	Zhou et al., 2002
	Ácido oxálico 0,3 M	15 °C	40 V	4	Jeong & Lee, 2003
	Ácido oxálico 0,56 M	17 °C	100 V	5	Masuda et al., 1993
	Ácido oxálico 0,3 M	18 °C	25-65 V		Li et al., 1998
	Ácido oxálico 0,33 M	20 °C	40 V	25	Chu et al., 2003
	Ácido sulfúrico 0,4 M	0 °C	28 V		Yang et al., 2003
	Ácido sulfúrico 1,0 M	10 °C	15 V	25	Chu et al., 2003
	Ácido sulfúrico 1,53 M	25 °C	15 mA.cm ⁻²	120	Patermarakis et al., 1999
	Ácido sulfúrico 1,53 M	25 °C	15 mA.cm ⁻²		Patermarakis et al., 2001a
	Ácido sulfúrico 2,2 M	25 °C	21 mA.cm ⁻²		De Laet et al., 1993
	Ácido sulfúrico 3,0 M	T ambiente	15 V	1,2	Gâlcă et al., 2003
	Ácido sulfúrico 1,7 M		40 V	1,5	Yang et al., 2002b