

**APARECIDA BARBOSA MAGESTE**

**ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE E DO  
GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) NA INTERFACE HIDROFÓBICA DE  
NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M192a  
2012

Mageste, Aparecida Barbosa, 1986-  
Adsorção de proteínas do soro do leite e do  
glicomacropéptido (GMP) na interface hidrofóbica de  
nanotubos de carbono de paredes múltiplas / Aparecida  
Barbosa Mageste. – Viçosa, MG, 2012.  
xvi, 102f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 96-102

1. Adsorção. 2. Proteínas. 3. Nanotubos. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 541.335

**APARECIDA BARBOSA MAGESTE**

**ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE E DO  
GLICOMACROPEPTÍDEO (GMP) NA INTERFACE HIDROFÓBICA DE  
NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS**

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

**APROVADA: 02 de fevereiro de 2012.**

---

**Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Hspanhol da  
Silva  
(Coorientadora)**

---

**Prof. Álvaro Vianna Novaes de  
Carvalho Teixeira**

---

**Prof<sup>a</sup>. Clascídia Aparecida Furtado**

---

**Prof. Nélio José de Andrade**

---

**Prof. Luis Henrique Mendes da Silva  
(Orientador)**

*A Deus,  
Aos meus pais em especial a minha mãe,  
Aos meus irmãos e sobrinhos,  
Ao Luis e a Carminha.  
Dedico este trabalho.*

*"Disciplina é a ponte que liga nossos sonhos às nossas realizações"*

*Pat Tillman*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela existência e por estar presente em cada momento guiando-me e mostrando o caminho, por ter me dado uma minha família maravilhosa e por colocar no meu caminho as pessoas certas nas horas certas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica pela possibilidade de realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) pelo apoio financeiro. A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento do microcalorímetro utilizado neste trabalho.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) pela realização das medidas de potencial zeta. A professora Glaura G. Silva (DQ - UFMG) pelas análises termogravimétricas. Ao Prof. Rochel M. Lago (DQ - UFMG) pelos experimentos de adsorção de N<sub>2</sub> e ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelas imagens de TEM e MEV.

A Davisco Foods International, Inc. pela doação das amostras de proteína e do GMP.

Ao professor Luis Henrique pela orientação, ensinamentos, apoio, confiança e exemplo de competência, caráter, dignidade e generosidade. Serei eternamente grata por toda sua ajuda. Obrigada por sempre me incentivar e pela paciência mediante a minha insegurança. Toda essa grande mudança em minha vida ocorreu principalmente porque encontrei você e a Carminha, vocês contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

A professora Maria do Carmo pela co-orientação, sinceridade, amizade, orientação, paciência, ensinamentos, confiança e exemplo de competência, caráter, dignidade e generosidade. Serei eternamente grata por toda sua ajuda.

Ao professor Luis Antônio Minim pela co-orientação.

Aos amigos do QUIVECOM pelo apoio, amizade e agradável convivência.

A Pamela pela amizade, bondade e presença constante em todos os momentos. Ao Igor pela amizade e incentivo nos momentos mais difíceis. A Lu, a Rose e o Digão pela amizade e apoio. Vocês são muito especiais.

Ao Jardel pela amizade e pela grande ajuda na realização dos experimentos.

Ao Gabriel e Guilherme M. pela amizade e pelas discussões que muito contribuíram para essa conquista.

Ao Luis Felipe que mesmo em pouco tempo de convivência se tornou um amigo muito especial.

Aos amigos Arcilene, Maiby e Leonel.

A Raquel pela amizade e pelo apoio e compreensão.

A Michelle, a Marina e a Dani pela agradável convivência e pelo apoio.

Ao amigo Guilherme R. e a Vivianne por toda amizade, apoio e ajuda.

A minha querida amiga Renata que foi de fundamental importância.

Aos meus pais por tudo e por estar sempre presentes e por tantas vezes que abriram mão de seus próprios sonhos para que os meus e de meus irmãos se tornassem possíveis, especialmente a minha mãe sem a qual nada disso seria possível.

Aos meus irmãos pela amizade constante e pelo apoio e aos meus sobrinhos lindos Dani, Kris e Arlen aos quais tanto amo.

Aos professores que aceitaram o convite para participar da banca desta defesa.

A todos que contribuíram para essa conquista o meu muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Aparecida Barbosa Mageste, filha de José Fernandes Mageste e Maria Vital Barbosa Mageste, nasceu aos 12 de agosto de 1986.

Em fevereiro de 2004 ingressou no curso de Licenciatura em Química no Centro Universitário de Caratinga e em dezembro de 2006 obteve o título de Licenciada em Química.

No período de maio de 2005 a abril de 2007 foi professora de química para o ensino médio em escolas estaduais e particulares. De outubro de 2006 a abril de 2007 atuou como preceptora de Química pela Universidade de Uberaba em um curso de educação à distância.

Iniciou especialização à distância em Química na Universidade Federal de Lavras em abril de 2007, concluindo o curso em abril de 2009

Em março de 2007 iniciou o mestrado em Físico-Química no programa de pós-graduação em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2009.

Em agosto de 2009 iniciou o doutorado em Físico-Química no programa de pós-graduação em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2012.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Revisão de Literatura.....	2
1.2.1. Nanotubos de Carbono.....	2
1.2.2. Proteínas e glicomacropéptidos do Soro do Leite.....	6
1.2.3. Adsorção .....	9
1.2.4. Adsorção de Proteínas em Nanotubos .....	19
1.2.5. Série de Hofmeister .....	23
1.2.6. A dupla camada elétrica e potencial zeta.....	26
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
2.1. Objetivos .....	35
2.2. Materiais e Métodos .....	35
2.2.1. Caracterização dos MWCNT.....	35
2.2.2. Adsorção de proteínas do soro do leite em MWCNT.....	36
2.2.2.1. Equipamentos .....	36
2.2.2.2. Materiais e Reagentes .....	36
2.2.2.3. Isotermas de Adsorção de proteínas em MWCNTs.....	37
2.2.2.3.1. Preparo das soluções tampão.....	37
2.2.2.3.2. Obtenção das isotermas de adsorção .....	38
2.2.2.4. Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC) .....	39
2.2.3. Medidas de Potencial Zeta.....	41
CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.1. Caracterização dos MWCNTs.....	43
3.2. Isotermas de adsorção .....	44
3.3. Cálculo dos parâmetros termodinâmicos de adsorção.....	54
3.4. Efeito de eletrólitos da série de Hofmeister sobre a adsorção de proteínas em CNTs .....	65

3.4.1. Efeito de Eletrólitos na adsorção de $\alpha$ -La.....	66
3.4.1.1. Efeito da concentração de eletrólitos sobre a adsorção da $\alpha$ -La .....	71
3.4.2. Efeito da natureza dos eletrólitos na adsorção de $\beta$ -Lg .....	74
3.4.1.2. Efeito da concentração de eletrólitos sobre a adsorção da $\beta$ -Lg .....	79
3.4.2. Efeito de Eletrólitos na adsorção de GMP .....	83
3.4.2.1. Efeito da concentração de eletrólitos sobre a adsorção do GMP .....	85
3.5. Efeito dos eletrólitos nos valores de $\Delta_{ads}G^{\circ}$ .....	86
3.5. Medidas de potencial eletrocinético .....	91
3.6. Conclusão .....	94
3.7. Referências Bibliográficas.....	96

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Sistema composto de duas fases e a interface delimitada entre $-\delta$ e $+\delta$ .	10
<b>Figura 2</b>	Perfil da concentração de água ao longo das fases e na interface	12
<b>Figura 3</b>	Perfil da concentração de surfatante $i$ ao longo das fases e na interface	13
<b>Figura 4</b>	Perfil da concentração de surfatante ao longo das fases e na interface equimolecular	13
<b>Figura 5</b>	Perfis típicos de isoterma: (a) isoterma do tipo I (b) isoterma do tipo II	17
<b>Figura 6</b>	A série de Hofmeister <sup>72</sup>	26
<b>Figura 7</b>	Modelo de Helmholtz para a dupla camada elétrica.	28
<b>Figura 8</b>	(a) Esquema interno do calorímetro e (b) torres e celas de amostra e referência.	40
<b>Figura 9</b>	(a) Curvas de TGA e DTG, (b) micrografia eletrônica de varredura e (c) imagens de transmissão eletrônica de amostras MWCNTs.	43
<b>Figura 10</b>	Isoterma de adsorção de $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg em MWCNT pH 9 a 25°C	44
<b>Figura 11</b>	Isoterma de adsorção de $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg pH 7 a 25°C	48
<b>Figura 12</b>	Área superficial do MWCNT disponível para cada molécula de proteína adsorvida em pH 7 a 25°C.	49
<b>Figura 13</b>	Isotermas de adsorção em diferentes valores de pH a 25°C para: (a) $\alpha$ -La e (b) $\beta$ -Lg.	51

<b>Figura 14</b>	Isoterma de adsorção de GMP em pH 9 a 25°C.	53
<b>Figura 15</b>	Gráfico semi-recíproco da adsorção de proteína em MWCNT :(a) $\alpha$ -La (■) e $\beta$ -Lg (▲) e (b) GMP (●).	55
<b>Figura 16</b>	Dados calorimétricos de $\Delta_{ads}H$ em pH 9 a 25°C	60
<b>Figura 17</b>	Isotermas de adsorção de $\alpha$ -La em MWCNT na presença de 10 mM de eletrólitos da série de Hofmeister em pH: 3 (a) e 9 (b).	66
<b>Figura 18</b>	Dados calorimétricos de $\Delta_{ads}H$ em pH 9 a 298 K na presença de 100 mM de diferentes eletrólitos para a $\alpha$ -La.	67
<b>Figura 19</b>	Isotermas de adsorção de $\alpha$ -La em MWCNT na presença de cátions da série de Hofmeister em pH: 3 (a) e 9 (b).	70
<b>Figura 20</b>	Isotermas de adsorção de $\alpha$ -La em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações e em pH 9	71
<b>Figura 21</b>	Isotermas de adsorção de $\alpha$ -La em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 3	73
<b>Figura 22</b>	Isotermas de adsorção de $\beta$ -Lg em MWCNT em pH 9 na presença de (a) ânions da série de Hofmeister (b) cátions da série de Hofmeister	74
<b>Figura 23</b>	Isotermas de adsorção de $\beta$ -Lg em MWCNT em pH 3 na presença de (a) ânions da série de Hofmeister (b) cátions da série de Hofmeister	76
<b>Figura 24</b>	Dados calorimétricos de $\Delta_{ads}H$ em pH 9 a 298 K na presença de 100 mM de diferentes eletrólitos para a $\beta$ -Lg	77

- Figura 25** Isotermas de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de 80 eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 9.
- Figura 26** Isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de 82 eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 3.
- Figura 27** Isotermas de adsorção de GMP em MWCNT pH 9 na presença de: 83 (a) ânions da série de Hofmeister e (b) cátions da série de Hofmeister.
- Figura 28** Isotermas de adsorção do GMP em MWCNT na presença de 85 eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 9.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Solventes utilizados no preparo das dispersões de MWCNT para medidas de  $\xi$ . 42
- Tabela 2** Parâmetros Termodinâmicos de adsorção da  $\beta$ -La e  $\alpha$ -La em MWCNT em diferentes valores de pH calculado com diferentes modelos 56
- Tabela 3** Parâmetros Termodinâmicos de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em MWCNT em pH 3 e 9 calculado com diferentes modelos. 63
- Tabela 4** Parâmetros Termodinâmicos de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de diferentes eletrólitos calculado com diferentes modelos. 68
- Tabela 5** Parâmetros Termodinâmicos de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de diferentes eletrólitos calculado com diferentes modelos. 78
- Tabela 6** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de GMP em MWCNT na presença de diferentes eletrólitos em tampão pH 9 calculado com diferentes modelos 84
- Tabela 7** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de diferentes ânions calculado com diferentes modelos 87
- Tabela 8** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de diferentes cátions calculado com diferentes modelos. 88
- Tabela 9** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de diferentes ânions calculado com diferentes modelos 89
- Tabela 10** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de diferentes cátions calculado com diferentes modelos 90
- Tabela 11** Valores de  $\xi$  para os MWCNTs e os biocomplexos proteínas-MWCNT em diferentes valores de pH. 91

## RESUMO

MAGESTE, Aparecida Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Adsorção de proteínas do soro do leite e do glicomacropéptido (GMP) na interface hidrofóbica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadores: Maria do Carmo Hespanhol da Silva e Luis Antonio Minim.

Neste trabalho, foi estudado o comportamento de adsorção das proteínas  $\alpha$ -Lactoalbumina ( $\alpha$ -La),  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e o glicomacropéptido (GMP) em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) na presença e na ausência de eletrólitos da série de Hofmeister, em diferentes valores de pH, visando a compreensão do mecanismo de adsorção de proteínas em nanotubos de carbono (CNTs). Foram investigados os efeitos do pH do meio reacional, natureza do eletrólito e estrutura da proteína sobre a quantidade adsorvida ( $\Gamma$ ) das diferentes proteínas e do GMP. Variações na carga líquida da proteína e na natureza do eletrólito alteram o processo de interação nanotubo-proteína. A  $\Gamma$  de  $\alpha$ -La é maior quando sua carga líquida é positiva (pH 3) e da  $\beta$ -Lg quando a carga líquida é negativa (pH 9). Os elevados valores de  $\Gamma$  demonstraram o potencial dos NCTs na adsorção de proteínas. Em pH 9 observa-se um aumento na  $\Gamma$  de  $\alpha$ -La devido à presença de 100,0 mM dos eletrólitos. Para  $[\alpha\text{-La}] \approx 0,7000 \text{ mg mL}^{-1}$ , na presença apenas de tampão pH 9 temos:  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Tampão}} = 197,0 \text{ mg g}^{-1}$ , indo para  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NaSCN}} = 233,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Na}_2\text{SO}_4} = 281,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NaHPO}_4} = 256,0 \text{ mg g}^{-1}$ . Comportamento contrário foi observado para a  $\beta$ -Lg. Em pH 9, os maiores valores de  $\Gamma$  foram observados para o GMP e o processo foi pouco influenciado por eletrólitos. Os resultados mostram que o mecanismo do processo de adsorção é dependente da natureza da proteína, sendo as isotermas de  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La características de adsorção monocamada, enquanto que as isotermas de adsorção de GMP não se ajustaram bem ao modelo de Langmuir, apresentando duas regiões de saturação, caracterizando a adsorção em bicamada. Além disso, pela primeira vez, foram determinados os parâmetros termodinâmicos de adsorção de proteínas em NCTs, usando dois modelos: o modelo de Langmuir e o modelo termodinâmico de diluição infinita. A análise termodinâmica baseada nas titulações microcalorimétricas demonstrou que o processo de adsorção de proteínas em todas as condições avaliadas ocorre de maneira espontânea ( $\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$ ). O processo é exotérmico e entálpicamente dirigido, para todos os estados termodinâmicos avaliados. Com base nos resultados experimentais, foi proposto um mecanismo para o

processo adsorptivo dos polieletrólitos estudados na interface dos MWCNTs, que consiste em mudança conformacional da molécula de proteína, devido a sua interação com a superfície do nanotubo, de forma que resíduos de aminoácidos hidrofóbicos se direcionam para a interface dos MWCNT e resíduos carregados e hidrofílicos formam uma interface proteína adsorvida solução. Enquanto isso, íons provenientes dos eletrólitos formadores da solução tampão adsorvem na interface proteína adsorvida/solução. Foi proposto que, na presença de eletrólitos da série de Hofmeister, há uma adsorção competitiva entre os íons da série de Hofmeister e os íons formadores do tampão, alterando as contribuições entálpicas e entrópicas para o processo adsorptivo. Medidas de potencial eletrocinético reforçaram o mecanismo proposto.

## ABSTRACT

MAGESTE, Aparecida Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Adsorption of whey protein and of the glicomacropeptídeo (GMP) in the hydrophobic interface of multiple-walled carbon nanotubes.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-Advisers: Maria do Carmo Hespanhol da Silva and Luis Antonio Minim.

In this work we studied the adsorption behavior of the proteins  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La),  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) and of the glicomacropeptídeo (GMP) in multiple-walled carbon nanotubes (MWCNT) in the presence and absence of electrolytes of Hofmeister series at different pH values, aimed in the understanding of the mechanism of protein adsorption on carbon nanotubes (NCTS). We investigated the effect of pH of the reaction medium, nature of electrolyte and protein structure on the amount adsorbed ( $\Gamma$ ) of different proteins and of the GMP. A variation in net charge of protein and of the electrolyte nature changes the process of nanotube-protein interaction. The  $\Gamma$  of  $\alpha$ -La is greater when its net charge is positive (pH 3) and  $\beta$ -Lg when the net charge is negative (pH 9). The high values of  $\Gamma$  demonstrated the big potential of NCTs in the protein adsorption. At pH 9 there is an increase in  $\Gamma$  of  $\alpha$ -La due to the presence of 100,0 mM electrolyte, for  $[\alpha\text{-La}] \approx 0,7000 \text{ mg mL}^{-1}$  in the presence of only buffer pH 9 are:  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Buffer}} = 197,0 \text{ mg g}^{-1}$  going to  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NaSCN}} = 233,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Na}_2\text{SO}_4} = 281,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NaHPO}_4} = 256,0 \text{ mg g}^{-1}$ , opposite behavior was observed for  $\beta$ -Lg. At pH 9 the highest values of  $\Gamma$  were observed for the GMP and the process was little influenced by electrolytes. The results show that the mechanism of adsorption depend on the nature of the polyelectrolyte, and the isotherms of  $\beta$ -Lg and  $\alpha$ -La features of monolayer adsorption while the adsorption isotherms GMP did not fit well to Langmuir model featuring two characterizing the regions of saturation adsorption bilayer. In addition, that is the first time that thermodynamic parameters were determined for adsorption of proteins in NCTs using two models: the Langmuir model and the thermodynamic model of infinite dilution. The thermodynamic analysis based on calorimetric titrations showed that the adsorption of proteins in all conditions evaluated occurs spontaneously ( $\Delta_{\text{ads}}G^\circ < 0$ ). The process is exothermic and enthalpy driven, for all thermodynamic states evaluated. Based on experimental results a mechanism was proposed for the process of adsorption of polyelectrolytes studied in the interface of MWCNTs consisting of conformational change of the protein molecule due to its

interaction with the surface of the nanotube so that hydrophobic amino acid residues are directed to interface of MWCNT loaded and hydrophilic residues and form an adsorbed protein solution interface, meanwhile ions from the electrolyte that forms the buffer adsorb at the protein adsorbed at the interface / solution and it was proposed that the presence of electrolytes of the Hofmeister series - a competitive adsorption between the ions the salt of the Hofmeister series of ions and the ions that form the buffer by changing the enthalpy and entropy contributions to the adsorptive process. Electrokinetic potential measurements reinforced the proposed mechanism.

# **CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## **1.1. Introdução**

Desde a descoberta dos nanotubos de carbono (CNTs) em 1991,<sup>1</sup> eles se tornaram rapidamente um dos nanomateriais mais estudados, devido às suas estruturas com propriedades físico-químicas únicas (eletrônica, óptica, térmica, mecânica, catalítica, etc) e amplas aplicações em nanoeletrônica, nanocompósitos, nanolitografia, sensores e em imagens de alta resolução<sup>2,3</sup>. Recentemente, sua importante aplicação em biotecnologia tem atraído muito interesse, pois complexos CNT-biomoléculas têm mostrado grande potencial para aplicações nas áreas de biossensores, liberação controlada de drogas em células específicas e dispositivos biomédicos<sup>4</sup>.

O grande desafio é a dispersão estável e/ou a aplicação de nanotubos em estruturas ordenadas ou tecnologicamente aplicáveis<sup>5</sup>, uma vez que os CNTs interagem fortemente entre si através de forças atrativas de van der Waals que induzem a formação de agregados insolúveis<sup>5,6</sup>. Recentemente, tem sido demonstrada a solubilização eficiente de nanotubos de carbono usando a adsorção de surfatantes<sup>7</sup>, polímeros e biomoléculas, como proteínas<sup>8</sup>, polissacarídeos<sup>9</sup>, DNA<sup>10</sup> e peptídeos<sup>11</sup>. Fica claro que esta é uma área de pesquisa desafiadora, que tem despertado um crescente interesse em compreender e controlar as interações dos nanomateriais de carbono com moléculas biológicas, tais como proteínas<sup>12</sup>.

Apesar dos vários trabalhos na literatura, investigando qualitativamente e / ou quantitativamente a adsorção de peptídeos e / ou proteínas nas superfícies de CNT<sup>13-16</sup>, a maioria deles têm se concentrado na modificação ou melhoria das propriedades dos nanomateriais para conferir uma função biológica específica<sup>17</sup>. Entretanto, o mecanismo de adsorção de proteínas em CNTs ainda é desconhecido e existe uma necessidade de

trabalhos que façam um estudo termodinâmico dessa adsorção, permitindo não só o desenvolvimento de produtos, como também uma contribuição científica sobre as propriedades físico-químicas da interface dos nanotubos e a interação destes com biomoléculas. Espera-se também que uma melhor compreensão das interações proteínas-CNTs possa acarretar um grande impacto sobre a biotecnologia, permitindo o desenvolvimento de nanocompósitos "inteligentes".

É bem estabelecido que as proteínas tem uma tendência em adsorver espontaneamente em interfaces sólido/líquido, sendo esta propriedade muito importante em diversos processos naturais e sintéticos, por exemplo, no uso potencial de proteínas na estabilização de microemulsões, fármacos, cremes, espumas, etc.<sup>18</sup>

É conhecido o fato de que a adsorção de proteínas em superfícies hidrofóbicas é fortemente influenciada pela presença de eletrólitos<sup>19</sup>. Para melhor entender as principais interações responsáveis pela adsorção de proteínas em NCTs é importante elucidar a influência de eletrólitos caotrópicos e cosmotrópicos da série Hofmeister (HS) na adsorção. Além disso, através da determinação de parâmetros termodinâmicos de adsorção na presença destes eletrólitos, pode-se inferir sobre a contribuição da estrutura terciária da água no processo de adsorção e pode-se descobrir um eletrólito que, em determinada concentração, permita tornar mais estáveis as dispersões de nanotubos, aumentando a aplicabilidade destas nanoestruturas de carbono.

## **1.2. Revisão de Literatura**

### **1.2.1. Nanotubos de Carbono**

O carbono em suas diversas formas alotrópicas tem sido amplamente utilizado desde a pré-história. As primeiras pinturas rupestres em cavernas foram feitas com

mistura de carbono e fuligem, além disso, carbono amorfo, grafite e negro de fumo têm sido amplamente utilizados em escrita, impressões e pintura<sup>20</sup>. Não devemos deixar de assinalar que ainda hoje o carvão é utilizado como combustível para consumo humano e também industrial. A importância do carvão é tão relevante que o descobrimento do carvão vegetal é considerado a primeira grande descoberta tecnológica.

Em 1896, Edward Acheson sintetizou pela primeira vez o grafite sintético e, a partir do século XX, cresceu o uso do carvão ativado para purificar o ar e a água. O grafite, assim como os diamantes - até recentemente utilizados apenas em decoração - é conhecido desde a antiguidade. No entanto, o desenvolvimento de um método para produzir diamante sintético abriu caminho para o uso industrial desta forma de carbono<sup>20</sup>.

Com tantas descobertas e aplicações, a ciência do carbono está repleta de nomes ilustres. No início dos anos 1980, a ciência do carbono era considerada consolidada e pouco provável de proporcionar novas descobertas. Essa situação hoje é diferente devido, em grande parte, à síntese do fulereno em 1985. Foi essa descoberta que levou a síntese de nanotubos de carbono e fez a ciência de carbono ressurgir mais forte<sup>20</sup>.

Essa grande versatilidade do carbono não somente de se ligar de maneiras diferentes, como também de criar estruturas inteiramente distintas é atribuída à diferente hibridização que os átomos de carbono podem assumir<sup>2, 3</sup>. O carbono tem quatro elétrons em sua camada de valência, a configuração do estado fundamental é  $2s^2 2p^2$ .

O nascimento do campo de pesquisa em nanotubos de carbono é marcado pela publicação de Iijima,<sup>1</sup> na qual ele observou nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT). Esse trabalho motivou o desenvolvimento de várias outras investigações experimentais e teóricas nos últimos anos.

Sumio Ijima, um microscopista eletrônico que trabalhava nos laboratórios da companhia de tecnologia japonesa, NEC, ficou fascinado pelo trabalho de Krätschmer–Huffman, a respeito do carbono, publicado na Nature<sup>20</sup>. Dez anos antes desta publicação, Ijima já havia utilizado um aparato de descarga por arco, semelhante ao usado por Krätschmer–Huffman (K-H) para estudar a formação da fuligem, descobrindo que na fuligem havia um grande número de diferentes estruturas de carbono. Ijima ficou intrigado em descobrir se essas diferentes estruturas estariam presentes em fuligem K-H. Seus estudos iniciais o deixaram desapontado, uma vez que apenas estruturas amorfas foram encontradas. Eventualmente, Ijima desistiu de peneirar a fuligem da parede, e concentrou sua atenção para o depósito desse elemento que se formava sobre o cátodo de grafite após a arco-evaporação. Em vez de uma massa amorfa, a fuligem catódica continha uma série de novas estruturas de grafite formadas por longas fibras ocas, mais finas e mais perfeitas do que quaisquer outras estruturas de carbono já vistas, que foram denominadas de nanotubos de carbono<sup>20</sup>.

Os nanotubos de carbono (CNTs) são cilindros longos compostos por átomos de carbono covalentemente ligados a outros três, formando estrutura hexagonal com hibridização  $sp^2$ , semelhante à observada nas folhas de grafeno constituintes do grafite<sup>3,21,22</sup>. Existem dois tipos básicos de CNTs: nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs). O SWCNT pode ser considerado como uma folha única de grafeno enrolada ao longo de um eixo característico na forma de cilindro. Esse enrolamento pode ocorrer de diferentes direções, originando nanotubos com quiralidade distintas: “zigzag”, “armchair” e “quiral”<sup>23</sup>. O MWCNT é formado por vários cilindros de grafeno enrolados ao longo de um eixo central, com separação intercamadas de aproximadamente 0,34 nm, indicativa do espaçamento interplanar do grafite<sup>23</sup>. Esses

nanotubos são produzidos basicamente por três técnicas, cada qual com suas próprias características: descarga por arco, ablação por laser e deposição química de vapor (CVD). Tais técnicas produzem misturas de nanotubos de diferentes tipos, diâmetros e comprimentos, juntamente com diferentes tipos e quantidades de impurezas, principalmente carbono amorfo, grafite e partículas metálicas dos catalisadores<sup>2, 3, 21-23</sup>.

Os estudos de Iijima, em 1991<sup>1</sup>, sobre os nanotubos de carbono impulsionaram uma enorme atividade na pesquisa básica e aplicada, devido às propriedades químicas e físicas sem precedentes destes elementos. Por exemplo, os SWCNTs podem ser metálicos ou semicondutores, possuem módulo de Young entre 640GPa-1TPa, resistência a tração de 150-180GPa e condutividade térmica teórica de 6000 W/mK. Os MWCNTs possuem características elétricas entre metal e semicondutor, apresentam módulo de Young de 0,27-0,95 TPa, resistência a tração de 11-63GPa e condutividade térmica entre 200-3000 W/mK (MWCNTs isolados)<sup>22, 24</sup>. Adicionalmente, os CNTs possuem alta flexibilidade, baixa densidade mássica e alta razão comprimento/diâmetro (tipicamente entre 300-1000). Sua resistência mecânica elevada deve-se a estrutura (semelhante a uma fibra) dos nanotubos, relacionada à sua baixa densidade, alta razão comprimento/diâmetro e extraordinárias propriedades mecânicas (é necessário o rompimento de 10-50 ligações carbono-carbono para que uma ruptura aconteça)<sup>25</sup>.

Os CNTs, devido às propriedades apresentadas, apresentam um vasto potencial com aplicações em dispositivos nanométricos<sup>26</sup>, por exemplo, como reforço em compósitos<sup>26</sup>; na síntese de compósitos poliméricos condutores em setores de energia (como em preparo de eletrodos para supercapacitores e baterias); no setor aeroespacial; em tintas que proporcionam dissipação eletrostática e interrupção de interferências eletromagnéticas<sup>22, 27</sup>; em suporte para catalisadores<sup>28</sup>, entre tantos outros. Para destacar apenas um desses campos, observa-se, por exemplo, que o emprego de nanotubos de

carbono em eletrodos para a construção de supercapacitores de alto desempenho é matéria atual nas pesquisas apresentadas na literatura, como pode ser verificado pelo crescente número de pedidos de patentes e como também na alta quantidade de patentes concedidas a pesquisadores<sup>29-35</sup>.

### **1.2.2. Proteínas e glicomacropéptídeos do Soro do Leite**

O soro do leite contém uma mistura de proteínas com numerosas e diversas propriedades funcionais que possuem muitos usos em potencial. As principais proteínas no soro de leite são a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) e a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), que representam aproximadamente 70 % do total protéico contido nele. Elas possuem diversas propriedades importantes para a indústria alimentícia, dentre elas, atividade hidratante, emulsificante, espumante, além de formar géis protéicos<sup>34</sup>.

A  $\alpha$ -La é uma proteína do soro do leite que contribui, significativamente, para suas características físicas, biológicas e nutricionais. Ela representa cerca de 20% das proteínas do soro de leite bovino (3,5% de proteínas do leite total) e é a principal proteína no leite humano<sup>35</sup>. Foi reconhecida pela primeira vez em 1885 e desde 1964 têm sido intensivamente estudada<sup>36,37</sup>.

Em condições fisiológicas, a  $\alpha$ -La funciona como uma proteína “modificadora” da especificidade da enzima D-glicose 4- $\beta$ -galactosil transferase, que é responsável pela síntese da lactose nas glândulas mamárias<sup>35</sup>.

A molécula de  $\alpha$ -La é formada por uma cadeia polipeptídica composta por 123 resíduos de aminoácidos e quatro ligações dissulfídicas, caracterizada por uma massa molar relativamente baixa (14.200 g mol<sup>-1</sup>) e ponto isoelétrico (PI) 4,6<sup>35</sup>.  $\alpha$ -La é relativamente rica em triptofano (quatro resíduos por mol). Também é rica em enxofre

(1,9%) que está presente nos resíduos de aminoácido cistina (quatro interações dissulfídicas por mol) e metionina, não contém cisteína (grupos sulfidril)<sup>35</sup>.

Em relação as estrutura terciária e secundária,  $\alpha$ -La é uma proteína compacta globular que, em solução, assume o formato de um prolato elipsóide com dimensões de 2,5 x 3,7 x 3,2 nm, consistindo de 26 % de  $\alpha$ -hélice, 14% de  $\beta$ -estrutura e 60 % de estrutura desordenada<sup>35</sup>.

A  $\alpha$ -La é uma metalo-proteína, pois ela se liga a um íon  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de proteína em uma espécie de “bolsa” contendo quatro resíduos do aminoácido asparagina (Asp). A interação com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  estabiliza a conformação da proteína. Em valores de pH menores que 5, os resíduos de Asp se tornam protonados e o íon  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado<sup>35</sup>.

A exposição da conformação nativa de  $\alpha$ -La (estado N), em valores de pH menores que 4, promove instantaneamente a formação de uma conformação (estado A) cujas propriedades são muito diferentes do estado nativo<sup>36,37</sup>. O intermediário estrutural surge da dissociação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Musci e Berliner<sup>37</sup>, utilizando técnicas espectroscópicas, determinaram que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta no aumento da exposição de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos para o meio aquoso, sendo que essa mudança conformacional leva a uma diminuição da estabilidade conformacional da  $\alpha$ -La.

A proteína presente em maior quantidade no soro de leite é a  $\beta$ -Lg, representando cerca de 50 % do total das proteínas do soro e, aproximadamente, 12 % do total das proteínas presentes no leite. É pequena, solúvel e globular com 162 resíduos de aminoácido e massa molar aproximada de 18,3 KDa, ponto isoeletrico igual a 5,2 e é termosensível<sup>38-40</sup>.

A  $\beta$ -Lg é rica em aminoácidos sulfurados, contém 2 mols de cistina e 1 mol de cisteína por monômero de 18 kDa. A cisteína é especialmente importante uma vez que

reage, após desnaturação por aquecimento, com o dissulfeto de  $\kappa$ -caseína e afeta significativamente coagulação do coalho e as propriedades de estabilidade térmica do leite, sendo também responsável pelo sabor do leite aquecido<sup>35</sup>.

Em relação a estrutura secundária, a  $\beta$ -Lg é uma proteína altamente estruturada: medidas de dicroísmo circular e rotação óptica mostram que na faixa de pH 2-6,  $\beta$ -lg consiste de 10 - 15%  $\alpha$ -hélice, 43% folhas  $\beta$  e 47% de estrutura não-ordenada.  $\beta$ -Lg tem uma estrutura globular muito compacta em que folhas  $\beta$  ocorrem em uma estrutura de tipo  $\beta$ -barril ou cálice. Cada monômero existe quase como uma esfera com um diâmetro de cerca de 3,6 nm<sup>35</sup>.

A estrutura quaternária de  $\beta$ -Lg apresenta associações que variam conforme o pH do meio. Em valores de pH menores que 3,5, a  $\beta$ -Lg bovina sofre uma mudança conformacional, dissociando em monômeros. Entre pH 5,5 e 7,5, todos as variantes  $\beta$ -Lg bovina forma dímeros de massa molar 36 kDa. Entre pH 3,5 e 5,2, especialmente no pH 4,6,  $\beta$ -Lg bovina forma octâmeros de massa molar 144 kDa. Acima de pH 7,5,  $\beta$ -Lg bovino sofre uma mudança conformacional, dissociando em monômeros e o grupo tiol torna-se exposto<sup>35</sup>.

O glicomacropéptido (GMP) é um péptido derivado da caseína que corresponde a cerca de 10 a 20 % do total de proteínas do soro do leite doce. Quando o leite é submetido ao tratamento com a enzima quimosina durante a fabricação de queijo, a proteína  $\kappa$ -caseína é hidrolisada em dois péptidos<sup>41</sup>. O péptido é relativamente pequeno, com a massa molar de 8000 Da. No entanto, devido à glicosilação, seu tamanho real pode variar 25.000-30.000 Da. Há duas variantes principais de GMP, a variante A e variante B, que diferem em dois aminoácidos. Abreviaturas diferentes são usadas para identificar GMP, mas todas se referem à mesma molécula encontrada no soro<sup>41</sup>.

### 1.2.3. Adsorção

A exposição de uma solução aquosa de proteína a uma superfície sólida resulta no acúmulo de um excesso de moléculas de proteína na interface sólido/líquido<sup>18</sup>. O fenômeno no qual moléculas de um componente se concentram preferencialmente na interface em relação às fases é denominado adsorção<sup>42</sup>.

Antes de iniciar a discussão sobre adsorção, é preciso saber que:

- 1) Fase é uma região homogênea do sistema em que as propriedades termodinâmicas intensivas do sistema não variam ponto a ponto em toda a sua extensão. Entre fases distintas do sistema existe uma região de contato a qual chamamos de interface. Na interface as propriedades termodinâmicas intensivas do sistema variam em toda sua extensão ao longo de um eixo Z perpendicular a interface.
- 2) Existe uma região limite, a interface, com propriedades termodinâmicas distintas das propriedades termodinâmicas das demais fases;
- 3) A diferença das propriedades termodinâmicas da interface em relação àquelas das fases determina propriedades termodinâmicas estratégicas do sistema;
- 4) Todos os processos coloidais são controlados via modulação dessas propriedades termodinâmicas da interface.

Existem algumas formas de alterar as propriedades termodinâmicas intensivas da interface. Dentre elas, pode-se citar a adição de um soluto ao sistema coloidal que seja capaz de ir à interface e alterar as interações intermoleculares em termo de energia e estrutura (configurações) dessa região. Isso é o que ocorre no fenômeno de adsorção.

A adsorção é o fenômeno pelo qual moléculas de um componente *i* do sistema se concentram preferencialmente na interface em relação às fases, porém, o fato de termos

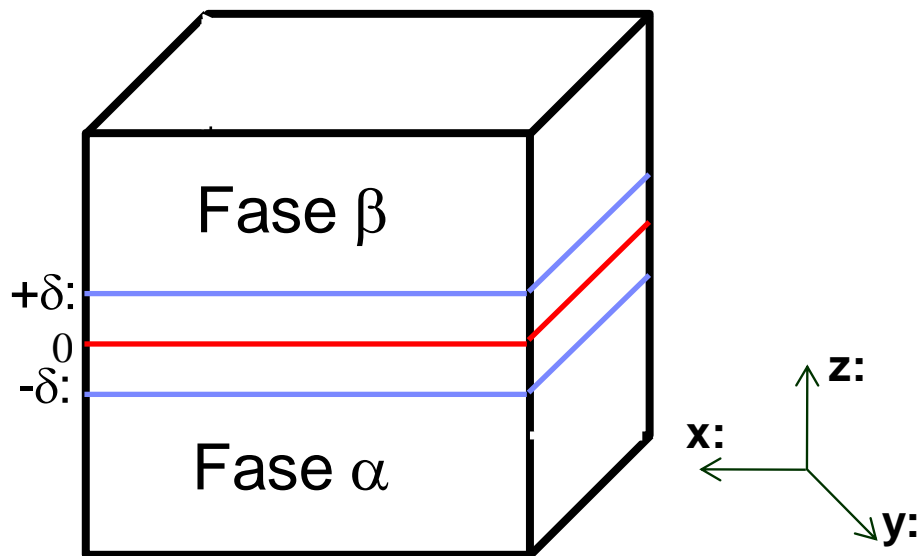
moléculas do componente  $i$  na interface não quer dizer que ocorreu adsorção. Este fenômeno só é caracterizado quando a concentração média de um componente  $i$  na interface é maior que a concentração média do componente nas demais fases<sup>42</sup>.

Quando se fala de adsorção, existe uma quantidade muito importante que é a quantidade do componente  $i$  adsorvida na interface, dada por  $\Gamma_i$ . Há um sistema formado pelas fases  $\alpha$  e  $\beta$ , no qual é feita a adição do componente  $i$  que se adsorve preferencialmente na interface. Pode-se determinar o valor de  $\Gamma_i$  pela equação 01<sup>42</sup>:

$$\Gamma_i = \frac{N_{T,i} - N_{\alpha,i} - N_{\beta,i}}{S} \quad (01)$$

Mais especificamente,  $\Gamma_i$  é a quantidade do componente  $i$  adsorvido por unidade de área da interface,  $N_{T,i}$  é o número de mols total do componente  $i$ ,  $N_{\alpha,i}$  e  $N_{\beta,i}$  é o número de mols do componente  $i$  nas fases  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente e  $S$  é a área superficial.

A limitação da equação 01 se dá pelo fato de não se saber onde começa e termina cada fase. Consideremos o sistema cúbico representado na Figura 1 formado pelas fases  $\alpha$  e  $\beta$ , a interface está delimitada entre  $+\delta$  e  $-\delta$  e dividida pelo eixo 0.



**Figura 1.** Sistema composto de duas fases e a interface delimitada entre  $-\delta$  e  $+\delta$ .

Supondo a adição de um componente  $i$  que adsorve na interface no sistema,  $\Gamma_i$  pode ser determinada a partir da equação 01. Assim, temos:

$$\Gamma_i = \int_{-\infty}^{-\delta} [C_i^{superfície}(z) - C_i^\alpha] dZ + \int_{-\delta}^0 [C_i^{superfície}(z) - C_i^\alpha] dZ \quad (02)$$

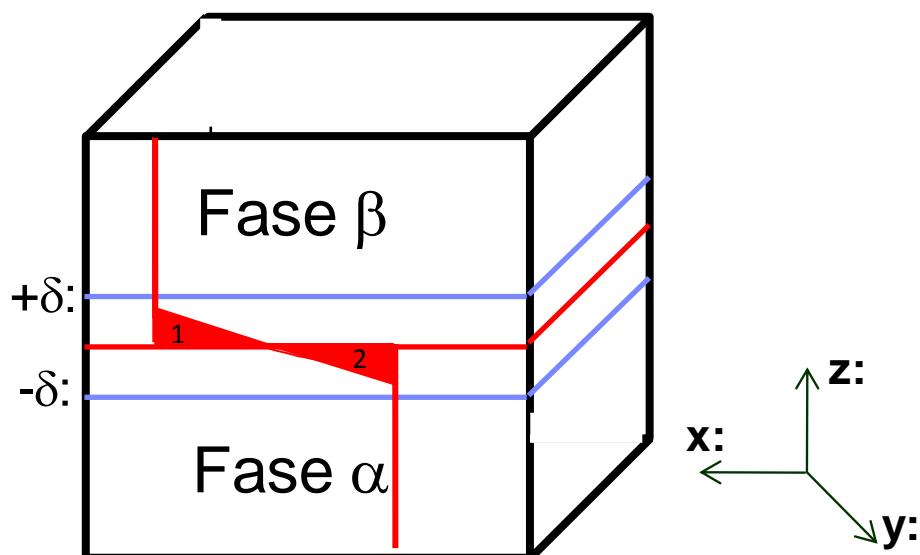
$$+ \int_0^{+\delta} [C_i^{superfície}(z) - C_i^\beta] dZ + \int_{+\delta}^{+\infty} [C_i^{superfície}(z) - C_i^\beta] dZ$$

Como a concentração de  $i$  não varia ao longo do eixo  $z$  nas fases  $\alpha$  e  $\beta$ , o primeiro e o último termo à direita da igualdade na equação 02 é igual a zero. Assim, temos:

$$\Gamma_i = \int_{-\delta}^0 [C_i^{superfície}(z) - C_i^\alpha] dZ + \int_0^{+\delta} [C_i^{superfície}(z) - C_i^\beta] dZ \quad (03)$$

Para definirmos rigorosamente  $\Gamma_i$ , aplica-se a equação 03 para o processo de adição de um surfatante  $i$  a um sistema consistindo de água líquida (fase  $\alpha$ ) em equilíbrio com água vapor (fase  $\beta$ ).

Ao analisar o perfil da concentração de moléculas de água no sistema, observa-se que a concentração de água é maior na fase  $\alpha$  e que, ao longo do eixo  $Z$ , a concentração de moléculas de água não varia em toda a extensão das fases  $\alpha$  e  $\beta$ , porém, na medida em que se aproxima da interface pelo lado da fase  $\alpha$ , a concentração de água diminui até atingir a concentração de água na fase vapor ( $\beta$ ) conforme Figura 2.



**Figura 2.** Perfil da concentração de água ao longo das fases e na interface.

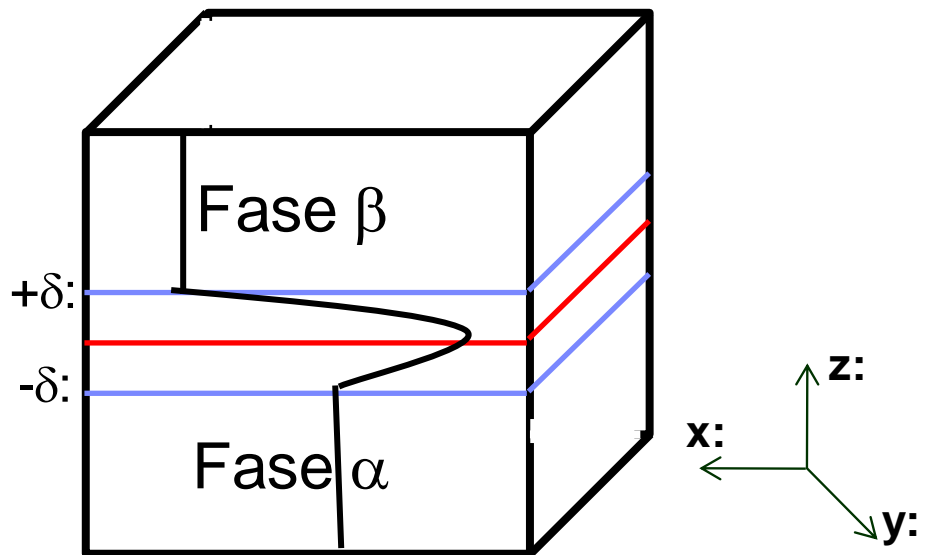
Podemos determinar  $\Gamma_{\text{água}}$  a partir da equação 03. Assim, temos:

$$\Gamma_{\text{água}} = \int_{-\delta}^0 [C_{\text{água}}^{\text{superfície}}(z) - C_{\text{água}}^{\alpha}] dZ + \int_0^{+\delta} [C_{\text{água}}^{\text{superfície}}(z) - C_{\text{água}}^{\beta}] dZ \quad (04)$$

As integrais na equação 04 representam as áreas 1 e 2 hachuradas na Figura 2, sendo que 1 é negativo e 2 é positivo. Dependendo da posição do eixo 0, a  $\Gamma_{\text{água}}$  pode ter valores negativo, positivo ou nulo. Existe uma posição no eixo z em que 1 e 2 são iguais em módulo e a  $\Gamma_{\text{água}}$  é zero. Nessa posição, definimos a interface equimolecular. A interface equimolecular é definida para que  $\Gamma$  de um dos componentes do sistema seja 0.

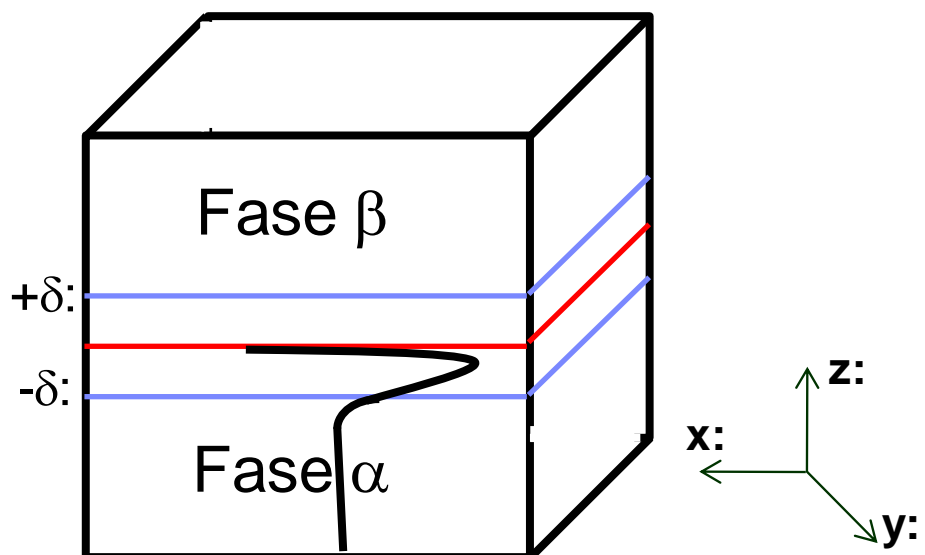
Supondo agora que a este sistema foi adicionado um surfatante i, surge um questionamento: como é o perfil da concentração de surfatante neste sistema?

Ao saber que i adsorve na interface, o perfil da concentração de surfatante ao longo do eixo z pode ser representado pela Figura 3.



**Figura 3.** Perfil da concentração de surfatante  $i$  ao longo das fases e na interface.

Podemos determinar  $\Gamma_i$  a partir da equação 03. Levando em conta a interface equimolecular definida anteriormente e que o surfatante não se move espontaneamente para a fase  $\beta$ , considera-se que  $C_i$  entre interface equimolecular e  $+\delta$  é zero (Figura 4).



**Figura 4.** Perfil da concentração de surfatante ao longo das fases e na interface equimolecular

E assim, obtemos:

$$\Gamma_i = \int_{-\delta}^0 [C_i^{superfície}(z) - C_i^\alpha] dz \quad (05)$$

Aplicando o teorema do valor médio, obtemos:

$$\Gamma_i = [\bar{C}_i^{superfície} - \bar{C}_i^\alpha] x \delta \quad (06)$$

O  $\delta$  é a espessura da interface e  $\bar{C}_i$  é um valor médio da concentração de i. Nessa equação, nós expressamos a concentração da espécie i na interface como concentração média, pois, não existe na interface um valor de concentração homogêneo. Esse valor varia ao longo do eixo Z.

Considerando  $\Gamma_i$  muito grande, temos que  $\bar{C}_i^{superfície} \gg \gg \bar{C}_i^\alpha$  e:

$$\Gamma_i = [\bar{C}_i^{superfície}] x \delta \quad (07)$$

A variação da energia livre de Gibbs do sistema ( $\Delta G$ ), quando moléculas adsorvem na interface, tem duas contribuições: a alteração na tensão interfacial ( $\sigma$ ), devido a mudanças nas interações e orientações das moléculas na interface, e o trabalho químico ( $\Gamma_i \mu_i$ ) referente à transferência de moléculas do soluto da solução para a interface. Assim, temos<sup>42</sup>:

$$G = \sigma + \Gamma_i \mu_i \quad (08)$$

Onde  $\mu_i$  é o potencial químico do componente i.

Derivando a equação 08 em relação a  $\mu_i$ , temos:

$$\frac{dG}{d\mu_i} = \frac{d\sigma}{d\mu_i} + \frac{d(\Gamma_i \mu_i)}{d\mu_i} \quad (09)$$

Ao multiplicar e dividir o termo  $\frac{dG}{d\mu_i}$  da equação 09 por  $\Gamma_i$  tem-se  $\frac{dG}{d\Gamma_i} \cdot \frac{d\Gamma_i}{d\mu_i}$ .

Considerando  $\frac{dG}{d\Gamma_i} = \mu_i$  e substituindo essas considerações na equação 09 e resolvendo a diferencial do produto  $\Gamma_i \mu_i$ , tem-se:

$$\mu_i \frac{d\Gamma_i}{d\mu_i} = \frac{d\sigma}{d\mu_i} + \Gamma_i + \mu_i \frac{d\Gamma_i}{d\mu_i} \quad (10)$$

Cancelando os termos iguais na equação 10, tem-se:

$$\Gamma_i = -\frac{d\sigma}{d\mu_i} \quad (11)$$

A equação 10 é a equação fundamental de adsorção de Gibbs para qualquer processo adsorptivo. Lembrando que  $\mu_i = \mu_i^\theta + RT \ln a_i$  e que para soluções ideais e idealmente diluídas  $\mu_i = \mu_i^\theta + RT \ln C_i$  e derivando em relação a  $C_i$ , tem-se:

$$\frac{d\mu_i}{dC_i} = \frac{d\mu_i^\theta}{dC_i} + RT \frac{1}{C_i} \quad (12)$$

Como  $\mu_i^\theta$  não varia com  $C_i$ ,  $\frac{\mu_i^\theta}{C_i}$  é constante e  $\frac{d\mu_i^\theta}{dC_i} = 0$ . Assim, temos:

$$\frac{d\mu_i}{dC_i} = RT \frac{1}{C_i} \quad (13)$$

Substituindo a equação 13 na equação 10 temos:

$$\Gamma_i = -\frac{C_i}{RT} \frac{d\sigma}{dC_i} \quad (14)$$

A equação 14 é válida apenas para soluções ideais e idealmente diluídas, mas tem uma vantagem em relação à equação 10, já que é muito difícil medir experimentalmente  $\mu_i$  e, conseqüentemente, difícil determinar  $\Gamma_i$  a partir da equação 10. Por outro lado, a partir da equação 14 pode-se medir  $\sigma$  em função de  $C_i$  e por meio de um gráfico obter  $\Gamma_i$ .

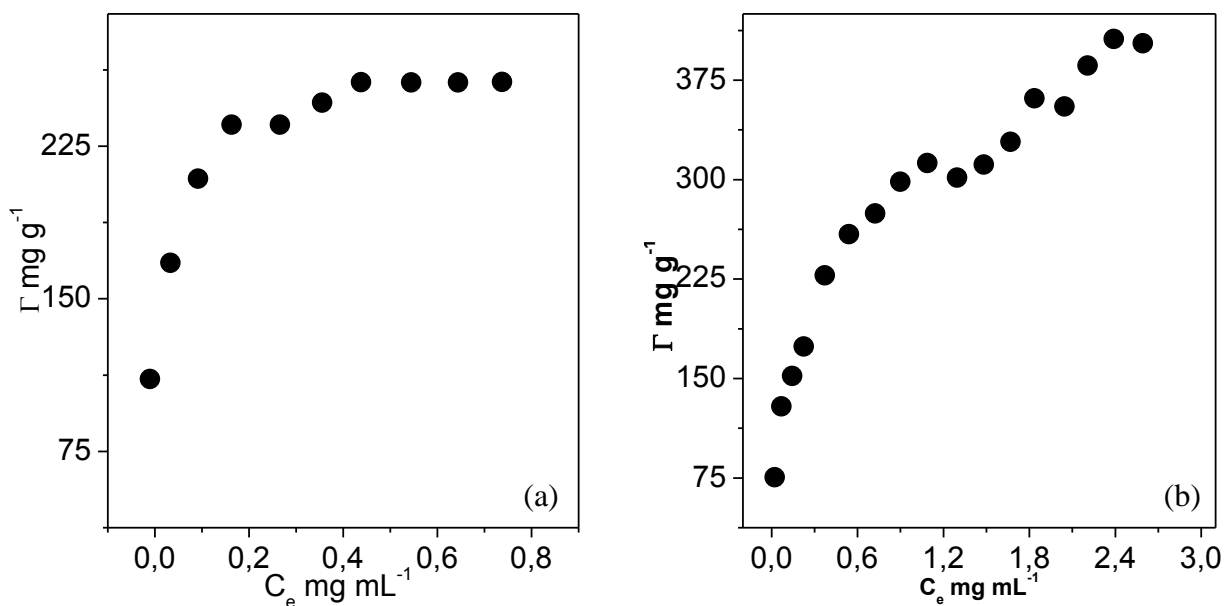
Moléculas de um componente  $i$  adsorvem na interface para reduzir o conteúdo de energia livre de Gibbs do sistema. Assim, uma molécula adsorve para reduzir a tensão interfacial e para aumentar o potencial químico da espécie  $i$  na solução (equação 11), uma vez que a quantidade  $\Gamma_i$  só pode ser uma grandeza positiva. Além disso, a equação fundamental de Gibbs nos diz que se  $\Gamma_i$  é um valor muito grande, implica que ao ir para a interface, as moléculas de  $i$  reduzem muito a tensão interfacial à custa de um pequeno aumento do potencial químico. E, se  $\Gamma_i$  é um valor muito pequeno, significa que, ao ir para interface, moléculas de  $i$  reduzem pouco a tensão interfacial, ao custo de aumentar muito o potencial químico da espécie em solução.

Para entender o mecanismo de adsorção constroem-se isotermas de adsorção, onde se tem um adsorvente sólido e o soluto, podendo ser o último um gás ou estar presente em uma solução líquida<sup>43</sup>.

Os primeiros estudos de adsorção foram de gases em sólidos. Preparavam-se tubos contendo o adsorvente em contato com gás em diferentes pressões e  $T$  constante. Para cada pressão determinava-se a quantidade adsorvida em mols do soluto por gramas de adsorvente<sup>43</sup>.

Uma isoterma é uma função que relaciona a quantidade de substância adsorvida por unidade de área interfacial ou quantidade de substância do soluto adsorvida por grama de adsorvente com a concentração de equilíbrio do adsorvato na solução<sup>43</sup>.

A Figura 5 mostra dois perfis típicos de isotermas obtidos para adsorção de um soluto presente em uma fase líquida na interface sólido/líquido.



**Figura 5.** Perfis típicos de isoterma: (a) isoterma do tipo I (b) isoterma do tipo II.

Observam-se perfis diferentes para as isotermas a e b na Figura 5. As isotermas com o perfil semelhante ao da Figura 5a são chamadas isotermas do tipo I e o processo de adsorção ocorre com a formação de uma única camada de  $i$  na superfície do adsorvente. As isotermas com perfil semelhante ao da Figura 5b são chamadas isotermas do tipo II e são caracterizadas pela formação de multicamadas do componente  $i$  sobre a superfície do adsorvente<sup>43</sup>.

Em 1918, Langmuir propôs um modelo para explicar as isotermas do tipo I<sup>44</sup>. É importante observar as considerações implícitas para se chegar a isoterma de Langmuir: (i) a variação de entalpia de adsorção ( $\Delta_{\text{ads}}H$ ) é equivalente para todos os sítios e, quando uma molécula encontra-se adsorvida, não há interações desta com as moléculas adsorvidas em sítios vizinhos e todos os sítios possuem a mesma estrutura química, (ii) cada molécula de adsorbato ocupa apenas um sítio (iii), a adsorção é localizada (isto é as moléculas permanecem no local de adsorção até serem dessorvidas)<sup>44</sup>.

De acordo com o modelo de Langmuir, o processo de adsorção de uma espécie pode ser encarado como uma reação química de conversão de espécies químicas em

outras, em que uma espécie I reage com o sítio do adsorvente S para formar o complexo espécie-sítio (IS), de acordo com o processo representado pela equação 15:



O sítio S é simplesmente uma espécie química que não se movimenta sobre a superfície do adsorvente. A esse processo químico, podemos associar uma constante termodinâmica ( $b$ ) relacionada à variação de energia livre de Gibbs padrão de adsorção pela equação 16<sup>19</sup>:

$$\Delta_{ads}G^0 = -RT \ln b \quad (16)$$

Onde  $\Delta_{ads}G^0 = \mu_{IS}^0 - (\mu_I^0 + \mu_S^0)$ . A constante  $b$  nessa equação é dada pela relação 17:

$$b = \frac{[IS]}{[S][I]} \quad (17)$$

em que os termos entre colchetes referem-se às concentrações das espécies na condição de equilíbrio termodinâmico. Se denominarmos de  $\theta$  a fração molar de sítios do adsorvente ocupados, tal que  $\theta = \frac{N^\circ \text{ de sítios ocupados}}{N^\circ \text{ de sítios totais}}$ , expressando assim a concentração da espécie IS, temos como consequência que a fração de sítios desocupados é igual a  $1 - \theta$ . Sendo a concentração de íons no “bulk” da solução igual a  $C_e$ , temos:

$$b = \frac{\theta}{C_e (1 - \theta)} \quad (20)$$

Isolando  $\theta$  na equação 20 obtemos:

$$bC_e = \theta + b\theta C_e \quad (21)$$

Rearranjando, temos:

$$\theta = \frac{bC_e}{1 + bC_e} \quad (22)$$

Podemos notar que se existe uma quantidade máxima de substância adsorvida ( $q_s$ ), para uma dada quantidade de substância adsorvida  $Q_e$  a fração de sítios ocupados  $\theta$  é dada por:

$$\theta = \frac{Q_e}{q_s} \quad (23)$$

Substituindo essa relação na equação 22 obtemos:

$$Q_e = \frac{bC_e q_s}{1 + bC_e} \quad (24)$$

A equação 24 é conhecida como equação da isoterma de Langmuir.

#### 1.2.4. Adsorção de Proteínas em Nanotubos

Ambos os nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs) e de paredes múltiplas (MWCNTs) têm aplicações potenciais no desenvolvimento de novos tipos de dispositivos biológicos em miniaturas, incluindo sondas e sensores, devida elétrica e tamanho nanométrico. O primeiro passo para alcançar este objetivo envolve a imobilização de moléculas bioativas na superfície de nanotubos de carbono através de ligações covalentes ou não-covalentes<sup>45</sup>.

Um dos primeiros trabalhos de interação proteína-nanotubo descritos na literatura foi publicado em 1995 por Tsang et. al<sup>46</sup>, avaliando a imobilização de pequenas proteínas (Zn<sub>2</sub>Cd<sub>5</sub>-metalotioneína, o citocromo C (3) e  $\beta$ -lactamase) em nanotubos de carbono. Foi utilizado para análise dos resultados, principalmente, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM). Nanotubos de carbono foram deixados em refluxo com ácido nítrico por 24 horas, lavados com água destilada e secados em vácuo a 180° C por 12 horas. Após esse tratamento, prepararam-

se suspensões de nanotubos em solução aquosa de proteína e após 24 horas a água foi volatilizada pela redução da pressão de vapor, a temperatura ambiente. O material restante consistindo de nanotubo e proteína foi analisado por HRTEM. Moléculas de proteína individuais e associadas foram claramente observadas no interior da cavidade central dos nanotubos e interessantemente uma quantidade significativa de proteína permaneceu cataliticamente ativa, indicando que nenhuma mudança conformacional drástica tinha ocorrido. Dando continuidade a estes trabalhos ainda em 1998, Davis et. al<sup>47</sup> compararam a atividade da proteína  $\beta$ -lactamase, imobilizada no interior do nanotubo com a atividade de  $\beta$ -lactamase livre em solução na hidrólise de penicilina, e observaram que as proteínas imobilizadas se mantiveram ativas, porém a atividade é menor que a das proteínas livres. A menor atividade das proteínas imobilizadas sugere mudança conformacional da enzima  $\beta$ -lactamase. Entretanto, o decréscimo na atividade pode ser associado com vários outros efeitos na imobilização, como por exemplo, a restrição do acesso do substrato ao sítio ativo. Ainda neste mesmo ano em continuação a esses trabalhos, Guo et. al<sup>45</sup> utilizando a técnica HRTEM avaliaram a imobilização de DNA e  $Zn_2Cd_5$ -metalotioneína em nanotubos. Curiosamente, as moléculas de DNA tendem a cobrir a superfície dos nanotubos uniformemente, sugerindo uma forte interação com a superfície do nanotubo de carbono. Eles concluíram que a natureza das interações entre nanotubo e proteína ou DNA ainda é desconhecida.

Esses trabalhos iniciais despertaram o interesse de pesquisa no desenvolvimento de bionanomateriais aplicáveis e, nessa perspectiva, em 2001, Chen et. al<sup>48</sup> funcionalizaram a superfície de SWCNT e avaliaram a imobilização de várias biomoléculas. A funcionalização dos SWCNT envolveu a adsorção da molécula bifuncional ácido 1-pirenobutanóico, éster Succinimidico na superfície hidrofóbica dos nanotubos na presença de dimetilformamida (DMF) ou metanol, ocasionando a

funcionalização dos nanotubos com grupos éster succinimidico que são muito reativos com aminas. As aminas são grupos funcionais presentes em grande quantidade na superfície de proteínas. O mecanismo de imobilização de proteínas em nanotubos funcionalizados com grupos éster succinimidico, envolve a substituição nucleofílica de N-hidróxisuccinimidico por um grupo amina na molécula de proteína, resultando na formação de uma ligação amida. Esta técnica permitiu a imobilização de uma grande variedade de biomoléculas como a ferritina, estreptavidina, e biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina nas paredes laterais de nanotubos de carbono com alta especificidade e eficiência.

Em 2002, Huang et. al<sup>49</sup> funcionalizaram nanotubos de carbono com a proteína Bovino Serum Albumina (BSA). O bionanocomplexo formado nanotubo-BSA é altamente solúvel em água, formando solução aquosa de cor escura. Resultados de caracterizações usando microscopia de força atômica (AFM), análise termogravimétrica, espectroscopia Raman e eletroforese em gel mostram que as amostras contêm nanotubos de carbono e proteínas, além de que as espécies de proteínas estão interagindo com os nanotubos e 90% delas permanecem bioativas. A funcionalização de nanotubos com proteínas pode ser usada para introduzir os nanotubos de carbono em outros sistemas biológicos importantes. Nessa perspectiva em 2002 Sun et. al<sup>50</sup> desenvolveram um trabalho sobre a aplicação de nanotubos funcionalizados com diversos tipos de moléculas, entre as quais a proteína BSA, e perceberam que a funcionalização dos nanotubos pode permitir uma maior aplicabilidade destes.

A interação altamente específica entre biomoléculas e nanotubos começou a intrigar os pesquisadores e, a partir de 2004, o número de trabalhos publicados

estudando a interação de nanotubos e diversas proteínas para a obtenção de bionanocomplexos aplicáveis aumentou significativamente.

Novos estudos têm sido feitos nos últimos anos na tentativa de descobrir proteínas que são capazes de dispersar melhor os nanotubos ou ainda formar bionanocomplexos aplicáveis. Entre as proteínas imobilizadas estão a ferritina<sup>51</sup>, BSA<sup>51</sup>, hemoglobina<sup>52</sup>, glicina<sup>53</sup>, citocromo C<sup>54</sup>, tripsina<sup>55</sup>, albumina de soro humano (HSA)<sup>56</sup>, ovalbumina<sup>57</sup>, hemoglobina bovina<sup>57</sup>, Streptavidina<sup>58</sup>, metalotioneína chamada SmTA<sup>59</sup> e hidrofobinas<sup>60</sup>. Algumas proteínas como glicosidase, quimotripsina e peroxidase (SBP) são adsorvidas em grande quantidade: 630, 670, e 575 mg de proteína por g de CNTs, respectivamente<sup>61,62</sup>. Também se tem um número significativo de trabalhos visando o desenvolvimento de biossensores<sup>63</sup>.

Em 2011 Li et. al<sup>64</sup> estudaram a adsorção da proteína BSA em nanotubos funcionalizados com uma amino-ciclodextrina sintetizada (f-MWNTs). Os difratogramas mostraram que a BSA adsorvida em f-MWNTs tem sua forma cristalina alterada. Os espectros de dicroísmo circular demonstraram uma redução percentual elevada do conteúdo  $\alpha$ -helicoidal quando BSA foi adsorvida em f-MWNTs. Os resultados também indicam que a mudança de estrutura secundária da BSA é causada principalmente pela interação hidrofóbica dos resíduos de BSA com as paredes de f-MWNTs. Este trabalho demonstra que, com a funcionalização dos nanotubos, aumenta-se a dispersabilidade do nanotubo em água, facilitando a adsorção de BSA nos f-MWNTs.

Proteínas têm a conformação e a carga líquida (CL) facilmente alterada em função do pH da solução, conseqüentemente, mudanças no pH do meio pode alterar a quantidade de proteína adsorvida e pode-se encontrar valores de pH em que a estabilização dos nanotubos é mais significativa. Nessa perspectiva, em 2011 Bomboi

et. al<sup>65</sup> avaliaram a interação de lisozima e SWCNTs em diferentes concentrações de proteína e valores de pH. Acredita-se que a lisozima adsorve nos SWCNTs devido a interações hidrofóbicas e do tipo  $\pi$ - $\pi$  entre a proteína e a superfície hidrofóbica dos nanotubos. Nos valores de pH estudados, a proteína estava carregada positivamente e interações eletrostáticas podem também contribuir para a estabilização do bionanocomplexo lisozima-SWCNT. Dados de dicroísmo circular indicam que não ocorre a desnaturação das moléculas de lisozima adsorvidas em nanotubos. A distribuição de carga em torno de nanotubos foi inferida através da combinação de mobilidade eletroforética e métodos de espectroscopia dielétrica. A primeira experiência fornece informações sobre as mudanças na densidade de carga na superfície dos complexos, enquanto a segunda, informa sobre modificações na espessura da dupla camada elétrica em torno deles. Tais resultados se complementam e indicam que algumas moléculas de lisozima estão ligadas aos SWCNTs.

### **1.2.5. Série de Hofmeister**

Íons têm um papel fundamental em muitos processos naturais, biológicos e tecnológicos e, por isso, o estudo e descrição das propriedades de soluções eletrolíticas têm despertado um maior interesse da comunidade científica nos últimos 100 anos<sup>66</sup>.

Em uma série de trabalhos, Franz Hofmeister, professor de Farmacologia da Universidade de Praga, foi o primeiro a estudar sistematicamente os efeitos de íons. Entre os anos de 1880 e 1890 Hofmeister e colaboradores estudaram tais efeitos na precipitação de proteínas, publicando uma série de sete artigos em alemão cujo título da série foi: “Sobre o efeito da ciência do sal”<sup>67</sup>. É interessante notar que Hofmeister era farmacologista e estudou o efeito de sais em sistemas fisiológicos, já que os sais têm um

impacto importante, por exemplo, sobre a digestão, o sistema nervoso e as propriedades do sangue. Ele investigou sistemas muito complexos para a época como sangue e clara de ovo, pois nesses sistemas era possível isolar grande quantidade de proteínas. Mesmo trabalhando com sistemas complexos, as propriedades buscadas foram facilmente medidas, uma vez que a condutividade elétrica e a pressão osmótica variam de várias ordens de grandezas quando pequenas quantidades de íons são adicionadas em solução aquosa<sup>68</sup>.

Avanços em metodologias experimentais e computacionais têm levado a um recente interesse na série de Hofmeister e sua origem molecular<sup>69</sup>. As conclusões obtidas por Hofmeister estão longe de serem triviais e ainda não são explicadas pelas teorias de solução ou química coloidal<sup>70</sup>. Ainda hoje há um debate sobre a importância relativa de interações diretas íon-íon e de interações íon-água para explicar ou mesmo prever esses efeitos, ou seja, a natureza molecular desse fenômeno ainda é desconhecida.

A principal razão para esse desconhecimento é que a série de Hofmeister emerge de uma combinação de efeitos gerais de cossolutos na estrutura do solvente e de interações específicas entre o cossoluto e o soluto (proteína ou outros biopolímeros)<sup>71</sup>.

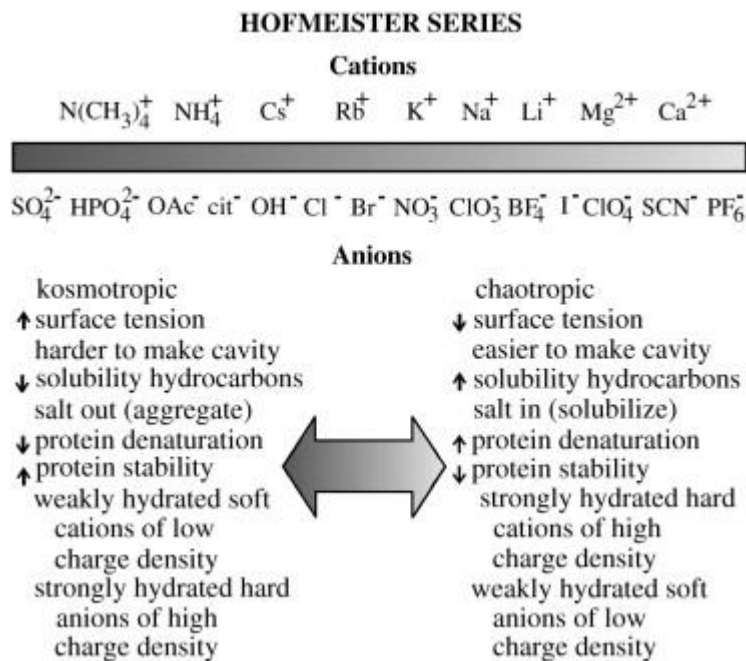
Um dos modelos propostos para explicar esse fenômeno se baseia no efeito destes íons na estrutura tridimensional das moléculas de água<sup>72</sup> que consiste em um átomo de oxigênio ligado covalentemente a dois átomos de hidrogênio. A diferença de eletronegatividade entre os átomos de oxigênio e hidrogênio gera uma distribuição assimétrica de cargas, de forma que há um dipolo orientado positivamente para o hidrogênio e outro orientado negativamente para o oxigênio. Cada átomo de oxigênio pode se ligar a dois átomos de hidrogênio de outra molécula de água, e cada átomo de hidrogênio a um átomo de oxigênio de outra molécula de água de forma que cada

molécula de água se liga a mais quatro moléculas de água formando um tetraedro<sup>71</sup>. A estrutura terciária da água é altamente organizada em consequência das ligações de hidrogênio, uma vez que essas são orientacionais, aditivas e cooperativas. Entretanto, a presença de íons pode alterar a estrutura terciária da água.

Desde 1930 surgiu o conceito de que alguns íons seriam caotrópicos e outros cosmotrópicos<sup>70</sup>. Os íons cosmotrópicos são aqueles que aumentam a organização entre as moléculas de água como, por exemplo, o lítio e o sulfato, enquanto os caotrópicos são aqueles que diminuem a organização entre as moléculas de água, como, por exemplo, o tiocianato e o perclorato.

A variação de entropia das moléculas de água devido à presença de íons pode ser negativa ou positiva<sup>66-72</sup>. Para íons com elevada densidade de carga,  $\Delta S < 0$ ; isso porque os átomos dos íons interagem fortemente com as moléculas de água orientando-as, ou seja, diminuindo as entropias configuracional, vibracional, translacional e rotacional das moléculas de água. Por outro lado, os íons com baixa densidade de carga interagem fracamente com as moléculas de água, de forma que elas estão mais livres para assumir outras configurações, aumentando as entropias configuracional, vibracional, translacional e rotacional destas moléculas.

Hofmeister observou o efeito de íons caotrópicos e cosmotrópicos na solubilidade de proteínas, organizando-os em uma série. A série de Hofmeister ou série liotrópica consiste em uma ordem de sais de acordo com o seu efeito na precipitação de proteínas<sup>72</sup>. A Figura 6 mostra a tradicional série de Hofmeister.



**Figura 6.** A série de Hofmeister<sup>72</sup>.

Conforme podemos observar na Figura 6, existe uma série para ânions e outra para cátions, sendo que os íons à direita têm efeito caotrópico e, à esquerda, efeito cosmotrópico. Os íons caotrópicos aumentam a solubilidade das proteínas, uma vez que ao adicionarmos proteína em uma solução aquosa de um íon é necessário quebrar as ligações de hidrogênio existentes entre as moléculas de água e as interações entre as moléculas de água e os íons para que a proteína seja solubilizada. O gasto energético envolvido na quebra dessas ligações é menor no caso dos íons caotrópicos, devido a uma interação menos intensa destes com a água, em comparação a íons cosmotrópicos.

### 1.2.6. A dupla camada elétrica e potencial zeta

A influência de cargas elétricas na superfície é muito importante para a físico-química. Interfaces em contato com água ou uma solução aquosa podem desenvolver pequenas ou grandes quantidades de cargas elétricas<sup>73</sup>. A presença ou ausência de carga

em partículas coloidais é extremamente importante, já que implica em aspectos significativos relacionados com a estabilidade dos sistemas<sup>42</sup>.

O entendimento das propriedades elétricas dos sistemas coloidais nos fornecerá uma base teórica para explicarmos diversos fenômenos que ocorrem nestes sistemas. Os fenômenos elétricos que ocorrem no sistema coloidal são: eletrosmose, eletrodifusão, corrente de fluxo e corrente de sedimentação.

Eletrosmose: é o movimento espontâneo da fase contínua em relação à fase dispersa quando se aplica uma diferença de potencial (ddp).

Eletrodifusão ou eletroforese: é o movimento espontâneo da fase dispersa em relação à fase contínua quando se aplica uma ddp.

Corrente de fluxo ou ddp de fluxo: é a ddp que é causada pelo movimento relativo da fase contínua em relação fase dispersa devido a uma diferença de pressão, ou seja, por uma gradiente mecânica.

Corrente de sedimentação ou ddp de sedimentação: é a ddp que surge em um sistema coloidal devido ao movimento da fase dispersa em relação à fase contínua, causada pela ação da gravidade.

Os quatro fenômenos elétricos podem ser tratados da seguinte forma: todas as vezes que uma fase contínua se deslocar em relação a uma fase dispersa ou vice-versa devido a algum agente externo, surge uma corrente elétrica no sistema e todas as vezes que uma diferença de potencial for aplicada num sistema coloidal, a fase contínua se deslocará em relação à fase dispersa ou vice-versa.

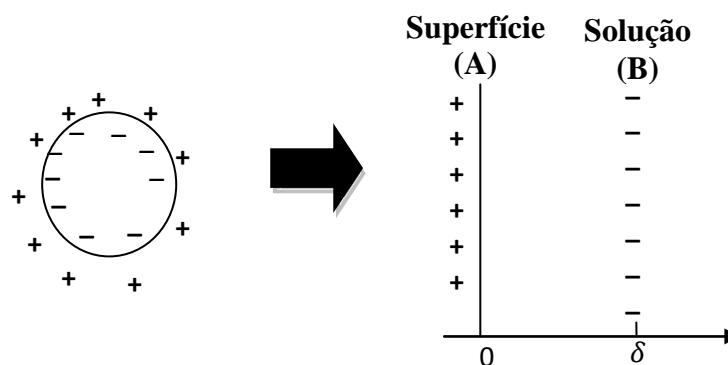
Segundo o modelo de Helmholtz, todos estes fenômenos podem ser explicados pela existência de cargas elétricas concentradas na interface da partícula coloidal. Essas cargas gerariam um campo elétrico que alinharia, ao redor destas partículas, íons de carga oposta, neutralizando assim as cargas da superfície. Essas cargas de sinal

contrário chamariam contra-íons. Ao redor da partícula coloidal haveria a formação de uma dupla camada, de tal forma que estas cargas permaneceriam rígidas no espaço da solução.

Só existe a dupla camada elétrica devido à existência de fenômenos eletrocinéticos em sistemas coloidais. Sabemos da existência desta distribuição de carga indiretamente, pois a existência da dupla camada elétrica explica esses fenômenos macroscópicos.

A distribuição de cargas ao redor de uma partícula coloidal é mais complexa do que Helmholtz propõe, mas a ideia dele contribuiu muito para o desenvolvimento desta teoria. Para explicar os fenômenos elétricos em sistemas coloidais, Helmholtz considerou um elemento de área muito pequeno de partícula (dA), de forma que se pôde representar essa área por uma região plana.

Com essa consideração, a separação de cargas que havia entre a superfície da partícula e a solução se aproximava da geometria de um capacitor elétrico de placas paralelas, como representado na Figura 7.



**Figura 7.** Modelo de Helmholtz para a dupla camada elétrica.

Para Helmholtz, como havia essa assimetria de carga, deveria haver uma diferença de potencial elétrico ( $\Delta\varphi$ ) entre a superfície da partícula (A) e um ponto na

solução (B), a uma distância  $\delta$  da interface onde estariam localizadas as cargas de sinal contrário às cargas da interface, isto é:

$$\Delta\varphi = \varphi_{sup} - \varphi_{sol,\delta} \quad (25)$$

Onde  $\varphi_{sup}$  e  $\varphi_{sol,\delta}$  são os potenciais elétricos experimentados por uma carga na superfície da partícula e na solução a uma distância  $\delta$  da superfície, respectivamente, e  $\Delta\varphi$  é a diferença de potencial elétrico entre a superfície e a solução.

É muito importante compreender o significado físico-químico de  $\Delta\varphi$ , uma vez que ele está diretamente ligado a uma propriedade termodinâmica a qual chamamos de potencial zeta. A diferença de potencial elétrico  $\Delta\varphi$  é a quantidade de energia liberada ou absorvida na forma de trabalho elétrico, por unidade de carga, para que uma carga seja transportada da solução (distante de  $\delta$  da superfície) até a superfície da partícula coloidal.

De acordo com Helmholtz, essa diferença de potencial deveria variar linearmente com a distância entre as placas (superfície e solução):  $\Delta\varphi = ax + b$ . Ele também propôs (para explicar a eletroforese e a eletroosmose) que, quando um campo elétrico externo perpendicular as placas estivesse presente, iria surgir um campo elétrico tangente e paralelo a interface da partícula coloidal.

A partícula coloidal pode estar se movimentando e ao aplicar um campo elétrico, sendo a partícula muito pequena, é como se em cada ponto dela tivéssemos um vetor campo elétrico paralelo e constante aplicado a pequena região da partícula coloidal.

Para este pesquisador, quando o campo elétrico aparecia, gerava-se uma força de cisalhamento ( $T_{cis}$ ), pois o campo elétrico iria fazer as cargas positivas que estão na interface se movimentarem em uma direção e as forças que estão na solução se movimentarem em sentido contrário.

A força de cisalhamento ( $\vec{T}_{cis}$ ) é proporcional à densidade de carga sobre a partícula e à magnitude do campo elétrico aplicado, como expresso na relação 26.

$$|\vec{T}_{cis}| \propto \rho_{carga}^{sup} \cdot |\vec{E}_{ext}| \quad (26)$$

A densidade de carga de um capacitor é proporcional a ddp e inversamente proporcional a espessura do capacitor. Aplicando a Lei de Gauss para o capacitor associado à dupla camada elétrica, obtemos a intensidade do campo elétrico entre as placas em função da carga sobre a superfície e da área do capacitor (densidade de carga = q/A) como sendo:

$$\int \vec{E} \cdot dA = \frac{q}{\epsilon_0} \Rightarrow |\vec{E}_{int}| = \frac{\rho_{carga}^{sup}}{\epsilon_0} \quad (27)$$

As equações 26 e 27 mostram que a densidade de carga sobre a partícula é proporcional à diferença de potencial e inversamente proporcional à distância entre um ponto na superfície e a solução, ou seja,  $\rho_{carga}^{sup} \propto \frac{\Delta\varphi}{\delta}$ , para uma distância  $\delta$ . Então, obtemos:

$$|\vec{T}_{cis}| \propto \frac{\Delta\varphi}{\delta} \cdot |\vec{E}_{ext}| \quad (28)$$

A constante de proporcionalidade na equação 28 é o produto da permissividade elétrica do meio na dupla camada ( $\epsilon$ ) e a permissividade elétrica do vácuo ( $\epsilon_0$ ).

$$|\vec{T}_{cis}| = \epsilon\epsilon_0 \frac{\Delta\varphi}{\delta} \cdot |\vec{E}_{ext}| \quad (29)$$

Na eletrosmose, a fase contínua se movimenta em relação à fase dispersa. Isso ocorre, pois ao ser aplicado a um campo elétrico, as partículas carregadas na solução se movem levando consigo as moléculas de água ou outras moléculas existentes na fase contínua. Nesse movimento, surgirá uma força de resistência contrária. Essa é a força de

resistência viscosa,  $T_{viscosa}$ . A grandeza  $T_{viscosa}$  é proporcional a  $dv/dx$ , gradiente de velocidade entre camadas vizinhas e a superfície.

$$|\vec{T}_{vis}| = n \cdot \frac{d\vec{v}}{d\vec{x}} \quad (30)$$

Onde  $n$  é a viscosidade do fluido no interior da dupla camada elétrica, denominada microviscosidade, e  $\frac{d\vec{v}}{d\vec{x}}$  é a taxa de variação da velocidade das camadas do líquido em relação à superfície da partícula com a distância em relação à superfície da dupla camada elétrica.

Após a aplicação de um campo elétrico, as partículas da fase dispersa vão se movimentar até chegar a um estado de equilíbrio metaestável. Nesta situação, a força de cisalhamento que faz a fase se mover, se igualará a força de resistência.

$$|\vec{T}_{cis}| = |\vec{T}_{vis}| \quad (31)$$

Nesse estado de equilíbrio, as partículas começam a se movimentar com velocidade constante em relação à fase contínua. Substituindo as relações 29 e 30 em 31, temos:

$$\varepsilon\varepsilon_0 \frac{\Delta\varphi}{\delta} \cdot E_{ext} = -n \cdot \frac{dv}{dx} \quad (32)$$

Essas são as equações desenvolvidas por Helmholtz para explicar os fenômenos eletrocinéticos. Na equação 32, a diferença de potencial elétrico também é conhecida como diferença de potencial zeta. A diferença de potencial entre a superfície da partícula e a região na solução com carga oposta localizada a uma distância  $\delta$  da superfície, no modelo de Helmholtz, é denominada de potencial zeta. Podemos determinar seus valores experimentais e teóricos.

Uma das limitações na obtenção do potencial zeta é que ele leva em conta alguns parâmetros de difícil determinação. Como por exemplo,  $n$ . Não é possível medir a

viscosidade no interior da dupla camada elétrica, então, para determinação deste potencial utiliza-se a viscosidade da fase contínua. Outro parâmetro duvidoso é a rigidez dielétrica do meio, que não é necessariamente a rigidez no interior da partícula coloidal.

Uma limitação no modelo proposto por Helmholtz está na ideia de que os íons iriam formar estruturas organizadas e planas em torno da interface. Não seria possível obter essa estrutura uma vez que os íons estão se movimentando todo o tempo. Um modelo mais coerente deveria compreender uma estrutura da dupla camada dinâmica.

Todavia, no modelo de Helmholtz, próximas à interface só poderiam estar presentes cargas de sinal contrário para se formar um capacitor. Mas isso não pode ser verdade, pois como os íons estão se movendo dinamicamente, próximas à interface também pode haver cargas positivas, já que a distribuição destas partículas é randômica. E mesmo existindo a repulsão elétrica entre partículas com mesma carga, partículas de mesma carga da interface poderiam se aproximar da interface. O que podemos esperar é que a densidade de cargas positivas é menor que a densidade de cargas negativas próximas a interface. Já ao analisar uma região mais distante da interface, encontraremos maior densidade de cargas positivas. Já a uma distância considerável, a densidade de cargas positivas e negativas se igualará.

A distribuição iônica em torno da interface visa reduzir a energia livre de Gibbs do sistema. Quando o equilíbrio termodinâmico é alcançado, o potencial eletroquímico ( $\tilde{\mu}_i$ ) de todas as espécies iônicas é mantido constante<sup>42</sup>, como pode ser observado na equação 33.

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i^\theta + RT \ln n_i + Z_i e N_A \varphi(x) = cte \quad (33)$$

Onde  $\mu_i^\theta$  é potencial químico da substância i no estado padrão,  $e$  é carga do elétron,  $Z_i$  é a carga do íon,  $\varphi(x)$  é a diferença de potencial elétrico entre a interface e um ponto P a uma certa distância da interface,  $N_A$  é constante de Avogadro,  $R$  é a

constante dos gases,  $T$  é a temperatura em Kelvin e  $n_i$  é o número de mols da espécie  $i$  por  $\text{m}^3$  (tanto o “bulk” quanto a dupla camada elétrica se comportariam como soluções idealmente diluídas).

Esta equação nos mostra que três fatores devem governar a distribuição do íon em torno da interface:  $\mu_i^\theta$ ,  $RT \ln n_i$  e  $Z_i e \varphi(x) N_A$ . O primeiro,  $\mu_i^\theta$ , varia em função da posição do íon, uma vez que, dependendo da posição, o íon fará diferentes interações intermoleculares e também alterará a configuração da solução. O segundo,  $RT \ln n_i$ , refere-se à contribuição para a entropia configuracional da dupla camada elétrica. Este termo refere-se à força motriz que vai procurar manter os íons numa dada região da dupla camada elétrica, organizados na configuração de maior probabilidade. O terceiro fator,  $Z_i e N_A \varphi(x)$ , é a energia devido às interações eletrostáticas ocorrendo entre íons que gera uma diferença de potencial elétrico<sup>42</sup>. Pode também ser definido, como trabalho elétrico, ou seja, é a energia potencial elétrica na forma de trabalho necessária para transportar o componente  $i$  do infinito até um ponto na dupla camada elétrica que se encontra num plano a uma distância  $x$  da interface com potencial  $\varphi(x)$ . Essa energia potencial elétrica surge da assimetria de cargas que existe em toda a região da dupla camada elétrica. Trata-se não só da distribuição de cargas na superfície, mas também na solução. Como a distribuição de cargas é diferente em cada ponto da interface, a energia potencial elétrica da espécie depende de sua posição<sup>42</sup>.

A partir destas considerações quatro estudiosos, Stern, Helmholtz, Gouy e Chapman propuseram um modelo para a dupla camada elétrica. De acordo com eles a estrutura da dupla camada elétrica era dividida em duas estruturas. Uma é a estrutura interna da dupla camada elétrica que é a estrutura mais próxima da interface, conhecida como estrutura interna de Stern-Helmholtz. Segundo eles, nesta estrutura interna as interações intermoleculares e a entropia dominam. Os íons que se aproximam da

interface fazem fortes interações intermoleculares (não apenas interações eletrostáticas) com as moléculas presentes na interface perdendo H<sub>2</sub>O de solvatação. Na região conhecida como Stern- Helmholtz pode ter íons de mesma carga que a interface coloidal, pois a interação dessas cargas com partículas na superfície são mais fortes que a repulsão eletrostática.

A outra região é a camada de Gouy – Chapman, mais distante da interface. Nela a distribuição dos íons é governada por forças entrópicas e eletrostáticas e os íons conservam a camada de solvatação.

A partir de uma série de deduções matemáticas, propostas por estes quatro estudiosos, ao longo de vários anos, realizadas no intuito de compreender como os íons se distribuem ao longo da dupla camada elétrica e como o potencial elétrico varia ao longo desta região, obtêm-se equações que mostram como o potencial elétrico varia na camada de Stern-Helmholtz e na camada de Gouy Chapman. Assim, podemos definir o potencial zeta segundo o modelo de Stern-Helmholtz-Gouy-Chapman.

Segundo o modelo de Stern-Helmholtz-Gouy-Chapman, potencial zeta é o valor do potencial em uma região em que a força elétrica aplicada por um campo elétrico externo é suficiente para deslocar a partícula em relação ao meio contínuo, carregando com ela toda a camada de Stern-Helmholtz e parte da camada de Gouy-Chapman. Ou seja, o potencial zeta é o valor da diferença de potencial entre o plano de cisalhamento que existe entre a unidade que se move, o meio contínuo e a superfície da partícula.

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS, MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Objetivos**

1. Estudar a interação intermolecular entre as proteínas  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg e peptídeo GMP com nanotubos de paredes múltiplas em diferentes valores de pH;
2. Determinar os parâmetros termodinâmicos de adsorção:  $\Delta_{ads}H$ ,  $\Delta_{ads}S$ ,  $\Delta_{ads}G$ ;
3. Investigar o efeito da natureza e concentração de eletrólitos sobre o processo de adsorção;
4. Determinar a contribuição da estrutura terciária da água sobre a interação proteína-MWCNT;
5. Determinar a força motriz associada ao processo de adsorção de proteínas em CNTs.

### **2.2. Materiais e Métodos**

#### **2.2.1. Caracterização dos MWCNT**

Adsorção de N<sub>2</sub>: A área superficial específica do MWCNT foi determinada a partir de isotermas de adsorção / dessorção de N<sub>2</sub> obtidas em um sistema automatizado de sorção de gás, Autosorb-1 ASIAG (INSTRUMENTOS Quantachrome), utilizando o método de Brunauer-Emmett-Teller (BET).

Análise termogravimétrica: Medidas Termogravimétricas (TG) foram realizadas utilizando um analisador simultâneo TG / DTA, a 5°C min<sup>-1</sup> em um fluxo de ar seco de 100 mL min<sup>-1</sup> entre 25 e 1000 ° C em um cadinho de alumínio.

Microscopia Eletrônica de Varredura: A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com 200 Quanta 200 FEG (FEI). A amostra de nanotubos de

carbono foi colocada em uma fita de carbono condutora e coberto com uma fina camada de ouro (~ 10 nm) para melhor visualização.

Microscopia Eletrônica de Transmissão: A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada com um microscópio Tecnai-G-20 (FEI), empregando um filamento LaB<sub>6</sub> com uma tensão de aceleração de 200 kV. As amostras para análise em TEM estavam dispersas em etanol e eram gotejadas em uma grade de cobre revestida com carbono.

## **2.2.2. Adsorção de proteínas do soro do leite em MWCNT**

### **2.2.2.1. Equipamentos**

Um peagâmetro (WTW Wissenschaftlich-TechnischeWerkstätten, pH 330i/SET) foi empregado para o preparo dos tampões. As amostras foram preparadas por pesagem de quantidades adequadas de MWCNT, utilizando uma balança analítica (Shimadzu, AY 220) com uma incerteza de  $\pm 0,0001$  g e adição de solução de proteína com auxílio de uma bureta. Também foram utilizados um microcalorímetro de titulação isotérmica, modelo CSC 4200 e um banho termostaticado (Cientec, CT 281-28) durante os experimentos. As concentrações de proteína das soluções sobrenadantes foram determinadas espectroscopicamente a 280 nm utilizando um espectrômetro de absorção molecular na região do ultra-violeta visível (UV/vis) (Shimadzu UV-2550).

### **2.2.2.2. Materiais e Reagentes**

Todos os reagentes, de grau analítico, foram utilizados como recebidos, sem purificação adicional. Para a construção das isotermas, foram utilizadas as proteínas  $\alpha$ -

lactoalbumina, massa molar média ( $M_w$ ) de 14,1 KDa,  $\beta$ -lactoglobulina,  $M_w$  18,3 kDa e o peptídeo glicomacropéptido obtidos da Davisco Foods International, Inc. (Minnesota, USA) e o adsorvente, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) C<sub>TUBE</sub> 100 MWCNT foi obtido da CNT CO., LTD., Korea. Especificações técnicas dos MWCNT foram fornecidas pelo fabricante: diâmetro médio: 10-40 nm; tamanho: 1-25  $\mu$ m; pureza: 93 wt % min.; contaminantes: 7 wt% máximo.; densidade: 0.03-0.06 g cm<sup>-3</sup>; área superficial específica: 150-250 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.

Os reagentes fosfato de sódio dibásico anidro Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (98.5%), tiocianato de sódio NaSCN (98 %), sulfato de sódio Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (99 %), carbonato de sódio anidro Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (99.5 %), cloreto de Bário BaCl<sub>2</sub> (99 %), Citrato de sódio tribásico diidratado C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O (99 %) foram obtidos pela VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de tetrametil amônio C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>NCl (98 %) foi comprado da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Cloreto de Amônio (99.5 %) foi comprado da Isofar (Duque de Caxias, Brasil). Ácido Cítrico C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (99.5%) foi comprado da Merck ((Darmstadt, Alemanha)). Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (100 %) foi obtido da Impex (Diadema, Brasil). Água deionizada (Milli-Q, Millipore) foi utilizada no preparo de todas as soluções empregadas nestes experimentos.

### **2.2.2.3. Isotermas de Adsorção de proteínas em MWCNTs**

#### **2.2.2.3.1. Preparo das soluções tampão**

Para obter a solução tampão pH 9 preparou-se 1000 mL de solução 0,1000 mol L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, e ajustou-se o pH do sistema para 9 com a adição de uma solução 0,100 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Para obter-se a solução tampão pH 7, preparou-se 500,0 mL de solução 5,000 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio dibásico e ajustou-se o pH do sistema

para 7 com a adição de uma solução 5,000 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio monobásico. Para obter a solução tampão pH 3, adicionou-se a 465,0 mL de uma solução de ácido cítrico 0,1000 mol L<sup>-1</sup> 500,0 mL de água deionizada e 35,00 mL de solução de citrato de sódio 0,1000 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi homogeneizada e o pH do sistema foi ajustado para 3 com a adição de solução de citrato de sódio 0,1000 mol L<sup>-1</sup>.

#### **2.2.2.3.2. Obtenção das isotermas de adsorção**

Dispersões com 1,000 mg mL<sup>-1</sup> de MWCNT e diferentes concentrações de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg e GMP foram preparadas usando tampão pH 3, 7 e 9. Nos valores de pH 3 e 9 as dispersões foram também preparadas em soluções de eletrólitos da série de Hofmeister NaSCN, BaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>NCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl em quatro diferentes concentrações (0; 1,000; 10,00 e 100,0 mmol L<sup>-1</sup>). O GMP é insolúvel em pH 3 e os experimentos foram realizados apenas em pH 7 e 9 e o efeito do eletrólito estudado apenas em pH 9. As concentrações iniciais das soluções de adsorbato variaram de 0,1000 a 1,000 mg mL<sup>-1</sup> para as proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg e de 0,100 a 3,400 mg mL<sup>-1</sup> e para o peptídeo GMP.

O valor de pH do tampão foi confirmado usando um peagâmetro. Para preparar a dispersão de MWCNT em tubo de headspace, 10,00 mg de adsorvente (MWCNT) foi pesado em uma balança analítica e acrescentou-se vários volumes (0,0-10,00 mL) de solução eletrolítica na concentração de eletrólito e no pH desejado (3, 7 ou 9) para os tubos. Posteriormente, solução concentrada de proteína ( na mesma solução eletrolítica e mesmo tampão) foi adicionado aos tubos a fim de completar o volume da dispersão para 10,00 mL e obter a concentração inicial desejada. Depois de adicionar a quantidade apropriada de cada componente, a mistura foi agitada por 10 minutos e deixada em repouso por aproximadamente 20 h à temperatura de 298,15 K em um banho

termostático. Todas as medidas foram feitas em duplicata e o valor médio da quantidade adsorvida foi utilizado. Quando o equilíbrio foi alcançado, alíquotas do sobrenadante foram coletadas e a concentração de proteína no sobrenadante foi determinada. A diferença entre a concentração inicial de proteína ( $C_{Proteína}^o$ ) e a concentração de proteína na fase líquida após o equilíbrio ( $C_{Proteína}^{equil}$ ) foi determinada de acordo com a equação 34.

$$\Delta C_{Proteína} = C_{Proteína}^o - C_{Proteína}^{equil} \quad (34)$$

Onde  $\Delta C_{Proteína}$  é a variação na concentração de proteína na fase líquida.

As quantidades de proteína adsorvida ( $\Gamma$ ) na fase sólida podem ser calculadas pela equação 35.

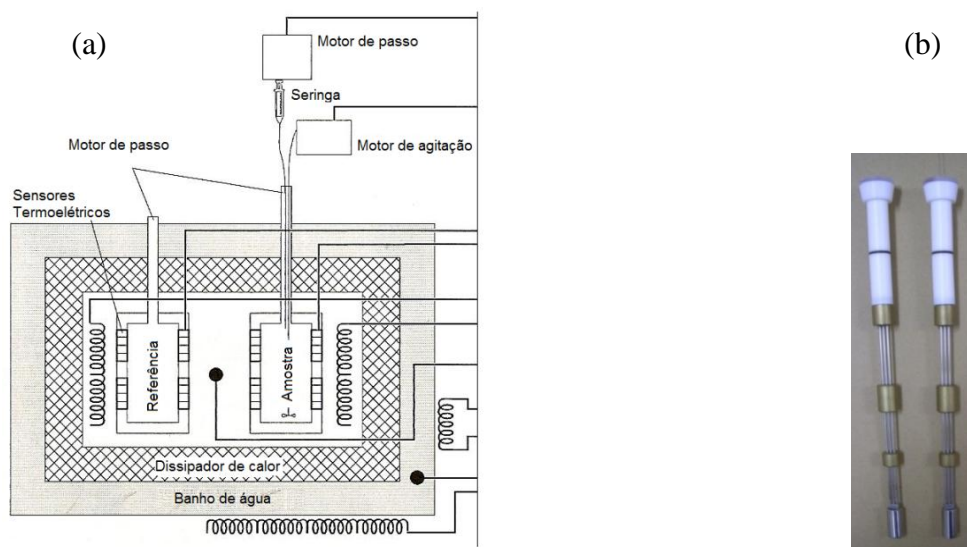
$$\Gamma = \frac{(\Delta C_{Proteína})V}{m} \quad (35)$$

Onde  $\Gamma$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a quantidade em mg de proteína adsorvida por mg de MWCNT,  $V$  (mL) é o volume da fase líquida,  $m$  (g) é a massa de fase sólida.

#### 2.2.2.4. Titulação Calorimétrica Isotérmica (ITC)

Os experimentos de titulação microcalorimétrica para determinação da variação de entalpia de adsorção de proteína na interface dos MWCNTs em dois valores de pH (3 e/ou 9), na presença de três diferentes concentrações de eletrólitos da série de Hofmeister (0, 10,00 e 100,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ) foram realizados em um microcalorímetro de titulação isotérmica. Tal equipamento consegue detectar fluxos de energia da ordem de 0,02  $\mu\text{W}$  através de termopilhas que se encontram entre as celas de amostra e referência (Figura 8a). O equipamento utiliza duas torres (Figura 8b), às quais se conectam celas

com volume de aproximadamente 1,8 mL. Em uma das celas adiciona-se a amostra que será titulada e na outra, uma amostra de referência.



**Figura 8.** (a) Esquema interno do calorímetro e (b) torres e celas de amostra e referência.

Para cada concentração de eletrólito da série de Hofmeister, adicionaram-se em ambas as celas calorimétricas 5,000 mg de MWCNT e 1,8 mL de solução de eletrólito na concentração e pH de interesse, de modo que na cela de amostra foram feitas adições consecutivas de solução concentrada de proteína (na mesma concentração de eletrólito e pH que a dispersão de nanotubo). Todo o experimento de titulação foi programado, sendo automatizado em todas as etapas: as adições das soluções de proteínas realizaram-se por meio de seringas gastight Hamilton (250  $\mu$ L), utilizando-se cânulas capilares feitas de teflon que conduziram a solução até a cela calorimétrica da amostra. As injeções de cerca de 25  $\mu$ L de solução titulante foram controladas por um motor de passo comandado por um microprocessador. O intervalo de tempo entre cada injeção foi de 60 minutos e a homogeneidade da amostra foi garantida por um agitador (350 rpm).

Os valores da energia liberada ou absorvida na forma de calor foram obtidos por integrações das deflexões ocorridas a partir da linha base, na curva de potência versus tempo. Em condições de temperatura e pressão constantes tem-se que a variação de entalpia é numericamente igual à energia na forma de calor envolvido no processo. Assim, pode-se obter a variação de entalpia ( $\Delta_{\text{obs}}H$ ) associada ao processo, para cada injeção de proteína.  $\Delta_{\text{obs}}H$  foi corrigido pela variação de entalpia de diluição das proteínas ( $\Delta_{\text{dil}}H$ ) para obter variação de entalpia líquida de interação entre as proteínas e MWCNT ( $\Delta_{\text{int}}H$ ). Divisão de  $\Delta_{\text{int}}H$  pelo número de mols de proteína adsorvida por grama de nanotubo tem como resultado a variação de entalpia de adsorção da proteína  $\Delta_{\text{ads}}H$  kJ mol<sup>-1</sup>. A variação de entalpia padrão de adsorção  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$  foi determinado considerando a diluição infinita.

Todas as medidas foram feitas a uma temperatura constante de 25,0000 °C .

### **2.2.3. Medidas de Potencial Zeta**

Para as medidas de potencial eletrocinético preparou-se dispersões de 1,000 mg mL<sup>-1</sup> de MWCNT utilizando como solvente as soluções especificadas na Tabela 1. As dispersões foram homogeneizadas durante 10 minutos em um banho ultrassom e, em seguida, transferidas para um banho termostatizado a 25°C, onde permaneceram por 20 horas. Após essas etapas o sobrenadante foi recolhido e o potencial eletrocinético (potencial zeta,  $\xi$ ) da superfície dos nanotubos e da superfície dos bionanocomplexos proteína-nanotubo foram medidos em um equipamento ZETA PLUS SIZE.

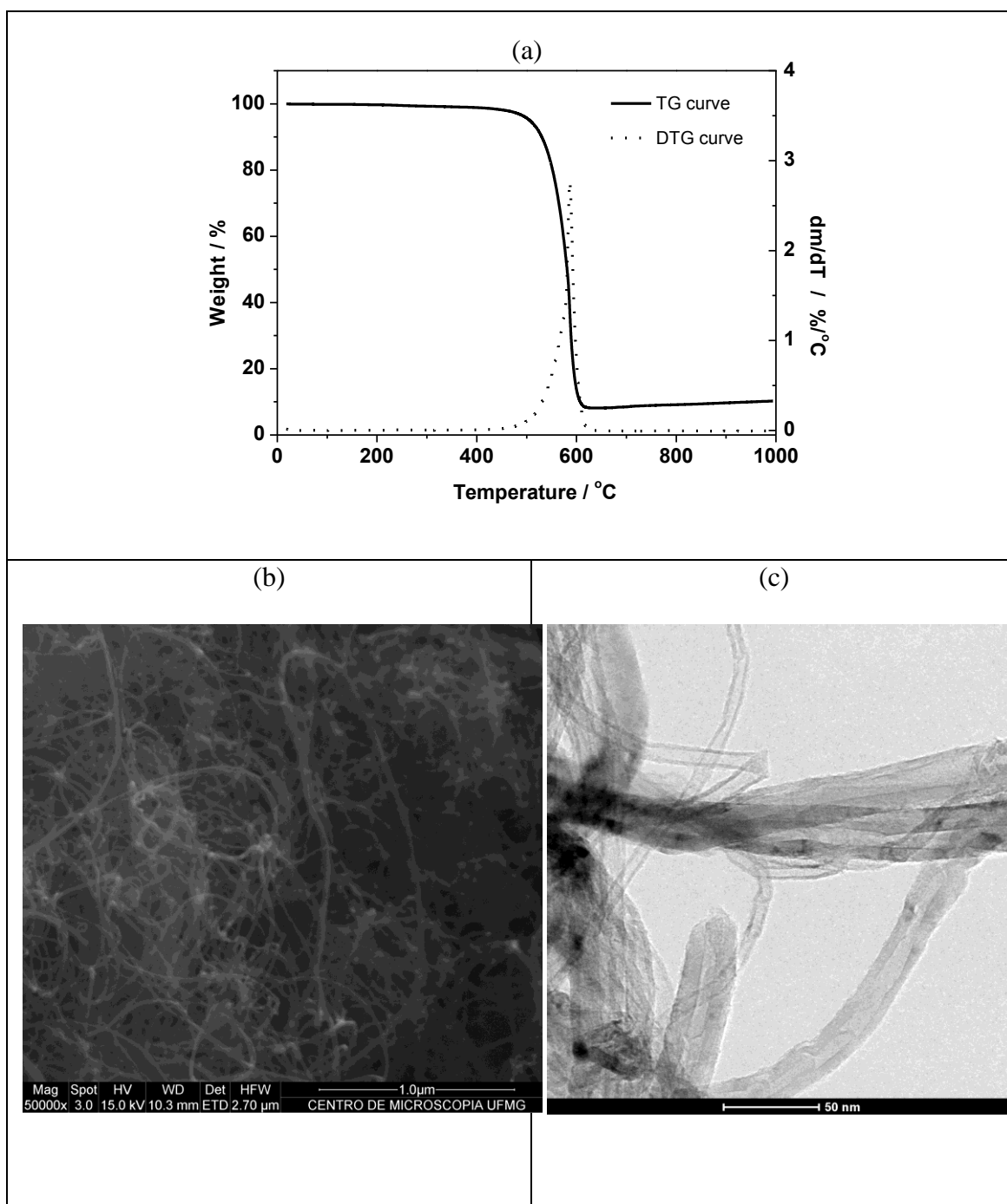
**Tabela 1:** Solventes utilizados no preparo das dispersões de MWCNT para medidas de  $\xi$ .

Código	Solvente
01	$\alpha$ -La 0,4006 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9
02	$\alpha$ -La 1,003 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9
03	$\alpha$ -La 0,4006 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 3
04	$\alpha$ -La 0,9014 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 3
05	$\alpha$ -La 0,4014 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 7
06	$\alpha$ -La 0,9032 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 7
07	$\beta$ -Lg 0,4018 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 3
08	$\beta$ -Lg 0,9041 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 3
09	$\beta$ -Lg 0,4016 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9
10	$\beta$ -Lg 0,9036 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9
11	$\alpha$ -La 0,4020 mg mL <sup>-1</sup> tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl
12	$\alpha$ -La 1,010 mg mL <sup>-1</sup> tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl
13	$\alpha$ -La 0,4014 mg mL <sup>-1</sup> tampão pH 9 100 mM (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl
14	$\alpha$ -La 1,007 mg mL <sup>-1</sup> tampão pH 9 100 mM (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl
15	$\beta$ -Lg 0,4000 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl
16	$\beta$ -Lg 1,000 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl
17	$\beta$ -Lg 0,4001 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9 100 mM (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl
18	$\beta$ -Lg 0,9005 mg mL <sup>-1</sup> em tampão pH 9 100 mM (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl
19	Tampão pH 9
20	Tampão pH 3
21	Tampão pH7
22	Tampão pH9 (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl 100 mM
23	Tampão pH9 NH <sub>4</sub> Cl 100 mM

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Caracterização dos MWCNTs

A partir da análise termogravimétrica (TG) (Figura 9a) e imagens de MEV e MET (exemplos podem ser encontrados na Figura 9b e Figura 9c, respectivamente).

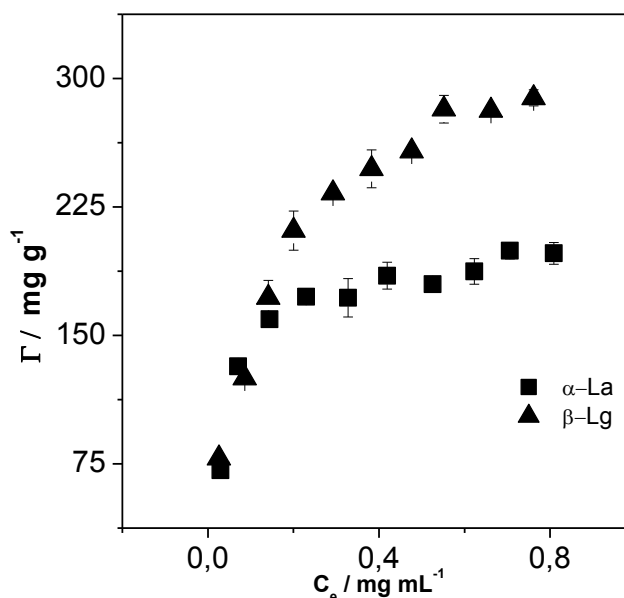


**Figura 9.** (a) Curvas de TGA e DTG, (b) micrografia eletrônica de varredura e (c) imagens de transmissão eletrônica de amostras MWCNTs.

Observa-se que a amostra de MWCNT tem uma pureza superior a 90 %, com tubos de comprimentos que variam entre de 1-25  $\mu\text{m}$  e diâmetros em torno de aproximadamente 10-40 nm (com predominância de tubos com diâmetro médio em torno de aproximadamente 13 nm). Sua área superficial foi determinada através de isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77 K usando a equação BET, e é da ordem de  $188 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Estes dados estão de acordo com as informações fornecidas pelo fornecedor do material, apresentada anteriormente.

### 3.2. Isotermas de adsorção

A Figura 10 mostra as quantidades adsorvidas ( $\Gamma$ ), expressa em miligramas das proteínas  $\alpha$ -La ou  $\beta$ -Lg por grama de MWCNT, em função da concentração de equilíbrio do biopolímero, dada em  $\text{mg mL}^{-1}$  em tampão pH 9.



**Figura 10.** Isoterma de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em MWCNT pH 9 a  $25^\circ\text{C}$ .

Analisando o comportamento de adsorção da  $\alpha$ -La e da  $\beta$ -Lg percebe-se que em baixas concentrações de proteína,  $0 < [\alpha\text{-La}] < 0,2000$  e  $0 < [\beta\text{-Lg}] < 0,5000 \text{ mg mL}^{-1}$ ,

há um aumento no valor de  $\Gamma$  com o crescimento da concentração de equilíbrio da proteína em solução. A afinidade das proteínas pela superfície dos MWCNTs é refletida na inclinação inicial das isotermas e pode ser verificado que a interação entre as proteínas e as nanoestruturas de carbono é alta. Para ambas as proteínas, em concentrações superiores a esse intervalo, observa-se um platô que possivelmente caracteriza uma saturação da superfície do adsorvente e como consequência o valor de  $\Gamma$  não varia com o aumento da concentração de proteína.

Apesar do perfil das isotermas de adsorção para  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg obtidas a 25°C e pH 9, mostrado na Figura 10, ser semelhante, no entanto, observa-se que a capacidade de adsorção máxima ( $\Gamma_{\max}$ ) observada para maiores concentrações de proteína depende da natureza do biopolímero, sendo menor para a  $\alpha$ -La do que para  $\beta$ -Lg.

Estudos sobre a adsorção de  $\alpha$ -La<sup>74-77</sup> e  $\beta$ -Lg<sup>74,78-81</sup> em diferentes interfaces mostram que a interação destas proteínas com a superfície são afetadas por um grande número de fatores tais como: temperatura, conformação da proteína em solução, sua concentração de equilíbrio em solução, pH, força iônica e características superficiais do substrato. Em geral, um aumento na temperatura resulta num aumento na capacidade adsortiva, tendo uma temperatura crítica acima da qual ocorre um aumento abrupto na capacidade adsortiva da superfície sólida. Foi verificado, também, que superfícies hidrofóbicas geralmente adsorvem muito mais estas duas proteínas do que interfaces hidrofílicas<sup>19</sup>. Estes trabalhos demonstraram que apesar da espessura da camada adsorvida ser considerada igual a uma monocamada, durante o processo de adsorção ocorrem mudanças conformacionais nas estruturas terciárias e secundárias de ambas as proteínas, sendo, muitas vezes, difícil a obtenção de informações detalhadas sobre a conformação dos biopolímeros na camada adsortiva.

A molécula de  $\alpha$ -La consiste de uma única cadeia polipeptídica e quatro ligações dissulfídicas. Ela é uma proteína globular compacta que se liga ao íon cálcio na razão 1:1 em um sítio específico e consiste de dois domínios: um  $\alpha$ -hélice e uma  $\beta$ -folha. O metal se liga a proteína através de 7 átomos de oxigênio formando uma bipirâmide pentagonal. Esses átomos de oxigênio originam de dois grupos carboxílicos e duas moléculas de água<sup>77</sup>.

Uma notável propriedade das moléculas de  $\alpha$ -La é a existência de um estado “mole” no qual a conformação da proteína possui uma estrutura secundária estável e uma estrutura terciária desordenada e mais relaxada. Por outro lado, as moléculas de  $\beta$ -Lg são proteínas globulares mais organizadas e menos flexíveis do que a  $\alpha$ -La resistindo assim mais a mudanças conformacionais causadas pelo processo de adsorção.

Estudos envolvendo adsorção de proteínas em interfaces de CNTs indicam que as interações hidrofóbicas e do tipo  $\pi$ - $\pi$  são as principais responsáveis pela adsorção de proteínas em nanotubos de carbono<sup>82-85</sup>, apesar de reconhecerem que as interações eletrostáticas e as ligações de hidrogênio poderem também desempenhar um papel importante em algumas condições<sup>85-87</sup>. Entretanto nenhum desses trabalhos determinou quantitativamente as energias envolvidas no processo de adsorção nem tampouco as forças motrizes responsáveis pela interação entre as proteínas e as nanoestruturas de carbono.

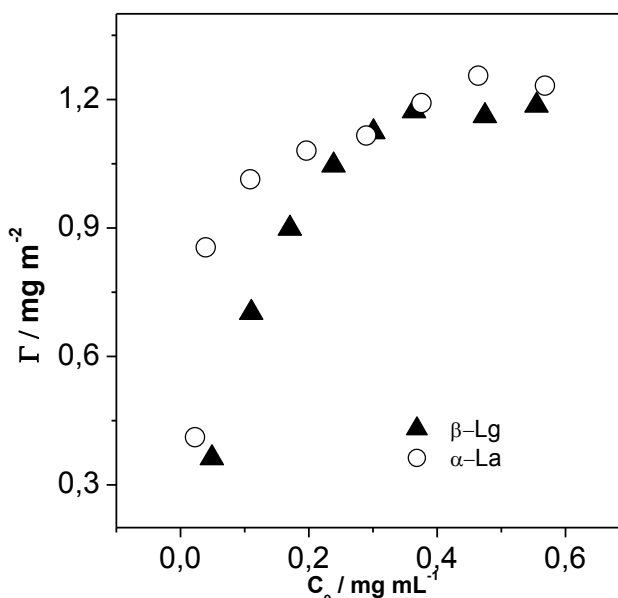
Diferentes proteínas globulares possuem aspectos comuns em suas estruturas secundárias e terciárias. Cálculos de mecânica e dinâmica moleculares obtidos usando uma estação de trabalho Silicon Graphics Iris 4D/70GT, o programa de computador Byosym's INSIGHTII e coordenadas atômicas obtidas pelo banco de dados de proteínas (Brookhaven National Laboratory) mostram que os átomos destas proteínas são densamente empacotadas, levando a uma forte interação de van der Waals entre átomos

adjacentes e conseqüente, a uma densidade atômica no interior destas proteínas igual a aproximadamente 75 % da densidade esperada em modelos atômicos de esfera rígida. Além disso, grupos hidrofóbicos tendem a se esconder no interior da biomolécula onde diminuem o contato com as moléculas de água e como conseqüência alguns grupos hidrofílicos, ligados aos grupos hidrofóbicos por ligações covalentes ou de hidrogênio acabam também se localizando no interior. Quanto aos grupos carregados, estão sempre localizados na interface proteína/solução. Qualquer grupo carregado no interior da proteína ocorrerá sempre como um par iônico, pois sua ionização é fortemente impedida pela baixa rigidez dielétrica da vizinhança. Entretanto, estes cálculos estruturais mostram que uma considerável área superficial destas proteínas tem um caráter hidrofóbico, enquanto resíduos polares e apolares são mais ou menos igualmente distribuídos sobre a superfície da proteína<sup>88</sup>.

Apesar de ambas as proteínas possuírem pontos isoelétricos próximos (PI da  $\alpha$ -La= 4,6 e PI da  $\beta$ -Lg=5,2), a  $\alpha$ -La é mais hidrofóbica do que  $\beta$ -Lg, em conseqüência da presença do resíduo de aminoácido triptofano<sup>89</sup>. Se fossem as interações adsorvato-adsorvente principalmente de natureza hidrofóbica os valores de  $\Gamma$  para a  $\alpha$ -La deveriam ser maiores que para  $\beta$ -Lg, porém os resultados experimentais mostram um comportamento inverso (figura 12). O menor valor de  $\Gamma_{\max}$  para  $\alpha$ -La pode ser decorrente da sua menor rigidez conformacional quando comparada a  $\beta$ -Lg, o que permitiria durante o processo de adsorção, um maior grau de mudança conformacional levando a estruturas moleculares mais abertas e com maior capacidade de recobrimento de área superficial por molécula, o que naturalmente levaria a uma saturação da interface com um menor número de biomoléculas adsorvidas.

A despeito da menor capacidade adsortiva da  $\alpha$ -la em superfícies de CNTs; estas nanoestruturas de carbono são adsorventes promissores para processos de purificação

desta proteína. A título de comparação com outros adsorventes a Figura 13 mostra nossos resultados expressos como quantidades adsorvidas ( $\Gamma$ ), em miligramas de proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg por  $\text{m}^2$  de área de MWCNT em função da concentração de equilíbrio de proteína, dada em  $\text{mg mL}^{-1}$  em tampão pH 7.

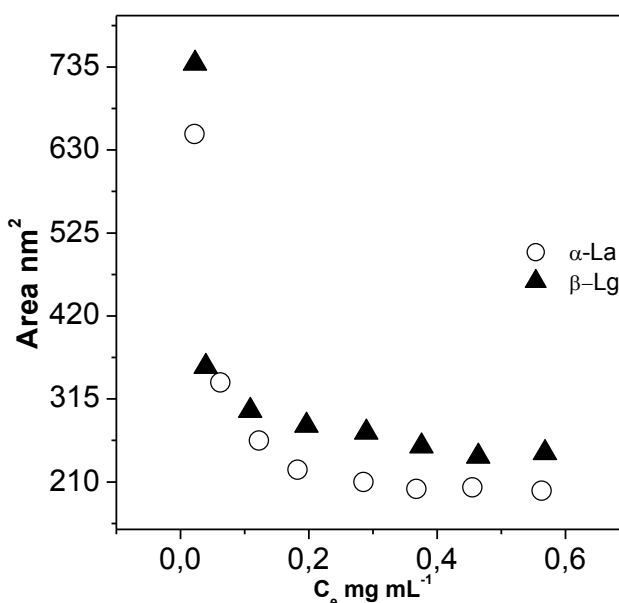


**Figura 11.** Isoterma de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg pH 7 a 25°C.

A isoterma de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em pH 7 (Figura 13) tem o mesmo perfil e comportamento de saturação que em pH 9, com uma  $\Gamma$  máxima de 1,173  $\text{mg}$  ( $\alpha$ -La) /  $\text{m}^2$  (MWCNT) e 1,232  $\text{mg}$  ( $\beta$ -Lg) /  $\text{m}^2$  (MWCNT). Em baixas concentrações ( $0 < [\alpha\text{-La}] \text{ mg mL}^{-1} < 0,3009$  e  $0 < [\beta\text{-Lg}] \text{ mg mL}^{-1} < 0,2897$ ) observa-se um aumento na  $\Gamma$  com o aumento da concentração de equilíbrio de  $\alpha$ -La. Para concentrações superiores a estes intervalos observa-se a saturação da superfície do adsorvente e os valores de  $\Gamma$  não variam com o aumento da concentração de proteína. Resultados experimentais de quantidades de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg adsorvidas máximas sobre superfícies de materiais sólidos, medidos a 295 K e em pH 7, mostram valores de  $\Gamma_{\text{max}}$  para alguns adsorventes usados mais baixos quando comparado com o  $\Gamma_{\text{max}}$  em NCTs, evidenciando o grande potencial como adsorvente dos MWCNT. Por exemplo, os valores de  $\Gamma_{\text{max}}$  da  $\alpha$ -La em hematita e

sílica gel em pH 7 a 22°C são 0,6500 e 0,1500 mg de  $\alpha$ -La por m<sup>2</sup> de adsorvente, respectivamente<sup>90</sup>. Entretanto, para o adsorvente poliestireno sulfonado (PSS) foram observados valores de  $\Gamma_{\max}$  de 1,5 mg m<sup>-2</sup> a 22°C em pH 7<sup>91</sup>, tendo esse material uma maior capacidade adsortiva para a  $\alpha$ -La que os MWCNTs. Para a proteína  $\beta$ -Lg a 25°C foram obtidos valores de  $\Gamma_{\max}$  2,000; 2,100 e 0,6000 mg m<sup>-2</sup> em superfícies de cromo hidrofílico pH 6<sup>92</sup>, sílica e sílica gel em pH 7<sup>93</sup> respectivamente.

Em tampão pH 7 a área disponível para cada molécula de  $\alpha$ -La (Figura 12) varia de 650,2 nm<sup>2</sup> em C<sub>e</sub> 0,0218 mg mL<sup>-1</sup> para 202,9 nm<sup>2</sup> em C<sub>e</sub> 0,4549 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto que para a  $\beta$ -Lg varia de 739,4 nm<sup>2</sup> em C<sub>e</sub> 0,0227 mg mL<sup>-1</sup> para 242,2 nm<sup>2</sup> em C<sub>e</sub> 0,4641 mg mL<sup>-1</sup>



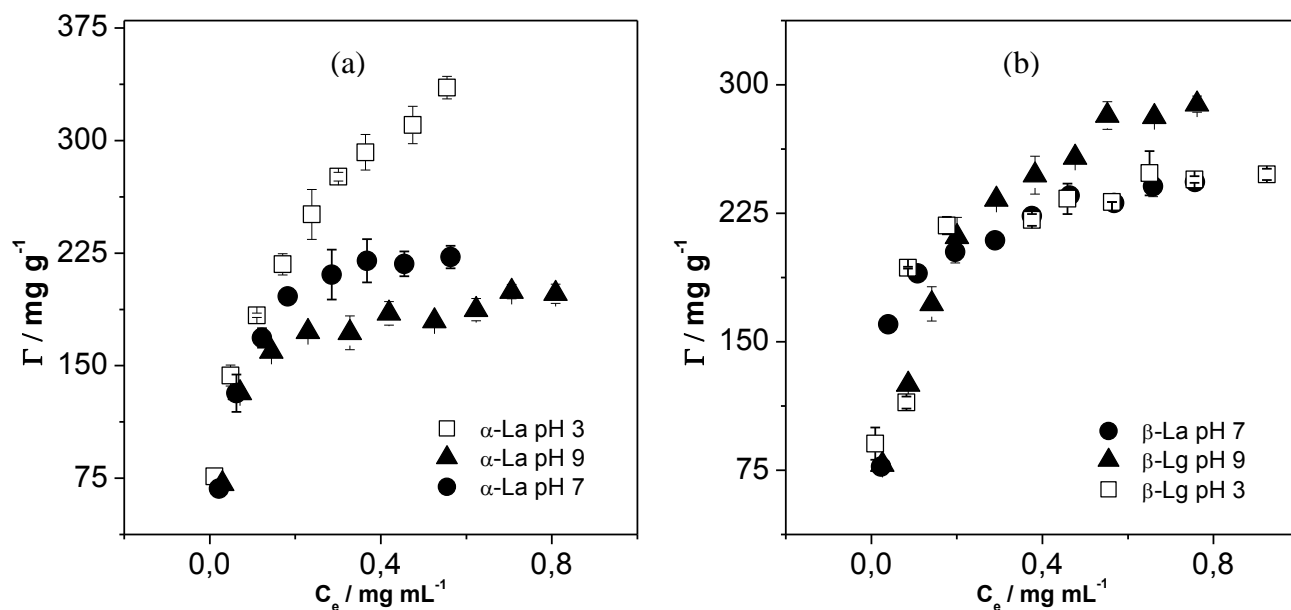
**Figura 12.** Área superficial do MWCNT disponível para cada molécula de proteína adsorvida em pH 7 a 25°C.

O diâmetro hidrodinâmico médio de  $\alpha$ -La em pH 7 a 25°C é 4,27 nm<sup>94</sup> e considerando que durante o processo de adsorção não ocorra mudança conformacional, a área ocupada por cada molécula de  $\alpha$ -La na superfície do MWCNT é igual a aproximadamente 14,39 nm<sup>2</sup> ( $A=\pi r^2$ ). O raio de  $\beta$ -Lg em pH 7 é aproximadamente 3,6 nm e a área ocupada por cada molécula é 40,71 nm<sup>2</sup>. Como cada molécula de  $\alpha$ -La tem

para si uma área entre 650,2 nm<sup>2</sup> e 202,9 nm<sup>2</sup>, e cada molécula de  $\beta$ -Lg uma área entre 739,4 nm<sup>2</sup> e 246,7 nm<sup>2</sup> estes resultados sugerem que as moléculas de proteína estão distantes entre si na superfície dos MWCNT. Entretanto, para considerarmos que quando uma proteína de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg tiver a sua disposição uma área superficial do MWCNT igual a 202,9 nm<sup>2</sup> e 246,7 nm<sup>2</sup>, respectivamente, a superfície dos MWCNT já estará saturada; temos que reconhecer que provavelmente ocorreu uma mudança conformacional na proteína, levando-a a estruturas abertas que ocupam áreas muito maiores do que 14,39 nm<sup>2</sup> e/ou, além disso, não podemos esquecer que nem toda a área da superfície do nanotubo está disponível para a proteína, pois a proteína não tem acesso a área interna do MWCNT.

Como já é bem estabelecido, o pH determina a carga líquida da proteína e estudando o efeito da concentração hidrogeniônica sobre o processo da adsorção, podemos determinar a contribuição das interações eletrostáticas sobre a interação proteína/CNTs. Assim, estudou-se o processo de adsorção das proteínas nos pHs 3 (carga líquida das proteínas positiva), 7 e 9 (carga líquida das proteínas negativa). Em valores de pH próximos ao PI (carga líquida das proteínas nula) as proteínas não solubilizaram impedindo a realização dos experimentos.

O efeito do pH do meio tamponante sobre a isoterma de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg é mostrado na Figura 13a e 13b, respectivamente.



**Figura 13.** Isotermas de adsorção em diferentes valores de pH a 25° C para: (a)  $\alpha$ -La e (b)  $\beta$ -Lg.

Em baixas concentrações de ambas as proteínas, o efeito do pH é insignificante sugerindo assim que a afinidade dos biopolímeros pela superfície das nanoestruturas de carbono é pouco afetada pela densidade de carga presente no biopolieletrólito. Assim, fica evidente que a interação proteína-CNTs é pouco influenciada por forças eletrostáticas, sendo determinada principalmente por interações hidrofóbicas e de Lifschitz-van der Waals.

Na Figura 13a também podemos observar que o valor máximo de adsorção para a  $\alpha$ -La é atingido em pH 3, onde a proteína é carregada positivamente, e que o aumento do pH para valores maiores que o ponto isoelétrico da proteína diminui os valores de  $\Gamma_{\text{max}}$  para a  $\alpha$ -La. Em geral, observa-se que a adsorção da  $\alpha$ -La em diferentes substratos possui um comportamento no qual a adsorção é máxima em valores pouco menores que o PI da proteína dissolvida no tampão e dos dois lados deste máximo a adsorção diminui com o afastamento do valor do pH em relação ao PI. Como este efeito do pH não se manifesta no início do processo de adsorção, mas apenas quando a superfície está

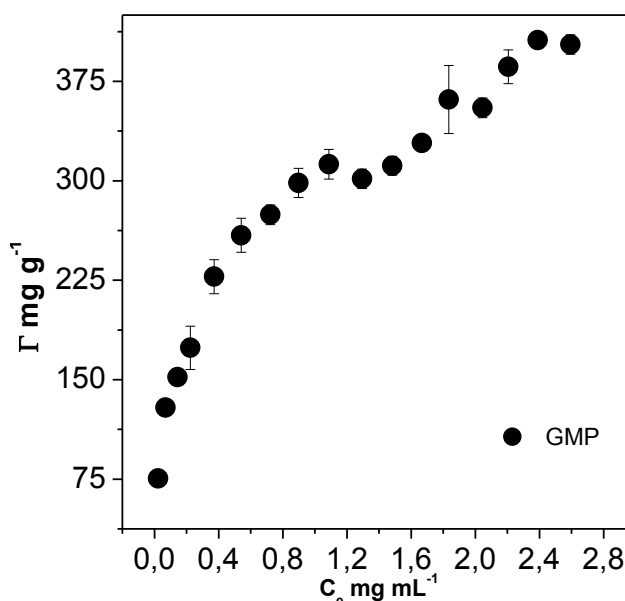
saturada, podemos inferir que este efeito da carga deve-se não a uma ação sobre a interação proteína-CNTs, mas sim a uma interação proteína-proteína presentes na interface do CNT.

Como descrito acima, a  $\alpha$ -La está ligada a átomos de cálcio em sua estrutura nativa e tem sido demonstrado que em soluções aquosa dessa proteína e em valores de pH abaixo de 4, ocorre a formação quase instantânea de uma conformação na qual a estrutura terciária torna-se desordenada e mais relaxada enquanto a estrutura secundária permanece quase similar a conformação da proteína nativa<sup>77</sup>. Além disso, este intermediário estrutural resulta em forte aumento da exposição da região hidrofóbica de  $\alpha$ -La, aumentando então as interações  $\alpha$ -La-nanotubo e  $\alpha$ -La- $\alpha$ -La presentes na interface da nanoestrutura de carbono, justificando os maiores valores de  $\Gamma_{\max}$  em pH 3.

Por outro lado, para a  $\beta$ -Lg observa-se um efeito muito menor do pH sobre os valores de  $\Gamma_{\max}$  (Figura 13b), quando comparado aos valores de  $\Gamma_{\max}$  da  $\alpha$ -La. Em solução a conformação da  $\beta$ -Lg é dependente da concentração hidrogeniônica do meio, sendo bem conhecido que a estrutura quaternária da  $\beta$ -Lg é fortemente dependente do pH. Em valores de pH abaixo de 3,5 e acima de 7,5 a  $\beta$ -Lg encontra-se sob a forma de monômeros, entre o pH 5,2 e 7,5 os monômeros de  $\beta$ -Lg se associam formando dímeros e quando o pH do meio se encontra entre 3,5 e 5,2 os dímeros se agregam formando octômeros<sup>35</sup>. Apesar do significativo efeito do pH sobre a estrutura conformacional e carga líquida da  $\beta$ -Lg em solução, não se observou um efeito significativo do pH nos valores de  $\Gamma_{\max}$ , evidenciando que as interações responsáveis pela adsorção da  $\beta$ -Lg na superfície de MWCNT não são, principalmente, de natureza eletrostática e que a interação  $\beta$ -Lg- $\beta$ -Lg na interface do nanotubo não é dependente da densidade de carga superficial. Observa-se também que a  $\Gamma_{\max}$  da  $\alpha$ -La é maior quando sua carga líquida é positiva (pH 3) e da  $\beta$ -Lg quando a carga líquida é negativa (pH 9), evidenciando que o

processo de mudança conformacional destas proteínas durante o processo de adsorção é dependente da CL da proteína.

A Figura 14 mostra as quantidades adsorvidas ( $\Gamma$ ), expressa em miligramas de GMP por grama de MWCNT em função da concentração de equilíbrio de GMP, dada em  $\text{mg mL}^{-1}$  em tampão pH 9.



**Figura 14.** Isotherma de adsorção de GMP em pH 9 a 25°C.

A isoterma de adsorção do GMP (Figura 14) mostra um perfil diferente das isotermas da  $\alpha$ -La ou da  $\beta$ -Lg. Entre as concentrações de  $0 < [\text{GMP}] < 1,100$  e  $1,700 < [\text{GMP}] < 2,230$  observa-se um aumento no valor de  $\Gamma$  com o crescimento da concentração do glicomacropéptido, para concentrações de GMP entre  $1,100 < [\text{GMP}] < 1,700$  e  $[\text{GMP}] > 2,230$  observa-se a formação de um pequeno patamar e o valor de  $\Gamma$  praticamente não varia com o aumento da concentração de proteína.

O GMP é um glicomacropéptido produzido pela hidrólise de  $\beta$ -caseína possuindo por isso uma cadeia peptídica com aminoácidos semelhantes aos presentes em determinadas regiões das proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg. Espera-se então que a semelhança

entre o GMP e as proteínas em relação à composição e/ou sequência de aminoácidos possa dar alguma evidência sobre a força motriz responsável pela adsorção das proteínas.

O comportamento distinto da isoterma de adsorção do GMP pode ser atribuído a formação de uma camada de adsorção mais complexa do que aquela formada na adsorção das proteínas. O GMP é um polipeptídeo hidrofílico com 1,9 vezes menos resíduos de aminoácidos do que a  $\alpha$ -La e 2,5 vezes menos que a  $\beta$ -Lg. Esta estrutura mais simples, possivelmente possibilita mudanças estruturais mais intensas a ponto de permitir a formação de bicamadas.

### 3.3.Cálculo dos parâmetros termodinâmicos de adsorção

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de adsorção da  $\alpha$ -La, da  $\beta$ -Lg e do GMP em MWCNTs os parâmetros termodinâmicos de adsorção foram determinados utilizando duas abordagens: o modelo de Langmuir e o tratamento termodinâmico para diluições infinitas.

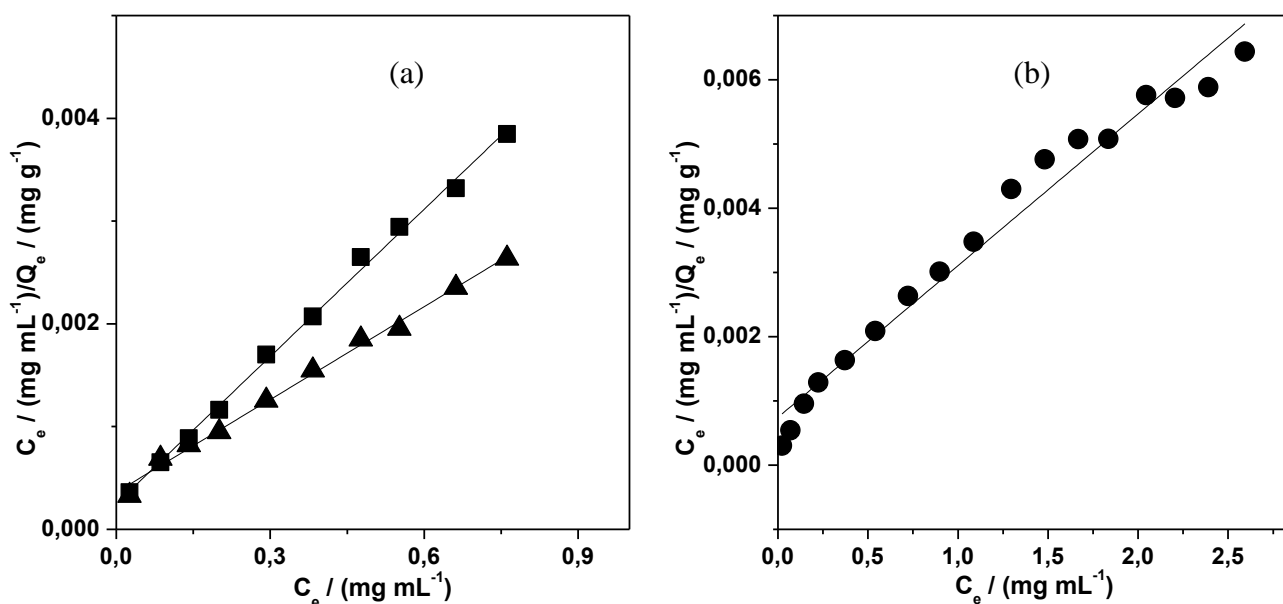
A equação 24 da isoterma de Langmuir pode ser rearranjada e escrita como:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{bq_s} + \frac{1}{q_s}C_e \quad (35)$$

Onde  $C_e$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) é a concentração de equilíbrio,  $Q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) a quantidade de adsorbato adsorvida por unidade de massa de adsorvente,  $q_s$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) é a capacidade de saturação monocamada do adsorvente e  $b$  é a constante de equilíbrio de adsorção.

Assim, com um gráfico de  $C_e / Q_e$  em função da  $C_e$  obtém-se uma linha reta com inclinação  $1/q_s$  e intercepto  $1/bq_s$  permitindo a obtenção de  $q_s$  e  $b$ . As Figuras 15a e 15b mostram o gráfico de  $C_e / Q_e$  em função de  $C_e$  em tampão pH 9 para as proteínas: (a)  $\alpha$ -

La e  $\beta$ -Lg e (b) GMP.



**Figura 15.** Gráfico semi-recíproco da adsorção de proteína em MWCNT : (a)  $\alpha$ -La (■) e  $\beta$ -Lg (▲) e (b) GMP (●).

As constantes de Langmuir  $b$  e  $q_s$  foram calculadas a partir das isotermas de adsorção de todos os biopolímeros estudados e seus valores foram utilizados na determinação dos parâmetros termodinâmicos de adsorção.

A linearidade observada na construção dos gráficos da relação  $C_e/Q_e$  versus  $C_e$ , sugere, a princípio que o comportamento da adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg (Figura 15a) em MWCNT pode ser modelado pela equação de Langmuir. Entretanto, para o GMP (figura 15b) observa-se um desvio da linearidade, indicando que o comportamento de adsorção do polipeptídeo GMP não pode ser representado pelo modelo de Langmuir, o que já era esperado, uma vez que o modelo de Langmuir é para isotermas monocamadas, ou seja, onde se observa apenas uma região de saturação, enquanto a isoterma do GMP mostra a possibilidade de formação de bicamada de adsorção.

Para estimar a variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta_{ads}G^0$ ) do processo de

adsorção, a partir da constante de equilíbrio (b) determinada pelo modelo de Langmuir, podemos usar a seguinte relação <sup>19</sup>:

$$\Delta_{ads}G^o = -RT \ln b \quad (36)$$

Os valores obtidos pelo modelo de Langmuir para as proteínas  $\beta$ -La e  $\alpha$ -La bem como os calculados pelo modelo termodinâmico são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Parâmetros Termodinâmicos de adsorção da  $\beta$ -La e  $\alpha$ -La em MWCNT em diferentes valores de pH calculado com diferentes modelos

Sistema	$\Delta_{ads}G^o / (\text{kJ mol}^{-1})$ ) Termod.	r	$\Delta_{ads}G^o / (\text{kJ mol}^{-1})$ Lang.	R
$\alpha$ - La pH 3	-18,40	0,99725	-20,05	0,98647
$\alpha$ - La pH 7	-18,55	0,98572	-20,96	0,99884
$\alpha$ - La pH 9	-18,92	0,95012	-22,46	0,90869
$\beta$ - Lg pH 3	-18,22	0,9185	-21,51	0,99041
$\beta$ - Lg pH 7	-18,06	0,93907	-23,20	0,99041
$\beta$ - Lg pH 9	-18,27	0,96892	-20,54	0,94992

Caso não queiramos impor aos dados experimentais de adsorção o modelo de Langmuir, um tratamento termodinâmico também permite a determinação de  $\Delta_{ads}G^o$ . Como é bem estabelecido, no equilíbrio termodinâmico o potencial químico de moléculas de proteína no bulk da solução ( $\mu_p^S$ ) é igual ao potencial químico de moléculas do biopolímero na interface MWCNT ( $\mu_p^I$ ).

$$\mu_p^I = \mu_p^S \quad (37)$$

Substituindo  $\mu_{\text{Proteína}}$  por  $\mu_p^o + RT \ln a$ :

$$\mu_p^{oS} + RT \ln a_p^S = \mu_p^{oI} + RT \ln a_p^I \quad (38)$$

Rearranjando:

$$\ln \frac{a_P^I}{a_P^S} = \frac{-\mu_P^{oI} - \mu_P^{oS}}{RT} \quad (39)$$

Lembrando que  $-\mu_P^{oI} - \mu_P^{oS} = -\Delta_{ads}G^o$ , temos:

$$\ln \frac{a_P^I}{a_P^S} = \frac{-\Delta_{ads}G^o}{RT} \quad (40)$$

$$-\Delta_{ads}G^o = RT \ln \frac{a_P^I}{a_P^S} \quad (41)$$

Considerando  $a_{Proteína}^I \cong C_p$  no estado termodinâmico de diluição infinita, a expressão para o cálculo de  $\Delta_{ads}G^o$ , é:

$$\Delta_{ads}G^o = -RT \ln \frac{\Gamma_{ads}}{C_e} \quad (42)$$

O parâmetro termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  é a variação da energia livre de Gibbs do sistema quando um mol de moléculas de proteína, em regime de diluição infinita na solução, é adsorvido na superfície do nanotubo em uma concentração muito baixa na interface do nanomaterial. O valor de  $\Delta_{ads}G^o$  é o resultado de quatro contribuições: (i) mudança de energia associada à dessolvatação da superfície do nanotubo e das moléculas de proteína ( $\Delta_{des}G_{MWCNT}^o + \Delta_{des}G_p^o$ ), (ii) a variação da energia livre de Gibbs da interação proteína-MWCNT ( $\Delta_{int}G_{p+MWCNT}^o$ ), (iii) a variação da energia livre de Gibbs devido à mudança conformacional da proteína ( $\Delta_{conf}G_p^o$ ), (iv) a variação da energia livre de Gibbs associada à troca de íons (i) entre a interface (S) proteína adsorvida/ solução ( $\Delta_{ads}G_{S-i}^o$ ).  $\Delta_{ads}G^o$  pode ser calculado pela soma de todas essas contribuições conforme equação 43.

$$\Delta_{ads}G^o = \Delta_{des}G_{MWCNT}^o + \Delta_{des}G_p^o + \Delta_{int}G_{p+MWCNT}^o + \Delta_{conf}G_p^o + \Delta_{ads}G_{S-i}^o \quad (43)$$

Os valores de  $\Delta_{ads}G^o$  foram determinados pelos dois modelos a partir dos dados obtidos experimentalmente pelas isotermas de adsorção da  $\alpha$ -La e da  $\beta$ -Lg em pH 3, 7 e 9 e os valores são listados na tabela 2. Os valores negativos de  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em MWCNT em diferentes valores de pH, calculados por ambos os modelos, indicam que a adsorção dessas proteínas na superfície dos nanotubos é espontânea.

Os valores de  $\Delta_{ads}G^o$  independem do pH para ambas as proteínas, indicando que em baixas concentrações de biopolímero as interações eletrostáticas não contribuem para o processo de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em MWCNTs. Para elucidarmos melhor o mecanismo de adsorção devemos lembrar que o parâmetro termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  é o resultado de contribuições entálpicas e entrópicas. Assim, podemos ter equações similares a relação 43 para  $\Delta_{ads}H$  e  $\Delta_{ads}S$ .

Os valores de  $\Delta_{ads}G^o$  encontrados na literatura para a adsorção da  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em outras superfícies são negativos demonstrando a grande afinidade destas proteínas por diferentes interfaces<sup>18,77</sup>. Para a adsorção da  $\alpha$ -La em superfícies de sílcio hidrofóbico a 27°C em pH 7 ou em aço inox 304 a 25°C em pH 6 ou em superfície de platina em pH 7 a 313°C, os valores de  $\Delta_{ads}G^o$  são de -39,00; -52,00 e -40,00 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente<sup>77</sup>. O valor mais negativo para o processo de adsorção em superfície de platina é atribuído à forte afinidade da proteína com a superfície deste metal que se encontra carregada positivamente, evidenciando, neste caso, a importância da contribuição das interações eletrostáticas para  $\Delta_{ads}G^o$ <sup>77</sup>. Além disso, estes resultados demonstraram, segundo os autores, que existe uma interação específica entre grupos carboxílicos nos resíduos de aminoácidos presentes na proteína com átomos de oxigênio presentes na superfície da platina<sup>77</sup>. Para adsorção de  $\beta$ -Lg em superfícies de resina hidrofóbica Streamline Phenyl, em pH 7, na presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> os valores de  $\Delta_{ads}G^o$  variam de -5 a -6 kJ mol<sup>-1</sup> na faixa de temperatura de 10 a 40°C, mostrando

que o processo de adsorção é um pouco mais favorável em maiores temperaturas<sup>19</sup>. Nossos resultados forneceram para a adsorção da  $\beta$ -Lg em superfícies dos MWCNTs um valor de  $\Delta_{ads}G^{\circ} = -18,06 \text{ kJ mol}^{-1}$ , ressaltando uma maior interação proteína-MWCNTs em relação à interação proteína-resina Streamline Phenyl. O valor de  $\Delta_{ads}G^{\circ}$  da  $\beta$ -Lg em aço inox 304 a 25°C em pH 7<sup>95</sup> é  $-45,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ , o que mostra uma maior afinidade da  $\beta$ -Lg com a superfície do aço inox quando comparado aos MWCNTs.

Valores de  $\Delta_{ads}G^{\circ}$  diferentes para  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg na superfície de aço inox evidenciam que o processo de adsorção depende da natureza da proteína. Além disso, os valores de  $\Delta_{ads}G^{\circ}$  diferentes para ambas as proteínas em diferentes superfícies indicam claramente que as interações intermoleculares entre, por exemplo, proteína-superfície, solvente-superfície ou solvente-solvente e forças intramoleculares entre os resíduos de aminoácidos no interior da macromolécula de proteína podem contribuir para os valores de  $\Delta_{ads}G^{\circ}$ <sup>19</sup>.

Considerando que o mecanismo de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg ocorre com o decréscimo da energia livre de Gibbs do sistema, podemos compreender porque essas proteínas preferem a interface dos nanotubos em relação a solução, avaliando os fatores que contribuem para  $\Delta_{ads}G^{\circ}$ , isto é a contribuição de  $\Delta_{ads}H$  e  $\Delta_{ads}S$ <sup>19</sup>.

Para determinarmos a contribuição entálpica, a variação da entalpia de adsorção ( $\Delta_{ads}H$ ) foi determinada usando a técnica de microcalorimetria de titulação isotérmica.

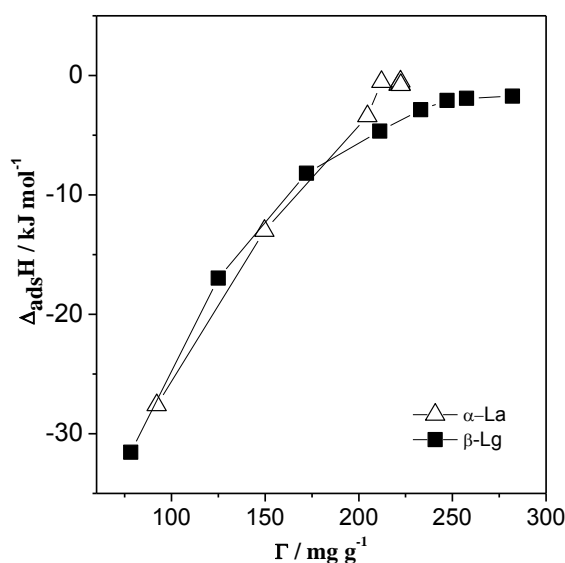
Os valores de  $\Delta_{ads}H$  representam a energia total entálpica absorvida ou liberada quando um mol de proteína em sua conformação nativa presente em solução é adsorvida na superfície do adsorvente. Norde e Lyklerma<sup>96</sup> mostraram que a magnitude de  $\Delta_{ads}H$  das proteínas reflete as contribuições de quatro subprocessos (equação 44) (i) mudanças no estado de hidratação da superfície adsorvente e das moléculas das proteínas ( $\Delta_{ads}H_{hid}$ ), (ii) a variação da energia da interação proteína-MWCNT ( $\Delta_{int}H_{p+MWCNT}^{\circ}$ ),

(iii) associação / dissociação de íons com grupos carregados na superfície da proteína ( $\Delta_{ads}H_i$ ), e (iv) rearranjo estrutural na molécula de proteína ( $\Delta_{ads}H_{rear.conf.}$ )

$$\Delta_{ads}H = \Delta_{ads}H_i + \Delta_{int}H_{p+MWCNT} + \Delta_{ads}H_{hid} + \Delta_{ads}H_{rear.conf.} \quad (44)$$

Todos os trabalhos encontrados na literatura para a adsorção da  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em diferentes superfícies mostram processos endotérmicos para a concentração destas proteínas nas diferentes interfaces estudadas. Para a adsorção da  $\alpha$ -La em superfícies de aço inox 304 a 25°C em pH 6 ou em superfície de platina em pH 7 a 40°C, os valores de  $\Delta_{ads}H^\circ$  são de 15,60<sup>79</sup> e 12,00<sup>81</sup> kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Para a  $\beta$ -Lg o valor de  $\Delta_{ads}H^\circ$  em aço inox 304 a 25°C em pH 7<sup>98</sup> é 3,40 kJ mol<sup>-1</sup>. Surpreendentemente, para a adsorção destas proteínas em MWCNTs os valores obtidos de  $\Delta_{ads}H$  em nossos trabalhos foram negativos.

A Figura 16 mostra os resultados microcalorimétricos de titulação da solução de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg (7,000 mg mL<sup>-1</sup>), em tampão pH 9, em dispersões de MWCNT a 25°C. A variação da entalpia molar de adsorção,  $\Delta_{ads}H$ , é plotada em função da quantidade de proteína adsorvida por grama de adsorvente.



**Figura 16.** Dados calorimétricos de  $\Delta_{ads}H$  em pH 9 a 25°C.

Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}H$  mostram que o processo de adsorção de ambas as proteínas a 25°C e em pH 9 é entálpicamente favorecido, *i.e.* ocorre com redução da entalpia do sistema. Com o aumento na quantidade de  $\alpha$ -La adsorvida os valores de  $\Delta_{\text{ads}}H$  se tornam menos exotérmicos, indo de -27,61 para -0,800 kJ mol<sup>-1</sup>. Comportamento similar é observado para  $\beta$ -Lg, para a qual  $-31,55 \leq \Delta_{\text{ads}}H \leq -1,570$  kJ mol<sup>-1</sup>. O modelo de Langmuir é baseado na consideração de que  $\Delta_{\text{ads}}H$  deveria ser constante em toda faixa dos valores de  $\Gamma$ . Entretanto, é interessante observar que para os processos de adsorção da  $\alpha$ -La e da  $\beta$ -Lg em MWCNTs,  $\Delta_{\text{ads}}H$  varia consideravelmente com o aumento da cobertura da interface dos MWCNTs pelos biopolímeros. A dependência de  $\Delta_{\text{ads}}H$  em relação a quantidade de proteína adsorvida expressa a interação intermolecular proteína-proteína que ocorre entre os biopolímeros adsorvidos na interface dos MWCNTs. Interessantemente, esta interação não depende da estrutura das duas biomoléculas, sugerindo, portanto, que ela ocorra via grupos funcionais presentes nas duas proteínas como, por exemplo, grupos sulfeto. Esta interação proteína-proteína na interface pode ser descrita da seguinte maneira: o processo de adsorção levaria a uma mudança conformacional da proteína, externando os grupos hidrofóbicos presentes no interior da biomacromolécula, promovendo assim uma forte interação inicial com a superfície dos nanotubos de carbono. Com o aumento da concentração de proteína na interface estes segmentos hidrofóbicos da proteína passariam a interagir não só com a interface, mas também entre diferentes moléculas de proteína. Essa interação hidrofóbica favoreceria a formação de outras interações intermoleculares tais como: pontes de dissulfeto intermolecular, ligações de hidrogênio e interações de Lifschitz-van der Waals.

Apesar do processo de adsorção ser exotérmico ainda assim existe a contribuição hidrofóbica para a interação proteína-nanotubo. Sabe-se que interações hidrofóbicas estão associadas a um aumento da entalpia do sistema acompanhada por um simultâneo

aumento de sua entropia. Assim, para compreendermos a contribuição entálpica exotérmica (Figura 18) para o processo de adsorção precisamos avaliar cada uma das contribuições para o valor do  $\Delta_{ads}H$  (equação 44). A primeira contribuição,  $\Delta_{ads}H_i$ , está associada à interação de íons presentes em solução com grupos carregados na superfície das moléculas das proteínas e do MWCNT durante o processo de adsorção. Para produzirmos o tampão pH 9 devemos adicionar ao sistema os íons  $CO_3^{2-}$  e  $Na^+$  que por sua vez interagem eletrostaticamente com grupos carregados na superfície da proteína adsorvida visando a redução das interações repulsivas entre segmentos carregados do biopolímero. Além disso, moléculas de  $H_2O$  da camada de solvatação desses íons são liberadas formando ligações de hidrogênio. A energia liberada das interações eletrostáticas e das ligações de hidrogênio é suficiente para compensar a energia requerida na dessolvatação dos íons e ainda contribuir significativamente para uma  $\Delta_{ads}H$  exotérmica. Cálculos teóricos<sup>19,77,88,96</sup>, indicam que estes subprocessos são exotérmicos e contribuem com valores altos de energia podendo chegar até  $-280 \text{ kJ mol}^{-1}$ . A segunda contribuição,  $\Delta_{int}H_{p+MWCNT}^o$ , refere-se à interação proteína-MWCNT. Essas interações ocorrem via contribuições hidrofóbicas, interações de dispersão (dipolo-dipolo, dipolo induzido-dipolo permanente, dipolo induzido-dipolo induzido, íon-íon, etc) ocorrendo com liberação de energia, contribuindo também para um  $\Delta_{ads}H$  exotérmico. A terceira contribuição,  $\Delta_{ads}H_{hid}$ , refere-se à dessolvatação das moléculas de proteína e da superfície de nanotubos, sendo esse processo endotérmico, pois para que ele ocorra é necessário romper as interações água-MWCNT e água-proteína, contribuindo para um  $\Delta_{ads}H > 0$ . Entretanto a contribuição endotérmica desse termo é menor na adsorção destas proteínas em MWCNT quando comparados a outras superfícies, isso porque a interação MWCNT-água é menos intensa que a interação água e outras superfícies contendo grupos hidrofílicos ou ainda grupos carregados. A quarta

contribuição,  $\Delta_{ads}H_{rear.conf.}$ , está associada à mudança conformacional das moléculas das proteínas com a adsorção em superfícies. A mudança conformacional é endotérmica, pois ocorre com a quebra de interações intramoleculares entre os resíduos de aminoácidos no interior da proteína, com consequente exposição de resíduos hidrofóbicos para a interface proteína-solução.  $\Delta_{ads}H_{rear.conf.}$  contribui para um  $\Delta_{ads}H$  endotérmico. Quando se compara a contribuição endotérmica de  $\Delta_{ads}H_{rear.conf.}$  para  $\Delta_{ads}H$ , observa-se que essa contribuição deve ser menor na presença dos MWCNTs do que em outros substratos, devido principalmente a maior afinidade entre os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e a superfície dos MWCNTs.

A entalpia padrão molar de adsorção ( $\Delta_{ads}H^0$ ) é obtida pela aproximação do regime de diluição infinita advinda da extrapolação de uma curva de  $\Delta_{ads}H$  em função de  $C_e$  fazendo  $C_e$  tendendo a 0. Os valores de  $\Delta_{ads}H^0$  foram determinados para  $\alpha$ -La,  $\beta$ -Lg em pH 3 e 9 e são listados na tabela 3.

**Tabela 3.** Parâmetros Termodinâmicos de adsorção de  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em MWCNT em pH 3 e 9 calculado com diferentes modelos.

Sistema	$\Delta_{ads}G^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	$\Delta_{ads}G^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	$\Delta_{ads}H^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	T $\Delta_{ads}S^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	T $\Delta_{ads}S^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.
$\alpha$ - La pH 3	-19,00	-22,63	-77,36	-58,36	-54,73
$\alpha$ - La pH 9	-18,92	-22,46	-30,68	-11,76	-8,22
$\beta$ - Lg pH 3	-18,45	-24,02	-97,85	-79,4	-73,83
$\beta$ - Lg pH 9	-18,27	-20,54	-43,04	-24,77	-22,5

Os valores de  $\Delta_{ads}H^0$  indicam que o processo de adsorção da  $\alpha$ -La e da  $\beta$ -Lg é exotérmico e entálpicamente favorecido. A partir dos dados de microcalorimetria não podemos determinar cada uma das contribuições individuais para o valor de  $\Delta_{ads}H^0$  expressos na equação 12. Entretanto, a diferença entre os valores deste parâmetro

termodinâmico obtidos nos dois pHs pode nos dar pistas sobre a contribuição principal para o  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ .

O valor de  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$  é fortemente dependente da natureza da proteína e do pH do meio, sendo que  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$  aumenta de 46,68 e de 54,81 kJ mol<sup>-1</sup> quando o pH do sistema aumenta de 3 para 9 para as proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg, respectivamente. A influência do pH pode ser entendida considerando que o meio tamponante no pH 3 é formado pelos íons Na<sup>+</sup> e C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup> (citrato) na concentração de 0,100 mol L<sup>-1</sup>, o que levaria muito provavelmente a adsorção dos ânions citrato na interface das proteínas adsorvidas no nanotubo. Como discutido anteriormente, o termo  $\Delta_{\text{ads}}H_i$  contribui exotermicamente para o valor de  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ . Contrariamente em pH 9, devido à proteína estar carregada negativamente haverá uma repulsão eletrostática entre os ânions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (presentes no tampão) e os segmentos carregados da proteína. Provavelmente, a adsorção do sódio nessas condições não é suficiente para liberar tanta energia quanto a observada em pH 3. Entretanto, não podemos descartar a influência do pH nas outras contribuições entálpicas (equação 44) que determinam o valor de  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$ .

Em pH 3,  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$  da proteína  $\alpha$ -La é 20,49 kJ mol<sup>-1</sup>, maior que para a  $\beta$ -Lg sugerindo uma maior adsorção dos ânions citrato na proteína  $\beta$ -Lg do que na  $\alpha$ -La. Provavelmente, este resultado é causado por um número maior de cargas positivas presentes na proteína  $\beta$ -Lg. Isso reforça a idéia anterior de que em pH 3 há uma maior exposição dos resíduos hidrofóbicos da  $\alpha$ -La.

Utilizando a clássica relação termodinâmica (equação 45) podemos obter teoricamente a variação de entropia padrão ( $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$ ) associada ao processo de adsorção .

$$\Delta_{\text{ads}}G^{\circ} = \Delta_{\text{ads}}H^{\circ} - T\Delta_{\text{ads}}S^{\circ} \quad (45)$$

Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$  para as proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg (tabela 03) indicam que o processo de adsorção de  $\alpha$ -La e/ou  $\beta$ -Lg em MWCNTs, pH 9 é entálpicamente dirigido.

A análise da tabela 03 mostra que o efeito do pH é bem pronunciado nos valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$ .

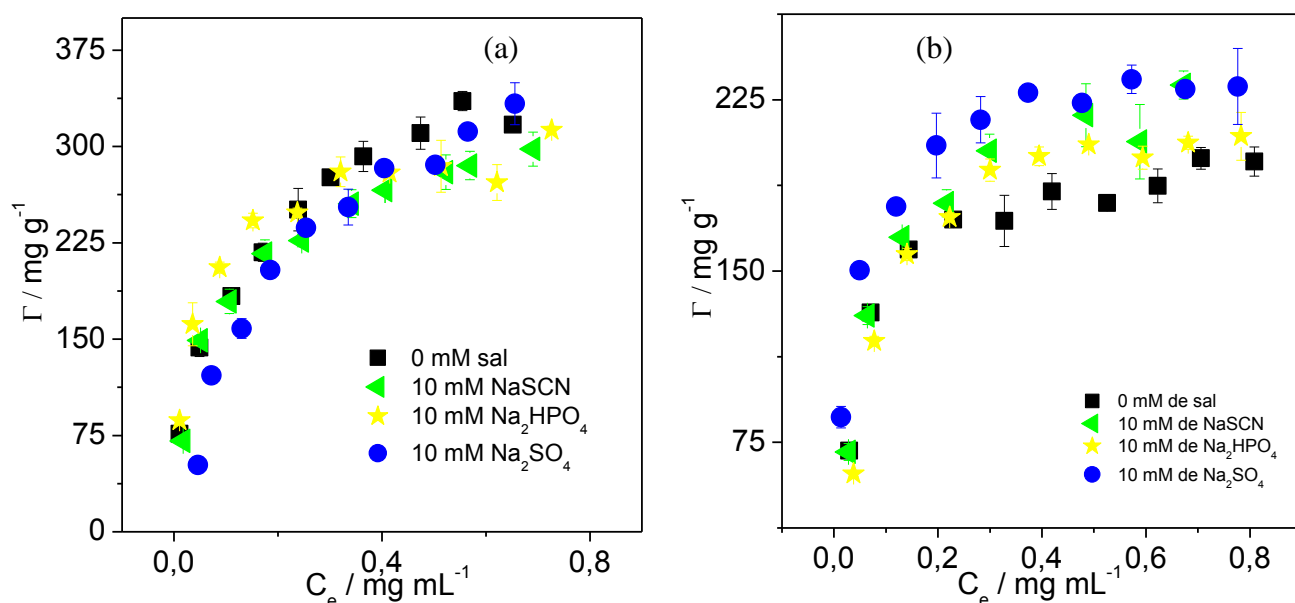
Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$  indicam que a entropia do sistema diminui com o processo de adsorção da  $\alpha$ -La e da  $\beta$ -Lg em MWCNTs. Como discutido anteriormente a adsorção de moléculas de proteínas na interface dos NCTs fazem com que moléculas globulares dos biopolímeros assumam uma conformação mais linear na superfície do MWCNT e contra-íons da dupla camada elétrica da proteína presentes na solução se ligam aos resíduos de aminoácidos por interações eletrostáticas diminuindo o grau de liberdade translacional desta espécie carregada, resultando, conseqüentemente, na diminuição da entropia do sistema. Por outro lado, o processo de adsorção dos íons leva a um parcial aumento da entropia configuracional do sistema, uma vez que moléculas de água são liberadas na dessolvatação dos íons e da proteína. Entretanto, a diminuição da entropia do sistema ocasionada pela adsorção dos íons na superfície proteína/solução compensa o aumento de entropia do sistema devido à liberação de moléculas de água de solvatação dos íons, de forma que a variação da entropia resultante é negativa.

#### **3.4. Efeito de eletrólitos da série de Hofmeister sobre a adsorção de proteínas em CNTs**

Para avaliar o papel das interações hidrofóbicas, da estrutura terciária da água e da interação íon-proteína no processo de adsorção da  $\beta$ -Lg, da  $\alpha$ -La e do GMP em MWCNT, levantou-se as isotermas de adsorção das proteínas em pH 3 e 9 na presença de sais caotrópicos (NaSCN, BaCl<sub>2</sub>) e cosmotrópicos (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl e (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NCl) da série de Hofmeister em diferentes concentrações do eletrólito. Como o GMP não é solúvel em pH 3, avaliou se o efeito de sais apenas em pH 9.

### 3.4.1. Efeito de Eletrólitos na adsorção de $\alpha$ -La

A Figura 17 mostra o efeito do sal rompedor da estrutura terciária da água, NaSCN e eletrólitos indutores de uma maior estruturação tridimensional das moléculas de água ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) na adsorção da  $\alpha$ -La em MWCNT em pH 3 (Figura 17a) e em pH 9 (Figura 17b).

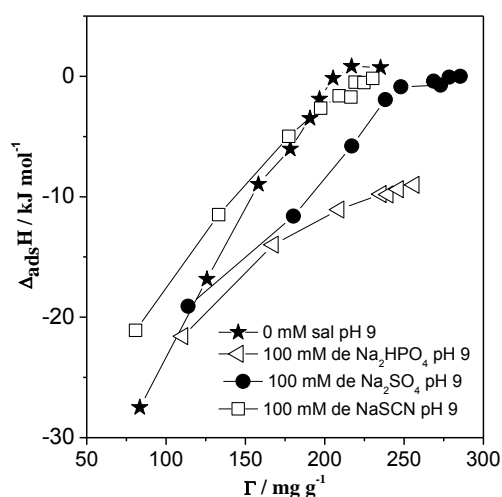


**Figura 17.** Isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de 10 mM de eletrólitos da série de Hofmeister em pH: 3 (a) e 9 (b).

Os valores de  $\Gamma$  da  $\alpha$ -La (figura 17a) mostram que, em pH 3, a presença de 10 mM de eletrólitos afeta pouco o comportamento de adsorção desta proteína. Estes resultados evidenciam que a interação entre MWCNT e  $\alpha$ -La, em pH 3, não é principalmente de natureza eletrostática. Entretanto, em pH 9 (Figura 17b) observa-se um aumento nos valores de  $\Gamma$  de  $\alpha$ -La devido a presença dos eletrólitos, onde tem-se que para a  $C_e$  da  $\alpha$ -La  $\approx 0,7000 \text{ mg mL}^{-1}$ , na ausência do eletrólito temos:  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Tampão}} = 199,0 \text{ mg g}^{-1}$  indo para  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NaSCN}} = 234,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Na}_2\text{SO}_4} = 229,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = 206,0 \text{ mg g}^{-1}$ .

Os eletrólitos sulfato de sódio e hidrogenofosfato de sódio são eletrólitos cosmotrópicos na série de Hofmeister, aumentando assim, a estrutura terciária da água o que levaria a diminuição na solubilidade da  $\alpha$ -La, resultando pelo menos, em princípio, no favorecimento da adsorção desta biomolécula em MWCNT. Nossos resultados colaboram com esta hipótese. Mas, surpreendentemente, segundo a série de Hofmeister o sal caotrópico tiocianato de sódio diminui as interações entre as moléculas de água aumentando a solubilidade da  $\alpha$ -La, o que segundo a série deveria aumentar a solubilidade da  $\alpha$ -La desfavorecendo a adsorção desta biomolécula em MWCNT. Entretanto, nossos resultados experimentais de  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NaSCN}}$  mostram que a presença do sal NaSCN aumenta o valor de  $\Gamma$  de  $\alpha$ -La em MWCNT. Esses resultados elucidam que o processo de adsorção da  $\alpha$ -La em pH 9 não segue necessariamente a série de Hofmeister<sup>97</sup>.

Para melhor entendermos o efeito desses eletrólitos na adsorção da  $\alpha$ -La foi determinado o efeito destes sais sobre os parâmetros termodinâmicos de adsorção. A Figura 18 mostra  $\Delta_{\text{ads}}H$  em função dos diferentes valores de  $\Gamma$  na presença de 100 mM dos distintos eletrólitos da série de Hofmeister para a proteína  $\alpha$ -La em pH 9.



**Figura 18.** Dados calorimétricos de  $\Delta_{\text{ads}}H$  em pH 9 a 298 K na presença de 100 mM de diferentes eletrólitos para a  $\alpha$ -La.

As curvas de  $\Delta_{ads}H$  em função de  $\Gamma$  apresentam o mesmo perfil na presença e ausência de eletrólitos. Os valores de  $\Delta_{ads}H$  são inicialmente exotérmicos e vão ficando cada vez menos exotérmicos até ficarem aproximadamente igual a zero. Esses resultados mostram que os processos moleculares de adsorção na presença dos eletrólitos são similares aqueles na ausência destes sais da série de Hofmeister. Com a presença dos eletrólitos a dependência dos valores  $\Delta_{ads}H$  em função de  $\Gamma$  não muda muito evidenciando que os eletrólitos não influenciam as interações intermoleculares  $\alpha$ -La- $\alpha$ -La das proteínas adsorvidas na interface do MWCNTs.

Como descrito anteriormente, a entalpia molar padrão de adsorção ( $\Delta_{ads}H^0$ ) é obtida pela aproximação do regime de diluição infinita. Os valores de  $\Delta_{ads}H^0$  foram determinados para alguns sistemas e são listados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros Termodinâmicos de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de diferentes eletrólitos calculado com diferentes modelos.

Sistema	$\Delta_{ads}G^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	$\Delta_{ads}G^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	$\Delta_{ads}H^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	T $\Delta_{ads}S^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	T $\Delta_{ads}S^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.
$\alpha$ - La pH 3	-19,00	-22,63	-77,36	-58,36	-54,73
$\alpha$ - La pH 9	-18,92	-22,46	-30,68	-11,76	-8,22
$\alpha$ - La pH 9 100 mM NaSCN	-18,48	-21,37	-25,65	-7,17	-4,28
$\alpha$ - La pH 9 100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-19,20	-25,85	-14,74	4,46	11,11

Os valores de  $\Delta_{ads}H^0$  indicam que o processo de adsorção de  $\alpha$ -La é entálpicamente favorecido mesmo na presença dos eletrólitos da série de Hofmeister. Estes sais fazem com que a contribuição entálpica diminua provavelmente devido a uma adsorção competitiva entre os íons do sal da série de Hofmeister e os íons formadores do tampão.

Utilizando a clássica relação termodinâmica (equação 45) podemos obter teoricamente a variação de entropia padrão ( $\Delta_{\text{ads}}S^\circ$ ) associada ao processo de adsorção. Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^\circ$  para a  $\alpha$ -La (tabela 4) indicam que o processo de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNTs, pH 9, é entálpicamente dirigido, tendo uma pequena contribuição entrópica para o sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

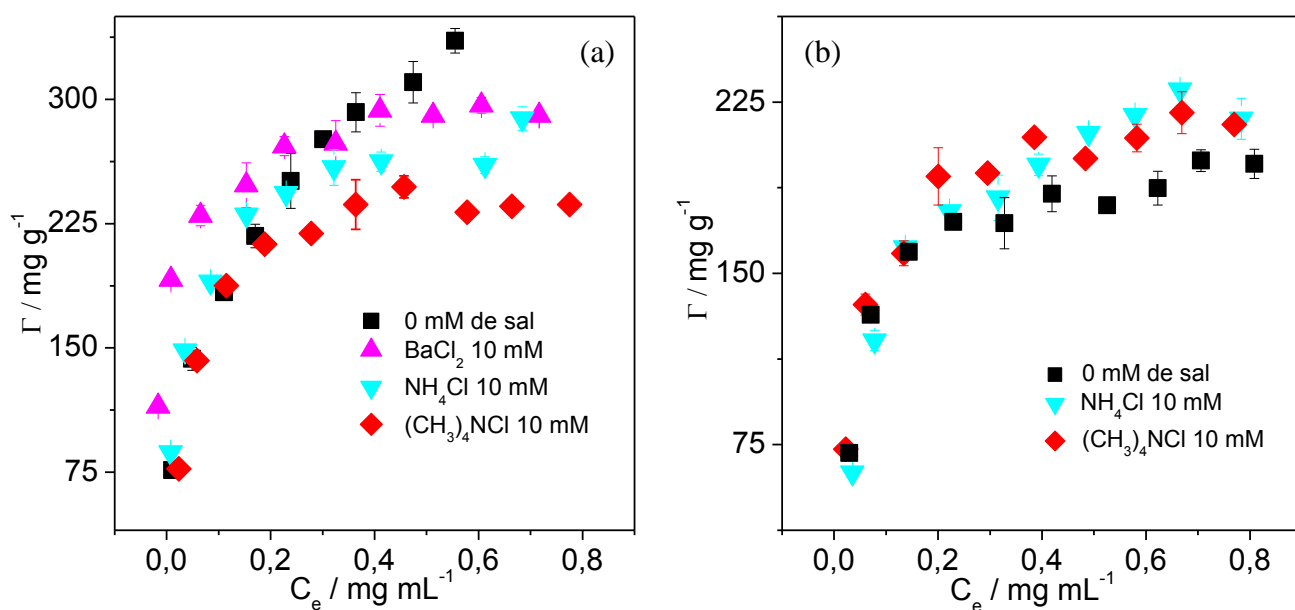
A análise da tabela 4 mostra que o efeito dos eletrólitos e do pH é pouco pronunciado nos valores de  $\Delta_{\text{ads}}G^\circ$ , mas intenso nos valores de  $\Delta_{\text{ads}}H^\circ$  e  $\Delta_{\text{ads}}S^\circ$ .

Valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^\circ$  indicam que a entropia do sistema diminui menos no processo de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNTs na presença dos eletrólitos da série de Hofmeister, colaborando com a hipótese de uma menor adsorção dos íons formadores do tampão devido a uma adsorção competitiva dos íons da série de Hofmeister.

Avaliou-se também o efeito de cátions da série de Hofmeister sobre a adsorção de  $\alpha$ -La. A Figura 19 mostra o comportamento de adsorção da  $\alpha$ -La em interfaces de MWCNT em função da concentração de equilíbrio ( $C_e$ ) de  $\alpha$ -La na presença de cátions caotrópicos ( $\text{BaCl}_2$ ) e cosmotrópicos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ ) da série de Hofmeister em pH 3 (Figura 19a) e 9 (Figura 19b).

Não foi avaliado o efeito do cátion  $\text{Ba}^{2+}$  em pH 9, uma vez que na presença de íons carbonato do tampão ocorre a precipitação do  $\text{BaCO}_3$ .

Observa-se um maior efeito dos cátions na adsorção da  $\alpha$ -La em pH 3 quando comparados ao efeito dos ânions. Em baixas concentrações da  $\alpha$ -La os valores de  $\Gamma$  praticamente não variam com a presença de 10 mM dos cátions. Entretanto, para maiores concentrações de  $\alpha$ -La observa-se uma redução nos valores de  $\Gamma$  da  $\alpha$ -La, devido a presença de 10 mM dos eletrólitos, para a  $C_e$  da  $\alpha$ -La  $\approx 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ , na presença apenas de tampão pH 3, temos:  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Tampão}} = 336,0 \text{ mg g}^{-1}$  indo para  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{BaCl}_2} = 296,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NH}_4\text{Cl}} = 260,0 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{(\text{CH}_3)_4\text{NCl}} = 231,0 \text{ mg g}^{-1}$ .



**Figura 19.** Isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de cátions da série de Hofmeister em pH: 3 (a) e 9 (b).

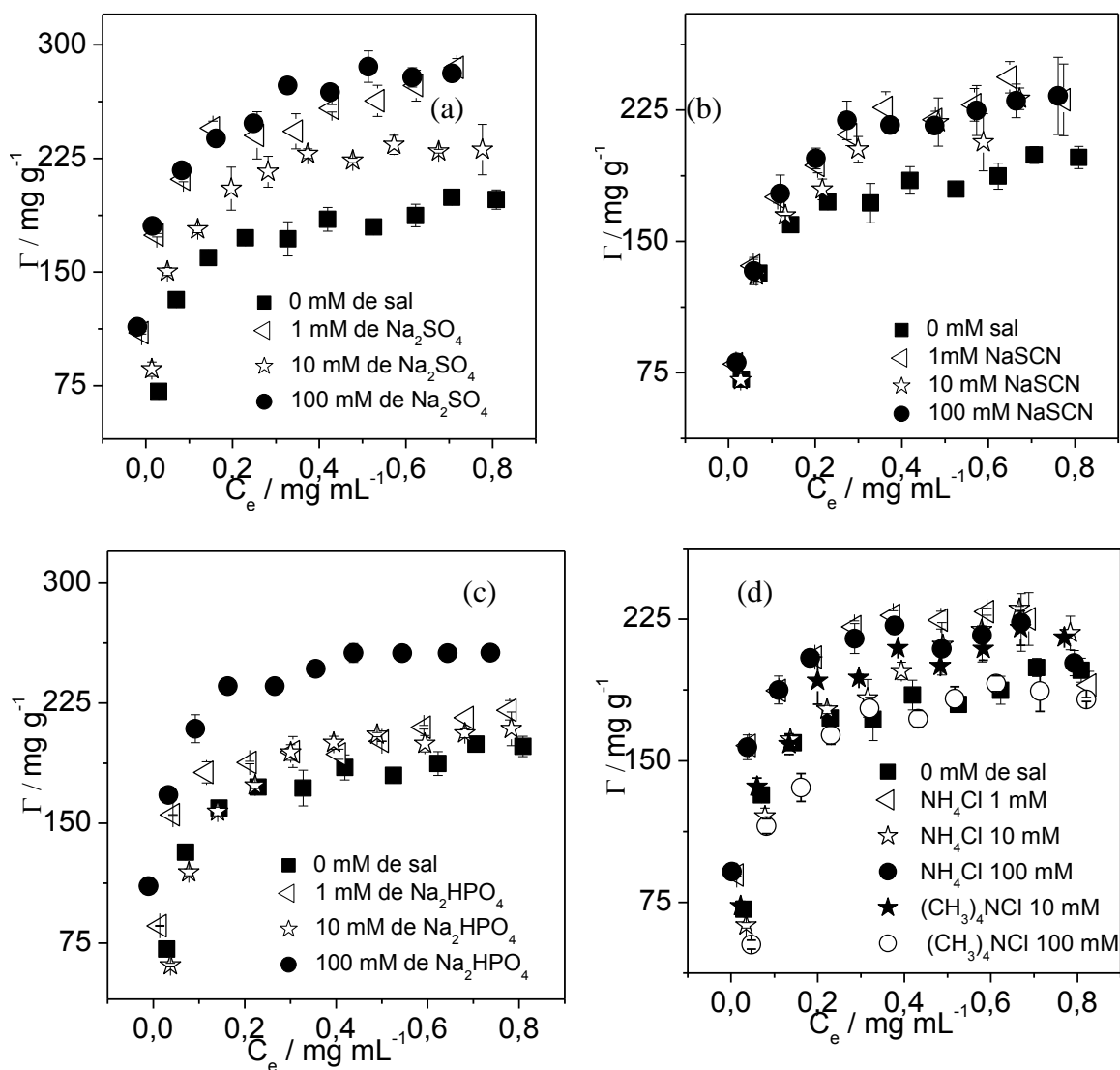
Em pH 9 (figura 19b) observa-se que 10 mM dos cátions  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  aumentam os valores de  $\Gamma$  da  $\alpha$ -La. Para  $C_e$  de  $\alpha$ -La  $\approx 0,77 \text{ mg mL}^{-1}$ , na presença apenas de tampão pH 9, temos:  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{Tampão}} = 197,9 \text{ mg g}^{-1}$  indo para  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{\text{NH}_4\text{Cl}} = 217,7 \text{ mg g}^{-1}$  e  $\Gamma_{\alpha\text{-La}}^{(\text{CH}_3)_4\text{NCl}} = 215,3 \text{ mg g}^{-1}$ . Uma possível explicação para este efeito do cátion é que em pH 9  $\alpha$ -La está carregada negativamente, os cátions interagem com os resíduos de aminoácidos carregados negativamente, minimizando a repulsão entre as proteínas na superfície dos MWCNT e assim aumentando os valores de  $\Gamma$ .

Estes resultados mostram que em pH 3 a presença dos eletrólitos da série de Hofmeister reduzem a capacidade adsortiva dos MWCNTs provavelmente também por um mecanismo competitivo entre os ânions citrato presentes no tampão e os ânions cloreto advindos dos eletrólitos da série de Hofmeister. Segundo esta hipótese os ânions cloreto adsorveriam melhor na interface proteína adsorvida/ solução resultando numa blindagem eletrostática menos eficiente que causaria uma menor cobertura da superfície dos nanotubos de carbono. Já em pH 9 o aumento na capacidade adsortiva do MWCNT

pode ser entendida devido também a uma adsorção competitiva entre os cátions do tampão e os cátions dos eletrólitos da série de Hofmeister. Neste modelo os cátions  $\text{NH}_4^+$  e  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$  adsorveriam mais do que o cátion  $\text{Na}^+$  blindando mais as cargas na superfície proteína adsorvida/solução levando a uma menor repulsão eletrostática proteína-proteína, o que contribuiria para uma maior adsorção.

### 3.4.1.1. Efeito da concentração de eletrólitos sobre a adsorção da $\alpha$ -La

A Figura 20 mostra o efeito da concentração de diferentes eletrólitos sobre as isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em tampão pH 9.



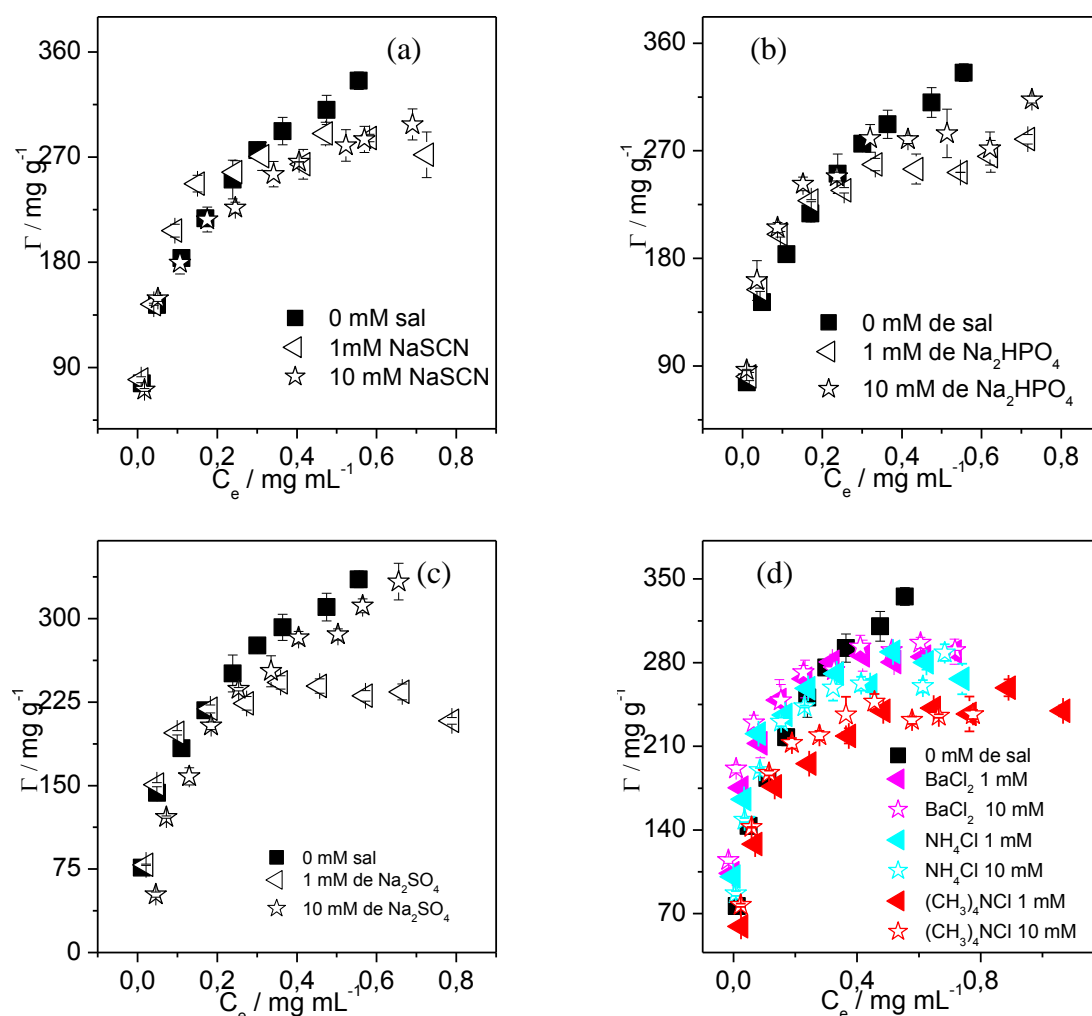
**Figura 20.** Isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações e em pH 9.

As isotermas de adsorção mostram que a presença dos eletrólitos, independente da concentração, aumenta a quantidade de  $\alpha$ -La adsorvida na interface dos nanotubos de carbono e, para todos os eletrólitos com exceção do NaSCN, observa-se uma influência da concentração dos eletrólitos no comportamento adsorptivo desta proteína. Na concentração de 1 mM dos eletrólitos da série de Hofmeister os valores de  $\Gamma$  de  $\alpha$ -La aumentam quando comparados no sistema tampão sem a presença do eletrólito. Entretanto, os valores de  $\Gamma$  de  $\alpha$ -La diminuem quando a concentração do eletrólito vai de 1mM para 10 mM, aumentando novamente quando a concentração do sal aumenta de 10 mM para 100 mM.

O aumento na concentração de eletrólitos da série de Hofmeister influencia os valores de  $\Gamma$  por duas contribuições: a primeira contribuição está associada à adsorção competitiva entre os íons dos sais da série de Hofmeister com os íons dos sais formadores do tampão. Neste processo competitivo, os íons interagem via forças eletrostáticas com os resíduos de aminoácidos carregados presentes na interface proteína adsorvida/solução de forma a minimizar a repulsão elétrica entre os segmentos das proteínas adsorvidas, aumentando, assim, a quantidade das mesmas adsorvidas na interface. A segunda contribuição está associada ao efeito de blindagem que os íons dos sais da série de Hofmeister têm sobre a dupla camada elétrica presente na interface proteína adsorvida/solução. Esta blindagem diminui a contribuição do potencial eletroquímico dos íons que sofrem a adsorção na interface proteína adsorvida/solução reduzindo, portanto, o processo adsorptivo desses íons, o que reduz a quantidade de proteína adsorvida. É reconhecido que este aumento na concentração do eletrólito de Hofmeister levaria o deslocamento do equilíbrio adsorptivo na direção de uma maior adsorção. Entretanto, considerando o efeito da blindagem maior que o deslocamento adsorptivo podemos considerar que o efeito resultante do aumento da concentração de 1

mM para 10 mM sobre as interações proteína-proteína na interface é aumentar a repulsão eletrostática, devido a menor adsorção dos íons do sal da série de Hofmeister. Porém, com o aumento da concentração do eletrólito de 10 mM para 100 mM, o efeito do deslocamento do equilíbrio adsorptivo prepondera sobre a blindagem eletrostática causando assim um novo aumento na adsorção dos íons do sal da série de Hofmeister reduzindo consequentemente a repulsão eletrostática entre os segmentos das moléculas de proteína adsorvidas e aumentando assim a capacidade adsorptiva da interface dos MWCNTs.

A Figura 21 mostra o efeito da concentração de diferentes eletrólitos sobre as isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em tampão pH 3.

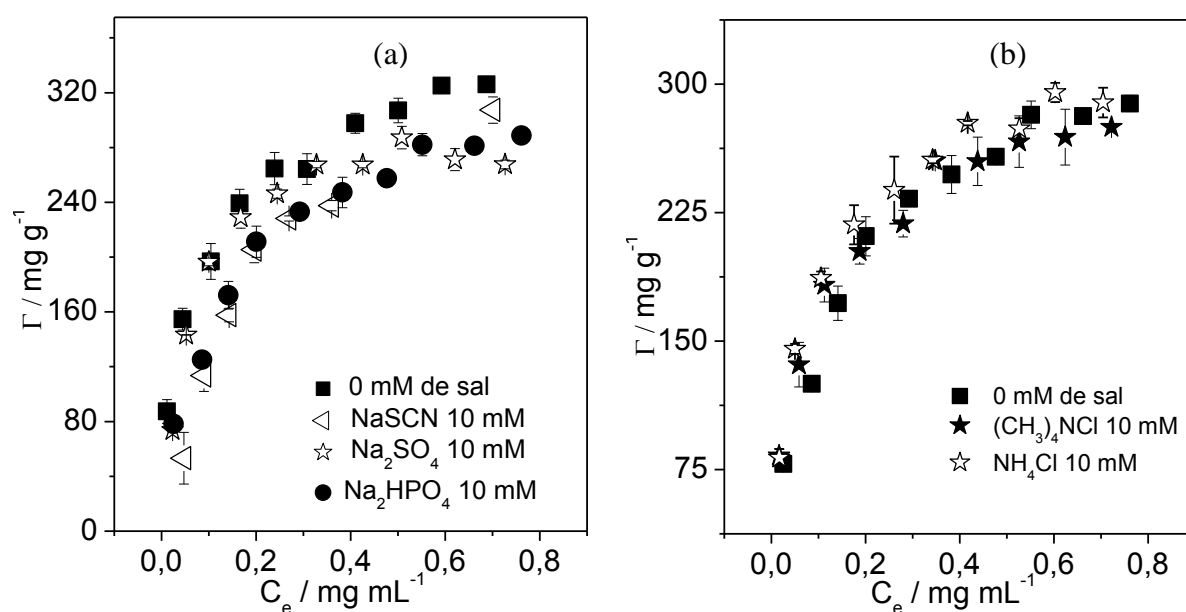


**Figura 21.** Isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 3

No pH 3 praticamente não existe um efeito da concentração do eletrólito sobre o processo de adsorção da  $\alpha$ -La na interface dos MWCNTs, com exceção do sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  no qual na concentração de 1 mM ocorre uma redução na capacidade adsortiva para concentrações altas de proteína. A ausência do efeito pode ser compreendida levando em consideração que a adsorção dos íons dos sais da série de Hofmeister independem da concentração dos mesmos no pH 3, *i.e.*, neste pH o início do processo de adsorção competitiva destes íons ocorre em concentrações acima de 10 mM com exceção naturalmente do  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

### 3.4.2. Efeito da natureza dos eletrólitos na adsorção de $\beta$ -Lg

A figura 22 mostra os valores de  $\Gamma$  em mg de  $\beta$ -Lg por grama de MWCNT em função da concentração de equilíbrio da proteína em pH 9 e na presença de ânions e cátions da série de Hofmeister.

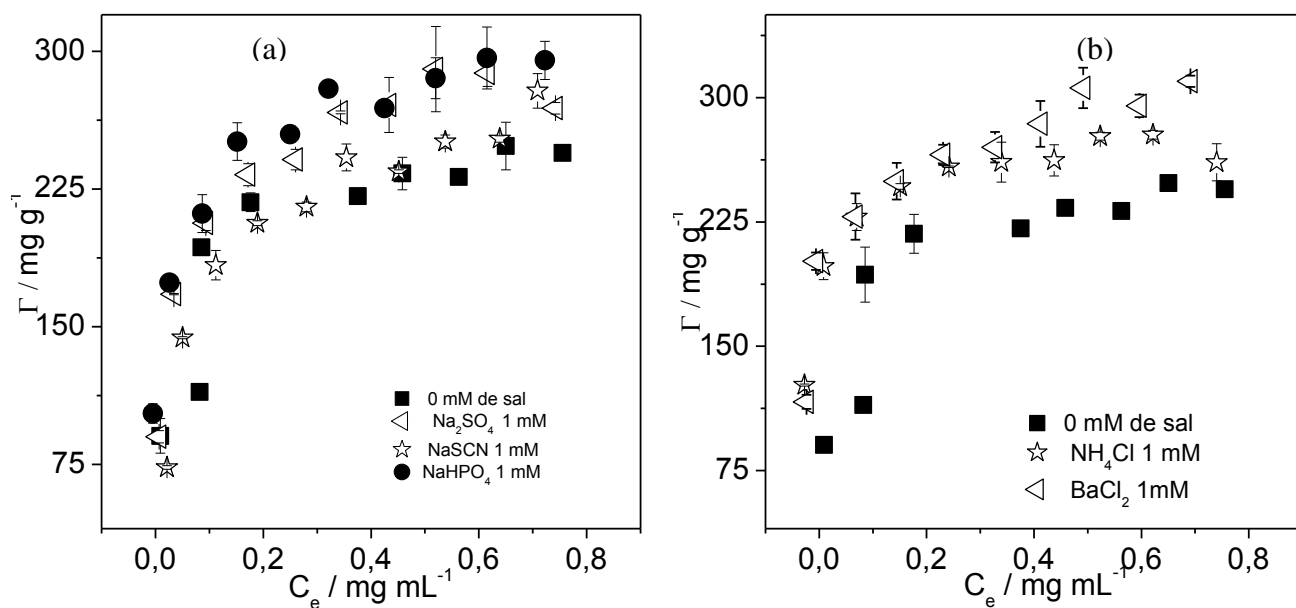


**Figura 22.** Isotermas de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNT em pH 9 na presença de (a) ânions da série de Hofmeister (b) cátions da série de Hofmeister

A figura 22 mostra que o perfil das isotermas de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em tampão pH 9 é o mesmo que na ausência desses eletrólitos. Os valores de  $\Gamma$  da  $\beta$ -Lg (figura 24b) mostram que, em pH 9, a presença de 10 mM dos eletrólitos  $\text{NH}_4^+$  e  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$  afeta pouco o comportamento de adsorção desta proteína. Estes resultados evidenciam que a interação entre MWCNT e  $\beta$ -Lg, em pH 9, não é, principalmente, de natureza eletrostática. Entretanto, em pH 9 (Figura 24a) observa-se que a presença de 10 mM de sais cosmotrópicos  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e a do sal caotrópico  $\text{NaSCN}$  diminui os valores de  $\Gamma$  (figura 24a).

Segundo a série de Hofmeister o sal caotrópico tiocianato de sódio diminui as interações entre as moléculas de água aumentando a solubilidade da  $\beta$ -Lg, desfavorecendo assim, a adsorção desta biomolécula em MWCNT. Nossos resultados colaboram com esta hipótese. Mas, surpreendentemente, segundo a série de Hofmeister, os eletrólitos sulfato de sódio e hidrogenofosfato de sódio são eletrólitos cosmotrópicos, o que aumentaria a estrutura terciária da água e diminuiria a solubilidade da  $\beta$ -Lg, resultando pelo menos, em princípio, no favorecimento da adsorção desta biomolécula. Entretanto, nossos resultados experimentais de  $\Gamma_{\beta\text{-Lg}}$  mostram que a presença dos sais  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  reduzem o valor de  $\Gamma$  de  $\beta$ -Lg em MWCNT. Esses resultados elucidam que o processo de adsorção da  $\beta$ -Lg em pH 9 não segue necessariamente a série de Hofmeister.

A figura 23 mostra a  $\Gamma$  em mg de  $\beta$ -Lg por grama de MWCNT em função da concentração de equilíbrio em pH 3 na presença de ânions e cátions da série de Hofmeister.



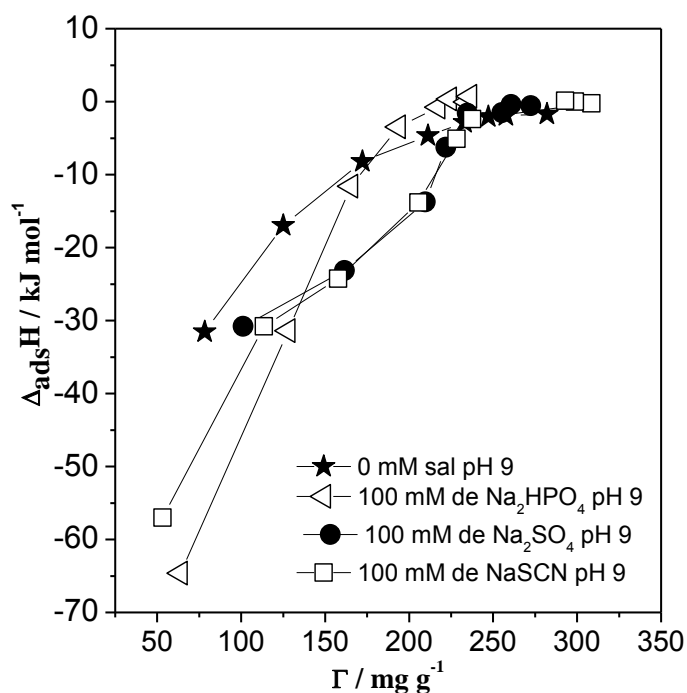
**Figura 23.** Isotermas de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNT em pH 3 na presença de (a) ânions da série de Hofmeister (b) cátions da série de Hofmeister

A figura 23 a e b mostra que o perfil das isotermas de adsorção da  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em tampão pH 3 é o mesmo que na ausência desses eletrólitos. A presença de ânions cosmotrópicos  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{HPO}_4^-$  aumenta os valores de  $\Gamma$  e a do íon caotrópico  $\text{SCN}^-$  praticamente não altera os valores de  $\Gamma$  de  $\beta$ -Lg (Figura 25 a).

Estes resultados mostram que em pH 3 a presença dos eletrólitos  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  da série de Hofmeister aumentam a capacidade adsortiva dos MWCNTs provavelmente também por um mecanismo competitivo entre os ânions citrato presentes no tampão e os ânions  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{HPO}_4^-$  advindos dos eletrólitos da série de Hofmeister. Segundo esta hipótese os ânions  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{HPO}_4^-$  adsorveriam melhor na interface proteína adsorvida/ solução blindando mais as cargas e levando a uma menor repulsão eletrostática proteína-proteína, o que contribuiria para uma maior adsorção, resultando em um aumento da capacidade adsortiva. Já o aumento da capacidade adsortiva do MWCNT na presença dos eletrólitos  $\text{BaCl}_2$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em pH 3 pode ser entendida

provavelmente também por um mecanismo competitivo entre os ânions citrato presentes no tampão e os ânions cloreto advindos dos eletrólitos da série de Hofmeister. Segundo esta hipótese os ânions cloreto adsorveriam melhor na interface proteína adsorvida/solução resultando numa blindagem eletrostática mais eficiente que minimizaria a repulsão proteína-proteína causando uma maior cobertura da superfície dos nanotubos de carbono.

Para melhor entendermos o efeito desses eletrólitos na adsorção da  $\beta$ -Lg foi determinado o efeito dos sais NaSCN,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  na concentração de 100 mM sobre os parâmetros termodinâmicos de adsorção em tampão pH 9. A figura 24 mostra  $\Delta_{\text{ads}}H$  em função dos diferentes valores de  $\Gamma$  na presença de 100 mM dos distintos eletrólitos da série de Hofmeister para a proteína  $\beta$ -Lg em pH 9.



**Figura 24.** Dados calorimétricos de  $\Delta_{\text{ads}}H$  em pH 9 a 298 K na presença de 100 mM de diferentes eletrólitos para a  $\beta$ -Lg.

As curvas de  $\Delta_{\text{ads}}H$  em função de  $\Gamma$  apresentam o mesmo perfil na presença e ausência de eletrólitos. Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}H$  são inicialmente exotérmicos e vão ficando

cada vez mais endotérmicos até ficarem aproximadamente iguais a zero. Esses resultados mostram que os processos moleculares de adsorção de  $\beta$ -Lg na presença dos eletrólitos são similares aqueles na ausência destes sais. Com a presença dos eletrólitos a dependência dos valores  $\Delta_{ads}H$  em função de  $\Gamma$  não muda muito evidenciando que os eletrólitos não influenciam predominantemente as interações entálpicas entre as moléculas do biopolímero adsorvidas na interface dos MWCNTs.

A entalpia molar padrão de adsorção ( $\Delta_{ads}H^0$ ) para adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNTs foi obtida pela aproximação do regime de diluição infinita e os valores de  $\Delta_{ads}H^0$  são listados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros termodinâmicos de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de diferentes eletrólitos calculado com diferentes modelos.

Sistema	$\Delta_{ads}G^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	$\Delta_{ads}G^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	$\Delta_{ads}H^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	T $\Delta_{ads}S^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	T $\Delta_{ads}S^0 /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.
$\beta$ - Lg pH 3	-18,45	-24,02	-97,85	-79,4	-73,83
$\beta$ - Lg pH 9	-18,27	-20,54	-43,04	-24,77	-22,5
$\beta$ - Lg pH 9 100 mM NaSCN	-17,96	-17,75	-88,19	-70,23	-70,44
$\beta$ - Lg pH 9 100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-17,92	-23,29	-30,10	-12,18	-6,81

Os valores de  $\Delta_{ads}H^0$  indicam que o processo de adsorção de  $\beta$ -Lg é entálpicamente favorecido mesmo na presença dos eletrólitos da série de Hofmeister. O sal caótopico NaSCN faz com que a contribuição entálpica aumente enquanto o sal cosmotrópico Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tem efeito contrário. Ambos os efeitos são provavelmente devido a uma adsorção competitiva entre os íons do sal da série de Hofmeister e os íons formadores do tampão, no caso da NaSCN a adsorção preferencial do ânion SCN- causaria uma melhor blindagem eletrostática do que os ânions citrato do tampão reduzindo assim as interações repulsivas proteína-proteína favorecendo uma maior

adsorção e, conseqüentemente, uma maior liberação de energia. Para o caso do sulfato, apesar de uma maior adsorção em relação ao ânion citrato, o mesmo não consegue uma blindagem eletrostática tão eficiente quanto o ânion citrato, levando a um aumento nas forças repulsivas da interação proteína-proteína adsorvidas na interface produzindo, assim,  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$  menos negativos.

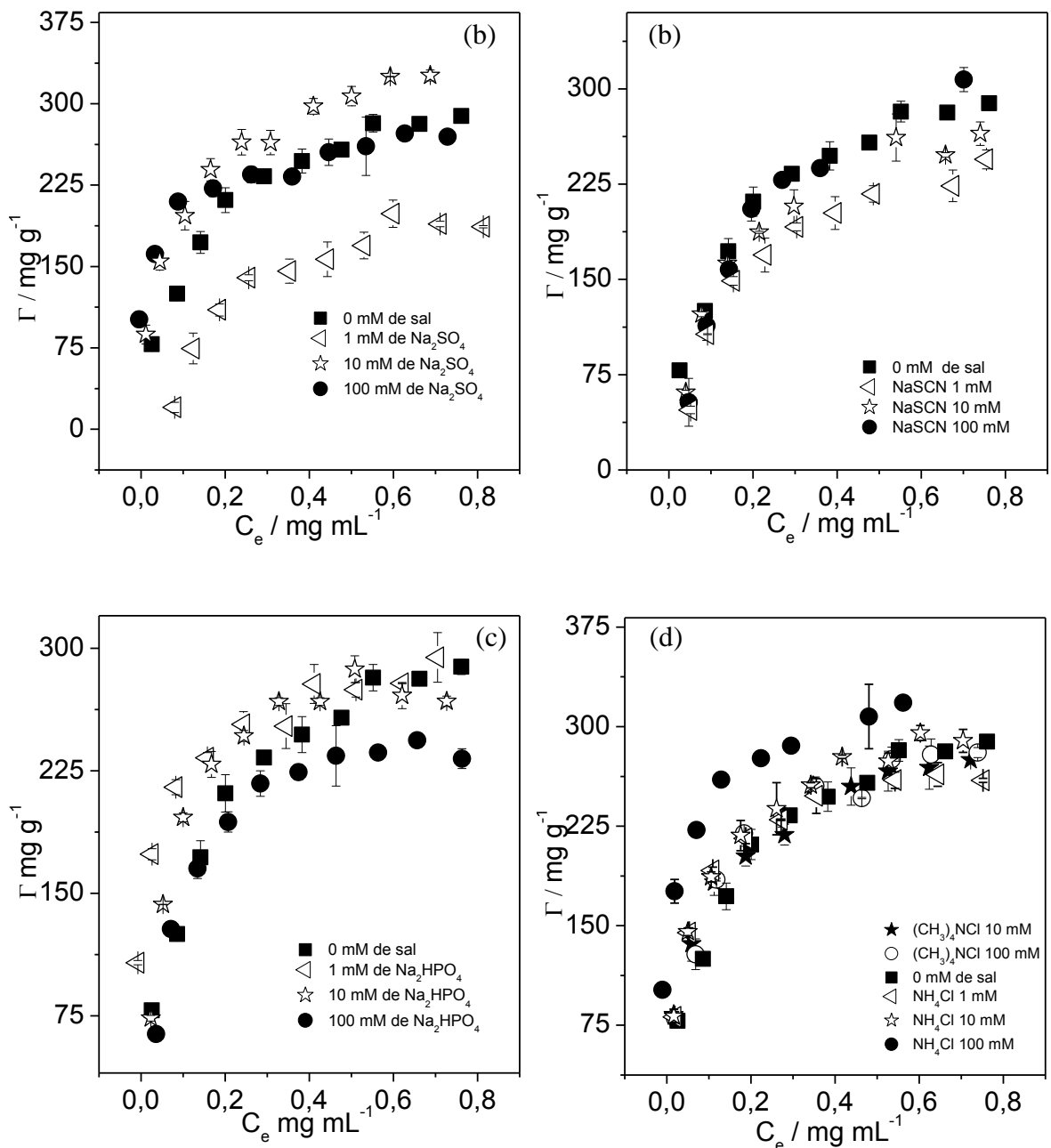
Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$  para a  $\beta$ -Lg foram determinados a partir da equação 45 e listados na tabela 5. Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$  indicam que o processo de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNTs, pH 9 é entálpicamente dirigido, e ocorrem com uma redução na entropia do sistema.

A análise da tabela 5 mostra que o efeito dos eletrólitos e do pH é pouco pronunciado nos valores de  $\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ , mas intenso nos valores de  $\Delta_{\text{ads}}H^{\circ}$  e  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$ .

Os valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$  indicam que a entropia do sistema diminui menos no processo de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNTs na presença do eletrólito  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  do que na sua ausência. Isto colabora com a hipótese de uma menor adsorção dos íons formadores do tampão, devido a uma adsorção competitiva entre estes e os íons da série de Hofmeister. Por outro lado, na presença do eletrólito NaSCN os valores de  $\Delta_{\text{ads}}S^{\circ}$  reduzem mais do que na ausência e na presença de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

#### **3.4.1.2. Efeito da concentração de eletrólitos sobre a adsorção da $\beta$ -Lg**

A Figura 25 mostra o efeito da concentração de diferentes eletrólitos sobre as isotermas de adsorção de  $\beta$ -Lg em tampão pH 9.



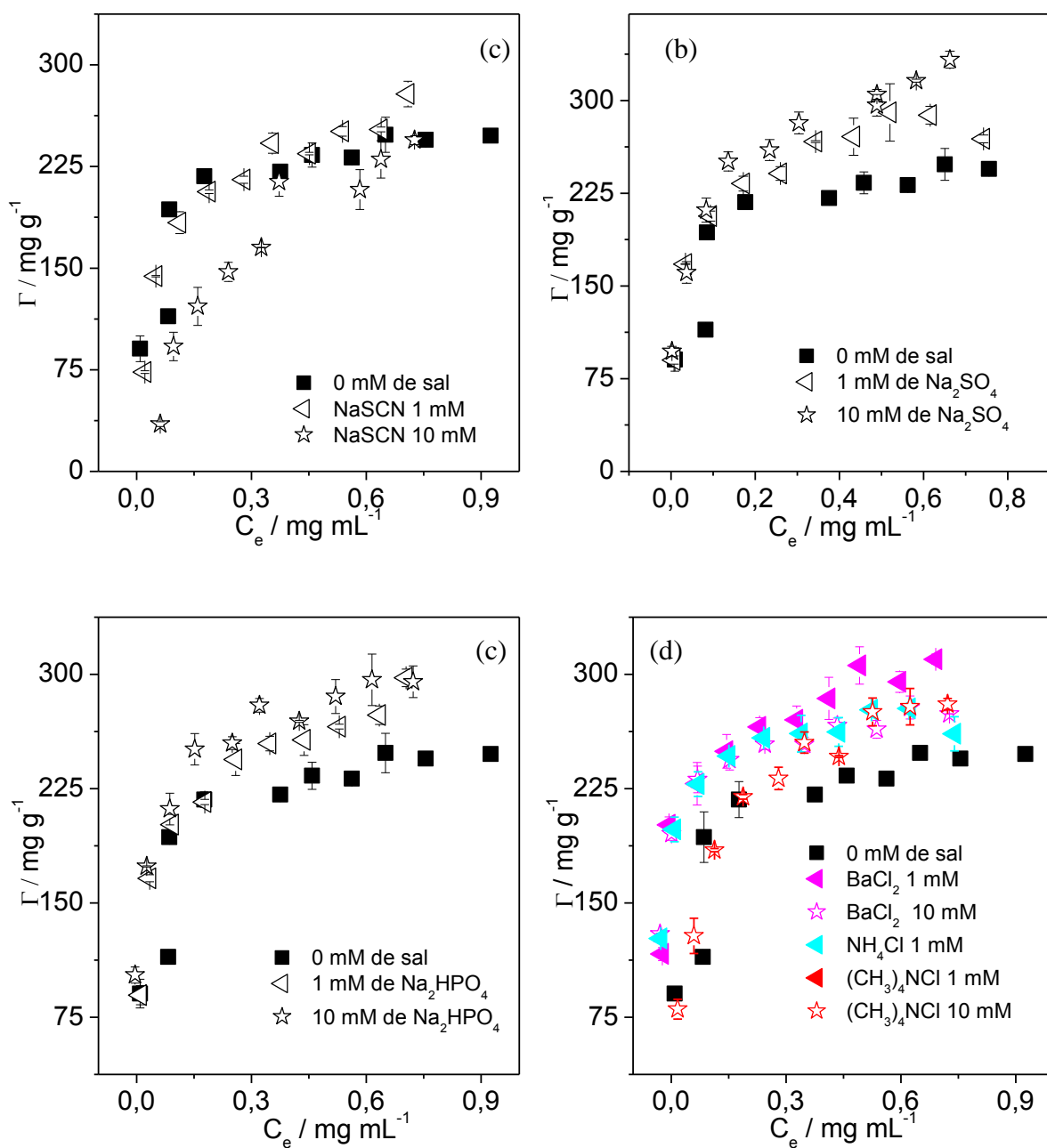
**Figura 25.** Isotermas de adsorção de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 9.

Observando os efeitos da concentração dos eletrólitos na adsorção da proteína  $\beta$ -Lg podemos destacar três comportamentos distintos. Para os sais  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e NaSCN, mesmo sendo o segundo caotrópico e o primeiro cosmotrópico, o efeito foi semelhante, onde na concentração de 1 mM ambos os sais reduziram a adsorção, enquanto para as

concentrações de 10 e 100 não houve efeito. Este comportamento pode ser entendido por uma maior adsorção dos ânions sulfato e tiocianato em concentração 1 mM na interface proteína adsorvida/solução, retirando, desta interface, ânions citrato previamente adsorvidos. Com o aumento da concentração o efeito não é verificado, devido à blindagem eletrostática da dupla camada elétrica da interface proteína adsorvida/solução, reduzindo, assim, a força motriz do potencial eletroquímico que levaria a adsorção dos ânions sulfato e tiocianato.

Um segundo comportamento observado foi para o sal fosfato ácido de sódio, no qual concentrações de 1 e 10 mM afetam pouco o processo de adsorção da  $\beta$ -Lg, enquanto concentrações de 100 mM reduzem a quantidade adsorvida. Este comportamento só pode ser explicado considerando que apenas a partir de 100 mM do sal  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  é que inicia-se uma efetiva adsorção competitiva entre os ânions  $\text{HPO}_4^{2-}$  e os ânions citrato pela interface proteína adsorvida/solução. Um comportamento muito similar é observado para o eletrólito  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  que não afeta em nenhuma concentração estudada a adsorção, isto ocorre provavelmente devido a uma ausência de adsorção competitiva entre os ânions cloreto e citrato nestas condições termodinâmicas do sistema. Finalmente um terceiro comportamento é observado para o sal  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para o qual estando em concentrações iguais a 1 ou 10 mM não ocorre efeito algum sobre a adsorção da  $\beta$ -Lg, enquanto em 100 mM a adsorção é incrementada. Este efeito pode ser entendido considerando que a adsorção competitiva entre os ânions cloreto e citrato inicia-se apenas na concentração de 100 mM do eletrólito  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e que a adsorção preferencial dos ânions cloreto leva a uma maior estabilização da camada protéica adsorvida o que permite uma maior quantidade de biopolímeros adsorvidos.

A Figura 26 mostra o efeito da concentração de diferentes eletrólitos sobre as isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em tampão pH 3.



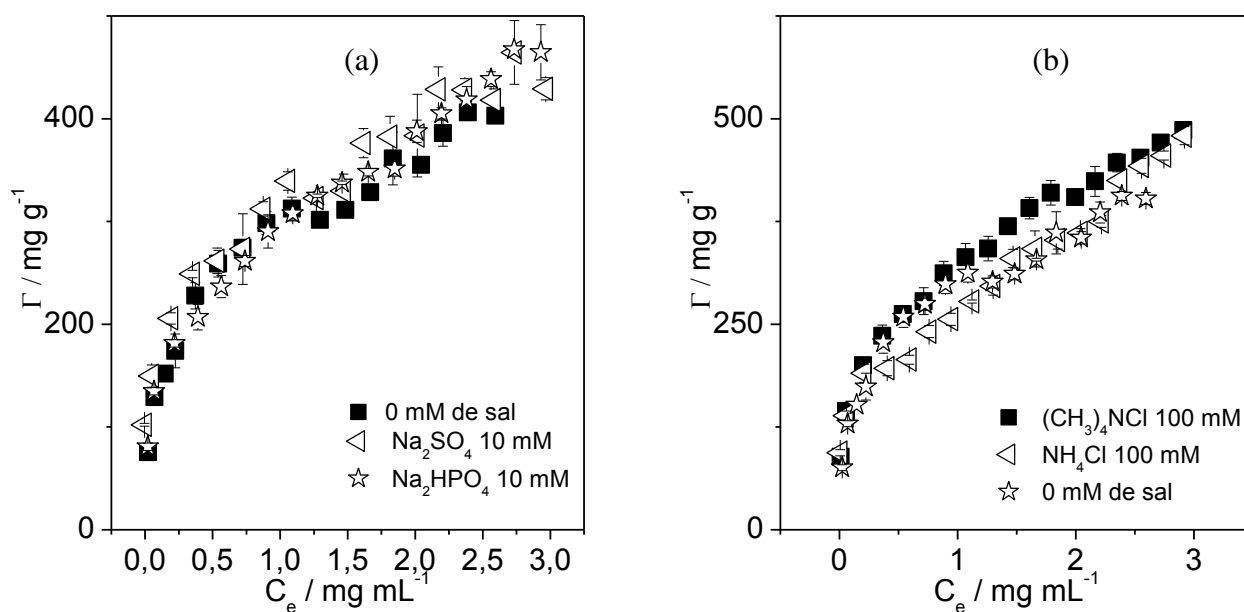
**Figura 26.** Isotermas de adsorção de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 3.

As isotermas de adsorção obtidas na presença de diferentes concentrações de eletrólito em tampão pH 3 mostram que não existe um efeito da concentração do eletrólito sobre o processo de adsorção da  $\beta$ -Lg na interface dos MWCNTs, com exceção do sal  $\text{BaCl}_2$  para o qual ocorre uma redução na capacidade adsorptiva para

concentrações altas de proteína em consequência do aumento da concentração deste eletrólito de 1 para 10 mM. A ausência do efeito da concentração para os demais eletrólitos pode ser compreendida levando em consideração que a adsorção dos íons dos sais da série de Hofmeister independem da concentração dos mesmos no pH 3, *i.e.*, neste pH o início do processo de adsorção competitiva destes íons ocorre em concentrações acima de 10 mM com exceção do  $\text{BaCl}_2$ .

### 3.4.2. Efeito de Eletrólitos na adsorção de GMP

Estudou-se também o efeito de eletrólitos caotrópicos e cosmotrópicos sobre a adsorção de GMP em pH 9. A figura 27 mostra a  $\Gamma$  em mg de GMP por grama de MWCNT em função da concentração de equilíbrio em pH 9 na presença de ânions e cátions da série de Hofmeister.



**Figura 27.** Isotermas de adsorção de GMP em MWCNT pH 9 na presença de: (a) ânions da série de Hofmeister e (b) cátions da série de Hofmeister.

A figura 27a e 27b mostra que o perfil das isotermas de adsorção de GMP em MWCNT na presença de diferentes eletrólitos é o mesmo que na ausência destes. Os valores de  $\Gamma$  do GMP (figura 29a e 29b) mostram que, em pH 9, a presença de 10 mM dos eletrólitos cosmotrópicos  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e 100 mM dos sais  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  afetam pouco o comportamento de adsorção deste peptídeo. Estes resultados evidenciam que a interação entre MWCNT e GMP, em pH 9, não é, principalmente, de natureza eletrostática.

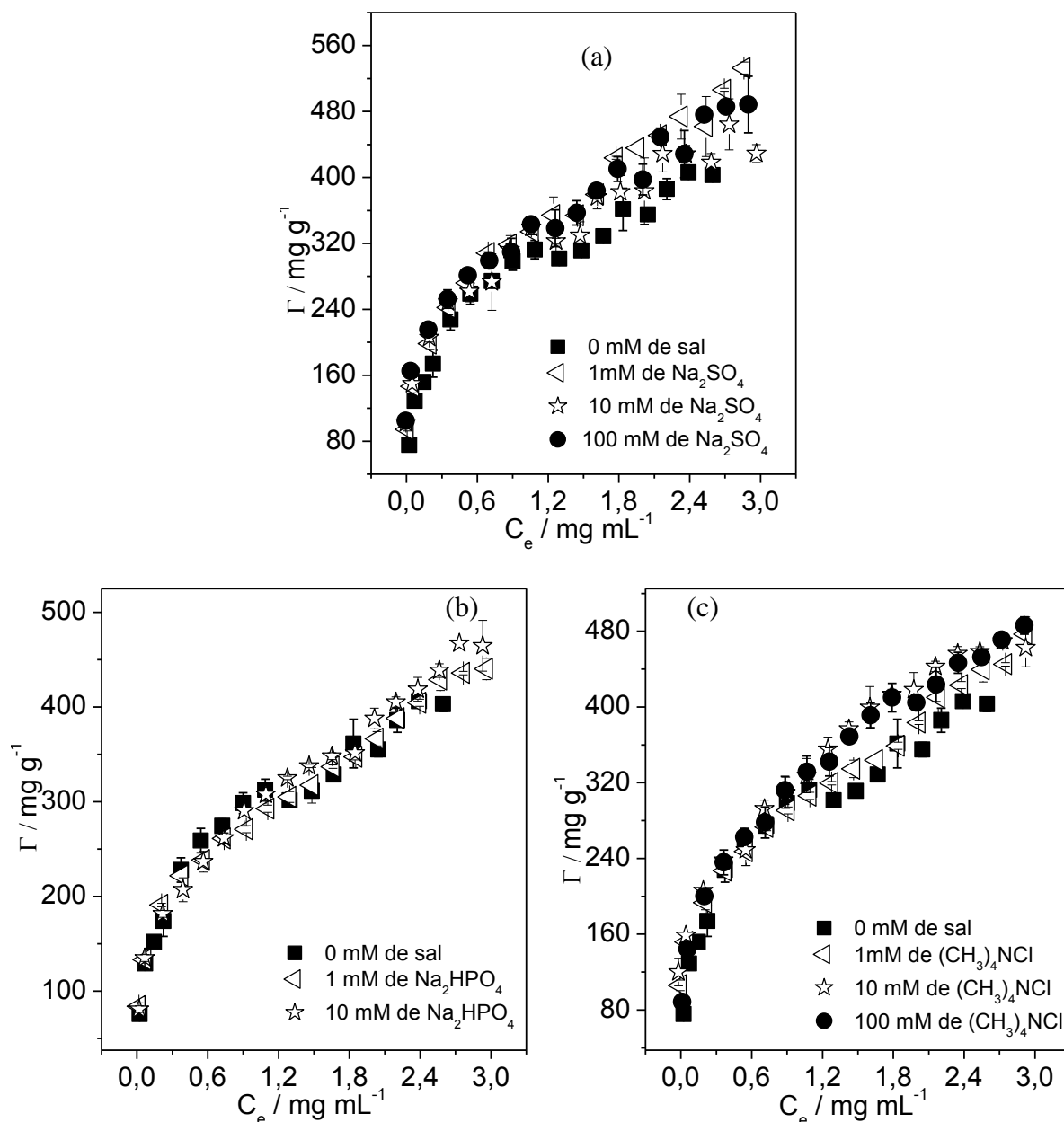
Valores de  $\Delta_{ads}G^o$  calculados por ambos os modelos de Langmuir e pela aproximação de diluição infinita (tabela 6) na presença e ausência de diferentes concentrações de eletrólitos mostram que o processo de adsorção do glicomacropéptídeo na interface dos MWCNTs é espontâneo.

**Tabela 6.** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de GMP em MWCNT na presença de diferentes eletrólitos em tampão pH 9 calculado com diferentes modelos.

Sal	Concentração de eletrólito	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	R	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	r
NaSCN	0 mM	-16,89	0,97591	-17,85	0,97377
	1 mM	-15,16	0,92853	-16,17	0,96142
	10 mM	-15,37	0,92384	-	-
	100 mM	-17,15	0,94378	-18,73	0,90883
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0 mM	-16,89	0,97591	-17,85	0,97377
	1 mM	-16,44	0,92783	-17,60	0,94445
	10 mM	-16,11	0,94247	-18,01	0,96525
	100 mM	-15,92	0,90932	-17,99	0,95409
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0 mM	-16,89	0,97591	-17,85	0,97377
	1 mM	-15,74	0,95853	-17,15	0,95022
	10 mM	-15,55	0,96757	-17,05	0,94733
$(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$	0 mM	-16,89	0,97591	-17,85	0,97377
	1 mM	-15,09	0,93223	-17,43	0,94383
	10 mM	-15,45	0,95944	-17,96	0,96467
	100 mM	-15,27	0,96806	-17,65	0,96552
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0 mM	-16,89	0,97591	-17,85	0,97377
	100 mM	-16,67	0,90112	-14,54	0,93858

### 3.4.2.1. Efeito da concentração de eletrólitos sobre a adsorção do GMP

A Figura 28 mostra o efeito da concentração de diferentes eletrólitos sobre as isotermas de adsorção de GMP em tampão pH 9.



**Figura 28.** Isotermas de adsorção do GMP em MWCNT na presença de eletrólitos da série de Hofmeister em diferentes concentrações em pH 9.

Não se observa um efeito da concentração do eletrólito sobre o processo de adsorção do peptídeo GMP na interface dos MWCNTs, com exceção do sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  no

qual nas concentrações de 10 e 100 mM aumenta a capacidade adsortiva para concentrações altas de proteína. A ausência do efeito pode ser compreendida levando em consideração que a adsorção dos íons dos sais da série de Hofmeister independem da concentração dos mesmos no pH 9, *i.e.*, neste pH o início do processo de adsorção competitiva destes íons ocorre em concentrações acima de 100 mM para o  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  e de 10 mM para o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  com exceção naturalmente do  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

### 3.5. Efeito dos eletrólitos nos valores de $\Delta_{ads}G^o$

Os efeitos da concentração dos eletrólitos no processo de adsorção das proteínas foram pouco pronunciados nos valores de  $\Delta_{ads}G^o$ , que podem ser vistos nas tabelas de 7 a 10. Este pequeno efeito no  $\Delta_{ads}G^o$  explica-se lembrando que este é um parâmetro termodinâmico associado à interação proteína-MWCNT que ocorre em baixas concentrações de proteína, sendo pequena a contribuição da interação proteína-proteína presente na superfície. Como visto anteriormente, o efeito dos eletrólitos está presente na adsorção competitiva que leva a blindagem da repulsão eletrostática proteína-proteína, tornando mais favorável à interação entre moléculas de proteína adsorvidas na interface. Entretanto, essas interações proteína-proteína só ocorrem para concentrações de proteína elevadas (final da isoterma de adsorção) onde o  $\Delta_{ads}G^o$  não é influenciado por essas interações.

**Tabela 7.** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de diferentes ânions calculado com diferentes modelos.

Sal	pH	Concentração de eletrólito	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	R	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	r
NaSCN	3	0 mM	-19,00	0,96638	-22,63	0,94663
		1 mM	-19,81	0,97613	-23,33	0,96711
		10 mM	-18,77	0,96289	-19,86	0,98078
NaSCN	9	0 mM	-18,92	0,95012	-22,46	0,90869
		1 mM	-18,62	0,94833	-21,90	0,98742
		10 mM	-18,68	0,97712	-20,29	0,98075
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	100 mM	-18,48	0,9803	-21,37	0,98282
		0 mM	-19,00	0,96638	-22,63	0,94663
		1 mM	-18,62	0,97846	-21,39	0,96459
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9	10 mM	-18,90	0,97346	-17,94	0,91632
		0 mM	-18,92	0,95012	-22,46	0,90869
		100 mM	-19,42	0,93496	-24,45	0,88535
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	10 mM	-17,94	0,91632	-18,25	0,98979
		0 mM	-19,00	0,96638	-22,63	0,94663
		1 mM	-18,81	0,97781	-21,73	0,99605
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9	10 mM	-19,11	0,95781	-22,12	0,99004
		0 mM	-18,92	0,95012	-22,46	0,90869
		100 mM	-19,18	0,95594	-22,98	0,98862
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9	10 mM	-17,71	0,99689	-19,91	0,99374
		100 mM	-17,77	0,99296	-23,69	0,9759

**Tabela 8.** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\alpha$ -La em MWCNT na presença de diferentes cátions calculado com diferentes modelos.

Sal	pH	Concentração de eletrólito	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	R	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	r
NH <sub>4</sub> Cl	3	0 mM	-19,00	0,96638	-22,63	0,94663
		1 mM	-18,49	0,95985	-24,13	0,99492
		10 mM	-19,24	0,97489	-22,32	0,98414
NH <sub>4</sub> Cl	9	0 mM	-18,92	0,95012	-22,46	0,90869
		1 mM	-18,83	0,94956	-23,17	0,97714
		10 mM	-17,31	0,94516	-19,56	0,99399
(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl	3	100 mM	-18,73	0,94386	-26,74	0,99397
		0 mM	-19,00	0,96638	-22,63	0,94663
		1 mM	-17,54	0,99092	-20,29	0,99465
(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl	9	10 mM	-18,43	0,97643	-21,73	0,99694
		0 mM	-18,92	0,95012	-22,46	0,90869
		100 mM	-18,29	0,97343	-20,97	0,99736
BaCl <sub>2</sub>	3	10 mM	-17,52	0,97429	-19,36	0,98855
		0 mM	-19,00	0,96638	-22,63	0,94663
		1 mM	-18,91	0,99432	-22,13	0,99651
		10 mM	-18,71	0,9688	-23,67	0,88237

**Tabela 9.** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de diferentes ânions calculado com diferentes modelos.

Sal	pH	Concentração de eletrólito	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	r	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	r
NaSCN	3	0 mM	-18,45	0,92408	-24,02	0,71352
		1 mM	-18,52	0,96727	-20,98	0,98579
		10 mM	-17,40	0,92021	-16,21	0,87466
NaSCN	9	0 mM	-18,27	0,96892	-20,54	0,94992
		1 mM	-17,57	0,97369	-17,45	0,97369
		10 mM	-17,56	0,97369	-17,45	0,93713
		100 mM	-17,96	0,87819	-17,75	0,97467
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	0 mM	-18,45	0,92408	-24,02	0,71352
		1 mM	-19,34	0,9148	-24,46	0,97088
		10 mM	-19,69	0,93957	-27,35	0,84471
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9	0 mM	-18,27	0,96892	-20,54	0,94992
		1 mM	-16,70	0,96916	-14,10	0,79177
		10 mM	-19,17	0,95858	-22,93	0,95291
		100 mM	-17,92	0,94689	-23,29	0,93538
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	0 mM	-18,45	0,92408	-24,02	0,71352
		1 mM	-19,21	0,94625	-23,41	0,99473
		10 mM	-18,62	0,98423	-21,79	0,99051
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9	0 mM	-18,27	0,96892	-20,54	0,94992
		1 mM	-18,37	0,96535	-24,57	0,96141
		10 mM	-18,29	0,98909	-24,57	0,99032
		100 mM	-17,89	0,98084	-20,11	0,99478

**Tabela 10.** Parâmetro Termodinâmico  $\Delta_{ads}G^o$  de  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de diferentes cátions calculado com diferentes modelos.

Sal	pH	Concentração de eletrólito	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Termod.	r	$\Delta_{ads}G^o /$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) Lang.	r
NH <sub>4</sub> Cl	3	0 mM	-18,45	0,92408	-24,02	0,71352
		1 mM	-18,28	0,97347	-26,76	0,99041
		10 mM	-19,95	0,9708	-24,74	0,99285
NH <sub>4</sub> Cl	9	0 mM	-18,27	0,96892	-20,54	0,94992
		1 mM	-21,41	0,9977	-18,42	0,97358
		10 mM	-18,55	0,97234	-20,91	0,9957
		100 mM	-19,03	0,94884	-23,66	0,89391
(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl	3	0 mM	-18,45	0,92408	-24,02	0,71352
		1 mM	-19,31	0,94846	-21,59	0,97924
		10 mM	-20,22	0,95552	-23,43	0,99128
(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl	9	0 mM	-18,27	0,96892	-20,54	0,94992
		10 mM	-18,84	0,94423	-20,67	0,99445
		100 mM	-18,99	0,97936	-20,47	0,9941
BaCl <sub>2</sub>	3	0 mM	-18,45	0,92408	-24,02	0,71352
		1 mM	-18,13	0,98795	-24,19	0,97097
		10 mM	-19,18	0,95598	-23,25	0,74019

### 3.5. Medidas de potencial eletrocinético

As características de distribuição de cargas na superfície dos MWCNTs, contendo ou não as proteínas  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg adsorvidas, foram estudadas através de medidas do potencial eletrocinético (potencial zeta,  $\xi$ ) em diferentes valores de pH. Os valores de  $\xi$  para os MWCNTs e os biocomplexos proteínas-MWCNT são mostrados na tabela 11.

**Tabela 11.** Valores de  $\xi$  para os MWCNTs e os biocomplexos proteínas-MWCNT em diferentes valores de pH.

Solvente	Proteína	$C_e^P$ mg mL <sup>-1</sup>	Potencial Zeta ( $\xi$ ) / mV
Tampão pH 3	-	0	-1,39
Tampão pH 3	$\alpha$ -La	0,1706	31,5
Tampão pH 3	$\alpha$ -La	0,5549	29,4
Tampão pH 3	$\beta$ -Lg	0,1767	28,4
Tampão pH 3	$\beta$ -Lg	0,7553	25,1
Tampão pH 7	-	0	-1,10
Tampão pH 7	$\alpha$ -La	0,1823	-29,2
Tampão pH 7	$\alpha$ -La	0,7549	-36,9
Tampão pH 9	-	0	-12,1
Tampão pH 9	$\alpha$ -La	0,2294	-26,7
Tampão pH 9	$\alpha$ -La	0,8086	-26,9
Tampão pH 9	$\beta$ -Lg	0,2006	-20,7
Tampão pH 9	$\beta$ -Lg	0,7615	-20,9
Tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl	-	0	-2,64
Tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl	$\alpha$ -La	0,1830	-21,8
Tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl	$\alpha$ -La	0,7928	-23,7
Tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl	$\beta$ -Lg	0,1834	-20,1
Tampão pH 9 100 mM de NH <sub>4</sub> Cl	$\beta$ -Lg	0,7392	-21,0
Tampão pH 9 100 mM (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl	-	0	-10,4
Tampão pH 9 100 mM (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl	$\alpha$ -La	0,1294	-19,9
Tampão pH 9 100 mM (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl	$\alpha$ -La	0,4697	-22,6

Os valores de potencial zeta ( $\xi$ ) das dispersões de nanotubo na ausência de proteína mostram que a carga na superfície da partícula coloidal nanotubo varia com o pH e com a presença de 100 mM do eletrólito. Quando as nanopartículas estão dispersas em tampão pH 9 o valor de  $\xi$  é -12,1 eV, indicando que a carga superficial do nanotubo nessas condições é negativa. Essa carga negativa origina-se provavelmente de dois mecanismos complementares. No primeiro, grupos funcionais presentes na superfície dos MWCNT ionizam-se gerando cargas negativas (COO<sup>-</sup>, O<sup>-</sup>, etc) e, num segundo, mecanismo ânions presentes no tampão podem adsorver preferencialmente na interface do MWCNT. Interessantemente o valor  $\xi$  aumenta significativamente para -1,10 eV e -1,39 eV quando o pH do sistema cai para pH 7 e 3, respectivamente. Esse aumento nos valores de  $\xi$  reforçam a ideia de que íons formadores do tampão adsorvem na superfície do nanotubo e/ou a existência de grupos carregados na superfície do nanotubo. Além disso, esses resultados mostram uma maior afinidade da superfície dos MWCNTs com os ânions carbonato e hidrogenocarbonato formadores do tampão pH 9 em relação aos ânions hidrogenofosfato e dihidrogenofosfato e do ânion citrato formadores dos tampão pH 7 e 3, respectivamente.

Para dispersões de nanotubo na  $C_e$  da  $\alpha$ -La 0,2294 mg mL<sup>-1</sup> em tampão pH 9, observa-se uma diminuição significativa de  $\xi$  quando comparado a ausência da proteína, sendo que em pH 9 a CL da  $\alpha$ -La é negativa e o menor valor de  $\xi$  (mais negativo) indica que moléculas de proteína estão adsorvendo na superfície dos MWCNTs. Quando se aumenta a  $C_e$  de  $\alpha$ -La para 0,8086 mg mL<sup>-1</sup> espera-se que com o aumento em  $C_e$  o número de moléculas na superfície dos MWCNTs aumente, sendo assim, o valor de  $\xi$  deveria diminuir significativamente, porém o valor de  $\xi$  praticamente não varia sugerindo que com o aumento no número de moléculas de  $\alpha$ -La na superfície dos

nanotubos íons sódio presentes no tampão interagem com os resíduos carregados na superfície da  $\alpha$ -La, mantendo  $\xi$  praticamente constante.

Quando se avalia os valores de  $\xi$  na presença da  $\beta$ -Lg observa-se valores bem menores  $\xi$  quando comparado a ausência da proteína, sendo que em pH 9 a CL da  $\beta$ -Lg é negativa e o menor valor de  $\xi$  indica que moléculas de proteína estão adsorvendo na superfície dos MWCNTs.

Na presença de 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , o valor de  $\xi$  na superfície do nanotubo aumenta de -12,1 mV quando apenas na presença do tampão pH 9 para -2,64 mV. Isso sugere a adsorção preferencial do cátion  $\text{NH}_4^+$  na interface dos nanotubos. Interessantemente, na presença de 100 mM de  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ , observa-se apenas uma pequena redução no valor de  $\xi$  em relação a ausência do eletrólito, sugerindo que o eletrólito  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  não adsorve na superfície do nanotubo. Entretanto, apesar da natureza destes eletrólitos terem influenciado o valor de  $\xi$  na superfície do nanomaterial os eletrólitos  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tem efeito semelhante na adsorção de ambas as proteínas, sendo assim observa-se um aumento nos valores de  $\xi$  para dispersões de  $\alpha$ -La e/ou  $\beta$ -Lg em MWCNT na presença de 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou de  $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$  em tampão pH 9, e isso sugere que o eletrólito  $\text{NH}_4\text{Cl}$  compete com os íons dos sais formadores do tampão e adsorvem na interface proteína adsorvida/solução via interação eletrostática.

Para dispersões de nanotubo na  $C_e$  da  $\alpha$ -La  $0,1823 \text{ mg mL}^{-1}$  em tampão pH 7, observa-se uma diminuição significativa de  $\xi$  quando comparado a ausência da proteína, sendo que em pH 7 a CL da  $\alpha$ -La é negativa e o menor valor de  $\xi$  indica que moléculas de proteína estão adsorvendo na superfície dos MWCNTs. Quando se aumenta a  $C_e$  de  $\alpha$ -La para  $0,7549 \text{ mg mL}^{-1}$  o valor de  $\xi$  diminui de 7,7 mV indicando um aumento no número de moléculas de  $\alpha$ -La na superfície dos MWCNTs, sugerindo que com o aumento no número de moléculas de  $\alpha$ -La na superfície dos nanotubos íons potássio

presentes no tampão interagem com os resíduos carregados na superfície da  $\alpha$ -La, mas não em proporção estequiométrica de forma a manter  $\xi$  praticamente constante, como ocorre em pH 9.

Para dispersões de nanotubo em  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg em tampão pH 3 observa-se um grande aumento de  $\xi$  quando comparado a ausência da proteína, sendo que em pH 3 a CL de ambas as proteínas é positiva e o maior valor de  $\xi$  indica que moléculas do biopolímero estão adsorvendo na superfície dos MWCNTs. Além disso, o valor de  $\xi$  é menor na interface do nanocomplexo  $\beta$ -MWCNT quando comparado ao  $\alpha$ -MWCNT sugerindo uma maior adsorção de íons formadores do tampão na interface  $\beta$ -Lg adsorvida/ solução em relação à interface  $\alpha$ -La adsorvida/solução.

### 3.6. Conclusão

Pela primeira vez, foi estudado o comportamento de adsorção das proteínas  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La e do glicomacropéptido GMP em interfaces de MWCNT. Os estudos mostraram que esse processo é caracterizado por valores negativos de  $\Delta_{\text{ads}}G^{\circ}$ , sendo portanto espontâneo. Elevados valores de  $\Gamma_{\text{max}}$  foram observados em todas as condições estudadas apontando a potencialidade do MWCNT como adsorvente para essas biomoléculas e a obtenção de híbridos proteínas-nanotubos com aplicações estratégicas.

Determinou-se os parâmetros termodinâmicos de adsorção de proteínas em NCTs pelo modelo de Langmuir e pelo modelo termodinâmico de diluição infinita e, apesar de geralmente o processo de adsorção destes polieletrólitos em superfícies sólidas ser endotérmico, os valores de  $\Delta_{\text{ads}}H$  medidos calorimetricamente mostram que o processo de adsorção de  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La foi entálpicamente dirigido, sugerindo que a adsorção ocorre pelo seguinte mecanismo: moléculas de proteína se adsorvem nos sítios

presentes na interface dos MWCNT, mudando de conformação, de forma que resíduos de aminoácidos hidrofóbicos se direcionam para a interface dos MWCNT e resíduos carregados e hidrofílicos formam uma interface proteína adsorvida solução. Enquanto isso, íons provenientes dos eletrólitos formadores da solução tampão adsorvem na interface proteína adsorvida/solução de forma a minimizar a repulsão elétrica entre os segmentos das proteínas adsorvidas, aumentando assim a quantidade das mesmas adsorvidas na interface. Por outro lado, essa adsorção de íons na interface solução/proteína adsorvida está associada ao efeito de blindagem que os íons dos sais da série de Hofmeister têm sobre a dupla camada elétrica. Esta blindagem diminui a contribuição do potencial eletroquímico dos íons que sofrem a adsorção na interface proteína adsorvida/solução, reduzindo assim o processo adsortivo desses íons o que reduz a quantidade de proteína adsorvida.

Neste contexto, foi avaliado o efeito de diferentes eletrólitos da série de Hofmeister sobre o processo de adsorção dessas biomoléculas e foi observado que o efeito destes eletrólitos sobre o processo adsortivo depende da natureza e concentração do eletrólito. Com base nestes resultados, foi proposto que na presença de eletrólitos da série de Hofmeister há uma adsorção competitiva entre os íons do sal da série de Hofmeister e os íons formadores do tampão, alterando as contribuições entálpicas e entrópicas para o processo adsortivo. Medidas de potencial eletrocinético reforçaram o mecanismo proposto.

Os valores de  $\Delta_{ads}S^{\circ}$  indicam que a entropia do sistema diminui com o processo de adsorção da  $\alpha$ -La e da  $\beta$ -Lg em MWCNTs. A diminuição da entropia do sistema ocasionada pela adsorção dos íons na superfície proteína/solução compensa o aumento de entropia do sistema, devida à liberação de moléculas de água de solvatação dos íons, de forma que a variação da entropia resultante é negativa.

### 3.7. Referências Bibliográficas

- (1) Iijima, S. *Nature* **1991**, 354, 56.
- (2) Terrones, M. *Annu. Rev. Mater. Res.* **2003**, 33, 419.
- (3) Ajayan, P. M. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1787.
- (4) Vaitheeswaran, S.; Garcia, A. E. *J. Chem. Phys.* **2011**, 143, 125101.
- (5) Cheng, Y.; Liu, G. R.; Li, Z. R.; Lu, C. *Physica A* **2006**, 367, 293.
- (6) Girifalco, L. A.; Hodak, M.; Lee, R. S. *Phys. Rev. B* **2000**, 62, 13104.
- (7) Bai, Y.; Park, S.; Lee, S. J.; Bae, S. T.; Atari, F.; Uo, M.; Lee, H. M. *Carbon* **2011**, 49, 3663.
- (8) Vijayaraj, M.; Gadiou, R.; Anselme, K.; Ghimbeu, C.; Vix-Guterl, C.; Orikasa, H.; Kyotani, T. *Adv. Funct. Mater* **2010**, 20, 2489.
- (9) Numata, M.; Asai, M.; Kaneko, K.; Bae, A.H.; Hasegawa, T.; Sakurai, K.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5875.
- (10) Sanz, V.; Borowiak, E.; Lukanov, P.; Galibert, A. M.; Flahaut, E.; Coley, H. M.; Silva, S. R. P.; McFadden, J. *Carbon* **2011**, 49, 1775.
- (11) Vidal, G.; Delord, B.; Neri, W.; Gounel, S.; Roubeau, O.; Bartholome, C.; Ly, I.; Poulin, P.; Labrugere, C.; Sellier, E.; Durrieu, M. C.; Amedee, J.; Salvétat, J.P. *Carbon* **2011**, 49, 2318.
- (12) Zhong, J.; Song, L.; Meng, J.; Gao, B.; Chu, W. S.; Xu, H. Y.; Luo, Y.; Guo, J. H.; Marcelli, A.; Xie, S. S.; Wu, Z. Y. *Carbon* **2009**, 47, 967.
- (13) Wei, G.; Zhang, J. T.; Xie, L.; Jandt, K. D. *Carbon* **2011**, 49, 2216.
- (14) Zuo, G.H.; Huang, Q.; Wei, G. H.; Zhou, R. H.; Fang, H.P. *ACS Nano* **2010**, 4, 7508.

- (15) Han, Z.J.; Ostrikov, K.; Tan, C. M.; Tay, B. K.; Peel, S.A.F. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 295712.
- (16) Li, S. S.; He, H.; Chen, Z.; Zha, J.; Chuong, P. H. *Spectroscopy and Spectral Analysis* **2010**, *30*, 2689.
- (17) Vashist, S. K.; Zheng, D.; Pastorin, G.; Al-Rubeaan, K.; Luong, J. H. T.; Sheu, F. S. *Carbon* **2011**, *49*, 4077.
- (18) Haynes, A. H.; Norde, W. *Colloid. Surf. B* **1994**, *2*, 517.
- (19) Bonomo, R. C. F.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R.; Fontan, R. C. I.; da Silva, L. H. M.; Minim, V. P. R. *J. Chromatogr B* **2006**, *844*, 6.
- (20) Harris, P. J. F. *Carbon Nanotube Science*, Cambridge: New York, **2009**.
- (21) Dresselhaus, M.S.; Endo, M. Relation of carbon nanotubes to other carbon materials. In: Dresselhaus, M.S.; Dresselhaus, G.; Avouris, Ph. eds. *Topics in Applied Physics 80: Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications*, Berlin: Springer, **2001**. p.11-28.
- (22) Moniruzzaman, M.; Winey, K. I. *Macromol.* **2006**, *39*, 5194.
- (23) . Dresselhaus, M.S.; Avouris, P. Introduction to carbon materials research. In: Dresselhaus, M.S.; Dresselhaus, G.; Avouris, Ph. eds. *Topics in Applied Physics 80: Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications*, Berlin: Springer, **2001**. p.1-9.
- (24) Yang, D.J.; Wang, S.G.; Zhang, Q.; Sellin, P.J.; Chen, G. *Phys. Lett. A* **2004**, *329*, 207.
- (25) Ajayan, P.M.; Tour, J.M. *Nature* **2007**, *447*, 1066.
- (26) Collins, P.G.; Zettl, A.; Bando, H.; Thess, A.; Smalley, R.E. *Science* **1997**, *278*, 100.
- (27) Kumar, S. Polymer/Carbon Nanotube Composites: Challenges and

Opportunities. Retirado da Internet em24/08/2006:  
www.ptfe.gatech.edu/faculty/kumar/kumar\_files /Polymer.pdf.

- (28) Planeix, J.M.; Coustel, N.; Coq, B.; Brotons, V.; Kumbhar, P.S.; Futartre, R.; Geneste, P.; Bernier, P.; Ajayan, P.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7935.
- (29) Lee, Y-H.; An, K.H.; Yoo, J. E. US PATENT 6454816 B1 (2002);
- (30) Chen, G.Z.; Fray, D.J.; Hughes, M.; Shaffer, M.S.P.; Windle, A.H. US PATENT APPLICATION 2003/0077515 A1 (2003);
- (31) Lobovsky, A.; Matrunich, J.; Baughman, R.H.; Palley, I.; West, G.A.; Golecki, I. US PATENT 6764628 B2 (2004);
- (32) Liu, T.; Kumar, S. US PATENT 7061749 B2 (2006);
- (33) Plee, D.; Taberna, P-L. US PATENT APPLICATION 2007/0201184 A1 (2007)
- (34) Damodaran, S. *Food proteins and their applications*, CRC Press: New York, **1997**.
- (35) Fox, P. F.; Mcsweeney, P. L. H; *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Ireland: Blackie Academic & Professional, **1998**.
- (36) Berliner, L. J.; Kogat, K. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3006.
- (37) Musci, G.; Berliner, L. J. *Biochemistry* **1985**, *24*, 3852.
- (38) Sgarbieri, V. C. *Braz. J. Food Technol.* 2009, *8*, 43.
- (39) Pieter, W.; Wouters, J. T. M.; Geurts, T. J. *Dairy Science and Technology*, New York: Taylor & Francis Group, 2nd ed., **2006**.
- (40) Dziuba, J.; Minkiewicz, P. *Int. Dairy J.* **1996**, *6*, 1017.
- (41) <http://www.daviscofoods.com/fractions/gmp.cfm> . Acesso em 15/12/2011.
- (42) Coimbra, J. S. dos R.; Teixeira, J. A. *Engineering aspects of milk and dairy products*, Boca Raton: CRC press, **2009**.
- (43) Levine, I. N. Physical Chemistry. *Higher Education*: New York, **2009**.

- (44) Crittenden, B.; Thomas, J. T. *Adsorption Technology and Design*, Typeset at the Spartan Press Ltd: Great Britain, **1998**.
- (45) Guo, M. L.; Chen, J. H.; Liu, D. Y.; Nie, L. H.; Yao, S. Z. *Bioelectrochemistry* **2004**, *62*, 29.
- (46) Tsang, S. C.; Davis, J. J.; Green, M. L. H.; Allen, H.; Hill, O.; Leung, Y. C.; Sadler, P. J. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1995**, *17*, 1803.
- (47) Davis, J. J.; Green, M. L. H.; Hill, H. A. O.; Leung, Y. C.; Sadler, P. J.; Sloan, J.; Xavier, A. V.; Tsang, S. C. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *272*, 261.
- (48) Chen, R. J.; Zhang, Y. G.; Wang, D. W.; Dai, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3838.
- (49) Huang, W. J.; Taylor, S.; Fu, K. F.; Lin, Y.; Zhang, D. H.; Hanks, T. W.; Rao, A. M.; Sun, Y. P. *Nano Lett* **2002**, *2*, 311.
- (50) Sun, Y. P.; Fu, K. F.; Lin, Y.; Huang, W. J. *Acc. Chem. Rev.* **2002**, *35*, 1096.
- (51) Jiang, K. Y.; Schadler, L. S.; Siegel, R. W.; Zhang, X. J.; Zhang, H. F.; Terrones, M. *J. Mater Chem.* **2004**, *14*, 37.
- (52) Jia, N. Q.; Wang, L. J.; Liu, L.; Zhou, Q.; Jiang, Z. Y. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 349.
- (53) Mavrandonakis, A.; Farantos, S. C.; Froudakis, G. E. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 6048.
- (54) Yin, Y. J.; Wu, P.; Lu, Y. F.; Du, P.; Shi, Y. M.; Cai, C. X. *J. Solid State Electr.* **2007**, *11*, 390.
- (55) Wang, S.; Bao, H. M.; Yang, P. Y.; Chen, G. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *612*, 182.
- (56) Shen, J. W.; Wu, T.; Wang, Q.; Kang, Y. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3847.

- (57) Mu, Q. X.; Liu, W.; Xing, Y. H.; Zhou, H. Y.; Li, Z. W.; Zhang, Y.; Ji, L. H.; Wang, F.; Si, Z. K.; Zhang, B.; Yan, B. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 3300.
- (58) Zhong, J.; Song, L.; Meng, J.; Gao, B.; Chu, W. S.; Xu, H. Y.; Luo, Y.; Guo, J. H.; Marcelli, A.; Xie, S.S.; Wu, Z. Y. *Carbon* **2009**, *47*, 967.
- (59) Kang, Y.; Liu, Y. C.; Wang, Q.; Shen, J. W.; Wu, T.; Guan, W. J. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2807.
- (60) Wang, Z. F.; Wang, Y. Y.; Huang, Y. J.; Li, S.; Feng, S. R.; Xu, H. J.; Qiao, M. Q. *Carbon* **2010**, *48*, 2890.
- (61) Karajanagi, S. S.; Vertegel, A. A.; Kane, R. S.; Dordick, J. S. *Langmuir* **2004**, *20*, 11594.
- (62) Gomez, J. M.; Romero, M. D.; Fernandez, T. M. *Catal Lett* **2005**, *101*, 275.
- (63) Ahammad, A. J. S.; Lee, J. J.; Rahman, M. A. *Sensors* **2009**, *9*, 2289.
- (64) Li, L.; Feng, W.; Ji, P. *Aiche J.* **2011**, *0*, 1.
- (65) Bomboi, F.; Bonincontro, A.; La Mesa, C.; Tardani, F. *J. Colloid. Interf. Sci.* **2011**, *355*, 342.
- (66) Vrbka, L.; Lund, M.; Kalcher, I.; Dzubiella, J.; Netz, R. R.; Kunz, W. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 154109.
- (67) Kunz, W.; Henle, J.; Niham, B. W. *Curr. Opin. Colloid In.* **2004**, *9*, 19.
- (68) Cacace, M. G.; Landau, E. M.; Ramsden, J. J. *Q. Rev. Biophys.* **1997**, *30*, 241.
- (69) Dill, A. K.; Truskett, T. M.; Vlachy, V.; Lee, B.H. *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 173.
- (70) Kunz, W. *Curr. Opin. Colloid In.* **2010**, *15*, 34.
- (71) Vlachy, V.; Hribar-lee, B.; Kalyuzhnyil, Y.V.; Dill, K. A. *Curr. Opin. Colloid In.* **2004**, *9*, 128.
- (72) Kunz, W. *Curr. Opin. Colloid In.* **2010**, *15*, 34.

- (73) Nikolov, V.; Lin, J.; Merzlyakov, M.; Hristova, K.; Searson, P.C. *Langmuir* **2007**, *26*, 13040.
- (74) Arnebrant, T.; Kathleen, B.; Tommy, N. *J. Colloid Interf. Sci.* **1987**, *119*, 383.
- (75) Cosman, N. P.; Fatih, K.; Roscoe, S.G. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *574*, 261.
- (76) Jones, T. T.; Fernandez, E. J. *J. Colloid Interf. Sci.* **2003**, *259*, 27.
- (77) Cabilio, N. R.; Omanovic, S.; Roscoe, S. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 8480.
- (78) Wahlgren, M. C.; Arnebrant, T.; Paulsson, M. A. *J. Colloid Interf. Sci.* **1993**, *158*, 46.
- (79) Liedberg, B.; Ivarsson, B.; Hegg, P. O.; Lundstrom, I. *J. Colloid Interf. Sci.* **1986**, *114*, 386.
- (80) Luey, J. K.; Mcguire, J.; Sproull, R. D. *J. Colloid Interf. Sci.* **1991**, *143*, 489.
- (81) Wahlgren, M.; Arnebrant, T. *J. Colloid Interf. Sci.* **1990**, *136*, 259.
- (82) Balavoine, F.; Schultz, P.; Richard, C.; Mallouh, V.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1912.
- (83) Azamian, B. R.; Davis, J. J.; Coleman, K. S.; Bagshaw, C. B.; Green, M. L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12664.
- (84) Lin, Y.; Allard, L. F.; Sun, Y. P. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3760.
- (85) Gomez, J. M.; Romero, M. D.; Fernandez, T. M. *Catal Lett.* **2005**, *101*, 275.
- (86) Li, X. J.; Chen, W.; Zhan, Q. W.; Dai, L. M.; Sowards, L.; Pender, M.; Naik, R. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 12621.
- (87) Zorbas, V.; Smith, A. L.; Xie, H.; Ortiz-Acevedo, A.; Dalton, A. B.; Dieckmann, G. R.; Draper, R. K.; Baughman, R. H.; Musselman, I. H. *J. Am. Chem.* **2005**, *127*, 12323.
- (88) Haynes, A. H.; Norde, W. *J. Colloid Interf. Sci.* **1994**, *169*, 313.

- (89) Ferreira, R. C.; Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- (90) Norde, W.; Anusiem, C.I. *Colloid Surface B* **1992**, 66, 73.
- (91) Galisteo, F.; Norde, W. *Colloid Surface B* **1995**, 4, 375.
- (92) Arnebrant, T.; Barton, K.; Nylander, T. *J. Colloid Interf. Sci.* **1986**, 119, 383.
- (93) Wahlgren, M.; Arnebrant, T.; Paulsson, M. A. *J. Colloid Interf. Sci.* **1993**, 158, 46.
- (94) Misra, P.P.; Kishore, N. *J. Colloid Interf. Sci.* **2011**, 354, 234.
- (95) Omanovic, S. G.; Roscoe, J. *Colloid Interf. Sci.* **2000**, 227, 452.
- (96) Norde, W. J. Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1979**, 71, 350.
- (97) Lyklema, J. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, 467, 217.