

GERMANNA WILK REIS DE ALMEIDA

TERMODINÂMICA DA BIOFUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS COM NISINA VISANDO
NANOCOMPÓSITOS ATIVOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A447t
2014
Almeida, Germanna Wilk Reis de, 1984-
Termodinâmica da biofuncionalização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com nisina visando nanocompósitos ativos / Germanna Wilk Reis de Almeida. – Viçosa, MG, 2014.
xiv, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.64-72.

1. Termodinâmica de adsorção. 2. Nanotubos de Carbono. 3. Materias nanoestruturado. 4. Peptídeos. 5. Nanotecnologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 541

GERMANNA WILK REIS DE ALMEIDA

TERMODINÂMICA DA BIOFUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE
CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS COM NISINA VISANDO
NANOCOMPÓSITOS ATIVOS


Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

APROVADA: 04 de outubro de 2014.


Nathália Ramos de Melo


Rita de Cássia Superbi de Sousa


Clascídia Aparecida Furtado
(Coorientadora)


Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)


Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio, amor, dedicação e constante sacrifício para me proporcionar as melhores oportunidades. À melhor irmã do mundo, Eliza, por seu amor, amizade, paciência e companheirismo. Motivo de orgulho. Devo tudo a vocês.

A toda minha maravilhosa família, Reis e Almeida, pelo amor, apoio e incentivo constantes. Meu porto seguro. Meu bem maior.

Ao Davi, por estar sempre ao meu lado, tornando os meus dias melhores com amor, carinho, dedicação e paciência, te amo. E a toda sua família, em especial Baffa, Dani e Juninho, por se tornarem parte minha também.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar meus estudos e contribuir para o meu crescimento.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pelas oportunidades, orientação, confiança, amizade e pela competência que sempre nos motiva a seguir em frente. Serei eternamente grata.

Ao professor Luis Henrique, por ter me iniciado ao mundo da físico-química e termodinâmica através de suas disciplinas, inspirando este trabalho. Pela orientação e confiança, o constante apoio e incentivo, amizade e as discussões de ideias, sem as quais este trabalho não se completaria.

À Clascídia por despertar a minha curiosidade sobre as fascinantes nanoestruturas de carbono, e apoiar este trabalho através da sua orientação e discussão de ideias, confiança, atenção e amizade.

À Nathália por estar sempre disponível, pela amizade e por estar me apoiando e participando em mais uma banca. Você me acompanhou desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e agora o doutorado, e sempre foi motivo de inspiração.

À Rita Superbi pela amizade e pronta disposição em participar da banca. Saiba que você também é motivo de inspiração.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira pela grande disponibilidade e atenção na realização das análises de AFM.

Ao Guilherme pela realização dos experimentos no calorímetro e pela grande ajuda na discussão dos resultados. Acho que não teria conseguido explicar tudo tão bem sem a sua ajuda e disposição.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, através da Karla e Gilmar, pela atenção e ajuda nas análises de MET.

A toda equipe do Laboratório de Embalagens, família LABEM, pelo auxílio e pela convivência, boas risadas e pelas novas e verdadeiras amizades que ali surgiram. A todos que já passaram e aos que permanecem, foi muito bom trabalhar com vocês e tenho muito que agradecer: Victor, Johnson, Cícero, Allan, Caio, Geany, Renatinho, Taíla, Paula, Roberta, Cristiane, Ana Clarissa, Hiasmyne, Miriane, Mariana, Eber, Luciano, Daniela, Pedro, Thiago, Gabriel, Carol...e em especial Madê e Laís, pela grande ajuda durante os experimentos, espero ter contribuído um pouco para a formação científica de vocês.

A toda a turma da pós-graduação e grandes amizades que fiz e levarei para sempre, em especial Michelle, Angélica, Jussara...

Ao Fernando pelo auxílio no laboratório, sempre prestativo e aos funcionários do DTA, pela contribuição em vários momentos. Pollyana e Geralda na secretaria da pós. E Perereca e seu filho, sempre nos salvando com os consertos de última hora e com ótimas gargalhadas.

Às amigas de república, atuais e que já se mudaram, mas continuam sempre presentes pela forte amizade, especialmente Bárbara, Amanda, Fernanda, Mayla, Tássia e Ágata.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho. E a todos os professores que contribuíram para a minha formação, o meu título é graças aos ensinamentos de vocês.

Não cabem aqui todos os nomes que gostaria de agradecer por terem feito parte dessa importante fase da minha vida. Peço desculpas àqueles que não estão presentes nestas palavras, mas podem estar certos que fazem parte do meu pensamento e da minha gratidão.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

GERMANNA WILK REIS DE ALMEIDA, filha de Geraldo Magela de Almeida e Maria das Graças Reis de Almeida, nasceu em Itaúna, Minas Gerais, em 24 de outubro de 1984.

Em março de 2004, iniciou o Curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em julho de 2010.

Em agosto de 2010 iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em outubro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
NOMENCLATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Nanotecnologia em Embalagens	3
2.2. Nanotubos de Carbono	4
2.2.1. Funcionalização	7
2.2.2. Funcionalização com proteínas e peptídeos	9
2.3. Peptídeos antimicrobianos	12
2.3.1. Nisina	12
2.3.1.1. Estrutura	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Nanotubos de carbono e peptídeos antimicrobianos	18
3.2. Adsorção	18
3.2.1. Obtenção das isothermas de adsorção em diferentes valores de pH 18	
3.2.2. Quantificação da nisina por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE)	19
3.2.3. Cálculos e equações: modelos de isothermas e parâmetros termodinâmicos de adsorção	20
3.2.4. Microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC)	21
3.3. Obtenção dos bionanocomplexos MWCNT-nisina	23
3.4. Medidas de potencial zeta (ξ)	24
3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	24
3.6. Microscopia de força atômica (AFM)	24
3.7. Atividade antimicrobiana dos complexos MWCNT – peptídeos	25
3.7.1. Culturas bacterianas	25
3.7.2. Ensaio de difusão em ágar	25
3.7.3. Ensaio em solução	25

3.7.4. Delineamento experimental.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Adsorção.....	27
4.1.1. Isotermas de adsorção.....	27
4.1.1.1. Efeito do pH.....	31
4.1.1.2. Ajustes aos modelos matemáticos.....	34
4.1.2. Análise termodinâmica do processo de adsorção	37
4.2. Dispersões de bionanocomplexos MWCNT-nisina	43
4.3. Potencial zeta (ξ).....	47
4.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	50
4.5. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	52
4.6. Atividade antimicrobiana	54
4.6.1. Ensaio de difusão em ágar.....	54
4.6.2. Ensaio em solução.....	58
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração das estruturas de grafeno (a), SWCNT (b) e MWCNT (c). Reproduzido com permissão de Han *et al.*, 2014. 5
- Figura 2.** Ilustração esquemática das estruturas de SWCNTs *zigzag* (A), *chiral* (B) e *armchair* (C). Reproduzido com permissão de Sun *et al.*, 2014. ... 6
- Figura 3.** Possíveis formas de funcionalização para SWCNTs: (A) funcionalização via grupos defeituosos na estrutura do nanotubo; (B) funcionalização covalente; funcionalização não-covalente com (C) surfactantes e (D) polímeros; (E) encapsulamento de substâncias no interior do tubo. Reproduzido com permissão de Hirsch (2002). 8
- Figura 4.** Estruturas primárias das variantes naturais da nisina. O aminoácido que as diferem está marcado com a cor cinza. Adaptado de Reunanen, 2007. 15
- Figura 5.** (I) O peptídeo líder (em cinza) direciona o peptídeo precursor para o mecanismo de modificação e transporte. (II) Os resíduos serina e treonina (destacados em amarelo) são convertidos pela desidratase NisB em dideidroalaninas (dha) e dideidrobutirinas (dhd), respectivamente. (III) Os resíduos desidratados são ligados pela NisC aos resíduos de cisteína (destacados em alaranjado) formando um anel lantionina (A, alaranjado) e quatro anéis metil-lantionina (B-E, vermelho). (IV) O peptídeo precursor modificado é exportado pelo transportador NisT e processado pela protease extracelular NisP, que cliva o peptídeo líder para liberar a nisina em sua forma final. O resíduo de serina na posição 29 não sofre a reação de desidratação. Reproduzido com permissão de Mavaro *et al.* (2011)..... 16
- Figura 6.** Estrutura tridimensional da nisina. Reproduzido de Abts, 2013.... 16
- Figura 7.** Isotermas de adsorção de nisina A (▲) e nisina Z (●) em MWCNT, pH 2 a 25 °C..... 27
- Figura 8.** Isotermas de adsorção em diferentes valores de pH a 25° C para: (A) nisina A e (B) nisina Z. 32
- Figura 9.** Efeito do pH na capacidade de adsorção de nisina em MWCNTs a 25 °C. 32
- Figura 10.** Isotermas de adsorção de nisina A e Z em MWCNTs em diferentes pHs ajustadas com o modelo de Langmuir (A – B) e com o modelo de Freundlich (C – D). 35
- Figura 11.** Dados calorimétricos de ΔH_{ads} em função de Q_e em diferentes valores de pH, a 25 °C, para (A) nisina A e (B) nisina Z. 39

Figura 12. Comparação entre os dados calorimétricos de ΔH_{ads} em função de Q_e das nisinas A e Z em (A) pH 2, (B) pH 3, (C) pH 4 e (D) pH 5, a 25 °C.	40
Figura 13. Dados calorimétricos de ΔH_{ppt} em função da concentração de nisina A e Z.....	42
Figura 14. Fotografia das dispersões dos MWCNTs em solução tampão pH 2 em diferentes concentrações de nisina A (A) e nisina Z (B), após centrifugação.	44
Figura 15. Fotografia das dispersões dos MWCNTs em solução tampão pH 3 em diferentes concentrações de nisina A (A) e nisina Z (B), após centrifugação.	44
Figura 16. Fotografia das dispersões (A) MWCNT-nisA em pH 4; (B) MWCNT-nisZ em pH 4; (C) MWCNT-nisA em pH 5; (D) MWCNT-nisZ em pH 5, em diferentes concentrações dos peptídeos após centrifugação.	45
Figura 17. Potencial zeta das nisinas A e Z em função do pH da solução. .	48
Figura 18. Potencial zeta dos MWCNTs em função da concentração de nisina A (A) e nisina Z (B), em diferentes valores de pH.	49
Figura 19. Imagens de MET das amostras de MWCNTs puros (A – C), e MWCNTs funcionalizados com nisina A, 1 mg·mL ⁻¹ , em pH 2 (D – F), em três diferentes ampliações.	51
Figura 20. Imagens de AFM de MWCNTs puros (A – C), e MWCNTs funcionalizados com nisina (D – F), em três diferentes ampliações. Abaixo de cada imagem, os perfis das seções transversais dos MWCNTs, indicados pelas linhas azuis S1 e S2.....	53
Figura 21. Controle das soluções dispersantes em ensaio antimicrobiano contra <i>Lactococcus lactis</i> : tampão citrato-fosfato em pH 2 (A); tampão citrato-fosfato em pH 3 (B); água deionizada (C).	55
Figura 22. Fotos dos resultados dos ensaios de difusão em meio sólido contra <i>L. lactis</i> : nisina (1); MWCNT-nis (2); MWCNT (3).....	56
Figura 23. Número de células viáveis no controle e amostras tratadas com MWCNTs, funcionalizados ou não com os peptídeos nisina A e nisina Z, após 3 h de incubação a 35 °C.	59
Figura A1. Isotermas de adsorção de nisina A e Z em MWCNTs em diferentes pHs, ajustadas com o modelo de Langmuir (A – B) e com o modelo de Freundlich (C – D).....	74
Figura A2. Fotos dos resultados dos ensaios de difusão em meio sólido contra <i>L. lactis</i> , dispersões em pH 2 (a) e em pH 3 (b): nisina (1); MWCNT-nis (2); MWCNT (3).....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais dos experimentos de ITC	22
Tabela 2. Quantidades máximas adsorvidas de nisina A e Z em MWCNT, em diferentes valores de pH, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	30
Tabela 3. Parâmetros das isotermas de adsorção da nis-A e nis-Z em MWCNT em diferentes valores de pH, para os modelos de Langmuir e Freundlich.....	36
Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos de adsorção da nis-A e nis-Z em MWCNT em diferentes valores de pH.....	37
Tabela 5. Diâmetro médio dos halos de inibição para <i>L. lactis</i>	58
Tabela A1. Contagem de <i>Lactococcus lactis</i> após 3 h de tratamento com MWCNTs, funcionalizados ou não com os peptídeos nisina A e nisina Z, a 35 °C.....	75
Tabela A2. Número de células viáveis no controle e amostras tratadas com MWCNTs, funcionalizados ou não com os peptídeos nisina A e nisina Z, após 3 h de incubação a 35 °C.....	76
Tabela A3. ANOVA halo de inibição.....	77
Tabela A4. ANOVA log de crescimento.....	77

NOMENCLATURAS

C_e	Concentração de equilíbrio
K_L	Constante de equilíbrio de Langmuir
$Q_e (máx)$	Quantidade máxima adsorvida
Q_e	Quantidade adsorvida
ΔG_{ads}^o	Variação da energia livre de Gibbs padrão de adsorção
ΔH_{ads}	Variação da entalpia de adsorção
ΔH_{ads}^o	Variação da entalpia padrão de adsorção
ΔS_{ads}^o	Variação da entropia padrão de adsorção
AFM	Atomic force microscopy
CLAE	Cromatografia líquida de alto desempenho
CNTs	Carbon nanotubes
CVD	Chemical vapor deposition
DI	Deionizada
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally recognized as safe
ITC	Isothermal titration calorimetry
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MWCNTs	Multi-walled carbon nanotubes
nisA	Nisina A
nisZ	Nisina Z
RMN	Ressonância magnética nuclear
SWCNTs	Single-walled carbon nanotubes
ξ	Potencial zeta

RESUMO

ALMEIDA, Germana Wilk Reis de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Termodinâmica da biofuncionalização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com nisina visando nanocompósitos ativos**. Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Clascídia Aparecida Furtado.

A dispersão estável e/ou a aplicação dos nanotubos de carbono em estruturas ordenadas ou tecnologicamente aplicáveis é sempre um grande desafio em todas as áreas. A funcionalização com moléculas biológicas é uma alternativa para aumentar a solubilidade dos CNTs (*carbon nanotubes*) e pode favorecer o desenvolvimento de nanocompósitos e novos nanomateriais bioativos. Neste trabalho, MWCNTs (*multi-walled carbon nanotubes*) foram funcionalizados por meio da adsorção de nisina, um peptídeo antimicrobiano de natureza catiônica e anfifílica, para posterior aplicação no desenvolvimento de nanocompósitos ativos. O pH, a concentração e o tipo de peptídeo foram determinantes na obtenção de dispersões estáveis dos nanotubos, sendo os melhores resultados alcançados em pH 2. Medidas de potencial zeta confirmaram a estabilização eletrostática e obtenção de dispersões estáveis em pH 2 ($\xi \approx 45,0$ mV) e em pH 3 ($\xi \approx 30,0$ mV). As isotermas de adsorção seguiram o modelo de Langmuir, sugerindo uma adsorção em monocamada, apresentando uma elevada inclinação no primeiro intervalo de concentrações, o que reflete a forte interação dos peptídeos com a superfície dos nanotubos. Os MWCNTs exibiram uma maior capacidade de adsorção para a variante Z da nisina (≈ 250 mg·g⁻¹, em pH 2) do que para a nisina A (≈ 180 mg·g⁻¹, em pH 2). Mas o aumento do pH provocou um aumento na quantidade máxima de nisina adsorvida (Q_e), e em pH 5, ambas apresentaram valores de Q_e muito próximos (288,96 mg·g⁻¹ e 305,94 mg·g⁻¹ para as nisinas A e Z, respectivamente). A análise termodinâmica do processo de adsorção demonstrou que o ΔG_{ads}^0 das nisinas A e Z em MWCNTs foram negativos em todas as condições estudadas, indicando que o processo de adsorção foi espontâneo. Os valores negativos de ΔH_{ads}^0 demonstraram um processo exotérmico, sendo entalpicamente favorecido para todos os estados

termodinâmicos avaliados. Por outro lado, o processo de adsorção é entropicamente desfavorecido (os valores de ΔS_{ads}^o foram negativos), possivelmente pela diminuição da entropia configuracional da solução devido à adsorção da nisina. Todas as variáveis termodinâmicas foram influenciadas pelo pH da solução, indicando a importância das interações eletrostáticas no processo de adsorção. De uma forma geral, a distribuição da nisina entre a solução e a superfície do MWCNT não depende somente das interações que a nisina faz com o adsorvente, mas também das interações que ela faz com o solvente no bulk e das interações existentes entre as próprias moléculas de nisina no bulk e na superfície do MWCNT. Ao alterar o pH do meio, essas interações são alteradas, afetando o processo de adsorção da nisina. O fato de a nisina estar adsorvida na superfície dos nanotubos não prejudicou a sua propriedade antimicrobiana, e os MWCNTs funcionalizados apresentaram significativa atividade antibacteriana contra o micro-organismo indicador *Lactococcus lactis* pelo teste de halo ($2,02 \pm 0,04$ cm e $2,11 \pm 0,09$ cm de inibição para MWCNT-nisA e MWCNT-nisZ, respectivamente) e no ensaio em solução (redução $> 8,0$ log para ambas as nisinas). Os MWCNTs não funcionalizados não apresentaram atividade antimicrobiana. Os bionanocomplexos MWCNT-nisina apresentam potencial aplicação para o desenvolvimento de nanocompósitos ativos, podendo ser efetivamente dispersos na matriz polimérica para melhorar suas propriedades mecânicas, exibindo também propriedades antimicrobianas.

ABSTRACT

ALMEIDA, Germanna Wilk Reis de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Thermodynamics of multi-walled carbon nanotubes biofunctionalization with nisin for active nanocomposites.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Clascídia Aparecida Furtado.

Stable dispersion and application of carbon nanotubes into ordered or technologically applicable structures is always a challenge in all areas. Bio-molecule functionalization is one option to enhance CNTs (*carbon nanotubes*) solubility and can improve nanocomposites and new bioactive nanomaterials development. In this work, MWCNTs (*multi-walled carbon nanotubes*) were functionalized by nisin adsorption, an amphiphilic cationic antimicrobial peptide, for posterior applications in active nanocomposites development. The pH, concentration and peptide type were determinants in obtaining nanotubes stable dispersions, with the best results being achieved with pH 2 solutions. Zeta potential measurements confirmed an electrostatic stabilization and the attainment of stable dispersions in pH 2 ($\xi \approx 45,0$ mV) and pH 3 ($\xi \approx 30,0$ mV). Adsorption isotherms followed Langmuir model, suggesting a monolayer adsorption, with a steep initial slope in the lower nisin concentration range, which reflects the strong interaction between peptides and nanotubes surface. MWCNTs exhibited a bigger adsorption capacity for nisin Z variant ($\approx 250 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, in pH 2) than for nisin A ($\approx 180 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, in pH 2). But, increasing the solution pH led to an increase in nisin maximum adsorption (Q_e), and in pH 5, both variants showed similar Q_e values ($288,96 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and $305,94 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ for nisins A and Z, respectively). Thermodynamics analysis of the adsorption process showed that ΔG_{ads}^o of both nisin A and Z on WCNTs was negative in all conditions evaluated, indicating that the adsorption process was spontaneous. The negative values of ΔH_{ads}^o revealed that the process is exothermic and enthalpy driven, for all thermodynamic states evaluated. On the other hand, the adsorption process is entropy unfavorable ($\Delta S_{ads}^o < 0$), possibly because of the solution configurational entropy reduction due to nisin adsorption. All thermodynamic variables were solution pH dependent, indicating that the electrostatic

interactions play an important role on the adsorption process. In general, nisin distribution between solution and MWCNT surface do not depends only on nisin-adsorbent interactions, but also on nisin-bulk solution interactions, and nisin-nisin in the solution bulk and in the MWCNT surface interactions. By altering the solution pH, these interactions changed, affecting the nisin adsorption process. The fact that nisin is adsorbed on carbon nanotubes surface did not damage its antimicrobial property, and the functionalized MWCNTs showed significant antibacterial activity against the indicator microorganism *Lactococcus lactis* in the agar diffusion assay ($2,02 \pm 0,04$ cm and $2,11 \pm 0,09$ cm of inhibition for MWCNT-nisA and MWCNT-nisZ, respectively) and in solution assay ($> 8,0$ log reduction for both nisins). Pristine MWCNTs did not show antimicrobial activity. The bio-nanocomplexes MWCNT-nisin has potential application for developing active nanocomposites, as it can be effectively dispersed in the polymer matrix for enhancing the mechanical properties, while still exhibit antimicrobial properties.

1. INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta por Iijima em 1991, os nanotubos de carbono (CNTs, do termo em inglês *carbon nanotubes*) têm gerado grandes atividades de pesquisa em diversas áreas da ciência e engenharia devido às suas propriedades especiais. O principal desafio é a dispersão estável e/ou a aplicação dos nanotubos em estruturas ordenadas ou tecnologicamente aplicáveis. Devido às interações de van der Waals formadas entre as superfícies hidrofóbicas de grafeno, os nanotubos minimizam sua energia livre superficial formando agregados que dificultam a sua processabilidade e impede a potencial utilização dos mesmos. Assim, torna-se necessária uma funcionalização externa dos CNTs para sua dispersão na maioria dos meios.

A funcionalização dos nanotubos pode ocorrer por modificações covalentes ou não-covalentes. A funcionalização não-covalente é especialmente atrativa porque oferece a possibilidade de ligação de espécies químicas sem afetar a rede eletrônica dos tubos, preservando suas propriedades enquanto aumenta a sua dispersibilidade.

Neste sentido, a funcionalização com moléculas biológicas tem atraído grande interesse. Proteínas e peptídeos têm demonstrado uma forte capacidade de adsorção na superfície externa dos CNTs, e o aproveitamento desta característica pode evitar procedimentos sintéticos complicados ou o uso de solventes orgânicos para a funcionalização dos CNTs, além de gerar a possibilidade de desenvolvimento de novos nanomateriais bioativos. Para isso, é importante a compreensão fundamental das interações e do mecanismo de ligação entre biomoléculas e CNTs, possibilitando o desenvolvimento e uso racional dessas novas estruturas híbridas em diversas aplicações.

O objetivo deste trabalho foi estudar a funcionalização de MWCNTs por meio da adsorção de nisina, um peptídeo antimicrobiano de natureza catiônica e anfifílica, para a obtenção de bionanocomplexos estáveis e funcionais, esclarecendo-se os mecanismos e interações envolvidas no processo.

Objetivos específicos:

- Investigar o mecanismo e o comportamento de adsorção dos peptídeos antimicrobianos Nisina A e Nisina Z em nanotubos de carbono de paredes múltiplas;

- Investigar o efeito do pH sobre o processo de adsorção;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos associados ao processo, elucidando os fatores predominantes que influenciam a adsorção desses peptídeos;
- Estudar a estabilidade e atividade antimicrobiana dos complexos peptídeos – nanotubos, para avaliar a capacidade de nanotubos de carbono em carrear peptídeos antimicrobianos por meio de interações não-covalentes, preservando sua atividade biológica;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nanotecnologia em Embalagens

Das atuais e potenciais aplicações da nanotecnologia no setor alimentício, aquelas relacionadas às embalagens e materiais de contato com alimentos constituem a principal parcela (CHAUDHRY et al., 2008; CIENTIFICA, 2006). De acordo com Duncan (2011), a área mais ativa de pesquisa e desenvolvimento de nanociência em alimentos é a de embalagem, com uma taxa de crescimento anual de 11,65%. Os principais desenvolvimentos incluem nanocompósitos com melhores propriedades mecânicas e de barreira; materiais mais leves; nanocompósitos ativos e inteligentes; e novas formulações de biopolímeros e materiais biodegradáveis (FAO/WHO, 2010; BRADLEY et al., 2011; DUNCAN, 2011).

Os nanocompósitos poliméricos podem ser definidos como um material proveniente da mistura de dois ou mais componentes, onde existe uma fase contínua, compreendendo a matriz polimérica e uma fase dispersa que apresenta pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica (ALEXANDRE e DUBOIS, 2000; AZEREDO, 2009). Esta mistura permite a obtenção de materiais com novas e/ou melhores propriedades, também levando em consideração a relação custo benefício dos materiais. Assim, os filmes nanocompósitos são produzidos com objetivo de alterar as propriedades da matriz original, como as propriedades térmicas, mecânicas e de barreira. As nanopartículas utilizadas para formação dos nanocompósitos são diferenciadas entre si basicamente pela composição química e pelo número de dimensões que se encontram na escala nanométrica. Devem ser materiais inertes e podem estar em diversas formas, dependendo da aplicação desejada (SOUZA FILHO, 2007). Dentre os diversos tipos de materiais de reforço pode-se citar nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono, nanofibras (wiskers) de celulose, argilas e silicatos (AZEREDO, 2009).

Compósitos poliméricos multifuncionais empregando nanoestruturas de carbono têm atraído grande atenção. As propriedades mecânicas e elétricas dos compósitos podem ser melhoradas por meio da adição de nanotubos de carbono devido ao seu elevado módulo de elasticidade e excelente condutividade elétrica. De um modo geral, nanoestruturas de carbono

(incluindo nanotubos de carbono, nanofibras e folhas de grafeno) apresentam uma série de propriedades bem conhecidas e bem estudadas, como alta condutividade elétrica, elevada resistência mecânica e melhor comportamento térmico, que os tornam excelentes materiais de reforço para nanocompósitos poliméricos (REDDY et al., 2013).

2.2. Nanotubos de Carbono

Os experimentos de síntese de novos materiais de carbono na década de 1980 por Harry Kroto e Richard Smalley que resultaram no descobrimento do fulereno (C_{60}), são o prelúdio da história dos nanotubos. Durante o início dos anos 90, Sumio Iijima observou a existência de novas estruturas grafiticas, similares a pequenos tubos de grafite. O trabalho de Iijima apontou as excepcionais propriedades e potenciais aplicações dessas nanoestruturas e novas descobertas foram sendo realizadas, desde a melhoria do método de síntese e a maior capacidade de produção, até a síntese de nanotubos de carbono de paredes simples (GOZE-BAC, C., 2008). Assim, o nascimento do campo de pesquisa de nanotubos de carbono é marcado pela publicação de Iijima (IJIMA, 1991) sobre a observação de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, e foi um importante intermediário na conexão entre fulerenos e nanotubos de carbono. Seu trabalho inicial estimulou uma extensa pesquisa teórica e experimental que levou à criação de um campo de pesquisa em rápido e constante desenvolvimento (ENDO et al, 1996). Os nanotubos de carbono são uma das fibras mais rígidas e fortes conhecidas. Além disso, possuem extraordinárias propriedades eletrônicas, ópticas, térmicas e químicas. Por estas razões o seu interesse nas áreas acadêmicas e industriais é sempre crescente (VIGOLO e HÉROLD, 2011).

Quando átomos de carbono ligam-se entre si, dependendo da natureza da ligação, compostos com estruturas inteiramente distintas podem ser gerados, como o grafite e o diamante, ou ainda formar estruturas fechadas com milhares de átomos, como é o caso dos nanotubos de carbono e dos fulerenos. Este comportamento do carbono, de apresentar tantos tipos de ligações, se deve às diferentes hibridizações que o carbono pode assumir (sp , sp^2 , sp^3) (DRESSELHAUS et al., 1996; RODRIGUES, 2011).

Nanotubos de carbono são cilindros longos compostos por átomos de carbono covalentemente ligados a outros três, formando uma estrutura hexagonal com hibridização sp^2 , semelhante à observada nas folhas de grafeno constituintes do grafite. Quanto ao número de camadas, podem ser classificados como nanotubos de paredes múltiplas (MWCNTs – *multi-walled carbon nanotubes*) ou de paredes simples (SWCNTs – *single-walled carbon nanotubes*). A Figura 1 mostra um esquema das estruturas de grafeno, SWCNT e MWCNT (HAN *et al.*, 2014)

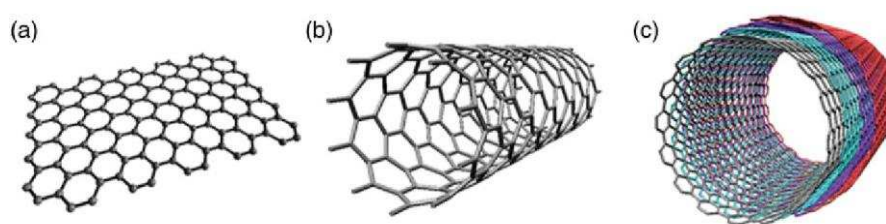


Figura 1. Ilustração das estruturas de grafeno (a), SWCNT (b) e MWCNT (c). Reproduzido com permissão de Han *et al.*, 2014.

Um SWCNT é um cilindro com espessura de um átomo, que pode ser conceitualmente enrolado a partir de uma folha única de grafeno. Esse enrolamento pode ocorrer em diferentes direções, cujo vetor é descrito por (n, m) , originando nanotubos com quiralidades distintas. Assim, os nanotubos são classificados como “armchair” quando $n = m \neq 0$, “zigzag” quando $m = 0$ ou “chiral” para as espécies (n, m) remanescentes (Figura 2). Suas propriedades eletrônicas dependem da sua quiralidade (n, m) , podendo ser metálicos ou semi-condutores. O MWCNT é formado por vários destes cilindros concêntricos, com uma distância parede-a-parede de aproximadamente 0,34 nm, indicativa do espaçamento interplanar do grafite (DRESSELHAUS, M. S.; AVOURIS, P., 2001; SUN *et al.*, 2014).

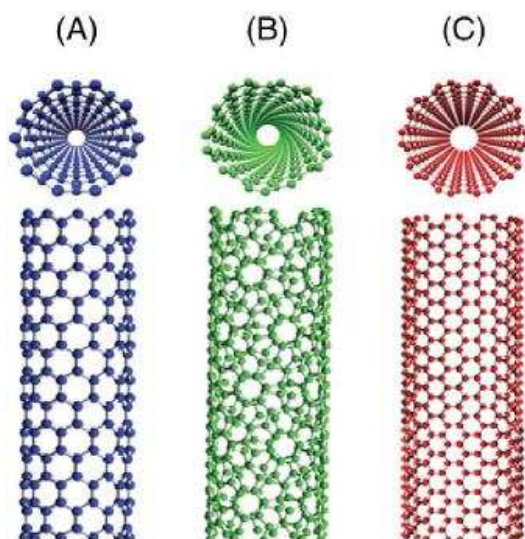


Figura 2. Ilustração esquemática das estruturas de SWCNTs *zigzag* (A), *chiral* (B) e *armchair* (C). Reproduzido com permissão de Sun *et al.*, 2014.

Os principais processos disponíveis para a síntese de nanotubos de carbono podem ser classificados em métodos de alta temperatura, como a descarga por arco elétrico e a ablação por laser, e métodos de temperatura moderada, como deposição química na fase vapor (CVD - *chemical vapor deposition*). O método de descarga por arco elétrico foi originalmente desenvolvido por Kratschmer-Huffamn para a produção de fulerenos, e foi o método utilizado por Iijima para obter os nanotubos de carbono. Os métodos de descarga por arco e de ablação por laser são baseados na condensação de átomos de carbono gerados pela evaporação de carbono a partir de um precursor sólido, normalmente grafite de alta pureza. Dessa forma, a temperatura envolvida nesse processo aproxima-se da temperatura de fusão do grafite, de 3000 °C a 4000 °C. O método de CVD se baseia na decomposição de gases ou vapores precursores que contenham átomos de carbono, geralmente um hidrocarboneto, sobre partículas de catalisadores metálicos, e ocorre a uma temperatura abaixo de 1000 °C (CASSEL *et al.*, 1999; DRESSELHAUS, M. S.; AVOURIS, P., 2001; DAI, 2002; GOZE-BAC, C., 2008; HOU *et al.*, 2008; VAIRAVAPANDIAN *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2014).

Entretanto, apesar dos métodos de síntese serem bem estabelecidos, os nanotubos de carbono ainda não são preparados em sua forma purificada. As amostras geradas contêm elevado teor de impurezas, como estruturas grafíticas, carbono amorfo e partículas metálicas utilizadas como catalisadores, as quais devem ser eliminadas já que interferem nas propriedades dos CNTs.

Assim, para que os nanotubos possam ser aplicados, é necessária uma etapa de purificação. Diferentes técnicas de purificação já foram desenvolvidas e aperfeiçoadas, podendo-se utilizar métodos físicos (como centrifugação e filtração) ou químicos (oxidação por meio de soluções ácidas como HCl, HNO₃ e H₂SO₄), ou ainda a combinação de ambos (CASSEL *et al.*, 1999; DRESSELHAUS, M. S.; AVOURIS, P., 2001; DAI, 2002; GOZE-BAC, C., 2008; HOU *et al.*, 2008; VAIRAVAPANDIAN *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2014).

2.2.1. Funcionalização

Desde a descoberta dos CNTs, o mundo vem testemunhando um desenvolvimento explosivo da ciência e tecnologia de nanotubos. Considerando o rápido progresso feito na fabricação, manipulação, caracterização e modelagem de nanoestruturas baseadas em nanotubos, espera-se que os CNTs continuem permeando por diversas áreas de aplicação nos próximos anos. Existe uma variedade de aplicações onde os nanotubos representam um potencial de grandes avanços e desenvolvimento, desde o armazenamento de energia, compósitos, nanoeletrônica, até sensores e aplicações biomédicas (RUBIO, 2008). Suas incomparáveis propriedades estruturais, mecânicas e eletrônicas são a razão de seu sucesso e versatilidade de aplicações em diversas áreas.

Entretanto, o principal desafio é a dispersão estável e/ou a aplicação dos nanotubos em estruturas ordenadas ou tecnologicamente aplicáveis (CHENG *et al.*, 2006). A baixa solubilidade e a difícil manipulação em quaisquer solventes têm imposto grandes limitações à utilização dos CNTs. Os nanotubos, na forma em que são produzidos, são insolúveis em todos os solventes orgânicos e soluções aquosas. A dispersão em alguns solventes é possível por meio de sonicação, mas a precipitação ocorre rapidamente quando o processo é interrompido (TASIS *et al.*, 2006). Devido às interações de van der Waals formadas entre as suas superfícies hidrofóbicas, os nanotubos minimizam sua energia livre superficial formando agregados que dificultam a sua processabilidade e impede a potencial utilização dos mesmos (TOMÁNEK *et al.*, 2008, SMITH *et al.*, 2009).

Um exemplo é a aplicação de nanotubos de carbono como materiais de reforço em compósitos poliméricos. O reforço mecânico de polímeros por

nanotubos de carbono só pode ser realizado por meio da solução de dois principais problemas, a dispersão dos nanotubos e a adesão interfacial entre nanotubos e matriz. Uma boa dispersão e adesão são essenciais para garantir a eficiente transferência de carga da matriz polimérica para os nanotubos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2005). Assim, torna-se necessária uma funcionalização externa dos CNTs.

Os nanotubos de carbono podem interagir com diferentes classes de compostos e sofrer reações químicas que os tornam mais solúveis para sua integração em sistemas inorgânicos, orgânicos e biológicos (TASIS *et al.*, 2006). São esses processos que dão origem à funcionalização dos CNTs.

As principais abordagens para a modificação (ou funcionalização) dos nanotubos de carbono podem ser agrupadas basicamente em duas categorias: a ligação covalente de grupos químicos por meio de reações na estrutura do CNT; e a modificação não-covalente por meio da adsorção de diversas moléculas funcionais. A Figura 3 ilustra esses métodos de funcionalização de CNTs.

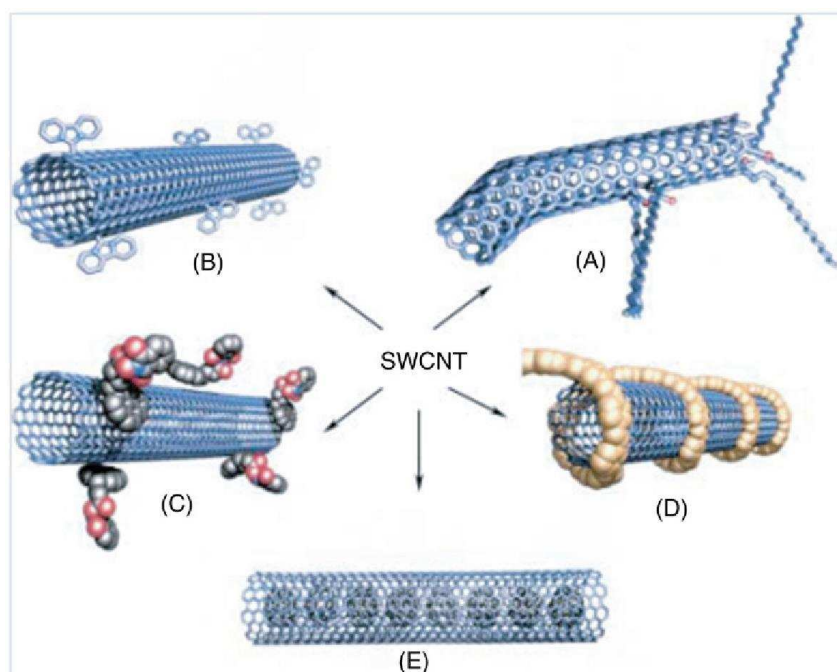


Figura 3. Possíveis formas de funcionalização para SWCNTs: (A) funcionalização via grupos defeituosos na estrutura do nanotubo; (B) funcionalização covalente; funcionalização não-covalente com (C) surfactantes e (D) polímeros; (E) encapsulamento de substâncias no interior do tubo. Reproduzido com permissão de Hirsch (2002).

A funcionalização não-covalente de CNTs é especialmente atrativa porque oferece a possibilidade de ligação de espécies químicas sem afetar a rede eletrônica dos tubos, preservando suas propriedades enquanto aumenta a sua dispersibilidade. A interação não-covalente é baseada nas forças de van der Waals, interações π - π , interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas (TASIS *et al.*, 2006; CALVARESI e ZERBETTO, 2013).

Neste sentido, a integração da nanotecnologia com a biologia e a bioengenharia é capaz de produzir muitos avanços. A funcionalização biológica de nanomateriais passou a ser de grande interesse nos últimos anos devido aos seus diferentes tipos de aplicações (BHATTACHARYYA *et al.*, 2005). Além disso, CNTs bem dispersos e funcionalizados com biomoléculas e surfactantes biocompatíveis demonstram ser os mais promissores na capacidade de minimizar riscos de toxicidade (WALSH e TOMASIO, 2010). De uma maneira geral a funcionalização produz CNTs mais biocompatíveis com sistemas fisiológicos e, conseqüentemente, reduz sua toxicidade em comparação com os nanotubos de carbono não funcionalizados (SAYES *et al.*, 2006; SAITO *et al.*, 2008; SANTOS, 2011). Moléculas anfifílicas, surfactantes, polímeros sintéticos, biopolímeros, DNA, proteínas e peptídeos têm sido utilizados na funcionalização não-covalente de CNTs (CALVARESI e ZERBETTO, 2013).

2.2.2. Funcionalização com proteínas e peptídeos

Nos últimos anos, proteínas e peptídeos têm sido amplamente estudados como agentes dispersantes de CNTs (DIECKMANN *et al.*, 2003; ARNOLD *et al.*, 2005; KARAJANAGI *et al.*, 2006; MATSUURA *et al.*, 2006; NEPAL e GECKELER, 2007; WALSH e TOMASIO, 2010; DESHPANDE e MAZUMDAR, 2012).

Proteínas e também alguns peptídeos são naturalmente anfifílicos, o que contribui para sua forte capacidade de adsorção na superfície externa dos CNTs (TASIS *et al.*, 2006; CALVARESI e ZERBETTO, 2013). De acordo com Arnold *et al.* (2005), uma vez que as superfícies dos nanotubos de carbono são hidrofóbicas e pouco polares, espera-se que peptídeos anfifílicos se adsorvam na sua superfície a partir da solução aquosa, de modo que a porção hidrofóbica do peptídeo interaja com a superfície hidrofóbica do nanotubo, e a porção

hidrofílica fica exposta para a solução, minimizando a energia interfacial da interface nanotubo – água.

O aproveitamento desta característica pode evitar procedimentos sintéticos complicados ou o uso de solventes orgânicos para a funcionalização dos CNTs. Além disso, a grande maioria destas biomoléculas são dependentes do pH do meio, o que é uma vantagem para manipulações do sistema. A estabilização estérica e a repulsão eletrostática são os dois principais mecanismos ativos na dispersão de CNTs em soluções de proteínas. As interações atrativas de van der Waals entre nanotubos individuais são de curto alcance e, com 5 nm de distância intertubos, torna-se menor do que $1K_bT$. Se o raio de uma proteína adsorvida na superfície de uma CNT é maior do que 2,5 nm (como por exemplo, a albumina do soro bovino, BSA), a interação estérica é suficiente para proporcionar uma barreira para prevenir a agregação dos CNTs. Em compensação, se o raio de uma proteína é menor do que 2,5 nm, a repulsão estérica não é capaz de conferir estabilização. Outro mecanismo pode então ser utilizado: a repulsão eletrostática. A lisozima, por exemplo, tem um raio de 1,43 nm, mas consegue dispersar CNTs de maneira eficiente. Isso porque em valores de pH diferentes do seu ponto isoelétrico, a distribuição de carga nos átomos da lisozima faz os nanotubos estabilizados pela proteína se repelirem. Em torno do seu ponto isoelétrico, a lisozima torna-se quase neutra, o que resulta na atração entre os tubos e subsequente floculação do sistema (NEPAL e GECKELER, 2006; CALVARESI e ZERBETTO, 2013). Este exemplo pode ser estendido a diversas proteínas e também peptídeos. Assim, considerando a grande variedade de biomoléculas existentes e a possibilidade adicional de manipulá-las, há muito espaço para descobrir novas formas de dispersar nanotubos de carbono (CALVARESI e ZERBETTO, 2013).

Kim *et al.* (2014) reportaram a dispersão de SWCNTs em água utilizando peptídeos. De acordo com os autores, a adição de água às misturas sólidas de SWCNTs e peptídeos, com um subsequente processo de sonicação, foi capaz de dispersar de forma eficiente grandes quantidades de SWCNTs com uma melhor estabilidade da dispersão em comparação com os métodos convencionais.

SWCNTs tornaram-se solúveis em água e formaram uma solução estável quando L-fenilalanina (Phe) foi adsorvida em sua superfície (PIAO *et al.*, 2008).

Sheikholeslam *et al.* (2012) demonstraram a modificação não-covalente de MWCNTs em soluções aquosas utilizando três peptídeos com sequências parecidas. De acordo com os autores, a modificação possivelmente ocorreu por meio da interação entre a porção hidrofóbica dos peptídeos e as paredes laterais dos MWCNTs, orientando os grupos funcionais hidrofílicos em direção à fase da solução, o que lhes permite formar dispersões altamente estáveis em água. Esta estabilidade foi atribuída à repulsão eletrostática entre os peptídeos adsorvidos nos MWCNTs.

A presença de resíduos aromáticos tem demonstrado ser fundamental na interação de proteínas e peptídeos com nanoestruturas de carbono. Horn e colaboradores (2012) estudaram a interação não-covalente entre a proteína lisozima e SWCNTs. Os resultados sugeriram que a interação chave para o processo de adsorção ocorre entre o resíduo hidrofóbico triptofano da lisozima e a parede lateral do SWCNT.

Um modelo baseado na hidrofobicidade de resíduos de aminoácidos em peptídeos sugeriu que peptídeos anfifílicos com resíduos hidrofóbicos localizados no centro ou em uma das extremidades da sequência, forma dispersões estáveis de conjugados peptídeo-MWCNT (DESHPANDE e MAZUMDAR, 2012).

Assim, a funcionalização não-covalente de CNTs com moléculas biológicas é capaz de promover a solubilidade, tornando possível a sua aplicação em diferentes finalidades, como sistemas de transporte de fármacos, desenvolvimento de biosensores, ferramentas de diagnóstico e imagem, aplicações anti-câncer, engenharia de tecidos, etc (HAN *et al.*, 2014). O desenvolvimento de nanocompósitos também pode ser melhorado utilizando-se estes sistemas.

A proteína ferritina foi utilizada na funcionalização de MWCNTs para que pudessem ser utilizados como material de reforço no polímero termoplástico poli(vinil álcool) (PVA). A funcionalização possibilitou a dispersão dos nanotubos em água e aumentou a sua interação com o polímero, aumentando significativamente as propriedades mecânicas do PVA (BHATTACHARYYA *et al.*, 2005).

Assim, espera-se que a associação de nanotubos de carbono com moléculas como proteínas e peptídeos seja útil em aplicações como biosensores e no desenvolvimento de novos nanomateriais bioativos.

2.3. Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos com propriedades antimicrobianas são utilizados como a primeira barreira química contra o ataque microbiano, sendo sintetizados em resposta a infecções bacterianas e também para competição entre micro-organismos. Eles são produzidos por quase todas as espécies vivas, desde micro-organismos, plantas e animais, até os humanos. São amplamente reconhecidos como alternativas promissoras para o atual uso de antibióticos devido à sua baixa propensão em causar resistência bacteriana. Peptídeos antimicrobianos têm sido utilizados em diversas aplicações, incluindo dispositivos biomédicos, equipamentos para processamento de alimentos e na conservação de alimentos (ESPÍTIA et al., 2012).

Dessa forma, peptídeos antimicrobianos são uma classe de moléculas que podem ser potencialmente explorados para a funcionalização de nanotubos de carbono, pois, além de poderem promover a sua dispersibilidade, também podem ser capazes de conferir propriedades antimicrobianas e antiadesão (QI et al., 2011).

Dentre os diversos tipos de peptídeos antimicrobianos existentes, um dos mais conhecidos é a nisina. A nisina é atualmente muito utilizada como conservante de alimentos na indústria alimentícia mundial e possui o status de GRAS, sigla em inglês para o termo *Generally Recognized as Safe*, aprovado pela agência de regulamentação americana *Food and Drug Administration* (FDA-USA) (IMRAN et al., 2012). Sua natureza catiônica e anfifílica faz dela um bom candidato para a dispersão de nanotubos de carbono, com potencial aplicação no desenvolvimento de nanocompósitos mais resistentes e com propriedades ativas.

2.3.1. Nisina

A nisina é um tipo de bacteriocina, ou seja, pertence a um grupo heterogêneo de proteínas e peptídeos antibacterianos produzidos por bactérias. As bacteriocinas variam no espectro de atividade, modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas. São constantemente confundidas com antibióticos, entretanto a principal diferença é

que são sintetizadas ribossomicamente, e também se diferem dos antibióticos no modo de ação, espectro antimicrobiano, toxicidade e mecanismos de resistência (COTTER *et al.*, 2005; ARAUZ *et al.*, 2009). Os primeiros registros sobre bacteriocinas datam de 1925, quando André Gratia publicou um estudo referente ao antagonismo promovido por uma linhagem de *Escherichia coli* sobre outras linhagens da mesma espécie. As substâncias responsáveis por esse efeito inibitório foram denominadas de 'colicinas' em referência ao microrganismo produtor original. Com a descoberta de que a produção desses compostos não se limitava ao grupo dos coliformes, peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias são agora chamados bacteriocinas (COTTER *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2008). A nisina foi descoberta na Inglaterra em 1928, como resultado de dificuldades experimentais durante um processo de fabricação de queijo. A estocagem de leite permitiu o desenvolvimento da microbiota contaminante e a produção da bacteriocina, que foi isolada e nomeada nisina.

Sua purificação e comercialização ocorreram na Inglaterra em 1953, sendo considerada segura para uso em alimentos pelo JECFA/OMS em 1969. Na Europa, em 1983, foi adicionada à lista de aditivos alimentares e, em 1988, nos EUA, o FDA autorizou seu uso em queijos processados. Assim, a nisina é amplamente aceita como um conservante alimentar e no Brasil seu uso é permitido pela lei brasileira como um conservante natural para produtos biológicos (NASCIMENTO *et al.*, 2008; ESPITIA *et al.*, 2012).

Sua solubilidade em meio aquoso é altamente dependente do pH; à medida que o pH aumenta a solubilidade diminui, passando de 57 mg.mL⁻¹ em pH 2 para 0,25 mg.mL⁻¹ em pH 8 (LIU e HANSEN, 1990). Seu ponto isoelétrico encontra-se na faixa alcalina (acima de 8,5) (TAI *et al.*, 2008). A maioria das bacteriocinas tem uma melhor estabilidade de sua atividade em pH de ácido a neutro, sendo praticamente inativadas em pH 8,0, a exemplo da nisina. LIU e HANSEN (1990) sugeriram que a inativação da nisina em meio alcalino pode ser consequência de desnaturação, modificação química ou uma combinação de ambos. Os resíduos de deidro são altamente susceptíveis a modificações por nucleofílicos que estão presentes em pH elevado, assim como íons hidroxila, aminas desprotonadas e grupamentos hidroxil desprotonados (MELO, 2005).

A nisina é ativa contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, incluindo micro-organismos deteriorantes e patógenos contaminantes de alimentos que representam grandes problemas para a indústria, como *Listeria*, *Staphylococcus* e *Mycobacterium*; e também formadores de esporos como *Bacillus* e *Clostridium*. Os esporos são na verdade mais sensíveis à nisina do que suas células vegetativas, entretanto, sua atividade é esporostática e não esporocida, necessitando então a presença contínua da nisina para inibir a germinação dos esporos. Além disso, a nisina normalmente não possui efeito em bactérias Gram-negativas, fungos e leveduras (CHEN e HOOVER, 2003).

2.3.1.1. Estrutura

A nisina é uma bacteriocina pertencente à classe dos lantibióticos, que compreendem peptídeos termoestáveis de baixa massa molar (< 5 kDa), diferenciados dos demais pela presença de anéis lantionina formados por modificações pós-traducionais. Trata-se de um peptídeo catiônico de natureza anfifílica, composto por 34 aminoácidos e massa molar de 3,5 kDa, produzido por estirpes da bactéria láctica *Lactococcus lactis* (BREUKINK e KRUIJFF, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2008; ARAUZ *et al.*, 2009).

Existem diferentes formas da nisina, sendo a nisina A e sua variante natural, a nisina Z, os dois tipos mais conhecidos e utilizados. Ambas se diferem estruturalmente pela substituição de um aminoácido na posição 27. A histidina na nisina A é substituída pela asparagina na nisina Z. De acordo com alguns autores, esta modificação estrutural não possui efeito na atividade antimicrobiana, mas confere à nisina Z maior solubilidade e características de difusão quando comparada à nisina A (CHEN e HOOVER, 2003; LARIDI *et al.*, 2003; ARAUZ *et al.*, 2009). A Figura 4 ilustra a estrutura das duas variantes A e Z.

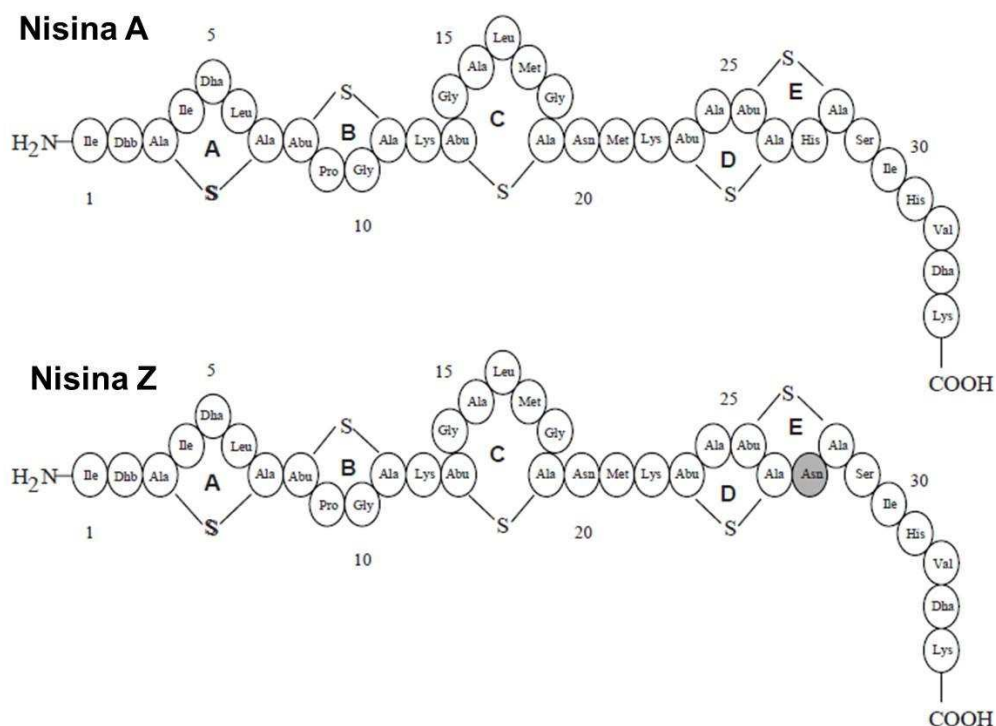


Figura 4. Estruturas primárias das variantes naturais da nisina. O aminoácido que as diferem está marcado com a cor cinza. Adaptado de Reunanen, 2007.

Assim, a nisina é formada por oito alaninas (Ala), quatro ácidos aminobutírico (Aba), três glicinas (Gly), três isoleucinas (Ile), três lisinas (Lys), duas leucinas (Leu), duas histidinas (His), duas metioninas (Met), uma serina (Ser), uma valina (Val), uma prolina (Pro), uma asparagina (Asn) e os aminoácidos incomuns, duas deidroalanina (Dha) e uma dedrobutirina (Dhb) (MELO et al., 2005).

A nisina é sintetizada ribossomicamente como um peptídeo precursor com 57 aminoácidos. Mudanças pós-traducionais são então introduzidas por meio de duas enzimas, a desidratase NisB e a ciclase NisC. A desidratase NisB é responsável pela desidratação dos resíduos serina e treonina. A reação de ciclização, catalisada pela NisC, gera um anel lantionina e quatro anéis metil-lantionina, os quais são os responsáveis pela atividade antimicrobiana da nisina. Além dessas mudanças pós-traducionais, o transporte para fora da célula produtora e a clivagem proteolítica do peptídeo líder são essenciais para a atividade antimicrobiana (ABTS, 2013). Uma visão geral do processo de maturação da nisina é dada na Figura 5.

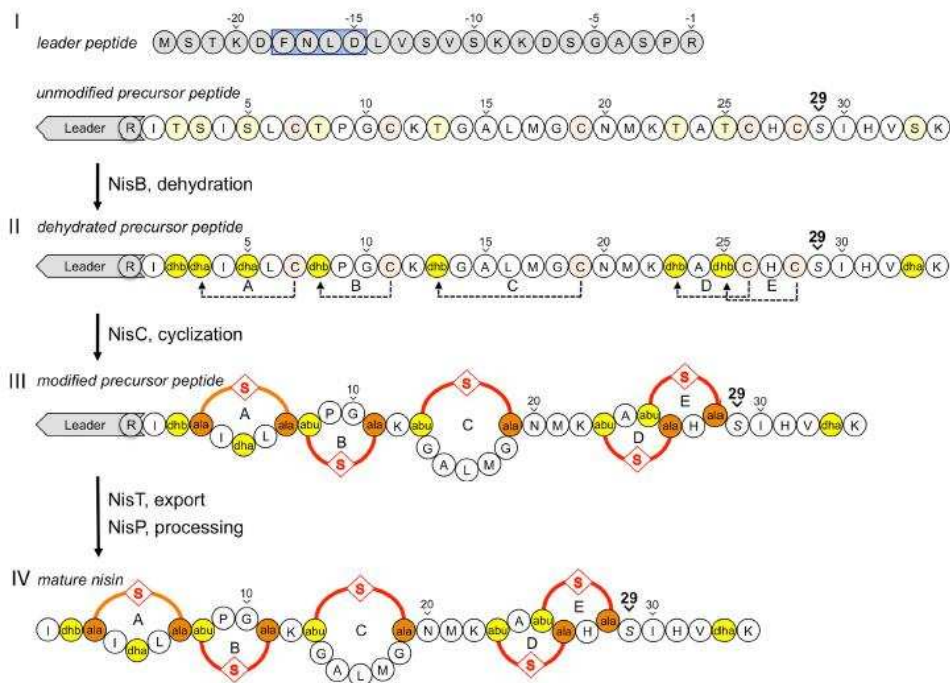


Figura 5. (I) O peptídeo líder (em cinza) direciona o peptídeo precursor para o mecanismo de modificação e transporte. (II) Os resíduos serina e treonina (destacados em amarelo) são convertidos pela desidratase NisB em dideidroalaninas (dha) e dideidrobutilinas (dhb), respectivamente. (III) Os resíduos desidratados são ligados pela NisC aos resíduos de cisteína (destacados em alaranjado) formando um anel lantionina (A, alaranjado) e quatro anéis metil-lantionina (B-E, vermelho). (IV) O peptídeo precursor modificado é exportado pelo transportador NisT e processado pela protease extracelular NisP, que cliva o peptídeo líder para liberar a nisina em sua forma final. O resíduo de serina na posição 29 não sofre a reação de desidratação. Reproduzido com permissão de Mavaro *et al.* (2011).

A estrutura tridimensional da nisina em solução foi esclarecida por espectroscopia RMN em 1991, e está representada na Figura 6.

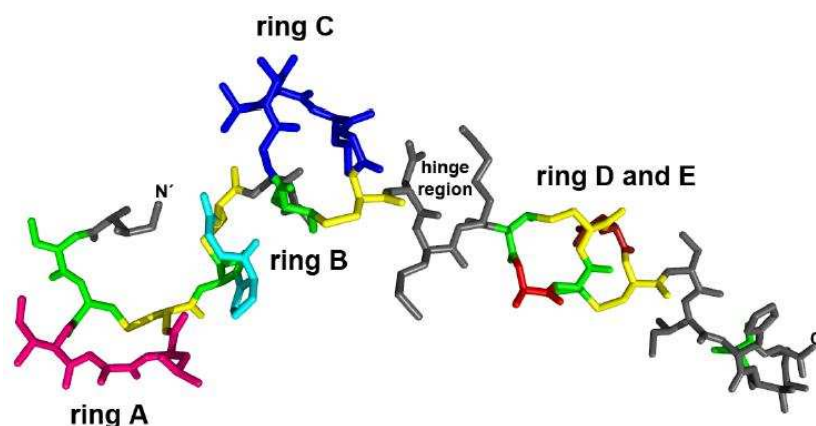


Figura 6. Estrutura tridimensional da nisina. Reproduzido de Abts, 2013.

Baseado nesta estrutura, a nisina pode ser subdividida em três regiões: (1) a porção N-terminal consiste dos anéis A – C; (2) uma parte flexível chamada “região dobradiça”; e (3) a região C-terminal compreende os anéis D e E, seguido de seis aminoácidos. É uma molécula anfipática com a porção N-terminal hidrofóbica e a parte C-terminal hidrofílica (BREUKINK e KRUIJFF, 1999; ABTS, 2013). A nisina não possui grupos funcionais negativos e tem uma carga líquida positiva de +4, devido aos três resíduos de lisina e uma histidina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Embalagens de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Química Verde Coloidal e Macromolecular do Departamento de Química, Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física, e Núcleo de Microscopia e Microanálise, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Nanotubos de carbono e peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos, Nisina A ultrapura - concentração $\geq 95,0$ % (m/m) e Nisina Z ultrapura - concentração $\geq 95,0$ % (m/m), foram adquiridos da empresa belga Handary S.A. (Bruxelles, BELGIUM).

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) CTUBE 100 MWCNT foram obtidos da CNT CO. , LTD., Korea. As especificações técnicas dos MWCNT foram fornecidas pelo fabricante: diâmetro médio: 10-40 nm; tamanho: 1-25 μm ; pureza: 93 % (m/m) mínimo; contaminantes: 7 % (m/m) máximo; densidade: 0,03-0,06 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; área superficial específica: 188 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$.

3.2. Adsorção

3.2.1. Obtenção das isotermas de adsorção em diferentes valores de pH

Soluções tampões em valores de pH 2, pH 3, pH 4 e pH 5 foram obtidas por meio da mistura de diferentes volumes de solução 0,1 M de ácido cítrico (P. A. - Vetec / Sigma - Aldrich) com solução 0,2 M de fosfato de sódio dibásico dihidratado (P. A. - Vetec / Sigma - Aldrich), e completando-se o volume final com água deionizada. Para o ajuste do pH foi utilizado um peagâmetro de bancada PG – 1800 (GEHAKA).

Para o preparo das dispersões de nanotubos, 10,00 mg do adsorvente (MWCNTs) foram pesados em *vials* de vidro de 15 mL em uma microbalança XP26 (Mettler-Toledo). Aos tubos foram acrescentados volumes variados (0,0 - 10,00 mL) de solução tampão no pH desejado (2, 3, 4 ou 5). Em seguida, uma

solução concentrada de cada peptídeo (preparada na mesma solução tampão e pH desejado) foi adicionada aos tubos a fim de completar o volume da dispersão para 10,00 mL e obter a concentração inicial de peptídeo desejada. Os frascos foram selados e agitados manualmente por 10 minutos e em seguida deixados em repouso por 24 horas em um banho termostático Thermomix BM-S (B. Braum Biotech), a 25 °C. Quando o equilíbrio termodinâmico foi alcançado (após 24 horas), alíquotas do sobrenadante foram coletadas e a concentração de peptídeo foi determinada por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE). Todas as medidas foram feitas em duplicata e o valor médio da quantidade adsorvida foi utilizado.

As quantidades de peptídeo adsorvido (Q_e) na fase sólida foram calculadas de acordo com a Equação 1.

$$Q_e = \frac{(C_{Peptídeo}^o - C_{Peptídeo}^f)V}{m} \quad (1)$$

onde Q_e ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) é a quantidade de peptídeo adsorvida por unidade de massa de MWCNT, $C_{peptídeo}^o$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) é a concentração inicial de peptídeo, $C_{peptídeo}^f$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) é a concentração de peptídeo na fase líquida (sobrenadante) após o equilíbrio, V (mL) é o volume da fase líquida em contato com a massa m (g) de fase sólida.

3.2.2. Quantificação da nisina por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE)

A determinação da nisina foi feita em aparelho de cromatografia líquida Shimadzu, modelo 10 AVP, com detector UV/VIS (Shimadzu, SPD-M10Avp), utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ VP-ODS, com dimensões de 15 cm x 4,6 mm. A metodologia, adaptada de Melo (2003), consistiu em uma corrida de gradiente binário, tendo como fase móvel acetonitrila (20 – 70%) e ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (80 – 30%), com um fluxo de 1,0 mL·min⁻¹. Utilizou-se o comprimento de onda de 233 nm e um “loop” com capacidade para 20 µL para injeção da amostra. A nisina A eluiu da coluna em 8,5 minutos, e a nisina Z em 8,8 minutos.

A quantificação das nisinas A e Z foi realizada utilizando-se uma curva analítica para cada uma das variantes. Esta curva foi obtida através da análise cromatográfica de diferentes soluções de nisina com concentrações conhecidas variando de 0 a 1,000 mg·mL⁻¹.

3.2.3. Cálculos e equações: modelos de isotermas e parâmetros termodinâmicos de adsorção

Para o estudo das isotermas e seus parâmetros termodinâmicos, os dados foram analisados utilizando-se os modelos de Langmuir e Freundlich.

Modelo de Langmuir

A isoterma de Langmuir é dada pela Equação 2:

$$Q_e = \frac{q_s K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (2)$$

onde, C_e (mg·mL⁻¹) é a concentração de equilíbrio do peptídeo na solução, Q_e (mg·g⁻¹) a quantidade de peptídeo adsorvida por unidade de massa de MWCNT, q_s (mg·g⁻¹) é a capacidade de saturação do MWCNT (ou seja, a capacidade máxima de adsorção por unidade de massa de adsorvente) e K_L é a constante de equilíbrio de Langmuir e está relacionada com a energia livre de Gibbs de adsorção.

A representação matemática do modelo de Langmuir pode ser linearizada pela Equação 3.

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{K_L q_s} + \frac{1}{q_s} C_e \quad (3)$$

A capacidade máxima de adsorção q_s e a constante de adsorção K_L foram determinadas a partir da inclinação e intercepto da linha reta obtida com o gráfico de C_e/Q_e em função da C_e .

Modelo de Freundlich

A isoterma de Freundlich é expressa matematicamente pela Equação 4.

$$Q_e = K_f C_e^{\frac{1}{n}} \quad (4)$$

onde, K_f é a capacidade de adsorção do adsorvente e n é a constante de Freundlich, que indica o quão favorável é o processo de adsorção. A equação pode ser reescrita na forma linearizada de acordo com a Equação 5:

$$\log Q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad (5)$$

Os valores de K_f e n foram determinados a partir da inclinação e intercepto da reta obtida com a plotagem de $\log Q_e$ em função do $\log C_e$.

Em cada pH estudado, o valor da constante de Langmuir (K_L) foi utilizado para estimar a variação de energia livre de Gibbs padrão (ΔG_{ads}^o) do processo de adsorção, a partir da Equação 6:

$$\Delta G_{ads}^o = -RT \ln K_L \quad (6)$$

onde R é a constante de Boltzman e T é a temperatura em Kelvins (K).

Para determinar a contribuição entálpica para o processo de adsorção das nisinas sobre o MWCNT, a variação da entalpia padrão de adsorção (ΔH_{ads}^o) foi determinada por meio da técnica de microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC).

A variação de entropia padrão (ΔS_{ads}^o) associada aos processos de adsorção foi calculada utilizando-se a relação termodinâmica expressa pela Equação 7.

$$\Delta G_{ads}^o = \Delta H_{ads}^o - T \Delta S_{ads}^o \quad (7)$$

3.2.4. Microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica foram realizados no Laboratório de Química Verde Coloidal e Macromolecular do Departamento de Química utilizando um TAM III Isothermal Titration Nanocalorimeter (TA Instruments) controlado pelo software TAM Assistant™. Os experimentos foram realizados em celas de reação de aço inoxidável (amostra e referência) com

volume total de 4,00 mL. Para cada experimento, a cela de amostra foi preenchida com 4,00 mg de MWCNT e 2,70 mL do solvente (tampão citrato-fosfato em pH adequado). A cela de referência foi preenchida apenas com 2,7 mL do solvente. Antes de ser utilizada, cada solução foi desgaseificada por 10 minutos em bomba de vácuo.

A titulação foi realizada dentro da cela de amostra por meio de injeções consecutivas de uma solução do peptídeo (nisina A ou nisina Z) utilizando uma seringa Hamilton com volume de 500 uL controlada por um bomba pistão 3810 (TA Instruments). A mistura na cela de amostra foi agitada durante todo o procedimento a uma taxa de 150 rpm utilizando um agitador de ouro do tipo hélice. O intervalo de tempo entre cada injeção foi de pelo menos 45 minutos, tempo suficiente para que o sinal registrado pelo equipamento retornasse à linha base. A temperatura de realização dos experimentos foi de $(25,0000 \pm 0,0001)^\circ\text{C}$. Para cada titulação, experimentos de titulação na ausência do MWCNT foram realizados para subtração dos efeitos de diluição do peptídeo.

A Tabela 1 mostra os volumes de injeção ($V_{\text{injeção}}$) e as concentrações iniciais do peptídeo ($C_{\text{titulante}}$) para cada experimento realizado.

Tabela 1. Condições experimentais dos experimentos de ITC

Peptídeo / pH	$V_{\text{injeção}}$ (uL)	$C_{\text{titulante}}$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
NisA_pH2	20	7,0
NisA_pH3	20	4,6
NisA_pH4	25	4,7
NisA_pH5	25	4,3
NisZ_pH2	20	7,0
NisZ_pH3	20	6,8
NisZ_pH4	25	4,6
NisZ_pH5	25	4,2

Os valores de entalpia de adsorção associados a cada injeção da solução do peptídeo na cela da amostra foram calculados pela Equação 8:

$$\Delta H_{ads} = \frac{\sum_i q_i}{\sum_i n_i} \quad (8)$$

em que q_i é a energia liberada ou absorvida na forma de calor após cada injeção i , que foi obtida a partir da integral da curva de potência versus tempo gerada pelo equipamento, e n_i é o número de mols adsorvidos em cada injeção.

A variação de entalpia padrão de adsorção, ΔH_{ads}^0 , foi determinada por meio da extrapolação da curva de ΔH_{ads} versus concentração de peptídeo, para concentração de nisina tendendo a zero.

Para determinação da entalpia molar associada à precipitação das nisinas A e Z (ΔH_{ppt}), titulações calorimétricas foram realizadas através da injeção de uma solução do peptídeo (nisina A ou Z), de concentração igual a $0,00199 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparada em uma solução tampão citrato-fosfato pH 2,00 sobre 2,7 mL de uma solução tampão citrato fosfato de pH 7,00. Foram realizadas 34 injeções consecutivas de 15 μL da solução titulante mantendo uma agitação constante de 120 rpm. O efeito de neutralização do tampão foi descontado pela titulação da solução tampão citrato-fosfato pH 2 na ausência do peptídeo.

3.3. Obtenção dos bionanocomplexos MWCNT-nisina

Dispersões de MWCNT de concentração fixa ($1,000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) contendo diferentes concentrações ($0,0500$ a $1,000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de nisina A ou nisina Z foram preparadas em valores de pH 2, 3, 4 e 5, conforme descrito no item 3.2. Os frascos foram selados e agitados manualmente por 10 minutos e em seguida deixados em repouso por 24 horas em um banho termostático Thermomix BM-S (B. Braum Biotech), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse período, as amostras foram sonicadas em equipamento Desruptor Eco-Sonics (Ultronique), utilizando-se uma micropona de 4 mm de diâmetro, por 5 minutos a 350 W de potência. A temperatura foi monitorada com um termômetro e mantida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com o auxílio de um banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Sigma[®] 4K15 a 5100 rpm por 1 hora a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para que os agregados maiores e de maior massa pudessem sedimentar, restando nos sobrenadantes, em sua maioria, tubos de MWCNTs isolados e cobertos com os peptídeos.

Cada amostra foi caracterizada por determinação do potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica e atividade antimicrobiana em solução e por difusão em meio sólido.

3.4. Medidas de potencial zeta (ξ)

O potencial eletrocinético (potencial zeta, ξ) da superfície dos MWCNTs e da superfície dos bionanocomplexos MWCNT-nis foi medido no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., UK). As medidas foram realizadas em duplicata, a 25 °C, utilizando-se cubetas apropriadas (*disposable folded capillary cell*).

3.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens MET foram coletadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss, modelo EM 109 a 80 kV, disponibilizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil.

Uma gota das dispersões foi colocada em grades de cobre de 300 *mesh* recobertas com filme de carbono (*holey-carbon grids*). As grades foram mantidas *overnight* em um dessecador contendo sílica gel para sua completa secagem. Em seguida, foi feito o contraste negativo com acetato de uranila 0,5 %.

3.6. Microscopia de força atômica (AFM)

Utilizou-se um microscópio de força atômica NT-MDT modelo NTEGRA PRIMA, disponibilizado no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da UFV, em modo de contato intermitente (*tapping mode*) e cantilever (L = 100 microns, W = 30 microns e T = 2 microns) com constante de força de aproximadamente 10 N·m⁻¹ e frequência de ressonância de 240 KHz. As imagens foram adquiridas com velocidade de 2 linhas·s⁻¹ (2 Hz).

As dispersões foram depositadas em um suporte de mica clivada e mantidas, *overnight*, em temperatura ambiente para sua completa secagem. A

análise das imagens obtidas foi feita utilizando o software padrão do microscópio.

3.7. Atividade antimicrobiana dos complexos MWCNT – peptídeos

3.7.1. Culturas bacterianas

Lactococcus lactis ATCC 19435, gentilmente cedido pela Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia Agrícola da UFV, foi utilizado como micro-organismo indicador da atividade da nisina. A cultura foi cultivada a 37 °C em meio Difco™ Lactobacilli MRS Broth.

3.7.2. Ensaio de difusão em ágar

A cultura de *L. lactis* foi ativada em 5 mL de caldo MRS e incubada a 37 °C por 18h.

Uma quantidade de 100 µL da cultura ativa com densidade populacional de $\approx 10^8$ UFC·mL⁻¹ foi misturada com 10 mL de meio Difco™ Lactobacilli MRS Agar e vertidos em placas de petri. Após a solidificação do ágar, orifícios de 5 mm de diâmetro foram feitos no meio, onde alíquotas de 25 µL das amostras foram aplicadas. Após incubação a 35 °C por 24 horas em incubadora B.O.D. 411/D (Nova Ética), o diâmetro do halo de inibição, quando formado, foi medido com paquímetro Mitutoyo®. A solução tampão citrato-fosfato nos pHs utilizados e água deionizada foram usadas como controles.

3.7.3. Ensaio em solução

A cultura de *L. lactis* foi ativada em 5 mL de caldo MRS e incubada a 37 °C por 18h.

Distribuiu-se 1 mL das amostras em tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo MRS. As amostras controle continham 1 mL do tampão citrato-fosfato no pH desejado, ou água deionizada. Em seguida, alíquotas de 20 µL da cultura celular ativa numa densidade populacional de $\approx 10^8$ UFC·mL⁻¹ foram adicionadas aos tubos. Neste ponto realizou-se o plaqueamento de diluições

seriadas do tubo controle contendo água, para a confirmação do número inicial de células inoculadas nos tubos. Após agitação em vórtex, os tubos foram incubados a 35 °C em banho incubador 501/DE (Nova Ética) com agitação, por 3 horas.

Após o período de incubação, diluições seriadas de cada tubo foram plaqueadas e o número de células viáveis foi determinado pelo método de contagem de colônias.

Todo o plaqueamento foi feito por espalhamento com auxílio de alça de Drigalski, em ágar MRS, e as placas foram incubadas em B.O.D. 411/D (Nova Ética) a 37 °C por 24h.

3.7.4. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial 7 x 2 (tratamentos x pHs), com três repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando-se o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS), versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Adsorção

4.1.1. Isotermas de adsorção

Uma isoterma é uma função que relaciona a quantidade de uma substância adsorvida (adsorvato) por unidade de área interfacial (ou por grama de adsorvente) com a concentração de equilíbrio do adsorvato na solução. Os dados de equilíbrio obtidos podem fornecer informações sobre a magnitude das interações envolvidas entre o adsorvato e o adsorvente e também sobre a capacidade de adsorção do adsorvente.

As isotermas de adsorção na Figura 7 mostram a quantidade adsorvida (Q_e) em mg de nisina A e nisina Z por grama de MWCNT, em função da concentração de equilíbrio dos peptídeos, em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, em tampão pH 2, a 25 °C.

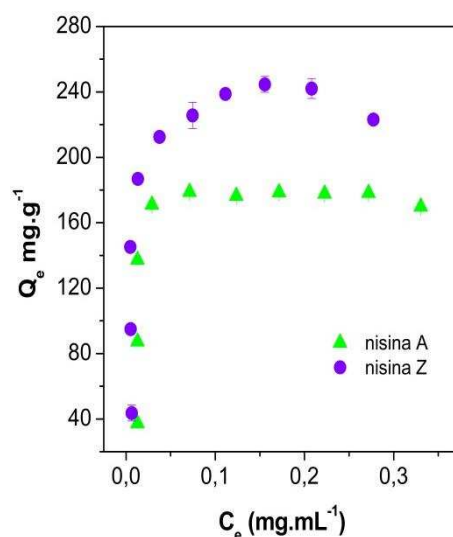


Figura 7. Isotermas de adsorção de nisina A (▲) e nisina Z (●) em MWCNT, pH 2 a 25 °C.

Observa-se que em baixas concentrações de peptídeo, $0 < [\text{nis-A}] < 0,0500$ e $0 < [\text{nis-Z}] < 0,1500$ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, há um aumento na quantidade adsorvida com o aumento da concentração de equilíbrio do peptídeo em solução. Em concentrações superiores a este intervalo, percebe-se a formação de um platô, onde o valor de Q_e não varia com o aumento da concentração do

peptídeo, o que possivelmente caracteriza a saturação da superfície do MWCNT. A inclinação elevada das isotermas no primeiro intervalo de concentrações reflete uma interação forte dos peptídeos com a superfície dos nanotubos. Os MWCNTs exibiram uma maior capacidade de adsorção para a variante Z da nisina ($\approx 250 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) do que para a nisina A ($\approx 180 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), sendo possível observar que a saturação da superfície do nanotubo ocorreu em concentrações de equilíbrio mais baixas para a nisina A.

As forças mais comuns envolvidas na adsorção de proteínas e peptídeos em superfícies são interações eletrostáticas, hidrofóbicas e forças de van der Waals. Os MWCNTs são estruturas com uma superfície de baixa polaridade e hidrofóbica, e de acordo com as medidas de potencial zeta apresentaram uma carga superficial próxima da neutralidade quando dispersos na solução tampão de pH 2. A nisina é um peptídeo anfifílico e em pH 2 está carregada positivamente (Figura 17). Dessa forma, a adsorção das duas variantes de nisina sobre a superfície dos MWCNTs pode ser atribuída à interação eletrostática existente entre os peptídeos e a superfície do nanotubo. Além de interações eletrostáticas, as interações hidrofóbicas possivelmente direcionam a parte hidrofóbica das moléculas de nisina ao longo da superfície do nanotubo, e a porção hidrofílica fica voltada para a solução, interagindo preferencialmente com as moléculas e íons na solução.

A diferença das quantidades adsorvidas observada entre os tipos de peptídeos, nisina A e Z, indica que as diferentes composições de suas cadeias modificam o delicado balanço de forças MWCNT-nisina, nisina-nisina e/ou nisina-componentes da solução, alterando a capacidade de adsorção do MWCNT para os diferentes peptídeos. Apesar de a diferença estrutural entre os peptídeos ser de apenas um aminoácido, estes aminoácidos possuem características específicas que podem explicar um maior ou menor valor de Q_e de cada variante de nisina nos MWCNTs. Em pH 2, a carga positiva da nisina A na porção hidrofílica é maior do que a da nisina Z devido à histidina na posição 27 presente na primeira variante. A histidina é um aminoácido polar carregado positivamente, enquanto a asparagina, presente na nisina Z, é um aminoácido polar neutro. Estes aminoácidos estão localizados na região hidrofílica da molécula e dessa forma, sugerem que a nisina A adsorve menos devido a uma maior repulsão eletrostática que ocorre entre as porções hidrofílicas mais carregadas das suas moléculas adsorvidas sobre a superfície dos MWCNTs. A

nisina Z, por ter sua porção hidrofílica menos carregada, adsorve um maior número de moléculas antes que a repulsão eletrostática entre elas seja suficientemente forte para que ocorra a saturação energética da superfície do MWCNT. Dessa forma, acredita-se que este seja o principal fator responsável pela diferença na capacidade de adsorção entre as duas variáveis da nisina em pH 2.

Outro fator que poderia contribuir para aumentar ou diminuir a quantidade adsorvida de uma molécula na superfície de MWCNTs é o tamanho da sua estrutura molecular. Estruturas maiores ocupariam uma área maior da superfície, impedindo que mais sítios fossem ocupados e conseqüentemente uma menor quantidade de moléculas conseguiriam adsorver. Chen *et al.* (2011), em um estudo sobre o comportamento de adsorção de cloridrato de epirrubicina (EPI) em nanotubos de carbono de paredes múltiplas e de paredes simples, concluíram que a área superficial externa foi o fator mais importante dominando a adsorção da EPI em CNTs devido à grande estrutura molecular do fármaco. Porém, os peptídeos nisina A e nisina Z possuem estrutura e peso molecular muito similar, não sendo, portanto, um fator determinante na diferença observada para os valores de Q_e das duas nisinas.

Guerra *et al.* (2005a) reportaram valores de adsorção de nisina A, a 25 °C e em pH 6, de $\approx 0,3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $\approx 0,6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $\approx 0,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ em superfícies de aço inoxidável, poli(tereftalato de etileno) - (PET) e borracha, respectivamente. De acordo com os autores, a adsorção em aço inoxidável exibiu uma inclinação inicial acentuada seguida por um aumento estável na concentração de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a partir da qual a quantidade adsorvida de nisina diminuiu levemente, sugerindo uma adsorção em monocamada. Entretanto, a adsorção de nisina nas superfícies de PET e borracha exibiu três fases, sugerindo que nessas superfícies a nisina se adsorveu em mais de uma camada.

Em outro trabalho, Guerra *et al.* (2005b) reportaram a adsorção da nisina em celofane, polímero derivado da celulose, exibindo pelo menos duas fases, não sendo observado um platô. A primeira fase exibiu uma inclinação inicial acentuada na faixa de concentração de nisina de 0 a $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguida por uma segunda fase onde a inclinação caiu com aumento da concentração. De acordo com os autores, o rápido aumento na adsorção observado na primeira fase demonstrou uma maior afinidade da nisina pela superfície,

relacionada à existência de sítios capazes de adsorver as moléculas de nisina. A diminuição observada na segunda fase foi relacionada à menor disponibilidade de sítios vazios devido à contínua cobertura da superfície do celofane. A quantidade máxima de nisina adsorvida na superfície do celofane, a 25 °C e pH 6, foi de $\approx 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de filme.

Em um estudo sobre a adsorção de nisina em superfícies de sílica de alta e baixa hidrofobicidade, Bower *et al.* (1995) também concluíram que a nisina não se adsorveu em uma monocamada simples. O estudo foi feito em pH 7 e a adsorção da nisina foi maior na superfície de alta hidrofobicidade ($\approx 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), concluindo-se que as potenciais aplicações de nisina podem ser mais adequadas para superfícies hidrofóbicas.

Ibarguren *et al.* (2014) estudaram a adsorção da nisina em argila montmorillonita (MMT), observando uma adsorção acentuada em baixas concentrações de nisina ($< 0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). De acordo com os autores, a curva descreveu uma adsorção em monocamada seguindo o modelo de Langmuir. A quantidade máxima adsorvida foi de aproximadamente 0,8 mg de nisina / mg de MMT.

Para efeito de comparação com os trabalhos citados, nossos resultados de quantidades máximas adsorvidas foram expressos em microgramas de nisina A e nisina Z por cm^2 de área de MWCNT, e estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Quantidades máximas adsorvidas de nisina A e Z em MWCNT, em diferentes valores de pH, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

pH	$Q_e(máx)$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	
	nisina A	nisina Z
2	0,095	0,130
3	0,115	0,135
4	0,133	0,151
5	0,154	0,163

Os valores de $Q_e(máx)$ reportados para todos os outros adsorventes (aço inoxidável, PET, borracha, celofane e sílica) foram superiores quando comparados com o $Q_e(máx)$ em MWCNTs. Estas diferenças na capacidade de adsorção podem ser relacionadas às diferentes características físicas e

químicas das superfícies utilizadas, principalmente sua composição elementar, hidrofobicidade, rugosidade, e a quantidade de poros na superfície, bem como suas cargas e energia livre (GUGALA e GOGOLEWSKI, 2004; GUERRA *et al.*, 2005).

4.1.1.1. Efeito do pH

O pH é um dos fatores mais importantes para o processo de adsorção, e seu efeito sobre a adsorção de proteínas, peptídeos e outros compostos em diferentes superfícies tem sido reportado por diversos autores (JONES e O'MELIA, 2000; CHEN *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2012; ADAMCZYK, 2012; SMITH *et al.*, 2014). Para substâncias ionizáveis, a variação do pH na solução resultará em uma mudança na especiação química, solubilidade e hidrofobicidade, conseqüentemente afetando as características de adsorção (WANG *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2012). Por exemplo, o pH determina a carga líquida de proteínas e estudando o efeito da concentração hidrogeniônica sobre o processo da adsorção, podemos determinar a contribuição das interações eletrostáticas sobre a interação proteína/nanotubos (MAGESTE, 2012). O mesmo efeito pode ser estendido para peptídeos. Dessa forma, o comportamento de adsorção da nisina A e Z nos MWCNTs também foi avaliado variando-se os valores de pH (pH = 2, 3, 4 e 5) abaixo do ponto isoelétrico da nisina ($\approx 8,5$), portanto mantendo sua carga líquida positiva. O efeito do pH do meio sobre as isotermas de adsorção da nisina A e nisina Z é mostrado na Figura 8A e Figura 8B, respectivamente.

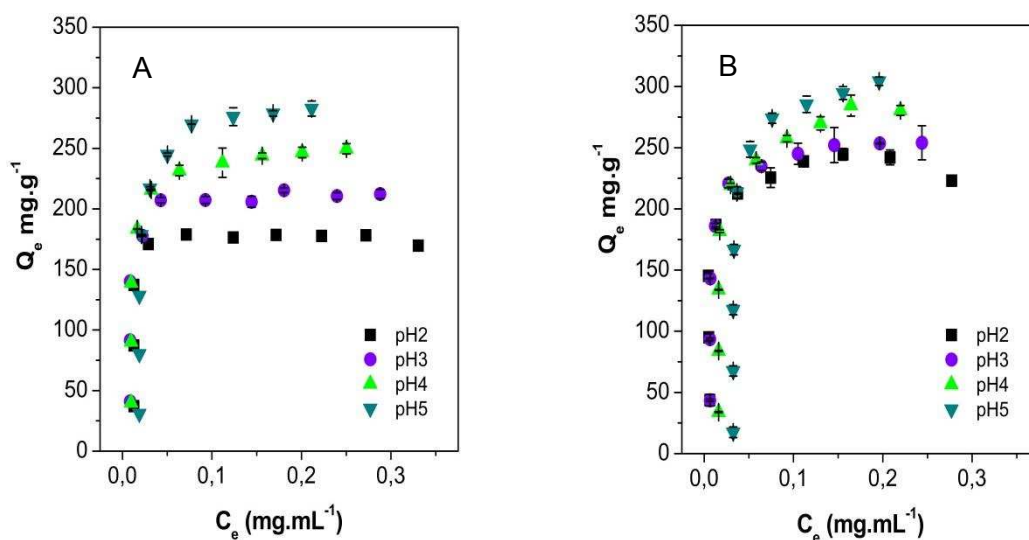


Figura 8. Isotermas de adsorção em diferentes valores de pH a 25° C para: (A) nisina A e (B) nisina Z.

Em baixas concentrações de ambos os peptídeos, o efeito do pH é pouco pronunciado, sugerindo que o processo de adsorção da nisina na superfície dos MWCNTs, é igualmente favorecido nos diferentes pHs, não sendo muito afetado pela densidade de carga presente nos peptídeos. Entretanto, com o aumento da concentração de equilíbrio dos peptídeos, o efeito do pH torna-se mais evidente. O aumento do pH provoca um aumento linear na quantidade máxima de nisina adsorvida, sendo este efeito mais pronunciado para a nisina A, como mostrado na Figura 9.

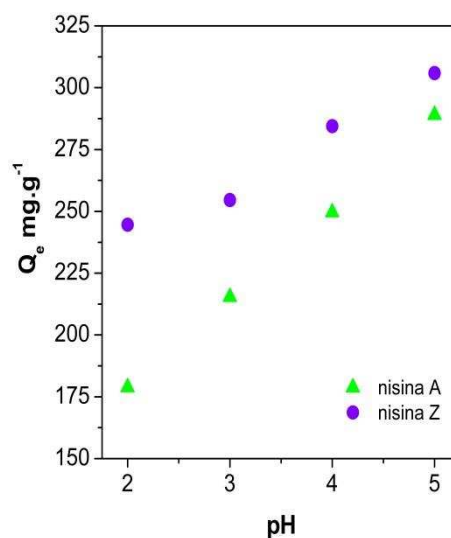


Figura 9. Efeito do pH na capacidade de adsorção das duas variantes de nisina em MWCNTs a 25 °C.

Como o efeito do pH não se manifesta no início do processo de adsorção, mas apenas quando a superfície está saturada, podemos inferir que este efeito da carga deve-se não a uma ação sobre a interação peptídeo-CNTs, mas sim às interações peptídeo-peptídeo presentes na interface do CNT. Assim, à medida que o pH da solução e a concentração de nisina aumentam, as forças eletrostáticas entre as moléculas de nisina adsorvidas na superfície dos MWCNTs passam a exercer um papel importante no processo de adsorção.

Com o aumento do pH, a carga líquida positiva da nisina diminui, reduzindo a interação eletrostática repulsiva entre as suas moléculas na superfície do nanotubo, de forma que mais moléculas conseguem se adsorver até que a saturação energética na superfície dos nanotubos seja atingida.

Adicionalmente, interações hidrofóbicas e de van der Waals desempenham um papel importante sobre o processo de adsorção das nisinas sobre o MWCNT. A porção N-terminal da cadeia polipeptídica contém um grande número de resíduos hidrofóbicos, especialmente os resíduos isoleucina, leucina e metionina, os quais possuem uma longa cadeia lateral hidrofóbica (CHAN *et al.*, 1989; VAN DE VEM *et al.*, 1991; NELSON e COX, 2006). A influência destas interações é confirmada pela quantidade de nisina adsorvida em pH 2 que, a despeito da repulsão eletrostática entre MWCNT e nisina, ainda é elevado. Diversos trabalhos têm sugerido que interações hidrofóbicas estão entre as principais responsáveis pela adsorção de peptídeos em superfícies de nanotubos de carbono (JANA *et al.*, 2013; ARNOLD *et al.*, 2005; DIECKMANN *et al.*, 2003), assim como outros solutos: surfactantes (BAI *et al.*, 2010; ZHONG e CLAVERIE, 2013), corantes (YAN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012) e compostos orgânicos (CHEN *et al.*, 2007; YANG e XING, 2010).

O efeito mais significativo do pH sobre a adsorção da nisina A (maior inclinação na curva da Figura 9), pode estar associado à histidina em sua cadeia polipeptídica, conforme discutido anteriormente. Interessantemente, à medida que o pH aumenta, a diferença entre as quantidades de nisina A e Z adsorvidas em MWCNT ($Q_{e(nisZ)} - Q_{e(nisA)}$) fica cada vez menor. Em pH 5 essa diferença é de apenas 16,98 mg·g⁻¹, sugerindo que à medida que o pH vai se aproximando do pK_a do resíduo de aminoácido histidina presente na nisina A, este é neutralizado e contribui para a diminuição da repulsão eletrostática entre

as porções hidrofílicas das moléculas desta variante de nisina sobre a superfície do MWCNT.

4.1.1.2. Ajustes aos modelos matemáticos

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de adsorção da nisina A e da nisina Z em MWCNTs duas abordagens foram utilizadas: o modelo de Langmuir e o modelo de Freundlich.

O modelo da isoterma de Langmuir é o modelo mais simples para descrever o processo de adsorção de solutos em superfícies sólidas, e assume que o processo de adsorção das moléculas ocorre por meio da formação de uma monocamada em uma superfície homogênea contendo um número finito de sítios uniformes que não interagem entre si.

O modelo de Freundlich é comumente utilizado para descrever as características de adsorção para superfícies heterogêneas. É uma equação empírica baseada na adsorção em superfícies contendo sítios aos quais estão associadas diferentes entalpias de adsorção. Assume-se que os sítios de ligações mais fortes são ocupados primeiro e que a força de ligação diminui com o aumento do grau de ocupação dos sítios.

Os dados experimentais em pH 2 ajustados pelos modelos de Langmuir e Freundlich são demonstrados na Figura 10. Para os demais valores de pH, resultados semelhantes foram obtidos e podem ser observados no Apêndice (Figura A1)

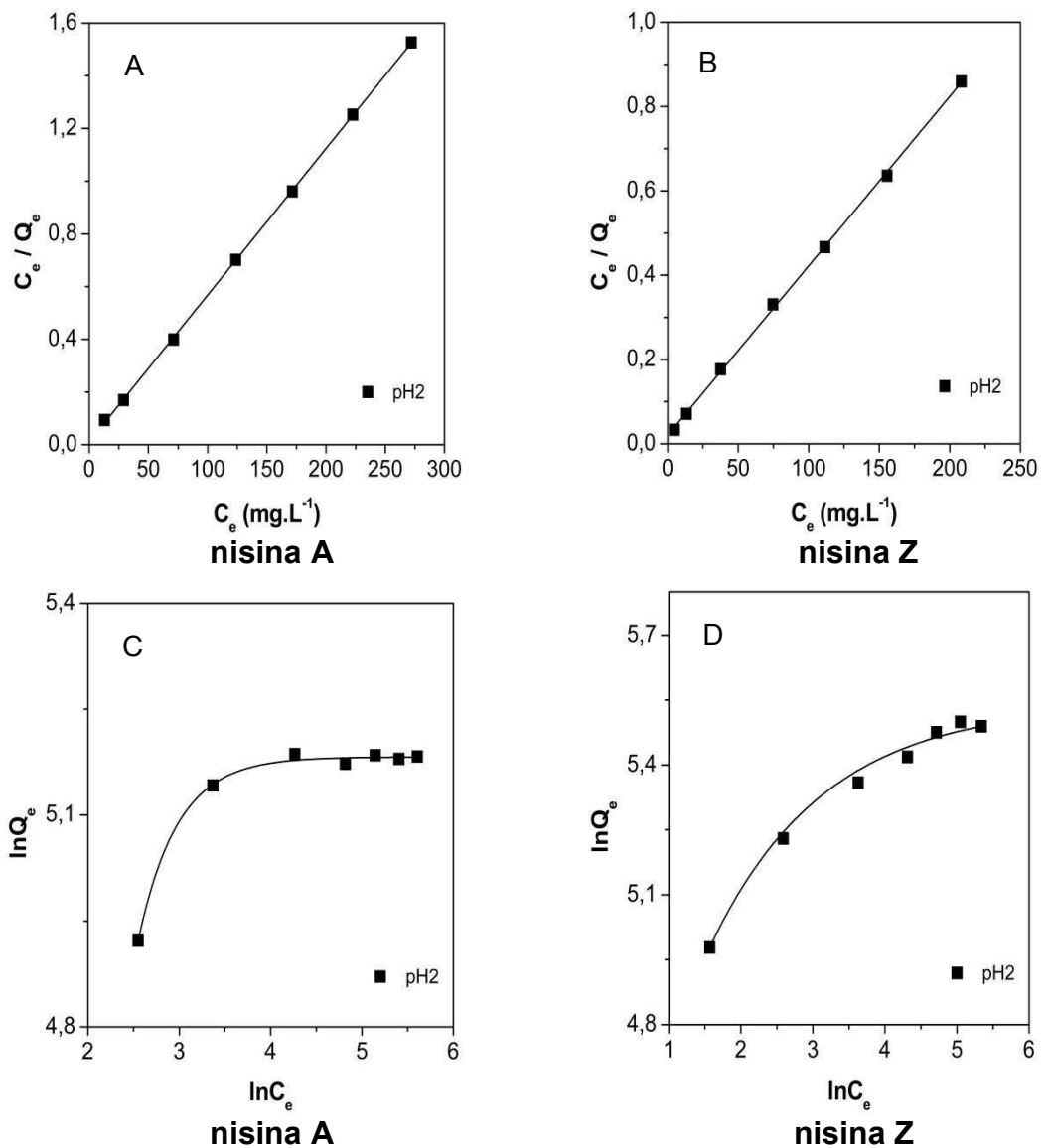


Figura 10. Isothermas de adsorção de nisina A e Z em MWCNTs, em pH 2, ajustadas com o modelo de Langmuir (A – B) e com o modelo de Freundlich (C – D).

A Tabela 3 lista os parâmetros das isothermas e os valores do coeficiente de correlação obtidos pela aplicação dos modelos de Langmuir e Freundlich para as nisinas A e Z em MWCNTs, em diferentes valores de pH.

Tabela 3. Parâmetros das isotermas de adsorção da nis-A e nis-Z em MWCNT em diferentes valores de pH, para os modelos de Langmuir e Freundlich.

Sistema	Langmuir			Freundlich			
	q_s (mg.g ⁻¹)	K_L (L.mg ⁻¹)	R^2	n	K_F mol ^(1-1/n) .L ^{1/n} .g ⁻¹	R^2	
nis-A	pH 2	179,86	0,48	0,9998	14,39	125,11	0,6618
	pH 3	215,05	0,27	0,9992	8,86	120,61	0,7981
	pH 4	254,45	0,15	0,9999	6,01	108,73	0,8417
	pH 5	312,50	0,06	0,9917	3,39	68,90	0,7665
nis-Z	pH 2	248,76	0,20	0,9995	7,51	125,58	0,9439
	pH 3	260,42	0,18	0,9999	6,53	119,89	0,8738
	pH 4	306,75	0,06	0,9964	3,92	80,84	0,8267
	pH 5	392,16	0,02	0,8952	2,27	36,08	0,6684

Analisando a Figura 10 e a Tabela 3, observa-se que não foi possível obter um ajuste linear pelo modelo de Freundlich, indicando que o mesmo não pode ser aplicado. O modelo de Langmuir se ajustou melhor aos dados, obtendo-se também valores de coeficiente de correlação maiores do que 0,99, sugerindo que a adsorção da nisina A e Z ocorre em monocamada. O parâmetro q_s indicou a maior capacidade de adsorção das nisinas com o aumento do pH, como já observado e discutido anteriormente. Entretanto, a constante K_L indica uma maior afinidade dos sítios de ligação dos MWCNTs com a diminuição do pH. A constante K_L está relacionada ao estado padrão em que não há a interação entre moléculas do adsorbato, ao contrário do parâmetro q_s que depende fortemente dessa interação. Portanto, a mudança no pH afeta de forma diferente os valores desses parâmetros.

A fim de compreender esse efeito do pH sobre a constante de Langmuir, e compreender as forças motrizes que regem o processo de adsorção da nisina sobre MWCNT, um estudo termodinâmico do processo de adsorção foi realizado.

4.1.2. Análise termodinâmica do processo de adsorção

Uma análise termodinâmica do processo de adsorção ajudará a entender os mecanismos de adsorção e a melhorar a aplicação prática dos MWCNTs em diversas áreas. Nenhum estudo anterior investigou os parâmetros termodinâmicos de peptídeos antimicrobianos como a nisina em MWCNTs. Neste trabalho, a termodinâmica de adsorção da nisina A e Z em MWCNTs foi analisada em quatro pHs diferentes.

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção padrão da nisina foram determinados a fim de compreender as diferentes contribuições energéticas (ΔH_{ads}^o) e configuracionais ($T\Delta S_{ads}^o$) para a adsorção da nisina. Os valores obtidos para a energia livre de Gibbs padrão de adsorção em cada valor de pH são apresentados na Tabela 4, e foram calculados segundo a relação termodinâmica descrita anteriormente pela Equação 6 no item 3.2.3.

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos de adsorção da nis-A e nis-Z em MWCNT em diferentes valores de pH.

Sistema	ΔG_{ads}^o (kJ·mol ⁻¹)	ΔH_{ads}^o (kJ·mol ⁻¹)	$T\Delta S_{ads}^o$ (kJ·mol ⁻¹)
nis-A pH 2	-42,60	-67,9	-25,30
pH 3	-41,14	-75,9	-34,76
pH 4	-39,63	-78,1	-38,47
pH 5	-37,35	-98,4	-61,05
nis-Z pH 2	-40,40	-40,5	-0,10
pH 3	-40,13	-45,1	-4,97
pH 4	-37,57	-83,5	-45,93
pH 5	-35,01	-99,7	-64,69

O ΔG_{ads}^o das nisinas A e Z em MWCNTs foram negativos nos quatro valores de pH estudados, indicando que o processo de adsorção foi espontâneo. Os valores de ΔG_{ads}^o tornam-se menos negativos com o aumento do pH para ambas as nisinas. Este efeito deve-se ao fato de que as moléculas de nisina e os nanotubos têm a carga superficial modificada com a alteração do

pH, demonstrando assim que as interações eletrostáticas contribuem para o processo de adsorção das nisinas em MWCNTs. Os sistemas termodinâmicos com ΔG_{ads}^0 menos negativo foram aqueles com maior quantidade máxima adsorvida ($Q_{e\ máx}$), sugerindo uma possível contradição. Entretanto, ΔG_{ads}^0 é um parâmetro relacionado ao estado padrão em que não há a interação entre moléculas do adsorbato presente na superfície do nanotubos de carbono, ao contrário do parâmetro $Q_{e\ máx}$ que depende fortemente dessas interações. Em geral os valores de ΔG_{ads}^0 foram mais negativos para a nisina A do que sua variante Z, indicando que o processo de adsorção depende da estrutura primária do peptídeo.

O parâmetro termodinâmico ΔG_{ads}^0 é a variação da energia livre de Gibbs do sistema quando um mol de moléculas de peptídeo, em regime de diluição infinita na solução, é adsorvido na superfície do MWCNT recobrimdo a metade dos sítios disponíveis. O ΔG_{ads}^0 é resultante de três contribuições: (1) a variação de energia livre de Gibbs associada à dessolvatação da superfície do nanotubo e das moléculas de peptídeo ($\Delta G_{des\ MWCNT}^0 + \Delta G_{des\ nis}^0$); (2) a variação da energia livre de Gibbs da interação peptídeo-MWCNT ($\Delta G_{int\ nis+MWCNT}^0$); (3) a variação da energia livre de Gibbs associada à troca de íons (i) entre a interface (S) peptídeo adsorvido/solução ($\Delta G_{ads\ i-S}^0$).

O efeito do pH sobre o ΔG_{ads}^0 pode ser atribuído à dependência da concentração hidrogeniônica dos parâmetros $\Delta G_{des\ MWCNT}^0 + \Delta G_{des\ nis}^0$ e $\Delta G_{ads\ i-S}^0$ pois, com a modificação das cargas interfaciais do peptídeo e do nanotubos, altera-se principalmente as interações nanotubo-nisina e íon-nisina adsorvida. Por outro lado o efeito da estrutura primária da nisina sobre o ΔG_{ads}^0 deve-se provavelmente a um maior efeito da troca dos aminoácidos histidina pela asparagina sobre os parâmetros $\Delta G_{des\ nis}^0$ e $\Delta G_{ads\ i-S}^0$, visto que a histidina é um aminoácido carregado e dessa forma interage mais com as moléculas de água e íons, enquanto a asparagina é um aminoácido neutro.

Para determinar a contribuição relativa das interações intermoleculares e das configurações para o processo de adsorção, precisamos entender como o pH e a mudança estrutural do peptídeo alteram as contribuições entálpicas e entrópicas para o processo de adsorção.

Os valores de ΔH_{ads} representam a energia total entálpica absorvida ou liberada quando um mol do peptídeo em sua conformação nativa presente em

solução é adsorvido sobre a superfície do adsorvente. A Figura 11 mostra as curvas de variação da entalpia de adsorção (ΔH_{ads}) em função da quantidade de peptídeo adsorvida Q_e , para a nisina A e nisina Z.

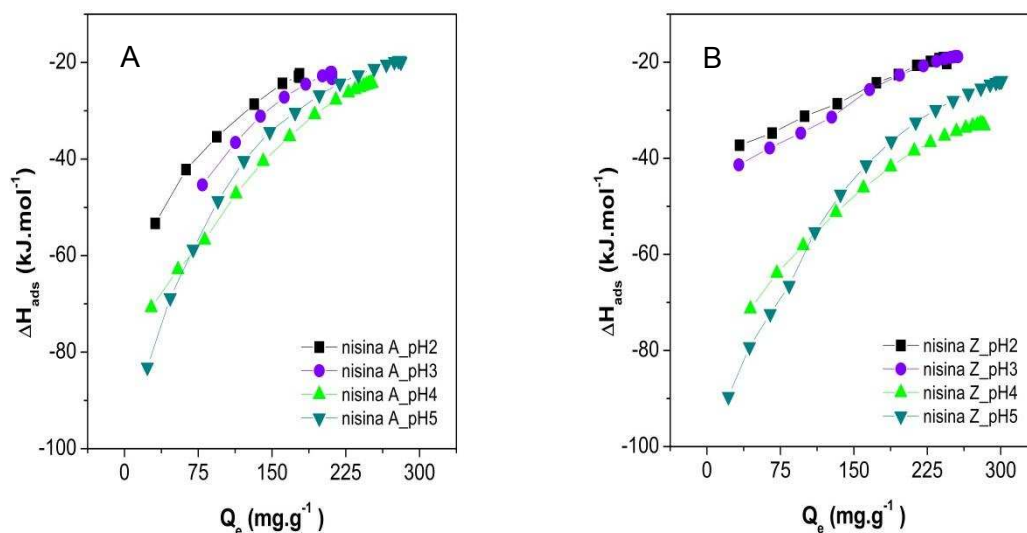


Figura 11. Dados calorimétricos de ΔH_{ads} em função de Q_e em diferentes valores de pH, a 25 °C, para (A) nisina A e (B) nisina Z.

Os valores de ΔH_{ads} mostram que a adsorção de ambas as nisinas nos diferentes valores de pH é entalpicamente favorecida para todos os valores de Q_e , ou seja, a adsorção do peptídeo ocorre com redução da entalpia do sistema. Apesar da hidrofobicidade da superfície do nanotubo, não apenas interações hidrofóbicas comandaram a adsorção das nisinas no MWCNT, pois caso as forças hidrofóbicas predominassem, o ΔH_{ads} deveria ser positivo. Dessa forma, concluímos que a interação da nisina com o nanotubo ocorre devido a interações específicas do tipo eletrostáticas, van der Waals e dispersões de London.

Por outro lado, com o aumento na quantidade de nisina adsorvida os valores de ΔH_{ads} se tornam menos exotérmicos. De acordo com o modelo de Langmuir, o ΔH_{ads} deveria ser constante em toda faixa de valores de Q_e , mostrando assim que apesar do processo de adsorção das nisinas em MWCNTs ajustarem-se às isotermas de Langmuir, medidas de entalpia mostram que este processo de adsorção é mais complexo do que o previsto pelo modelo de Langmuir. Provavelmente isso ocorre porque os sítios de adsorção na superfície dos MWCNTs são heterogêneos e/ou há interações ocorrendo entre moléculas de nisina adsorvidas em sítios vizinhos. Além disso,

as curvas de ΔH_{ads} versus Q_e são crescentes, mostrando assim que as interações nisina-nisina são repulsivas e dependentes da sua carga.

As curvas de ΔH_{ads} em função de Q_e também são dependentes da estrutura da nisina, do pH e dos valores de Q_e (Figura 12).

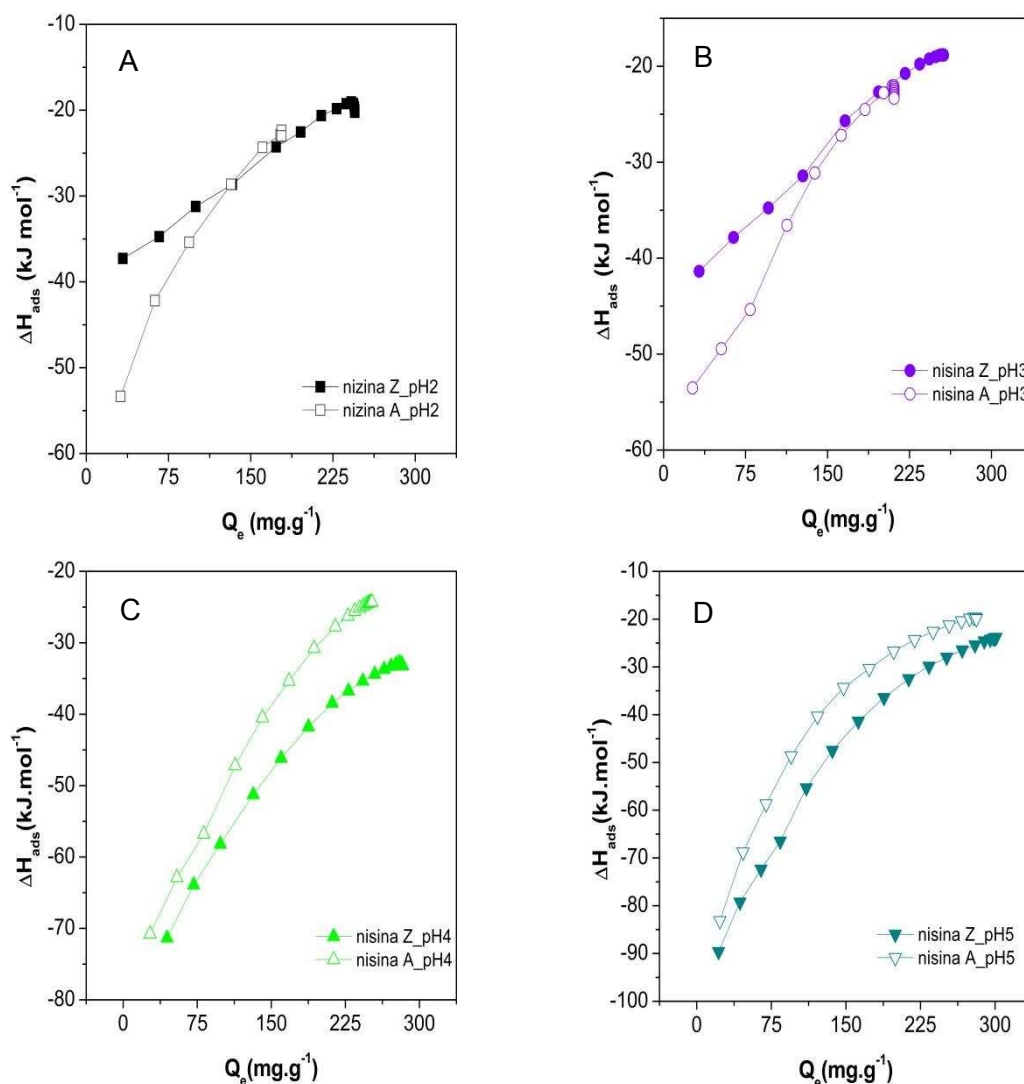


Figura 12. Comparação entre os dados calorimétricos de ΔH_{ads} em função de Q_e das nisinas A e Z em (A) pH 2, (B) pH 3, (C) pH 4 e (D) pH 5, a 25 °C.

Em valores de $\text{pH} \leq 3$ e $Q_e < 150 \text{ mg.g}^{-1}$, a nisina A apresentou valores de ΔH_{ads} mais negativos, enquanto que em valores de $Q_e > 150 \text{ mg.g}^{-1}$ as duas estruturas de nisina apresentaram valores semelhantes de ΔH_{ads} . Para condições de baixo recobrimento da interface do MWCNT pelas moléculas de nisina ($Q_e < 150 \text{ mg.g}^{-1}$), a principal contribuição para ΔH_{ads} advém da interação nisina-nanotubo, mostrando assim que esta interação depende da configuração primária dos peptídeos. Entretanto para altas densidades

moleculares de nisina adsorvida ($Q_e > 150 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), as principais contribuições para ΔH_{ads} provêm da interação nisina-nisina. Em pH baixo, as moléculas de nisina encontram-se carregadas, fazendo com que interações repulsivas eletrostáticas predominem, impedindo assim o aparecimento de contribuições entálpicas advindas das diferenças estruturais. Interessantemente, para valores de $\text{pH} \geq 4$, onde a carga da nisina é quase zerada, para toda a faixa de Q_e o ΔH_{ads} da nisina Z é mais negativo que o ΔH_{ads} da nisina A. Para compreendermos este efeito estrutural da nisina, devemos considerar que a magnitude de ΔH_{ads} de peptídeos reflete as contribuições de três subprocessos: (1) mudanças no estado de hidratação da superfície adsorvente e das moléculas dos peptídeos ($\Delta H_{ads\ hid}$); (2) a variação da energia da interação peptídeo-adsorvente ($\Delta H_{int\ nis+MWCNT}$); (3) associação / dissociação de íons com grupos carregados na superfície do peptídeo ($\Delta H_{ads\ i}$). O rearranjo conformacional da molécula de nisina é desprezível, uma vez que transições conformacionais em sua estrutura parecem não serem possíveis devido à presença de diversos anéis lantionina (BREUKINK *et al.*, 2000). Assim, o valor de ΔH_{ads} é a soma representada pela Equação 9:

$$\Delta H_{ads} = \Delta H_{ads\ i} + \Delta H_{int\ nis+MWCNT} + \Delta H_{ads\ hid} \quad (9)$$

Interessantemente, em $\text{pH} \leq 3$ é a nisina A que possui ΔH_{ads} mais exotérmico, enquanto em $\text{pH} \geq 4$ é a nisina Z que libera mais energia no processo de adsorção. Para entendermos este efeito estrutural, devemos considerar que ΔH_{ads} possui a contribuição do $\Delta H_{int\ nis+MWCNT}$ e do $\Delta H_{ads\ i}$. Em $\text{pH} \leq 3$, devido a processos de ionização de grupos funcionais o parâmetro $\Delta H_{ads\ i}$ contribui mais efetivamente para os valores de ΔH_{ads} , sendo assim, a nisina A terá um ΔH_{ads} mais exotérmico porque o aminoácido histidina ao se carregar positivamente faz com que um íon H^+ forme uma ligação covalente com o grupo NH_2 , liberando assim mais energia do que a liberada na adsorção da nisina Z, a qual possui o aminoácido asparagina não ionizável. Entretanto em $\text{pH} \geq 4$, devido à ausência de processos de ionização (peptídeo quase descarregado), é o $\Delta H_{int\ nis+MWCNT}$ que determina os valores do ΔH_{ads} . Esses resultados microcalorimétricos nos permitem concluir que a nisina Z interage

mais fortemente com os nanotubos de carbono do que a nisina A, entretanto os processos de ionização são mais efetivos na nisina A do que na nisina Z.

Para verificar se o efeito estrutural da nisina sobre a adsorção em MWCNT foi devido às diferentes interações que as duas nisininas fazem com as moléculas de solvente e íons na solução, um experimento de ITC foi realizado pela titulação de uma solução de nisina A ou Z solubilizada em tampão pH 2 a uma solução tampão pH 7. Os resultados são mostrados na Figura 13.

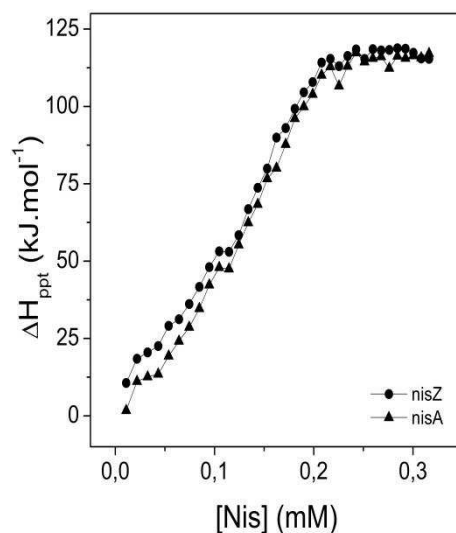


Figura 13. Dados calorimétricos de ΔH_{ppt} em função da concentração de nisina A e Z.

Os valores de variação de entalpia mostrados na Figura 13 são associados aos processos de diluição e neutralização dos solutos e, após o processo de saturação da solução pelos peptídeos, processos de interação nisina-nisina que levam à precipitação do peptídeo passam a contribuir para os valores de variação de entalpia. Como pode ser observado, os valores de entalpia medidos para as duas nisininas são similares, mostrando que as diferenças entre os processos de adsorção das duas nisininas não pode ser dividido a processos que ocorrem no bulk da solução, mas sim na superfície do nanotubo.

Por outro lado, o processo de adsorção é entropicamente desfavorecido, pois os valores de ΔS_{ads}^0 são negativos, reduzindo cada vez mais com o aumento do pH (Tabela 4). Possivelmente essa redução entrópica é causada pela diminuição da entropia configuracional do sistema devido à adsorção da nisina e de seus contra-íons presentes em sua dupla camada elétrica.

Observa-se uma grande diferença entre os valores de ΔH_{ads}^o e ΔS_{ads}^o entre as duas variantes da nisina em pH 2 e 3, enquanto que em valores de pH 4 e 5, essas diferenças praticamente não existem, indicando que em valores de pH mais baixos a nisina A adsorve-se expondo sua região hidrofílica para a solução enquanto que a nisina Z maximiza as interações hidrofóbicas ao interagir sua porção hidrofílica com a superfície do nanotubos, como discutido anteriormente. A variação de entropia corrobora com esta hipótese uma vez que, para a nisina Z a perda entrópica em pH 2 e 3 é menor, possivelmente pela liberação de um maior número de moléculas de água e íons que solvavam a nisina e o MWCNT, levando à uma diferença de $T\Delta S_{ads}^o \approx 25$ kJ.mol⁻¹. À medida que o pH aumenta, a diferença entre o número dessas moléculas que são liberadas é insignificante e dessa forma, os valores de $T\Delta S_{ads}^o$ não diferem em mais do que 4 kJ.mol⁻¹. Como discutido anteriormente para os valores de ΔH_{ads} , as diferenças nos valores de ΔH_{ads}^o da nisina A em relação à nisina Z nos valores de pH 2 e 3 deve-se também a processos reacionais entre grupos NH₂ dos aminoácidos e H⁺ presentes na solução, que fazem com que o parâmetro ΔH_{ads} contribua mais efetivamente para os valores de ΔH_{ads}^o . Sendo assim, a nisina A terá um ΔH_{ads}^o mais exotérmico porque o aminoácido histidina, ao se carregar positivamente, faz com que um íon H⁺ forme uma ligação covalente com o grupo NH₂, liberando assim mais energia do que a liberada na adsorção da nisina Z, a qual possui o aminoácido asparagina não ionizável.

4.2. Dispersões de bionanocomplexos MWCNT-nisina

Dispersões de MWCNTs foram obtidas por meio da interação com os peptídeos nisina A e nisina Z, formando bionanocomplexos MWCNT-peptídeo. A Figura 14 mostra os resultados da dispersabilidade das amostras de MWCNT-nisA (Figura 14A) e MWCNT-nisZ (Figura 14B), em pH 2.

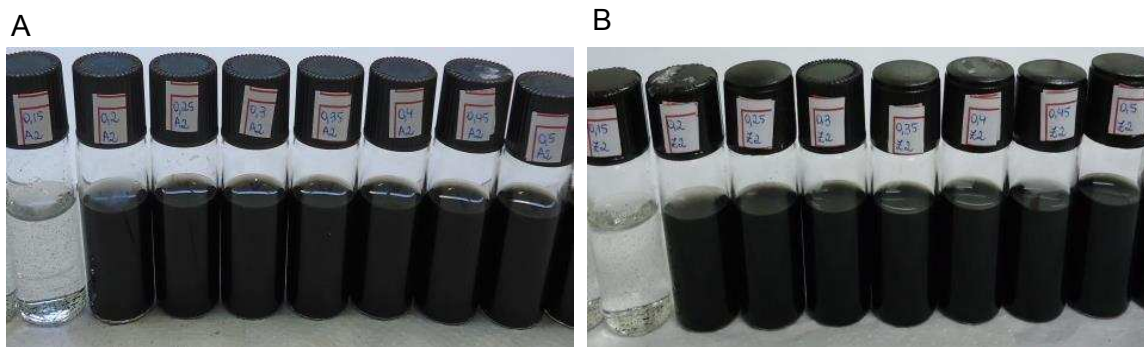


Figura 14. Fotografia das dispersões dos MWCNTs em solução tampão pH 2 em diferentes concentrações de nisina A (A) e nisina Z (B), após centrifugação.

Em pH 2, a partir de uma concentração inicial de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, ambas variantes da nisina produziram dispersões estáveis dos MWCNTs após sonicação por 5 minutos seguida de centrifugação por 1 hora. Isso sugere que as nisinas, que são peptídeos anfifílicos catiônicos, estejam atuando como surfactantes, resultando na funcionalização não-covalente dos MWCNTs e aumentando a sua estabilidade.

Uma vez que a carga iônica líquida dos peptídeos pode ser controlada pelo pH, a estabilidade dos bionanocomplexos também pode ser modificada. Assim, estudou-se o efeito do pH na estabilidade das dispersões MWCNT-peptídeo obtidas (Figura 15 e Figura 16).

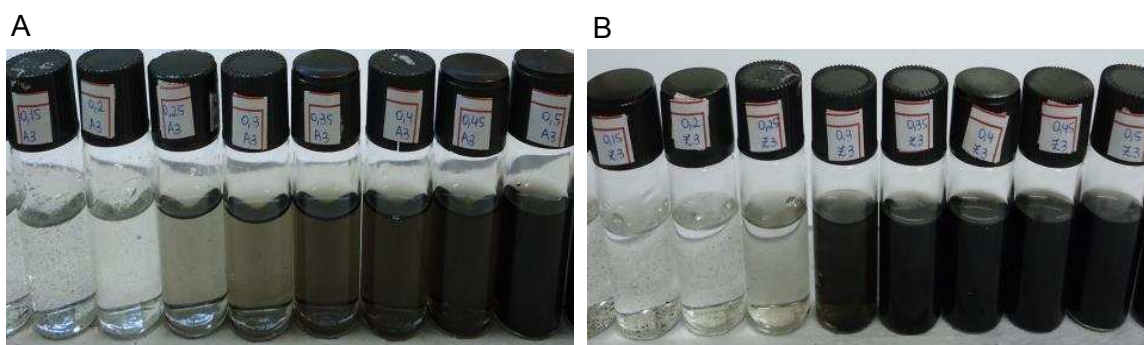


Figura 15. Fotografia das dispersões dos MWCNTs em solução tampão pH 3 em diferentes concentrações de nisina A (A) e nisina Z (B), após centrifugação.

Com o aumento do pH para 3, observa-se qualitativamente um efeito do tipo e da concentração da nisina nos resultados de dispersibilidade das amostras, e maiores concentrações dos peptídeos são necessárias para se obter dispersões dos MWCNTs visualmente semelhantes às obtidas em pH 2: $0,50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a nisina A (Figura 15A), e $0,35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a nisina Z (Figura 15B). Porém, observa-se que a concentração de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para

ambas as nisinas já é capaz de manter em suspensão uma certa quantidade de MWCNTs, devido à coloração cinza claro da solução. A coloração da solução torna-se mais escura à medida que a concentração do peptídeo aumenta, possivelmente devido a uma maior quantidade de MWCNTs em suspensão.

A partir do pH 4, não foi possível obter dispersões visualmente estáveis dos bionanocomplexos, pois após a etapa de centrifugação parece que todo o nanotubo sedimentou (Figura 16).

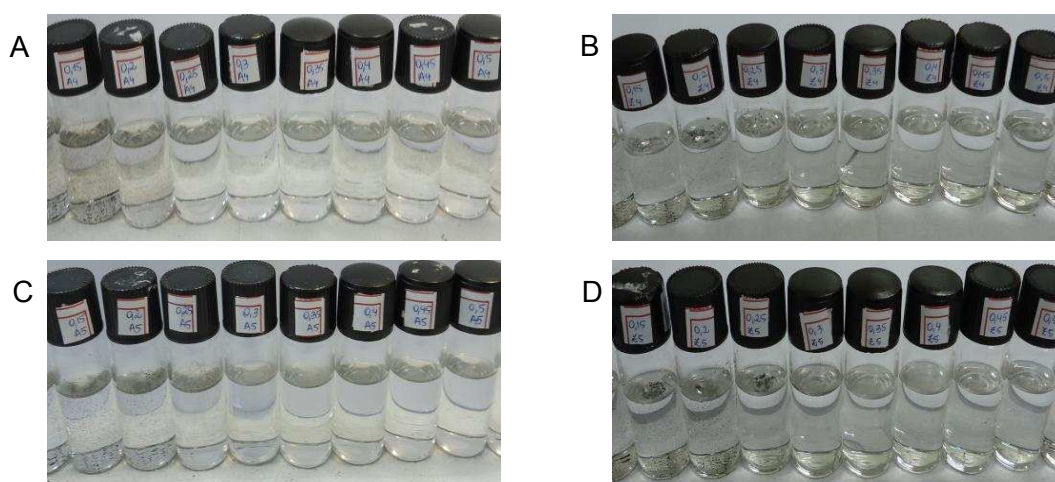


Figura 16. Fotografia das dispersões (A) MWCNT-nisA em pH 4; (B) MWCNT-nisZ em pH 4; (C) MWCNT-nisA em pH 5; (D) MWCNT-nisZ em pH 5, em diferentes concentrações dos peptídeos após centrifugação.

A solubilidade e estabilidade dos bionanocomplexos em meio aquoso é altamente dependente do pH, e, no caso dos MWCNTs funcionalizados com nisina, estes dois parâmetros aumentaram significativamente à medida que o pH diminui.

Isso pode ser explicado pelo fato de que a nisina é mais estável e possui maior carga líquida em pH 2. Sua estabilidade neste pH é tão alta que ela pode ser autoclavada sem sofrer inativação, resistindo também sem mudanças químicas ou biológicas quando estocada por dois meses sob refrigeração. Sua solubilidade cai de forma acentuada e contínua de $57 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pH 2, para aproximadamente $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pH 6; e ainda para $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pH 8,5, quando então se mantém constante (LIU e HANSEN, 1990).

Assim, os resultados de estabilidade das dispersões sugerem que, em pH 2, como as moléculas de nisina estão mais carregadas positivamente, ao se adsorverem sobre a superfície dos MWCNTs, a repulsão eletrostática entre os

complexos MWCNT-nis é aumentada mantendo-os em suspensão. Ou seja, a força de repulsão eletrostática dos bionanocomplexos é dominante em relação às forças atrativas de van der Waals dos nanotubos de carbono, de modo que a aglomeração é suprimida. Já nos valores de pH 4 e 5, a nisina está se aproximando de seu ponto isoelétrico, conseqüentemente sua carga líquida é reduzida e da mesma forma a partícula coloidal formada entre o MWCNT e a nisina também tem sua carga superficial reduzida, enfraquecendo as forças repulsivas que mantém os bionanocomplexos em suspensão. Nestas condições os bionanocomplexos começam a se aglomerar e sedimentam.

Com relação ao efeito do tipo de nisina observado na formação das dispersões em pH 3, este pode estar relacionado à diferença na composição de aminoácidos dos dois peptídeos. Ambas nisininas possuem uma estrutura similar, mas diferem em um resíduo de aminoácido na posição 27: histidina na nisina A e asparagina na nisina Z (MULDERS *et al.*, 1991). A histidina é um aminoácido polar carregado positivamente, que possui um grupo imidazol. É o único aminoácido comum que possui uma cadeia lateral ionizável com um pK_a próximo da neutralidade, e com isso, em pH 6 pode ter carga positiva ou estar na sua forma desprotonada. A asparagina é um aminoácido polar não carregado, mas que possui elevada hidrofiliçidade devido ao seu grupo funcional amida, que pode participar de ligações de hidrogênio (NELSON e COX, 2006).

Os nanotubos de carbono puros, sem modificações, têm uma forte tendência a se aglomerar e são insolúveis na maioria dos solventes devido às fortes interações de van der Waals entre suas superfícies. Entretanto, a associação a moléculas biológicas como proteínas, enzimas e peptídeos pode melhorar a solubilidade ou dispersabilidade dos nanotubos em solução (ARNOLD *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2011), como observado aqui. De acordo com Arnold *et al.* (2005), espera-se que a funcionalização de nanotubos de carbono com peptídeos seja útil em aplicações como biosensores e no desenvolvimento de novos materiais bioativos.

4.3. Potencial zeta (ξ)

A presença ou ausência de carga em partículas coloidais é extremamente importante, já que implica em aspectos significativos relacionados com a estabilidade dos sistemas coloidais (PIRES et al.; 2009).

Para a maioria dos materiais, quando uma superfície sólida entra em contato com uma solução aquosa, irá adquirir cargas em sua superfície. Essa carga pode ser devido à ionização de grupos funcionais da superfície, adsorção preferencial de íons da solução sobre a superfície, dissolução de sólidos iônicos ou outros mecanismos. A superfície carregada afeta a distribuição dos íons em sua vizinhança, atraindo contra íons e repelindo íons com carga de mesmo sinal, formando-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Quando se aplica um campo elétrico nesses sistemas contendo partículas coloidais, estas partículas juntamente com os íons mais fortemente ligados a ela em sua dupla camada elétrica movem-se como uma unidade, e o potencial elétrico no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial zeta (ξ), e pode ser medido experimentalmente. Apesar de não ser possível medir diretamente e com precisão a carga na superfície sólida, o potencial zeta é usado como sua estimativa, sendo uma caracterização valiosa das propriedades da dupla camada elétrica (WANG *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2011; PIRES et al.; 2009). A maior carga elétrica sobre a superfície de uma partícula coloidal significa uma dupla camada elétrica mais espessa, o que resulta no aumento da interação eletrostática repulsiva entre as partículas dispersas no meio, aumentando a estabilidade do sistema coloidal (JIANG *et al.*, 2009). Assim, o ξ pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Quanto maior o ξ , maior é a estabilidade das partículas, pois, as cargas irão repelir as partículas impedindo a agregação.

Para se ter uma estimativa da carga da nisina nos valores de pH estudados, o potencial zeta das duas variantes da nisina, na concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, foi medido em pH 2, 3, 4 e 5 (Figura 17).

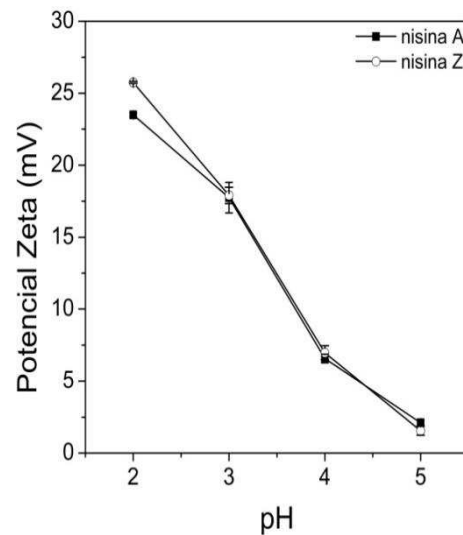


Figura 17. Potencial zeta das nisinas A e Z em função do pH da solução.

Com o aumento do pH da solução o potencial zeta das nisinas cai de $\approx + 25$ mV para $\approx + 2,0$ mV, não havendo diferenças significativas entre as variantes. Esta redução em sua carga superficial pode ser explicada pela protonação / desprotonação dos grupos ionizáveis da nisina, e conforme os peptídeos se aproximam de seu ponto isoelétrico, sua carga líquida se aproxima de zero. Lequeux *et al.* (2014) reportaram um valor próximo em pH = 5, de $\xi = + 3,5$ mV para a nisina em água Mili-Q com o pH ajustado com KOH (0,1 M).

As características de distribuição de cargas na superfície dos MWCNTs, contendo ou não os peptídeos nisA e nisZ adsorvidos, foram estudadas através de medidas do potencial zeta (ξ) das dispersões de nanotubos em diferentes concentrações de nisina e valores de pH, e estão representadas na Figura 18.

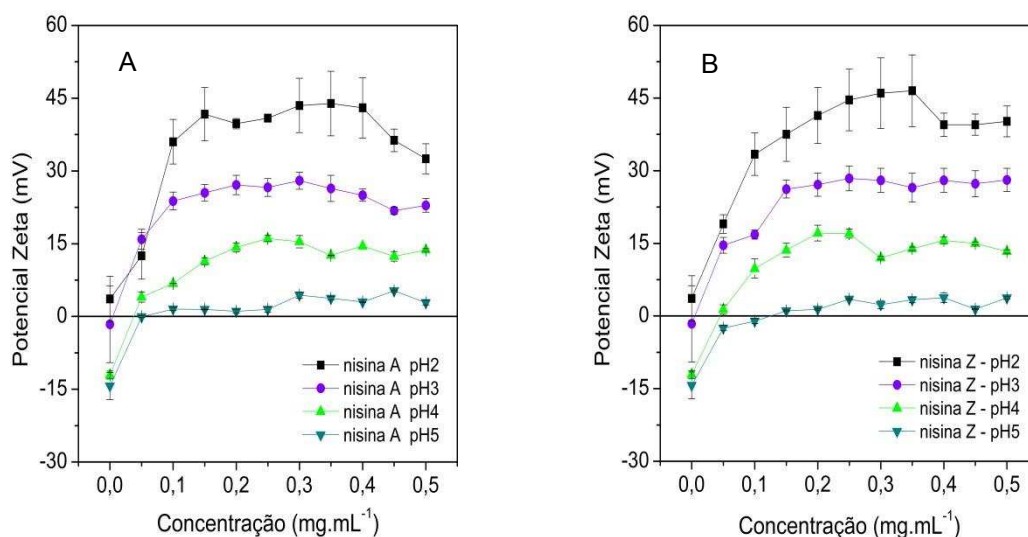


Figura 18. Potencial zeta dos MWCNTs em função da concentração de nisina A (A) e nisina Z (B), em diferentes valores de pH.

Na ausência dos peptídeos, a carga na superfície dos MWCNTs é negativa (exceto em pH 2) e torna-se mais negativa com o aumento do pH. Essa carga sobre a superfície dos nanotubos puros pode ser devido à ionização de grupos funcionais presentes na sua superfície, gerando cargas negativas, e também devido à adsorção preferencial de ânions do tampão na interface MWCNT / solução.

Na presença dos peptídeos o ξ da superfície dos MWCNTs aumentou e tornou-se positivo em todos os valores de pH estudados (exceto nas primeiras concentrações da nisina Z em pH 5) sugerindo que as moléculas dos peptídeos, que estão carregados positivamente (Figura 17), adsorveram-se às paredes dos tubos. Além disso, os valores também mostram que a carga na superfície da partícula coloidal varia com a concentração de nisina até certo ponto, estabilizando-se rapidamente, o que sugere a saturação da superfície dos MWCNTs com as moléculas do peptídeo.

Com o aumento do pH da solução houve uma queda acentuada nos valores de potencial zeta da superfície dos bionanocomplexos, possivelmente resultado da menor carga da nisina adsorvida e da redução da carga superficial dos sítios ainda disponíveis na superfície dos MWCNTs.

Um critério aproximado para a estabilização eletrostática e obtenção de dispersões estáveis é de que o valor absoluto do potencial zeta deve ser maior do que + 30 mV / - 30 mV (MURDOCK *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2009). Dessa forma, o $\xi \approx 45,0$ mV para as dispersões em pH 2 e $\xi \approx 30,0$ mV para as dispersões em pH 3, indicam a obtenção de dispersões estáveis dos

bionanocomplexos MWCNT-nis nestes valores de pH. O $\xi < 15,0$ mV para as dispersões em pH 4 e 5 indicam não haver uma estabilização eletrostática e estas dispersões encontram-se instáveis. Estes resultados corroboram com os resultados reportados no item 4.2.

Conclui-se que dispersões coloidais estáveis de bionanocomplexos MWCNT-nis foram obtidas em pH 2 e 3 por meio de uma estabilização eletrostática, conferida pela adsorção dos peptídeos carregados positivamente na superfície dos nanotubos de carbono.

4.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na microscopia eletrônica de transmissão o feixe de elétrons é transmitido através de uma amostra do material que se deseja observar, interagindo com o material à medida que o atravessa. Dessa forma, o contraste na imagem gerada é devido à absorção dos elétrons na amostra, espessura e composição do material. Como a imagem no MET é produzida pelo balanço da quantidade de elétrons que atingiram o detector e elétrons que foram retidos no tubo do microscópio, a imagem resultante é sempre em preto e branco, sendo as áreas escuras mais elétron-densas, e as áreas claras elétron-lucentes ou elétron-transparentes (CARNEIRO e JUNQUEIRA, 2007).

A microscopia eletrônica de transmissão é muito efetiva na observação da morfologia de CNTs, destacando-se como vantagem sua capacidade de alta resolução, que permite distinguir os tipos de nanotubos de carbono (de parede simples, de parede dupla ou paredes múltiplas), e se os CNTs estão em agregados ou não. Para distinguir o número de paredes é necessária uma ampliação bastante elevada. De um modo geral, a partir das imagens de MET é possível inferir sobre a pureza e a qualidade de uma amostra de nanotubos de carbono. Softwares para análise de imagem podem dar informações quantitativas sobre a pureza para agregados maiores de nanotubos (JORIO et al., 2008).

As imagens de MET evidenciaram algumas diferenças entre os MWCNTs puros e funcionalizados com os peptídeos (Figura 19).

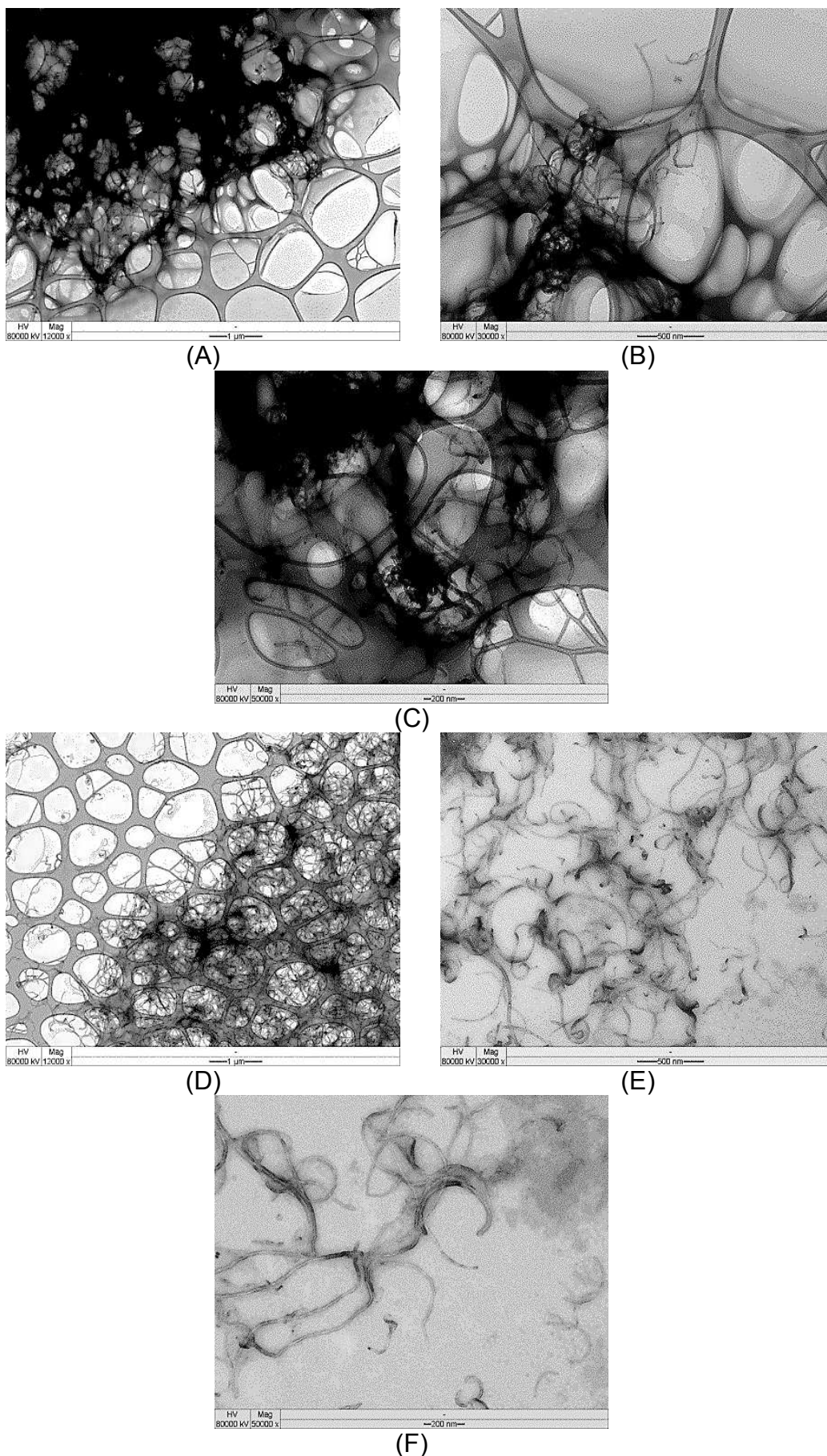


Figura 19. Imagens de MET das amostras de MWCNTs puros (A – C), e MWCNTs funcionalizados com nisina A, $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, em pH 2 (D – F), em três diferentes ampliações.

Quando os nanotubos puros são dispersos em solução tampão, o que se observa nas imagens de microscopia eletrônica são grandes aglomerados, sendo difícil a visualização de nanotubos individuais. A Figura 19A é representativa de toda a amostra, com um aumento de apenas 12.000x. Na maior ampliação, 50.000x (Figura 19C), é possível visualizar alguns MWCNTs individuais com diâmetro na ordem de nanômetros e comprimento na ordem de micrômetros.

Entretanto, na presença da nisina, observa-se que os nanotubos encontram-se mais dispersos e curtos, sendo possível observar nanotubos individuais mesmo na menor magnitude (Figura 19D). Isso comprova a capacidade da nisina de adsorver e manter os nanotubos dispersos em solução. Algumas manchas escuras concentradas em torno dos nanotubos podem ser observadas nas Figura 19E e Figura 19F, e podem estar associadas à nisina adsorvida, que por possuir baixa condutividade, interage pouco com o feixe de elétrons, formando-se uma imagem translúcida.

Resultados similares (nanotubos mais curtos e individualizados) foram reportados para MWCNTs funcionalizados com peptídeos tripticos (DESHPANDE e MAZUMDAR, 2012), e MWCNTs revestidos com peptídeos ramificados aniônicos e catiônicos (ARNOLD *et al.*, 2005).

4.5. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de AFM confirmam as diferenças observadas na MET, entre os MWCNTs puros (Figura 20 A – C) e funcionalizados com a nisina (Figura 20 D - F).

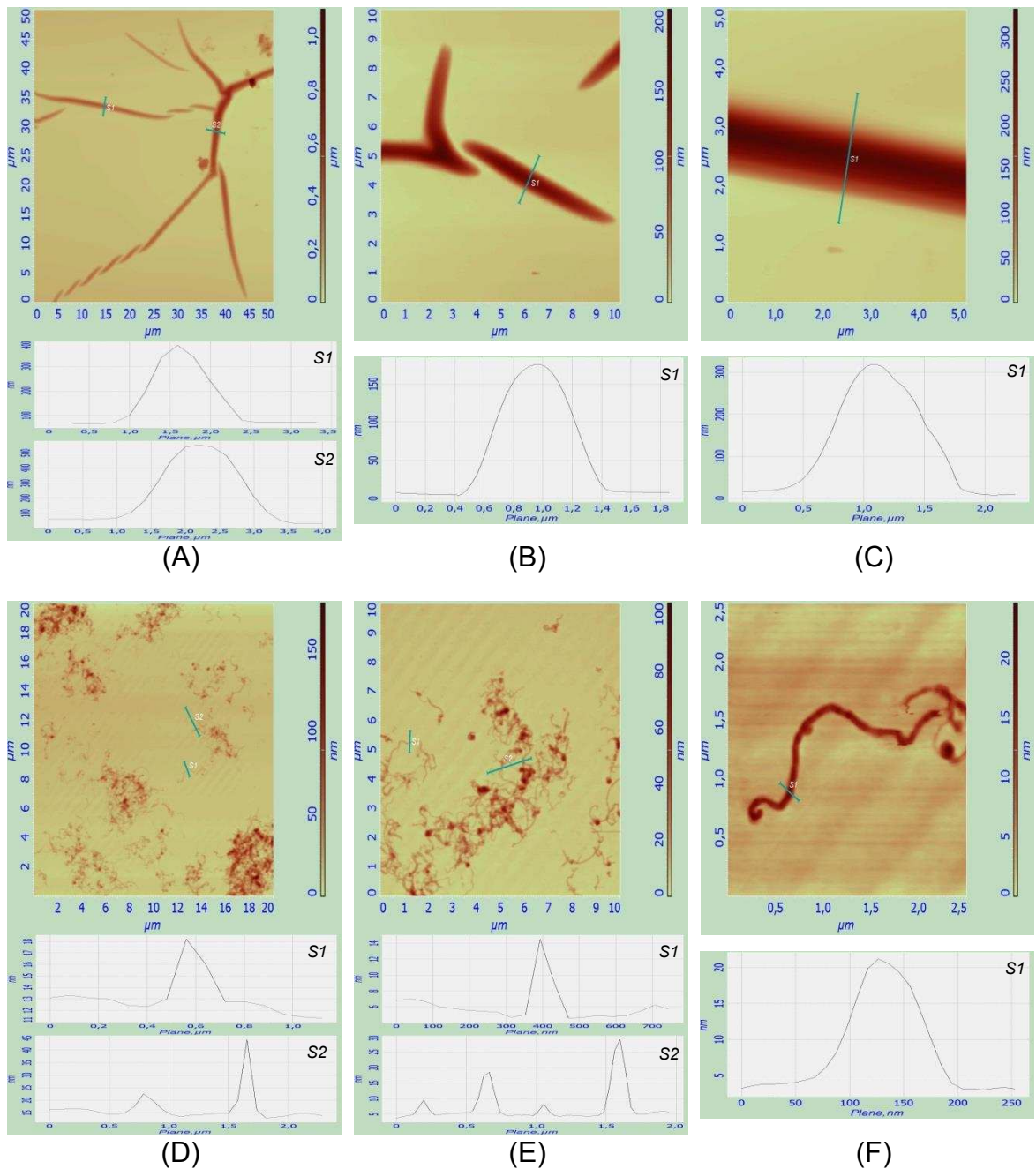


Figura 20. Imagens de AFM de MWCNTs puros (A – C), e MWCNTs funcionalizados com nisina (D – F), em três diferentes ampliações. Abaixo de cada imagem, os perfis das seções transversais dos MWCNTs, indicados pelas linhas azuis S1 e S2.

Considerando as dimensões das escalas em cada imagem, observa-se que os MWCNTs funcionalizados com a nisina estão presentes em maior quantidade e mais individualmente distribuídos sobre a superfície de mica. As imagens são parecidas com as obtidas por MET, confirmando que os MWCNTs conseguem permanecer em um estado não agregado quando modificado com os peptídeos. Isto também pode ser observado ao analisarmos a altura dos tubos nas seções transversais dos MWCNTs funcionalizados (Figura 20D – S1

e S2; Figura 20E – S1 e S2; e Figura 20F – S1). Estes valores proporcionam uma medida aproximada do diâmetro dos nanotubos, e estão de acordo com os valores fornecidos pelo fabricante (diâmetro médio: 10-40 nm), sugerindo que a maioria dos nanotubos visualizados são MWCNTs individuais. O formato mais curto e enrolado dos nanotubos funcionalizados é o mesmo observado nas imagens de MET.

Sheikholeslam *et al.* (2012) observaram imagens similares ao visualizarem MWCNTs funcionalizados com peptídeos anfifílicos, concordando sobre a excelente habilidade desses peptídeos em dispersar os nanotubos individualmente.

As imagens de AFM e as medidas de altura dos perfis transversais revelam uma grande diferença quando apenas os MWCNTs puros são analisados (Figura 20A, B e C). Visualizam-se poucos tubos, porém, muito maiores, alinhados e com uma superfície mais uniforme. Notam-se ainda algumas partes retorcidas, formando um espiral (Figura 20A). Comparando-se as escalas das imagens e das seções transversais S1 e S2, é possível sugerir que na ausência dos peptídeos, a maioria dos MWCNTs observados encontram-se agrupados em grandes feixes, com altura variando de 200 a 500 nm e aproximadamente 1 μm de largura. Isso pode ser explicado pelas interações entre as superfícies hidrofóbicas dos nanotubos, que faz com que eles se agrupem formando agregados para minimizar sua energia livre superficial. Sendo assim, conclui-se que o simples processo de sonicação em água ou solução tampão não consegue produzir MWCNTs puros individualmente dispersos e estáveis, como também observado por Liu *et al.* (2009).

4.6. Atividade antimicrobiana

4.6.1. Ensaio de difusão em ágar

Primeiro avaliou-se qualitativamente a atividade antibacteriana dos bionanocomplexos MWCNT-nisA e MWCNT-nisZ e dos MWCNTs puros pelo método de difusão em ágar contra o micro-organismo indicador *L. lactis*.

A interação dos tratamentos com o pH não foi significativa ($p > 0,05$), dessa forma, o pH das dispersões não influenciou na atividade antimicrobiana dos tratamentos.

O tampão citrato-fosfato não apresentou halo de inibição (Figura 21), comprovando que a solução de dispersão dos bionanocomplexos não exerceu ação inibitória contra o micro-organismo indicador e pode ser usada para os estudos de toxicidade. A avaliação da biocompatibilidade das soluções usadas como dispersantes em estudos microbiológicos é importante para que um resultado falso-positivo não seja reportado. Liu *et al.* (2009) utilizaram solução salina, Tween-20 e colato de sódio para dispersar nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) e estudar a atividade antimicrobiana dos nanotubos quando dispersos individualmente ou na forma e agregados. Os autores demonstraram que a solução salina e o surfactante Tween-20 não tiveram impactos na viabilidade de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Entretanto, o colato de sódio exibiu uma forte atividade antimicrobiana e não pôde ser usado como agente dispersante dos SWCNTs.

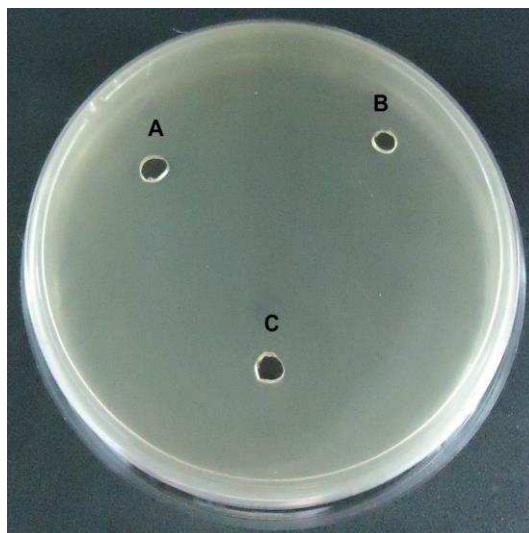


Figura 21. Controle das soluções dispersantes em ensaio antimicrobiano contra *Lactococcus lactis*: tampão citrato-fosfato em pH 2 (A); tampão citrato-fosfato em pH 3 (B); água deionizada (C).

Os nanotubos de carbono funcionalizados com os peptídeos nisina A e nisina Z apresentaram significativa atividade antibacteriana ($p < 0,05$), comparável à atividade observada para os peptídeos puros (Figura 22). Dessa forma, o fato da nisina estar adsorvida na superfície dos nanotubos não prejudicou a sua atividade antimicrobiana.

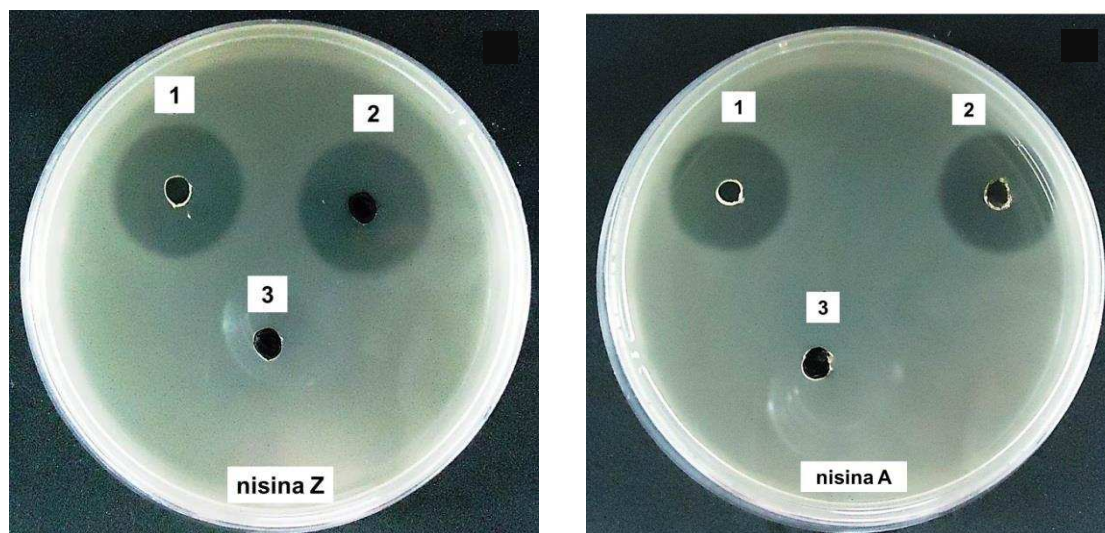


Figura 22. Fotos dos resultados dos ensaios de difusão em meio sólido contra *L. lactis*: nisina (1); MWCNT-nis (2); MWCNT (3).

A redução ou perda da atividade antimicrobiana da nisina quando adsorvida, pode ocorrer devido a mudanças em sua conformação induzidas pela superfície (BOWER *et al.*, 1995). O fato dos bionanocomplexos terem apresentado um halo de inibição maior ou igual ao do peptídeo puro indica que a nisina possivelmente não sofreu mudanças conformacionais drásticas em sua estrutura ao adsorver na superfície dos MWCNTs.

Pesquisas anteriores comprovaram que a nisina adsorvida em diferentes superfícies é capaz de reter sua atividade antimicrobiana (DAESCHEL *et al.*, 1992). Bower *et al.* (1995) demonstraram que a nisina adsorvida em superfícies de sílica pode reduzir a adesão celular e foi letal para as células de *Lysteria monocytogenes* que conseguiram aderir à superfície. Entretanto, de acordo com os autores, para exercer seu efeito antimicrobiano, a molécula de nisina deve primeiramente atravessar a membrana celular, o que só pode ocorrer após a sua dessorção da superfície.

Com os resultados aqui obtidos, é possível propormos duas situações para a atividade dos MWCNTs funcionalizados com a nisina: na primeira, a ação antimicrobiana observada ocorreu por meio da dessorção da nisina, possivelmente acelerada pela temperatura de incubação das placas ($\pm 37^\circ\text{C}$) necessária ao crescimento da bactéria; na segunda situação, a ação antimicrobiana ocorre sem que ocorra dessorção, e os próprios nanotubos atuam como carreadores das moléculas de nisina adsorvidas em sua superfície através da membrana celular da bactéria. Esta segunda proposição é uma das grandes aplicações estudadas atualmente para os nanotubos de carbono em

áreas da biologia e medicina. Bons resultados têm sido alcançados na sua aplicação como carreadores de fármacos e outras substâncias diretamente às células alvo (SIU *et al.*, 2014; BEHNAM *et al.*, 2013; LADEIRA *et al.*, 2010; PRATO *et al.*, 2008; KAM & DAI, 2006).

Os MWCNTs puros, sem nisina adsorvida, não apresentaram a formação de halos de inibição, concluindo-se que não possuem atividade antimicrobiana contra o micro-organismo testado pelo método de difusão em ágar (Figura 22-3).

Isso pode ser devido à baixa capacidade de difusão dos nanotubos de carbono no ágar, uma vez que os nanotubos puros são estruturas altamente hidrofóbicas e estão presentes na forma de grandes agregados, e o ágar é um meio extremamente hidrofílico. A formação de halo é dependente da difusão do composto e da velocidade de crescimento do microrganismo, fatores que podem ser afetados pela composição e umidade do meio de cultura (TOLEDO 200).

Resultado contrário foi observado por Zardini *et al.* (2012), que avaliaram a atividade antimicrobiana de MWCNTs puros e funcionalizados com os aminoácidos lisina e arginina. De acordo com os autores, apesar do seu halo de inibição ter sido menor quando comparado aos dos nanotubos funcionalizados, o MWCNT puro também apresentou significativa atividade antimicrobiana contra os patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. Alguns fatores que podem ter contribuído para essa diferença de resultados observada são os tipos de bactérias e o meio de cultura utilizados. Além de testar bactérias diferentes, o meio de cultura usado por Zardini *et al.* (2012) era composto de caldo triptona de soja (TSB) e agarose. Neste estudo, utilizamos a bactéria *Lactococcus lactis*, que, por ser uma bactéria láctica, necessita um meio de cultura específico para seu crescimento (ágar MRS). Outro parâmetro importante é a presença de grupos funcionais –COOH na superfície dos nanotubos de carbono, resultado do seu processo de purificação, o que aumenta sua hidrofiliidade e dispersividade (BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; XING *et al.*, 2005), e conseqüentemente promoveria uma maior difusão dos MWCNTs no ágar. No trabalho de Zardini *et al.* (2012), os autores não deixam claro se o MWCNT empregado no teste de difusão em ágar possuía ou não os grupamentos carboxila em sua superfície.

Os diâmetros médios dos halos de inibição para *L. lactis* pelos tratamentos avaliados encontram-se na

Tabela 5.

Tabela 5. Diâmetro médio dos halos de inibição para *L. lactis*.

Tratamentos	Diâmetro do halo (cm)
Água DI	0,00 ± 0,00 ^a
Tampão citrato-fosfato	0,00 ± 0,00 ^a
MWCNT	0,00 ± 0,00 ^a
MWCNT – nisA	2,02 ± 0,04 ^b
MWCNT – nisZ	2,11 ± 0,09 ^b
Nisina A	2,01 ± 0,07 ^b
Nisina Z	2,04 ± 0,05 ^b

^{a, b} Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey ($p > 0,05$). Valores de diâmetro de inibição incluem o diâmetro do orifício (0,5 cm).

4.6.2. Ensaio em solução

A atividade antibacteriana dos bionanocomplexos e dos MWCNTs puros também foi avaliada quantitativamente contra o micro-organismo indicador *L. lactis*, pelo método de contagem em placas.

A interação dos tratamentos com o pH não foi significativa ($p > 0,05$), dessa forma, o pH das dispersões não influenciou na atividade antimicrobiana dos tratamentos.

A Figura 23 mostra a redução no número logarítmico de células viáveis nos tubos após 3 horas de tratamento com os MWCNTs, funcionalizados ou não. A concentração inicial de células foi de $\approx 10^6$ UFC·mL⁻¹. As reduções logarítmicas das amostras foram calculadas em relação à amostra controle, que continha apenas água.

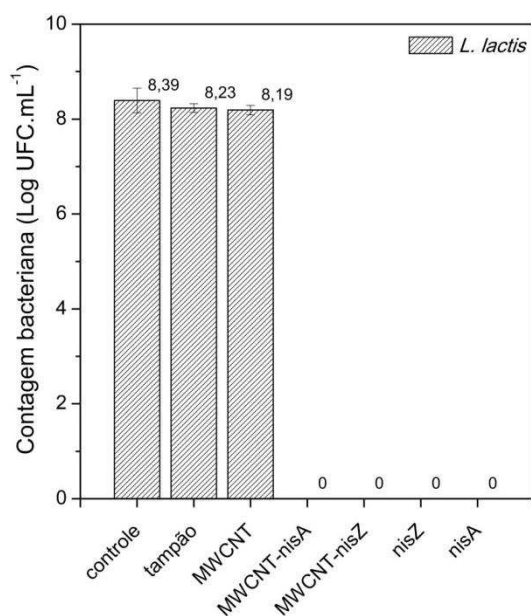


Figura 23. Número de células viáveis no controle e amostras tratadas com MWCNTs, funcionalizados ou não com os peptídeos nisina A e nisina Z, após 3 h de incubação a 35 °C.

O tampão citrato-fosfato e os MWCNTs puros não causaram efeito significativo ($p > 0,05$) no número de células viáveis (redução de 0,16 log e 0,20 log, respectivamente). Durante os experimentos, observou-se que os MWCNTs puros permaneceram na forma agregados suspensos na solução, o que também pôde ser confirmado pelas imagens de microscopia. Isto pode ter prejudicado o contato direto com as células dificultando sua ação mecânica contra a membrana celular. Esta ideia é suportada pelo trabalho de Kang *et al.* (2008a), que observaram uma correlação entre citotoxicidade bacteriana e propriedades físico-químicas que aumentam as oportunidades de contato entre os MWCNT e as células. Por exemplo, de acordo com os autores, observou-se maior toxicidade quando os nanotubos estavam com suas extremidades abertas, desagrupados, curtos e dispersos em solução. Liu *et al.* (2009) reportaram que SWCNTs dispersos individualmente foram mais tóxicos para bactérias do que quando estavam na forma de agregados, pois os nanotubos dispersos agiram como numerosos “nano dardos” movendo-se em solução e constantemente atacando as células bacterianas, causando uma degradação da integridade celular que levaria à morte da bactéria.

Arias e Yang (2009) acompanharam as curvas de crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas após tratamento com MWCNTs e também observaram que os MWCNTs não apresentaram atividade antimicrobiana em água deionizada, solução salina (NaCl 0,9 %), tampão

fosfato-salino ou caldo BHI. Mesmo concentrações maiores de nanotubos não causaram qualquer redução significativa no número de células viáveis, exceto os MWCNTs funcionalizados com grupos –OH, que levaram a uma redução de 0,43 log na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 0,77 log na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Estes resultados também são consistentes com o estudo de Kang *et al.* (2008b), onde os MWCNTs demonstraram ser muito menos tóxicos para células bacterianas do que SWCNTs. Apesar dos autores terem observado que os MWCNTs conseguiram inativar aproximadamente 24 % das células de *Escherichia coli* em uma população de 10^7 UFC·mL⁻¹ após um ensaio em solução a 37 °C, é um valor muito baixo quando comparado à inativação, de cerca de 80 % das células, causada pelos SWCNTs. O resultado foi comprovado por estudos de atividade metabólica das células e por imagens de microscopia eletrônica de varredura, onde apenas uma pequena quantidade de células expostas aos MWCNTs perdeu sua integridade celular e a maioria das células permaneceu intacta como as células do controle.

Da mesma forma que observado no ensaio em meio sólido, os nanotubos de carbono funcionalizados com os peptídeos nisina A e nisina Z apresentaram significativa atividade antibacteriana ($p < 0,05$). Houve a total inibição do crescimento de *L. lactis* (redução $> 8,0$ log), mesmo resultado observado para os peptídeos puros.

Por meio das imagens de MET e AFM (Figura 19 e Figura 20, respectivamente), é possível observar que os nanotubos funcionalizados com a nisina tornaram-se mais curtos e individualmente dispersos na solução. Estes fatores são extremamente importantes para o efeito tóxico dos MWCNTs, favorecendo a sua interação com as células (KANG *et al.*, 2008a), podendo até mesmo penetrar a membrana, o que aumentaria a sua permeabilidade, com a consequente redução da atividade metabólica e morte da bactéria (MOHAN *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2008b; Ernst *et al.*, 2000).

Dessa forma é possível imaginar um efeito sinérgico entre os nanotubos e a nisina, que levou à completa inibição das bactérias. O fato de não terem sido observadas diferenças na atividade dos bionanocomplexos e da nisina pura, confirma a hipótese de que a nisina adsorvida não reduziu ou perdeu sua atividade, e consequentemente sua molécula não deve sofrer grandes transformações conformacionais com o processo de adsorção. Porém não é

possível afirmar se os bionanocomplexos foram mais eficientes do que a nisina pura e se realmente houve um efeito sinérgico entre nanotubos e peptídeos, uma vez que a concentração testada foi suficiente para eliminar toda a população bacteriana.

A nisina exerce sua atividade antimicrobiana ao interferir na síntese da membrana celular ligando-se ao lipídio II. Sua molécula consegue então permeabilizar a membrana, levando à formação de poros com o consequente extravasamento do conteúdo celular e morte da bactéria (HASPER *et al.*, 2004).

Apesar dos MWCNTs em geral exibirem uma atividade antimicrobiana pouco efetiva, especialmente quando comparado aos SWCNTs, sua eficiência antimicrobiana pode ser melhorada por meio da combinação com outros antimicrobianos, como a nisina. Diversos trabalhos reportam a associação de MWCNTs com peptídeos (QI *et al.*, 2011; AMIRI *et al.*, 2012; ZARDINI *et al.*, 2012;), proteínas (HORN *et al.*, 2012), e nanopartículas (MURUGAN e VIMALA, 2011; YUAN *et al.*, 2008), resultando em excelentes propriedades antimicrobianas, capazes de inibir completamente o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

De acordo com Qi *et al.* (2011), os peptídeos antimicrobianos são uma classe de moléculas com grande potencial para ser explorado na melhoria das propriedades antimicrobianas e anti-adesão dos MWCNTs. Especialmente a nisina, um peptídeo antimicrobiano natural e econômico, é um bom candidato por possuir grande eficácia contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas, alta estabilidade, baixa toxicidade para humanos e baixa propensão em induzir resistência bacteriana.

5. CONCLUSÕES

- MWCNTs podem ser funcionalizados não-covalentemente com o peptídeo antimicrobiano nisina, nas suas variáveis A e Z, obtendo-se dispersões estáveis e funcionais em pH 2 e 3;
- O principal mecanismo de estabilização das dispersões é a estabilização eletrostática, conferida pela adsorção dos peptídeos carregados positivamente na superfície dos nanotubos de carbono.
- Pela primeira vez o comportamento de adsorção das nisinas A e Z foi estudado em superfícies de MWCNTs. Elevados valores de quantidade máxima adsorvida foram observados para ambas as nisinas, apontando a potencialidade do MWCNT como adsorvente para essas biomoléculas e a obtenção de conjugados peptídeos-nanotubos com aplicações estratégicas. A forte influência do pH sugere que as interações eletrostáticas entre MWCNT-nisina e entre as moléculas de nisina adsorvidas desempenham um importante papel no processo de adsorção.
- O estudo termodinâmico indicou que a adsorção da nisina em MWCNTs é um processo espontâneo ($\Delta G_{ads}^o < 0$), exotérmico e entalpicamente favorecido ($\Delta H_{ads}^o < 0$). Por outro lado, o processo de adsorção é entropicamente desfavorecido (os valores de ΔS_{ads}^o são negativos), possivelmente pela diminuição da entropia configuracional do sistema devido à adsorção da nisina e de seus contra-íons presentes em sua dupla camada elétrica. Além disso, esses valores são dependentes do tipo de peptídeo e do pH do meio. Assim, pode-se inferir que a adsorção da nisina em MWCNTs é regida por interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas, que possivelmente direcionam a parte hidrofóbica das moléculas de nisina ao longo da superfície do nanotubo, e a porção hidrofílica fica voltada para a solução, interagindo preferencialmente com as moléculas e íons na solução.
- Os nanotubos de carbono funcionalizados com os peptídeos nisina A e nisina Z apresentaram significativa atividade antibacteriana, comprovando que o fato da nisina estar adsorvida na superfície dos nanotubos não prejudicou a sua atividade antimicrobiana.

- A nisina não sofre grandes mudanças conformacionais ao adsorver na superfície dos MWCNTs.
- Os bionanocomplexos MWCNT-nisina apresentam potencial aplicação para o desenvolvimento de nanocompósitos ativos, com a possibilidade de uma eficiente dispersão dos nanotubos na matriz polimérica, tornando-a mais resistente e ao mesmo tempo exibindo também propriedades antimicrobianas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABTS, A. **The Nisin ABC - Investigating the maturation process of the lanthipeptide nisin**. Inaugural-Dissertation. Doutorado na Faculdade de Matemática e Ciências Naturais. Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 214p., 2013.

ADAMCZYK, Z. Modeling adsorption of colloids and proteins. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 17, p. 173–186, 2012.

ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 28, n. 1–2, p. 1-63, 2000.

AMIRI, A.; ZARDINI, H. Z.; SHANBEDI, M.; MAGHREBI, M.; BANIADAM, M.; TOLUEINIA, B. Efficient method for functionalization of carbon nanotubes by lysine and improved antimicrobial activity and water-dispersion. **Materials Letters**, v. 72, p. 153–156, 2012.

ARAUZ, L.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**. v. 20, p. 146-154, 2009.

ARIAS L. R.; YANG, L. Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions. **Langmuir**. v. 25, p. 3003-3012, 2009.

ARNOLD, M. S.; GULER, M. O.; HERSAM, M. C.; STUPP, S. I. Encapsulation of Carbon Nanotubes by Self-Assembling Peptide Amphiphiles. **Langmuir**. v. 21, p. 4705-4709, 2005.

AZEREDO, H. M. C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**. v.2, p.1240–53, 2009.

BAI, Y.; LIN, D.; WU, F.; WANG, Z.; XING, B. Adsorption of Triton X-series surfactants and its role in stabilizing multiwalled carbon nanotube suspensions. **Chemosphere**. v. 79, p. 362–367, 2010.

BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. Chemically functionalized carbon nanotubes. **Small**. v. 1, p. 180–192, 2005.

BEHNAM, B.; SHIER, W. T.; NIA, A. H.; ABNOUS, K.; RAMEZANI, M. Non-covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with modified polyethyleneimines for efficient gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 454, p. 204-215, 2013.

BHATTACHARYYA, S.; SINTUREL, C.; SALVETAT, J. P.; SABOUNGI, M.-L. Protein-functionalized carbon nanotube-polymer composites. **Applied Physics Letters**. v. 86, p. 113104, 2005.

BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 992–997, 1995.

BRADLEY, E. L.; CASTLE, L.; CHAUDHRY, Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**. v.22, p.604-610, 2011.

BREUKINK, E.; GANZ, P.; KRUIJFF, B.; SEELIG, J. Binding of nisin z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry. **Biochemistry**. v. 39, p. 10247-10254, 2000.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1462, p. 223-234, 1999.

CALVARESI, M.; ZERBETTO, F. The Devil and Holy Water: Protein and Carbon Nanotube Hybrids. **Accounts of Chemical Research**. v. 46, p.2454-2463, 2013.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. **Histologia Básica – 11ªed**. Rio de Janeiro, 529 p., 2007.

CASSEL, A. M.; RAYMAKERS, J. A.; KONG, J.; DAI, H. Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 103, p. 6484-6492, 1999.

CHAN, W. C.; LIAN, L. Y.; BYCROFT, B. W.; ROBERTS, G. C. K. Confirmation of the structure of nisin by complete ¹H N.M.R. resonance assignment in aqueous and dimethyl sulphoxide solution. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**. p. 2359–2361, 1989.

CHAUDHRY, M. Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A. B. A.; CASTLE, I.; AITKEN, R. J.; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants**. 25, 241-258, 2008.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 2, p. 82-100, 2003.

CHEN, W.; DUAN, L.; ZHU, D. Adsorption of Polar and Nonpolar Organic Chemicals to Carbon Nanotubes. **Environmental Science & Technology**. v. 41, p. 8295–8300, 2007.

CHEN, Z.; PIERRE, D.; HE, H.; TAN, S.; PHAM-HUY, C.; HONG, H.; HUANG, J. Adsorption behavior of epirubicin hydrochloride on carboxylated carbon nanotubes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 405, p. 153–161, 2011.

CHENG, Y.; LIU, G. R.; LI, Z. R.; LU, C. Computational analysis of binding free energies between peptides and single-walled carbon nanotubes. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**. v. 367, p.293-304, 2006.

CIENTIFICA. **Nanotechnologies in the food industry**. Publicado em Agosto de 2006. Disponível em: www.cientifica.com/www/details.php?id=47.

- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, p. 777-788, 2005.
- DAESCHEL, M. A.; McGUIRE, J.; AL-MAKHLAFI, H. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. **Journal of Food Protection**. v. 55, p. 731–735, 1992.
- DAI, H. Carbon nanotubes: synthesis, integration and properties. **Accounts of Chemical Research**. v. 35, p. 1035-1044, 2002.
- DESHPANDE, M. S.; MAZUMDAR, S. Sequence Specific Association of Tryptic Peptides with Multiwalled Carbon Nanotubes: Effect of Localization of Hydrophobic Residues. **Biomacromolecules**. v. 13, p. 1410–1419, 2012.
- DIECKMANN, G. R.; DALTON, A. B.; JOHNSON, P. A.; RAZAL, J.; CHEN, J.; GIORDANO, G. M.; MUNOZ, E.; MUSSELMAN, I. H.; BAUGHMAN, R. H.; DRAPER, R. K. Controlled assembly of carbon nanotubes by designed amphiphilic peptide helices. **Journal of the American Chemical Society**. v. 125, p. 1770-1777, 2003.
- DRESSELHAUS, M. S.; AVOURIS, P. Introduction to carbon materials research. In: DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; AVOURIS, P. **Topics in Applied Physics 80: Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications**. Berlin: Springer, 2001. 447 p.
- DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; EKLUND, P. C. **Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes**. New York Academic Press, 1996. 966 p.
- DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.363, p.1–24, 2011.
- ENDO, M.; IJIMA, S.; DRESSELHAUS, M. S. **Carbon nanotubes**. First Edition. Oxford: Pergamon, 1996. 220 p.
- ERNST, W. A.; THOMA-USZYNSKI, S.; TEITELBAUM, R.; KO, C.; HANSON, D. A.; CLAYBERGER, C.; KRENSKY, A. M.; LEIPPE, M.; BLOOM, B. R.; GANZ, T.; MODLIN, R. L. Granulysin, a T cell product kills bacteria by altering membrane permeability. **The Journal of Immunology**. v. 165, p. 7102–7108, 2000.
- ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 11: 187–204, 2012.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2010. **FAO/WHO Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potencial Food Safety Implications: Meeting Report**. Rome, 133 pp. 2010.
- GOZE-BAC, CHRISTOPHE. Carbon Nanotubes: A Basic Description. In.: FIORITO, S. **Carbon Nanotubes: Angels or Demons?** Singapore: Pan Stanford Publishing, 2008. 138 p.

GUERRA, N. P.; MACÍAS, C. L.; AGRASAR A. T.; CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**. v. 40, p. 106–110, 2005(b).

GUERRA, N. P.; ARAUJO, A. B.; BARRERA, A. M.; AGRASAR, A. T.; MACÍAS, C. L.; CARBALLO, J.; PASTRANA L. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. **Journal of Food Protection**. v. 68, p. 1012-1019, 2005(a).

GUGALA, Z.; GOGOLEWSKI, S. Protein adsorption, attachment, growth and activity of primary rat osteoblasts on polylactide membranes with defined surface characteristics. **Biomaterials**. v. 25, p. 2341 – 2351, 2004.

HAN, Z. J.; RIDER, A. E.; FISHER, C.; VAN DER LAAN, T.; KUMAR, S.; LEVCHENKO, I.; OSTRIKOV, K. Biological Application of Carbon Nanotubes and Graphene. In: TANAKA, K.; IJIMA, S. **Carbon Nanotubes and Graphene**. 2 ed. Elsevier, 2014. 445 p.

HASPER, H. E.; DE KRUIJFF, B.; BREUKINK, E. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. **Biochemistry**. v. 43, p. 11567–11575, 2004.

HIRSCH, A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 41, p. 1853–1859, 2002.

HORN, D. W.; TRACY, K.; EASLEY, C. J.; DAVIS, V. A. Lysozyme Dispersed Single Walled Carbon Nanotubes: Interaction and Activity. **The Journal of Physical Chemistry C**. 116 (18), 10341-10348, 2012.

HOU, P. X.; LIU, C.; CHENG, H. M. Purification of carbon nanotubes. **Carbon**. v. 46, p. 2003-2025, 2008.

HU, J.; TONG, Z.; HU, Z.; CHEN, G.; CHEN, T. Adsorption of roxarsone from aqueous solution by multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 377, p. 355–361, 2012.

IBARGUREN, C.; NARANJO, P. M.; STÖTZEL, C.; AUDISIO, M. C.; SHAM, E. L.; TORRES, E. M. F.; MÜLLER, F. A. Adsorption of nisin on raw montmorillonite. **Applied Clay Science**. v. 90, p. 88–95, 2014.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature (London)**, v.,354, p. 56-58, 1991.

IMRAN, M.; REVOL-JUNELLES, A. M.; RENÉ, N.; JAMSHIDIAN, M.; AKHTAR, M. J.; ARAB-TEHRANY, E.; JACQUOT, M.; DESOBRY, S. Microstructure and physicochemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 407-419, 2012.

JANA, A. K.; JOSE, J. C.; SENGUPTA, N. Critical roles of key domains in complete adsorption of A β peptide on single-walled carbon nanotubes: insights with point mutations and MD simulations. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 15, p. 837-844, 2013.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticles Research**. v. 11, p. 77–89, 2009.

JONES, K. L.; O'MELIA, C. R. Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. **Journal of Membrane Science**. v. 165, p. 31–46, 2000.

JORIO, A.; KAUPPINEN, E.; HASSANIEN, A. Carbon-Nanotube Metrology. In: JORIO, A.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S. **Carbon Nanotubes. Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008. p. 63–100.

KAM, N. W. S.; DAI, H. Single walled carbon nanotubes for transport and delivery of biological cargos. **Physica Status Solidi B**. v. 243, p. 3561, 2006.

KANG, S.; HERZBERG, M.; RODRIGUES, D. F.; ELIMELECH, M. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! **Langmuir**. v. 24, p. 6409–6413, 2008(b).

KANG, S.; MAUTER, M.; ELIMELECH, M. Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity. **Environmental Science & Technology**. v. 42, p. 7528–7534, 2008(a).

KARAJANAGI, S. S.; YANG, H.; ASURI, P.; SELBITTO, E.; DORDICK, J. S.; KANE, R. S. Protein-Assisted Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes. **Langmuir**. v. 22, p. 1392–1395, 2006.

KIM, D.; SAWADA, T.; SERIZAWA, T. Aqueous dispersion of carbon nanotubes using self-aggregating peptides. **Chemistry Letters**. v. 43, p. 102–104, 2014.

LADEIRA, M. S.; ANDRADE, V. A.; GOMES, E. R. M.; AGUIAR, C. J.; MORAES, E. R.; SOARES, J. S.; SILVA, E. E.; LACERDA, R. G.; LADEIRA, L. O.; JORIO, A.; LIMA, P.; LEITE, M. F.; RESENDE, R. R.; GUATIMOSIM, S. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. **Nanotechnology**. v. 21, p. 385101, 2010.

LARIDI, R.; KHEADR, E. E.; BENECH, R. O.; VUILLEMARD, J. C.; LACROIX, C.; FLISS, I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. **International Dairy Journal**. v. 13, p. 325–336, 2003.

LEQUEUX, I.; DUCASSE, E.; JOUENNE, T.; THEBAULT, P. Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide. **European Polymer Journal**. v. 51, p.182-190, 2014.

LIU, S.; WEI, L.; HAO, L.; FANG, N.; CHANG, M. W. C.; XU, R.; YANG, Y.; CHEN, Y. Sharper and faster “nano darts” kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. **ACS Nano**. v. 3, p. 3891–3902, 2009.

LIU, W.; HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, p.2551-2558, 1990.

MAGESTE, A. B. **Adsorção de proteínas do soro do leite e do glicomacropéptido (GMP) na interface hidrofóbica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas.** Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 102p., 2012.

MATSUURA, K.; SAITO, T.; OKAZAKI, T.; OHSHIMA, S.; YUMURA, M.; IJIMA, S. Selectivity of Water-Soluble Proteins in Single-Walled Carbon Nanotube Dispersions. **Chemical Physics Letters.** v. 429, p. 497–502, 2006.

MAVARO, A.; ABTS, A.; BAKKES, P. J.; MOLL, G. N.; DRIESSEN, A. J. M.; SMITS, S. H. J.; SCHMITT, L. Substrate recognition and specificity of the nisB protein, the lantibiotic dehydratase involved in nisin biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 286, p. 30552–30560, 2011.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus* sp..** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 88p, 2003.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres.** v. 52(303), p. 921-938, 2005.

MOHAN, R.; SHANMUGHARAJ, A. M.; HUN, R. S. An efficient growth of silver and copper nanoparticles on multiwalled carbon nanotube with enhanced antimicrobial activity. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.** v. 96B, p. 119–126, 2011.

MULDERS, J. W. M.; BOERRIGTER, I. J.; ROLLEMA, H. S.; SIEZEN, R. J.; de VOS, W. M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a structural nisin variant. **European Journal of Biochemistry.** v. 201, p. 581-584, 1991.

MURDOCK, R. C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A. M.; SCHLAGER, J. J.; HUSSAIN S. M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences.** v. 101, p. 239–253, 2008.

MURUGAN, E.; VIMALA G. Effective functionalization of multiwalled carbon nanotube with amphiphilic poly(propyleneimine) dendrimer carrying silver nanoparticles for better dispersability and antimicrobial activity. **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 357, p. 354–365, 2011.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology.** v. 11, p. 120-127, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica.** Tradução de Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 4. ed. São Paulo: SARVIER, 2006.

NEPAL, D.; GECKELER, K. E. Proteins and Carbon Nanotubes: Close Encounter in Water. **Small.** v. 3, p. 1259–1265, 2007.

ORTIZ-ZARAMA, M. A.; JIMÉNEZ-APARICIO, A.; PEREA-FLORES, M. J.; SOLORZA-FERIA, J. Barrier, mechanical and morpho-structural properties of

- gelatin films with carbon nanotubes addition. **Journal of Food Engineering**. v.120, p.223–232, 2014.
- PIAO, L.; LIU, Q.; LI, Y.; WANG, C. Adsorption of L-Phenylalanine on Single-Walled Carbon Nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry C**. v. 112, p. 2857-2863, 2008.
- PIRES, A. C. S.; SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M. Physical Chemistry of Colloidal Systems Applied to Food Engineering. In: COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. A. **Engineering aspects of milk and dairy products**, Boca Raton: CRC press, 2009, p.1-25.
- PRATO, M.; KOSTARELOS, K.; BIANCO, A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. **Accounts of Chemical Research**. v. 41, p. 60-68, 2008.
- QI, X.; POERNOMO, G.; WANG, K.; CHEN, Y.; CHAN-PARK, M.B.; XU, R.; CHANG, M.W. Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: superior antimicrobial and anti-biofilm properties. **Nanoscale**. v. 3, p. 1874–1880, 2011.
- REDDY, M. M.; VIVEKANANDHAN S.; MISRA, M.; BHATIA, S. K.; MOHANTY A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. **Progress in Polymer Science**. v.38, p.1653– 1689, 2013.
- REUNANEN, J. **Lantibiotic nisin and its detection methods**. Academic Dissertation. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki, Helsinki, 41p., 2007.
- RODRIGUES, J. G. **Caracterização por espectroscopia de fotoelétrons de nanotubos funcionalizados**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Física) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 120p., 2011.
- RUBIO, A. Applications in Mechanics and Sensors In.: FIORITO, S. **Carbon Nanotubes: Angels or Demons?** Singapore: Pan Stanford Publishing, 2008. 138 p.
- SAITO, N., USUI, Y., AOKI, K., NARITA, N., SHIMIZU, M., OGIWARA, N., NAKAMURA, K., ISHIGAKI, N., KATO, H., TARURA, S., ENDO, M. Carbon Nanotubes for Biomaterials in Contact with Bone, **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 523-527, 2008.
- SANTOS, J. C. C. **Síntese e Caracterização de Nanocompósitos PVA/Nanotubos de Carbono para Potencial Aplicação Biomédica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e Materiais) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 133p, 2011.
- SAYES, C. M.; LIANG, F.; HUDSON, J. L.; MENDEZ, J.; GUO, W.; BEACH, J. M.; MOORE, V. C.; DOYLE, C. D.; WEST, J. L.; BILLUPS, W. E.; AUSMAN, K. D.; COLVIN, V. L. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. **Toxicology Letters**. v. 161, p. 135-142, 2006.
- SHEIKHOESLAM, M.; PRITZKER, M.; CHEN, P. Dispersion of Multiwalled Carbon Nanotubes in Water Using Ionic-Complementary Peptides. **Langmuir**. v. 28, p. 12550–12556, 2012.

SIU, K. S.; CHEN, D.; ZHENG, X.; ZHANG, X.; JOHNSTON, N.; LIU, Y.; YUAN, K.; KOROPATNICK, J.; GILLIES, E. R.; MIN, W.-P. Non-covalently functionalized single-walled carbon nanotube for topical siRNA delivery into melanoma. **Biomaterials**. v.35, p. 3435-3442, 2014.

SMITH, B., WEPASNICK, K., SCHROTE, K. E., BERTELE, A. R., BALL, W., O'MELIA, C., FAIRBROTHER, H. Colloidal properties of aqueous suspensions of acid-treated, multi-walled carbon nanotubes, **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 819-825, 2009.

SMITH, S. C.; AHMED, F.; GUTIERREZ, K. M.; RODRIGUES, D. F. A comparative study of lysozyme adsorption with graphene, graphene oxide, and single-walled carbon nanotubes: Potential environmental applications. **Chemical Engineering Journal**. v. 240, p. 147–154, 2014.

SOUZA FILHO, A. G.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de Carbono. **Química Nova**. v. 30, p. 1695-1703, 2007 .

SUN, C. F.; MEANY, B.; WANG, Y. Characteristics and Applications of Carbon Nanotubes with Different Numbers of Walls. In.: TANAKA, K.; IJIMA, S. **Carbon Nanotubes and Graphene**. 2 ed. Elsevier, 2014. 445 p.

TAI, Y. C.; JOSHI, P.; MCGUIRE, J.; NEFF, J. A. Nisin adsorption to hydrophobic surfaces coated with the PEO-PPO-PEO triblock surfactant pluronic (R) F108. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 322, p. 112–118, 2008.

TASIS, D.; TAGMATARCHIS, N.; BIANCO, A.; PRATO, M. Chemistry of Carbon Nanotubes. **Chemical Reviews**. v.106, p.1105-1136, 2006.

TOLEDO, M.M. **Crescimento de Lactococcus lactis subsp. Lactis NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais**. 2000. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, 2000.

TOMÁNEK, D., JORIO, A., DRESSELHAUS, M. S., DRESSELHAUS, G. Introduction to the important and exciting aspects of carbon-nanotube science and technology. In: JORIO, A., DRESSELHAUS, M. S., DRESSELHAUS, G. **Carbon Nanotubes; advanced topics in the synthesis, structure, properties and applications**. New York: Springer, 2008. Topics in applied physics ;111, 1-12.

UMADEVI, D.; PANIGRAHI, S.; SASTRY, G. N. Noncovalent Interaction of Carbon Nanostructures. **Accounts of Chemical Research**. v. 47, p.2574-2581, 2014.

VAIRAVAPANDIAN, D.; VICHCHULADA, P.; LAY, M. D. Preparation and modification of carbono nanotubes: review of recente advances and applications in catalysis and sensing. **Analytica Chimica Acta**. v. 626, p. 119-129, 2008.

VAN DE VEN, F. J.; VAN DEN HOOVEN, H. W.; KONINGS, R. N.; HILBERS, C. W. NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution. **European Journal of Biochemistry**. v. 202, p. 1181–1188, 1991.

VIGOLO, B.; HÉROLD, C. Processing Carbon Nanotubes. In.: Yellampalli, S. **Carbon Nanotubes - Synthesis, Characterization, Applications**. Croacia: InTech, 2011.514 p.

WALSH, T. R.; TOMASIO, S. M. Investigation of the influence of surface defects on peptide adsorption onto carbon nanotubes. **Molecular BioSystems**. v. 6, p. 1707–1718, 2010.

WANG, N.; HSU, C.; ZHU, L.; TSENG, S.; HSU, J. P. Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 407, p. 22-28, 2013.

WANG, S.; NG, C. W.; WANG, W.; LI, Q.; HAO, Z. Synergistic and competitive adsorption of organic dyes on multiwalled carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**. v. 197, p. 34–40, 2012.

XIE, H.; SAITO, T.; HICKNER, M. A. Zeta Potential of Ion-Conductive Membranes by Streaming Current Measurements. **Langmuir**. v. 27, p. 4721-4727, 2001.

XING, Y. C.; LI, L.; CHUSUEI, C. C.; HULL, R. V. Sonochemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Langmuir**. v. 21, p. 4185–4190, 2005.

YAN, Y. M.; ZHANG, M. N.; GONG, K. P.; SU, L.; GUO, Z. X.; MAO, L. Q. Adsorption of methylene blue dye onto carbon nanotubes: a route to an electrochemically functional nanostructure and its layer-by-layer assembled nanocomposite. **Chemistry of Materials**. v. 17, p. 3457–3463, 2005.

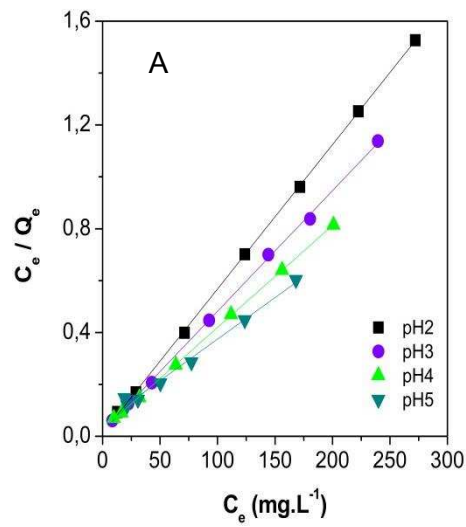
YANG, K.; XING, B. Adsorption of organic compounds by carbon nanomaterials in aqueous phase: polanyi theory and its application. **Chemical Reviews**. v. 110, p. 5989–6008, 2010.

YUAN, W.; JIANG, G.H.; CHE, J.F.; QI, X.B.; XU, R.; CHANG, M.W.; CHEN, Y.; LIM, S.Y.; DAI, J.; CHAN-PARK, M.B. Deposition of silver nanoparticles on multiwalled carbon nanotubes grafted with hyperbranched poly(amidoamine) and their antimicrobial effects. **Journal of Physical Chemistry C**. v. 112, p. 18754–18759, 2008.

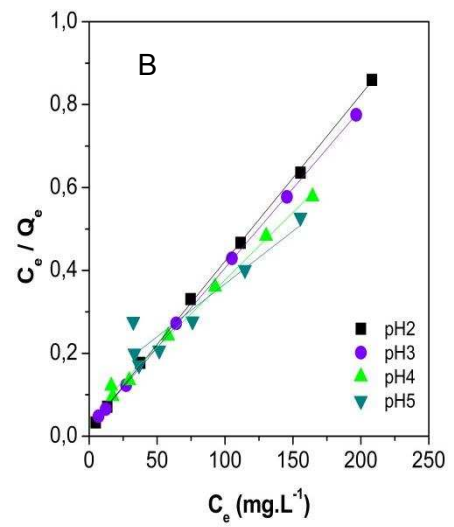
ZARDINI, H. Z.; AMIRI, A.; SHANBEDI, M.; MAGHREBI, M.; BANIADAM, M. Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 196-202, 2012.

ZHONG, W.; CLAVERIE, J. P. Probing the carbon nanotube-surfactant interaction for the preparation of composites. **Carbon**. v. 51, p. 72–84, 2013.

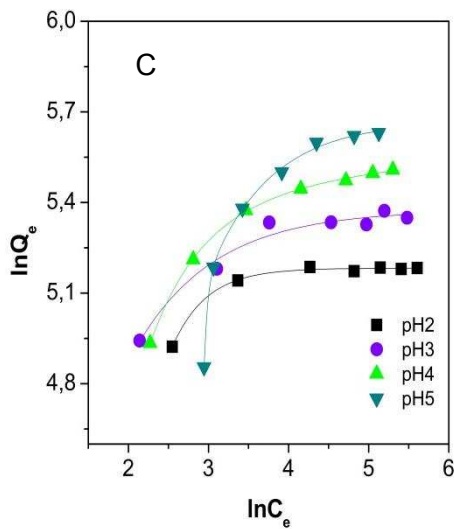
APÊNDICE



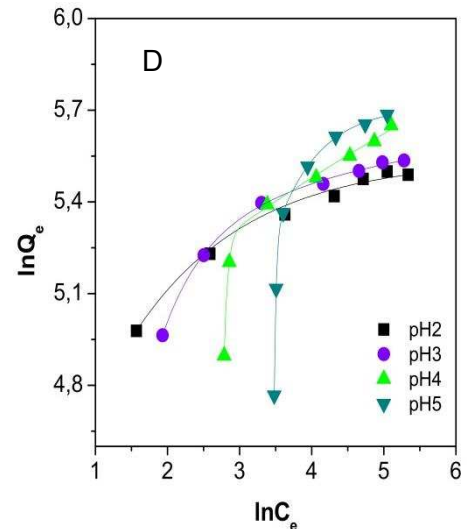
nisina A



nisina Z



nisina A



nisina Z

Figura A1. Isothermas de adsorção de nisina A e Z em MWCNTs em diferentes pHs, ajustadas com o modelo de Langmuir (A – B) e com o modelo de Freundlich (C – D).

Tabela A1. Contagem de *Lactococcus lactis* após 3 h de tratamento com MWCNTs, funcionalizados ou não com os peptídeos nisina A e nisina Z, a 35 °C.

Tratamentos	Contagem microbiana (UFC·g ⁻¹)					
	pH2			pH3		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Controle	3,06 x 10 ⁸	4,35 x 10 ⁸	1,15 x 10 ⁸	3,06 x 10 ⁸	4,35 x 10 ⁸	1,15 x 10 ⁸
Tampão	1,68 x 10 ⁸	1,98 x 10 ⁸	1,25 x 10 ⁸	2,27 x 10 ⁸	1,69 x 10 ⁸	1,47 x 10 ⁸
MWCNT	1,63 x 10 ⁸	1,77 x 10 ⁸	1,39 x 10 ⁸	2,28 x 10 ⁸	1,26 x 10 ⁸	1,15 x 10 ⁸
MWCNT-nisA	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)
MWCNT-nisZ	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)
nisA	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)
nisZ	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)	< 1,0 x 10 ¹ (est)

Tabela A2. Número de células viáveis no controle e amostras tratadas com MWCNTs, funcionalizados ou não com os peptídeos nisina A e nisina Z, após 3 h de incubação a 35 °C.

Tratamentos	Crescimento Bacteriano (log UFC·mL ⁻¹)
Água DI	8,39 ± 0,26 ^a
Tampão citrato-fosfato	8,23 ± 0,09 ^a
MWCNT	8,19 ± 0,10 ^a
MWCNT – nisA	0,00 ± 0,00 ^b
MWCNT – nisZ	0,00 ± 0,00 ^b
Nisina A	0,00 ± 0,00 ^b
Nisina Z	0,00 ± 0,00 ^b

^{a, b} Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey ($p > 0,05$). Valores de diâmetro de inibição incluem o diâmetro do orifício (0,5 cm).

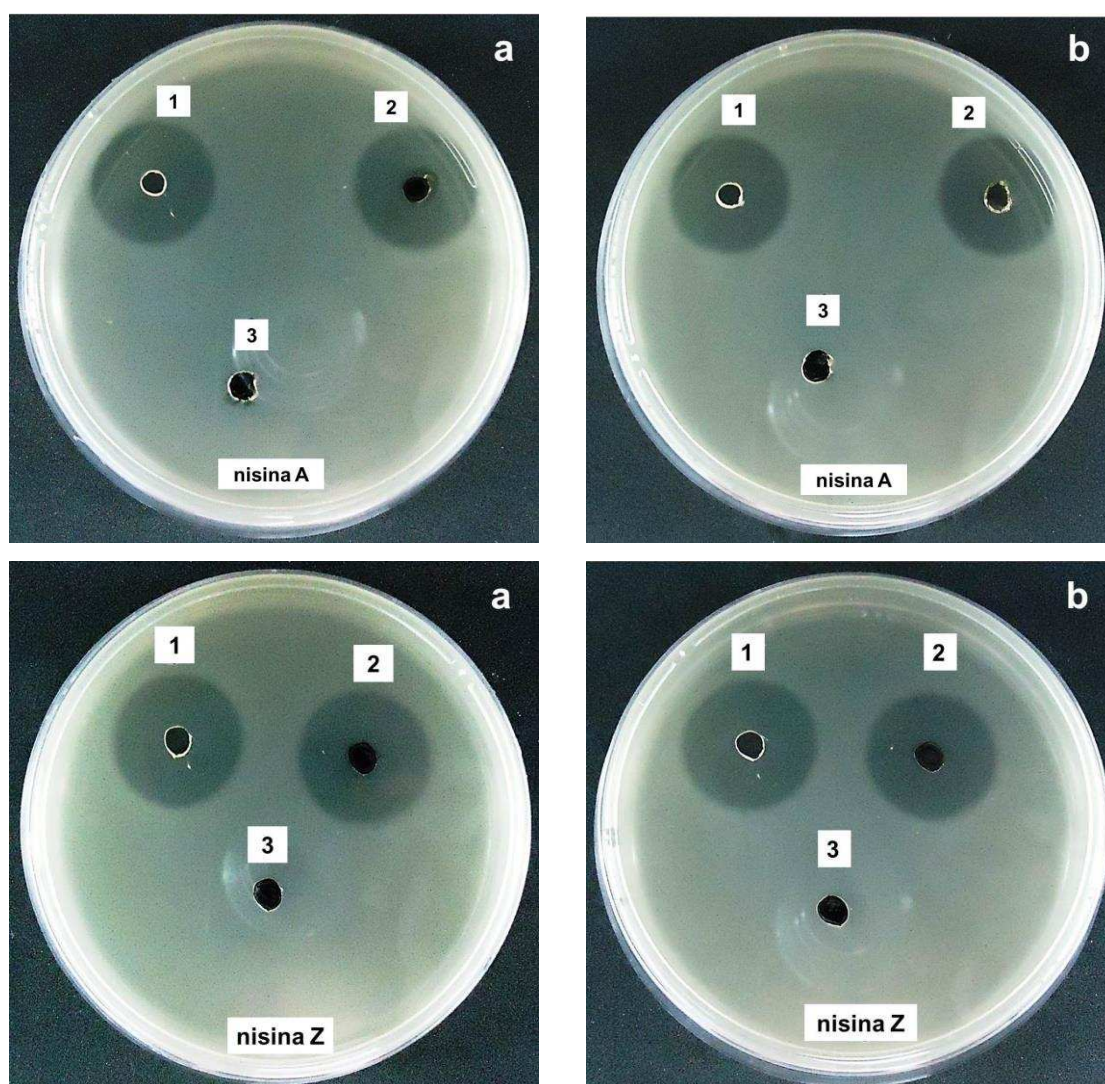


Figura A2. Fotos dos resultados dos ensaios de difusão em meio sólido contra *L. lactis*, dispersões em pH 2 (a) e em pH 3 (b): nisina (1); MWCNT-nis (2); MWCNT (3).

Tabela A3. ANOVA halo de inibição.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Trat	6	43,2299	7,2049	2071,96	< 0,0001*
pH	1	0,0003	0,0003	0,10	0,7558ns
Trat*pH	6	0,0013	0,0002	0,07	0,9987ns
Residuo	28	0,0973	0,0034		
Total	41	43,3290			

*Significativo a $p < 0,05$ e ^{ns} não significativo a $p > 0,05$

Tabela A4. ANOVA log de crescimento.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Trat	6	703,6351	117,2725	7210,56	< 0,0001*
pH	1	0,00005	0,00005	0,00	0,9539ns
Trat*pH	6	0,0040	0,0006	0,04	0,9996ns
Residuo	28	0,4553	0,0162		
Total	41	704,0946			

*Significativo a $p < 0,05$ e ns não significativo a $p > 0,05$