



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS
BASEADOS EM POLÍMEROS CONDUTORES E SUAS APLICAÇÕES
NA PURIFICAÇÃO DE DNA, REMEDIAÇÃO AMBIENTAL
E EM DISPOSITIVOS ELETRÔNICOS FLEXÍVEIS**

Recife

2019

ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS
BASEADOS EM POLÍMEROS CONDUTORES E SUAS APLICAÇÕES
NA PURIFICAÇÃO DE DNA, REMEDIAÇÃO AMBIENTAL
E EM DISPOSITIVOS ELETRÔNICOS FLEXÍVEIS**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Materiais.

Área de Concentração: Materiais não metálicos

Orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

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

Orientador externo: Dr(a). Alicia Elizabeth Chávez-Guajardo

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Nataly Soares Leite Moro, CRB4-1722

S586d Silva, Romário Justino da
Desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados baseados em polímeros condutores e suas aplicações na purificação de DNA, remediação ambiental e em dispositivos eletrônicos flexíveis / Romário Justino da Silva. – 2019.
342 f.: il., fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência de Materiais, Recife, 2019.
Inclui referências e apêndices.

1. Materiais não metálicos. 2. Polianilina. 3. PEDOT. 4. Nanocompósitos magnéticos. 5. Purificação de DNA. I. Melo, Celso Pinto de (orientador). II. Título.

620.19 CDD (23. ed.) UFPE- CCEN 2023 - 166

ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS
BASEADOS EM POLÍMEROS CONDUTORES E SUAS APLICAÇÕES NA
PURIFICAÇÃO DE DNA, REMEDIAÇÃO AMBIENTAL E EM DISPOSITIVOS
ELETRÔNICOS FLEXÍVEIS**

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

Aprovada em: 28/11/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Celso Pinto de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Severino Alves Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Beate Saegesser Santos (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Nara Cristina de Souza (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Mato Grosso

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meu pais, Adevar e Silvânia, que apesar de não compreenderem os desejos e sonhos que me regem, sempre me apoiaram e sangraram para me prover a oportunidade de estar aqui, neste exato momento, contemplando esse turbilhão de sentimentos. Aos professores Nara e Josmary, pelo respeito, amizade, por me apresentarem essa religião, e por pavimentarem com sinceridade e otimismo esse caminho que venho percorrendo há uma década. Aos meus tios Ana Cristina e Luciano, por sempre estarem ao meu lado e por serem pessoas com as quais posso contar. E a Bruna, por todo amor, carinho, companheirismo, e por manter minha sanidade em tantos momentos de desespero ao longo desse período emocionalmente caótico apelidado de doutorado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Grupo de Polímeros Não Convencionais (PNC), por dispor das condições necessárias para a elaboração de toda a pesquisa desenvolvida neste manuscrito. A todos os colegas do grupo com os quais tive a oportunidade de interagir, Hérica, Sandro, Elton, Winnie, Kamila, Edson, Hugo, Rodrigo, Macário e Yuri, pela convivência, amizade, colaborações, descontrações, e contribuições diretas e indiretas na realização deste trabalho.

Aos muchachos Juan, Alicia e Jarib (que devem estar construindo o muro), pela amizade, todos os conselhos, orientações, transmissão de conhecimento, e inúmeras discussões e ideias que foram basilares para o meu desenvolvimento científico e realização deste e de tantos outros trabalhos.

Ao professor Celso, por ter acolhido esse imigrante em seu círculo científico, pela orientação, liberdade e confiança. Por ser essa fonte infinda e sempre aberta de conhecimento. Pelas discussões ao longo da constante metamorfose desse trabalho. Por ser esse eterno e sagaz advogado do diabo, mas sempre com aquele tom inglês, na busca de nos instigar a aperfeiçoar nossa ciência. Por ser esse eterno otimista quanto à ciência e ao futuro dessa nação, mesmo nestes dias de neblina extremamente espessa, que até parecem nuvens de metal.

Ao professor Helinando e ao Laboratório LEIMO (UNIVASF), pela colaboração e fortes contribuições em partes deste trabalho. Pela transmissão de conhecimento e oportunidade de trabalhar junto à equipe.

A todos os professores que passaram por minha trajetória educacional e contribuíram com minha formação pessoal e profissional.

À UFPE e ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais (PGMTR), pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro fornecido por meio da bolsa de Doutorado.

****Meus agradecimentos informais se encontram no Apêndice D.***

*“Sei que parecem idiotas,
As rotas que eu traço,
Mas tento traçá-las eu mesmo,
E, se chego sempre atrasado,
Se nunca sei que horas são,
É porque nunca se sabe,
Até que horas os relógios funcionarão.*

*Sem dúvida a dúvida é um fato,
Sem fatos não sai um jornal,
Sem saída ficamos todos presos,
Aqui dentro faz muito calor,
Nem sempre faço o que é melhor pra mim,
Mas nunca faço o que eu não tô a fim de fazer,
Não quero perder a razão pra ganhar a vida,
Nem perder a vida pra ganhar o pão,
Não é que eu faça questão de ser feliz,
Eu só queria que parassem de morrer de fome a um palmo do meu nariz.*

*Mesmo que pareçam bobagens,
As viagens que eu faço,
Eu traço meus rumos eu mesmo (a esmo),
E se nunca sei a quantas ando,
Se ando sem direção,
É porque nunca se sabe.*

*Nem sempre faço o que é melhor pra mim,
Mas nunca faço o que eu não tô a fim de fazer,
Não viro vampiro, eu prefiro sangrar,
Me obrigue a morrer, mas não me peça pra matar!”*

Gessinger (1988)

RESUMO

Neste trabalho, discutimos a preparação e caracterização de diversos tipos de materiais nanoestruturados baseados em polímeros condutores, e analisamos sua aplicação em diferentes áreas, como na purificação de ácidos nucleicos, na remoção de contaminantes e na construção de dispositivos orgânicos de armazenamento de energia. Especificamente, desenvolvemos e caracterizamos os seguintes nanomateriais: i) compósitos magnéticos constituídos por nanopartículas de maghemita (γ -NPs) com a superfície recoberta pelos polímeros condutores poli(3, 4-etilenodioxitiofeno), (PEDOT)- γ -NPs/PEDOT, e polianilina, (Pani)- γ -NPs/Pani; ii) membranas de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), obtidas por meio da técnica de eletrofiação com a superfície modificada pela incorporação de PEDOT; iii) eletrodos orgânicos flexíveis baseados em nanoestruturas de carbono, PEDOT e membranas proteicas da casca de ovo. Os nanocompósitos magnéticos γ -NPs/PEDOT e γ -NPs/Pani foram desenvolvidos com o objetivo de serem usados como adsorventes de fase sólida para a purificação de ácidos nucleicos extraídos de diferentes amostras biológicas. Para isso, desenvolvemos protocolos de purificação de DNA total e de DNA plasmídeo extraídos a partir de amostras de sangue humano e de bactérias Gram-negativas. Os resultados mostraram que os protocolos correspondentes são simples, rápidos e que levam a um bom rendimento do DNA alvo (que é obtido com pureza adequada), com um desempenho equivalente ao de kits comerciais. A qualidade do DNA extraído permite que ele possa ser usado em protocolos regulares de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Fizemos ainda estudo preliminar do uso do nanocompósito para a captura direta de bactérias em suspensões aquosas. Por sua vez, as membranas de PVDF/PEDOT foram utilizadas para a remoção do azocorante alaranjado de metila, quando realizamos estudos cinéticos e termodinâmicos da adsorção, bem como de seu uso em sistemas de filtração. As análises revelaram que as membranas possuem uma boa capacidade de adsorção, ótima estabilidade química e mecânica, e podem ser utilizadas em sucessivos ciclos de adsorção/dessorção sem perda de capacidade, com o incremento da capacidade sendo observada com o aumento da temperatura. Finalmente, os eletrodos orgânicos compósitos preparados através da incorporação de nanoestruturas de carbono e PEDOT em membranas de casca de ovo foram utilizados para a produção de dispositivos supercapacitores orgânicos, que exibem uma capacitância de natureza híbrida (ou seja, capacitância de dupla camada e pseudocapacitância). Os resultados eletroquímicos mostraram que os dispositivos apresentavam uma boa capacitância, baixa resistência interna, alta retenção capacitiva, boa

ciclabilidade e estabilidade mecânica. Além disso, foi também observado que o tamanho das nanoestruturas tem influência direta sobre a capacitância dos dispositivos.

Palavras-chave: polianilina; PEDOT; nanocompósitos magnéticos; purificação de DNA; remediação ambiental; supercapacitor orgânico.

ABSTRACT

In this paper, we discuss the preparation and characterization of various types of conducting polymers based on nanostructured materials and investigate their application in different areas, such as nucleic acid purification, contaminant removal and the construction of energy storage organic devices. Specifically, the following nanomaterials were developed and characterized: i) magnetic composites composed of maghemite nanoparticles (γ -NPs) with the surface covered by the conductive polymers poly (3,4-ethylenedioxythiophene), (PEDOT)- γ -NPs/PEDOT, and polyaniline, (Pani)- γ -NPs/Pani; ii) electrospun polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes modified by the incorporation of PEDOT chains; iii) flexible organic electrodes based on carbon nanostructures, PEDOT and eggshell protein membranes. The γ -NPs/PEDOT and γ -NPs/Pani magnetic nanocomposites were developed as solid phase adsorbent materials for the purification of nucleic acids extracted from different biological samples. To this end, using human blood samples and Gram-negative bacteria solutions we have developed total DNA and plasmid DNA purification protocols. The results showed that the corresponding protocols are simple, fast and lead to a good yield of the target DNA, which is obtained with adequate purity, and with a performance equivalent to that of commercial magnetic purification kits. The quality of the extracted DNA allows its use in regular molecular biology protocols, such as Polymerase Chain Reaction (PCR). We further explored the use of nanocomposites for direct bacterial capture in aqueous suspensions. In turn, PVDF/PEDOT membranes were used for the removal of the methyl orange azodye, when we performed kinetic and thermodynamic studies of adsorption, as well as their use in filtration systems. The analysis revealed that the membranes have good adsorption capacity, excellent chemical and mechanical stability, and can be used in at least 20 adsorption/desorption cycles without loss of adsorptive capacity, with an increase in capacity being observed with increasing temperature. Finally, composite organic electrodes, which we prepared by incorporating carbon and PEDOT nanostructures in eggshell membranes, were used to produce flexible solid phase supercapacitor devices that exhibit hybrid capacitance (i.e., capacitance of double layer and pseudocapacitance). The electrochemical results showed that the devices had good capacitance, low internal resistance, high capacitive retention, good cyclability and mechanical stability. In addition, we observed that the size of nanostructures has a direct influence on the capacitance of the devices.

Keywords: polyaniline; PEDOT; magnetic nanocomposites; DNA purification; environmental remediation; organic supercapacitor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do monômero tiofeno a). Primeira rota sintética (reação de condensação) do politiofeno b). Estrutura geral dos derivados poli(3-alkil-tiofeno)s c) e poli(3-alkil-oxi-tiofeno)s. Adaptado de [16]	39
Figura 2 –	Estrutura química do politiofeno em seus diferentes estados de oxidação: na forma neutra (não condutora) a), e após a formação de um pólaron b) e um bipólaron c)	40
Figura 3 –	Estrutura química do monômero EDOT a). Estruturas químicas do PEDOT em seus diferentes estados de oxidação: na forma neutra (não condutora) i) e com a formação de um pólaron ii) e um bipólaron iii) (formas condutoras)	42
Figura 4 –	Estrutura química da polianilina em seus estados de oxidação, representados também com as respectivas cores observadas devido ao efeito eletrocromico (mudança da cor de acordo com estímulos eletroquímicos) que a mesma apresenta: a) leucoesmeraldina, b) base esmeraldina, c) pernigranilina, e d) sal esmeraldina	43
Figura 5 –	Estrutura química das bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos	45
Figura 6 –	Estrutura do DNA, a) fita simples com sua ligação fosfodiéster, b) dupla hélice	46
Figura 7 –	Representação convencional de um DNA plasmídeo	48
Figura 8 –	Processo de transferência de horizontal de informação genética entre bactérias: a) transferência de plasmídeo não-conjuntivo junto ao conjuntivo, b) transferência sexuada (pili) de material genético por plasmídeo conjuntivo	49
Figura 9 –	Representação esquemática das principais etapas da PCR	56
Figura 10 –	Esquema ilustrativo das principais etapas em um protocolo de eletroforese em gel de agarose para a identificação da integridade e tamanho de fragmentos de DNA	59
Figura 11 –	Equipamentos e acessórios que compõem um sistema de eletroforese de configuração horizontal	60
Figura 12 –	Distribuição dos patótipos de <i>Escherichia coli</i>	62

Figura 13 –	Esquema básico do processo de eletrofiação e aparato experimental de sistema de eletrofiação com configuração horizontal	64
Figura 14 –	Esquema ilustrativo de um dispositivo de armazenamento eletrolítico baseado no mecanismo de EDLC	67
Figura 15 –	Esquema representativo dos diferentes mecanismos de armazenamento pseudocapacitivos: eletrossorção a), intercalação b) e oxirredução c)	69
Figura 16 –	Representação esquemática das principais etapas da síntese por fase-vapor do nanocompósito γ -NPs/PEDOT	75
Figura 17 –	Procedimento de preparação das amostras (γ -NPs e γ -NPs/PEDOT) para MEV	76
Figura 18 –	Representação esquemática das principais etapas do protocolo de purificação de DNA a partir de amostras de sangue total humano	83
Figura 19 –	Diagrama do procedimento executado (ciclagem) para a amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real para as amostras de DNA purificadas com o γ -NPs/PEDOT	86
Figura 20 –	Protocolo de cultivo celular de <i>E. coli</i> para obtenção de amostras e controle de concentração por densidade ótica DO ₆₀₀	90
Figura 21 –	Espectros infravermelho das γ -NPs a) e do nanocompósito γ -NPs/PEDOT b)	93
Figura 22 –	Micrografias das γ -NPs a) e do nanocompósito γ -NPs/PEDOT b), obtidas por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 200 kX	94
Figura 23 –	Histograma de distribuição de tamanho de partículas para o caso das γ -NPs (em vermelho), e para o nanocompósito γ -NPs/PEDOT (em azul)	94
Figura 24 –	Curvas de magnetização à temperatura ambiente (293 K) para as γ -NPs a) e o nanocompósito γ -NPs/PEDOT b)	95

Figura 25 –	Espectros UV-Vis para a solução de DNA de esperma de salmão antes (linha contínua), e depois de interagir por 10 min com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT (linha tracejada). Em detalhe, a variação da intensidade de fluorescência da solução de DNA marcada com o corante Sybr Green, antes e depois da interação com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT	97
Figura 26 –	Gráfico da porcentagem de adsorção de DNA de esperma de salmão em função do pH da solução de ligação (Glicina – HCl)	98
Figura 27 –	Eletroforese em gel de agarose (1%) do DNA Ladder antes a) e após passar pelo protocolo de adsorção/dessorção do γ -NPs/PEDOT b)	99
Figura 28 –	Cinética do processo de adsorção do DNA de esperma de salmão pelos nanocompósitos γ -NPs/PEDOT	100
Figura 29 –	Efeito da concentração inicial de DNA sobre a quantidade percentual de adsorção (●) e capacidade de adsorção q_e (■) do γ -NPs/PEDOT ..	101
Figura 30 –	Ajustes lineares dos dados experimentais de adsorção de DNA com os modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b)	103
Figura 31 –	Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha contínua), e Freundlich (linha tracejada) aos dados experimentais (●) de adsorção de DNA de esperma de salmão pelos γ -NPs/PEDOT	104
Figura 32 –	Ajustes lineares dos dados experimentais de adsorção de DNA segundo os modelos cinéticos de PSO a), PSO b), e MW c)	106
Figura 33 –	Ajuste dos modelos cinéticos de PSO (linha contínua) e MW (linha tracejada) aos dados experimentais (●) para adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT	107
Figura 34 –	Figura 2.19 – Espectros de UV-Vis para a solução de DNA inicial (linha tracejada), e após 10 min de interação pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT (linha pontilhada). Na linha contínua, o espectro UV-Vis para a solução de eluição após 5 min de interação. No detalhe, percentuais encontrados para as taxas de adsorção e dessorção	108
Figura 35 –	Aumento da concentração de DNA de esperma de salmão em fase líquida em função do volume da solução de eluição utilizado	109

Figura 36 –	Eficiência (%) do nanocompósito γ -NPs/PEDOT quando usado ciclos consecutivos de adsorção/dessorção de DNA de esperma de salmão	110
Figura 37 –	Variação de potencial zeta do nanocompósito γ -NPs/PEDOT em função do pH da solução de ligação (Glicina – HCl)	111
Figura 38 –	Mecanismo de interação proposto para a adsorção de DNA pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT	113
Figura 39 –	Espectros UV-Vis para amostras de DNA purificado a partir de sangue total humano utilizando o nanocompósito γ -NPs/PEDOT como adsorvente de fase sólida. Em detalhe, resultado do experimento de eletroforese em gel de agarose (1%) para as mesmas amostras	117
Figura 40 –	Variação do rendimento (●) e da razão 260/280 (■) como função do pH da solução de ligação para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano	118
Figura 41 –	Resultados de eletroforese em gel de agarose (1%) para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano para diferentes valores de pH da solução de ligação	119
Figura 42 –	Variação do rendimento (●) e da razão 260/280 (■) da amostra de DNA em função do volume inicial de sangue humano	120
Figura 43 –	Variação da concentração (●) e rendimento (■) da amostra de DNA como função do volume da solução de eluição utilizado	121
Figura 44 –	Evolução do rendimento de DNA purificado após múltiplas eluições para uma mesma adsorção	122
Figura 45 –	Curva de amplificação PCR em tempo real para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano com o nanocompósito γ - NPs/PEDOT. Em a) para amostras de DNA eluídas, e b) para o nanocompósito adicionado diretamente ao meio reacional (mastermix)	124
Figura 46 –	Espectros UV-Vis para as amostras de DNA eluída (a), e do nanocompósito adicionado na reação (b) após a amplificação PCR	125

Figura 47 –	Eletroforese em gel de agarose (1%) após PCR para as amostras de DNA eluída (b-c), e para a amostra de nanocompósito adicionado diretamente à reação PCR (d-e). em a) o padrão de comparação	126
Figura 48 –	Comparação do rendimento do DNA obtido pelo uso do nanocompósito γ -NPs/PEDOT com o de kits comerciais de purificação magnética de DNA a partir de amostras de sangue total humano	127
Figura 49 –	Eletroforese em gel de agarose (1%) para amostras de DNA após a purificação com o γ -NPs/PEDOT b), e os diferentes kits comerciais; Maxwell a), MagAttract c), MagaZorb d), e Dynabeads e). e posteriormente à amplificação PCR; Maxwell g), MagaZorb h), γ -NPs/PEDOT i), MagAttract j), e Dynabeads k)	128
Figura 50 –	Rendimento de amostras de DNA purificado a partir de sangue total humano com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT em função do tempo de prateleira	129
Figura 51 –	Espectros UV-Vis para amostras de DNA purificado a partir de <i>E. coli</i> utilizando o nanocompósito γ -NPs/PEDOT como adsorvente de fase sólida. Em detalhe, eletroforese em gel de agarose (1%) para as mesmas amostras	131
Figura 52 –	– Rendimento (●) e da razão 260/280 (■) da amostra de DNA em função do volume inicial da suspensão de <i>E. coli</i> . Em detalhe, rendimento de DNA purificado para múltiplas eluições para o volume de 1 mL de amostra inicial de <i>E. coli</i>	132
Figura 53 –	Eletroforese em gel de agarose (1%) para amostras de DNA após a purificação com os volumes de suspensão de <i>E. coli</i> ; a) 2 mL, b) 1 mL, c) 500 μ L, e 250 μ L. e posteriormente à amplificação PCR (em duplicata, f) e g)) da amostra obtida a partir do volume de 1 mL de suspensão de <i>E. coli</i> . Em h) temos o controle negativo	133
Figura 54 –	Representação esquemática das principais etapas do processo de preparação das membranas de PVDF/PEDOT.....	142
Figura 55 –	Representação esquemática da montagem experimental para os estudos de adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT em modo batelada	143

Figura 56 –	Representação esquemática da configuração experimental adotada para os estudos de filtração	146
Figura 57 –	Micrografias das membranas de PVDF pura a) e com a superfície modificada com PEDOT b). Em c) é apresentado o histograma do diâmetro das fibras de PVDF pura	148
Figura 58 –	Estudo de cinética de polimerização da camada PEDOT na membrana de PVDF. Em detalhe, a membrana de PVDF antes e depois da polimerização do PEDOT	149
Figura 59 –	Figura 3.6 – Imagens de medidas de ângulo para as membrana de PVDF pura a) e as membranas de PVDF/PEDOT b)	151
Figura 60 –	Membranas de PVDF e PVDF/PEDOT submersas em água antes a) e depois de 10 segundo em banho ultrassônico b)	151
Figura 61 –	Espectros UV-Vis - NIR para as membranas de PVDF a) e PVDF/PEDOT	153
Figura 62 –	Espectros infravermelho das membranas de PVDF a) e PVDF/PEDOT a)	154
Figura 63 –	Espectros de UV-Vis da solução de MO após 2 h de interação com as membranas de PVDF a) e PVDF/PEDOT b)	155
Figura 64 –	Efeito do pH do meio na porcentagem de remoção do corante MO pela membrana PVDF/PEDOT	156
Figura 65 –	Efeito do tempo de interação na porcentagem de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT para diferentes concentrações iniciais de corante: a) 1 mg/L, b) 5 mg/L, c) 10 mg/L, d) 15 mg/L, e) 20 mg/L, f) 30 mg/L e 40 mg/L	158
Figura 66 –	Efeito da concentração inicial de MO sobre a porcentagem (%) e capacidade de remoção (mg/g) da membrana PVDF/PEDOT	159
Figura 67 –	Ajustes lineares dos modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados experimentais de adsorção de MO das membranas de PVDF/PEDOT	160
Figura 68 –	Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha contínua), e Freundlich (linha tracejada) junto aos dados experimentais de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT (●)	161

Figura 69 –	Ajustes lineares dos dados experimentais de remoção de MO com os modelos cinéticos de PSO a), PSO b), e MW c)	162
Figura 70 –	Ajustes dos modelos cinéticos de adsorção de PSO (linha contínua) junto aos dados experimentais (●) de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT	163
Figura 71 –	Efeito da temperatura sobre a capacidade de remoção das membranas de PVDF/PEDOT para diferentes concentrações iniciais de MO	164
Figura 72 –	Ajustes lineares do modelo de isoterma Langmuir para o processo de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT à temperatura de 10 a), 20 b), 30 c) e 50 °C d)	165
Figura 73 –	Ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir em função da temperatura (em Kelvin) de adsorção	166
Figura 74 –	Porcentagem de adsorção e dessorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT em ciclos sucessivos de reutilização	168
Figura 75 –	Efeito do modo de utilização das membranas de PVDF/PEDOT na cinética remoção de MO. Em modo batelada a) e filtração do tipo dead-end b)	169
Figura 76 –	Espectros UV-Vis antes e depois da interação com as membranas de PVDF/PEDOT para as diferentes misturas entre corantes aniônicos e catiônicos. Em detalhe é apresentada a imagem com a coloração das misturas de corantes antes e depois da interação	175
Figura 77 –	Esquema ilustrativo do mecanismo de interação proposto entre as membranas de PVDF/PEDOT e o corante MO	176
Figura 78 –	Sequência esquemática da síntese do nanocompósito γ -NP/Pani	183
Figura 79 –	Procedimento de preparação das amostras (γ -NP e γ -NP/Pani) para MET	185
Figura 80 –	Representação esquemática do experimento de captura de <i>E. coli</i> em solução aquosa utilizando os γ -NP/Pani	187
Figura 81 –	Esquema representativo das principais etapas do protocolo de lise alcalina celular para bactérias Gram-negativas	189
Figura 82 –	Esquema ilustrativo das etapas do protocolo de purificação de pDNA utilizando os γ -NP/Pani como adsorvente	191

Figura 83 –	Diagrama do procedimento executado para a amplificação por reação em cadeia da polimerase para as amostras de pDNA purificadas com o γ -NP/Pani e com o kit comercial	193
Figura 84 –	Espectros UV-Vis da Pani (a), do nanocompósito γ -NP/Pani (b), e da γ -NP (c)	195
Figura 85 –	Espectros infravermelho da polianilina a), γ -NP b), e do nanocompósito γ -NP/Pani c)	196
Figura 86 –	Micrografias do nanocompósito γ -NP/Pani obtidas por MEV a), e TEM b)	198
Figura 87 –	Histograma de distribuição de tamanho de partículas do nanocompósito γ -NP/Pani obtido por DLS	199
Figura 88 –	Curva de magnetização da γ -NP a), e do nanocompósito γ -NP/Pani b) em função do campo externo aplicado	200
Figura 89 –	Contagem em placa de unidades formadoras de colônias (UFC) em função da massa de γ -NP/Pani utilizada para a captura. No detalhe, a densidade ótica (600 nm) das suspensões de <i>E. coli</i> após 10 min de interação com as diferentes massas de γ -NP/Pani	202
Figura 90 –	Suspensão de <i>E. coli</i> antes (controle), e após interagir com as diferentes massas de γ -NP/Pani	204
Figura 91 –	Placas semeadas com a solução controle e com as soluções submetidas à captura com as massas de 6,25 mg e 50 mg	205
Figura 92 –	Espectro de absorção do pDNA purificado com o γ -NP/Pani. No detalhe, antes a), e depois b) da purificação com o γ -NP/Pani	206
Figura 93 –	Espectro de absorção das amostras de pDNA amplificadas por PCR para as amostras purificadas com o γ -NP/Pani a), e com o kit comercial b)	207
Figura 94 –	Eletroforese em gel de agarose (1%) das amostras de pDNA amplificadas por PCR para amostras purificadas com o γ -NP/Pani a), e com o kit comercial b)	208
Figura 95 –	Esquema ilustrativo das principais etapas do processo de funcionalização ácida dos nanotubos de carbono	216

Figura 96 –	Representação esquemática das principais etapas da preparação dos eletrodos flexíveis baseados em MCO/NECs/PEDOT	217
Figura 97 –	Sequência esquemática do método adotado para a fabricação dos dispositivos supercapacitores flexíveis de estado sólido	219
Figura 98 –	Esquema ilustrativo da configuração experimental adotada para a caracterização eletroquímica de dispositivos	220
Figura 99 –	Imagens dos eletrodos em diferentes estágios de fabricação: MCO pura a), após a incorporação das NECs por meio de banho ultrassom b), e em seu estado final após o recobrimento com PEDOT via polimerização em fase-vapor c)	222
Figura 100 –	Espectros de FTIR das amostras de MCO pura a), após a incorporação de MWCNT (MCO/MWCNT) b), e depois do revestimento com PEDOT por meio da polimerização fase-vapor (MCO/MWCNT/PEDOT) c)	223
Figura 101 –	Espectros Raman dos eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/GNP/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/FWCNT/PEDOT d)	224
Figura 102 –	Micrografias eletrônicas de varredura da membrana MCO em diferentes ampliações	225
Figura 103 –	Micrografias das membranas MCO após a incorporação dos nanotubos de carbono de poucas camadas (MCO/FWCNT) a) e b), nanotubos multicamadas (MCO/MWCNT) c) e d), e os nanopellets de grafeno (MCO/GNP) e) e f)	226
Figura 104 –	Micrografias das membranas MCO após incorporação da incorporação das NECs e a polimerização PEDOT: MCO/PEDOT a) e b), MCO/FWCNT/PEDOT c) e d), MCO/MWCNT/PEDOT e) e f), e MCO/GNP/PEDOT g) e h)	228
Figura 105 –	Histogramas do diâmetro das fibras MCO puras a) e para os eletrodos MCO/FWCNT/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d)	228

Figura 106 –	Voltametria cíclica em diferentes taxas de varredura para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/FWCNT/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d)	229
Figura 107 –	Curvas de voltametria cíclica com uma taxa de varredura de 50 mV.s ⁻¹ para os dispositivos preparados com os diferentes eletrodos	231
Figura 108 –	Curvas galvanométricas obtidas a diferentes valores de corrente para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/FWCNT/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d)	232
Figura 109 –	Curvas galvanométricas obtidas com corrente de 0,3 mA para os dispositivos preparados com os diferentes eletrodos	233
Figura 110 –	Impedância elétrica dos dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/MWCNT/PEDOT b), MCO/FWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d)	234
Figura 111 –	Capacitância elétrica em função da densidade de corrente aplicada a), e o diagrama de Ragone para os dispositivos SCs preparados com os diferentes eletrodos baseados em MCO/NECs/PEDOT	235
Figura 112 –	Estudos de estabilidade dos dispositivos SC preparados com eletrodos MCO/GNP/PEDOT; a) eficiência de retenção da capacitância, e b) variação da impedância após 2000 ciclos de carga/descarga	238
Figura 113 –	Variação da resistência elétrica dos dispositivos SCs MCO/GNP/PEDOT quando submetido a 2000 ciclos consecutivos de dobramento de 0 a 180°. Em detalhe, o dispositivo SCs de MCO/GNP/PEDOT em sua configuração (0°) normal e dobrado (180°)	239
Figura 114 –	Sequência esquemática da síntese por co-precipitação das nanopartículas de óxido de ferro (γ -NPs)	289
Figura 115 –	Aspecto visual das γ -NPs sintetizadas pelo método de co-precipitação	291
Figura 116 –	Esquema ilustrativo dos principais eventos da oxidação do Fe ²⁺ para Fe ³⁺ em nanopartículas de magnetita	292
Figura 117 –	Espectro de absorção UV-Vis das γ -NPs	293

Figura 121 –	Histograma de distribuição de tamanhos de partículas das γ -NPs obtidos das micrografias de MEV com auxílio do software ImageJ.....	298
Figura 122 –	Curva de magnetização das γ -NPs à temperatura ambiente	299
Figura 123 –	Esquema ilustrativo do fenômeno de superparamagnetismo	301

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estrutura e condutividade dos principais polímeros condutores	36
Tabela 2 –	Influência dos principais parâmetros de Eletrofiação na morfologia das fibras eletrofiadas. Adaptado de [109]	65
Tabela 3 –	Propriedades dos reagentes utilizados	74
Tabela 4 –	Parâmetros das isoterma de Langmuir e Freundlich para adsorção de DNA pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT	104
Tabela 5 –	Parâmetros cinéticos para adsorção de DNA pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT	106
Tabela 6 –	Comparação do nanocompósito γ -NPs/PEDOT com outros adsorventes magnéticos de DNA	115
Tabela 7 –	Parâmetros calculados das isotermas de Langmuir e Freundlich para adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT	160
Tabela 8 –	Parâmetros cinéticos de adsorção de MO pelos tapetes PVDF-PEDOT para os modelos de PPO, PSO e MW	162
Tabela 9 –	Parâmetros termodinâmicos para adsorção de MO com as membranas PVDF/PEDOT	166
Tabela 10 –	Comparação de diferentes propriedades adsorptivas das membranas de PVDF/PEDOT com outros adsorventes de MO reportados na literatura	172
Tabela 11 –	Comparação da posição em cm^{-1} entre os picos de absorção IR obtidos para a Pani, γ -NP, e o nanocompósito γ -NP/Pani	197
Tabela 12 –	Área de superfície BET para a MCO pura e modificada com diferentes NECs	227
Tabela 13 –	Comparação dos SC CMO/PEDOT modificados com nanoestruturas de carbono com outros SCs baseados em PEDOT relatados na literatura.....	241
Tabela 14 –	Classificação dos diferentes óxidos de ferro relatados na literatura. Adaptado de (2017)	286
Tabela 15 –	Propriedades dos reagentes utilizados nas sínteses	288
Tabela 16 –	Resultados dos cálculos das distâncias interplanares d_{hkl} , e o parâmetro de rede	296

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Acetona
APS	Persulfato de amônia
cDNA	DNA complementar
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CR	Vermelho do congo
CV	Voltametria cíclica
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO₆₀₀	Densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm
dsDNA	DNA de fita dupla
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDLC	Capacitância de dupla camada
EDOT	2,4 – etilodioxitiofeno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF	Técnica de Eletrofiação
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
FWCNT	Nanotubos de carbono de poucas camadas
GCD	Carga/descarga galvanostática
GNP	Nanopellets de Grafeno
IC	Índigo carmim
MB	Azul de metileno
MCO	Membrana de casca de ovo
MCO/FWCNT/PEDOT	Eletrodos orgânicos modificados com nanotubos de carbono de poucas camadas e PEDOT
MCO/GNP/PEDOT	Eletrodos orgânicos modificados com nanopellets de grafeno e PEDOT
MCO/MWCNT/PEDOT	Eletrodos orgânicos modificados com nanotubos de carbono multicamadas e PEDOT

MCO/NEC	Membrana de casca de ovo com nanoestruturas de carbono incorporadas
MCO/NEC/PEDOT	Eletrodos orgânicos modificados com nanoestruturas de carbono e PEDOT
MCO/PEDOT	Eletrodos orgânicos modificados com PEDOT
MEF	Membranas eletrofiadas
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Alaranjado de metila
Ms	Magnetização de saturação
MW	Morris-Weber
MWCNT	Nanotubos de carbono multicamadas
NEC	Nanoestruturas de carbono
NTC	Nanotubos de carbono
OMS	Organização Mundial da saúde
Pani	Polianilina
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDNA	DNA plasmídeo
PEDOT	Poli (3,4 – etilenodioxitiofeno)
PEH	Plano externo de Helmholtz
PICs	Polímeros intrinsecamente condutores
PIH	Plano interno de Helmholtz
PPO	Pseudo-Primeira Ordem
PSO	Pseudo-Segunda Ordem
PSS	Poliestireno sulfonato
PTh	Politiofeno
PVA	Poli(álcool vinílico)
PVDF	poli(fluoreto de vinilideno)
PVDF/PEDOT	Membranas compósitas de PVDF modificada com PEDOT
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RB	Rodamina B

RNA	Ácido ribonucleico
RNase A	Enzima ribonuclease A
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase
SC	Supercapacitor
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ssDNA	DNA de fita simples
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TB	Azul de toluidina
THF	Tetrahidrofurano
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

% Ads	Porcentagem de adsorção
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia
θ_c	Ângulo de contato
γ-NPs	Nanopartículas magnéticas de maghemita
γ-NPs/PEDOT	Nanocompósito magnético maghemita revestida com PEDOT
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	32
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	35
2.1	POLÍMEROS CONDUTORES	35
2.1.1	Politiofenos	37
2.1.1.1	Poli (3,4-etilenodioxitiofeno)	40
2.1.2	Polianilina	42
2.2	ÁCIDOS NUCLÉICOS	44
2.2.1	DNA plasmídeo	47
2.2.2	Quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria	50
2.2.3	Métodos de purificação de ácidos nucleicos	52
2.3	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	54
2.4	ELETROFORESE	58
2.5	ESCHERICHIA COLI	61
2.6	ELETROFIAÇÃO	62
2.7	CAPACITÂNCIA DE DUPLA CAMADA	66
2.8	PSEUDOCAPACITÂNCIA	68
3	SÍNTESE DO NANOCOMPÓSITO γ-Fe₂O₃/PEDOT E SUA APLICAÇÃO PARA A PURIFICAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	71
3.1	MOTIVAÇÃO	71
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	73
3.2.1	Materiais	73
3.2.2	Síntese do nanocompósito magnético γ-NPs/PEDOT	74
3.2.3	Métodos de caracterização	75
3.2.3.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	75
3.2.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	76
3.2.3.3	Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM)	77
3.2.4	Uso do nanocompósito γ-NPs/PEDOT como adsorvente de fase sólida de DNA	77
3.2.4.1	Experimentos de adsorção	77

3.2.4.1.1	<i>Influência do pH</i>	77
3.2.4.1.2	<i>Influência do tempo de interação</i>	78
3.2.4.1.3	<i>Influência da concentração inicial de DNA e capacidade de adsorção</i>	78
3.2.4.1.4	<i>Experimento de dessorção</i>	79
3.2.4.1.5	<i>Experimento de concentração de amostras de DNA</i>	80
3.2.4.1.6	<i>Experimento de reutilização</i>	81
3.2.4.2	Purificação de DNA de amostras de sangue total	81
3.2.4.2.1	<i>Efeito do pH da solução de ligação</i>	83
3.2.4.2.2	<i>Efeito do volume inicial da amostra</i>	83
3.2.4.2.3	<i>Efeito do volume de eluição</i>	84
3.2.4.2.4	<i>Estudo de inibição da reação PCR</i>	84
3.2.4.2.4.1	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	86
3.2.4.2.5	<i>Estudo comparativo com kits comerciais</i>	88
3.2.4.3	Purificação de DNA total de células bacterianas	88
3.2.4.3.1	<i>Cultivo celular da Escherichia coli</i>	89
3.2.4.3.2	<i>Protocolo de purificação</i>	90
3.2.4.3.3	<i>Estudos do efeito de volume usado de amostra bacteriana</i>	92
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	92
3.3.1	Caracterização do nanocompósito magnético γ -NPs/PEDOT	92
3.3.2	Uso do nanocompósito como material adsorvente de ácidos nucleicos	96
3.3.2.1	Estudos de adsorção em sistema modelo	96
3.3.2.1.1	<i>Influência do pH</i>	97
3.3.2.1.2	<i>Influência do tempo de interação</i>	99
3.3.2.1.3	<i>Influência da concentração inicial de DNA</i>	100
3.3.2.1.4	<i>Isotermas de adsorção</i>	101
3.3.2.1.5	<i>Cinéticas de adsorção</i>	104
3.3.2.1.6	<i>Dessorção de DNA</i>	107
3.3.2.1.7	<i>Concentração de DNA em amostras líquidas</i>	108
3.3.2.1.8	<i>Reutilização dos γ-NPs/PEDOT</i>	109
3.3.2.1.9	<i>Sobre os mecanismos de interação entre o γ-NPs/PEDOT e cadeias de DNA</i>	110

3.3.2.1.10	<i>Comparação do uso das γ-NPs/PEDOT com outros adsorventes de DNA</i>	113
3.3.2.2	Estudos da adsorção de DNA a partir de amostras biológicas complexas	116
3.3.2.2.1	Amostras de sangue total	116
3.3.2.2.1.1	<i>Efeito do pH da solução ligação</i>	117
3.3.2.2.1.2	<i>Efeito do volume inicial da amostra</i>	119
3.3.2.2.1.3	<i>Efeito do volume de eluição</i>	120
3.3.2.2.1.4	<i>Ensaio de biologia molecular (qPCR)</i>	122
3.3.2.2.1.5	<i>Estudo comparativo com kits comerciais</i>	126
3.3.2.2.2	Amostras de bactérias	130
3.3.2.2.2.1	<i>Estudo do volume de amostra bacteriana</i>	131
3.4	CONCLUSÕES	133
4	PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS DE PVDF/PEDOT ELETROFIADAS E SEU USO PARA A REMOÇÃO DE CORANTES EM MEIOS AQUOSOS	136
4.1	MOTIVAÇÃO	136
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	140
4.2.1	Materiais	140
4.2.2	Preparação das membranas de PVDF/PEDOT	140
4.2.3	Métodos de caracterização	142
4.2.4	Experimentos de adsorção	143
4.2.5	Experimentos de termodinâmica	144
4.2.6	Experimentos de dessorção e reutilização	145
4.2.7	Experimentos de filtração	145
4.2.8	Experimentos de seletividade	146
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	147
4.3.1	Caracterização das membranas de PVDF/PEDOT	147
4.3.1.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	147
4.3.1.2	Medidas de ângulo de contato	149
4.3.1.3	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	152
4.3.1.4	Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	153
4.3.2	Estudos de adsorção	154

4.3.2.1	Influência do pH	155
4.3.2.2	Influência da concentração inicial de MO e do tempo de interação	157
4.3.2.3	Isotermas de adsorção	159
4.3.2.4	Cinética de adsorção	161
4.3.2.5	Estudos termodinâmicos	163
4.3.2.6	Estudos da reutilização das membranas de PVDF/PEDOT	167
4.3.2.7	Estudos da remoção de MO a partir de sistemas de filtração	168
4.3.2.8	Comparação com outros adsorventes de MO	170
4.3.2.9	Estudos de seletividade e mecanismo de interação	174
4.4	CONCLUSÃO	176
5	USO DE NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO	179
	γ-Fe₂O₃/PANI PARA PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMÍDEO	
5.1	MOTIVAÇÃO	179
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	182
5.2.1	Materiais	182
5.2.2	Síntese do nanocompósito magnético de polianilina e maghemita	182
	(γ – NP/Pani)	
5.2.3	Métodos de caracterização	184
5.2.3.1	Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	184
5.2.3.2	Espectroscopia FTIR, microscopia MEV, e medidas magnéticas	184
5.2.3.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	184
5.2.3.4	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	185
5.2.4	Aplicação do nanocompósito γ-NP/Pani para a captura de <i>E. coli</i>	185
	e purificação de pDNA	
5.2.4.1	Captura de <i>E. coli</i> em meios aquosos	186
5.2.4.1.1	<i>Cultivo celular da E. coli</i>	186
5.2.4.1.2	<i>Experimentos de captura de E. coli</i>	186
5.2.4.2	Experimentos de purificação de pDNA	188
5.2.4.2.1	<i>Protocolo de lise celular</i>	188
5.2.4.2.2	<i>Protocolo de purificação de pDNA</i>	190
5.2.4.2.3	<i>Protocolo de PCR convencional</i>	191
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	193
5.3.1	Síntese do nanocompósito γ-NP/Pani	193

5.3.1.1	Caracterizações	193
5.3.1.1.1	<i>Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)</i>	193
5.3.1.1.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)</i>	195
5.3.1.1.3	<i>Microscopia eletrônica: Varredura e Transmissão (MEV, MET)</i>	197
5.3.1.1.4	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	198
5.3.1.1.5	<i>Propriedades magnéticas</i>	199
5.3.2	Aplicação do nanocompósito γ-NP/Pani para a captura de <i>E. coli</i> e purificação de pDNA	200
5.3.2.1	Uso do nanocompósito γ -NP/Pani na captura de <i>E. coli</i> em meios aquosos	200
5.3.2.2	Uso do Nanocompósito γ -NP/Pani na purificação de pDNA	205
5.3.4	Mecanismo de interação	209
5.4	CONCLUSÕES	209
6	PREPARAÇÃO DE ELETRODOS ORGÂNICOS FLEXÍVEIS DE PEDOT/NANOESTRUTURAS DE CARBONO E E SUA APLICAÇÃO EM SUPERCAPACITORES	211
6.1	MOTIVAÇÃO	211
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	213
6.2.1	Materiais	214
6.2.2	Funcionalização dos nanotubos	215
6.2.3	Preparação do substrato de COM	216
6.2.3.1	Incorporação das NECs e polimerização com PEDOT	216
6.2.4	Fabricação dos SC com eletrodos MCO/NEC/PEDOT e MCO/PEDOT	218
6.2.5	Métodos de caracterização	219
6.2.5.1	Caracterização dos eletrodos MCO/NEC/PEDOT	219
6.2.5.2	Caracterização eletroquímica dos dispositivos SCs	219
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	221
6.3.1	Caracterização dos eletrodos MCO/NEC/PEDOT	221
6.3.2	Caracterização eletroquímica dos SC baseados em MCO/NEC/PEDOT	229
6.3.2.1	Testes de ciclabilidade e estabilidade mecânica	236
6.3.3	Comparação com dispositivos relatados na literatura	239

6.4	CONCLUSÃO	243
7	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	245
	REFERÊNCIAS	
	APÊNDICE A – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO (γ -Fe ₂ O ₃)	
	APÊNDICE B – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO UTILIZADAS NOS CAPÍTULOS 3 E 5	
	APÊNDICE C – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O DOUTORADO	
	APÊNDICE D – AGRADECIMENTOS INFORMAIS	

1 INTRODUÇÃO

No presente manuscrito serão apresentados os resultados obtidos ao longo de meu trabalho de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais (PGMTR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os trabalhos aqui discutidos foram desenvolvidos no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física (DF) da UFPE, sendo parte realizado em colaboração com o Laboratório de Espectroscopia de Impedância e Materiais Orgânicos da UNIVASF, situado no campus de Juazeiro.

A finalidade deste trabalho foi o desenvolvimento de nanomateriais baseados em polímeros condutores, nanopartículas magnéticas, membranas poliméricas e nanoestruturas de carbono e suas aplicações em protocolos de purificação magnética de biomoléculas, na adsorção de contaminantes ambientais, e na preparação de dispositivos orgânicos flexíveis para o armazenamento de energia.

Deste modo, para alcançar nossos objetivos gerais, fixamos os seguintes objetivos específicos:

- Funcionalizar a superfície de nanopartículas magnéticas (γ -NPs, γ -Fe₂O₃) com os polímeros condutores (γ -NPs γ -Fe₂O₃) com os polímeros condutores poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) e polianilina (Pani), utilizando as rotas de polimerização em fase-vapor e emulsão, respectivamente.
- Preparar membranas poliméricas de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) a partir da técnica de eletrofiliação e realizar a modificação de sua superfície com o PEDOT.
- Preparar eletrodos orgânicos flexíveis a partir da incorporação de nanoestruturas de carbono e poli(3,4-etilenodioxitiofeno) em membranas proteicas naturais de casca de ovo.
- Caracterizar os diferentes materiais nanoestruturados desenvolvidos quanto as suas propriedades químicas, morfológicas, magnéticas, elétricas, de molhabilidade através das técnicas de espectroscopias no infravermelho (FTIR), ultravioleta-visível (UV-Vis) e Raman, microscopias eletrônica de varredura e transmissão (MEV, MET), medidas de ângulo de contato, magnetização, voltametria, galvanometria, e impedância elétrica.

- Estabelecer os melhores parâmetros físico-químicos e cinéticos de adsorção de DNA a partir de sistemas modelos (meio aquoso) para os nanocompósitos magnéticos baseados em polímeros condutores.
- Desenvolver protocolos de purificação magnética de DNA a partir de amostras biológicas complexas como sangue humano e microrganismos (bactérias), fazendo uso dos nanocompósitos γ -NPs/PEDOT e γ -NPs/Pani como materiais adsorventes de fase sólida.
- Avaliar a eficácia das membranas poliméricas de PVDF/PEDOT como adsorvente para a recuperação de corantes dissolvidos em meios aquosos.
- Estudar a capacidade de recuperação do alaranjado de metila em função de parâmetros físico-químicos, cinéticos e termodinâmicos.
- Preparar dispositivos supercapacitores de estado sólido simétricos a partir dos eletrodos orgânicos flexíveis a base de membrana de casca de ovo, nanoestruturas de carbono e PEDOT.
- Realizar estudos eletroquímicos dos supercapacitores por meio de medidas de voltametria, galvanometria e impedância elétrica a fim de determinar a influência das diferentes estruturas de carbono na capacitância e resistência interna dos dispositivos.
- Investigar o desempenho dos dispositivos supercapacitores quanto a estresse mecânico por meio de sucessivos ciclos de dobramento.

A presente tese está organizada em 6 capítulos, que foram distribuídos da seguinte forma:

- ✓ No Capítulo 2 são apresentados os conceitos básicos acerca de tópicos de relevância com respeito aos polímeros condutores, ácidos nucleicos, métodos de purificação de DNA, técnicas de biologia molecular, e princípios relacionados a produção de membranas poliméricas e mecanismos eletroquímicos de armazenamento de energia, visando uma melhor compreensão das metodologias e dos resultados descritos nos capítulos posteriores. Os conceitos apresentados nesse capítulo não formam em si uma unidade, por abordarem os trabalhos de desenvolvimento de diferentes materiais e aplicações ao longo da tese; no entanto, por questões de organização e simplicidade, decidimos mesmo assim reunir esses tópicos dessa forma.

- ✓ No Capítulo 3 são descritos os procedimentos experimentais empregados para a preparação e a caracterização de um novo nanocompósito magnético de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PEDOT}$ e sua aplicação para a purificação de DNA total em amostras de sangue humano e bactérias Gram-negativas. Além disso, é apresentado ainda um estudo comparativo entre o uso do nanocompósito e de diferentes kits comerciais de purificação magnética de DNA.
- ✓ No Capítulo 4 são apresentados a preparação, caracterização e os procedimentos experimentais para a obtenção das membranas eletrofiadas de PVDF/PEDOT, bem como os resultados dos ensaios de remoção do azocorante laranja de metila.
- ✓ No Capítulo 5 abordamos a preparação e caracterização do nanocompósito magnético $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pani}$, assim como sua aplicação para a purificação de DNA plasmídeo a partir de amostras de bactérias Gram-negativas (*E. coli*). Serão também apresentados resultados preliminares sobre o potencial de seu uso em captura de células bacterianas suspensas em meios aquosos.
- ✓ Já no Capítulo 6 dissertamos sobre as metodologias experimentais adotadas para a preparação de eletrodos orgânicos flexíveis pelo uso de compósitos de membranas proteicas de casca de ovo, nanotubos de carbono, nanoplacas de grafeno e PEDOT, assim como seu uso na produção de dispositivos supercapacitores orgânicos simétricos.
- ✓ Por último, no Capítulo 7 apresentamos as conclusões e perspectivas gerais do trabalho.

Esta tese contém ainda quatro apêndices, onde são apresentadas as metodologias experimentais utilizadas na síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de ferro para o uso como núcleo magnético dos nanocompósitos desenvolvidos no decorrer desse trabalho (Apêndice A), uma breve descrição da preparação das soluções tampão utilizadas nos protocolos de purificação de DNA (Apêndice B), a listagem das publicações realizadas durante o período de Doutorado (Apêndice C), e meus agradecimentos informais (Apêndice D).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

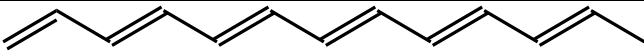
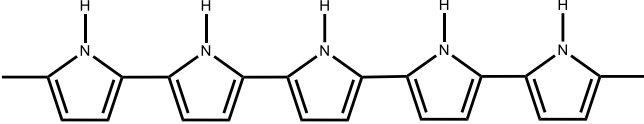
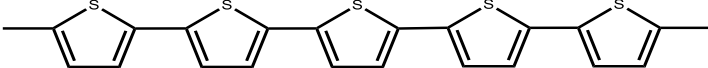
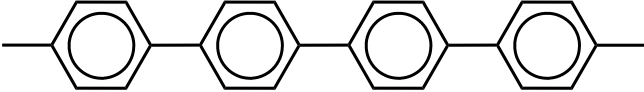
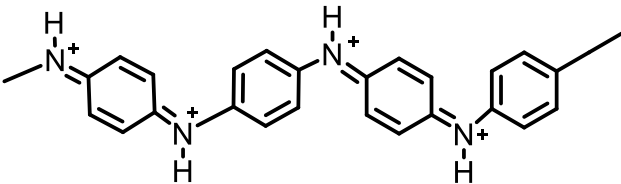
Neste capítulo serão apresentados conceitos relacionados aos polímeros intrinsecamente condutores, com destaque para o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) e a polianilina. Será também introduzida uma breve discussão sobre os ácidos nucleicos (em especial, o DNA), e as técnicas usadas para sua purificação e caracterização, bem como os procedimentos básicos de biologia molecular utilizados ao longo desta tese. Além disso, discorreremos sobre a técnica de eletrofiação para a preparação de membranas poliméricas a natureza dos mecanismos eletroquímicos de armazenamento de energia. Esses conceitos essenciais para a compreensão dos processos e aplicações dos materiais nanoestruturados desenvolvidos neste trabalho serão abordados de modo mais detalhado nos capítulos posteriores.

2.1 POLÍMEROS CONDUTORES

Diferentemente dos polímeros convencionais (que são isolantes), os polímeros condutores formam uma classe de macromoléculas orgânicas com propriedades elétricas similares aos materiais semicondutores, e que oferecem uma vantajosa combinação de propriedades como boa condutividade, flexibilidade mecânica, e facilidade no processamento, entre outras, que não é observada em outras classes de materiais (Heeger 2001).

Apesar de estudos teóricos predizerem que alguns polímeros poderiam apresentar propriedades elétricas (Martinez and Paya 2009), os mesmos sempre foram considerados intrinsicamente isolantes, sendo, por exemplo, usados na eletrônica como meios dielétricos para capacitores, e recobrimento de fios e de outros componentes eletrônicos. Contudo, em 1977 Shirakawa e colaboradores, por acidente, conseguiram sintetizar um filme de poliacetileno flexível e com aspecto metálico. Mais tarde, ao tratarem esse filme com vapor de iodo, observaram um ganho de 13 ordens de grandeza em sua condutividade elétrica (Seymour 1981). Essa descoberta abriu uma nova e promissora área de pesquisa relacionada tanto com a busca de outros polímeros que pudessem conduzir eletricidade, quanto por uma melhor compreensão do mecanismo responsável pelo elevado aumento observado na condutividade. Mais tarde, essa busca levou à identificação de outros polímeros condutores, como a polianilina, o polipirrol, politiofeno, poli(p-fenileno), e o poli (p-fenileno vinileno), que são apresentados, juntamente com suas respectivas estruturas e valores da condutividade, na Tabela 1.

Tabela 1 – Estrutura e condutividade dos principais polímeros condutores.

Polímero	Estrutura química	Condutividade (S.cm ⁻¹)
Poliacetileno		10 ³ - 10 ⁶
Polipirrol		600
Politiofeno		200
Poli(p-fenileno)		500
Polianilina		10 - 10 ³

Fonte: O autor (2019)

De uma maneira geral, os polímeros condutores são constituídos por longos sistemas π conjugados, ou seja, apresentando uma alternância entre ligações simples e duplas, o que permite uma maior deslocalização dos elétrons. No entanto, essa alternância não assegura uma boa condutividade para o polímero, sendo necessário a existência de defeitos conformacionais, como pólarons¹ e bipólarons², ao longo da cadeia polimérica, para que ocorra o efetivo transporte de carga. Esses defeitos são introduzidos ao se adicionar ou remover elétrons da cadeia do polímero, por sua exposição a agentes oxidantes ou redutores, comumente chamados de dopantes (Faez, Reis et al. 2000, Medeiros, Oliveira et al. 2012).

Relativamente aos materiais condutores inorgânicos, os polímeros condutores oferecem as vantagens de processamento, leveza, e flexibilidade, propriedades que podem ser exploradas para o desenvolvimento de novos dispositivos eletrônicos e optoeletrônicos, além de possibilitar a substituição de outros materiais não renováveis, o que torna as possíveis aplicações mais práticas e econômicas (Heeger 2001). Entre as

¹ **Pólarons** – no âmbito de polímeros condutores, um polaron é um defeito (cátion/ânion-radical) criado pela retirada ou adição de um elétron da cadeia polimérica por meio de processos óxido-redutivos que levam a mudança de estruturas da forma aromática para a forma quinônica, de maior afinidade eletrônica.

² **Bipólarons** – corresponde a um par de pólarons ligados entre si devido à diminuição de suas energias por meio do compartilhamento das mesmas distorções na cadeia polimérica, o que causa uma atração entre os dois defeitos.

aplicações que já se beneficiam das propriedades desta classe de polímeros, pode-se citar a produção de baterias (Chen, Liu et al. 2007), diodos orgânicos emissores de luz (OLEDs) (Kim, Lee et al. 2013), purificação de moléculas biológicas (Medina-Llamas, Chávez-Guajardo et al. 2014), supercapacitores (Bagotskiĭ, Skundin et al. 2015), células fotovoltaicas (Sun, Zhang et al. 2015), e diferentes tipos de sensores (Janata and Josowicz 2003, Ates 2013).

2.1.1 Politiofenos

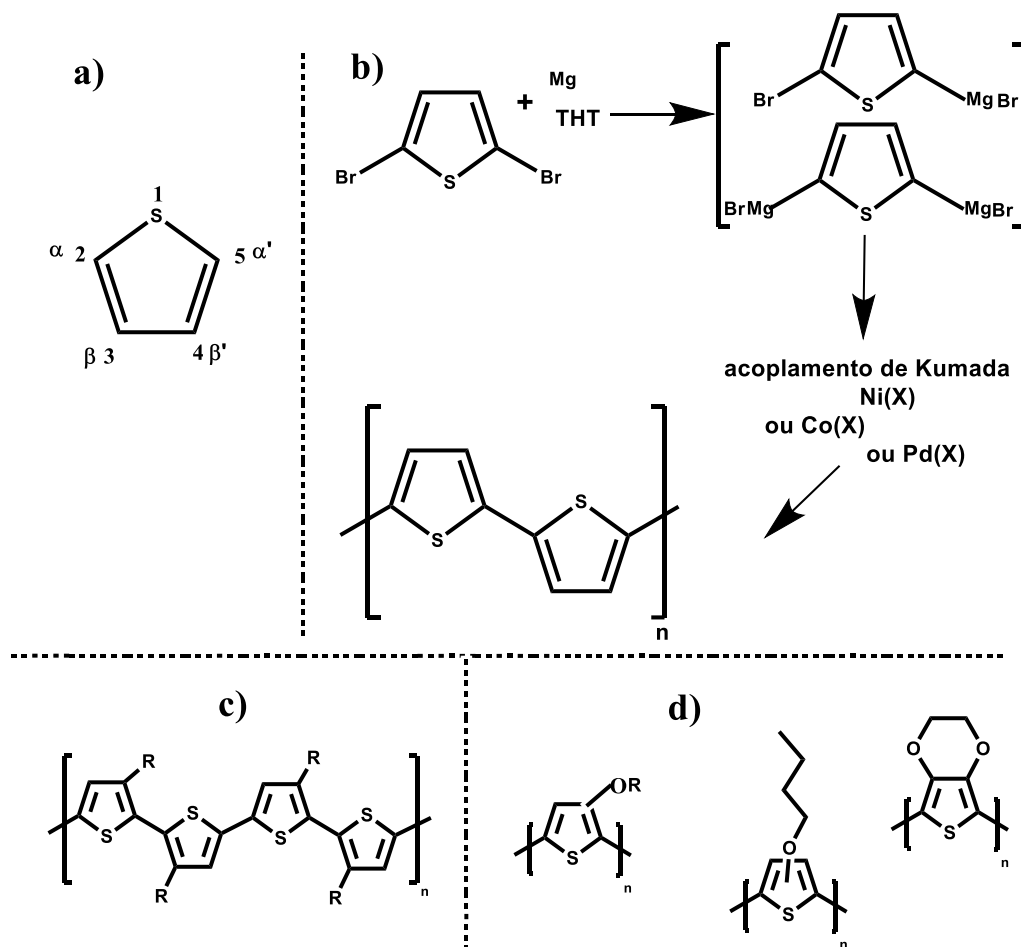
Os politiofenos formam uma das classes de polímeros conjugados que mais tem experimentado desenvolvimento (no sentido da síntese de novos polímeros por meio de substituições e adição de grupos químicos), e correspondem a materiais que exibem alta estabilidade química, térmica, e um alto nível de condutividade elétrica. Essa grande versatilidade química permitiu o uso desses polímeros em diferentes tecnologias, como OLEDs, dispositivos ópticos, sensores, atuadores, janelas eletrocromáticas, eletrodos orgânicos, absorvedores de radiação, transistores, diodos, células solares orgânicas, memórias e moduladores óticos, fotoresistores, capacitores e baterias, recobrimento anti-estático, entre outros (McCullough 1998, Fichou 1999). A estrutura básica do politifeno (não-substituído) e seus derivados consiste no acoplamento nas posições 2 e 5 (acoplamento α, α' , Fig. 1a) de unidades monoméricas compostas por anéis pentagonais cíclicos que possuem como heteroátomo o enxofre, e que apresentam diferentes grupos funcionais ou estruturas cíclicas ligados ao anel principal (tiofeno) (Schopf and Kossmehl 1997). Os tiofenos são mais comumente divididos em poli(3-alkil-tiofeno)s e poli(3-alkil-oxi-tiofeno)s. O primeiro grupo (Fig. 1c) engloba os compostos com substituição na posição 3 do anel de tiofeno por um grupo doador, como um grupo alkil, enquanto o segundo (Fig. 1d) é caracterizado por substituições de grupos alcóxi no anel principal (Schopf and Kossmehl 1997, Fichou 1999). No caso das substituições alcóxi, quando o oxigênio é ligado diretamente ao anel isso oferece vantagens como mais estabilidade química, menor banda de gap, e ainda a possibilidade de atuar como grupos de reconhecimento molecular ou sítios de automontagem direcionada (Fichou 1999).

O politiofeno (PTh) não-substituído (o polímero constituído apenas pela cadeia principal formada por anéis tiofeno) foi relatado simultaneamente pela primeira vez em 1980, por Yamamoto e Lin, via reação de condensação baseada no acoplamento cruzado

de Kumada³. Tal processo, mostrado na Fig. 1b, consistiu na exposição de 2,5-dibromotiofeno (2,5 dBrTh) em meio orgânico (Tetrahidrofurano – THF) contendo magnésio e um catalisador (compostos de metais de transição – haletos metálicos). A reação entre o 2,5 dBrTh e o Mg produz o 2-bromo-5 magnésio-bromo-tiofeno ou 2-magnésio-bromo-5-bromo-tiofeno. Posteriormente, esses compostos se acoplam ao catalisador metálico e a reação de condensação ocorre pela formação do PTh (Lin and Dudek 1980, Yamamoto, Sanechika et al. 1980). Subsequentemente, inúmeras outras rotas químicas com outros metais, meios orgânicos e aquosos, ambientes inertes, fase vapor, além de rotas eletroquímicas e físicas (plasma), tem sido reportadas para os mais variados politiofenos (Schopf and Kossmehl 1997, Fichou 1999). Os politiofenos obtidos por rotas eletroquímicas, assim como a grande maioria dos polímeros condutores, apresentam um alto nível de conjugação e, conseqüentemente, uma maior condutividade elétrica pode ser alcançada (McCullough 1998). Além disso, uma alternativa para atingir boas características elétricas na síntese de politiofenos e seus derivados se dá pelo uso de dopantes, dos quais os mais comumente utilizados são lítio, percloratos, tetra-alquil tetrafluorborato de amônio e hexafluorofosfato, além de solventes como acetonitrila, THF e diclorometano (CH_2Cl_2) (Schopf and Kossmehl 1997).

³ **Acoplamento de Kumada** – corresponde à reação entre um composto organometálico R-MgX e um eletrófilo orgânico do tipo $\text{R}'\text{-X}$, originando um composto orgânico $\text{R-R}'$ no qual houve a formação de uma nova ligação química carbono-carbono (onde R e R' = alquila, vanila ou arila). Essas reações são catalisadas por complexos de metais de transição (Cu, Ni, Fe, Pd), sendo os complexos de paládio aqueles mais comumente empregados.

Figura 1 – Estrutura química do monômero tiofeno a). Primeira rota sintética (reação de condensação) do politiofeno b). Estrutura geral dos derivados poli(3-alkil-tiofeno)s c) e poli(3-alkil-oxi-tiofeno)s. Adaptado de (Lin and Dudek 1980).



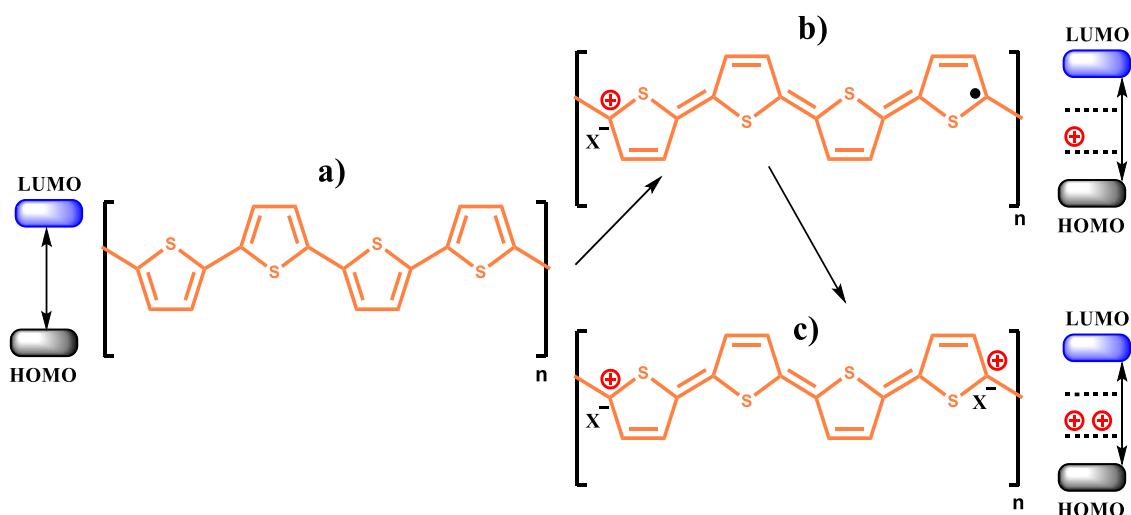
Fonte: O autor (2019)

Assim como nos outros polímeros condutores, o mecanismo de condução dos politiofenos é baseado no caráter conjugado da cadeia polimérica e na presença de defeitos (pólarons e bipólarons) ao longo da estrutura do polímero, o que cria estados eletrônicos localizados no “band gap”⁴. Esses defeitos se originam da adição ou retirada de elétrons da cadeia polimérica (via dopagem oxirredutiva), o que, por sua vez, ocasiona a redistribuição das ligações π - π que causam uma modificação espacial dos átomos, polarizando o polímero localmente. Desse modo, o transporte pode ocorrer através do deslocamento dos pólarons e bipólarons ao longo da cadeia (devido à fácil deslocalização das ligações alternadas) quando um campo elétrico é aplicado (Margolis 1989). O processo de dopagem dos politiofenos ocorre principalmente pela adição de agentes

⁴ **Band gap** – é a separação em energia entre a banda de valência dos elétrons e a banda de condução. Essencialmente, o band gap representa a energia mínima necessária para excitar um elétron até um estado na banda de condução, onde ele pode participar da condução.

oxidantes no meio reacional durante a polimerização ou quando exposto a vapores desses agentes oxirredutores (Nalwa 1997, McCullough 1998). Na Fig. 2 são mostrados como exemplo os três estados no qual o PTh pode ser encontrado: a) desprotonado (não condutor), e após a formação de um pólaron b) e um bipólaron c) (formas condutoras).

Figura 2 – Estrutura química do politiofeno em seus diferentes estados de oxidação: na forma neutra (não condutora) a), e após a formação de um pólaron b) e um bipólaron c).



Fonte: O autor (2019)

2.1.1.1 Poli (3,4 – etilenodioxitiofeno)

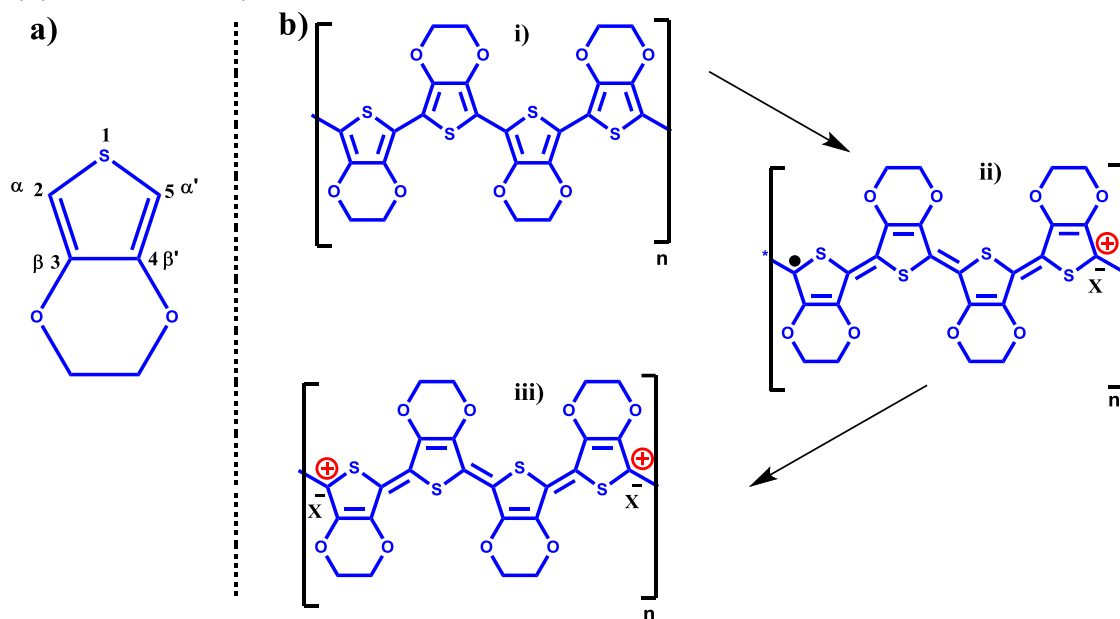
Entre todos os polímeros da classe dos politiofenos, o poli(2,4-etilnodioxitiofeno) (PEDOT) é um dos derivados que mais tem destaque, tanto na área acadêmica como na tecnológica. Ele foi desenvolvido por Jonas e Heywang nos laboratórios da Bayer, que buscavam solucionar os problemas de instabilidade química que interfere na condutividade dos politiofenos, e também as baixas propriedades de solubilidade e processamento (Elschner 2011). Após muitos anos de pesquisas na síntese de poli(3-alquil-oxi-tiofeno)s, no final da década de 80 o monômero (2,4 – etilodioxitiofeno – EDOT) e, conseqüentemente, o PEDOT foram obtidos. Seu sucesso instantâneo não foi por menos, pois ele trouxe um conjunto vantajoso de propriedades, como um baixo potencial de oxidação, elevada condutividade elétrica, transparência ótica no estado condutor, e uma alta estabilidade química e ambiental, até então não alcançadas com outros politiofenos. Essas características tornam o PEDOT um material de grande potencial de aplicação em diversas áreas, seja como condutor ou eletrodo injetor de buracos em diodos emissores de luz e dispositivos fotovoltaicos orgânicos, revestimentos eletrostáticos, eletrodos para baterias e supercapacitores, dispositivos termoeletrônicos,

transistores de efeito de campo orgânicos, liberação de drogas, eletrodos neurais, entre outras (Elschner 2011, Sun, Zhang et al. 2015, Wen and Xu 2017). Não apenas isso, também seu complexo como o poliestireno sulfonato (que funciona como contra-íon) chamado de PEDOT:PSS permite uma suspensão estável em meio aquoso e sua produção em grande escala, que hoje movimenta uma indústria de filmes finos de bilhões de dólares em todo o mundo, voltada a tecnologias de eletrônica orgânica como células solares, diodos, transistores entre outras (Elschner 2011, Wen and Xu 2017).

Como já apresentado, o PEDOT é obtido por meio da polimerização oxidativa do EDOT, mostrado na Fig. 3a. O monômero em si é composto por um anel tiofeno substituído por um grupo dioxietileno nas posições β e β' (átomos 3 e 4 do anel tiofeno); essa substituição impede a adição ou acoplamento durante a polimerização que não seja nas posições α e α' , do que resulta uma estrutura altamente regular e conjugada (Elschner 2011). Da mesma maneira que os outros tiofenos e demais polímeros condutores de cadeias aromáticas, o PEDOT pode ser sintetizado por métodos químicos e eletroquímicos, sendo o mais simples e utilizado a síntese química em fase líquida via oxidação na presença de haletos metálicos ou ácidos de Lewis (principalmente sais de Fe – III, como $C_{21}H_{21}FeO_9S_3$ e $FeCl_3$) em atmosfera inerte (Elschner 2011, Bhattacharyya, Howden et al. 2012). Uma outra rota química que pode ser utilizada, quando há a necessidade da modificação ou funcionalização de materiais com o PEDOT, é a polimerização em fase vapor do monômero EDOT. Neste método, se faz a impregnação do substrato ou material com um excesso do oxidante e, sequencialmente, a exposição deste material a uma atmosfera saturada do monômero em um reator (Elschner 2011). Além disso, essa rota de síntese apresenta uma série de vantagens em relação a outros métodos, como menor quantidade de reagentes, não precisar de atmosfera inerte, solventes orgânicos, e problemas de solubilidade em meio aquoso.

Quanto a suas propriedades de condutividade, assim como os outros polímeros de sua classe, ele tem um mecanismo baseado na formação de pólarons e bipólarons por meio da oxirredução da cadeia polimérica. No caso específico do PEDOT, essa reação é de oxidação (retirada de elétrons), o que dá origem a buracos na cadeia, de modo que a condução pode ser entendida em analogia ao caso dos semicondutores orgânicos do tipo-p. Na Fig. 3b são mostrados os três estados do PEDOT, sendo i) seu estado neutro (desprotonado) não condutor, e em seu estado condutor, onde uma parte da cadeia está oxidada (dopado), formando pólarons ii) e/ou bipólarons iii).

Figura 3 – Estrutura química do monômero EDOT a). Estruturas químicas do PEDOT em seus diferentes estados de oxidação: na forma neutra (não condutora) i) e com a formação de um pólaron ii) e um bipólaron iii) (formas condutoras).



Fonte: O autor (2019)

2.1.2 Polianilina

Nos últimos anos, a polianilina vem se destacando entre os polímeros condutores mais estudados. Entre os fatores que impulsionam sua utilização podem ser destacados sua síntese simples, fácil oxidação/redução, baixo custo, boa estabilidade química, e elevada condutividade (Eftekhar 2010). Devido a estas características, a polianilina tem sido utilizada com sucesso em muitas aplicações práticas, como em transistores de efeito de campo, separação de biomoléculas, sensores, circuitos integrados, transporte de spin (spintrônica), entre outras (Bhadra, Khastgir et al. 2009, Mostafaei and Zolriasatein 2012, Mendes, Alves Santos et al. 2017).

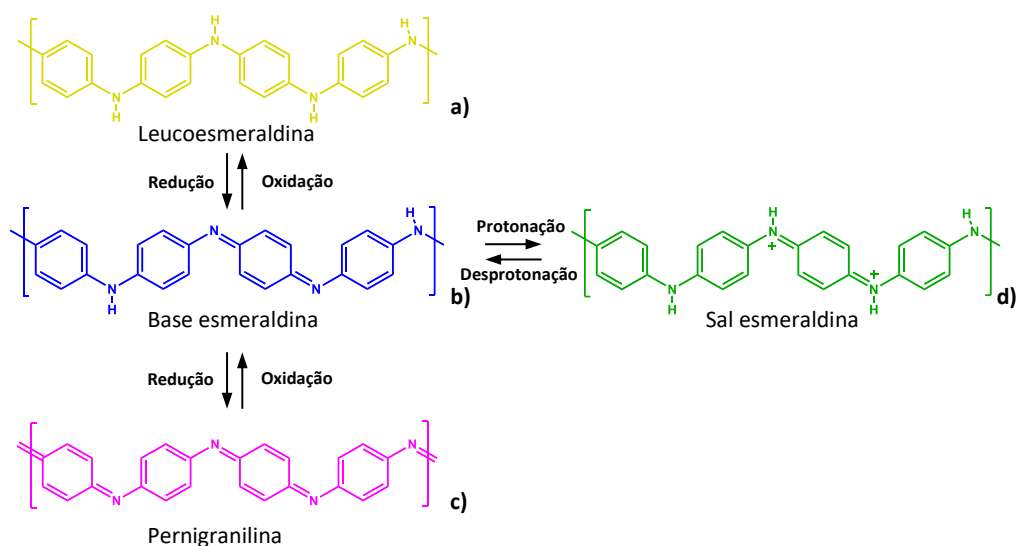
A polianilina é sintetizada por meio da polimerização oxidativa da anilina, que pode ser realizada por rota química ou eletroquímica, sendo a síntese química a mais utilizada. Na rota química, a polimerização se dá pelo uso de agentes oxidantes (geralmente persulfatos). Já pela síntese eletroquímica, um certo potencial é aplicado na solução para impelir a oxidação dos monômeros de anilina (Boeva and Sergeyev 2014).

A rota de síntese a ser adotada tem relação direta com a finalidade para a qual a polianilina será utilizada: para um grande rendimento, é aconselhável a síntese química, enquanto que para a obtenção de filmes finos e homogêneos, os melhores resultados são obtidos via síntese eletroquímica. Outro fator que influencia as propriedades não só da

polianilina, mas dos polímeros condutores em geral, é sua morfologia, pois a depender do tipo de síntese escolhida pode resultar o aparecimento de muita desordem na estrutura polimérica, o que limita a mobilidade de cargas, diminuindo assim consequentemente a condutividade elétrica do material (Heeger 2001).

A polianilina, que é constituída por unidades repetidas que se compõem por anéis aromáticos e/ou quinonas ligados entre si por átomos de nitrogênio, pode apresentar diferentes estados de oxidação em sua cadeia, como pode ser observado na Fig. 4.

Figura 4 – Estrutura química da polianilina em seus estados de oxidação, representados também com as respectivas cores observadas devido ao efeito eletrocromático (mudança da cor de acordo com estímulos eletroquímicos) que a mesma apresenta (Watanabe, Mori et al. 1987): a) leucoesmeraldina, b) base esmeraldina, c) pernigranilina, e d) sal esmeraldina.



Fonte: O autor (2019)

A polianilina possui quatro estados de oxidação, como mostrado na Fig. 4. A leucoesmeraldina (Fig. 4a) é a forma na qual a polianilina se encontra completamente reduzida, de modo que se tem apenas os anéis benzênicos ligados entre si por nitrogênios amina. A base esmeraldina, a forma mais estável (Fig. 4b), é um estado parcialmente oxidado, onde a polianilina é constituída por anéis benzênicos ligados a nitrogênios aminas (parte reduzida), e por anéis quinóides ligados a nitrogênios iminas (parte oxidada). A pernigranilina (Fig. 4c), na qual a polianilina encontra-se totalmente oxidada, é formada por anéis benzênicos e quinóides ligados por meio de iminas. E, por último e mais interessante, a forma condutora da polianilina, o estado sal esmeraldina (Fig. 4d), que é obtido a partir da base esmeraldina através do processo de protonação da mesma.

com ácidos fortes (ácidos de Brönsted). Essa reação de protonação se dá sobretudo nos grupos iminas ao longo da cadeia da polianilina, sendo esta reação a responsável pela formação dos portadores de carga (pólarons e bipólarons), o que pode proporcionar um ganho de até 10 ordem de grandeza na condutividade da polianilina (Epstein, Ginder et al. 1987, Sariciftci, Bartonek et al. 1989). Este processo simples de dopagem e desdopagem (protonação/desprotonação) da polianilina, que não ocorre para os demais polímeros condutores (apenas por reações redox), tem estimulado vários estudos sobre o material e possibilitado sua aplicação em diferentes áreas, como, por exemplo, remediação ambiental e extração de DNA (Medina-Llamas, Chávez-Guajardo et al. 2014, Alcaraz-Espinoza, Chávez-Guajardo et al. 2015, Chávez-Guajardo, Medina-Llamas et al. 2015, da Silva, Maciel et al. 2019).

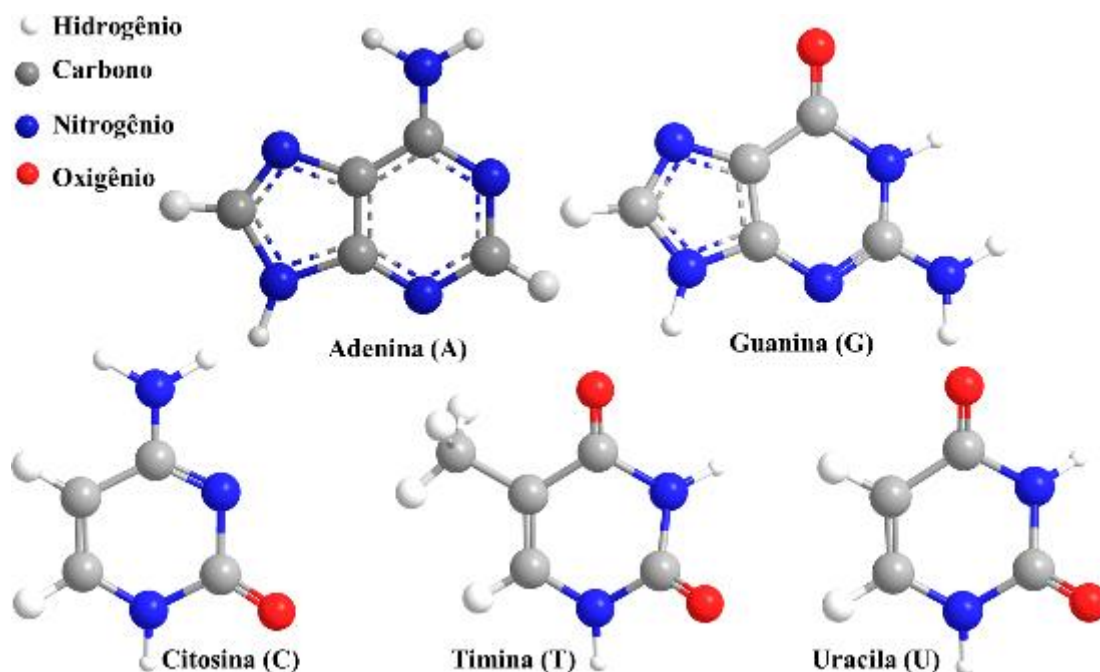
2.2 ÁCIDOS NUCLÉICOS

Como já muito bem estabelecido, os ácidos nucléicos são responsáveis por desempenhar funções fundamentais em todos os seres vivos, uma vez que, além de armazenarem e transmitirem as informações genéticas, controlam as atividades celulares, regularizando a síntese das proteínas (Alberts 2019). Por ácidos nucleicos, compreende-se essencialmente o ácido desoxirribonucleico (do inglês, DeoxyriboNucleic Acid - DNA) e o ácido ribonucleico (do inglês, RiboNucleic Acid - RNA), sendo o DNA responsável por carregar e transmitir as informações genéticas nele codificadas, ao passo que o RNA é encarregado de carrear as informações contidas no DNA para o citoplasma, onde os ribossomos se ligam ao RNA, codificando as proteínas (Calladine 2004, Fitzgerald-Hayes and Reichsman 2010). Nas células eucariontes, o DNA localiza-se principalmente no núcleo celular, e o RNA no citoplasma, enquanto que nas células procariontes ambos encontram-se no citoplasma (Brown, LeMay et al. 2014).

O DNA e o RNA são moléculas poliméricas constituídas pela ligação sequenciada entre quatro diferentes tipos de unidades monoméricas denominadas de nucleotídeos. Estas quatro unidades possuem uma estrutura geral muito similar, que consiste em uma base nitrogenada ligada a um açúcar de cinco carbonos (a desoxirribose no caso do DNA, e a ribose para o RNA), que, por sua vez, é ligado a um ou mais grupos fosfatos. O que difere nos quatro nucleotídeos são suas bases nitrogenadas, sendo estas, no caso do DNA, a adenina (A), citosina (C), guanina (G), ou timina (T). Por sua vez, o RNA tem três das mesmas bases nitrogenadas do DNA, adenina, citosina, e guanina, enquanto que o quarto nucleotídeo é a base uracila (U), encontrada ao invés da timina presente no DNA. Estas

bases nitrogenadas são classificadas de acordo com o número de anéis aromáticos (1 ou 2), de modo que as bases adenina e guanina que possuem dois anéis aromáticos são denominadas de purinas, e as bases citosina, timina, e uracila, que detêm um único anel, são chamadas de pirimidinas (Sinden 1994, Alberts 2019), como pode-se observar na Fig. 5.

Figura 5 – Estrutura química das bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos.



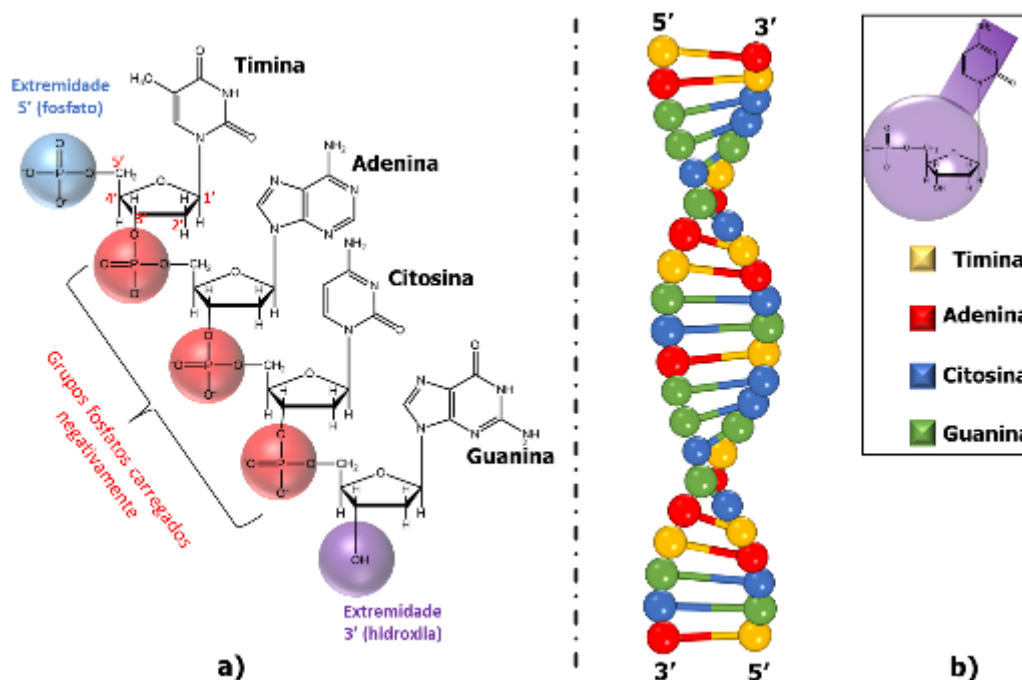
Fonte: O autor (2019)

A junção dos nucleotídeos para a formação das cadeias poliméricas de DNA e RNA é feita pela ligação covalente fosfodiéster, que ocorre entre os açúcares e os grupos fosfatos, resultando em cadeias de polinucleotídicas contendo milhares de nucleotídeos. O DNA é composto pela união de duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas que se conformam de modo a originar a chamada dupla hélice, enquanto que o RNA se encontra normalmente na forma de uma única cadeia (Watson 2014).

As cadeias polinucleotídicas do DNA se acoplam de maneira que os grupos fosfatos com carga negativa ficam posicionados na extremidade da cadeia, seguidos do açúcar (desoxirribose), e das bases nitrogenadas (hidrofóbicas) mais internamente, como pode-se observar na Fig. 6a. Devido à maneira como as ligações fosfodiéster são formadas, com os fosfatos ligados entre si através dos carbonos 5' e 3' dos açúcares adjacentes, a molécula de DNA possui um certo grau de polaridade. Esta ligação característica propicia à cadeia de DNA duas terminações diferentes, denominadas 5' e

3'; onde a terminação 5' é marcada pela presença do grupo fosfato, enquanto que a 3' por uma hidroxila, tendo assim polaridades opostas as extremidades da cadeia de DNA. Estas polaridades contrárias são fundamentais para a replicação, transcrição, e recombinação do DNA (Sinden 1994, Alberts 2019).

Figura 6 – Estrutura do DNA, a) fita simples com sua ligação fosfodiéster, b) dupla hélice.



Fonte: O autor (2019)

Como citado previamente, a estrutura dupla hélice do DNA é constituída por duas cadeias polinucleotídicas simples, com os sentidos das terminações opostas, ou seja, enquanto uma é direcionada de 5' para 3', a outra é orientada de 3' para 5', como mostrado na Fig. 6b. A conformação dupla hélice é formada e mantida através da ligação de hidrogênio entre os pares de bases das duas cadeias, com uma pequena contribuição de interações hidrofóbicas (Watson 2014, Alberts 2019). Essas ligações de hidrogênio fazem com que o emparelhamento das bases nitrogenadas seja específicas entre si, de modo que a adenina só se liga à timina, e a guanina à citosina, e vice-versa.

A especificidade dessas ligações de hidrogênio advém da incompatibilidade entre os grupos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio das bases nitrogenadas e da geometria das mesmas (Watson 2014). É esta especificidade das ligações entre as bases a responsável pelas funções primárias dos ácidos nucleicos; como o armazenamento de informação genética, que resulta da disposição dos pares de base ao longo da cadeia.

Estes, por sua vez, se organizam em segmentos menores, chamados de genes, cada um deles responsáveis pela expressão de uma função. A complementaridade das bases permite a duplicação e transmissão das informações genéticas para novas cadeias de nucleotídeos. Além disso, a expressão genética realiza-se pela transcrição (DNA codifica a produção de RNA), seguida da tradução (o RNA expresso pelo DNA codifica a produção de proteína) (Alberts 2019).

2.2.1. DNA plasmídeo

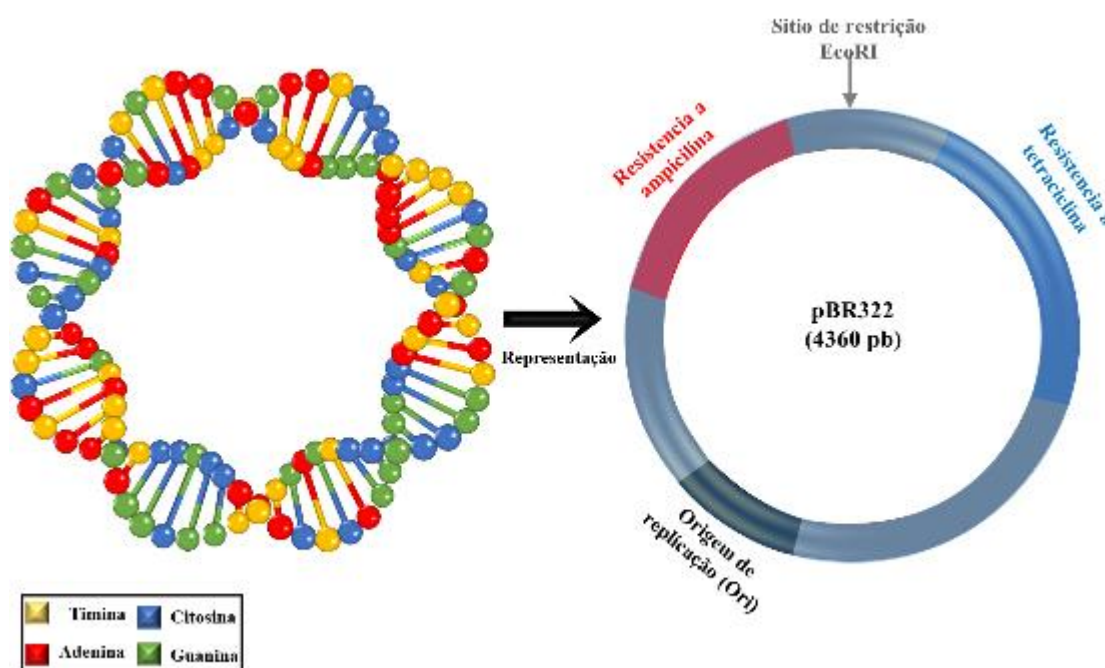
O plasmídeo (pDNA) é uma molécula circular relativamente pequena de DNA extra cromossômico (isto é, fisicamente separado do DNA cromossômico). Ele pode ser encontrado livre no citoplasma de células procariontes, principalmente em bactérias, e é capaz de se replicar de forma autônoma ao DNA cromossômico. Contudo, sob algumas condições, o plasmídeo pode ser algumas vezes encontrado em células eucariontes, ou na forma linear. Os plasmídeos são responsáveis por comportarem a maioria dos genes ligados a funções adaptativas das células, como conjugação, funções metabólicas de degradação, resistência a antibióticos e à presença de íons metálicos, além de fatores de virulência (Bennett and Grinsted 1988, Thomas 2000, Lipps 2008, Esser, Kück et al. 2012, Clewell 2014). Apesar das várias funções que desempenham, eles não são essenciais para a sobrevivência da célula, que continuam viáveis mesmo após a eventual perda do plasmídeo (Schleef 2001).

O pDNA possui um tamanho que varia de (1 – 400) mil pares de bases (Kpb), sendo seu número de cópias em uma única célula dependente de seu tamanho, de modo que quanto menor for ele, maior é o número de suas cópias na célula, podendo ocorrer de uma a dezena de cópias. Por exemplo, plasmídeos com tamanhos entre 5 – 10 Kpb podem possuir de 20 a 30 cópias em uma única célula, o que aumenta em muito a eficiência de expressão de proteínas (Bennett and Grinsted 1988, Thomas 2000, Casali and Preston 2003, Clewell 2014). Vários tipos de pDNA podem coexistir em uma bactéria; na *E. coli* por exemplo, já foram identificados até 7 pDNA coexistentes. Essa presença de muitos plasmídeos em uma mesma célula é uma vantagem evolutiva, já que os plasmídeos podem trocar genes entre si (como os de resistência, por exemplo) através de recombinação gênica, fazendo com que surjam plasmídeos com múltiplos genes de resistência antibiótica (Lodder, Schwarz et al. 1996, Ryan 2004). Porém, nem todos eles podem coexistir, porque alguns plasmídeos partilham uma mesma origem de replicação (sequência de nucleotídeos responsável por iniciar a replicação do pDNA), o que acaba

causando uma disputa por enzimas necessárias para a iniciação do maquinário de replicação. Isso leva à rápida eliminação de um desses plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade (Kollek, Oertel et al. 1978, Schleef 2001, Davison 2002, Lipps 2008, Tolmasky and Alonso 2015).

Geralmente o pDNA é representado por um círculo subdividido em regiões nas quais se situam os genes característicos de uma função, como mostra a Fig. 7. A configuração pode conter mais ou menos regiões, a depender do tamanho do plasmídeo e da quantidade de genes (funções) que um mesmo pDNA pode carregar, sendo apenas fixo a existência da região chamada de Ori, a qual é responsável por iniciar a replicação do pDNA.

Figura 7 – Representação convencional de um DNA plasmídeo. No exemplo é mostrado o plasmídeo pBR322, que foi o primeiro plasmídeo criado artificialmente (1977), e um dos vetores mais utilizados em *E. coli*. Seu nome foi dado em homenagem seus criadores Bolivar e Rodriguez. Ele é constituído de uma região de replicação, e os genes *ampR* e *tetR*, que codificam proteínas para resistência a ampicilina e tetraciclina, respectivamente. Possui sítios específicos para 40 diferentes enzimas de restrição (enzimas responsáveis por cortar a fita de DNA em regiões específicas) (Watson 1988).

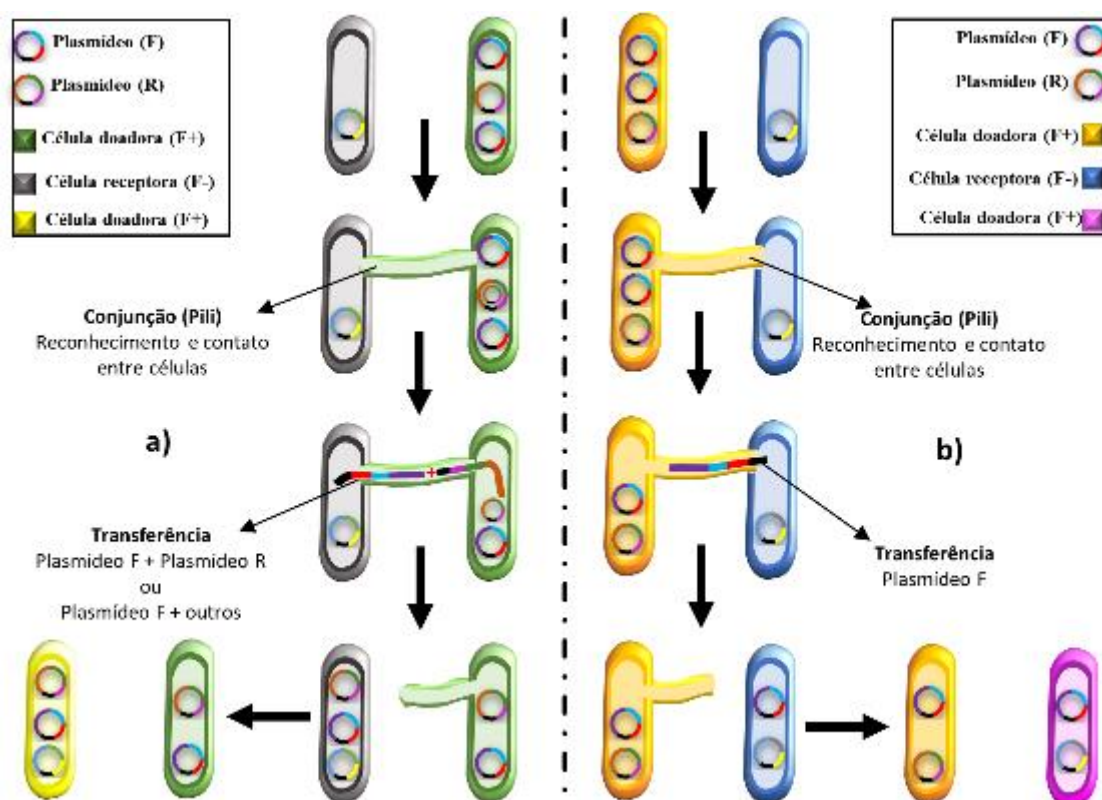


Fonte: O autor (2019)

Os pDNA são separados especialmente em dois grandes grupos, o grupo conjuntivo e o não-conjuntivo. Os plasmídeos do grupo conjuntivo têm como característica serem capazes de promover a conjugação sexual (transferência horizontal de genes) entre duas células, permitindo que a célula receptora adquira uma série de

informações genéticas que até então não possuía. Este processo consiste na transferência física do pDNA de uma célula para a outra, como mostrado esquematicamente na Fig. 8b, através da fímbria sexual proteica (pili) codificada por este grupo de plasmídeos. Todo o processo de conjugação e transferência é controlado por um conjunto de genes chamados de tra genes, ou genes de transferência. Já o grupo não conjuntivo dos pDNA é caracterizado por não realizar conjugação. Entretanto, sob certas circunstâncias, o pDNA não-conjuntivo pode ser transferido junto a um pDNA conjuntivo, quando ambos coexistem na célula doadora, como ilustrado na Fig. 8a (Hollaender 1977, Brown 2001, Dale 2004, Clewell 2014).

Figura 8 – Processo de transferência de horizontal de informação genética entre bactérias: a) transferência de plasmídeo não-conjuntivo junto ao conjuntivo, b) transferência sexuada (pili) de material genético por plasmídeo conjuntivo.



Fonte: O autor (2019)

Contudo, a classificação mais útil dos plasmídeos é a que tem por base os genes que carregam e as características funcionais que estes concedem às células bacterianas (Hollaender 1977, Bennett and Grinsted 1988, Lipps 2008), uma classificação que é constituída pelos cinco tipos seguintes de pDNA:

Plasmídeos F (fertilidade) – são plasmídeos conjuntivos portadores dos tra genes, e que têm como principal função a troca de material genético entre as células bacterianas.

Plasmídeo R (resistência) – possuem genes que promovem a codificação de enzimas capazes de proporcionar a resistência de bactérias a agentes antibióticos e/ou íons de metálicos.

Plasmídeos Col – transportam os genes codificadores das enzimas conhecidas como colicinas, responsáveis por inibir ou matar espécies similares, ou de diferentes linhagens, a fim de oferecer vantagens em condições de estresse como o que ocorre em um ambiente com restrição de nutrientes.

Plasmídeos degradativos – conferem à célula bacteriana a capacidade de metabolizar (digerir) substâncias atípicas, como, por exemplo, o ácido salicílico e o tolueno.

Plasmídeos de Virulência – carregam genes que concedem patogenicidade às bactérias hospedeiras.

Atualmente, os DNA plasmídeos são ferramentas indispensáveis para a engenharia genética, principalmente na tecnologia do DNA recombinante, e são um dos vetores mais utilizados para a expressão de proteínas e hormônios, como insulina, interferon-, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês Platelet-derived growth fator) (Burnouf 2011), hormônio de crescimento (Raiti and Tolman 1986), e na fabricação de vacinas (Levy, Clowes et al. 1981, Schleef 2001, Manthorpe, Hobart et al. 2005), terapia genética (Prud'Homme, Draghia-Akli et al. 2007), entre outras. Sua grande importância se dá por suas propriedades únicas, como na replicação independente do DNA cromossômico, a alta estabilidade por conta de seu tamanho reduzido, por serem facilmente introduzidos na célula hospedeira (transformação, eletrotransformação), e transferidos para todas as células descendentes, e por possuírem um grande número de cópias em uma única célula, o que faz com que no caso de expressão proteica uma grande quantidade de proteína seja produzida por cada célula (Stein and Stein 1984, Brown 2001, Lodish 2013).

2.2.2. Quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria

A espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível é um método muito utilizado para a determinação da concentração e pureza de solução de ácidos nucleicos, devido a sua praticidade e baixo custo. Tanto o DNA como o RNA apresentam um pico

de absorção no comprimento de onda de 260 nm (λ_{260}), que é atribuído a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos das bases nitrogenadas (pirimidina e purina), sendo o máximo de absorção em 260 nm um valor médio resultante da absorção das bases nitrogenadas separadamente (Schmid 2001, Technology 2011).

A forma estrutural em que se podem ser encontrados os ácidos nucleicos deve sempre ser levada em consideração durante sua quantificação por espectroscopia UV-Vis, uma vez que, para uma mesma concentração, os nucleotídeos isolados (na forma de monômeros) possuem uma absorbância maior que o RNA e o DNA de cadeia única (ssDNA), os quais por sua vez apresentam absorbância maior que o DNA de dupla cadeia (dsDNA). Assim, para um valor de absorbância igual a 1, a concentração de ssDNA e de RNA é de 33ng/ μ L e 40 ng/ μ L, respectivamente, enquanto que para o dsDNA este valor de absorbância corresponde a uma concentração de 50 ng/ μ L (Schmid 2001). Esta diminuição nas intensidades de absorção (hipocromismo) conforme aumenta o grau de interação entre as bases dos ácidos nucleicos é atribuída às ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, e de dipolo-dipolo entre as bases, que limitam a ressonância dos anéis heterocíclicos das bases nitrogenadas (Technology 2011, Medina-Llamas 2015).

Para a determinação da pureza dos ácidos nucleicos com base no UV-Vis são utilizadas as razões entre as absorbâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$), e de 260 e 230 nm ($A_{260/230}$). O DNA e o RNA são considerados puros com base na razão $A_{260/280}$, quando os valores observados ficam em torno de 1,8 e 2,0, respectivamente. Valores substancialmente menores que estes para $A_{260/280}$ indicam principalmente a presença de proteínas e fenol na solução. Já para a razão $A_{260/230}$, é esperado um valor entre 2,0 e 2,2 no caso de ácidos nucleicos puros. Para uma $A_{260/230}$ consideravelmente menor, contaminantes que absorvem próximo ao comprimento de onda de 230 nm, como o EDTA, carboidratos, e fenol, podem estar presentes (Fisher 2010).

Outro cuidado a se tomar durante a estimativa da concentração de ácidos nucleicos é o conhecimento dos reagentes utilizados no procedimento de purificação, uma vez que a contaminação residual por compostos como o trizol (solução fenólica) e o isoticianato de guanidina, comumente utilizados em muitos protocolos de purificação, pode levar a uma superestimação da concentração, uma vez que estes compostos têm absorção na região de 270 e 260 nm, respectivamente (Fisher 2010).

2.2.3. Métodos de purificação de ácidos nucleicos

A separação e purificação de biomoléculas a partir de sistemas biológicos (como, tecidos, fluidos, células, vírus, etc), e em especial o DNA, é um dos processos fundamentais para a obtenção de amostras com qualidade suficiente para sua aplicação em protocolos de biologia molecular para as mais diversas aplicações, como, por exemplo, diagnósticos, testes de paternidade, clonagem, sequenciamento, estudos fenótipos e mutagênicos, e terapias genéticas, entre outras (Berensmeier 2006, Xu, Song et al. 2012).

O primeiro procedimento de isolamento de DNA foi reportado em 1869, antes mesmo do reconhecimento dessa molécula, por Friedrich Miescher ao estudar leucócitos que coletara de curativos cirúrgicos. Ao longo dos experimentos, ele observou uma nova substância nos núcleos, a qual chamou em um primeiro momento de "nucleína". Mas tarde, ele desenvolveu dois protocolos de isolamento desse novo composto, hoje conhecido como DNA (Chacon-Cortes and Griffiths 2014). A partir de então, uma série de protocolos de isolamento de DNA foram desenvolvidos e otimizados ao longo do tempo.

De um modo geral, todos os métodos de purificação de ácidos nucleicos incluem quatro principais etapas. Inicialmente, a lise, que consiste no rompimento da membrana plasmática e a exposição do material celular através do uso de soluções contendo surfactantes ou um agente caotrópico⁵, como por exemplo, SDS, Triton X-100, sais de guanidina, ureia e sais de isotiocianato. Desnaturação e inativação do complexo proteico e nucleases, que compreende a adição de enzimas digestoras como proteinase K, RNase ou DNase dependendo do ácido nucleico de interesse. O isolamento do ácido nucleico alvo, que pode ocorrer por adsorção, separação de fase, precipitação, entre outros. E, por último, a ressuspensão do ácido nucleico em uma solução buffer estabilizante.

As técnicas de purificação podem ser basicamente classificadas como métodos de fase líquida e de fase sólida. Os protocolos baseados em fase líquida formam a primeira geração de técnicas de purificação de ácidos nucleicos e usam solventes orgânicos (como fenol e clorofórmio) e grandes concentrações de sais como agentes desnaturantes das proteínas. Esses protocolos se utilizam da separação de fase entre o meio orgânico e o aquoso, da solubilidade, e das diferentes propriedades de desnaturação das moléculas

⁵ **Agentes caotrópicos** – são compostos que aumentam a solubilidade de substâncias apolares na água, rompendo interações hidrofóbicas.

envolvidas, de modo que se torna possível a separação dos ácidos nucleicos dos outros constituintes celulares. Em sua grande maioria, esses protocolos de fase líquida envolvem um grande número de etapas, podendo fazer uso da centrifugação, filtração, cromatografia, de baixa temperatura, entre outras, o que leva a um grande consumo de tempo e de uma variedade de equipamentos (Berensmeier 2006, Shan, Wu et al. 2010). Além disso, esses protocolos fazem uso de solventes tóxicos, tanto para quem os realiza, como para o meio ambiente.

Em um segundo momento, na busca constante de metodologias mais eficientes, surgiram os protocolos de purificação de ácidos nucleicos a partir de substratos sólidos. Estes fazem uso de uma matriz sólida onde os ácidos nucleicos são adsorvidos de acordo com parâmetros físico-químicos, como pH e concentração de sal a que as amostras são submetidas. O primeiro relato dessa metodologia foi realizado por Vogelstein e Gillespie no início dos anos 80, que usaram partículas de vidro (sílica) para purificar fragmentos de DNA (Chacon-Cortes and Griffiths 2014). Quando comparados como os protocolos de fase líquida, as vantagens oferecidas por esses métodos se resumem na significativa redução no número de etapas, o que leva a um menor tempo de realização da purificação e a um bom grau de pureza dos ácidos nucleicos obtidos. A maioria dos métodos de fase sólida usa a configuração de coluna de centrifugação para ligar o ácido nucleico ao substrato, por meio de força centrífuga. Essas colunas geralmente são feitas de matrizes de sílica, partículas de vidro, diatomitos ou resinas de troca iônica.

Nos últimos anos, as metodologias de purificação de fase sólida têm ganhado inúmeras variantes, que vão desde microfluídica, polímeros aniônicos, diferentes nanoestruturas, ao uso de partículas magnéticas, entre outras. Em especial, os protocolos de purificação de ácidos nucleicos que fazem uso de partículas magnéticas têm se apresentado como um método bastante vantajosos em comparação com os demais. Entre essas vantagens se pode citar a simplicidade de separação do complexo partícula magnética/biomolécula alvo (devido à aplicação de um campo magnético), o baixo custo, a rapidez, e a não utilização de solventes orgânicos tóxicos, na maioria dos casos (Hou, Han et al. 2013).

Essas vantagens podem ser traduzidas ao se observar o significativo portfólio desses protocolos de purificação magnética oferecido por várias empresas no mercado de biotecnologia, seja no âmbito acadêmico, forense, ou de diagnósticos. Na maioria dos casos, essas partículas magnéticas fazem uso dos óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que apresentam uma alta resposta magnética e boa

biocompatibilidade (Gupta and Gupta 2005, Dias, Hussain et al. 2011). Contudo, outros óxidos como hematita (Fe_2O_3) e ferritas cobalto (CoFe_2O_4), níquel ($\text{NiZnFe}_2\text{O}_4$), manganês (MnFe_2O_4), óxido de zircônia (ZrO_2) têm sido também usados para essa aplicação. O que estende a gama de aplicabilidade dessas partículas magnéticas é a fácil modificação da superfície das partículas com grupos funcionais (Chiang, Sung et al. 2005), polímeros (Chiang, Sung et al. 2005, Brahmasandra, Craig et al. 2010), biomoléculas (Lund-Olesen, Dufva et al. 2007), polissacarídeos (Brevnov, Shewale et al. 2010), e silicatos (Ashtari, He et al. 2005, Li, Zhang et al. 2011), de modo a conseguir uma alta afinidade com a biomolécula de alvo, nesse caso, os ácidos nucleicos.

2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Na literatura, é possível encontrar um grande número de técnicas de diagnósticos moleculares baseados na detecção, identificação e quantificação de ácidos nucleicos (DNA/RNA). Dentre estas técnicas, uma das mais importantes, e que tem sido amplamente empregada, é a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada para amplificar sequências específicas de DNA ou RNA.

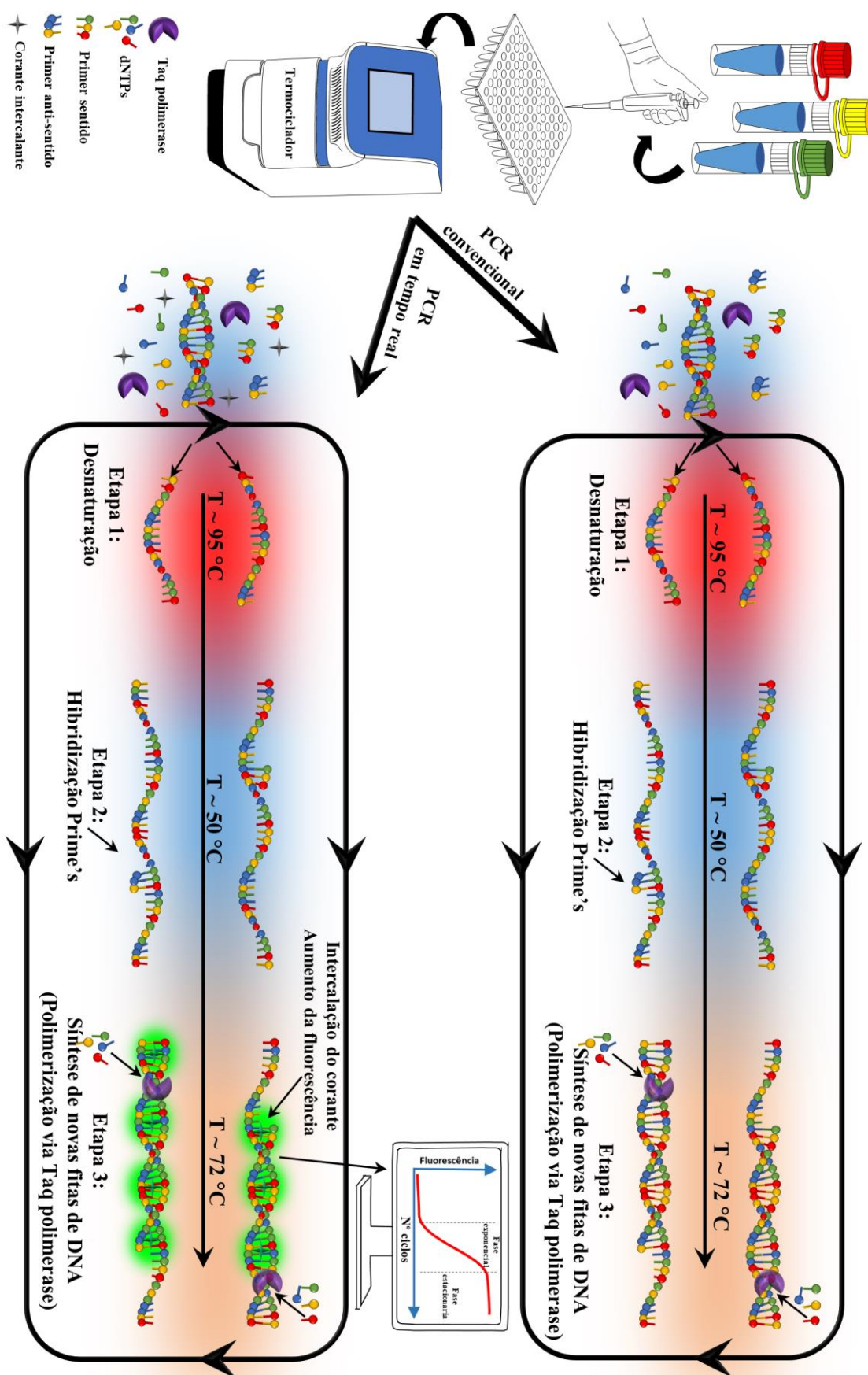
Na PCR, uma amplificação exponencial do DNA alvo é realizada a partir de múltiplos ciclos de desnaturação, hibridização e amplificação, por meio do uso da enzima Taq DNA polimerase (uma enzima termoestável capaz de catalisar a reação). O método utiliza um par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos, denominados de “primers”. Os primers geralmente apresentam uma sequência entre 20 a 40 bases nitrogenadas que é específica do DNA do organismo que se pretende identificar.

Os primers desempenham papel fundamental durante o processo da PCR, pois eles se hibridizam com uma das cadeias do DNA alvo desnaturado exatamente na região que contém os pares de bases que se deseja amplificar exponencialmente e, uma vez tendo sido hibridizados, atuam como um molde para a que a Taq DNA polimerase crie uma cadeia de DNA complementar pela adição sequencial de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) (Erlich, Gelfand et al. 1991, Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008).

Todo o processo da PCR consiste basicamente em três etapas (Fig. 9): um passo de desnaturação do DNA alvo, que geralmente ocorre a 94°C ou 95°C , a hibridização dos primers com as cadeias de ssDNA alvo a $\sim 60^\circ\text{C}$, e, por fim, a extensão do primer pela adição sequencial dos dNTP's a 72°C catalisada pela Taq DNA polimerase (Kubista, Andrade et al. 2006, Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008). A técnica requer vários ciclos de amplificação e, se partirmos de uma única molécula de DNA alvo, após 30 ciclos serão

obtidos cerca de 1,07 bilhão de cópias da região limitada pelos primers. De fato, a característica mais interessante da PCR é a grande quantidade de cópias da sequência-alvo geradas após a sua amplificação exponencial (Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008).

Figura 9 – Representação esquemática das principais etapas da PCR.



Fonte: O autor (2019)

Na PCR convencional, após um número fixo de ciclos de amplificação, as análises a partir do produto da reação oferecem uma informação qualitativa a respeito da presença ou ausência de um determinado gene na amostra de DNA alvo.

Ao longo dos anos, a técnica foi sendo aperfeiçoada, e numerosas adaptações e aplicações para a PCR convencional foram descritas, incluindo PCR semiquantitativa, PCR competitivo quantitativo, RT-PCR e, sua mais recente inovação, PCR em tempo real (Dorak 2007). Na PCR semiquantitativa, a acumulação do produto de PCR é medida durante a fase exponencial da reação, o que exige a interrupção da reação de PCR após um determinado número de ciclos, resultando em dados semiquantitativos (Kubista, Andrade et al. 2006).

Alternativamente, o PCR competitivo (multiplex) foi desenvolvido a fim de obter dados quantitativos. Para isso, o método requer a coamplificação para um cDNA ou RNA controle (competidor), com uma amostra desconhecida no mesmo tubo. A quantificação é realizada pela titulação de uma quantidade desconhecida da amostra alvo contra uma série de diluições da quantidade conhecida do padrão. O método proporciona uma estratégia para a quantificação exata, porém dificuldades relacionadas com a construção de padrões internos (tecnicamente sofisticados) e de trabalho extensivo têm sido enfrentadas (Kubista, Andrade et al. 2006, Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008).

Por sua vez, a RT-PCR consiste em um método de amplificação de ácidos nucleicos a partir de moléculas de RNA convertidas em DNA complementar (cDNAs) pela ação da enzima transcriptase reversa. A reação se inicia tendo como fita-molde a molécula de RNA, em vez de DNA. Isso mostra a eficiência da técnica de PCR também para a detecção, amplificação e quantificação de RNA. Além disso, ela possibilita a construção de bibliotecas de cDNA (Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008, Saeed and Ahmad 2013).

Dentre as várias técnicas de diagnósticos desenvolvidas baseadas na reação em cadeia da polimerase, a PCR em tempo real é uma das mais sensíveis e rápidas, pois permite a quantificação do produto de PCR durante a fase exponencial da reação, a partir do uso de sondas ou corantes intercalantes para DNA e RNA. É digno de nota que a técnica de PCR se tornou uma das ferramentas mais influentes na pesquisa de diagnósticos moleculares (Kubista, Andrade et al. 2006, Mackay 2007, Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008).

Para todas estas técnicas, a detecção dos produtos da PCR pode ser realizada a partir de vários procedimentos para marcação do DNA amplificado. A mais conhecida é

a eletroforese em gel de agarose, com o uso de marcadores fluorescentes tais como o brometo de etídio ou SYBR Green, SYBR Safe, Diamond, entre outros. Contudo, a principal limitação desses procedimentos está relacionada com o tempo consumido (Kubista, Andrade et al. 2006).

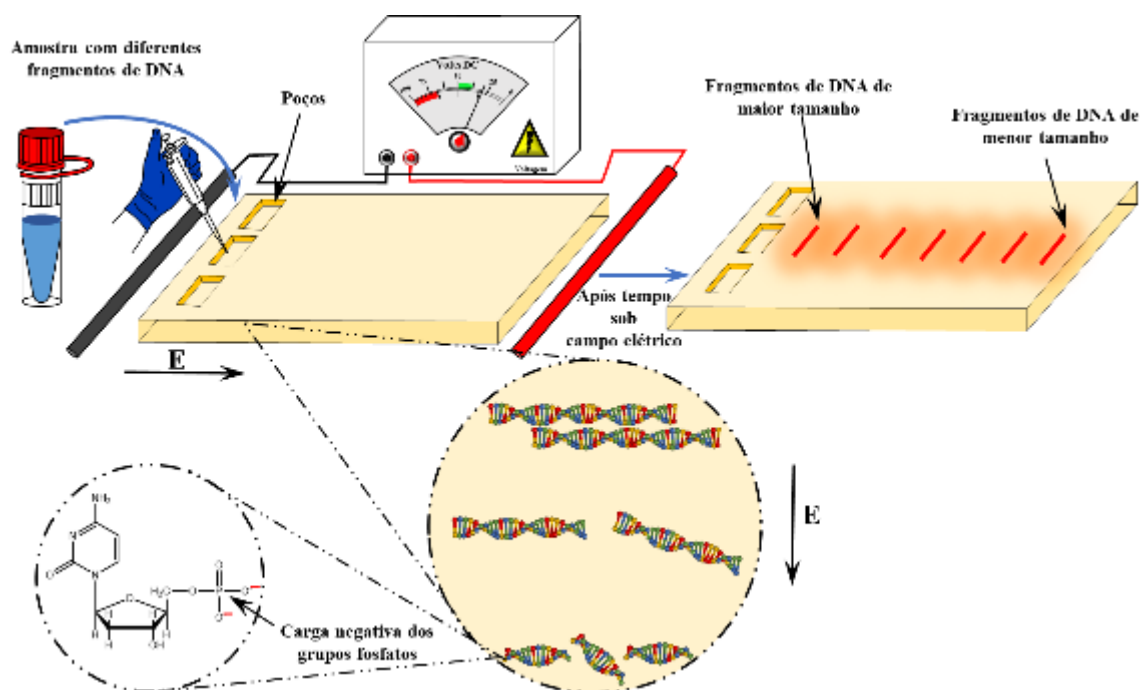
Embora, os testes de diagnóstico baseados em PCR sejam no momento predominantes, tecnologias alternativas baseadas em biossensores de DNA (óticos, eletroquímicos, impedimétricos, entre outros), que podem ser implementados de uma maneira rápida, simples e de baixo custo, quando comparada com a análise de PCR, vêm sendo desenvolvidos (Wang 2000, Vercoutere and Akeson 2002, Mohanty and Kougianos 2006). Esses biossensores de DNA fundamentam-se na capacidade de reconhecimento de cadeias de DNA complementares pela hibridização, e geralmente são produzidos imobilizando-se, em plataformas adequadas, primers específicos daquele organismo que se pretende identificar.

2.4 ELETROFORESE

A eletroforese é uma técnica padrão de fracionamento utilizada extensivamente para a separação, purificação e identificação de macromoléculas que apresentam cargas líquidas de acordo com a sua forma, tamanho e carga elétrica (Johansson 1972, Makovets 2013). Esse método simples e de baixo custo foi desenvolvido por Tisélius em 1937, e posteriormente otimizada por König através da adição de uma matriz rígida para impedir movimentos mecânicos e convectivos dos fluidos durante o processo. Desde então ela tem sido principalmente utilizada na caracterização de biomoléculas como DNA, RNA e proteínas (Wilson and Walker 2000). Basicamente, a eletroforese consiste na migração de partículas carregadas na direção de um polo (negativo ou positivo, de acordo com a carga) dentro de um meio poroso (que serve como resistência a migração), quando submetidas a um campo elétrico externo.

Conceitualmente, o processo consiste no fato de que à medida que uma amostra percorre o gel em direção ao polo de carga oposta, as moléculas de diferentes tamanhos moleculares vão se agrupando de modo distinto devido suas respectivas mobilidades (quanto maior a molécula, mais lento seu deslocamento), de modo ao final se obtém regiões (ou apenas uma região para as moléculas de tamanho muito próximos) do gel no qual estão contidas as moléculas de mesmo tamanho. Uma boa exemplificação deste processo é dada pelo uso de cadeias de DNA com diferentes tamanhos de fragmentos, como ilustrado na Fig. 10.

Figura 10 – Esquema ilustrativo das principais etapas em um protocolo de eletroforese em gel de agarose para a identificação da integridade e tamanho de fragmentos de DNA.



Fonte: O autor (2019)

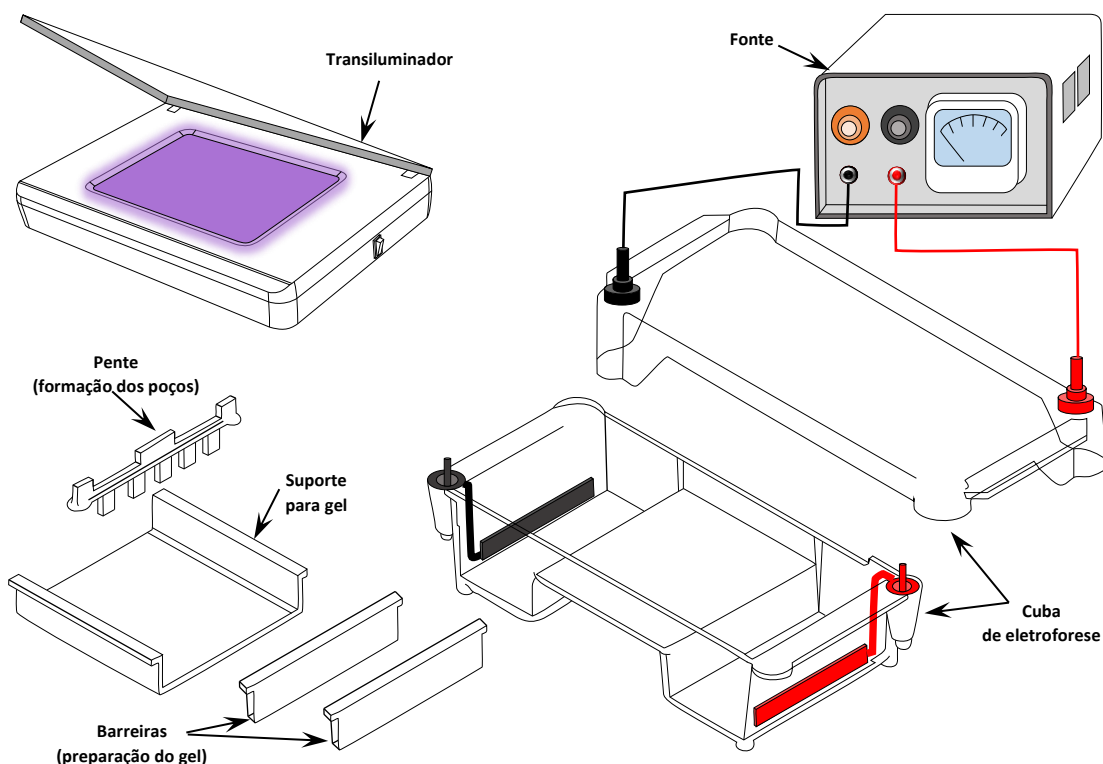
Como mencionado, a matriz rígida é um gel poroso feito de agarose, um polissacarídeo extraído de algas, ou de poliacrilamida, que é obtida a partir da polimerização da acrilamida e da bis-acrilamida. Geralmente os géis de agarose possuem tamanhos de poros maiores que os géis de poliacrilamida, e podem ter sua porosidade ajustada por meio da concentração de agarose (entre 0,8 – 1,5 % em P/V) durante o preparo do gel. Devido seus diferentes graus de porosidades, os géis de agarose e poliacrilamida (sendo também sua porosidade função da concentração) são usados para separar fragmentos de DNA (200 a 5000 pares de base) e proteínas (5 a 2000 kDa), respectivamente (Wilson and Walker 2000, Makovets 2013).

O processo de visualização das moléculas normalmente ocorre através da coloração das mesmas com um corante marcador fluorescente ou não, a depender da molécula. No caso específico da eletroforese em gel de agarose para a visualização de fragmentos de DNA, se faz uso de um marcador fluorescente, que comumente é adicionado ao gel durante seu preparo. Entre os marcadores encontrados comercialmente para essa finalidade, pode-se citar o brometo de etídio, GelRed, Diamond, Sybr Green, Sybr Safe, entre outros (Sheehan 2009). Esses marcadores, chamados de intercalantes, se ligam entre as bases nitrogenadas das cadeias de DNA e exibem uma fluorescência diferenciada nessa condição, por meio aumento da intensidade da mesma (Sheehan 2009,

Makovets 2013). Deste modo, ao se incidir radiação no comprimento de onda de excitação desses corantes, se tem como resultado uma intensa fluorescência na região do gel onde se encontram os diferentes fragmentos de DNA. Além da visualização, ao se adicionar amostras padrões (com tamanhos de fragmentos conhecidos – geralmente obtidas comercialmente) em poços adjacentes, se torna possível ao final da eletroforese determinar de forma comparativa o tamanho dos fragmentos de DNA da amostra em análise.

Como mostrado na Fig. 11, o aparato experimental necessário para se realizar o processo de eletroforese consiste essencialmente de uma cuba, que é um recipiente de suporte com eletrodos que acomoda o gel e o eletrólito (solução tampão de Tris-Acetato-EDTA ou Tris-Borato-EDTA, que permite a passagem de corrente e estabilizar o pH), suportes para a preparação do gel (pentes, barreiras), uma fonte de tensão, e um transiluminador utilizado para revelar as bandas (região do gel onde as moléculas se encontram). Além disso, a eletroforese pode ter a configuração horizontal (Fig. 11), a mais utilizada para amostras de DNA, ou a configuração vertical, normalmente usada para proteínas.

Figura 11 – Equipamentos e acessórios que compõem um sistema de eletroforese de configuração horizontal.



Fonte: O autor (2019)

2.5 ESCHERICHIA COLI

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria pequena, de forma bacilar, com aproximadamente 1 µm de diâmetro e de 2 – 6 µm de comprimento, flagelada ou não, que pertence à família Enterobacteriaceae. Ela é uma bactéria Gram-negativa, que apresenta metabolismo anaeróbio facultativo (na grande maioria são fermentadoras de lactose), não produtora de esporos, e mesófila⁶, com temperatura ótima de 37 – 40 °C para seu crescimento. Ela foi isolada pela primeira vez em fezes de crianças pelo médico alemão Theodor Von Escherich em 1885, que a nomeou de *Bacterium coli commune*, sendo mais tarde (1919) renomeada como *E. coli*, em sua homenagem (Griffiths 2000, Berg 2004, Tenaillon, Skurnik et al. 2010, Donnenberg 2013).

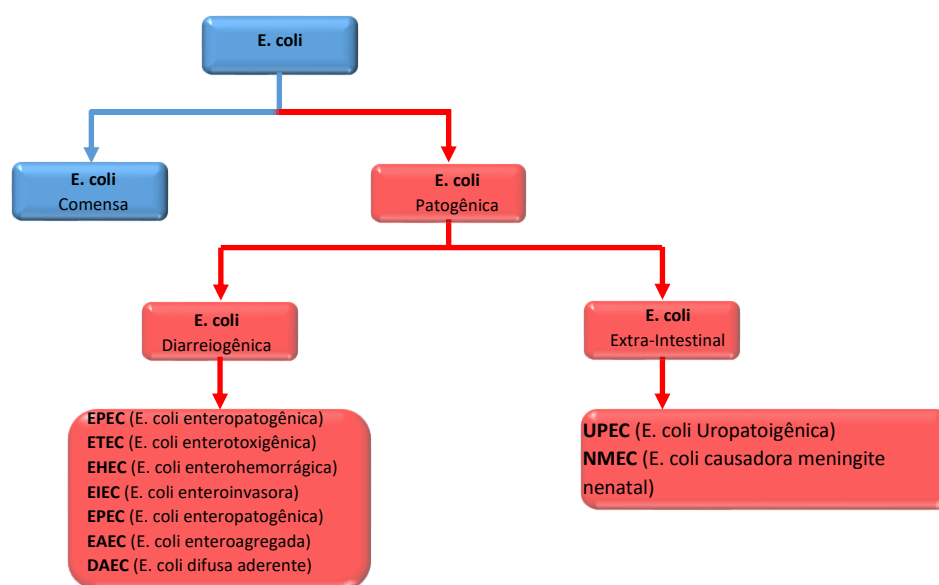
A *E. coli* é o microrganismo comensal mais comum de mamíferos (inclusive no ser humano) e aves, tendo como principal habitat o trato gastrointestinal, colonizando-o nas primeiras horas ou dias após o nascimento, e que se mantém em equilíbrio com o hospedeiro durante toda a vida do mesmo. No entanto, algumas estirpes de *E. coli* podem vir a ser patogênicas, devido ao desenvolvimento de fatores de virulência originados em ganhos genéticos (mutações) ao longo do processo evolutivo da espécie, ou pela transferência horizontal de material genético entre as linhagens. Geralmente estes genes de virulência responsáveis pela expressão de proteínas capazes de promover a invasão e colonização de novos sistemas e tecidos do hospedeiro se situam nas chamadas ilhas de patogenicidade (PAIs, do inglês, Pathogenicity Islands) no cromossomo da bactéria ou, na maioria dos casos, no material genético extra cromossômico (DNA plasmídeo) (Kaper, Nataro et al. 2004, Saviolli 2010, Donnenberg 2013).

Por conta dessas estirpes patogênicas de *E. coli* apresentarem mecanismos de virulência muito específicos, causarem diferentes tipos de infecções, e atacarem várias regiões (sítios), elas são classificadas em patotipos, como pode-se observar no mapa conceitual da Fig. 12. Contudo, de forma prática, esses patotipos são divididos apenas em dois grandes grupos, sendo o primeiro o de estirpes diarreio gênicas, que causam várias infecções intestinais. Como exemplos deste grupo, pode-se mencionar as estirpes O157:H7 e O104:H4, consideradas as mais patogênicas da espécie, que foram responsáveis por inúmeros surtos de infecção alimentar ao redor do mundo, com destaque para casos nos Estados Unidos, Japão, e Escócia (Mead and Griffin 1998, Rangel,

⁶ **Mesófilas** – Constituem um grupo de bactérias que são capazes de se multiplicar entre 10 – 45 °C, sendo a temperatura ideal em torno de 36 °C.

Sparling et al. 2005, Allocati, Masulli et al. 2013). O segundo grande grupo, denominado ExPEC (do inglês, Extraintestinal Pathogenic *E. coli* - ExPEC) é o das *E. coli* responsáveis por infecções fora do ambiente intestinal. As ExPEC respondem por uma grande gama de infecções extraintestinais, que ocorrem através da colonização e disseminação em outros tecidos e sistemas do hospedeiro, como sangue, sistema nervoso, trato urinário, entre outros (Kaper, Nataro et al. 2004, Saviolli 2010, Donnenberg 2013).

Figura 12 – Distribuição dos patotipos de *Escherichia coli*.



Fonte: O autor (2019)

2.6 ELETROFIAÇÃO

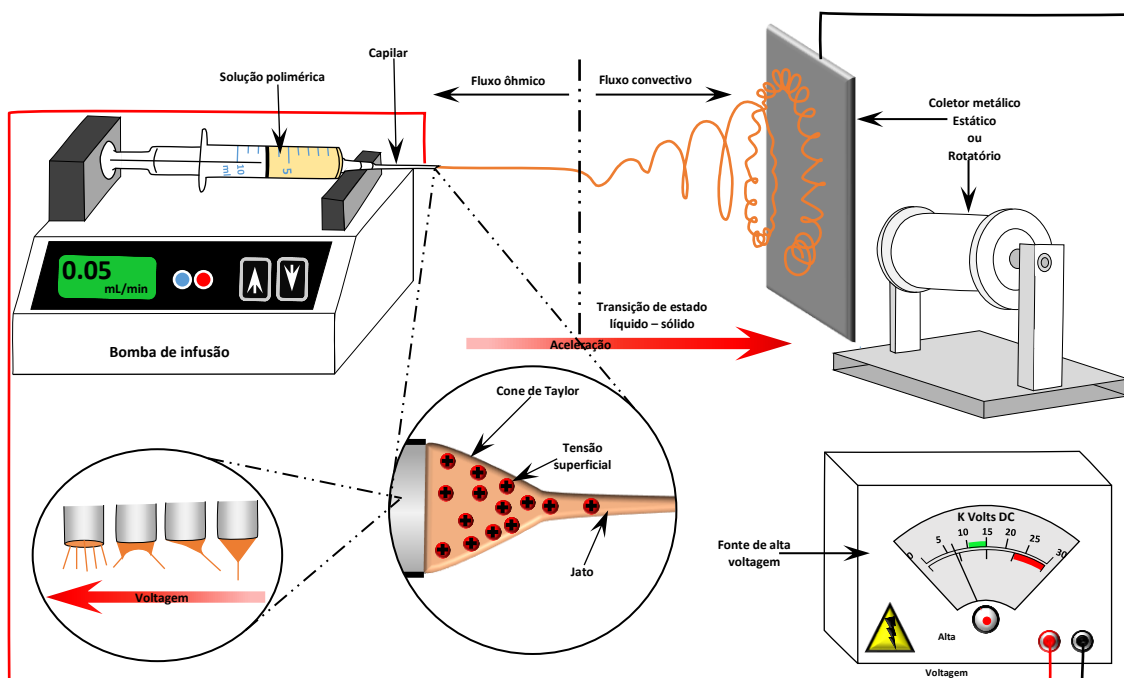
A eletrofiação é uma das técnicas atualmente mais utilizadas para a produção de fibras poliméricas de escala micro e nanométrica. Essa técnica se baseia em um fenômeno eletrodinâmico que consiste no movimento de um dado fluido quando submetido a um campo elétrico. O fenômeno foi registrado pela primeira vez por William Gilbert no final do século XVI, sendo mais tarde também estudado por Rayleigh. Contudo, a descrição do processo e dos aparatos foi somente relatado por Cooley em uma patente da virada do século XIX para o XX (Li and Wang 2013). Posteriormente, Zeleny (1917) seguido por Formhals (1934) conseguem reproduzir os experimentos de Cooley e fazem avanços na técnica no sentido de seu uso comercial. Mais tarde, na década de 60, Taylor faz a descrição fenomenológica por trás da técnica (Stanger, Tucker et al. 2009, Li and Wang 2013, Cavaliere 2016). Entretanto, a eletrofiação ficou fora do radar da academia até meados dos anos 90, quando começou a chamar a atenção através dos trabalhos de

Reneker e colaboradores (Stanger, Tucker et al. 2009). A partir de então, a técnica tem ganhado cada vez mais variações e encontrado inúmeras aplicações acadêmicas, sendo utilizada em aplicações como remediação ambiental, conversão e armazenamento de energia, engenharia de tecidos, sensoriamento, fotocatalise, ótica, catálise, modificação de superfícies, purificação, liberação controlada de drogas, até terapia gênica, entre outras (Wendorff, Agarwal et al. 2012). Além disso, ela tem se estabelecido na indústria em um segmento especializado de filtração e purificação, que é estimado vir a movimentar mais de 1 bilhão de dólares entre 2020 e 2021 (Ghosal, Krasia-Christoforou et al. 2018, Xue, Wu et al. 2019).

Entre as vantagens da eletrofiação, pode-se destacar sua simplicidade, baixo custo, versatilidade experimental e de processamento. Essas características permitem a obtenção de membranas com elevada área superficial, tamanho de poros ajustáveis, boas propriedades mecânicas, flexibilidade, e diferentes morfologias, de acordo com os parâmetros escolhidos. Além disso, a eletrofiação se torna ainda mais robusta devido não só ao grande número de materiais poliméricos sintéticos e naturais que podem ser processados por ela, mas também pela incorporação de nanoestruturas, agentes precursores, grupos funcionais, entre outros, durante o processo de eletrofiação (na solução precursora), ou posteriormente (após a formação da fibra), o que justifica a vasta gama de possibilidade de utilização das membranas eletrofiadas.

Basicamente, um sistema convencional de eletrofiação é baseado em um aparato experimental de quatro componentes; um recipiente com um capilar (tipicamente uma seringa plástica ou de vidro, com uma agulha de ponta metálica), uma bomba de infusão (no caso de um sistema horizontal e outras variantes da técnica), uma fonte de corrente contínua de alta tensão, e um coletor metálico (sendo mais utilizados os estáticos e o rotatório) aterrado, como mostrado na Fig. 13.

Figura 13 – Esquema básico do processo de eletrofiação, e aparato experimental de sistema de eletrofiação com configuração horizontal.



Fonte: O autor (2019)

Em termos fenomenológicos, ao se aplicar uma elevada diferença de potencial (habitualmente superior a 5 kVolts) em uma gota de solução polimérica situada na extremidade de um capilar, a mesma sofre uma deformação de forma cônica (o chamado cone de Taylor) em direção à polaridade oposta (coletor aterrado). Quando o campo elétrico aplicado se torna suficientemente elevado, há o acúmulo de cargas até um ponto em que a tensão superficial da solução que forma a gota é superada. Neste momento, um jato líquido é expelido da superfície da gota e acelerado ao longo do percurso entre o capilar e o coletor. Durante essa trajetória o solvente é evaporado, formando assim um fio (fibra) polimérico sólido que é depositado na superfície do coletor. Esse processo em modo contínuo gera uma malha porosa composta por micro ou nanofibras, de acordo com os critérios utilizados no processo de obtenção.

Como já mencionado, as características morfológicas das fibras obtidas por eletrofiação são afetadas por vários parâmetros experimentais que devem ser controlados de modo preciso. Essencialmente, são três grupos os parâmetros de influência: parâmetros da solução precursora, parâmetros de processamento e parâmetros ambientais. Dentre os parâmetros da solução, tem-se como os mais relevantes a viscosidade da solução, o peso molecular do polímero, a condutividade, tensão superficial, e a constante dielétrica. Por

outro lado, encontra-se que a diferença de potencial, a taxa de injeção da solução, a distância entre capilar e coletor, e o tipo do coletor (estático, ou dinâmico – disco ou cilindro rotatório) são de grande importância dentro dos parâmetros de processamento. Quanto aos parâmetros ambientais, temos como os principais a umidade relativa do ar, a temperatura, e pressão atmosférica (Stanger, Tucker et al. 2009, Wendorff, Agarwal et al. 2012, Ghosal, Krasia-Christoforou et al. 2018, Xue, Wu et al. 2019). Na Tabela 2 é apresentada de forma sucinta a influência de alguns dos principais parâmetros sob a morfológica das fibras eletrofiadas.

Tabela 2 – Influência dos principais parâmetros de Eletrofiação na morfologia das fibras eletrofiadas. Adaptado de (Mitchell 2015).

<i>Parâmetro</i>	<i>Propriedade afetada</i>
Solução	
Viscosidade	• Diâmetro da fibra • Formação de beads (bolas) em competição com a tensão superficial.
Peso molecular	• Influência direta na viscosidade
Concentração do polímero	• Aumento da viscosidade e quantidade de polímero depositado
Condutividade	• Diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da condutividade
Tensão superficial	• Altos valores levam à formação de beads
Processamento	
Tensão	• Diminuição do diâmetro com o aumento da tensão
Distância capilar – coletor	• Diminuição do diâmetro com o aumento da distância
Taxa de injeção	• Taxas baixas impedem a formação do cone de Taylor • Altas taxas aumentam o diâmetro
Ambiente	
Umidade	• Aumento da porosidade por baixa taxa de evaporação do solvente

Temperatura	• Alteração da viscosidade • Mudança do diâmetro

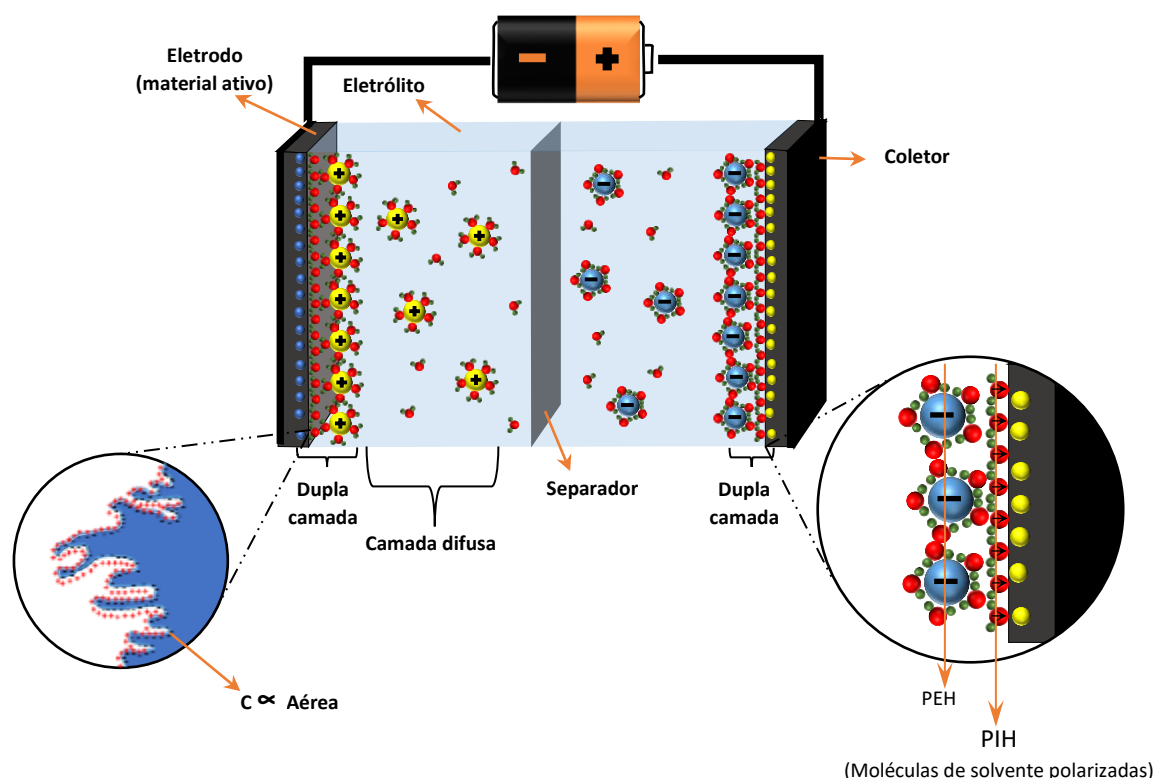
Fonte: O autor (2019)

2.7 CAPACITÂNCIA DE DUPLA CAMADA

A capacitância de dupla camada (EDLC) é um fenômeno eletroquímico de armazenamento de carga eletrostático superficial que ocorre na interface entre um eletrodo e um condutor iônico (eletrólito) (Zhang, Feng et al. 2009, Bagotskiĭ, Skundin et al. 2015). Ele foi inicialmente estudado por Helmholtz, em 1853. Posteriormente, Gouy e Chapman introduzem os efeitos de difusão na formação da dupla camada, não considerados previamente na descrição de Helmholtz. Mais tarde, na década de 1920, essas duas teorias são combinadas por Stern para explicar pontos falhos, como no caso de superfícies altamente carregadas (Yu 2013).

De forma simplificada, quando se tem um dispositivo eletrolítico clássico (formado por dois eletrodos, um separador e um meio eletrolítico), um campo elétrico é aplicado carregando a superfície dos eletrodos. Para manter a interface neutra, a carga distribuída no eletrodo é contrabalaneada por um gradiente de concentração de íons de cargas oposta próximo a superfície do eletrodo. Essa camada de íons, que no limite da interface compõe o plano externo de Helmholtz (PEH), é separada da superfície do eletrodo por uma monocamada molecular de solvente polarizado (formando um dielétrico molecular), sendo essa região chamada de plano interno de Helmholtz (PIH) (Béguin and Frackowiak 2010, Sharma and Bhatti 2010). A espessura dessa dupla camada é dependente da concentração de eletrólitos, do raio iônico e do solvente (responsável por uma esfera de solvatação entorno do íon), podendo variar entre 5 e 10 nm (Zhang, Feng et al. 2009). Deste modo, obtém-se na interface eletrodo-eletrólito a configuração de armazenamento de carga de um capacitor de placas paralelas convencional, com a capacitância sendo uma função do potencial aplicado, concentração iônica do eletrólito e a área superficial do eletrodo (Yu 2013). Como esses dispositivos eletroquímicos são compostos por dois eletrodos, o fenômeno ocorre de forma espelhada no segundo eletrodo (ou seja, com polaridades opostas), sendo a capacitância resultante a junção de dois capacitores em série. Na Fig. 14 é ilustrado de forma simplificada o mecanismo de armazenamento por dupla camada em um dispositivo supercapacitor.

Figura 14 – Esquema ilustrativo de um dispositivo de armazenamento eletrolítico baseado no mecanismo de EDLC.



Fonte: O autor (2019)

Como o armazenamento de carga de dupla camada é um processo de superfície, a área superficial (e, conseqüentemente, a porosidade e o tamanho de poro) dos eletrodos tem um grande impacto na capacitância final dos dispositivos que utilizam esse tipo de mecanismo de acúmulo de carga. Desde o início das pesquisas, e ainda hoje, os materiais baseados em carbono têm sido largamente utilizados na fabricação de eletrodos. Isso se deve a seus altos valores de área superficial, condutividade, tempo de vida (uso), densidade de potência, boa estabilidade química, a grande variedade de nanoestruturas, disponibilidade e custo (Béguin and Frackowiak 2010, Sharma and Bhatti 2010, Yu 2013).

O primeiro dispositivo baseado nesse mecanismo foi desenvolvido inicialmente pela General Electric, em 1957, com o carbono poroso sendo usado como material ativo na fabricação dos eletrodos. No mesmo ano, os primeiros dispositivos foram produzidos de forma efetiva pela Nippon Electric, sendo utilizados em backups de energia de memória em computador; mais tarde, a empresa introduz o termo “Supercapacitor” (Sharma and Bhatti 2010, Bagotskiĭ, Skundin et al. 2015). A partir da década de 80, várias empresas começaram a produzir esses dispositivos comercialmente, e um crescente número de pesquisas tem se concentrado principalmente no desenvolvimento de novos

materiais usados em eletrodos e meios eletrólitos para essa tecnologia (Bagotskiĭ, Skundin et al. 2015).

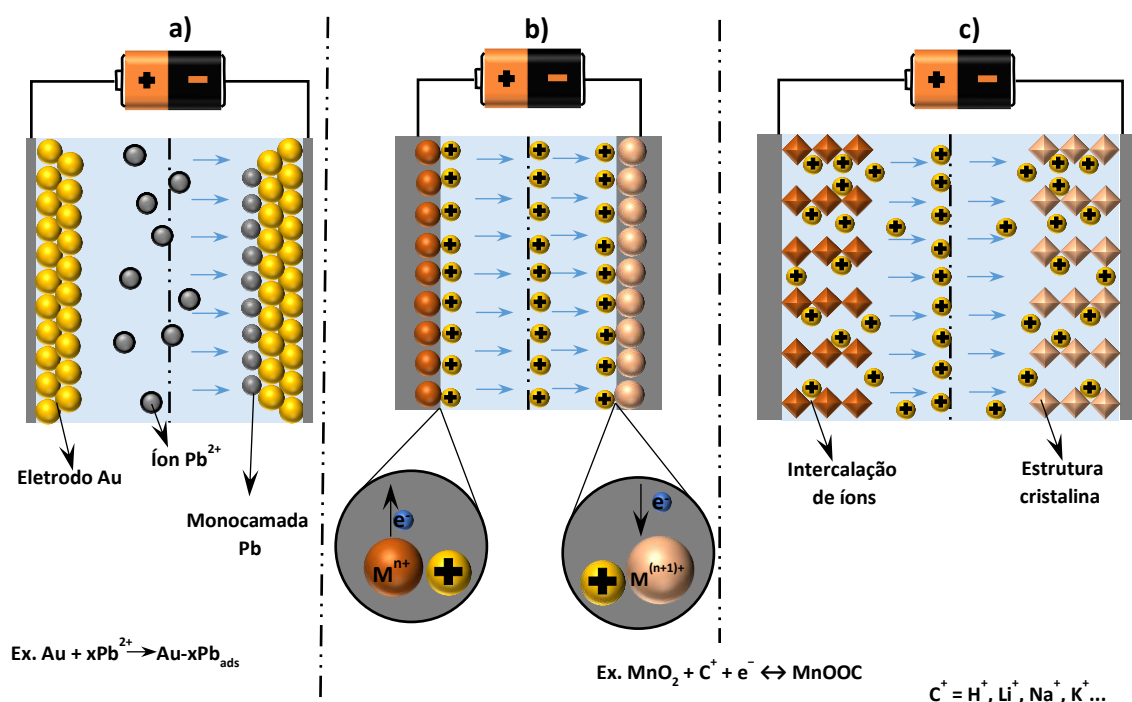
2.8 PSEUDOCAPACITÂNCIA

Diferentemente do fenômeno de dupla camada, a pseudocapacitância consiste no armazenamento faradaico de carga através da transferência de elétrons na interface eletrodo-eletrólito (passagem de carga através da camada dupla) de dispositivos supercapacitores. Esse processo é baseado em reações reversível de oxirredução, eletrossorção ou intercalação (a depender dos materiais que compõem os eletrodos), sendo semelhantes aos que ocorrem em baterias (Costentin and Savéant 2019). Mas ao contrário das baterias, essas reações são rápidas e quase não geram subprodutos, o que garante um maior tempo de vida (ciclos de carga-descarga) (Conway 1999). Esse fenômeno acontece somente em conjunto com o mecanismo EDLC. Ou seja, um dispositivo pseudocapacitivo também apresenta invariavelmente armazenamento por EDLC, sendo sua capacitância total uma soma dessas duas contribuições.

Conceitualmente, o que acontece é que quando um campo elétrico é aplicado, e a dupla camada eletrostática é formada, alguns dos íons conseguem ultrapassar o PIH e são adsorvidos na superfície do eletrodo, transferindo carga para o eletrodo através de reações redox, eletrossorção ou intercalação (Conway and Pell 2003), e gerando uma corrente faradaica. Esses elétrons envolvidos nos processos faradaicos são transferidos para os (ou a partir dos) estados de valência-elétron do eletrodo e fluem através do circuito externo para o eletrodo oposto, onde permanecem nos íons com deficiência de elétrons (como, por exemplo, metais de transição) da superfície fortemente ionizados e do eletrodo, não sendo transferidos para os íons adsorvidos. No caso da pseudocapacitância de eletrossorção (Fig. 15a), sua origem se dá quando íons metálicos adsorvem na superfície de diferentes metais abaixo do seu potencial de redução, como, por exemplo, a deposição de chumbo em eletrodos de ouro. Para o armazenamento por intercalação (Fig. 15c), os íons se intercalam nos túneis ou nas camadas cristalográficas de um material redox-ativo, o que é acompanhado por uma transferência faradaica de carga sem alteração de fase cristalina. Já a pseudocapacitância redox (Fig. 15b) ocorre quando os íons são eletroquimicamente adsorvidos na superfície de material, com uma transferência faradaica concomitante de carga devido a reações moleculares de oxirredução. Esses três mecanismos ocorrem devido a diferentes processos físicos e com diferentes tipos de

materiais; a semelhança nas assinaturas eletroquímicas ocorre devido à relação entre o potencial e a extensão da carga que se desenvolve como resultado de processos de adsorção/dessorção na interface eletrodo-eletrólito ou na superfície interna de um material.

Figura 15 – Esquema representativo dos diferentes mecanismos de armazenamento pseudocapacitivos: eletrossorção a), oxirredução b) e intercalação c).



Fonte: O autor (2019)

Os materiais que exibem pseudocapacitância e que são geralmente utilizados como eletrodos são os óxidos metálicos de transição (RuO_2 , IrO_2 , Fe_3O_4 , MnO_2 , TiS_2) e polímeros condutores, que geralmente são inseridos no material do eletrodo condutor, ou são combinados na forma de compósitos. No caso dos polímeros condutores, as reações redox ocorrem ao longo da conjugação das cadeias poliméricas durante a dopagem-desdopagem eletroquímica. Durante o processo de oxidação (dopagem tipo p), por exemplo, as espécies aniônicas que são inseridas pela extensão da cadeia servem como contra-íons, consequentemente armazenando carga. Essa incorporação e a remoção de íons contrários permitem altos valores específicos de capacitância, semelhantes a uma reação do tipo bateria (Conway 1999).

Os estudos de pseudocapacitância demonstram que esses processos eletroquímicos faradaicos não apenas estendem a tensão de trabalho (faixa de operação), mas também aumentam a capacitância específica dos dispositivos, que pode chegar a valores até 100 vezes maiores que a de dispositivos baseados apenas em armazenamento de dupla camada. Assim como nos EDLC, a pseudocapacitância apresenta uma dependência com o potencial, concentração iônica, e a área e estrutura do eletrodo (Srinivasan 2006). Além disso, como os processos eletroquímicos ocorrem tanto na superfície quanto na massa próxima à superfície do eletrodo, os pseudocapacitores exibem elevados valores de densidade de energia. Contudo, eles apresentam uma densidade de potência relativamente inferior que os supercapacitores EDLC. Isso é uma consequência dos processos faradaicos que são normalmente mais lentos por envolverem reações químicas e difusivas (Costentin and Savéant 2019). Adicionalmente, os polímeros condutores sofrem com alterações volumétricas durante essas reações, o que leva a um menor tempo de vida (Béguin and Frackowiak 2010).

Vale ressaltar que nos últimos anos tem se buscado extensivamente combinar EDLC e pseudocapacitância, seja via compósitos (constituídos por diferentes combinações de nanoestruturas de carbono e materiais pseudocapacitivos) ou dispositivos assimétricos (por exemplo, no caso em que um eletrodo consiste em material de carbono eletrostático, enquanto o outro consiste em material de capacitância faradaica). O desenvolvimento desses dispositivos híbridos visa capitalizar as vantagens de ambos os materiais, possibilitando melhorias como o aumento da janela de operação, maiores densidades de energia e potência, flexibilidade, maior tempo de vida útil, entre outros (Conway and Pell 2003, Costentin and Savéant 2019).

3 SÍNTESE DO NANOCOMPÓSITO γ - Fe_2O_3 /PEDOT E SUA APLICAÇÃO PARA A PURIFICAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

No presente capítulo, apresentaremos os procedimentos experimentais para a síntese de um nanocompósito híbrido formado por nanopartículas magnéticas de maghemita revestidas com o polímero condutor poli (3,4 – etilenodioxitiofeno) (PEDOT). Ainda neste capítulo, serão também discutidos os resultados referentes às caracterizações do material, assim como estudos de adsorção de DNA em meio aquoso. Por fim, serão mostrados os protocolos desenvolvidos para a purificação do DNA extraído de amostras de sangue total e de bactérias, utilizando o nanocompósito como adsorvente em fase sólida, além de estudos comparativos do rendimento correspondente com o de kits comercialmente disponíveis.

3.1 MOTIVAÇÃO

Os ácidos nucleicos (DNA, RNA) são essenciais para a manutenção de todos os organismos vivos. Enquanto o ácido desoxirribonucleico (DNA) é o principal responsável pela transmissão das informações genéticas, o ácido ribonucleico (RNA) pode ter funções distintas, como mensageiro, transportador e ribossomal (isto é, responsável pela síntese de proteínas) (Hall 2011). Desde o início do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular até os dias de hoje, a demanda por protocolos de extração e purificação de ácidos nucleicos é de extrema importância, uma vez que tanto a qualidade quanto a quantidade do DNA de partida nessas técnicas são fatores extremamente críticos para o sucesso das etapas posteriores. Devido à alta susceptibilidade de contaminação (por solventes, proteínas, carboidratos, entre outros) das amostras de partida, muitas dessas técnicas e protocolos, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) acaba sendo inibida (Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008, Wink 2011). Assim, a extração e a purificação é um fator determinante para a qualidade da amostra, sendo a primeira etapa para aplicações tão diversas quanto na área forense, na indústria farmacêutica, em biologia (principalmente em diagnóstico molecular), epidemiologia, e sequenciamento genético (Wink 2011, Rittich and Španová 2013).

Inúmeros protocolos de extração e purificação foram desenvolvidos/usados ao longo dos anos. Contudo, basicamente eles são fundamentados em dois métodos consolidados de extração de ácidos nucleicos, a extração líquido-líquido, e a extração em fase sólida (Tan and Yiap 2009). A extração em fase líquida, a primeira metodologia

desenvolvida, requer um grande número etapas para ser completadas, como centrifugação, filtração, além do uso de solventes orgânicos tóxicos e/ou mutagênicos, como fenol, clorofórmio, e cloreto de cério. Dessa forma, esse método requer maior atenção do operador, uma vez que o descarte desses materiais pode prejudicar o meio ambiente. Além disso, esses solventes podem ser altamente inibidores de técnicas de nível molecular (Wink 2011). Na busca de uma alternativa para diminuir o número de etapas e melhorar a qualidade do DNA extraído, houve o desenvolvimento de metodologias que tem por base o uso de materiais nanoestruturados adsorventes de fase sólida. Inicialmente, foram utilizados materiais à base de sílica, seja na forma de membranas, isto é, em colunas de centrifugação, ou na forma de partículas (Butler 2012). Na literatura, podem ser encontradas referências a outras metodologias, como sistemas de microfluídica (Wen, Legendre et al. 2008), cromatografia (Sousa, Sousa et al. 2012), capilaridade (Wen, Ferrance et al. 2015), nanoestruturas de carbono (Shakhmaeva, Bulatov et al. 2011, Hashemi, Akhavan et al. 2014), resinas de troca iônica (Kristyenne, Candau et al. 2003), entre outras. Ocorre que, apesar desses métodos serem mais eficientes e envolver um menor número de etapas, eles ainda se mostram dispendiosos, devido ao alto custo dos adsorventes usados, e a utilização de solventes tóxicos, como o tiocianato de guanidina.

Nos últimos anos, dentro dos métodos de extração em fase sólida tem adquirido destaque o uso de nanopartículas magnéticas (magnetita, Fe_3O_4 ; maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), por requererem o uso de um menor número de equipamentos e uma maior agilidade do processo, através do uso de um ímã para a separação do adsorvente (ou seja, o nanocompósito utilizado) após a captura da molécula alvo. Além da praticidade operacional, outras vantagens do uso de nanopartículas magnéticas estão associadas à sua baixa toxicidade, biocompatibilidade, baixo custo, elevada área superficial (Reddy, Arias et al. 2012), e a facilidade de modificação da superfície pela incorporação de grupos funcionais que melhoram a interação com moléculas alvos (Rittich and Španová 2013), nesse caso, com DNA especificamente. Entre os materiais reportados para a modificação da superfície das nanopartículas magnéticas para a purificação de DNA, podemos citar a sílica mesoporosa (Zhang, Zhang et al. 2006), polietilenimina (Danthanarayana, Manatunga et al. 2018), polietilenoglicol (Xu, Wang et al. 2017), grupos carboxílicos (Sarkar and Irudayaraj 2008), ácido dimercaptosuccínico (Min, Woo et al. 2014), hidroxiapatita (Shan, Li et al. 2012), ácido salicílico (Zhou, Kadam et al. 2013), estreptavidina (Paul, Avci-Adali et al. 2009), grupos amino (Yoza, Arakaki et al. 2003),

poliamidoamina (Qie, Zhang et al. 2012), polipirrol (Jiang, Zhou et al. 2013), polianilina (da Silva, Maciel et al. 2019) entre outros.

Mais recentemente, o uso dos polímeros intrinsecamente condutores (PICs) como materiais de adsorção tem cada vez mais atraído a atenção em várias áreas, como, por exemplo, na remediação ambiental, onde são utilizados como adsorventes de corantes (Gorza, Pedro et al. 2018), íons de metais pesados (Chávez-Guajardo, Medina-Llamas et al. 2015), pesticidas (Yang, Qiao et al. 2016), hormônio (Nezhadali, Es'haghi et al. 2016), dentre outros contaminantes, e também na imobilização e detecção de biomoléculas (Pedro, Gorza et al. 2019). Este interesse se deve tanto as peculiares propriedades químicas, elétricas, óticas dessa classe de materiais, quanto a fatores como estabilidade ambiental, biocompatibilidade, grande versatilidade de rotas de síntese, e baixo custo (Das and Prusty 2012). Na literatura entre os polímeros condutores utilizados para aplicações biológicas, o Poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT), assim como o Polipirrol e a Polianilina, tem a capacidade de interagir com moléculas de ácidos nucleicos (Alemán, Teixeira-Dias et al. 2009), uma propriedade conveniente para uma adsorção eficiente de DNA. Ocorre, no entanto, que apesar de vários trabalhos fazerem o uso de PICs como adsorvente de biomoléculas, poucos se tem sobre a preparação de materiais compósitos híbridos formados por PICs e nanopartículas magnéticas. Nessa perspectiva, propomos realizar a síntese, caracterização e uso de um novo nanocompósito magnético composto por nanopartículas de maghemita recobertas com o polímero condutor PEDOT como um adsorvente de fase sólida para a purificação de DNA a partir de amostras reais. Como expectativa esse nanocompósito pode ser usado não apenas em uma simples manipulação e separação de ácidos nucleicos, mas também para o desenvolvimento de protocolos mais simples e eficientes para a purificação de DNA.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Os reagentes utilizados em cada experimento estão listados na Tabela. 3, onde são mostrados: o grau de pureza, a origem, e o peso molecular (quando informados pelos fabricantes). Todos os reagentes que eram de grau analítico ou molecular, foram utilizados como adquiridos. Em todos os experimentos foi usada água ultrapura com condutividade de 18 MΩ/cm, obtida após tratamento em um sistema Synergy 185 (Millipore, Estados Unidos).

Tabela 3 – Propriedades dos reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula Molecular	Fabricante	Peso Molecular (g/mol)	Pureza (%)
<i>E. Coli</i> – pUC19 - DH5 α	–	Addgene/EUA	–	–
Meio Luria-Bertani	–	KASVI/BR	–	–
Ampicilina	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	Sigma-Aldrich/EUA	371,39	98,0
Tris Base	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Promega/EUA	121,14	99,9
EDTA	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ Na ₃ O ₈	Dinâmica/BR	358,19	98,0
Ácido Clorídrico	HCl	Química Moderna/BR	36,46	37,0
RNase A	–	Promega/EUA	–	–
Hidróxido de sódio	NaOH	Química Moderna/BR	39,99	97,0
Acetato de potássio	CH ₃ CO ₂ K	AppliChem/AL	98,15	98,0
Ácido acético	CH ₃ COOH	Dinâmica/BR	60,05	99,7
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	Promega/EUA	75,06	99,9
Fosfato monossódico	NaH ₂ PO ₄	Nuclear/BR	119,98	98,0
Fosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	Nuclear/BR	141,96	98,0
Dodecil sulfato de sódio	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Sigma-Aldrich/EUA	288,37	98,0
Metanol	CH ₃ OH	Química Moderna/BR	32,04	98,0
Etanol	C ₂ H ₆ O	Química Nova/BR	46,06	99,3
TAE 40X	–	Promega/EUA	–	99,9
Agarose	–	Promega/EUA	–	99,9
Diamond	–	Promega/EUA	–	99,9
Sybr green	C ₃₂ H ₃₇ N ₄ S+	Invitrogen/EUA	509,73	99,9
Blue/Orange Loading	–	Promega/EUA	–	99,9
Cloreto de sódio	NaCl	Química Nova/BR	58,44	98,0
EDOT	C ₂ H ₄ O ₂ C ₄ H ₂ S	Sigma-Aldrich/EUA	142,17	97,0
Cloreto de ferro (III)	FeCl ₃ • 6 H ₂ O	Dinâmica/BR	270,33	98,0

Fonte: O autor (2019)

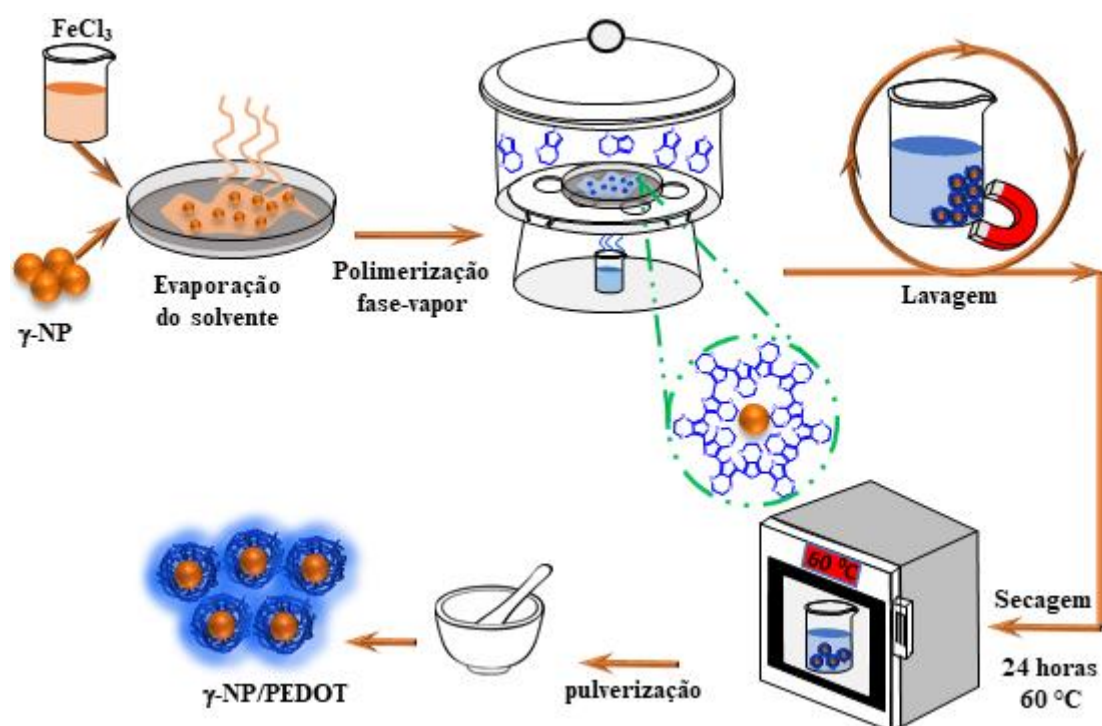
3.2.2 Síntese do nanocompósito magnético γ -NPs/PEDOT

Para um melhor fluxo de leitura e organização, a síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de ferro utilizadas como núcleo magnético na síntese, tanto do γ -NPs/PEDOT como dos outros nanocompósitos desenvolvidos ao longo desta tese, estão descritas no Apêndice A.

Para a obtenção do nanocompósito γ -NPs/PEDOT através do recobrimento das γ -NPs por uma camada polimérica adotamos, a rota de polimerização em fase vapor do monômero de 3,4-etilenodioxitiofeno (Madl, Kariuki et al. 2011). Assim, 60 mg de γ -NPs foram dispersados em 3 mL de uma solução 0,2 M de FeCl₃ em metanol. Em seguida, essa dispersão foi colocada em uma placa petri de vidro (60 mm de diâmetro) e levada a uma capela por 180 min para a evaporação do solvente. Posteriormente, a placa foi transferida para um dessecador, e um volume de 60 μ L do monômero de EDOT foi colocado na parte inferior do dessecador. O sistema foi fechado e colocado sobre

uma placa aquecedora a 100 °C, com a reação de polimerização deixada ocorrer por um período de 6 h. Após este período, a placa é retirada do dessecador, e deixada secar por 24 h na capela, para que o polímero se fixe melhor na superfície das γ -NPs. Depois o γ -NPs/PEDOT foi lavado uma vez com metanol (150 mL) e três vezes com água ultrapura, em cada lavagem o nanocompósito sendo confinado magneticamente, e descartado o sobrenadante. Por fim, o nanocompósito γ -NPs/PEDOT recolhido foi deixado por 24 h na estufa a 60 °C e pulverizado com almofariz, do que resultou um pó fino preto. Na Fig. 16 apresentamos de forma esquemática as principais etapas seguidas para a obtenção do γ -NPs/PEDOT.

Figura 16— Representação esquemática das principais etapas da síntese por fase-vapor do nanocompósito γ -NPs/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

3.2.3 Métodos de caracterização

3.2.3.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A identificação química das γ -NPs e do nanocompósito γ -NPs/PEDOT foi realizada através da técnica de espectroscopia no infravermelho. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier *IRTracer*-

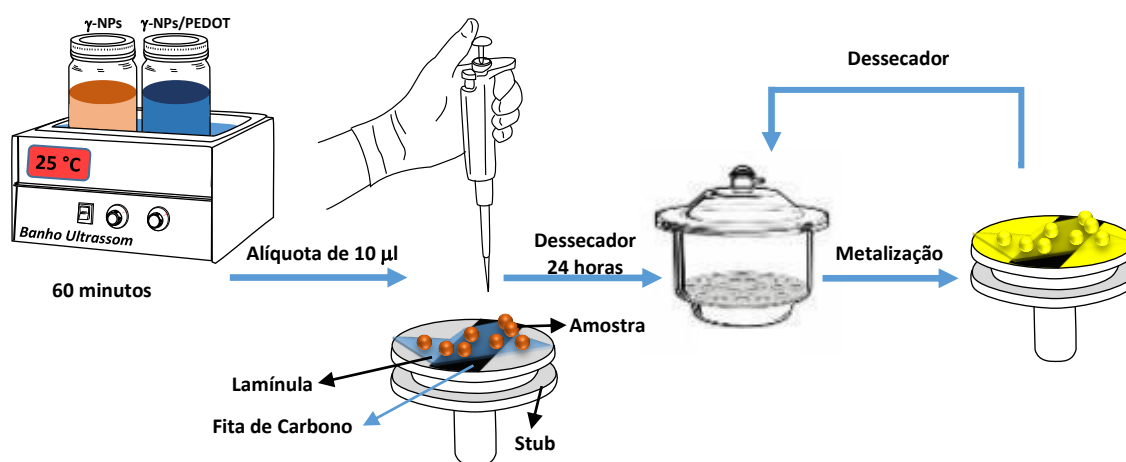
100 (Shimadzu, Japão), no intervalo de 400 – 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , e com 64 varreduras consecutivas. As amostras foram preparadas em pastilha de KBr, que foram obtidas pela adição de 1mg do material em 50 mg de KBr, seguida da maceração em almofariz e prensagem por 10 minutos com uma carga de 2 toneladas.

3.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O estudo das características morfológicas das nanopartículas e dos nanocompósitos foi realizado por MEV. O equipamento utilizado foi um *Mira3-LM* (TESCAN, República Checa), cujo emissor de feixe de elétrons era um FEG (do inglês, Field Emission Gun) de efeito Schottky.

A preparação das amostras envolvem várias etapas. Inicialmente 1 mg do material foi adicionado em 5 mL de álcool isopropílico e disperso em banho ultrassônico por 60 min. Posteriormente, um volume de 10 μL foi depositado com o auxílio de uma micropipeta sobre a superfície de uma lamínula fixada com fita de carbono em um suporte de alumínio. Esse suporte foi então colocado em um dessecador por 24 h para total evaporação do solvente ou de qualquer umidade que pudesse estar presente na amostra. Por último, as amostras foram metalizadas com uma camada de ouro ($\sim 10 \text{ nm}$) em uma metalizadora *Quick Coater SC-701* (Sany Electron, Japão), durante 30 s com uma corrente de 40 mA e atmosfera de argônio. Todo o procedimento está mostrado de maneira simplificada na Fig. 17.

Figura 17 – Procedimento de preparação das amostras (γ -NPs e γ -NPs/PEDOT) para MEV.



Fonte: O autor (2019)

3.2.3.3 Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM)

As propriedades magnéticas das γ -NPs e nanocompósito γ -NPs/PEDOT foram determinadas a partir de curvas de magnetização de saturação. A técnica utilizada foi a magnetometria de amostra vibrante, na qual a amostra é submetida a um campo magnético externo crescente até sua completa magnetização (saturação), quando, em seguida, um campo de sentido oposto é aplicado, de modo a permitir a obtenção da curva de histerese magnética, permitindo a obtenção de magnetização de saturação, magnetização remanescente e campo coercitivo (Zijlstra 1967). As medidas magnéticas das amostras foram realizadas em um magnetômetro EV7 (*Microsense, Estados Unidos*), pelo professor Alexandre Ricalde do Departamento de Física da UFPE.

3.2.4 Uso do nanocompósito γ -NPs/PEDOT como adsorvente de fase sólida de DNA

Nessa seção do trabalho serão apresentados os procedimentos experimentais adotados para a adsorção de DNA em soluções aquosas e a purificação de DNA total a partir de amostras biológicas, sendo os referentes resultados mostrados na Seção 2.3. Para uma melhor organização dos procedimentos, a descrição dos modos de preparação de todas as soluções utilizadas ao longo da tese para sistemas biológicos são mostrados no Apêndice B.

3.2.4.1 Experimentos de adsorção

Após a produção do nanocompósito γ -NPs/PEDOT, realizamos uma série de experimentos de adsorção usando como sistema modelo uma solução de DNA de espermatozoides de salmão em meio aquoso, a fim de determinar os melhores parâmetros físico-químicos para a adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT. Durante os experimentos, a capacidade de adsorção foi monitorada através da medida de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), no comprimento de onda de 260 nm característico da absorção dos ácidos nucleicos. Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro para pequenos volumes NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher, Estados Unidos*).

3.2.4.1.1 Influência do pH

Inicialmente, o primeiro parâmetro a ser investigado foi a influência do pH do meio sobre a capacidade de adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT. Para isso, soluções de ligação (Glicina-HCl) com diferentes valores de pH preparadas (2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0;

5,0; 6,0). Em seguida, em um frasco de vidro contendo 4 mg do nanocompósito γ -NPs/PEDOT foram adicionados 5 mL da solução de ligação e 5 mL de uma solução aquosa de DNA (200 ng/ μ L) e, subsequentemente, as amostras são colocadas em agitação no orbital (modo batelada) por 2 h a 300rpm. Após esse período de interação, o γ -NPs/PEDOT foi separado com o auxílio de um ímã, com uma pequena alíquota sendo retirada para determinar a concentração de DNA após a interação.

Para a determinação da eficiência de adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT, usamos a relação (Maciel, da Silva et al. 2018)

$$\%Adsorção = \frac{(C_i - C_f)}{C_f} \times 100, \quad (3.1)$$

onde C_i e $[C_f]$ é a concentração inicial e [final] (mg/L) de DNA presente na solução.

3.2.4.1.2 Influência do tempo de interação

Após termos estabelecido o melhor valor de pH do meio, realizamos o experimento de tempo de interação para determinar a cinética de adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT. Esse experimento consistiu em adicionar 5 ml de solução de ligação (Glicina-HCl, pH, 2,5) e 5 ml de solução aquosa de DNA de salmão (400 ng/ μ L) em frascos contendo 4 mg de γ -NPs/PEDOT. Em seguida, os frascos foram colocados sob agitação a 300 rpm (em modo batelada), e a eficiência de adsorção foi monitorada ao longo do tempo através da retirada de pequenas alíquotas (2 μ L) para a obtenção de espectros de absorção (260 nm) UV-Vis.

3.2.4.1.3 Influência da concentração inicial de DNA e capacidade de adsorção

Uma vez determinado o tempo necessário para que as cadeias de DNA adsorvidas pelo γ -NPs/PEDOT atingisse o equilíbrio pelo estudo da cinética do processo correspondente, realizamos experimentos para identificar a influência da concentração inicial de DNA sobre a capacidade de adsorção do nanocompósito. Para esses experimentos, soluções aquosas com diferentes concentrações de DNA de salmão foram preparadas (100, 200, 300, 400, 500, 600, e 800 ng/ μ L). Em seguida, em diferentes frascos de vidro contendo 4 mg de γ -NPs/PEDOT foram adicionados 5 mL da solução de ligação (Glicina-HCl, pH 2,5) e 5 mL de uma das soluções de DNA. Os frascos foram então colocados em agitação orbital por 360 min a 300 rpm, após o γ -NPs/PEDOT foi

separado magneticamente da solução com o auxílio de um ímã. Por fim, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e analisada por espectroscopia UV-Vis para a determinação da concentração de DNA ainda em solução.

A capacidade de adsorção (q_e) de DNA do nanocompósito, que é a quantidade de DNA (mg) adsorvida por unidade de massa (g) do material adsorvente (γ -NPs/PEDOT) pode ser estimada como (Maciel, da Silva et al. 2018)

$$q_e = \frac{V(C_i - C_e)}{m}, \quad (3.2)$$

onde V é o volume de solução (L), m a massa do adsorvente (g), e C_i e C_e a concentração de DNA (mg/L) inicial e no equilíbrio, respectivamente. Para o valor de capacidade de adsorção em um tempo t, temos que,

$$q_t = \frac{V(C_i - C_t)}{m}, \quad (3.3)$$

onde C_t é a concentração (mg/L) de DNA na solução no instante t.

3.2.4.1.4 Experimento de dessorção

Uma vez definidos os parâmetros relevantes para o processo de adsorção, realizamos experimentos para estabelecer a eficiência de dessorção do DNA da superfície do γ -NPs/PEDOT, pois assim como no caso da adsorção, uma dessorção eficiente é crucial para uso adequado em protocolo de purificação que permite um elevado grau de liberação das cadeias de DNA para aplicações posteriores.

Dessa forma, em um microtubo de 2 mL contendo 4 mg do γ -NPs/PEDOT adicionamos 500 μ L da solução de ligação (Glicina – HCl, pH 2,5) e 500 μ L de uma solução de DNA de esperma de salmão com concentração de 200ng/ μ L, de modo a obter no final uma solução com volume de 1 mL, com uma concentração de DNA de aproximadamente 100 ng/ μ L. O γ -NPs/PEDOT foi então deixado interagir por 10 min com a solução, sendo que nos primeiros 15 s de cada minuto o microtubo é colocado em agitação em vortex, e depois submetido a inversões manuais sucessivas nos 45 s restante, até o próximo minuto. Este ciclo foi repetido por 10 vezes no total. Em seguida, o nanocompósito foi confinado magneticamente, sendo o sobrenadante transferido para um microtubo limpo. Após isso, 1 mL da solução de eluição ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,8) foi acrescido ao microtubo contendo o γ -NPs/PEDOT, que foi agitado em vortex por 30 s e deixado em repouso por 5 min para que o processo de dessorção do DNA viesse a

ocorrer. O γ -NPs/PEDOT foi então imediatamente confinado mais uma vez com o auxílio de um ímã, e o sobrenadante transferido para um segundo microtubo. Por fim, as duas amostras (isto é, de adsorção e de dessorção) tiveram seus espectros UV-Vis tomados para a determinação da eficiência (%) de dessorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT.

A escolha da solução de fosfato como solução de eluição se baseou na hipótese de que a interação entre as cadeias de DNA e o PEDOT fossem de caráter eletrostático (por troca iônica) entre os grupos fosfatos do DNA e as cargas positivas distribuídas ao longo da cadeia polimérica. Sendo assim, a troca dos íons de fosfato da solução de eluição pelos fosfatos da cadeia de DNA será favorecido devido ao tamanho e mobilidade dos íons livres na solução.

3.2.4.1.5 Experimento de concentração de amostras de DNA

Uma importante característica adicional do nanocompósito que investigamos foi a possibilidade de que pudesse vir a ser utilizado para concentrar amostras de DNA, uma vez que essa propriedade poderia vir a ter aplicações relevantes como, por exemplo, na área de ciência forense por conta de más condições e reduzida quantidade das amostras, e na área de biopsia líquida (van Oorschot, Ballantyne et al. 2010, Elazezy and Joosse 2018).

Para esses experimentos, adotamos o seguinte procedimento. Primeiramente, em um microtubo de 2 mL contendo 4 mg do γ -NPs/PEDOT foram acrescidos 500 μ L de uma solução de ligação (Glicina – HCl, pH 2,5) e 500 μ L de uma solução aquosa de DNA de espermatozoides de salmão (200 ng/ μ L). Posteriormente, a interação foi deixada ocorrer por um tempo de 10 min, de acordo com os passos descritos na Seção 2.2.4.1.4. Após a interação, o nanocompósito foi confinado magneticamente, e o sobrenadante descartado, sendo então um volume de 500 μ L de solução de eluição ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,8) adicionado ao microtubo contendo o nanocompósito. O microtubo foi então agitado em vortex por 30 s, e deixado em repouso por 5 min para que a dessorção viesse a acontecer. Finalmente, o γ -NPs/PEDOT foi mais uma vez confinado, com o sobrenadante sendo transferido para um novo microtubo, de onde uma alíquota foi retirada para uma medida de UV-Vis de modo a determinar a concentração de DNA. Esse procedimento foi também repetido para o caso em que volumes de eluição de 250, 100, e 50 μ L foram usados.

3.2.4.1.6 Experimento de reutilização

Como uma última análise com base no sistema modelo estudado (DNA de esperma de salmão em meio aquoso), exploramos o desempenho do γ -NPs/PEDOT quando usado em sucessivos ciclos de adsorção/dessorção de DNA. Uma boa resposta levaria a um aumento da eficiência do material, da versatilidade de mais aplicações, e a diminuição da quantidade de rejeitos. Ao mesmo tempo isso poderia nos permitir uma melhor compreensão dos mecanismos de adsorção envolvidos. Para isso, submetemos o γ -NPs/PEDOT a quatro ciclos consecutivos de adsorção/dessorção de DNA, sempre de acordo com o procedimento detalhado na Seção 2.2.4.1.4.

3.2.4.2 Purificação de DNA de amostras de sangue total

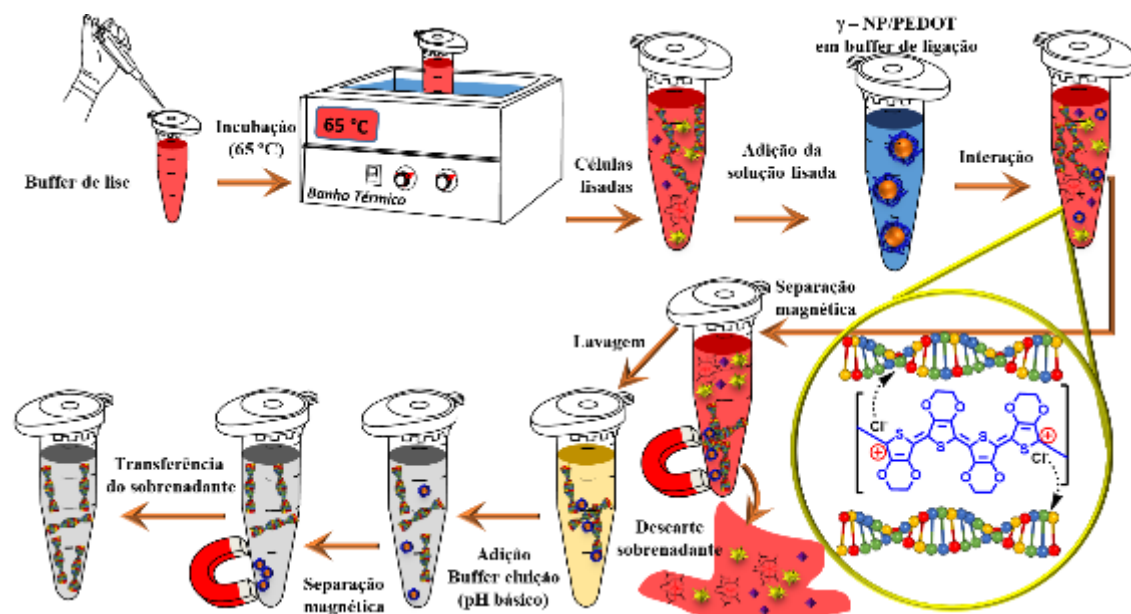
Depois de realizarmos os experimentos de adsorção/dessorção do nanocompósito usando o sistema modelo de DNA de esperma de salmão encontrar as condições ótimas para que esses processos ocorram e comprovar sua capacidade efetiva de adsorver DNA, desenvolvemos um protocolo segundo o qual o γ -NPs/PEDOT pudesse ser usado para purificar DNA de amostras de sangue total. Esse protocolo é mostrado a seguir, enquanto que como mencionado anteriormente, a preparação das soluções utilizadas são descritas no Apêndice B.

1. Em um microtubo de 2 mL adicionou-se 5 μ L de proteinase K (26 mg/mL);
2. Adicionou-se 50 μ L de sangue seguido de 500 μ L da solução de lise (Buffer BLS);
3. Homogeneizar em vortex por 15 s e colocar em banho maria a 65 °C por 10 min;
4. O microtubo foi retirado e deixado atingir a temperatura ambiente.
5. Em um segundo microtubo de 2 mL contendo 4 mg de nanocompósito, foi adicionado 1,2 mL de solução de ativação (Glicina-HCl-NaCl, pH 3,2).
 - Agitou-se o microtubo em vortex por 10 s.
6. Foi então adicionado a solução com o material lisado (~ 600 μ L) no microtubo.
7. A interação foi deixada ocorrer por 10 min sob agitação, em que o microtubo foi submetido ao vortex nos primeiros 15 s de cada minuto, e então as inversões sucessivas até o próximo minuto.
8. Separou-se o nanocompósito com o auxílio de um ímã, sendo descartada a solução do microtubo.

9. Adicionou-se 900 μL de solução de lavagem (CH_3COOK – Tris – EDTA – Etanol).
 - O microtubo foi submetido ao vortex por 15 s.
 - Separou-se o nanocompósito com o auxílio de um ímã, e se descartou a solução sobrenadante do microtubo.
10. O procedimento do passo 9 foi repetido por 3 vezes.
11. O microtubo foi deixado aberto por 5 min para a evaporação de qualquer resíduo de etanol.
12. Foi adicionado 100 μL de solução de eluição (fosfato/fosfato, pH 7,8).
 - O microtubo foi submetido ao vortex por 15 s
 - Deixou-se a solução interagir por 10 min sob repouso.
 - Uma segunda agitação em vortex foi realizada por 15s.
 - Com o auxílio de um ímã, separou-se o nanocompósito na parte inferior do microtubo.
13. Por fim, o sobrenadante (amostra) foi transferido para um microtubo esterilizado e armazenado sob refrigeração.

Mais detalhadamente e resumido, o protocolo pode ser descrito em quatro principais etapas; (i) lise celular (etapas de 1 – 4 descrito acima) onde o surfactante (Triton 1%) e o aquecimento permitiu a quebra da parede das células, expondo todo o material genético e organelas, (ii) captura do DNA (5 – 8), com o DNA sendo adsorvido na superfície do γ -NPs/PEDOT, (iii) lavagem (9 – 11), para a retirada de contaminantes celulares e reagentes, e, por último, (iv) eluição (12 – 13), com as moléculas de DNA sendo desorvidas da superfície do γ -NPs/PEDOT. Na Fig. 18 apresentamos de forma esquemática os principais passos do protocolo de purificação magnética por nós desenvolvido com base no uso dos nanocompósitos γ -NPs/PEDOT. Em seguida, as amostras foram utilizadas para estudos de biologia molecular e espectroscópicos de modo a determinar a quantidade e a qualidade das amostras de DNA obtidas através desse protocolo de purificação.

Figura 18 – Representação esquemática das principais etapas do protocolo de purificação de DNA a partir de amostras de sangue total humano.



Fonte: O autor (2019)

3.2.4.2.1 Efeito do pH da solução de ligação

Estabelecido uma primeira versão do protocolo de purificação, realizamos uma série de experimentos com o intuito de encontrar as condições ótimas para purificação de DNA a partir de amostras de sangue total. Como no sistema modelo, o primeiro deles foi o estudo da influência do pH do meio. O valor de pH (2,0; 2,5; e 3,2) foi então ajustado com a adição de pequenas alíquotas de HCl (0,1M) na solução de ligação (Glicina-HCl-NaCl). Após o ajuste para cada solução, foi realizado o protocolo de purificação com volume de sangue de 100 μ L e com as amostras sendo medidas através de espectroscopia UV-Vis e eletroforese em gel de agarose.

3.2.4.2.2 Efeito do volume inicial da amostra

Outro fator importante que avaliamos foi a resposta em termos de rendimento e de qualidade do DNA obtido com o protocolo de purificação, em função da quantidade inicial de sangue utilizada. Para isso, realizamos purificações seguindo o protocolo da Seção 2.2.4.2 utilizando os volumes de 25, 50, 100, 150, e 200 μ L de sangue.

3.2.4.2.3 Efeito do volume de eluição

Nestes experimentos, examinamos qual a influência do volume de solução de eluição sobre a concentração final de DNA da amostra e o rendimento obtido. Assim, implementamos purificações de acordo com o protocolo da Seção 3.2.4.2 utilizando volumes de 25, 50, 100, 150, e 200 μL de solução na etapa de eluição.

Outro parâmetro explorado foi a possibilidade da realização de múltiplas etapas de eluição no nanocompósito em uma mesma purificação, de modo a aumentar o rendimento total de DNA purificado. Para isso, foram realizadas purificações de acordo com o descrito na Seção 3.2.4.2, com a etapa de purificação sendo repetida por três vezes consecutivas.

3.2.4.2.4 Estudo de inibição da reação PCR

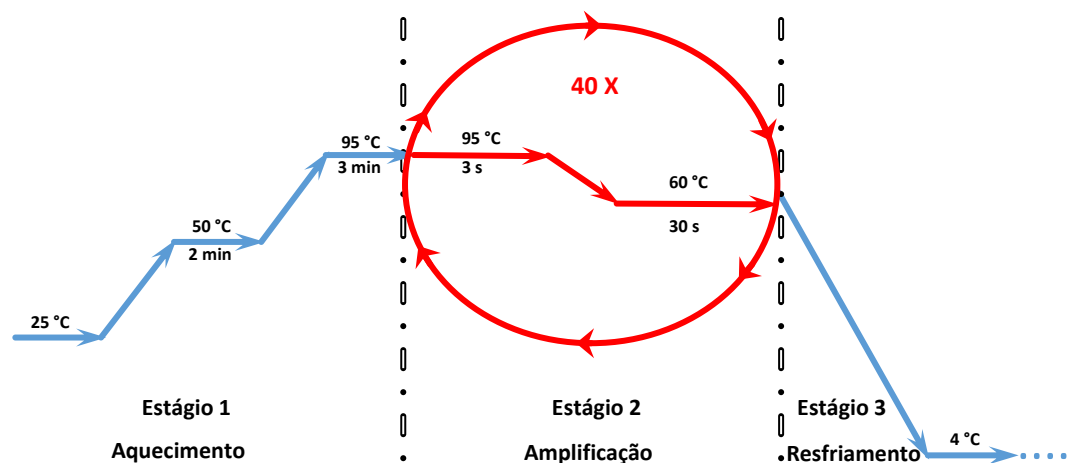
Uma análise importante a ser realizada corresponde ao estudo da validação da qualidade do DNA purificado com base em técnicas de biologia molecular, uma vez que a utilização das amostras obtidas na maioria dos casos é direcionada a este fim, como em casos de diagnóstico de doenças, genotipagem, análises forenses e identificação de paternidade, entre outros. Como já discutido anteriormente, a técnica de biologia molecular mais utilizada é a reação de PCR, que é altamente sensível, confiável e reprodutível (Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008). Contudo, esta técnica é bastante sensível no que se refere às condições da amostra, ou seja, a reação de PCR é susceptível a um grande número de interferentes (como a qualidade da amostra de partida) que podem vir a impedir que a mesma ocorra. Desse modo, a reação de PCR é uma técnica muito significativa para validar a qualidade da amostra coletada pelo uso do nosso nanocompósito.

Dessa maneira, após a purificação do DNA a partir de sangue total realizamos ensaios de amplificação PCR utilizando as amostras coletadas. Além disso, de modo a comprovar que o nanocompósito γ -NPs/PEDOT utilizado como material adsorvente não seria capaz de impedir a reação em cadeia da polimerase, quanto examinar se a etapa de eluição do DNA poderia ser eliminada, realizamos experimentos nos quais após a etapa de adsorção do DNA de sangue, e terem sido realizadas as lavagens, submetemos uma pequena quantidade de γ -NPs/PEDOT com o DNA capturado diretamente ao procedimento de amplificação por PCR.

A técnica PCR usada foi a reação em tempo real (qPCR), uma vez que com ela é possível o monitoramento durante todo o processo da reação através da fluorescência. A amplificação foi realizada em um termociclador *StepOnePlus* (*Applied Biosystems, Estados Unidos*). O conjunto de primers utilizado foi um padrão do gene da β -actina, adquiridos comercialmente (*Invitrogen, Estados Unidos*), sendo sua sequência mostrada no protocolo a seguir, que descreve o procedimento de preparação da mastermix (solução de reação qPCR).

- Adiciona-se 100 μ L de fast SYBR Green (*AppliedBiosystems, Estados Unidos*) em um microtubo com capacidade para 500 μ L.
- Adiciona-se 55 μ L de água livre de RNase (*Promega, Estados Unidos*).
- Adicionou-se 15 μ L do primer sentido (Forward) (5'- CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC -3'), com concentração de 10 pmol.
- Adicionou-se 15 μ L do primer anti-sentido (Reverse) (5'- CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'), com concentração de 10 pmol.
- Submeteu-se o microtubo a uma agitação vortex por 10 s.
- Transferiu-se 23,5 μ L para 10 diferentes poços de uma placa ótica de reação PCR.
- Acrescentou-se 1,5 μ L de água livre de RNase em dois poços, que passam a ser utilizados como controle negativo.
- Acrescentou-se 1,5 μ L das amostras de DNA purificados e eluídas com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT em quatro poços.
- Com o auxílio da ponteira da micropipeta, adicionou-se uma pequena quantidade de γ -NPs/PEDOT com DNA adsorvido nos quatro poços restantes. As condições de ciclagem empregadas para a realização da amplificação são detalhadas a seguir, e estão representadas no diagrama mostrado na Fig. 19:
 - I. 50 °C por 2 min.
 - II. 95 °C por 3 min.
 - III. 40 ciclos sequenciais de 95 °C por 3 s, 60 °C por 30 s.
 - IV. Arrefecimento a 4 °C.

Figura 19 – Diagrama do procedimento executado (ciclagem) para a amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real para as amostras de DNA purificadas com o γ -NPs/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

Após a amplificação por PCR, as amostras foram purificadas utilizando o kit QIAquick PCR (Qiagen, Estados Unidos), e por fim, realizamos análises de espectrofotometria ($\lambda=260$ nm) e eletroforese para verificar o rendimento, a qualidade, e o tamanho do fragmento do DNA amplificado.

3.2.4.2.4.1 Eletroforese em gel de agarose

Como já indicado anteriormente, a técnica de eletroforese, foi utilizada para que pudéssemos monitorar o grau de pureza do DNA coletado pelo uso do protocolo de separação magnética baseado no γ -NPs/PEDOT, e também para identificar o tamanho dos fragmentos obtidos após as amplificações por PCR. Além disso, este protocolo foi utilizado em outros estudos nos Capítulos 4 e 5 desta tese. Os experimentos foram realizados em uma cuba de eletroforese horizontal K33-15H (Kasvi, Brasil). A metodologia seguida foi:

1. Separadamente, montamos todos os acessórios (barreiras e pente) no suporte (15x15 cm) para a formação do gel de agarose.
2. Preparou-se 1 L de solução TAE 0,5 X a partir da solução estoque TAE 40 X (Promega, Estados Unidos).
3. Pesou-se 1 g de agarose, que foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL.
4. Foi adicionado 100 mL da solução de TAE 0,5 X no erlenmeyer contendo a agarose.

5. Levou-se o erlenmeyer ao forno de micro-ondas por 1 min, até ocorrer a completa dissolução da agarose.
6. Agitou-se o erlenmeyer em movimentos circulares suaves para homogeneizar a solução.
7. Deixou-se a solução atingir uma temperatura por volta de 37 – 40 °C.
8. Adicionou-se 10 µL do corante de ácidos nucleicos Diamond (*Promega, Estados Unidos*).
9. Agitou-se o erlenmeyer em movimentos circulares suaves para homogeneizar a solução.
10. Verteu-se a solução de agarose cuidadosamente, para não formar bolhas dentro do suporte (15x15 cm) contendo o pente.
11. Esperou-se 30 min para que ocorresse a polimerização da agarose.
12. Retirou-se as barreiras do suporte.
13. Colocou-se o suporte dentro da cuba de eletroforese.
14. Encheu-se a cuba com a solução de TAE 0,5 X até cobrir o gel.
15. Retirou-se cuidadosamente o pente que forma o poço no gel.
16. À parte, foi depositado em parafilm 2 µL do carregador Blue/Orange 6X (*Promega, Estados Unidos*) e, em seguida, adicionou-se 8 µL da amostra de DNA.
17. Com o auxílio de uma micropipeta misturou-se as amostras com o carregador, e posteriormente colocou no poço do gel de agarose.
18. Após a adição do número desejado de amostras nos poços do gel, foram repetidos os passos 17 e 18, substituindo o DNA das amostras por DNA Ladder 1Kbp (*Promega, Estados Unidos*).
19. Tampou-se a cuba.
20. Uma vez que tenha sido devidamente conectados os cabos à fonte de tensão, aplicamos uma diferença de potencial de 60 Volts por 10 min.
21. Após este período, a diferença de potencial foi aumentada para 100 Volts, por um período de tempo entre 1 – 2 h, até que a parte amarela (visível) do carregador estivesse a poucos milímetros do fim do gel.
22. Cuidadosamente, transferiu-se o gel para um transiluminador ultravioleta (302 nm) - em nosso caso o *MB-16 (Maestrogen, Estados Unidos)*.
23. Por fim, as imagens foram adquiridas com o uso de uma câmera digital.

3.2.4.2.5 Estudo comparativo com kits comerciais

Com o propósito de determinar o quanto nosso protocolo é viável, e permitir que pudesse ser feito um comparativo do rendimento e da qualidade do DNA purificado a partir de amostras de sangue com o γ -NPs/PEDOT com o de kits comerciais, nós usamos 4 kits de purificação magnética de DNA disponíveis no mercado, sendo o Maxwell[®] e o MagaZorb[®] (Promega, Estados Unidos), o MagAttract (Qiagen, Alemanha), e o Dynabeads (Thermo Fisher, Estados Unidos). Todos os experimentos foram realizados com o volume da amostra (sangue) sendo fixado em 100 μ L, e a purificação com cada um dos kits foi implementada de acordo com as instruções dos fabricantes. Após a purificação, as diferentes amostras foram submetidas a análises de UV-Vis, eletroforese e PCR, com a finalidade de quantificação do rendimento, pureza, e qualidade de cada uma delas.

Um estudo adicional que realizamos foi a análise da estabilidade do nanocompósito γ -NPs/PEDOT no que se refere ao tempo de prateleira, mais especificamente, durante quanto tempo após a síntese permaneceu ainda o material utilizável para a aplicação proposta. Para isso, foram realizadas purificações ao longo de um período de 12 meses seguindo o protocolo da Seção 2.2.4.2, com o γ -NPs/PEDOT usado sendo sempre da mesma amostra original. A cada purificação realizada dentro deste intervalo de tempo, tanto as amostras de sangue, quanto as soluções utilizadas foram preparadas com um dia de antecedência.

3.2.4.3 Purificação de DNA total de células bacterianas

Como será mostrado adiante, os resultados obtidos para a purificação de DNA a partir de amostras de sangue foram bastantes positivos, de modo que resolvemos examinar a capacidade do nanocompósito γ -NPs/PEDOT para a purificação do DNA obtido a partir de outros tipos de amostra. Para isso, escolhemos inicialmente amostras bacterianas, pelo fato de ser esse um padrão muito utilizado e de grande demanda em protocolos de microbiologia. O microrganismo de nossa escolha foi a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), a estirpe foi escolhida por ter seu sequenciamento genético muito bem reportado na literatura (Idalia and Bernardo 2017). Na verdade, o emprego da *E. coli* como sistema modelo não se deve exclusivamente pelo maior controle de cultivo, mas também pelo fato de que *E. coli* é um dos principais agentes infecciosos humanos,

como no caso em infecções urinárias (Rané and Dasgupta 2013, Freitas, Resende et al. 2016).

3.2.4.3.1 Cultivo celular da *Escherichia coli*

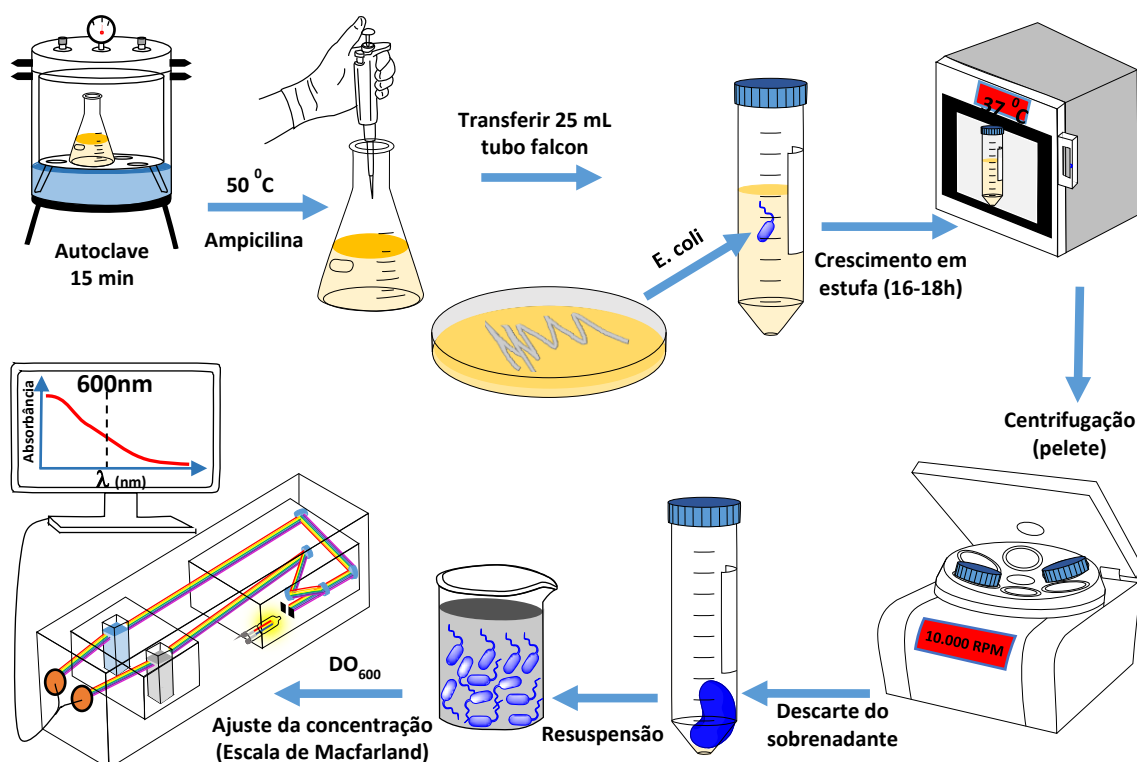
Nesta seção iremos apresentar o cultivo celular que foi adotado como método padrão para a obtenção das amostras de células bacterianas, tanto i) para os experimentos de purificação de DNA total com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT, como ii) nos experimentos de captura de células bacterianas em meio aquoso e iii) na purificação de DNA plasmídeo com o nanocompósito γ -NPs/Pani (que serão apresentados posteriormente, no Capítulo 4 desta tese).

A *Escherichia coli* usada em todos os experimentos foi a estirpe DH5 α com o vetor plasmidial pUC19 resistente ao antibiótico ampicilina, que foi adquirida do repositório Addgene (Estados Unidos). Para o cultivo celular, foi adotado o protocolo padrão descrito na literatura para este tipo de estirpe (Vasanthakumar 2009, Addgene 2012), que, de forma resumida, consiste de várias etapas: Primeiramente, em um erlenmeyer de 250 mL preparou-se 100 mL de meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) em água ultrapura com concentração de 20 mg/mL, que foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1Kgf/cm². Deixou-se então o meio resfriar, sob a proteção de um bico de Bunsen em capela biológica, até atingir a temperatura de 50 °C, quando então foram adicionados 200 μ L de uma solução aquosa de ampicilina com concentração de 50 mg/mL. Após o meio atingir a temperatura ambiente (~25 °C), volumes iguais a 25 mL foram distribuídos em 4 tubos falcon de 50 mL, nos quais por meio de uma alça de níquel-cromo foi usada para inocular uma pequena massa bacteriana (alguns microgramas) cultivada em placa de petri (meio sólido). O crescimento bacteriano foi deixado ocorrer durante toda a noite (16 – 18 h) em câmara incubadora com agitação orbital, a uma temperatura de 37 °C e a uma taxa de agitação de 160 rpm.

Após esse período de incubação e crescimento, fizemos a quantificação e o ajuste da concentração de células por densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), com o uso de espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Japão) (Heritage 1996, Sutton 2006). Para isso, os tubos foram centrifugados por 10 min a 10.000 rpm até a formação de um pellet (precipitado de bactérias) na parte inferior dos tubos; em sequência, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspenso em solução fisiológica, com a concentração sendo ajustada até atingir o valor de 0,5 em absorbância no

comprimento de onda de 600 nm. Este ajuste da absorbância deve ser realizado devido ao fato de que, de acordo com a escala de turbidez de Mcfarland (Balouiri, Sadiki et al. 2016), um valor de 0,5 em 600 nm corresponde a uma concentração de 10^8 células por mililitro de solução (Heritage 1996, Sutton 2011), comumente expresso como unidades formadoras de colônias (UFC). De modo a comprovar estes valores e verificar a viabilidade celular da *Escherichia coli* crescida, realizamos contagens primeiramente em placa cruzando os dados obtidos com os resultados de medida DO_{600} , que se mostraram consistentes com a escala de Macfarland. As principais etapas do protocolo de cultivo celular e do ajuste de amostras por densidade ótica estão representadas na Fig. 20.

Figura 20 – Protocolo de cultivo celular de *E. coli* para obtenção de amostras e controle de concentração da suspensão bacteriana por densidade ótica DO_{600} .



Fonte: O autor (2019)

3.2.4.3.2 Protocolo de purificação

Após termos estabelecido a padronização das amostras de *E. coli*, elaboramos o protocolo de purificação de DNA total na forma apresentar a seguir. Deve ser lembrado que, como já indicado, a descrição dos trabalhos de preparação das soluções buffer utilizadas em todos os protocolos nesta tese será feito detalhadamente no Apêndice B.

1. Em um microtubo de 2 mL adicionou-se 1 mL de suspensão de *E. coli*.

2. Centrifugou-se o microtubo por 5 min a 10000 rpm até a formação de um pellet (massa branca na parte inferior do microtubo).
3. Descartou-se o sobrenadante, e foi adicionado 600 µL da solução de lise celular (SDS 1%).
4. A mistura do microtubo foi homogeneizada em vortex por 15 s e colocado em banho maria a 80 °C por 5 min para que a lise celular ocorresse.
5. O microtubo foi retirado e deixado resfriar até atingir a temperatura ambiente.
6. Adicionou-se 4 µL de RNase A (4 µg/µL), e o microtubo foi invertido gentilmente cinco vezes e colocado em banho maria a 36 °C por 20 min.
7. Adicionou-se 250 µL da solução de precipitação proteica (CH₃COOK-Ác. acético).
8. Agitou-se o microtubo em vortex por 15 s e deixou em banho de gelo por 5 min.
9. Centrifugou-se o microtubo por 10 min a 10000 rpm, e transferiu-se o sobrenadante para um microtubo limpo.
10. Em um segundo microtubo de 2 mL contendo 4 mg de nanocompósito, foi adicionado 1,2 mL de solução de ativação (Glicina-HCl-NaCl, pH 3,2).
 - Agitou-se o microtubo em vortex por 10 s.
11. Adicionou-se a solução com o material lisado (~ 750 µL) no microtubo listado no passo 9.
12. A interação foi deixada por 10 min sob agitação, com o microtubo sendo submetido a vortex nos primeiros 15 s de cada minuto, e a várias inversões sucessivas até o próximo minuto.
13. Separou-se o nanocompósito com o auxílio de um ímã, sendo descartada a solução do microtubo.
14. Adicionou-se 900 µL de solução de lavagem (CH₃COOK – Tris – EDTA – Etanol).
 - O microtubo foi submetido ao vortex por 15 s.
 - Separou-se o nanocompósito com o auxílio de um ímã, e se descartou a solução sobrenadante do microtubo.
15. O procedimento do passo 14 foi repetido por quatro vezes.
16. O microtubo foi deixado aberto por 5 min para a evaporação de qualquer resíduo de etanol.
17. Foi adicionado 100 µL de solução de eluição (fosfato/fosfato, pH 7,8).

- O microtubo foi submetido ao vortex por 15 s
- Deixou-se a solução interagir por 10 min sob agitação sob repouso.
- Uma segunda agitação em vortex foi realizada por 15s.
- Com o auxílio de um ímã separou-se o nanocompósito na parte inferior do microtubo.

18. Por fim, o sobrenadante foi transferido para um microtubo esterilizado e armazenado sob refrigeração.

Assim como feito nos trabalhos de purificação do DNA extraído de sangue total, as amostras de DNA de *E. coli* purificadas através do protocolo descrito acima foram também utilizadas em ensaios PCR, eletroforese e espectroscopia UV-Vis de modo a estabelecer na qualidade. Para os ensaios de PCR, o conjunto de primers usado foi o 16S primer 804 RX (5'-GAC TAC CNG GGT ATC TAA TCC-3') sentido, e o anti-sentido 16S primer 10FX (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTN AG-3'), sendo o tamanho do amplicon estimado em 800 pares de base (Laboratory 2013).

3.2.4.3.3 Estudos do efeito de volume usado de amostra bacteriana

Da mesma maneira que feito no protocolo usado para extração do DNA de amostras de sangue, exploramos o efeito de alguns parâmetros do protocolo para amostras de *E. coli*, como, o volume da suspensão bacteriana e o número de eluições realizadas. Para esses experimentos, adotamos o protocolo apresentado na Seção 2.2.4.3.2, com utilização de amostras com volumes de 0,5; 1; 1,5; e 2 mL. Já no caso do experimento de múltiplas eluições, o protocolo foi realizado usando um volume de 1 mL, sendo feitas 3 eluições seguidas a partir de uma única purificação.

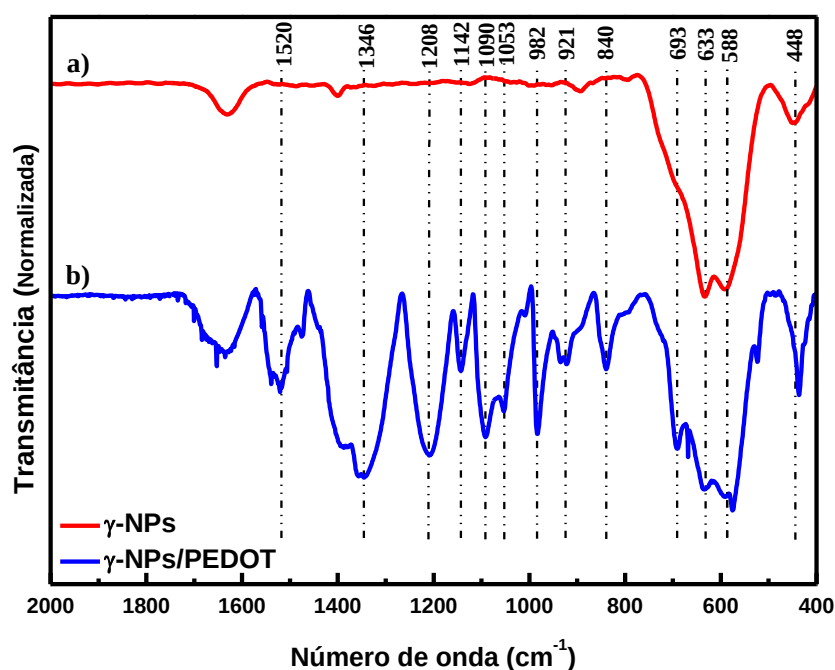
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Caracterização do nanocompósito magnético γ -NPs/PEDOT

Para comprovar que de fato realizamos o recobrimento das γ -NPs com o polímero PEDOT, as análises de FTIR foram realizadas, sendo os espectros correspondentes mostrados na Fig. 21. Como pode ser observado na curva a) referente as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro há a presença de duas bandas (uma em 588 cm^{-1} e outra em 633 cm^{-1}) características do estiramento dos íons Fe-O como discutido no Apêndice A (Cornell and Schwertmann 2003). Já na curva b), referente ao nanocompósito γ -

NPs/PEDOT pode ser identificado tanto a presença dos picos referentes às γ -NPs como as bandas de vibrações referentes ao PEDOT, observadas em 693, 840, 921, e 982 cm^{-1} referentes às vibrações de alongamento da ligação C-S; em 1090, 1142, e 1208 cm^{-1} associadas ao alongamento C-O do anel etilenodioxi, e, por último, em 1346 e 1520 cm^{-1} , que correspondem aos alongamentos inter-anel da ligação C-C e à vibração de alongamento assimétrico C=C, respectivamente (Cho, Wu et al. 2015, Pang, Zhou et al. 2016, Xie, Xu et al. 2016). Dessa maneira, fica evidente a presença dos dois constituintes, de modo que podemos confirmar que houve de fato o revestimento das γ -NPs com PEDOT através da síntese em fase vapor.

Figura 21 – Espectros infravermelho das γ -NPs a), e do nanocompósito γ -NPs/PEDOT b).

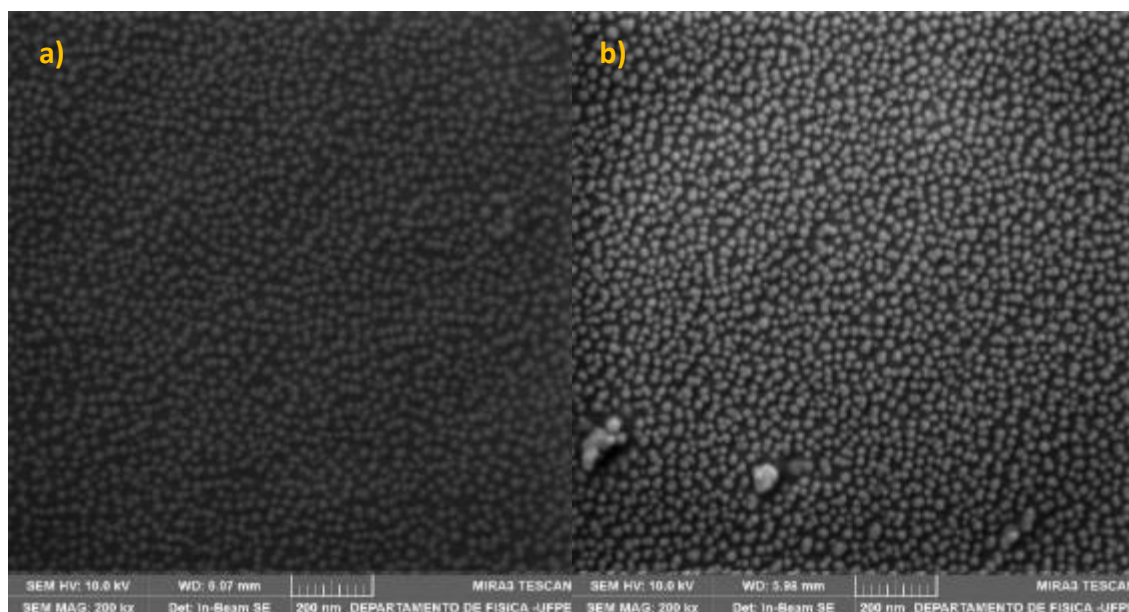


Fonte: O autor (2019)

A fim de analisar as propriedades morfológicas do nanocompósito, realizamos a microscopia eletrônica de varredura, com as micrografias correspondentes sendo mostradas na Fig. 22. Conforme pode ser visto, tanto as γ -NPs (Fig. 22a) como o γ -NPs/PEDOT (Fig. 22b) apresentam uma forma esférica, e uma distribuição de tamanhos homogênea. Além disso, a partir do uso do software Image J foi obtido o histograma das γ -NPs e do γ -NPs/PEDOT que é apresentado na Fig. 23. Para a construção desse histograma, foi realizada a contagem de 500 partículas em diferentes micrografias em ambos os casos. Como podemos verificar, as γ -NPs apresentaram uma distribuição de tamanho entre 13 e 24 nm, com diâmetro médio de $(18,5 \pm 3,7)$ nm, o que é muito próximo

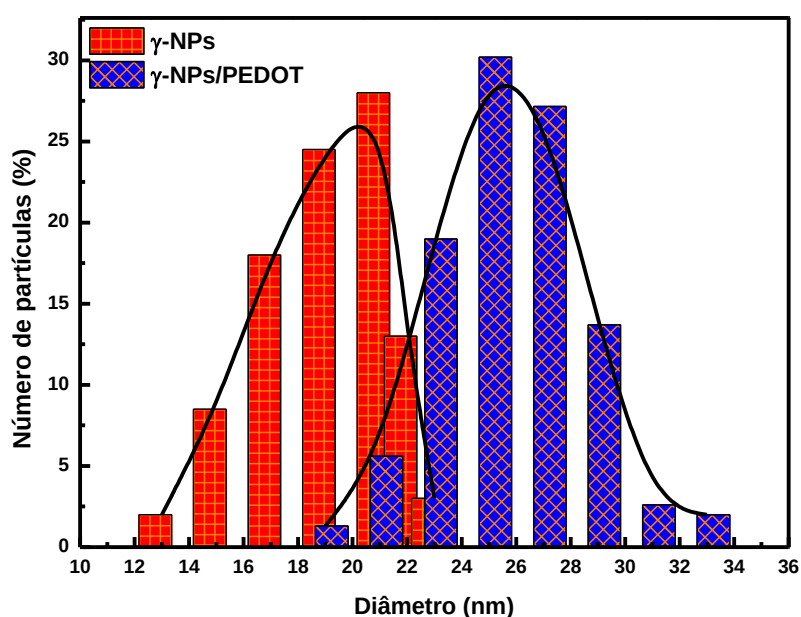
daquele observado no Apêndice A como esperado. Já para o nanocompósito γ -NPs/PEDOT, a distribuição ficou entre 19 e 33 nm, com um diâmetro médio de $(26,1 \pm 4,8)$ nm. Desse modo, é possível inferir que realmente houve o revestimento das γ -NPs com o PEDOT, com a presença de uma fina camada polimérica da ordem de 3 a 4 nm de espessura.

Figura 22 – Micrografias das γ -NPs a) e do nanocompósito γ -NPs/PEDOT b), obtidas por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 200 kx.



Fonte: O autor (2019)

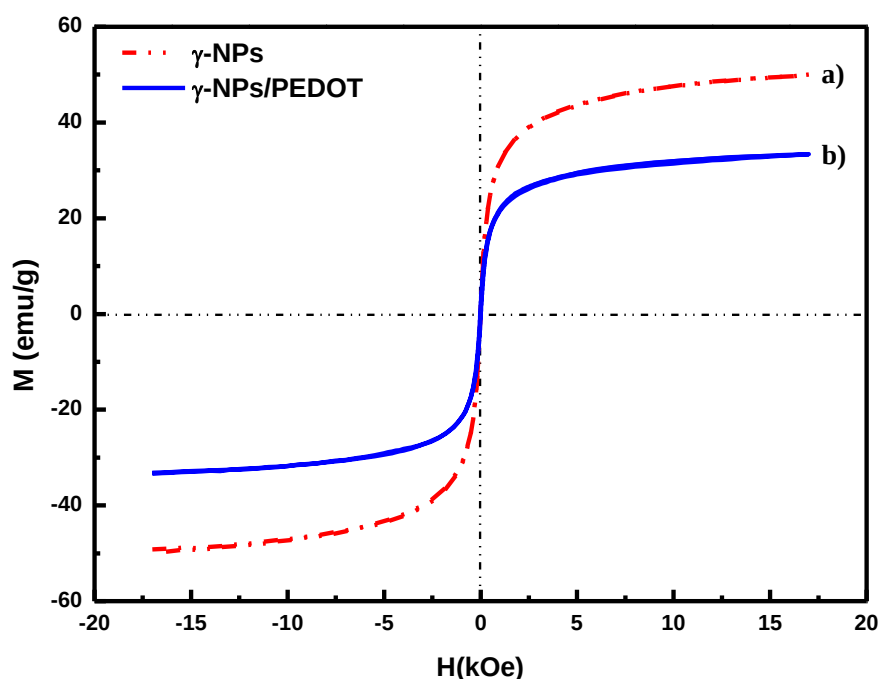
Figura 23 – Histograma de distribuição de tamanho de partículas para o caso das NPs (em vermelho), e para o nanocompósito γ -NPs/PEDOT (em azul).



Fonte: O autor (2019)

As propriedades magnéticas das amostras obtidas, foram investigadas pela obtenção de curvas de magnetização pela técnica de magnetometria de amostra vibrante a temperatura ambiente, como já discutido. As curvas de magnetização das γ -NPs e do nanocompósito γ -NPs/PEDOT são mostradas na Fig. 24, onde pode ser visto que a magnetização de saturação (M_s) correspondente foi igual a 51,4 e 33,3 emu/g, respectivamente. Uma diferença dessa ordem já era esperada, uma vez que essa medida leva em consideração a massa total da amostra; como o polímero não contribui para essa resposta, o valor de M_s é consequentemente reduzido, o que mais uma vez comprova o revestimento das γ -NPs com PEDOT. Apesar dessa redução na magnetização, o nanocompósito γ -NPs/PEDOT exibe ainda uma resposta magnética elevada, o que o torna viável sua separação magnética contendo as espécies aderidas. Nessas curvas podemos também observar que tanto as γ -NPs (Fig. 24a), como o γ -NPs/PEDOT (Fig. 24b) exibiram um comportamento superparamagnético como esperado, ou seja, não há magnetização remanescente e campo coercitivo após o campo externo ser retirado (ver Apêndice A) (Ozaki 2004).

Figura 24 – Curvas de magnetização à temperatura ambiente (293 K) para as NPs a), e o nanocompósito γ -NPs/PEDOT b).



Fonte: O autor (2019)

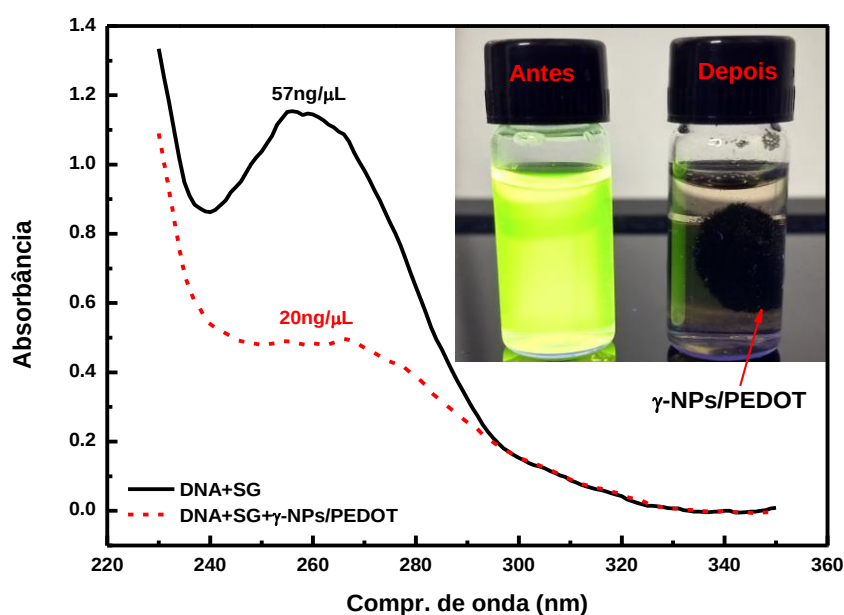
3.3.2 Uso do nanocompósito como material adsorvente de ácidos nucleicos

3.3.2.1 Estudos de adsorção em sistema modelo

Uma vez estabelecido o procedimento de síntese do nanocompósito γ -NPs/PEDOT e realizada sua caracterização, investigamos se era factível a utilização do γ -NPs/PEDOT para a adsorção de cadeias de DNA. Para isso, realizamos inicialmente uma série de experimentos de adsorção com DNA de esperma de salmão dissolvido em meio aquoso. Os resultados obtidos para esses estudos são apresentados a seguir.

Em uma primeira prova de conceito, marcamos uma solução de DNA com o corante Sybr Green-SG (*Invitrogen, Estados Unidos*) através da adição de 5 μ L de corante em um volume de 5 mL de solução de DNA (~ 50 ng/ μ L). Em seguida, acrescentamos 10 mg do nanocompósito γ -NPs/PEDOT, que foi deixado interagir por 10 min sob agitação manual. Após a interação, o γ -NPs/PEDOT foi confinado magneticamente, com uma pequena alíquota sendo retirada para a caracterização por UV-Vis. Posteriormente, o frasco foi colocado em um transiluminador (302 nm) para que fosse monitorada de modo visual a adsorção do DNA, uma vez que o corante Sybr Green tem a propriedade de se ligar as cadeias de DNA dupla hélice, aumentando com isso sua intensidade de fluorescência em até 100X relativo a aquele de uma fita simples de DNA (Dragan, Pavlovic et al. 2012). Na Fig. 25 são apresentados os espectros de absorção do DNA antes e depois da interação com o γ -NPs/PEDOT, bem como a resposta fluorescente das amostras marcadas com o SG.

Figura 25 – Espectros UV-Vis para a solução de DNA de esperma de salmão antes (linha contínua), e depois de interagir por 10 min com o nanocompósito g-NPs/PEDOT (linha tracejada). Em detalhe, a variação da intensidade de fluorescência da solução de DNA marcada com o corante Sybr Green, antes e depois da interação com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

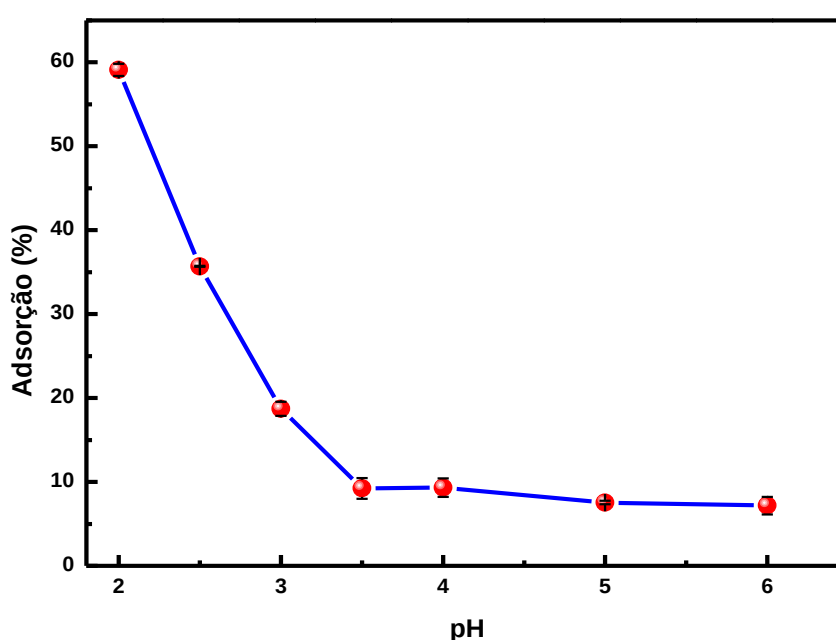
Pode ser observado que a banda característica do DNA em 260 nm apresenta uma acentuada perda de intensidade, com o valor inicial de concentração igual a 57 ng/μL passando para apenas 20 ng/μL após a interação com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT (~60%). Com isso, fica demonstrado que o nanocompósito é de fato capaz de adsorver DNA. Além disso, a adsorção pode ser igualmente comprovada pela marcação fluorescente da amostra (ver na imagem em detalhe), onde, da mesma maneira que observado por espectroscopia UV-Vis, uma grande redução da fluorescência da amostra ocorre após um certo tempo de contato da mesma com o γ -NPs/PEDOT. Com ambos os resultados em concordância, passamos a ter segurança para prosseguir com um estudo mais detalhado das particularidades de adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT.

3.3.2.1.1 Influência do pH

É bem estabelecido que o pH do meio é uma variável muito relevante para a ocorrência de processos de adsorção (Tewari and American Chemical Society. Division of Colloid and Surface Chemistry. 1981). Por essa razão, realizamos experimentos para avaliar a eficiência de adsorção de DNA pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT será afetada por uma variação controlada do pH da solução, cujo resultados são apresentados na Fig.

26. Conforme é possível ser observado, a adsorção de DNA ocorre preferencialmente na faixa de pHs mais ácidos (2,0 – 3,0), sendo a maior adsorção obtida (~ 60%) em pH 2,0. Já para valores de pHs acima deste intervalo, a adsorção é consideravelmente baixa, sendo inferior a 10%. A razão deste comportamento pode ser associado ao fato de que em meios mais ácidos a cadeia do PEDOT se encontra protonada e se comporta como um polycation, podendo assim interagir eletrostaticamente com os grupos fosfatos do DNA, que possuem carga negativa.

Figura 26 – Gráfico da porcentagem de adsorção de DNA de esperma de salmão em função do pH da solução de ligação (Glicina – HCl).



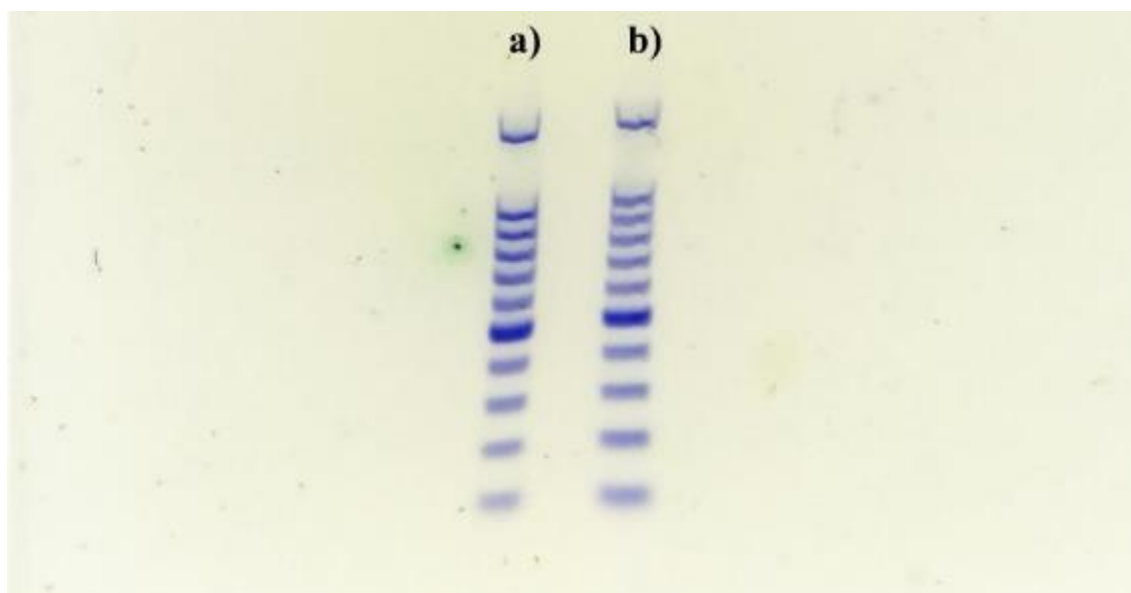
Fonte: O autor (2019)

Devido ao fato da maior adsorção ocorrer para valores de pH mais baixos, e considerando serem as moléculas de DNA susceptíveis à degradação em meios ácidos, realizamos um experimento a fim de verificar se as cadeias de DNA poderiam estar sendo degradadas ao longo de nosso protocolo de operação. Nesse experimento utilizamos como molécula alvo um DNA padrão (Ladder 100pb) adquirido comercialmente (*Promega, EUA*), o qual possui diferentes tamanhos de fragmentos conhecidos. Assim, adicionamos 1 mL da solução de ligação (Glicina – HCl, pH 2,5) e 1 mL do DNA Ladder, a um microtudo que foi deixado em repouso por 1 h. Em seguida, adicionou-se a solução 2 mg de γ -NPs/PEDOT, e a interação foi deixada ocorrer por 10 min. Após esse tempo, o nanocompósito foi confinado magneticamente, e o sobrenadante descartado. Em

sequência, a eluição foi realizada com 100 μL da solução de eluição (fosfato/fosfato, pH 7,8), quando por fim, foi feita uma eletroforese em gel de agarose com essa amostra (ver Seção 2.2.4.2.4.1).

Na Fig. 27 é apresentado o resultado da eletroforese para o experimento de adsorção com o Ladder descrito acima. Como podemos observar, após o DNA passar pelo protocolo de adsorção/dessorção (Fig. 27b), as bandas características se mantiveram inalteradas ao compararmos com aquela do DNA que não interagiu com γ -NPs/PEDOT (Fig. 27a). Desse modo, fomos capazes de demonstrar que o protocolo é viável para as condições em que o nanocompósito apresenta a capacidade de adsorver DNA.

Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose (1%) do DNA Ladder antes a), e após passar pelo protocolo de adsorção/dessorção do γ -NPs/PEDOT b).



Fonte: O autor (2019)

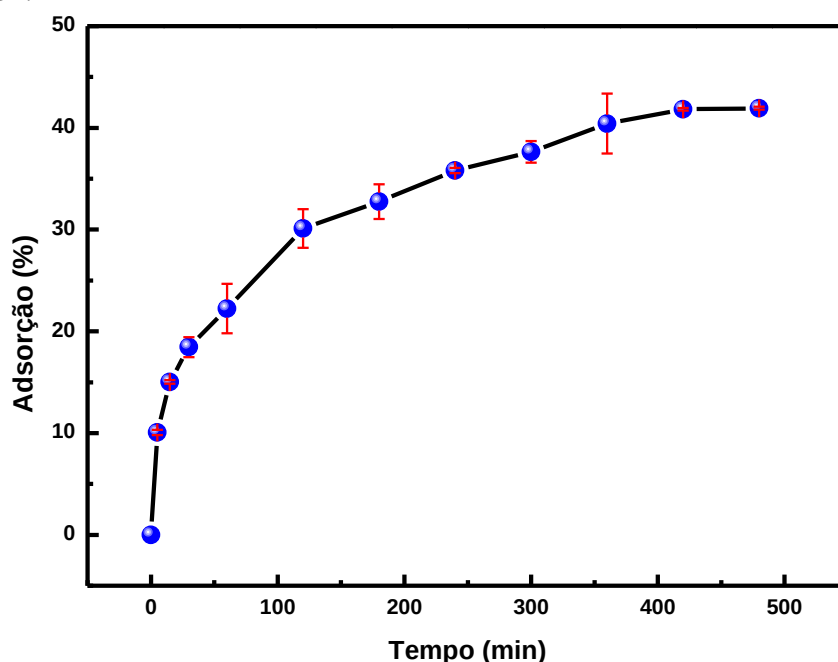
Face esses resultados, passamos a realizar todos os experimentos subsequentes de adsorção de DNA em meio aquoso utilizando a solução de ligação com pH 2,5. Adotamos esse valor levemente superior a aquele em que a maior eficiência de adsorção é observada para que fosse minimizada a interação do DNA com íons de cloro e H^+ , uma vez que percebemos durante a preparação da solução que a quantidade de HCl (1M) necessária para diminuir o valor do pH de 2,5 para 2,0 era consideravelmente grande.

3.3.2.1.2 Influência do tempo de interação

Como relatado na Seção 3.2.4.1.2, nós realizamos um estudo do tempo de interação para estabelecer a cinética de adsorção de DNA de esperma de salmão em meio aquoso pelo γ -NPs/PEDOT. O resultado para estes experimentos é mostrado na Fig. 28,

onde, como podemos observar, a adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT teve uma maior eficiência (adsorção por unidade de tempo) nos primeiros 120 min (30%). A partir deste ponto, a eficiência se torna menor, atingindo um valor de adsorção de apenas 41% para um tempo de 480 min (quando se torna possível observar que o sistema começou a atingir o equilíbrio). Tal comportamento pode ser compreendido ao supormos que uma grande maioria dos sítios ativos estão dispostos na superfície, sendo por isso, rapidamente ocupados nos primeiros minutos de experimento. Logo após esse primeiro processo, a eficiência tende a diminuir devido tanto a escassez de sítios, como pelos impedimentos estéricos e de repulsão que podem vir a dificultar o acesso de moléculas de DNA aos sítios remanescentes. Essa hipótese pode ser fortalecida ao cruzarmos esses resultados com os dados de MEV, que como visto, indicam que as γ -NPs são recobertas por uma camada fina de polímero (PEDOT), da ordem de 3 - 4 nm.

Figura 28 – Cinética do processo de adsorção do DNA de esperma de salmão pelos nanocompósitos γ -NPs/PEDOT.



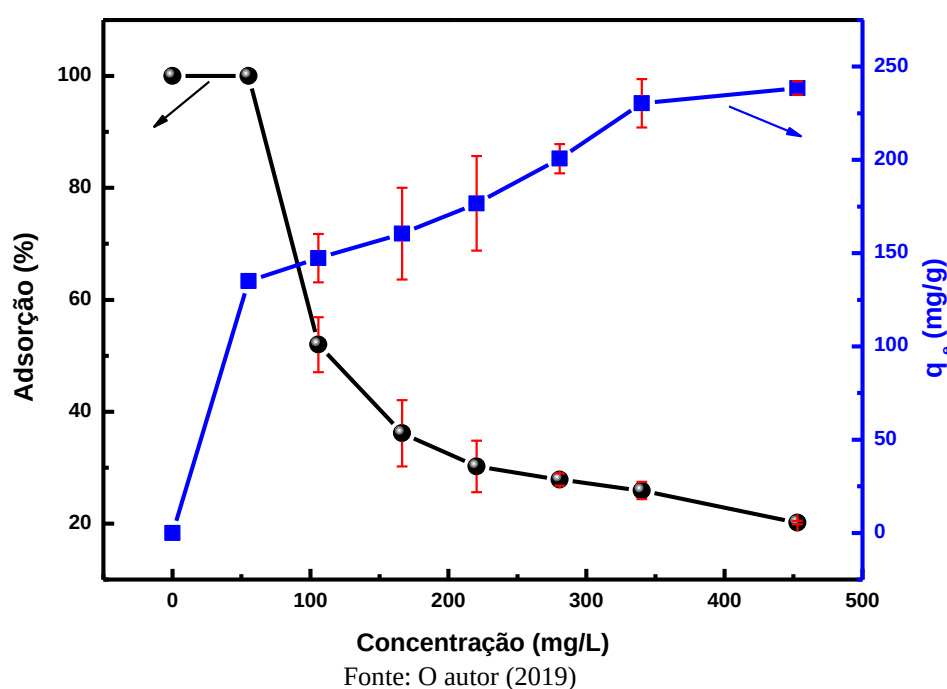
Fonte: O autor (2019)

3.3.2.1.3 Influência da concentração inicial de DNA

Na sequência, investigamos também a influência da concentração inicial de DNA sobre as características de adsorção do γ -NPs/PEDOT. O procedimento adotado para este experimento foi aquele descrito na Seção 3.2.4.1.3. Na Fig. 29 é mostrada a eficiência

(%) e a capacidade (em mg/g) de adsorção em função da concentração inicial de DNA. Como se pode ver, a eficiência de adsorção diminui conforme a concentração inicial de DNA aumenta, sendo obtidos os valores de 100, 51,3, 36,7, 30,1, 27,5, 24,4, e 20,1 % para as soluções de DNA com concentração de 52,3, 105,4, 166,2, 220,3, 280,4, 340,1, e 453,5 mg/L, respectivamente. Muito embora seja observado o decréscimo na porcentagem de adsorção, podemos ver que, por outro lado, a capacidade do γ -NPs/PEDOT aumenta, passando de 135 mg/g para uma concentração inicial de 52,3 mg/L, para 248,7 mg/g para uma concentração de 453,5 mg/L. Esse aumento pode ser explicado pelo fato de que, ao aumentarmos a concentração de DNA na solução, há um consequente aumento da força motriz de transferência de massa entre a fase líquida e a fase sólida (Ansari, Kumar et al. 2015).

Figura 29 – Efeito da concentração inicial de DNA sobre a quantidade percentual de adsorção (●) e capacidade de adsorção q_e (■) do γ -Nps/PEDOT.



3.3.2.1.4 Isotermas de adsorção

O uso de modelos de isotermas é apenas uma ferramenta útil para a compreensão da natureza dos processos que regem a interação entre o adsorvente e o adsorvato a uma dada temperatura, como também permite a determinação de outros parâmetros relevantes,

como a capacidade máxima de adsorção. Por essa razão, aplicamos os modelos de Langmuir e Freundlich para o ajuste de nossos dados experimentais.

O modelo de Langmuir, descreve fenômenos de adsorção nos quais um número finito de sítios energeticamente idênticos adsorve uma única molécula por sítio, de modo a formar uma monocamada de adsorvato sobre a superfície (Vidal, Nascimento et al. 2014, Largitte and Pasquier 2016). Em sua forma linearizada, esse modelo pode ser expresso como

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{bq_m} + \frac{C_e}{q_m}, \quad (3.4)$$

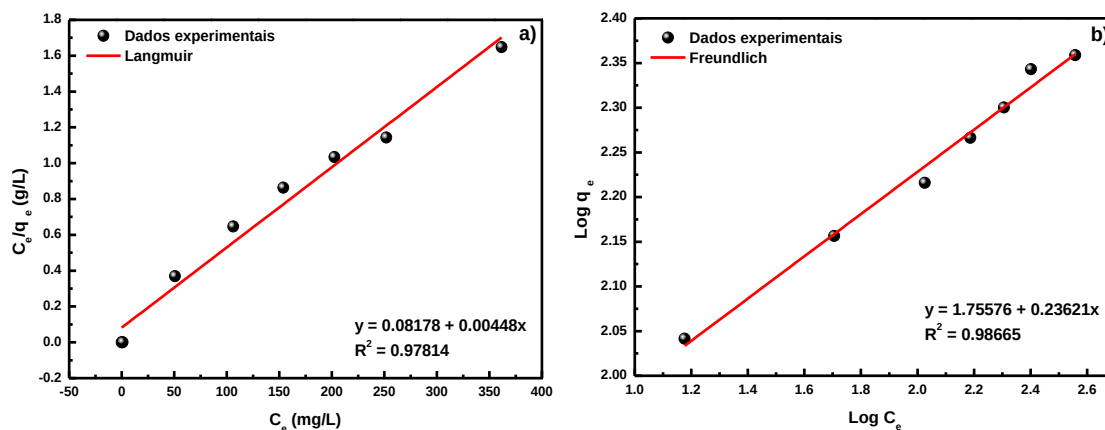
onde C_e é a concentração de DNA na solução no equilíbrio em mg/L, q_e é a quantidade de DNA em mg/g por unidade de massa (g) do γ -NPs/PEDOT, q_m a capacidade máxima de adsorção de DNA (mg/g), e b (L/mg) a constante de Langmuir. A determinação dos valores das constantes q_m e b foi realizada pelo ajuste do gráfico de C_e/q_e versus C_e , como mostrado na Fig. 30a.

Por sua vez, o modelo de isoterma de Freundlich é de natureza empírica, sendo aplicado a sistemas não ideais nos quais existam sítios energeticamente heterogêneos, o que leva a uma adsorção em multicamadas, uma vez que um único sítio mais energético é capaz de adsorver mais de que uma molécula do adsorvato (Vidal, Nascimento et al. 2014). A relação linear que descreve esse modelo é expressa como

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e, \quad (3.5)$$

onde K_f ($\text{mg}^{1-1/n} \cdot (\text{g}^{-1}) \cdot \text{L}^{1/n}$) e n são constantes correlacionadas à capacidade adsortiva e à heterogeneidade energética da superfície, respectivamente. Tais parâmetros foram calculados a partir da regressão linear do gráfico $\log q_e$ versus $\log C_e$, apresentado na Fig. 30b.

Figura 30 – Ajustes lineares dos dados experimentais de adsorção de DNA com os modelos de isothermas de Langmuir a) e Freundlich b).



Fonte: O autor (2019)

Na Tabela 4 são apresentados os valores dos parâmetros de Langmuir e Freundlich calculados a partir de nossos dados experimentais, juntamente com os respectivos coeficientes de correlação (R^2). Já na Fig. 31, são mostrados os ajustes dos dados para os dois modelos. Ao analisarmos tanto o valor de R^2 (0,986), como o ajuste dos dados experimentais (Fig. 30b), podemos notar ser o modelo Freundlich aquele que melhor descreve a adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT. Esse resultado indica que o processo de adsorção se dá por meio da disposição de multicamadas sobre sítios com diferentes energias adsorptivas (Vidal, Nascimento et al. 2014), no caso específico, ao longo da estrutura polimérica. Uma hipótese sobre a origem desses diferentes sítios pode ser levantada ao analisarmos quimicamente a estrutura do PEDOT, bem como a faixa de valores de pH do meio no qual a adsorção de DNA ocorre. Devido ao baixo valor de pH, pode estar ocorrendo tanto a protonação da cadeia do PEDOT, o que daria origem a defeitos tipo pólarons e bipólarons, energeticamente diferentes, como a protonação do enxofre pelos dois pares de elétrons desemparelhados (Szajda and Lam 1996), possibilitando um terceiro sítio de adsorção. No entanto, experimentos adicionais ainda se fazem necessários para dar suporte a tais suposições.

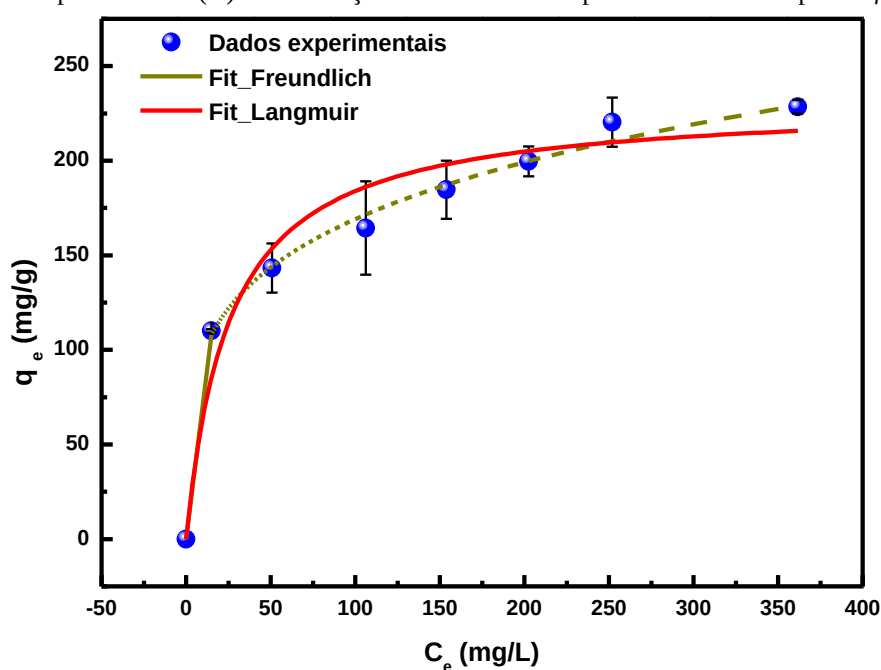
Outra informação extraída desse modelo se refere ao tipo de isoterma indicado através do valor da constante de Freundlich n (1,758), a qual é assumido uma isoterma do tipo favorável para valores de n maior que 1 (Vidal, Nascimento et al. 2014, Hussain 2018), como foi obtido para o sistema γ -NPs/PEDOT – DNA.

Tabela 4 – Parâmetros das isoterma de Langmuir e Freundlich para adsorção de DNA pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT.

Langmuir			Freundlich		
q_m	b	R^2	K_F	$1/n$	R^2
(mg/g)	(L/mg)		(mg/g)/(mg/L) ^{1/n}		
227,273	0,054	0,978	56,985	0,569	0,986

Fonte: O autor (2019)

Figura 31 – Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha contínua), e Freundlich (linha tracejada) aos dados experimentais (●) de adsorção de DNA de esperma de salmão pelos γ -NPs/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

3.3.2.1.5 Cinéticas de adsorção

O ajuste dos dados experimentais, obtidos segundo modelos de cinética usualmente discutidos na literatura, tem por finalidade permitir um melhor entendimento do tipo de mecanismo (químico, físico, ou difusão) dominante no processo de adsorção do adsorvente e pelo adsorvato. Esses ajustes obtidos por regressões lineares permitem a obtenção de parâmetros relevantes como taxa de adsorção, coeficiente de difusão, capacidade máxima, entre outros (Vidal, Nascimento et al. 2014, Largitte and Pasquier 2016). Desse modo, os dados obtidos na Seção 3.3.2.1.2 (tempo de interação) foram

ajustados os modelos cinéticos de reação de Pseudo – Primeira Ordem (PPO), Pseudo – Segunda Ordem (PSO), e Morris – Weber (MW) (Azizian 2004).

Os modelos cinéticos de PPO e PSO, admitem que a força motriz de adsorção seja resultante da diferença ao longo do tempo entre a concentração da fase sólida (C_t), e a concentração da fase sólida em equilíbrio (C_e). No entanto, a taxa de variação de adsorção como função de força motriz apresenta um caráter linear para o modelo PPO, enquanto para o caso PSO essa dependência é quadrática (Azizian 2004, Vidal, Nascimento et al. 2014). Em suas formas linearizadas, esses modelos podem ser escritos como

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t, \quad (3.6)$$

para o PPO, e

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{h} + \frac{1}{q_e}, \quad (3.7)$$

para o PSO;

de modo que,

$$h = k_2 q_e^2, \quad (3.8)$$

onde q_t e q_e são as quantidades de DNA (em mg) adsorvidas por unidade de massa do γ -NPs/PEDOT (em g) no instante t e na situação do equilíbrio, respectivamente.

Já o modelo de MW, que tem por base na segunda lei de Fick (difusão em estado não-estacionário) para a difusão (Vidal, Nascimento et al. 2014), assume que a força motriz a controlar os processos de adsorção e a difusão intrapartícula, que variaria com a raiz quadrada do tempo. Em sua forma linear, ele é expresso como

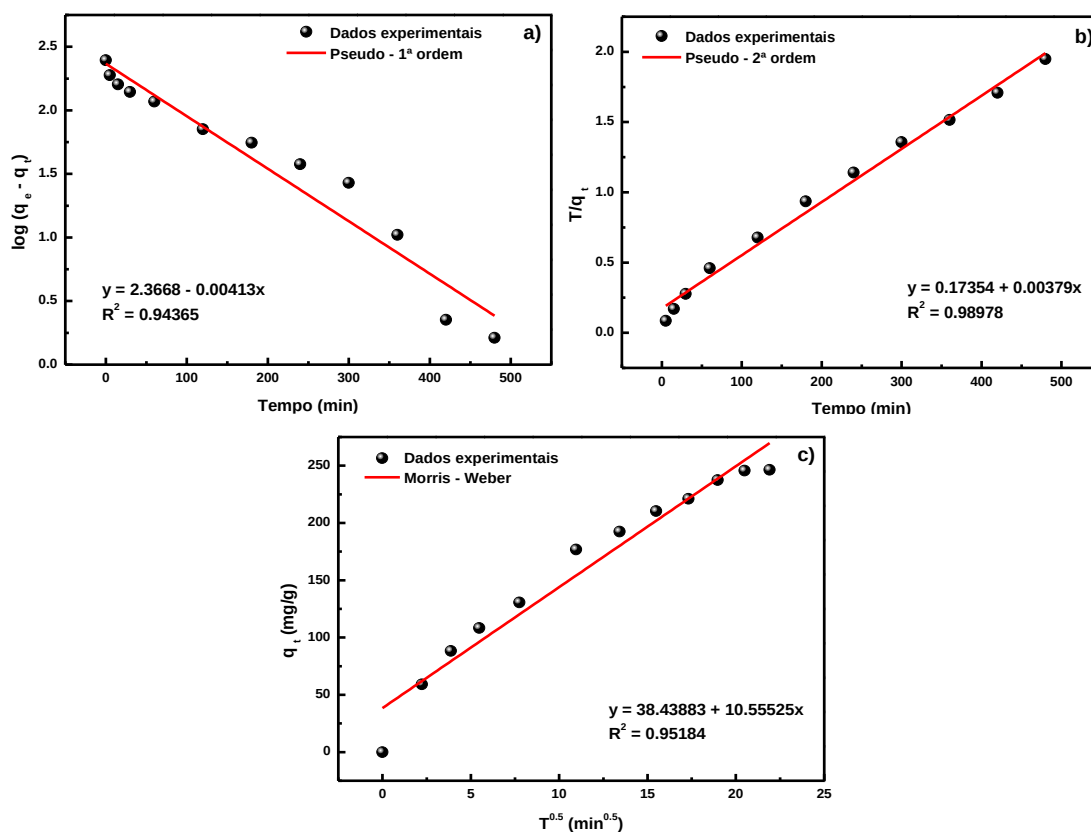
$$q_t = k_{id} t^{0,5} + C, \quad (3.9)$$

onde k_{id} e C são coeficiente de difusão intrapartícula ($\text{mg.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e a constante relacionada ao impedimento de difusão, respectivamente.

A partir dos ajustes lineares realizados para os três modelos, que são mostrados na Fig. 32, pudemos obter os parâmetros de cinética de adsorção e correlação (R^2) para cada um deles. Como mostrados de forma resumida na Tabela 5. Como pode ser visto, o modelo PSO foi o que melhor se ajustou aos nossos dados, para o qual o valor de correlação de 0,989, contra 0,943 e 0,951 para os modelos de PPO e MW, respectivamente. Podemos ainda observar que o valor da capacidade máxima (q_e)

calculada segundo esse modelo (263 mg/g) é consideravelmente próximo daquele obtido experimentalmente (248 mg/g) por nós, um resultado que nos indica ser o mecanismo de adsorção do sistema γ -NPs/PEDOT – DNA baseado em um processo de quimissorção. Isso está de acordo com o mecanismo de interação proposto por nós, sobre o qual discutiremos na próxima Seção (ver Seção 3.3.2.1.9).

Figura 32 – Ajustes lineares dos dados experimentais de adsorção de DNA segundo os modelos cinéticos de PSO a), PSO b), e MW c).



Fonte: O autor (2019)figura

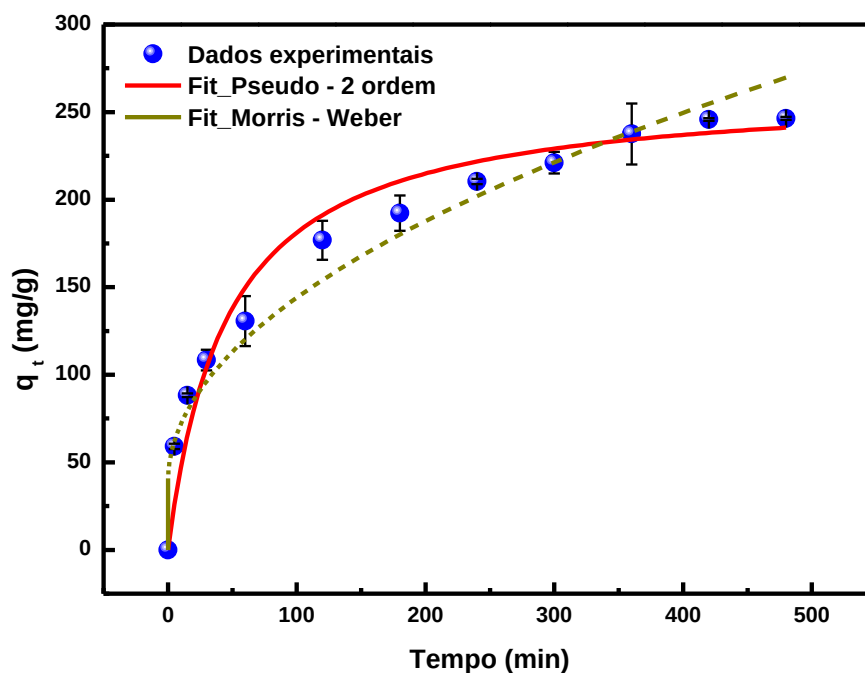
Tabela 5 – Parâmetros cinéticos para adsorção de DNA pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT.

$q_{e, exp}$ (mg/g)	Pseudo-Primeira- ordem			Pseudo-Segunda-Ordem			Morris-Weber		
	k_1 (h^{-1})	$q_{e, calc}$ (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.h)	$q_{e, calc}$ (mg/g)	h (mg/g.h)	R^2	k_{id} (mg/g.h ⁻¹)	R^2
248,7	0,009	232,71	0,943	$8,3 \times 10^{-5}$	263,853	5,763	0,989	10,556	0,951

Fonte: O autor (2019)

Na Fig. 33 é mostrada a variação de q_t como função do tempo de acordo com nossos dados experimentais e os ajustes para os modelos PSO e MW.

Figura 33 – Ajuste dos modelos cinéticos de PSO (linha contínua), e MW (linha tracejada) aos dados experimentais (●) para adsorção de DNA pelo γ -NPs/PEDOT.

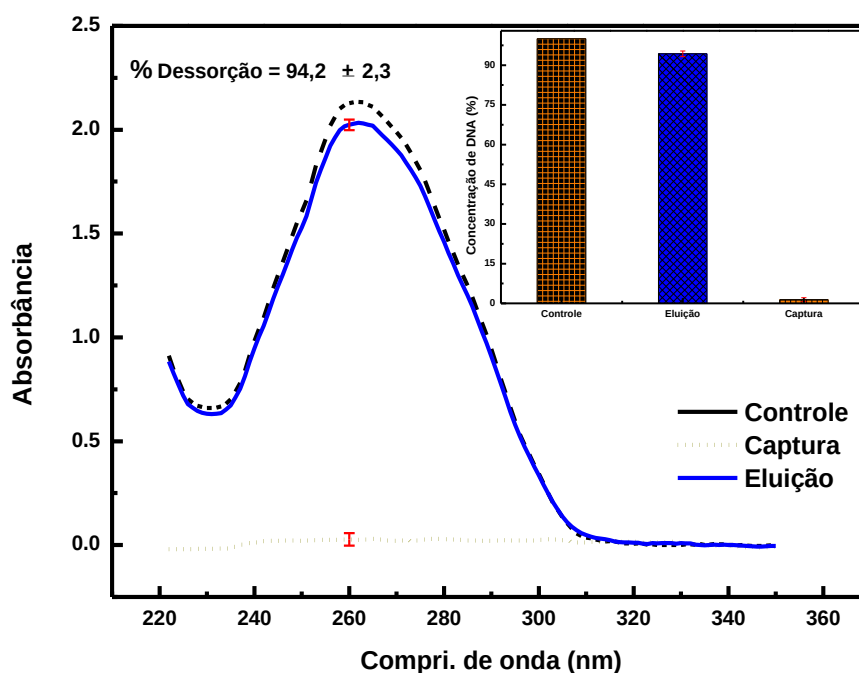


Fonte: O autor (2019)

3.3.2.1.6 Dessorção de DNA

Na Fig. 34 são mostrados os resultados obtidos para os experimentos de adsorção juntamente com os de dessorção de DNA discutidos na Seção 3.2.4.1.4. Como podemos observar, no processo de adsorção houve uma grande captura do DNA presente na solução pelo γ -NPs/PEDOT, que passou de uma concentração inicial de 106 ng/ μ L (curva tracejada) para 1,4 ng/ μ L (curva pontilhada) após 10 min de interação. Já no processo de adsorção (curva contínua), após apenas 5 min de interação os γ -NPs/PEDOT com a solução de eluição, a concentração de DNA na solução rapidamente aumentou, passando a ser de aproximadamente 100 ng/ μ L. Isso que corresponde a uma eficiência de dessorção de 94,2 %, como apresentado no detalhe da Fig. 34. Dessa maneira, podemos afirmar que o processo de dessorção ocorre de maneira simples e rápida, e com uma alta eficiência. Ao compararmos esses resultados com os de outros adsorventes, (o que será abordado na Seção 3.3.2.1.10), vemos que os γ -NPs/PEDOT é um dos adsorventes com melhor combinação entre eficiência e tempo de dessorção.

Figura 34 – Espectros de UV-Vis para a solução de DNA inicial (linha tracejada), e após 10 min de interação pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT (linha pontilhada). Na linha contínua, o espectro UV-Vis para a solução de eluição após 5 min de interação. No detalhe, percentuais encontrados para as taxas de adsorção e dessorção.



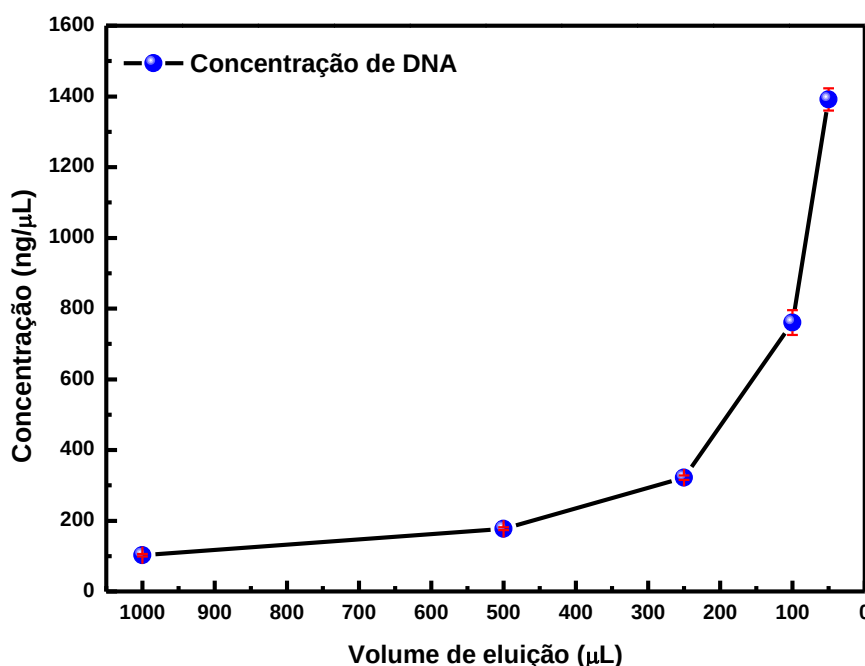
Fonte: O autor (2019)

3.3.2.1.7 Concentração de DNA em amostras líquidas

Como apresentado na Seção 3.2.4.1.5, fizemos experimentos a fim de investigar a capacidade de que os γ -NPs/PEDOT pudessem ser utilizados não apenas como adsorventes, mas também como um material concentrador em amostras líquidas de DNA. Na Fig. 35, mostramos a concentração final de amostras de DNA (DNA de esperma de salmão) quando feito uso de diferentes volumes da solução de eluição, partindo da adsorção de uma amostra de 1 mL com concentração de aproximadamente 100 ng/ μ L. Podemos ver que à medida que diminui o volume da solução de eluição usada, a concentração de DNA recuperada aumenta consideravelmente, saindo de um valor igual a 180 ng/ μ L quando usamos 500 μ L da solução de eluição, para 1390 ng/ μ L quando 50 μ L são utilizados. Assim é possível aumentar a concentração de DNA presente em meio líquido em mais de 13 vezes, com relação à concentração inicial ($\sim$ 100 ng/ μ L). Como já mencionado o uso do nanocompósito γ -NPs/PEDOT em protocolos de concentração de DNA em amostras líquidas, pode vir a ser útil tanto em casos como análises forenses, quanto em diagnósticos moleculares como biópsia líquida, por exemplo, em situações em

que a concentração de DNA se encontre abaixo do limiar de sensibilidade de uma determinada técnica ou protocolo. Assim, a depender das condições, o γ -NPs/PEDOT poderia ser usado em uma etapa preliminar para adsorver o DNA da amostra original, e em seguida eluir em um pequeno volume, de modo a trazer a concentração da amostra para dentro da faixa de sensibilidade da técnica/protocolo de interesse.

Figura 35 – Aumento da concentração de DNA de espermatozoides de salmão em fase líquida em função do volume da solução de eluição utilizado.



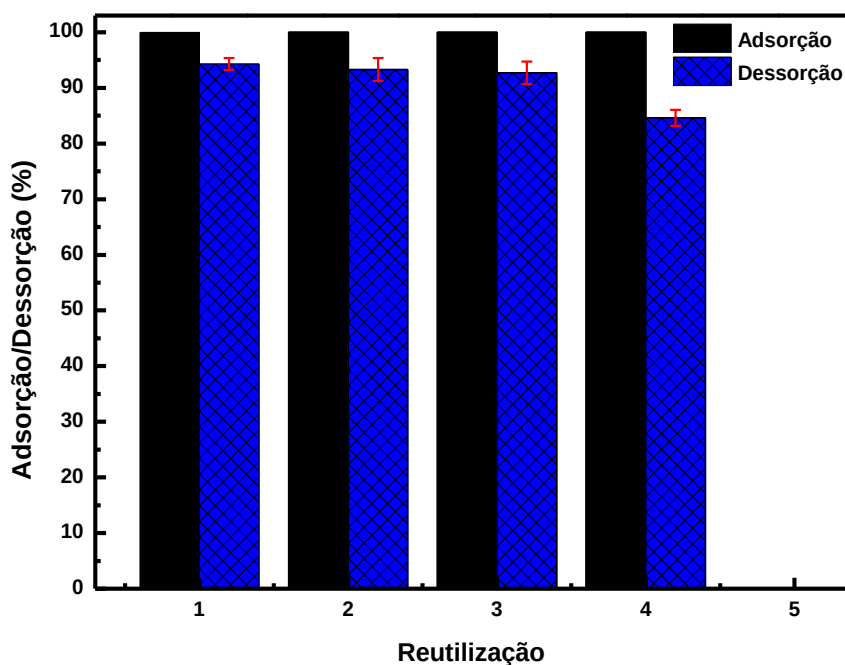
Fonte: O autor (2019)

3.3.2.1.8 Reutilização dos γ -NPs/PEDOT

Na Fig. 36, mostramos resultados (em %) do comportamento da eficiência de adsorção/dessorção do γ -NPs/PEDOT para 4 ciclos consecutivos de reutilização, como detalhado na Seção 3.2.4.1.6. Pode ser notado que nos três primeiros ciclos de adsorção/dessorção a taxa de eficiência do nanocompósito se manteve relativamente estável, com valores de adsorção e dessorção ficando na faixa entre 100 e ~94%. Já no 4º ciclo, muito embora a adsorção tenha se mantido em 100%, a taxa de dessorção diminuiu para ~84%. Um valor ainda ser considerável. Assim, podemos concluir que o nanocompósito pode ser reutilizado por pelo menos 3 vezes seguidas, sem que nenhuma perda significativa ocorra em sua eficiência de adsorção/dessorção.

Deve ser mostrado, no entanto, que a aplicação das γ -NPs/PEDOT para a captura de DNA em meios líquidos está direcionada primordialmente para áreas como biologia molecular e obtenção de amostras para uso em testes de diagnóstico, essa reutilização do adsorvente não deve ser geralmente algo viável, por conter principalmente eventuais riscos de contaminação. Entretanto, se pensarmos em casos nos quais seja preciso realizar a extração de mais de uma amostra de um mesmo indivíduo, essa propriedade do γ -NPs/PEDOT poderia ser útil. Da mesma forma, existe uma larga gama de aplicações em outras áreas, como na remediação ambiental.

Figura 36 – Eficiência (%) do nanocompósito γ -NPs/PEDOT quando usado ciclos consecutivos de adsorção/dessorção de DNA de esperma de salmão.



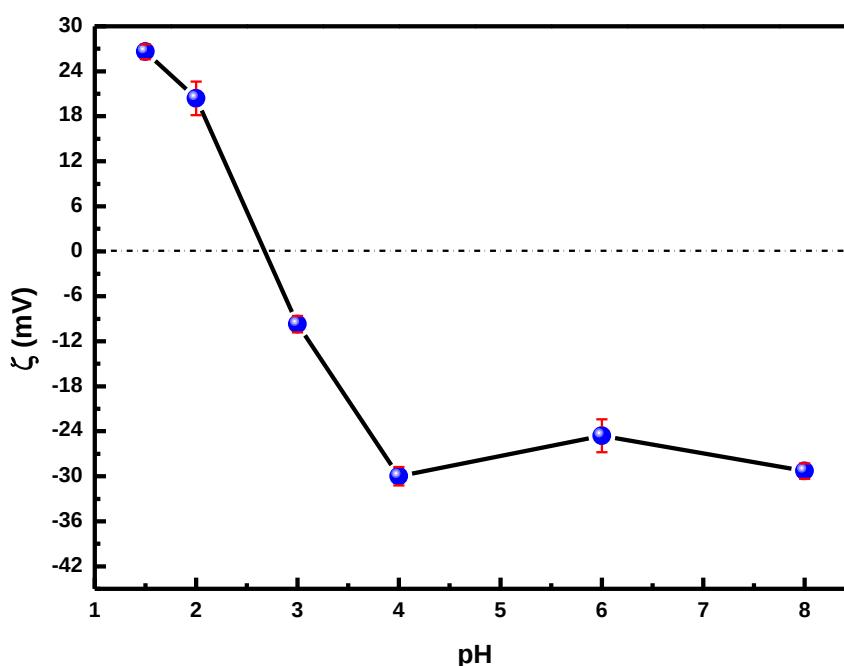
Fonte: O autor (2019)

3.3.2.1.9 Sobre os mecanismos de interação entre o γ -NPs/PEDOT e cadeias de DNA

Para tentar elucidar os mecanismos prevalentes na interação entre o γ -NPs/PEDOT e as cadeias de DNA, utilizamos medidas de potencial zeta (ζ) em dois tipos de experimentos. O primeiro consistiu em medir o valor de ζ para os γ -NPs/PEDOT dispersos em uma solução de ligação (Glicina – HCl) com diferentes valores de pH. Já no segundo, foi medido o potencial zeta da solução de DNA pura e após a interação com o nanocompósito.

Na Fig. 37 mostramos os valores de (ζ) obtidos para as soluções de γ -NPs/PEDOT em função do pH da solução de ligação (experimento 1). Como podemos observar, em meio mais ácido ($1.5 \leq \text{pH} \leq 3$), o γ -NPs/PEDOT possui uma carga positiva, indicando que dentro desta faixa de pH a interação do nanocompósito híbrido com as cadeias de DNA está possivelmente ocorrendo por meio de uma interação eletrostática entre as cargas negativas dos grupos fosfatos do mesmo e a superfície positivamente carregada do nanocompósito.

Figura 37 – Variação de potencial zeta do nanocompósito γ -NPs/PEDOT em função do pH da solução de ligação (Glicina – HCl).



Fonte: O autor (2019)

Já no segundo experimentos, onde medimos o potencial zeta da solução de dna antes e depois da adsorção com o γ -NPs/PEDOT, obtivemos valores de $\zeta = -62,5 \text{ mV}$ e $-10,3 \text{ mV}$, para a solução pura de DNA e após a interação, respectivamente. Mais uma vez, isso reforça a ideia de que uma interação eletrostática estaria ocorrendo. Além disso, ao cruzarmos esses resultados de potencial zeta com a eficiência de adsorção de DNA em função do pH do meio (ver Seção 3.3.2.1.1), com aqueles obtidos nos experimentos de cinética e isoterma de adsorção (ver Seções 3.3.2.1.4 e 3.3.2.1.5), podemos chegar as seguintes conclusões;

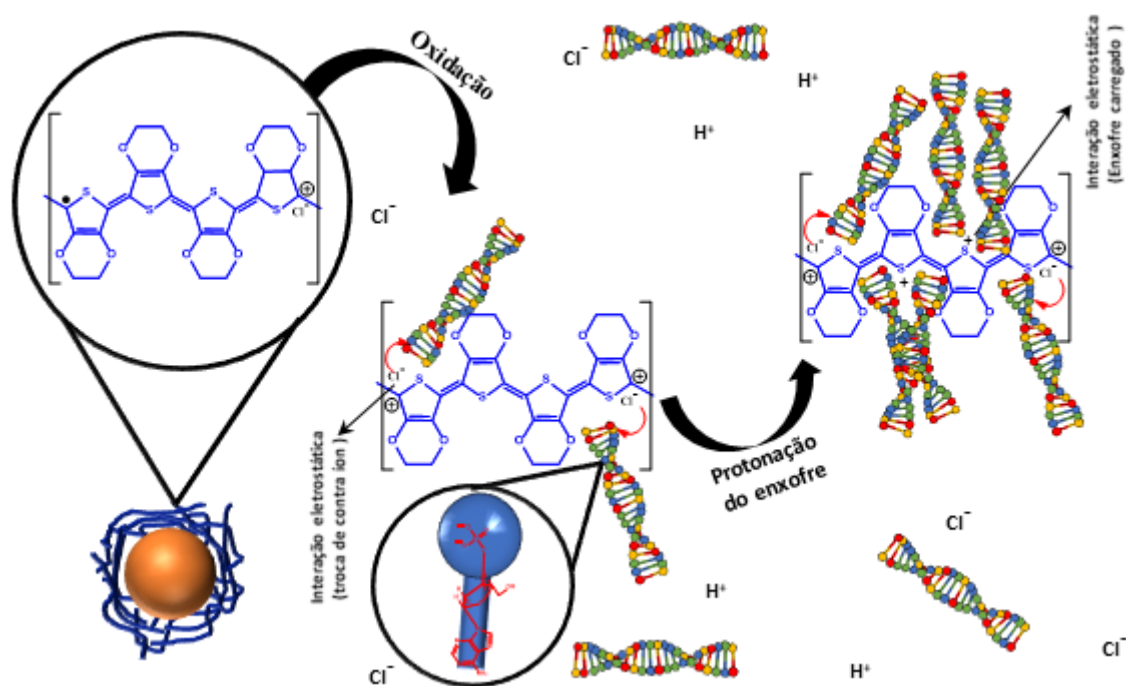
- i. o perfil de carga do γ -NPs/PEDOT em função do pH está em ressonância com o de adsorção, inclusive quanto à faixa de melhor adsorção, mostrando que quanto

mais baixo o valor de pH do meio, maior será o valor de ζ e, consequentemente, maior a adsorção de DNA, como observado.

- ii. Os resultados dos modelos de cinética indicam que o mecanismo de adsorção é de caráter químico, o que está de acordo com a ideia de que a adsorção ocorre através da troca iônica do contra-íon dos defeitos presentes ao longo da cadeia polimérica.
- iii. Os ajustes de isotermas de adsorção mostram que existe uma distribuição energética heterogênea nos sítios de adsorção. Assim, outros tipos de interação ou diferentes sítios são formados na estrutura do polímero, devido às condições de adsorção.

Considerando os resultados obtidos, e com base nas propriedades químicas do PEDOT, e as condições em que ocorre o processo de adsorção, podemos sugerir a seguinte hipótese sobre como a adsorção pode vir a acontecer. Em um primeiro instante, deve ocorrer a adsorção através da substituição dos contra-íons associados aos defeitos dos polarons e bipolarons do PEDOT pela interação com os grupos fosfatos das cadeias de DNA (Teixeira-Dias, Zanuy et al. 2010). Por sua vez, devido ao ambiente ácido, os átomos de enxofre do anel tiofeno são protonados através de seus dois pares de elétrons desemparelhados (Szajda and Lam 1996, Alemán, Teixeira-Dias et al. 2009), criando novos sítios carregados ao longo de toda a cadeia polimérica, que podem desempenhar um papel na adsorção de DNA. Na Fig. 38, mostramos de forma esquemática as principais etapas desse mecanismo de interação proposto.

Figura 38 – Mecanismo de interação proposto para a adsorção de DNA pelo nanocompósito γ -NPs/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

Por outro lado, existe também a possibilidade de ocorrer contribuições através da formação de ligações de hidrogênio, dado que, devido ao baixo valor de pH uma parcela de cadeias de DNA podem vir a se desnaturar, expondo assim as bases nitrogenadas, as quais por sua vez, podem realizar ligação de hidrogênio com o anel tiofeno e o oxigênio do anel oxietileno (Alemán, Teixeira-Dias et al. 2009). Devemos notar, porém, que ainda se fazem necessários experimentos adicionais que possam vir a dar suporte a tais suposições.

3.3.2.1.10 Comparação do uso das γ -NPs/PEDOT com outros adsorventes de DNA

Na Tabela 6, estão resumidos os dados relativos à adsorção de DNA para diferentes adsorventes baseados em nanopartículas magnéticas reportados na literatura, e os resultados apresentados neste trabalho para o uso do γ -NPs/PEDOT. Podemos ver que a capacidade de adsorção apresentada pelo γ -NPs/PEDOT (248 mg/g) é uma das maiores entre todos os adsorventes listados, comparável a aqueles de partículas com fosfonatos de zircônia, ácido bromoacético/acridina, e quitosana-nanotubo-PEG, com valores de capacidade de 239, 181, e 177 mg/g, respectivamente (Tang, Ren et al. 2013, Sahoo and Liu 2015, Xu, Wang et al. 2017). No entanto, o γ -NPs/PEDOT apresenta vantagens comparativas, em relação a parâmetros importantes como tempo de equilíbrio de adsorção

(que no caso dos fosfonatos é muito elevado, chegando a 1440 min), dessorção (que não é reportado para bromoacético/acridina), e tempo de dessorção (não apresentado para o quitosana-nanotubo-PEG). Por sua vez, considerando o processo de dessorção, que apresenta um valor acima de 90%, em um tempo de apenas 5 min, podemos afirmar que o γ -NPs/PEDOT está entre os mais altos, perdendo apenas para as nanopartículas revestidas com polianilina (Medina-Llamas, Chávez-Guajardo et al. 2014). Deve ser notado ainda, no que diz respeito ao valor de pH da solução de ligação utilizada, alguns dos outros adsorventes também fazem uso de pHs mais ácidos (Cai, Huang et al. 2006, Ghaemi and Absalan 2014, Wang, Ma et al. 2015, Saraji, Yousefi et al. 2017, Maciel, da Silva et al. 2018). Considerando todos esses aspectos, podemos afirmar que o nanocompósito γ -NPs/PEDOT aparece como um adsorvente magnético de fase sólida consideravelmente competitivo, seja por sua elevada capacidade de adsorção, seja pela porcentagem e reduzido tempo de dessorção, em relação a outros adsorventes baseados na funcionalização/revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

Tabela 6 – Comparação do nanocompósito γ -NPs/PEDOT com outros adsorventes magnéticos de DNA

Funcionalização da superfície	Tipo de DNA adsorvido	pH	Capacidade de adsorção (mg/g)	Tempo de adsorção (min)	Dessorção (%)	Tempo de dessorção (min)	Ref.
Sílica mesoporosa	Esperma de salmão	-	46	20	80	20	(Teng, Li et al. 2009)
Sílica mesoporosa	Esperma de salmão	7,6	121,6	1200	89,5	60	(Li, Zhang et al. 2011)
hemoglobina	Plasmídeo	6,1	27,9	15	68,3	15	(Chen, Mao et al. 2012)
ácido bromoacético/acridina	Plasmídeo	6,2	181,1	30	-	-	(Sahoo and Liu 2015)
montmorilonita	Esperma de salmão	2,0 – 5,0	54,3	140	46,6	140	(Cai, Huang et al. 2006)
Polietilenimina	Esperma de salmão	4,0	61,8	0,5	70	5	(Hu, Hu et al. 2015)
Zircônia	Tabaco	2,0	53,5	5	81,3	5	(Saraji, Yousefi et al. 2017)
polidopamina	Timo de bezerro	2,0	161	10	-	10	(Wang, Ma et al. 2015)
Brometo de 1-hexil-3-3metilimidazolio	Esperma de arenque	3,0	19,9	2	96	30	(Ghaemi and Absalan 2014)
Quitosana-Nanotubo-PEG	Esperma de salmão	4,0	177	60	79	-	(Xu, Wang et al. 2017)
Au – Polietilenimina	Esperma de salmão	5,0	90	1	87	20	(Sun, Zhu et al. 2010)
Fosfonatos de zircônia	Esperma de salmão	-	239	1440	89	240	(Tang, Ren et al. 2013)
PSG-NH ₂ -SiO ₂	Plasmídeo	5,0	17	-	56,3	-	(Xu, Song et al. 2012)
Polianilina	Aspergillus niger	-	2,1	40	-	40 – 60	(Gai, Han et al. 2013)
Polipirrol			2,6				
Polianilina	Esperma de salmão	3,8	75,2	10	96,5	2	(Medina-Llamas, Chávez-Guajardo et al. 2014)
Quitisana-Polianilina	Esperma de salmão	3,6	45	60	66	-	(Maciel, da Silva et al. 2018)
PEDOT	Esperma de salmão	2,5	248	360	94,2	5	Este trabalho

Fonte: O autor (2019)

PSG: Poli(estireno-co-metacrilato de glicidil); **PEG:** Polietilenoglicol

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

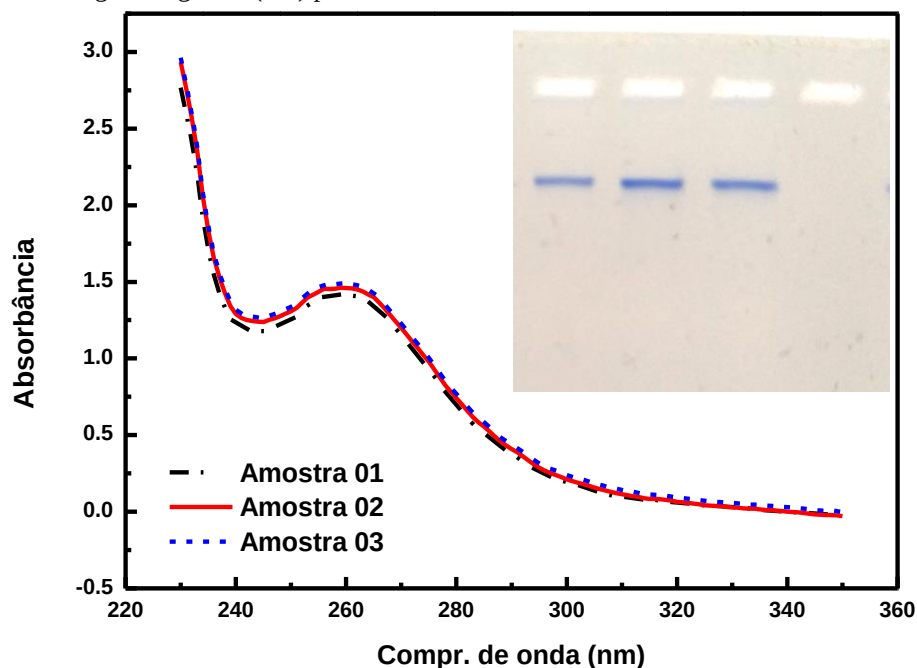
Diante dos resultados satisfatórios de adsorção obtidos para os experimentos realizados com o sistema modelo de uma solução aquosa de esperma de salmão, consideramos a utilização do γ -NPs/PEDOT com material adsorvente de fase sólida em protocolos para a purificação de DNA a partir de amostras reais de natureza mais complexas. Na presente seção, apresentaremos os resultados com estes estudos como um primeiro incentivo à extração do DNA a partir amostras de sangue total humano, seguido dos resultados para o uso de solução da bactéria *Escherichia coli*.

3.3.2.2.1 Amostras de sangue total

Com o intuito de obter um protocolo viável para a purificação de DNA com amostras de sangue, realizamos inicialmente uma busca na literatura associada ao conhecimento anterior do grupo PNC, de modo a desenvolver o protocolo a ser descrito na Seção 3.2.4.2. Assim, como feito no caso do sistema modelo para DNA de salmão, realizamos uma série de estudos preliminares que nos permitiram um protocolo otimizado. Tais estudos serão discutidos nas próximas seções a partir de agora.

Na Fig. 39, apresentamos alguns espectros e o resultado de experimentos de eletroforese (em detalhe) obtidas nas primeiras tentativas de purificação de DNA com o γ -NPs/PEDOT a partir de sangue total. Apesar do protocolo não estar ainda totalmente estabelecido, é possível observar que resultados promissores foram até agora obtidos, o que é comprovado tanto pela presença de DNA de boa qualidade como visto pela análise de UV-Vis, como pelos dados de eletroforese, onde uma única banda bem definida é observada. A presença dessa única banda no experimento de eletroforese, é um indicativo da integridade do DNA (caso o mesmo estivesse degradado ou contaminado, a banda não seria estreita, e sim muito larga, ou seja, um rastro, devido a uma grande distribuição de tamanhos de cadeias de DNA e também à presença de proteínas) (Makovets 2013).

Figura 39 – Espectros UV-Vis para amostras de DNA purificado a partir de sangue total humano utilizando o nanocompósito γ -NPs/PEDOT como adsorvente de fase sólida. Em detalhe, resultado do experimento de eletroforese em gel de agarose (1%) para as mesmas amostras.

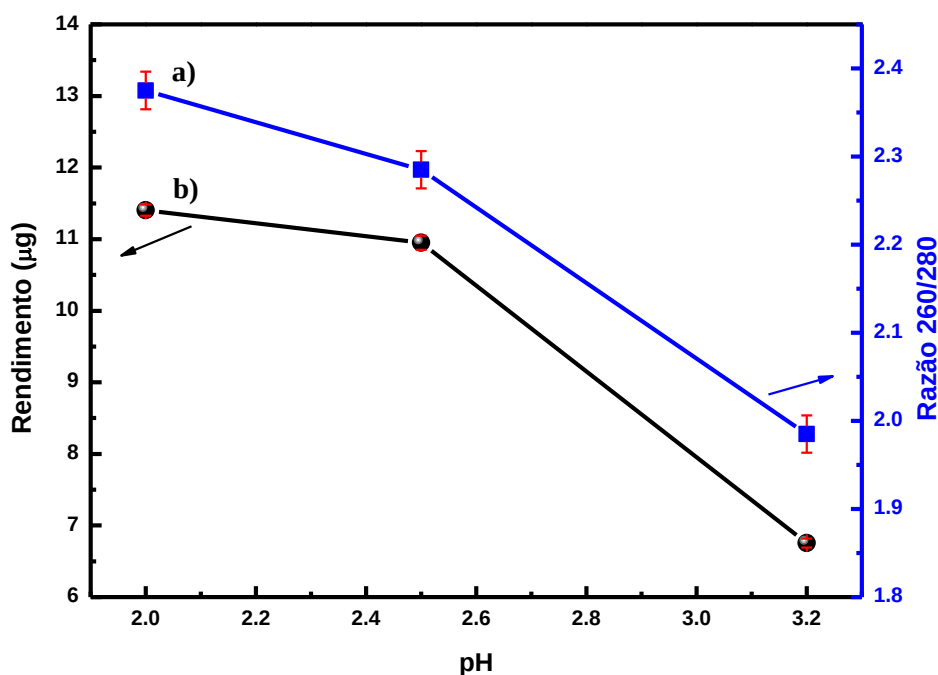


Fonte: O autor (2019)

3.3.2.2.1.1 Efeito do pH da solução ligação

Na Fig. 40 mostramos os resultados obtidos para o rendimento de DNA purificado e para a razão 260/280 em função do pH da solução de ligação, segundo o protocolo descrito na Seção 3.2.4.2 (100 μ L de sangue total). Podemos ver que o rendimento de DNA (curva b) exibe uma perda significativa com o aumento do pH do meio, indo de um valor de aproximadamente 11,4 μ g em pH 2,0, para um rendimento em torno de 6,5 μ g quando utilizado um pH de 3,2. Este comportamento está de acordo com o observado anteriormente para o sistema modelo (ver Seção 3.3.2.1.1). No entanto, com relação à razão 260/280, (curva a) vemos que em valores de pH ela fica acima de 2,0, o que sugere contaminação por RNA. Como visto anteriormente, essa relação é um indicativo da pureza do DNA, sendo uma amostra de DNA considerada pura quando essa razão se encontra na faixa de 1,8 – 2,0 (Scientific 2008), o que nos sugere que a protonação das cadeias de PEDOT está criando um grande número de sítios ativos. Consequentemente, este excesso de carga permite a adsorção simultânea de outras moléculas (como proteínas, carboidratos, entre outros) que absorvem na mesma região, o que causa a super estimação da quantidade de DNA adsorvido.

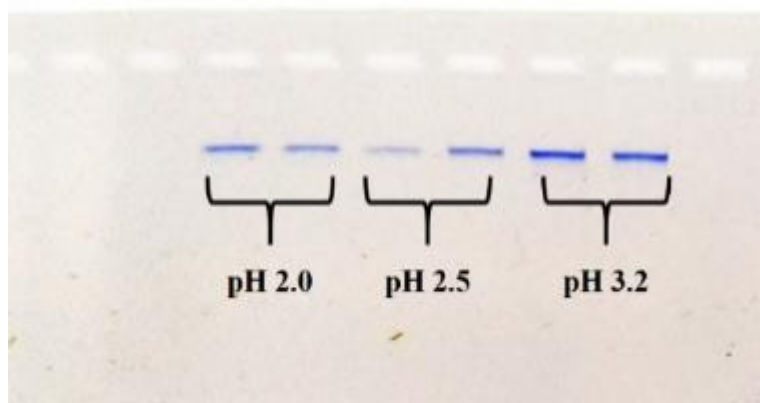
Figura 40 – Variação do rendimento (●) e da razão 260/280 (■) como função do pH da solução de ligação para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano.



Fonte: O autor (2019)

Uma outra evidência da contaminação da amostra para valores de pH abaixo de 3,2 é evidenciada pelos experimentos de eletroforese em gel de agarose para amostras de DNA purificadas usando diferentes pHs, como mostrado na Fig. 41. Conforme nota-se, a intensidade da banda de DNA purificado com o pH 3,2 é significativamente mais forte que as observadas para pHs mais ácidos apesar de mostrar menor rendimento na espectroscopia. Este resultado corrobora as informações extraídas da razão 260/280, uma vez que a intensidade da banda de eletroforese está diretamente relacionada com a quantidade de DNA da amostra (Makovets 2013). Portanto, apoiados por tais resultados podemos concluir que o melhor pH para a solução de ligação é de 3,2, visto que este apresentou uma pureza satisfatória com razão 260/280 (~1,97) dentro da faixa aceitável. Vale salientar que as amostras utilizadas para a eletroforese não passaram por ajuste de concentração, ou seja, mantivemos o volume fixo em todas as amostras.

Figura 41 – Resultados de eletroforese em gel de agarose (1%) para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano para diferentes valores de pH da solução de ligação.

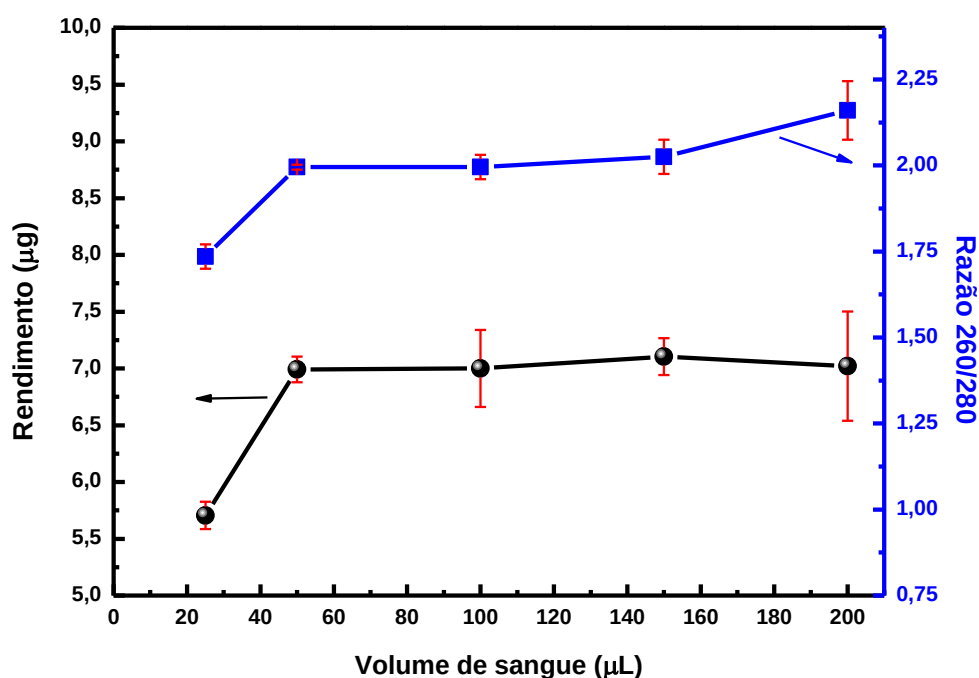


Fonte: O autor (2019)

3.3.2.2.1.2 Efeito do volume inicial da amostra

Uma vez estabelecido o melhor pH do meio para uma adsorção mais efetiva de DNA, passamos a analisar a importância da quantidade inicial da amostra no tocante ao rendimento final e à pureza do DNA purificado. Na Fig. 42 apresentamos os resultados obtidos para esse estudo. Como podemos observar, a partir de 50 μL de sangue o rendimento de DNA se mantém aproximadamente constante ($\sim 7 \mu\text{g}$). O fato do rendimento não aumentar com o aumento da quantidade de amostra inicial indica que, com um volume igual ou superior a 50 μL , ocorre a saturação da capacidade de adsorção de DNA para a quantidade fixa de $\gamma\text{-NPs/PEDOT}$ utilizada (4 mg). Por sua vez, analisando o comportamento da razão 260/280, vemos que até um volume de sangue 150 μL essa relação se mantém no limite ($\sim 2,0$) no qual o DNA é considerado puro. Ocorre, no entanto, que para volumes de sangue superiores a 150 μL começamos a observar indícios de contaminação, com a razão 260/280 alcançando valores acima da faixa aceitável de pureza (no caso, 2,16 para 200 μL). Esse fato pode estar associado à grande disponibilidade (concentração) de moléculas contaminantes, por conta do aumento da quantidade de amostra inicial.

Figura 42 – Variação do rendimento (●) e da razão 260/280 (■) da amostra de DNA em função do volume inicial de sangue humano.



Fonte: O autor (2019)

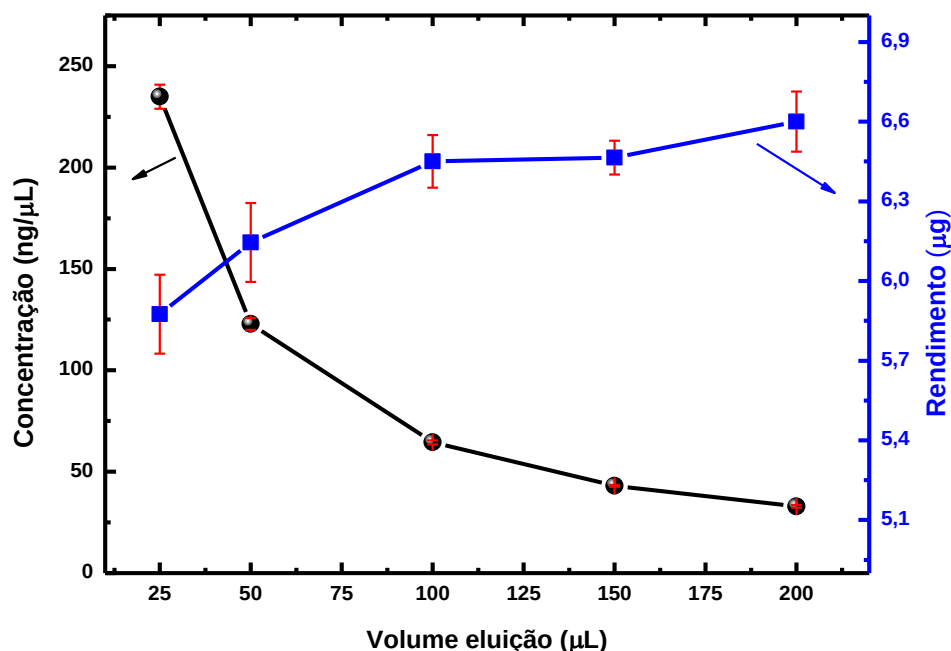
Considerando esses resultados, optamos pelo uso de um volume de 50 μL de sangue no protocolo de purificação, uma vez que com tal volume por um lado devemos ter a mínima interferência de matéria orgânica, e por outro teríamos uma quantidade suficiente para permitir um rendimento máximo de adsorção para a quantidade de γ -NPs/PEDOT por nós utilizada.

3.3.2.2.1.3 Efeito do volume de eluição

Uma vez determinado o melhor volume de amostra para o protocolo de purificação, passamos a investigar a interferência do volume do tampão de eluição no rendimento e concentração de DNA purificado, uma vez que sabemos que o γ -NPs/PEDOT tem a capacidade de concentrar amostras de DNA (ver Seção 3.3.2.1.7). Os resultados correspondentes são mostrados na Fig. 43, onde é possível verificar que, com o aumento do volume do tampão de eluição, temos um acréscimo no rendimento total, que passa de 5,8 μg com 25 μL de tampão para 6,6 μg quando 200 μL são usados. Isso faz sentido, uma vez que, para um maior volume do tampão de eluição há uma maior quantidade de íons disponíveis na solução para neutralizarem (por troca iônica) as cargas do PEDOT e, desta maneira, realizar a eluição de uma maior quantidade de DNA ligado

ao polímero. Por outro lado, ao analisarmos a concentração de DNA para cada volume utilizado, vemos que como esperado, a mesma tem um intenso aumento ao serem utilizados baixos volumes com um rendimento de 235 ng/ μ L com 25 μ L do tampão, sem que ocorra uma perda expressiva no rendimento. Essa capacidade de concentração da amostra a um baixo custo do rendimento representa de fato uma importante vantagem, que pode ser explorada em protocolos de concentração de amostras muito diluídas. Nesses casos, uma baixa concentração do DNA alvo que poderia estar fora do limite de detecção de várias técnicas e protocolos de biologia molecular, ou análises forenses passaria a ser efetivamente aumentada.

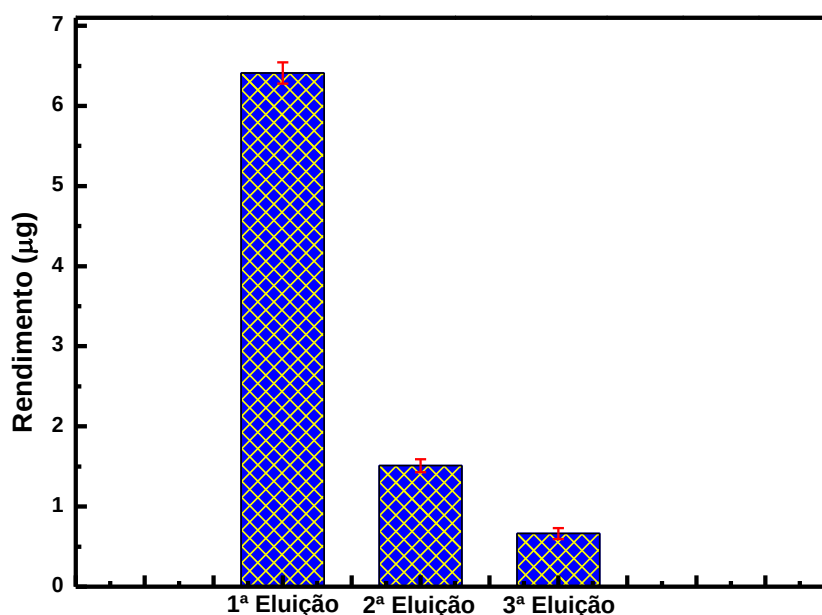
Figura 43 - Variação da concentração (●) e rendimento (■) da amostra de DNA como função do volume da solução de eluição utilizado.



Fonte: O autor (2019)

Em um estudo complementar, analisamos o efeito de múltiplas eluições consecutivas do γ -NPs/PEDOT, anteriormente usado em processo de adsorção. Para isso, realizamos três eluições sucessivas da mesma amostra de nanocompósito, utilizando um volume de 100 μ L de solução tampão por vez. Na Fig. 44 é apresentado o rendimento obtido em cada uma das eluições, que foi de 6,4, 1,6, e 0,6 μ g, respectivamente. Como podemos ver, o rendimento total passa de aproximadamente 6,4 para 8,6 μ g, em um ganho de 2,2 μ g. Esse resultado nos mostra que uma única etapa de eluição não é capaz de liberar todo o DNA adsorvido pelo γ -NPs/PEDOT, e que portanto, o rendimento final pode ser aumentado consideravelmente se forem realizadas múltiplas eluições.

Figura 44 – Evolução do rendimento de DNA purificado após múltiplas eluições para uma mesma adsorção.



Fonte: O autor (2019)

É digno de nota que, dentre outros fatores a discrepância entre os valores de rendimento entre cada experimento que observamos pode estar associada ao fato de que há uma variação na concentração de leucócitos no sangue de cada doador, e até do mesmo indivíduo, a depender das condições fisiológicas e imunológicas em diferentes momentos (Winkel, Statland et al. 1981). Em nosso caso, cada experimento foi sempre realizado utilizando uma mesma amostra, não sendo, porém, possível o uso de uma mesma amostra de sangue ao longo de todo o trabalho. Além disso, erros de pesagem do γ -NPs/PEDOT podem ter também contribuído para tal comportamento oscilatório de rendimento. Apesar disso, é possível observar que o rendimento se manteve em uma faixa de 6,3 - 6,9 μg .

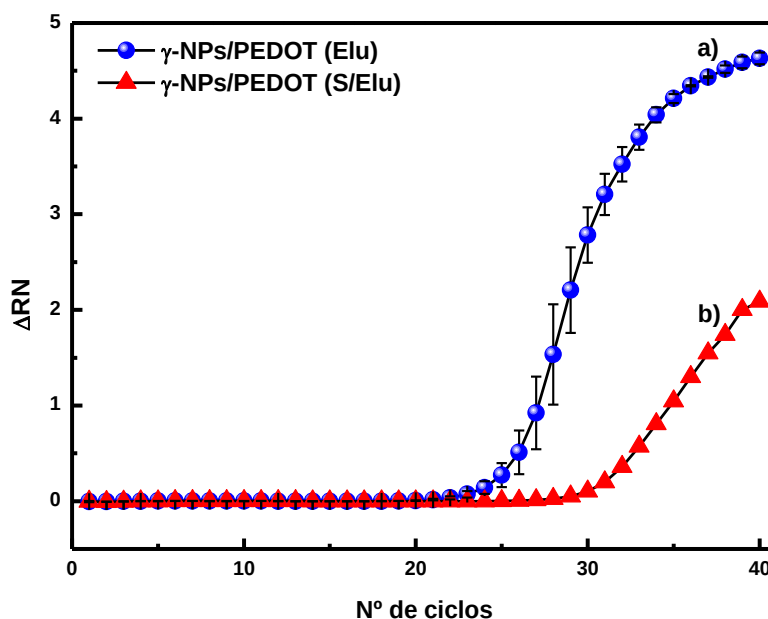
3.3.2.2.1.4 Ensaios de biologia molecular (qPCR)

Uma das principais utilizações do DNA é sua aplicação em ensaios e técnicas de biologia molecular, em procedimentos como diagnósticos, identificação, sequenciamento, clonagem, ou na pesquisa. Como já mencionado, dentre todas as técnicas de biologia molecular, a PCR se destaca devido a sua elevada sensibilidade e especificidade, características que a tornaram em padrão ouro. Contudo, ela é uma técnica muito susceptível a diversos interferentes que podem impedir o desenvolvimento da reação de amplificação, e por isso a qualidade da amostra de partida tem uma importância significativa. Considerando que, a amplificação de amostras por PCR é uma passo

importante para a comprovação da qualidade do DNA, como descrito na Seção 3.2.4.2.4. Realizamos ensaios de PCR em tempo real (qPCR) com dois tipos de amostra; uma a partir do DNA purificado de acordo com o protocolo da Seção 3.2.4.2, e uma outra em que adicionamos uma pequena quantidade de γ -NPs/PEDOT (com o DNA adsorvido), sem que tenhamos realizado a etapa prévia de eluição diretamente dentro da reação. A escolha do uso da técnica qPCR para saber a qualidade de nossas amostras se deu por conta de sua capacidade de monitoramento da amplificação durante a reação através da adição de marcadores fluorescentes (no caso Sybr Green).

Na Fig. 45 é apresentada a curva de amplificação tanto para a amostra eluída (Fig. 45a), como para a reação com o γ -NPs/PEDOT sem eluição (Fig. 45b). Como pode ser visto, a amplificação ocorreu com sucesso para as duas amostras, e vemos o aumento da intensidade de fluorescência característico ao longo da reação, através da fase exponencial a partir do ciclo 25 para a amostra eluída, e do ciclo 30 para a amostra com γ -NPs/PEDOT. Essa diferença no início da amplificação, bem como na intensidade de fluorescência entre as duas amostras, está associada com a quantidade de DNA adicionada na reação, uma vez que, no caso da reação com o γ -NPs/PEDOT não se tem controle da concentração inicial, e por ter sido adicionado uma quantidade não determinada de material. Nesse caso, a amplificação começa nos últimos 10 ciclos, e ao término nota-se que a reação ainda se encontra na fase exponencial, sem que todos os reagentes tenham sido consumidos, como ocorre no caso da amostra com o DNA eluído, onde pode ser observado o fim da fase exponencial.

Figura 45 – Curva de amplificação PCR em tempo real para amostras de DNA purificadas a partir de sangue total humano com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT. Em a) para amostras de DNA eluídas, e b) para o nanocompósito adicionado diretamente ao meio reacional (mastermix).



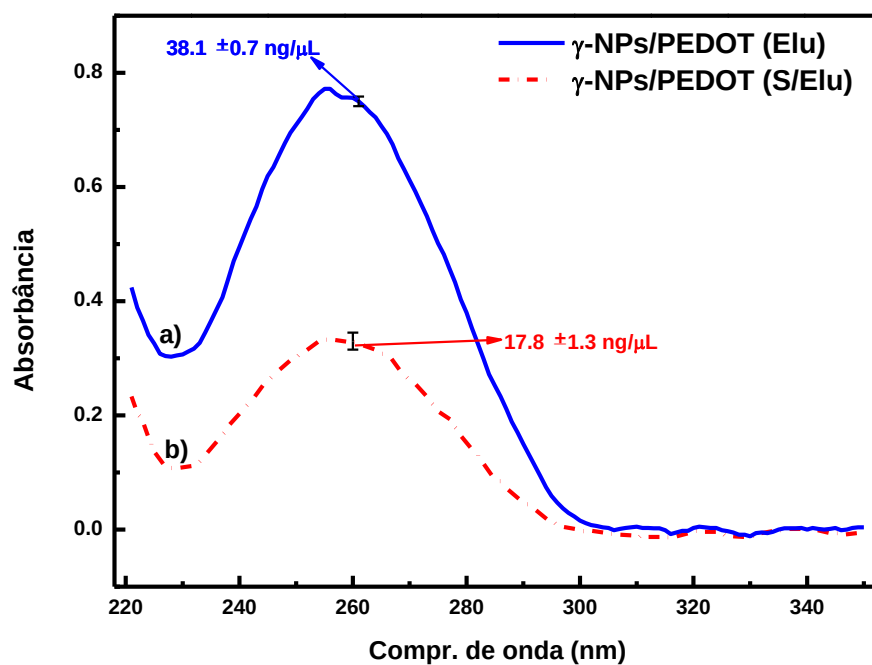
Fonte: O autor (2019)

Após o término da reação qPCR, as amostras foram purificadas com um kit comercial e quantificadas por espectroscopia UV-Vis, como discutido na Seção 3.2.4.2.4. Como mostrado na Fig. 46, a quantidade de material (amplicons) obtida para a reação com o DNA eluído (Fig. 46a) é o dobro daquele resultado do uso do γ -NPs/PEDOT (Fig. 46b), o que confirma o observado na curva de amplificação mostrada na Fig. 45. Por sua vez, a banda bem definida em 260 nm também confirma a presença de DNA, como esperado.

Por fim, para avaliar a qualidade e tamanho dos amplicons obtidos através da reação qPCR, foi realizado um experimento de eletroforese (ver Seção 3.2.4.2.4.1) com as amostras obtidas, como mostrado na Fig. 47. Como pode ser visto, para ambas as amostras DNA eluído (Fig. 47b e 47c) e com o γ -NPs/PEDOT (Fig. 47d e 47e) nota-se uma banda intensa e definida com um tamanho de aproximadamente 250 pares. Esse tamanho é o que se espera para o conjunto de primers por nós empregados na reação, conforme relatado na literatura (Röcken, Neumann et al. 2007). Desse modo, podemos afirmar que, i) o DNA purificado com o γ -NPs/PEDOT apresenta pureza suficiente para ser empregado em técnicas de biologia molecular, ii) o material adsorvente (γ -NPs/PEDOT), mesmo quando adicionado diretamente na reação não a inibe. Essa última

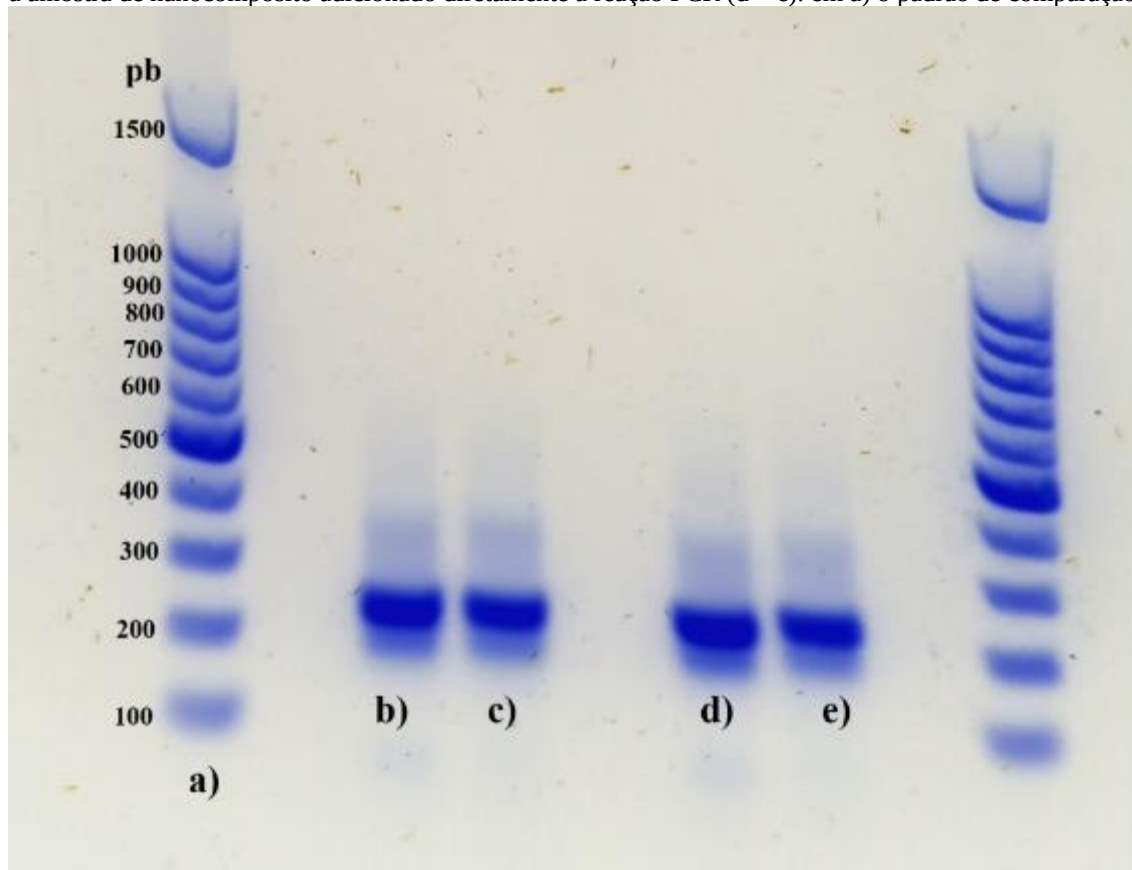
conclusão é de especial interesse, ao menos do ponto de vista operacional, posto que, ao eliminarmos a etapa de eluição tem-se um ganho considerável de tempo.

Figura 46 – Espectros UV-Vis para as amostras de DNA eluída (a), e do nanocompósito adicionado na reação (b) após a amplificação PCR.



Fonte: O autor (2019)

Figura 47 – Eletroforese em gel de agarose (1%) após PCR para as amostras de DNA eluída (b – c), e para a amostra de nanocompósito adicionado diretamente à reação PCR (d – e). em a) o padrão de comparação.

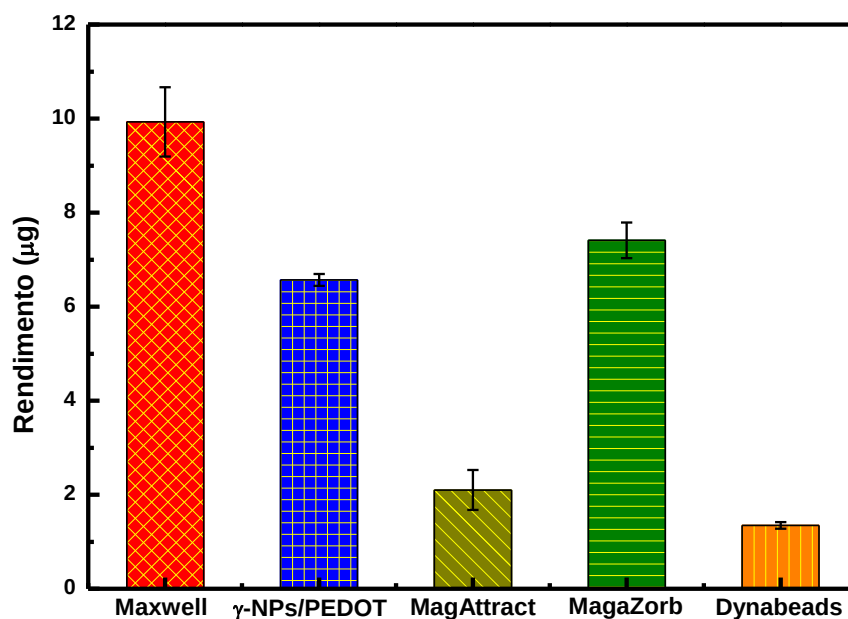


Fonte: O autor (2019)

3.3.2.2.1.5 Estudo comparativo com kits comerciais

Tendo em vista os bons resultados de rendimento e pureza de DNA após seguirmos o protocolo de purificação utilizando o γ -NPs/PEDOT, para fins comparativos, e como já discorrido na Seção 3.2.4.2.5, realizamos a aquisição de quatro kits comerciais para purificação magnética de DNA a partir de amostras de sangue total. Na Fig. 48 são mostrados os rendimentos obtidos para a extração de DNA a partir de amostras de sangue humano, usando tanto os kits comerciais como o γ -NPs/PEDOT. Como é possível observar, o rendimento do γ -NPs/PEDOT (6,6 μ g) se mostrou competitivo quando comparado com o kit MagaZorb (7,4 μ g), e inferior ao Maxwell (9,9 μ g). Por outro lado, em relação ao MagAttract (2,2 μ g) e o Dynabeads (1,4 μ g), vemos que o rendimento do nosso material é consideravelmente superior. Assim, podemos inferir que de um modo geral o uso do γ -NPs/PEDOT é um material competitivo, estando esse compósito entre os três melhores adsorventes que tínhamos disponíveis para os experimentos. Deve ser observado que para cada kit foi seguido o respectivo protocolo sugerido pelo fabricante.

Figura 48 – Comparação do rendimento do DNA obtido pelo uso do nanocompósito γ -NPs/PEDOT com o de kits comerciais de purificação magnética de DNA a partir de amostras de sangue total humano.

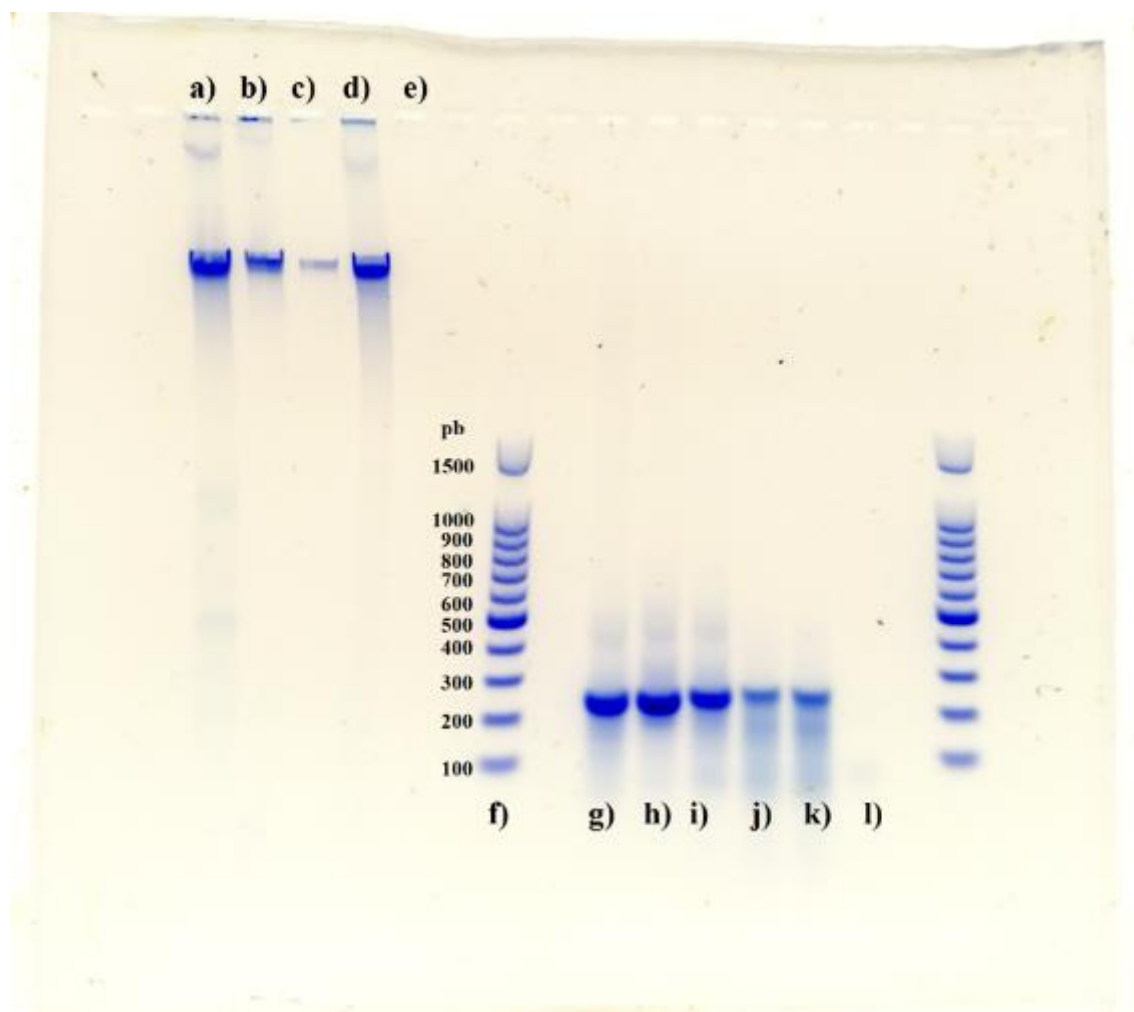


Fonte: O autor (2019)

Após o procedimento de purificação, realizamos uma eletroforese em gel de agarose como apresentado na Fig. 49 para cada uma das amostras purificadas (parte superior) e para as amostras amplificadas por qPCR correspondentes (parte inferior). Para as amostras purificadas temos a seguinte ordem de poços: Maxwell a), γ -NPs/PEDOT b), MagAttract c), MagaZorb d), e Dynabeads e). Já as respectivas amplificações, a sequência adotada foi: Maxwell g), MagaZorb h), γ -NPs/PEDOT i), MagAttract j), e Dynabeads k). No que se refere à etapa de purificação (a-k), vemos que a intensidade da banda do DNA purificado com o γ -NPs/PEDOT é comparável com as das faixas do Maxwell e MagaZorb, e maior que as bandas dos outros dois (MagAttract e Dynabeads). Esse resultado está de acordo com o que foi obtido através da quantificação por espectroscopia UV-Vis (Fig. 48), o que novamente comprova a competitividade do γ -NPs/PEDOT. Além disso, temos uma única banda observada na mesma região quando do uso dos kits comerciais, o que indica a boa integridade do DNA purificado com nosso protocolo, em mais um resultado que corrobora as análises anteriores por nós realizadas. A mesma concordância foi verificada no caso dos resultados de qPCR, de modo que, para todas as amostras à amplificação ocorreu como previsto, com os amplicons apresentando um tamanho de aproximadamente 250 pares de bases, o que era o esperado para o conjunto de primers do gene β -actina utilizados (Röcken, Neumann et al. 2007). Mais uma vez,

esses resultados confirmam a boa qualidade, integridade, e semelhança de rendimento do DNA purificado a partir de amostras de sangue total com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT, comprovando a viabilidade de seu uso em protocolos subsequentes de biologia molecular.

Figura 49 – Eletroforese em gel de agarose (1%) para amostras de DNA após a purificação com o γ -NPs/PEDOT b), e os diferentes kits comerciais; Maxwell a), MagAttract c), MagaZorb d), e Dynabeads e). e posteriormente à amplificação PCR; Maxwell g), MagaZorb h), γ -NPs/PEDOT i), MagAttract j), e Dynabeads k).

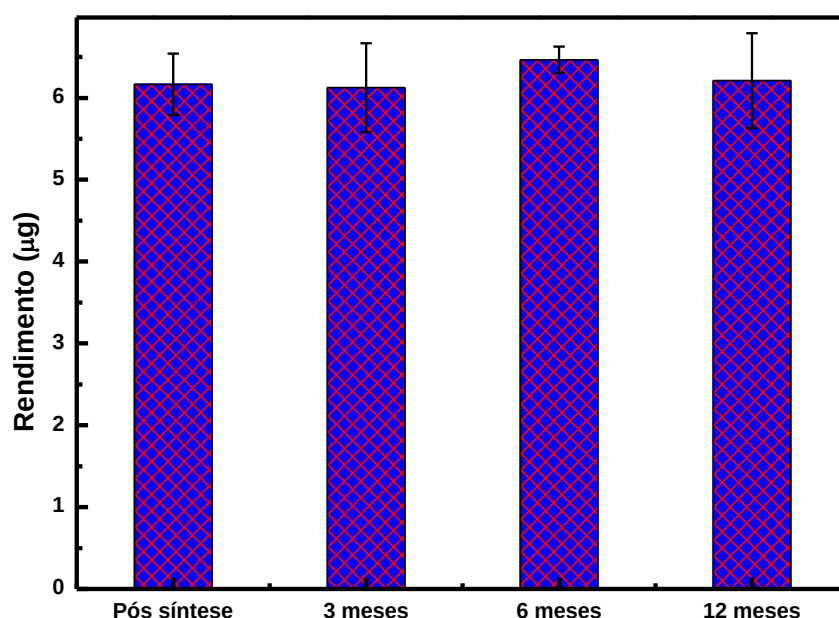


Fonte: O autor (2019)

Uma última característica explorada em nossos experimentos foi a questão da estabilidade do γ -NPs/PEDOT com relação ao tempo de armazenamento em prateleira. Para isso, realizamos uma síntese, sendo a amostra dos nanocompósitos armazenada à temperatura ambiente (25 – 30 °C) e utilizada em uma sequência de purificações de DNA a partir de amostras de sangue total realizadas dentro de um período total de 12 meses. Na Fig. 50 é apresentado o rendimento para diferentes tempos de armazenamento do γ -

NPs/PEDOT. Como podemos observar, o γ -NPs/PEDOT se manteve estável durante o período de tempo por nós analisado, em uma demonstração de que o material se mantém com suas características preservadas quando armazenados em condições ambientes (25 – 30 °C) por pelo menos 12 meses de armazenamento. Contudo, vale ressaltar que esse período de viabilidade pode ser ainda maior, uma vez que nosso estudo se limitou apenas a esta faixa de tempo. Um, outro aspecto a ser salientado é o fato de que para cada purificação, todas as soluções tampões utilizadas eram preparadas um dia antes, a fim que fossem evitadas possíveis interferências pelo envelhecimento das soluções a serem usadas.

Figura 50 – Rendimento de amostras de DNA purificado a partir de sangue total humano com o nanocompósito γ -NPs/PEDOT em função do tempo de prateleira.



Fonte: O autor (2019)

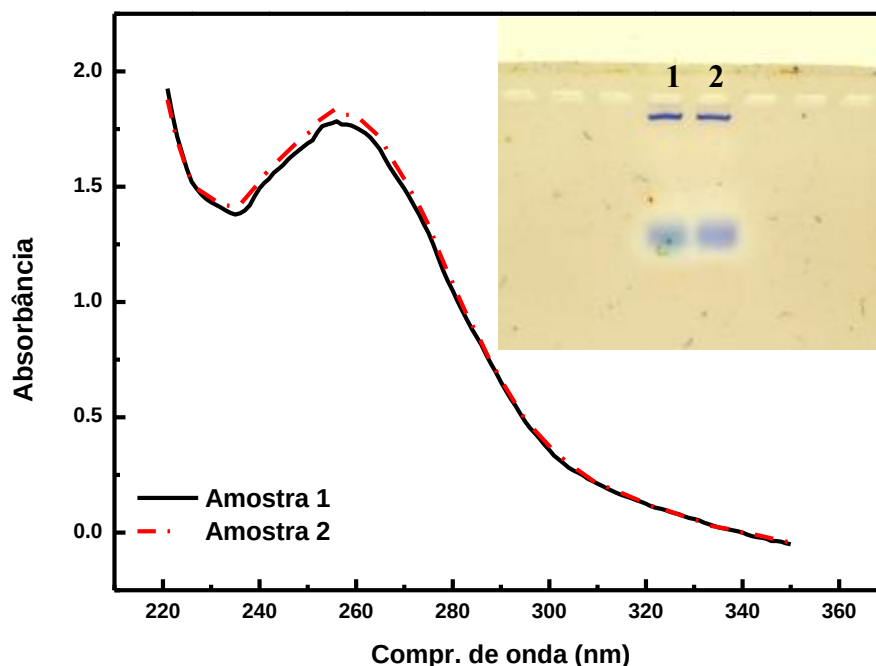
Em resumo, quanto às vantagens oferecidas pelo protocolo desenvolvido no presente trabalho podemos mencionar: o fato do mesmo não fazer uso de compostos fenólicos, que são utilizados na maioria dos protocolos tradicionais (extração orgânica), e do tiocionato de guanidina, usado em protocolos de adsorção baseados em sílica porosa (extração de fase sólida). Sabe-se que esses reagentes são tóxicos tanto para quem os manipula, como para o meio ambiente. Além disso, a contaminação do DNA purificado com tais compostos pode provocar interferência em técnicas de biologia molecular sensíveis como a PCR; ser uma metodologia simples e de baixo custo, sem que seja necessário o uso de equipamentos sofisticados ou de mão de obra especializada; as

características magnéticas que tornam o material passível de separação do meio através da aplicação de um pequeno ímã, a fácil e rápida eluição do DNA adsorvido na superfície do material por simples mudanças de pH do meio, e as dimensões nanométricas do nanocompósito, que confere a ele uma grande área superficial para a adsorção do DNA alvo.

3.3.2.2 Amostras de bactérias

Tendo em vista, a qualidade dos resultados obtidos nos estudos realizados para a purificação de DNA a partir de sangue total, decidimos investigar a possibilidade de utilizar o γ -NPs/PEDOT como material de purificação para outros tipos de amostras biológicas. Para esse fim, elaboramos um protocolo para a purificação de DNA total de bactérias Gram negativas, como apresentado (na Seção 3.2.4.3) a bactéria escolhida foi a estirpe DH5 α da *E. coli* resistente à ampicilina, com amostras obtidas de acordo com o procedimento de cultivo celular descrito na Seção 3.2.4.3.1. A purificação obtida seguiu o protocolo estabelecido na Seção 3.2.4.3.2, e que foi desenvolvido a partir da adaptação de protocolos para sangue e de outros usados para bactérias Gram negativas disponíveis na literatura (He 2011). Os resultados obtidos com esta metodologia são apresentados na Fig. 51, onde podemos ver que de fato fomos capazes de purificar o DNA total de amostras bacterianas, com um bom rendimento (7,3 μ g) Isso mais uma vez mostra a versatilidade e a robustez do uso do γ -NPs/PEDOT em protocolos de purificação de DNA a partir de amostras complexas. Apesar disso, ao realizarmos a eletroforese em gel de agarose, em detalhe, notamos a presença de uma extensa faixa na parte inferior do gel, além da banda esperada do DNA (estreita e bem definida). Essa faixa indica que há presença de contaminantes, possivelmente proteínas, RNA, e/ou DNA degradado (Makovets 2013). Essa observação está de acordo com os valores da razão 260/280 obtidos para essas amostras, que se mantiveram entre 1,60 – 1,62. Desse modo, podemos concluir que, apesar de se mostrar viável na presente versão, o protocolo utilizado precisa ainda sofrer algumas otimizações.

Figura 51 – Espectros UV-Vis para amostras de DNA purificado a partir de *E. coli* utilizando o nanocompósito γ -NPs/PEDOT como adsorvente de fase sólida. Em detalhe, eletroforese em gel de agarose (1%) para as mesmas amostras.



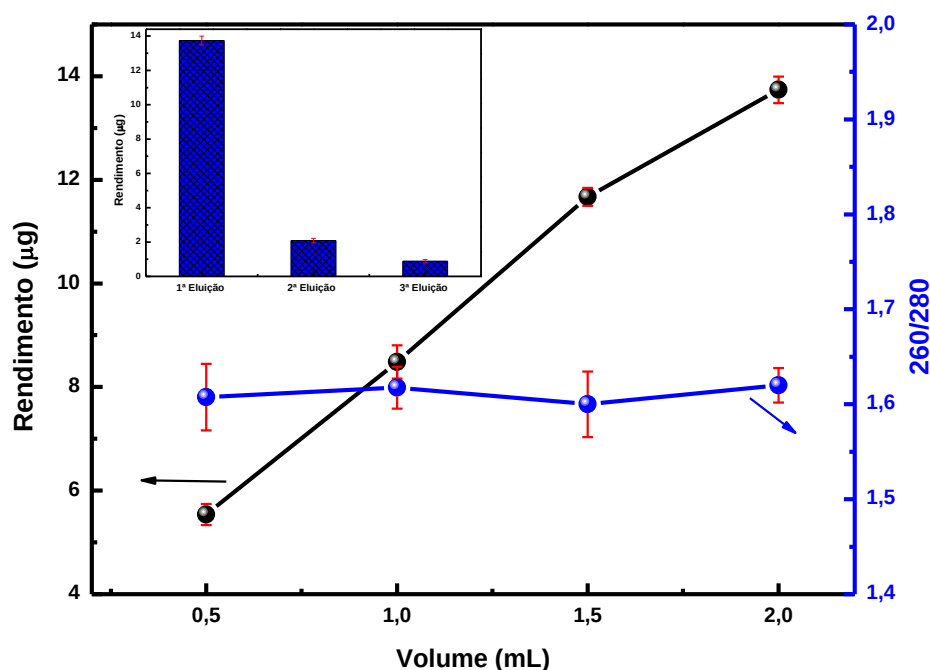
Fonte: O autor (2019)

3.3.2.2.2.1 Estudo do volume de amostra bacteriana

Assim como para o caso de amostras de sangue, nós analisamos também para as amostras de bactérias a influência da quantidade inicial de amostra no rendimento final e no valor da razão 260/280 (indicativo de pureza). A partir dos dados da Fig. 52, podemos observar que, à medida que se aumenta o volume inicial da amostra, se tem um maior rendimento, que passa de 5,5 μg com 500 μL de amostra para 13,7 μg com 2 mL. Em contrapartida, a razão 260/280 se manteve entre 1,60 – 1,62, apontando que com o presente protocolo ainda existe contaminação ao final do processo de purificação, o que certamente deve estar ocasionando uma superestimação do rendimento do DNA purificado. Essa afirmação pode ser corroborada através do experimento com gel de eletroforese para essas amostras purificadas, como apresentado na Fig. 53, sendo que as raia de a) – d) correspondem às amostras obtidas a partir do volume inicial de 2 mL – 500 μL , respectivamente. Podemos constatar a presença tanto uma larga banda na parte inferior do gel atestando a presença de contaminação verificada pela baixa razão 260/280, como de uma banda definida e intensa na parte superior do gel, que mostra que apesar da contaminação e da superestimação por espectroscopia, ainda temos um considerável rendimento de DNA com boa integridade. Além disso, analisando a banda referente ao DNA, vemos que conforme o volume de amostra inicial aumenta (d $\rightarrow$ a) temos uma

maior intensidade, correspondendo a um maior rendimento, como observado por espectroscopia. Em outras palavras, mesmo com uma superestimação do rendimento, é válido o comportamento constatado na Fig. 49, de que um aumento do rendimento acompanha o aumento do volume da amostra inicial.

Figura 52 – Rendimento (●) e da razão 260/280 (■) da amostra de DNA em função do volume inicial da suspensão de *E. coli*. Em detalhe, rendimento de DNA purificado para múltiplas eluições para o volume de 1 mL de amostra inicial de *E. coli*.



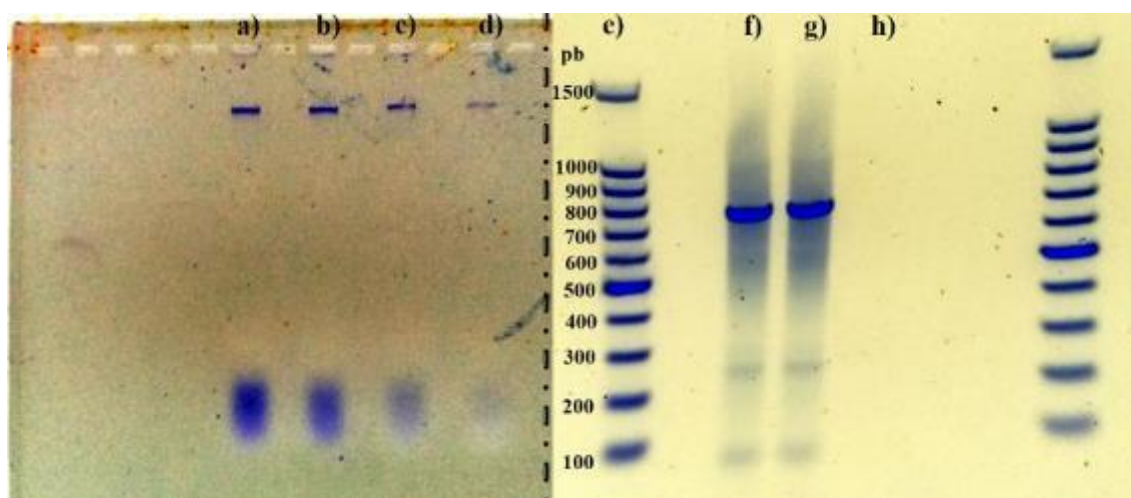
Fonte: O autor (2019)

Em detalhe na Fig. 52, temos o rendimento de DNA para múltiplas eluições consecutivas (3 eluições) obtidas para uma única amostra. Estes rendimentos são de 13,4, 1,99, e 0,8 μg para a primeira, segunda, e terceira eluição, respectivamente. Assim como no mesmo experimento realizado para amostras de sangue, observamos que uma única etapa de eluição não é capaz de liberar todas as cadeias de DNA adsorvidas na superfície do γ -NPs/PEDOT, e que a adoção de múltiplas eluições podem aumentar expressivamente o rendimento final de um único ensaio de purificação. Apesar de terem um rendimento individual muito menor que a primeira, ainda levam a coleta de quantidades significativas de DNA, que podem ser utilizados em protocolos e análises moleculares de forma satisfatória.

Mesmo com a comprovação de que ocorre uma contaminação residual, nós utilizamos as amostras purificadas para realizar uma qPCR com o propósito de verificar se a qualidade do DNA obtida seria ainda suficiente para que não viesse a causar a

inibição da reação de amplificação. Para isso, foram usados os primers sentido 16S 804 RX, e o anti-sentido 16S 10FX (ver Seção 3.2.4.3.2) referentes ao gene 16S rRNA. Essa região é responsável pela transcrição do RNA ribossômico (rRNA), molécula essa altamente conservada entre as bactérias, e utilizada na classificação filogenética das mesmas (Yang, Wang et al. 2016). O resultado da amplificação é mostrado na Fig. 53 (f e g, em duplicata). Como é possível notar, os amplicons resultantes possuem um tamanho de 800 pares de bases, que é o esperado para o conjunto de primers usados (Laboratory 2013). A vista disso, é plausível afirmar que mesmo com as amostras de DNA apresentando contaminação, elas ainda mostram pureza suficiente para que a técnica de PCR não se mostra inviável. Como já discutido, a PCR é muito susceptível à contaminação, assim, apesar de que o protocolo não está ainda otimizado, o γ -NPs/PEDOT se mostra adequado para a purificação de DNA total de bactérias Gram negativas.

Figura 53 – Eletroforese em gel de agarose (1%) para amostras de DNA após a purificação com os volumes de suspensão de *E. coli*; a) 2 mL, b) 1 mL, c) 500 μ L, e 250 μ L, e posteriormente à amplificação PCR (em duplicata, f) e g)) da amostra obtida a partir do volume de 1 mL de suspensão de *E. coli*. Em h) temos o controle negativo.



Fonte: O autor (2019)

3.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui apresentados, podemos constatar que conseguimos alcançar de forma satisfatória os objetivos específicos deste trabalho, que consistiam na síntese e caracterização de um novo nanocompósito magnético híbrido consistente de um núcleo de maghemita revestido com o polímero condutor PEDOT, e sua aplicação em

protocolos de extração e purificação de DNA a partir de amostras biológicas complexas, como sangue humano e células bacterianas.

Realizamos com sucesso a síntese do nanocompósito γ -NPs/PEDOT através da rota de fase-vapor, que apresentou um tamanho médio de partícula de $(26,1 \pm 4,8)$ nm, como determinado através de microscopia eletrônica de varredura, revestido por uma camada fina de PEDOT da ordem de 3 – 4 nm. Além disso, o nanocompósito manteve o comportamento superparamagnético, tendo uma magnetização de saturação de 33,3 emu/g à temperatura ambiente.

Com relação aos estudos de adsorção em sistema modelo (meio aquoso), onde variamos uma série de fatores como o tempo de interação, o pH do meio, e a concentração inicial de DNA na solução, encontramos que a adsorção de DNA ocorre preferencialmente para valores de pHs mais baixos, com uma grande capacidade de adsorção (248 mg/g) em um período de tempo de 360 minutos. Além disso, ao compararmos nossos resultados com o de outros adsorventes similares reportados na literatura, e com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos deduzir que o γ -NPs/PEDOT é um material promissor devido a sua alta capacidade de adsorção, sua eficiência de dessorção (94,2 %), e seu curto período de dessorção (5 min).

No tocante às aplicações, conseguimos desenvolver protocolos de purificação magnética de DNA a partir de amostras de sangue total humano e bactérias Gram negativas de maneira efetiva e prática, sem a necessidade de uso de reagentes tóxicos, ou de equipamentos sofisticados. Com tais protocolos, obtivemos rendimentos na faixa de 6,4 μ g (sangue) e 7,3 μ g (bactéria) de DNA para cada amostra. Através de técnicas como a PCR e de eletroforese, comprovamos que o DNA purificado tem uma boa qualidade e pureza, uma vez que a reação PCR (a técnica padrão em biologia molecular, que é muito sensível a contaminações) não foi inibida, tanto pelo uso do DNA purificado pelo protocolo, como também quando a adição direta do γ -NPs/PEDOT ao meio reacional. Além do mais, o rendimento e a pureza obtida com as amostras de sangue se mostraram competitivos com kits de purificação magnéticos disponíveis comercialmente, tendo inclusive rendimento melhor que alguns dos kits por nós adquiridos. Não obstante, observamos que o no caso do protocolo de purificação de DNA com amostras de bactérias ainda se faz necessário estudos de otimização para melhorar o grau pureza da amostra final.

Por fim, uma vez superadas essas limitações iniciais, julgamos que esse novo material apresenta ótimas perspectivas de utilização em protocolos na área de biologia molecular, como por exemplo, no desenvolvimento em kits comerciais de purificação de ácidos nucléicos a partir de diferentes amostras biológicas, como sangue, bactérias, vírus e tecido vegetal, dentre outras.

4 PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS DE PVDF/PEDOT ELETROFIADAS E SEU USO PARA A REMOÇÃO DE CORANTES EM MEIOS AQUOSOS

Neste capítulo apresentaremos os resultados referentes à obtenção de membranas de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) por meio da técnica de eletrofiação e à modificação de sua superfície com o polímero condutor PEDOT, de modo a formar membranas compósitas de PVDF/PEDOT. Serão também descritas as metodologias adotadas e discutidos os resultados da caracterização dessas membranas e de sua aplicação como material adsorvente de corantes em meios aquosos, o que foi implementado através de uma série de experimentos de adsorção, termodinâmica e reutilização.

4.1 MOTIVAÇÃO

A contaminação de água com os mais diferentes tipos de efluentes (matéria orgânica, íons de metais pesados, hormônios, corantes, agrotóxicos, entre outros) é um dos principais problemas ambientais em escala global, e que tem se agravado devido ao grande crescimento populacional e do decorrente aumento da industrialização, mineração e agricultura, e de muitos outros segmentos das atividades humanas. Em seu relatório de 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que 2,1 bilhões de pessoas em todo o mundo não têm acesso a água potável (Organization and UNICEF 2017). Além disso, a contaminação de água causa a morte de 1,6 milhões de pessoas por ano (Schwarzenbach, Egli et al. 2010), sendo mais de 360 mil de crianças (Organization and UNICEF 2017).

Em sua maior parte, por serem estáveis quanto à interação com a luz e à oxidação esses resíduos químicos não sofrem processos de biodegradação (Gong, Ye et al. 2013), permanecendo assim reativos no meio ambiente por vários anos, o que aumenta ainda mais os riscos de desequilíbrio e poluição ambiental. Desde sua origem em 1865, com os trabalhos de William Perkin, os corantes orgânicos sintéticos revolucionaram a indústria alimentícia, têxtil, cosmética, de papel, couro, tintas, dentre outras (Sharma, Kaur et al. 2011). A utilização em larga escala tornou os corantes sintéticos um contaminante recorrente em águas residuais das indústrias. Entre os incontáveis compostos disponíveis, o grupo dos azocorantes é a classe mais utilizada em processos têxteis e alimentícios (Jantawasu, Sreethawong et al. 2009), representando cerca de 50 a 70% da produção mundial de corantes sintéticos (Zhou, Särkkä et al. 2011). Os azocorantes são moléculas

caracterizadas pela presença de um ou mais grupos azo ($-N=N-$) ligados a anéis aromáticos, os quais, por sua vez, possuem diferentes grupos radicais (Popli and Patel 2015). Os problemas ambientais atribuídos a esses corantes estão relacionados com suas atividades carcinogênica, mutagênica, e de bioacumulação, dentre outras (Mansour, Barillier et al. 2009, Singh, Singh et al. 2015). Além disso, de forma geral, mesmo quando em baixas concentrações em meios aquáticos, a presença de corantes acaba causando desequilíbrio de oxigenação, devido ao impedimento de penetração da luz necessária para a fotossíntese de plânctons (Mittal, Malviya et al. 2007).

Como todos os azocorantes, o alaranjado de metila (MO), em especial, é um corante extensivamente utilizado nas indústrias têxtil e gráfica (tintas), alimentícia farmacêutica, e de plásticos (Mittal, Malviya et al. 2007, Mansour, Barillier et al. 2009, Khaniabadi, Heydari et al. 2016). O MO também é bastante utilizado em laboratórios de pesquisa como indicador de pH de soluções. Ele é uma substância alergênica, que causa eczema ao contato com a pele (Khaniabadi, Heydari et al. 2016). Assim como observado para outros corantes da sua classe, a presença de MO no sistema digestivo ocasiona um aumento significativo das atividades de enzimas azo-nitro-redutases, capazes de produzir aminas aromáticas, que podem acarretar o aparecimento de câncer intestinal (Chang, Chadwick et al. 1994). Ainda que o MO não possua uma qualificação tóxica clara, sua presença no meio ambiente pode se mostrar nociva aos organismos vivos (Mittal, Malviya et al. 2007), e assim a busca por metodologias eficazes de remediação desse efluente como de outros se mostra de grande relevância.

Dentre os vários métodos de tratamento de água contaminada com corantes relatados na literatura, as tecnologias mais utilizadas incluem as técnicas de filtração, floculação-coagulação, sedimentação, fotodegradação, oxidação química, degradação biológica, destilação, adsorção, filtração, dentre outras (Robinson, McMullan et al. 2001, Nguyen and Juang 2013). Contudo, alguns dessas abordagens estão sujeitas a fatores limitantes, como, por exemplo, no caso da coagulação, que produz grande volume de rejeito, da degradação química (ozonização), que – apesar de proporcionar a descolorização do corante – tem como subproduto moléculas orgânicas reativas (Fu and Viraraghavan 2001, Robinson, McMullan et al. 2001); a reação Fenton⁷, que só ocorre em baixos valores de pH (Robinson, McMullan et al. 2001, Nguyen and Juang 2013). De todas as tecnologias atualmente adotadas, a adsorção e a filtração são aquelas mais

⁷ **Reação Fenton** – É um processo catalítico oxidativo que converte o peróxido de hidrogênio na presença de óxidos ferrosos em radicais livres de hidroxila altamente tóxico.

utilizadas no tratamento da contaminação por corantes (Sharma and Sanghi 2012), ao apresentarem como vantagens uma alta capacidade de remoção, baixo custo, boa processabilidade, elevada área superficial, e regeneração adsorativa⁸ dos materiais por elas empregados (Kyzas, Fu et al. 2013, Dawood and Sen 2014). Dentro dessa família de adsorventes (adsorativos e de filtração), a tecnologia de membranas poliméricas tem atraído interesse, tanto no âmbito acadêmico quanto industrial, por sua rica química de superfície e elevada área superficial e por demonstrarem superioridade na eficiência de remoção de contaminantes a um baixo custo, além das vantagens de permitirem um design simples e conveniência de operação (Gupta and Ali 2013, Wang and Hsiao 2016).

Para os sistemas de adsorção e filtração por meio de membranas, as características de área superficial, química de superfície, nanoestrutura, entre outros são fatores críticos, e a metodologia de fabricação tem influência direta nessas propriedades finais das membranas (Liao, Loh et al. 2018). Das diversas técnicas de preparação de membranas poliméricas, as mais comuns são a sinterização, casting, *Layer-by-Layer*, fiação úmida, fiação por sopro, alongamento, e inversão de fase (Lalia, Kochkodan et al. 2013, Liao, Loh et al. 2018), sendo a última a mais utilizada na indústria (Liao, Loh et al. 2018). Nos últimos anos, a técnica de eletrofiação (EF) se tornou muito atrativa para a produção de membranas das mais diferentes composições, morfologias, e características químico-físicas, as quais têm sido utilizadas em processos otimizados de remoção de contaminantes em meios aquosos. As membranas eletrofiadas são compostas pela sobreposição de fibras com diâmetros que variam de alguns micrômetros até poucas dezenas de nanômetros, a depender das condições de processamento e dos materiais utilizados (Lu, Wang et al. 2009, Kumar, Sundaramurthy et al. 2014). Efetivamente, a EF é uma técnica simples e de baixo custo que permite a obtenção de membranas que com excelentes propriedades, como uma alta razão entre área superficial e volume, porosidade ajustável, alta flexibilidade, boa resistência mecânica, fácil incorporação de materiais funcionais, dentre outras (Wendorff, Agarwal et al. 2012, Wang and Hsiao 2016). Essas características fizeram com que as membranas eletrofiadas (MEF) tenham ganhado espaço nas mais variadas aplicações, como, por exemplo, no armazenamento de energia (Ding 2014), na purificação de biomoléculas (Ma and Ramakrishna 2008, Demirci, Celebioglu et al. 2014), em sensoriamento (Hernández-Rivera, Rodríguez-Roldán et al. 2017, Mercante, Scagion et al. 2017), liberação controlada de drogas (Mendes,

⁸ **Regeneração adsorativa** – Consistem na capacidade de um dado material adsorativo poder ser utilizado em consecutivos ciclos de adsorção e dessorção sem perder suas propriedades de adsorção.

Gorzelanny et al. 2016), engenharia de tecidos (Ngadiman, Noordin et al. 2017), conversão de energia (Liu, Zhu et al. 2018), catalise (Formo, Lee et al. 2008), e remediação ambiental (Focarete 2018), dentre outras.

Na esfera da remediação de água, inúmeros trabalhos utilizam MEF preparadas com diferentes polímeros naturais e sintéticos que exibem em sua composição grupos funcionais capazes de adsorver contaminantes. Como exemplo, temos os trabalhos de Tian e colaboradores (Tian, Wu et al. 2011), que utilizaram MEF de celulose para a remoção de íons metálicos de mercúrio, cobre, e cádmio. Gopi e colaboradores (Gopi, Balakrishnan et al. 2017), por outro lado, prepararam MEF híbridas de PVDF e quitosana para a adsorção de índigo de carmim com uma capacidade de adsorção de 72 mg do corante por cada g de membrana utilizada. Já Feng e colaboradores (Feng, Wu et al. 2018) fizeram o uso de membranas de poliácridonitrila e celulose para a remoção de íons de ferro, cobre, e cádmio. Contudo, a abordagem mais empregada é o revestimento e incorporação de outros materiais e nanoestruturas junto às MEF, no que é uma estratégia simples, econômica, e muito efetiva (Miao, Wang et al. 2012, Jia, Wang et al. 2014, Li, Wang et al. 2014). Com essa abordagem, uma menor quantidade do material a ser incorporado se faz necessária para conferir as propriedades de interesse à membrana. Além disso, com esse método é possível atribuir múltiplas funcionalidades às membranas, como, por exemplo, a possibilidade de fotodegradar o poluente ao mesmo tempo em que ocorre a adsorção.

Uma diversidade de materiais vem sendo utilizados para a modificação da superfície das MEFs, incluindo a classe de polímeros condutores, cujas características físicas e químicas únicas abre a possibilidade de exibir propriedades multifuncionais. Desde sua descoberta em meados da década de setenta, os polímeros condutores têm sido aplicados na área de sensores, blindagem eletromagnética, eletrônica orgânica, atuadores mecânicos, catalise, dispositivos de memória (Das and Prusty 2012), e, mais recentemente, como materiais adsorventes para o tratamento de efluentes (Ibanez, Rincón et al. 2018) e na purificação de moléculas biológicas de alto valor econômico, como DNA (Park, Oh et al. 2008, Kaushal, Boparai et al. 2018, Maciel, da Silva et al. 2018, da Silva, Maciel et al. 2019), proteínas (Liu, Zhang et al. 2006), aminoácidos (Zhou, Ren et al. 2019), enzimas (Radovanović, Jugović et al. 2016), e outras. Em particular, o PEDOT se sobressai por sua elevada condutividade, estabilidade química, versatilidade de rotas sintéticas, biocompatibilidade, e rápido processo de oxirredução (Tong, Skorenko et al. 2015, Zhou, Zhai et al. 2016, Liu 2018).

Uma busca na literatura recente mostra que vários autores têm utilizado o PEDOT para a remoção e detecção de íons metálicos (Anandhakumar, Mathiyarasu et al. 2011, Inamuddin, Rangreez et al. 2015, Zuo, Xu et al. 2016, Checkol, Elfwing et al. 2018, Xiongwei, Jianjun et al. 2018), fotocatalise de antibióticos (Lu, Yu et al. 2018) e corantes (Katančić, Gavran et al. 2018), entre outras aplicações. Contudo, até o momento não foram localizados trabalhos que façam uso do PEDOT como material adsorvente de corantes em meios aquosos. Além disso, apesar do PEDOT ter uma grande atividade química para interagir com diferentes moléculas, fatores limitantes, como sua baixa solubilidade e reduzidas propriedades mecânicas, são ainda desafios a serem superados.

Nesse contexto, o presente trabalho descreve a preparação de um novo material adsorvente para a remoção de alaranjado de metila em meio aquoso baseado em membranas de PVDF eletrofiadas com superfície modificada com o material ativo PEDOT, de modo a contornar o problema das limitadas propriedades mecânicas do PEDOT. Com tal metodologia, as fibras de PVDF passam a servir como um robusto suporte mecânico que permite o uso eficiente do PEDOT em configurações apropriadas para processos de tratamento de água, seja em métodos de filtração ou de batelada.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

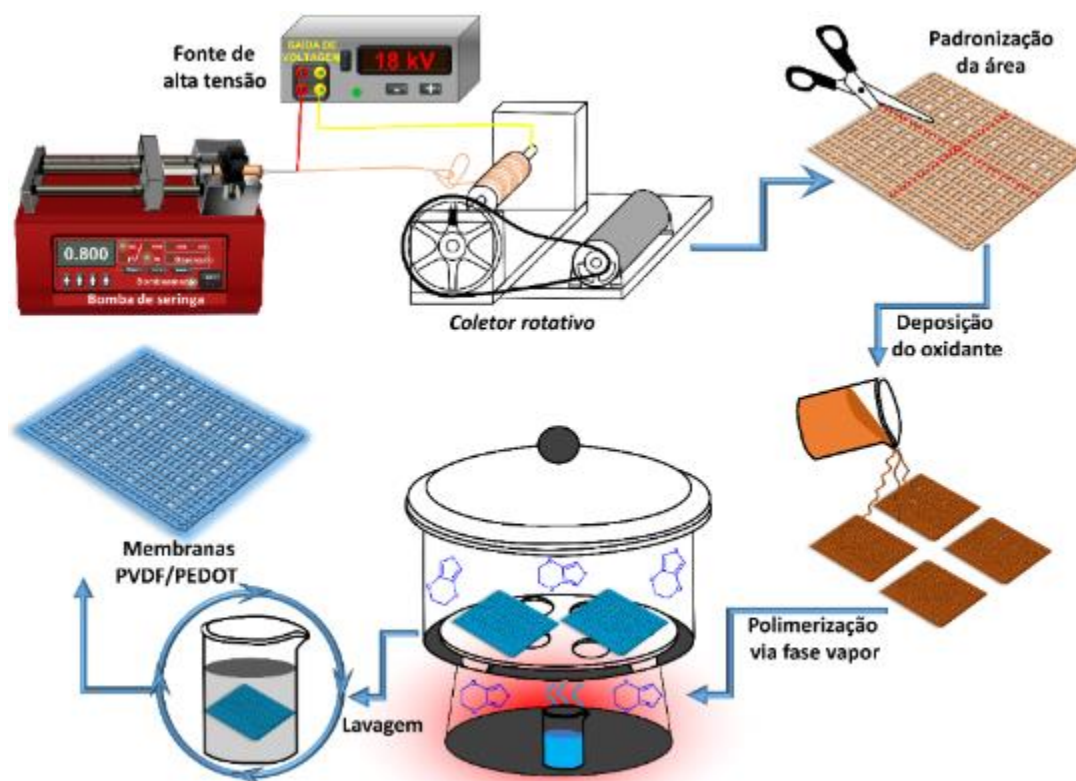
Poli (fluoreto de vinilideno) (PM ~ 530,000), 3,4-Etilenodioxitiofeno (EDOT), alaranjado de metila, dodecil sulfato de sódio (SDS), e o perclorato de ferro (III) hidratado ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (*Estados Unidos*). Acetona (ACT), dimetilformamida (DMF), álcool metílico (CH_3OH), álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Química Moderna (*Brasil*). Todos os reagentes eram de grau analítico e foram utilizados como recebidos. Em todos os experimentos, foi utilizada água deionizada (18 $\text{M}\Omega/\text{cm}$) obtida após passagem por um sistema de ultrapurificação Synergy (*Millipore, Estados Unidos*).

4.2.2 Preparação das membranas de PVDF/PEDOT

As membranas de PVDF foram preparadas utilizando um sistema de eletrofiação horizontal equipado com um coletor rotativo customizado. Para isso, uma solução de 17% PVDF (massa/volume) em DMF-ACT (razão 2:3) foi inicialmente preparada sob agitação magnética e a uma temperatura de 60 °C, por 6 h. Posteriormente, essa solução foi

introduzida em uma seringa de plástico contendo uma agulha de aço inoxidável (18 G) acomodada em uma bomba de seringa NE-4000 (*New Era, Estados Unidos*), e um volume de 10 mL foi dispensado, sob uma tensão de 18 kV a uma taxa de 0,8 mL/h, diretamente sobre uma folha de alumínio fixada em um coletor rotativo (1200 rpm) aterrado. As membranas resultantes foram então cortadas em quadrados de 2x2 cm e submetidas a uma exposição controlada com vapor do monômero EDOT para depositar cadeias do polímero condutor PEDOT na superfície das membranas de PVDF (Elschner 2011, Xie, Xu et al. 2016). Para isso, as membranas foram impregnadas com 150 µl de uma solução de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em metanol (0,2 M), e permitida a evaporação do solvente por 20 min. Posteriormente, as membranas de PVDF foram transferidas para um suporte fixo colocado dentro de um dessecador, na parte inferior do qual foi adicionado um volume de 40 µL do monômero EDOT. O sistema foi então selado e colocado sobre uma placa aquecedora a 100 ° C para permitir que a polimerização prosseguisse durante 60 min. Depois disso, as membranas foram lavadas 4 vezes com etanol (30 min cada) para remoção do excesso de oxidante, e finalmente, armazenadas em água ultrapura. As principais etapas de preparação das membranas de PVDF/PEDOT são mostradas esquematicamente na Fig. 54.

Figura 54 – Representação esquemática das principais etapas do processo de preparação das membranas de PVDF/ PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

Durante o processo de preparação das membranas foi realizado um estudo detalhado da cinética de polimerização de modo a estabelecer o tempo necessário para que viesse a ocorrer a completa polimerização do PEDOT na superfície das membranas de acordo para uma dada quantidade de oxidante utilizado.

4.2.3 Métodos de caracterização

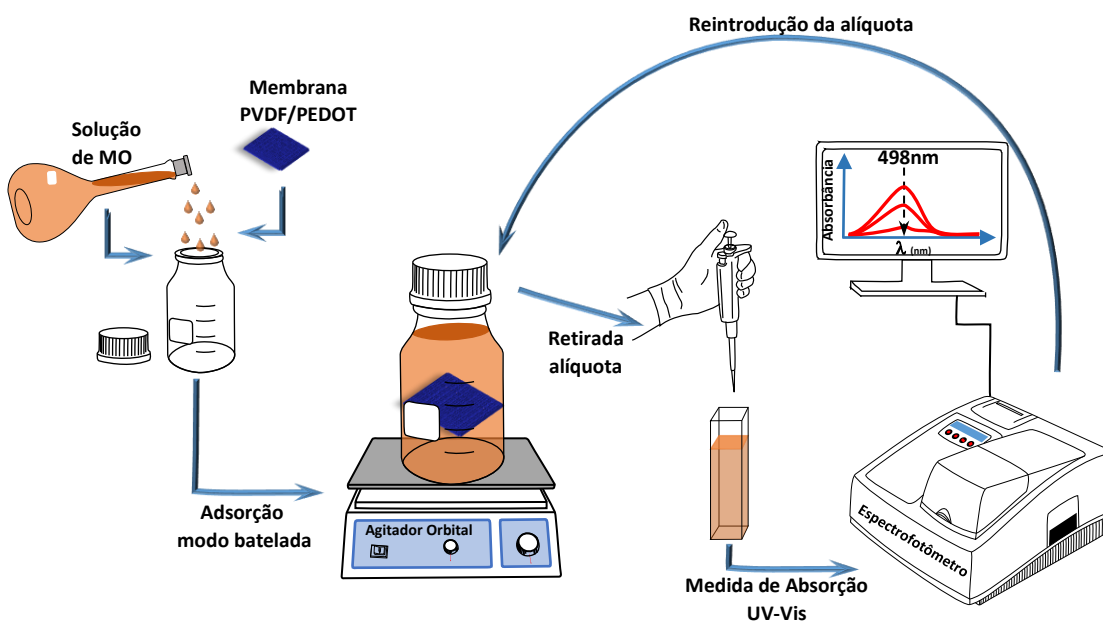
Para investigar as propriedades químicas das amostras das membranas utilizamos as espectroscopias na região do infravermelho (FTIR) e do visível (UV-Vis). No caso do FTIR, os espectros foram obtidos na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com um espectrômetro IR TRACER-100 (*Shimadzu, Japão*), utilizando amostras preparadas em pastilhas de KBr. Já na espectroscopia UV-Vis, os espectros foram tomados no intervalo de 200 – 1400 nm em um espectrofotômetro UV-2600 (*Shimadzu, Japão*) com um módulo de esfera integradora. As características morfológicas, e também a distribuição de tamanhos das membranas de PVDF/PEDOT, foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura usando um microscópio Mira3-LM FEG (*TESCAN, República Checa*). Para os estudos de adsorção/dessorção de MO com as membranas de PVDF/PEDOT, adotamos a técnica

de espectroscopia UV-Vis ultravioleta-visível, utilizando um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão).

4.2.4 Experimentos de adsorção

Nós estudamos o efeito de diferentes variáveis experimentais, tais como pH, tempo de interação, concentração inicial de corante e temperatura, para estabelecer as melhores condições para a remoção de MO das soluções aquosas. Para isso, utilizamos uma solução estoque MO (300 mg/L) preparada em água ultrapura. O pH foi ajustado pela adição de pequenas alíquotas de HCl (1 M) e NaOH (1 M), conforme apropriado. As membranas de PVDF/PEDOT foram colocadas em frascos de vidro contendo 20 mL da solução MO com a concentração escolhida e submetidos a agitação orbital (modo batelada) a uma velocidade de 160 rpm. Realizamos o monitoramento nas mudanças de concentração das soluções aquosas de MO antes e depois da interação com as membranas PVDF/PEDOT por meio da espectroscopia UV-Vis da banda de absorbância da transição $\pi - \pi^*$ do MO, que tem o máximo de absorção no comprimento de onda de 498 nm para pH na faixa de 2 – 3, e 460 nm para os demais valores (pH 4 – 10). A configuração experimental adotada para os estudos de adsorção é apresentada de forma esquemática na Fig. 54.

Figura 55 – Representação esquemática da montagem experimental para os estudos de adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT em modo batelada.



Fonte: O autor (2019)

Inicialmente, examinamos a influência do pH do meio (que foi variado em uma fixa de 2 a 10) sobre a capacidade de adsorção das membranas, usando uma concentração inicial de MO de 20 mg/L e um tempo de interação fixo de 120 min. Uma vez estabelecido o valor de pH que levaria à máxima adsorção do corante, investigou-se a eficiência de adsorção das membranas de PVDF/PEDOT em função da concentração inicial de MO (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 mg/L) e o tempo de interação (5 - 720 min). A eficiência de adsorção do MO nas membranas de PVDF/PEDOT foi estimada como a porcentagem de adsorção (% Ads)

$$\% Ads = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100 \quad , \quad (4.1)$$

onde C_0 e C_f são as concentrações (mg/L) da solução MO antes e após a interação com as membranas de PVDF/PEDOT, respectivamente. A capacidade de adsorção no tempo t , isto é, a quantidade (em mg) de MO adsorvida por unidade de massa (g) de PEDOT foi determinada como

$$q_t = \frac{V(C_0 - C_t)}{m} \quad , \quad (4.2)$$

sendo V é o volume (L) da solução, C_0 e C_t a concentração inicial e no instante t de MO (mg/L) na solução, e m é a massa PEDOT (em g). Após o processo de adsorção atingir o equilíbrio, a capacidade final de adsorção (q_e) (mg/g) é estimada como

$$q_e = \lim_{C_t \rightarrow C_e} q_t \quad , \quad (4.3)$$

no qual C_e é a concentração de equilíbrio da solução de corante (mg/L) (Gorza, Pedro et al. 2018).

4.2.5 Experimentos de termodinâmica

Outro estudo que realizamos foi a determinação dos parâmetros e do tipo de processo termodinâmico que governa a adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT. Para esse fim, as membranas foram inicialmente adicionadas em frascos de vidro contendo 20 mL de solução de MO com diferentes concentrações iniciais (10, 15, 20, 30, 40 mg/L) e colocadas em banho-maria (em casa) e levado a uma agitação orbital constante de 160 rpm por um período de 720 min. Posteriormente, as amostras foram deixadas atingir a temperatura ambiente antes da análise de absorbância UV-Vis. Este processo de adsorção foi realizado para as temperaturas de 10, 20, 30 e 50 °C.

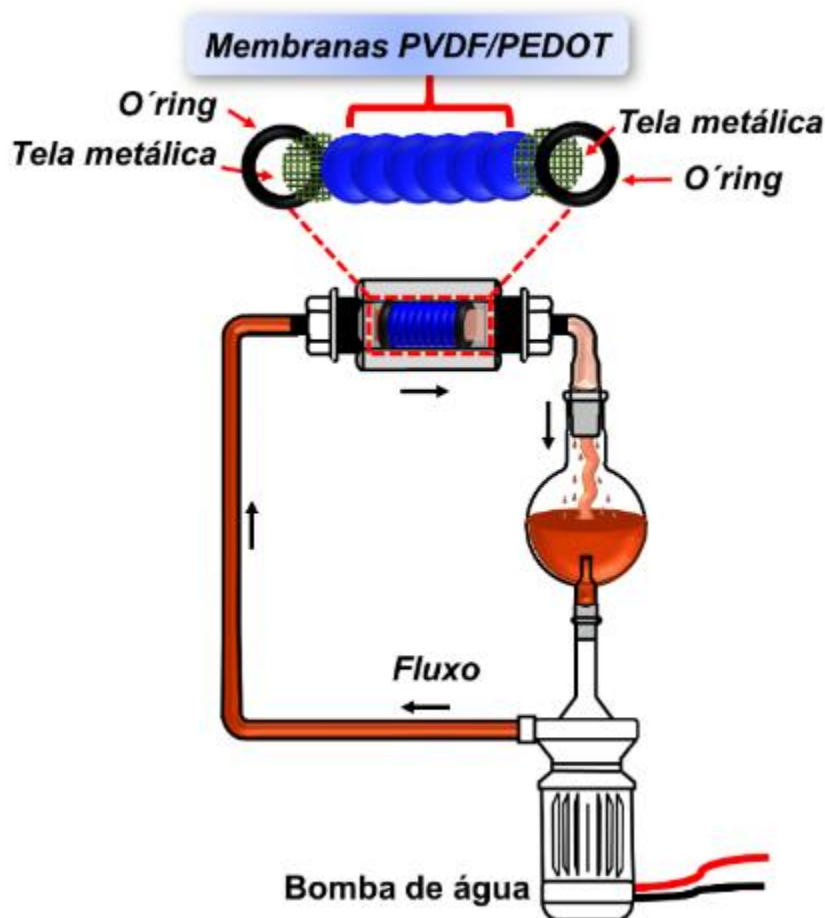
4.2.6 Experimentos de dessorção e reutilização

Examinamos a possibilidade de reciclar as membranas PVDF/PEDOT durante sucessivos experimentos de dessorção/adsorção. Para isso, inicialmente colocamos as membranas em frascos de vidro contendo 20 mL de uma solução aquosa 10 mg/L de MO (pH 3). Os frascos foram mantidos sob agitação a 160 rpm durante 180 min, e depois as membranas saturadas com corante foram transferidas para um segundo frasco contendo 20 mL de uma solução aquosa de SDS (0,1 M, pH 5,8), a qual foi sujeita a agitação a 160 rpm durante 60 min para promover a dessorção do corante. Finalmente, as membranas de PVDF/PEDOT foram extensivamente lavadas com água ultrapura, e alíquotas de ambas as soluções (MO e SDS) foram analisadas por espectroscopia UV-Vis para avaliar as percentagens correspondentes de adsorção e dessorção, respectivamente. Neste experimento, as membranas de PVDF/PEDOT foram submetidas a 20 ciclos consecutivos de adsorção/dessorção.

4.2.7 Experimentos de filtração

Também examinamos a capacidade das membranas de PVDF/PEDOT quando usadas como material de filtração em um sistema de recirculação para a remoção do corante de soluções aquosas. Na configuração experimental adotada, um fluxo constante de 200 mL/min de uma solução aquosa 10 mg/L MO foi circulado em um sistema fechado, de modo a passar por seis membranas circulares empilhadas (com um diâmetro de 19 mm), que foram perpendicularmente acomodadas em um suporte fixo, conforme esquematicamente mostrado na Fig. 56. Para avaliar a eficiência de remoção das membranas, a cinética de adsorção foi monitorada pela remoção periódica de alíquotas para análise UV-Vis. Neste experimento nós mantivemos a mesma relação de massa de adsorvente e volume de MO utilizada nos experimentos de modo batelada, uma vez que pretendíamos realizar uma análise comparativa da cinética e da eficiência de adsorção entre as duas configurações.

Figura 56 – Representação esquemática da configuração experimental adotada para os estudos de filtração.



Fonte: O autor (2019)

4.2.8 Experimentos de seletividade

Outra característica das matrizes avaliadas foi a adsorção seletiva de MO em relação aos diferentes corantes. Para isso, preparamos soluções aquosas binárias (1:1) de MO com outros corantes (azul de metileno, azul de toluidina, índigo carmim, rodamina B e vermelho do congo). Todas as soluções binárias foram testadas nas mesmas condições iniciais (pH 6, concentração de 10 mg/L e volume de 10 mL) e colocadas em frascos de vidro contendo as membranas, que foram então submetidos a uma agitação de 12 h à temperatura ambiente. Em seguida, alíquotas das soluções foram retiradas e tiveram suas absorbâncias comparadas com as das soluções binárias iniciais. A identificação dos picos característicos de cada componente das soluções finais permitiu estimar a relativa especificidade das membranas de PVDF/PEDOT para a remoção de cada um dos corantes.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

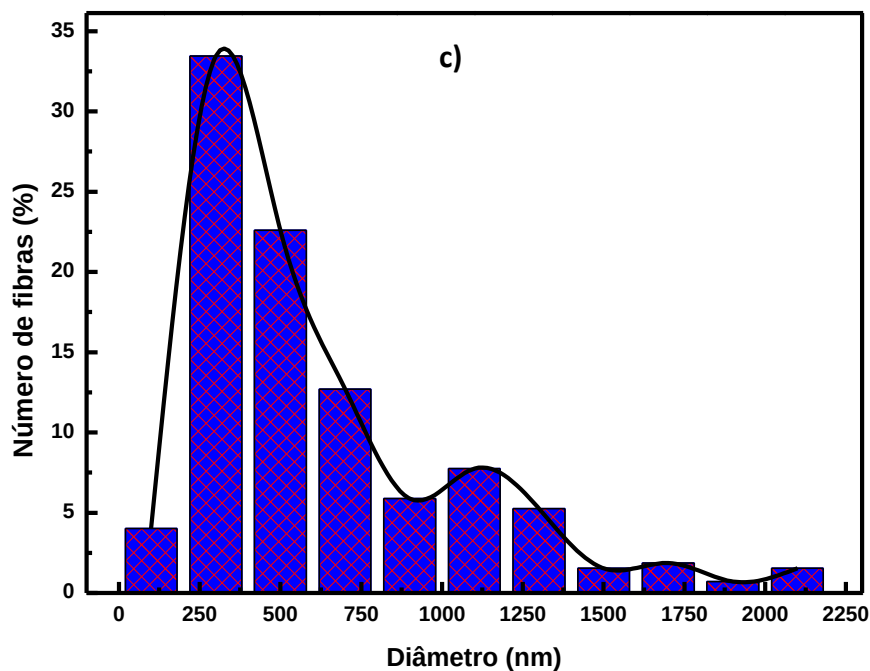
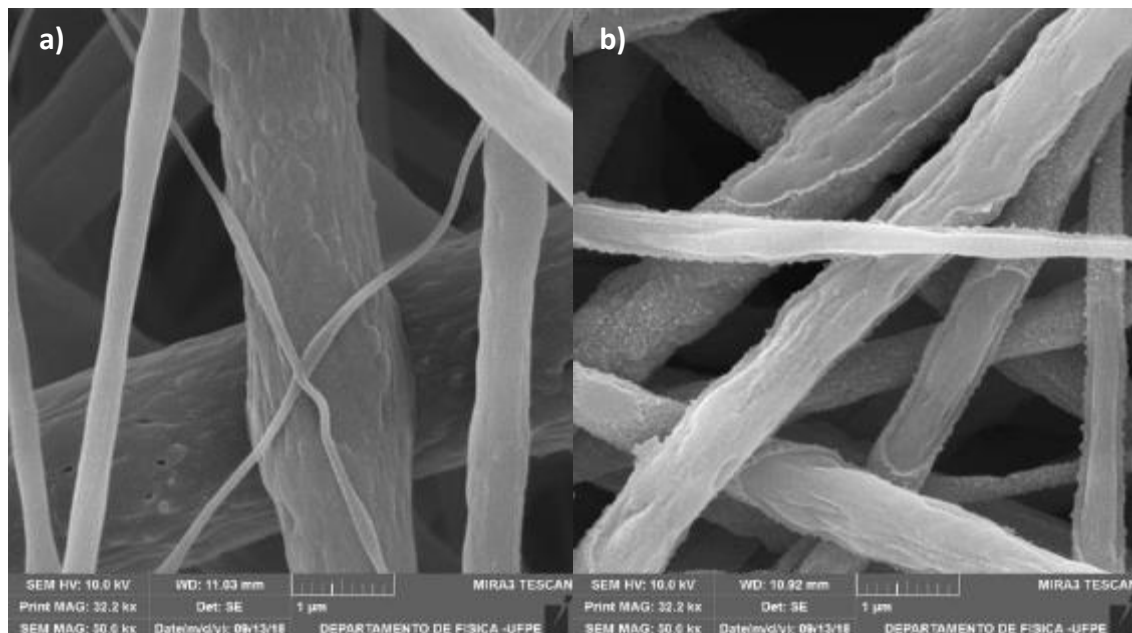
4.3.1 Caracterização das membranas de PVDF/PEDOT

Como já apresentado, as membranas de PVDF foram utilizadas como uma matriz de suporte para o crescimento das nanoestruturas de PEDOT, com a perspectiva de que com essa metodologia conseguíssemos superar problemas usualmente encontrados, como aglomeração do polímero, limitadas propriedades mecânicas, e aumentar a área superficial disponível, além de reduzir a contaminação do material adsorvente (PEDOT) na solução. O procedimento para obtenção das membranas de PVDF/PEDOT compreendeu a preparação de membranas de PVDF pela técnica de EF, o que foi seguido da modificação de sua superfície com PEDOT por meio da síntese em fase vapor do monômero de EDOT. Para confirmar tanto a produção das membranas, como o crescimento do PEDOT em sua superfície, foram realizadas caracterizações de MEV, UV-Vis, FTIR, e medidas de ângulo de contato. Os resultados obtidos nessas caracterizações são apresentados a seguir.

4.3.1.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de MEV foi utilizada a fim de determinar as características morfológicas das membranas de PVDF, assim como o diâmetro das fibras e as mudanças superficiais ocasionadas pela incorporação do PEDOT. Na Fig. 57 mostramos as micrografias das membranas de PVDF puras (Fig. 57a), e após a incorporação do PEDOT (Fig. 57b). Como podemos observar, as membranas de PVDF (Fig. 57a) possuem uma estrutura densa e porosa. Além disso, as fibras apresentaram uma larga faixa de distribuição de tamanho, com diâmetros que variaram 100 nm à 2 μ m, como pode ser observado no histograma da Fig. 57c. O diâmetro médio das fibras calculado foi de $(0,9 \pm 0,7) \mu$ m. Já ao observar as membranas após a incorporação do PEDOT por polimerização fase vapor (Fig. 57b), podemos notar que elas ficaram revestidas com nanoestruturas (de aspecto granular) de PEDOT – demonstrando assim que o método de polimerização empregado é robusto para a incorporação do PEDOT em membranas poliméricas porosas.

Figura 57 – Micrografias das membranas de PVDF pura a) e com a superfície modificada com PEDOT b). Em c) é apresentado o histograma do diâmetro das fibras de PVDF pura.

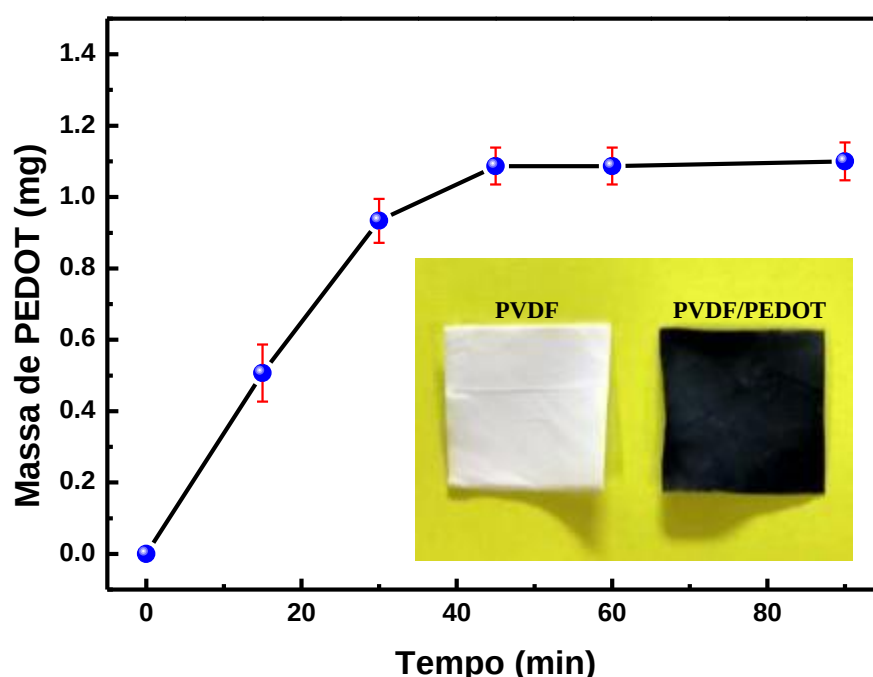


Fonte: O autor (2019)

Quanto à porosidade das membranas de PVDF depois de revestidas com o PEDOT, como pode ser visto nas imagens obtidas por MEV, não houve uma mudança significativa. Isso se deve à baixa quantidade de oxidante empregue durante o processo de polimerização. Esse cuidado foi tomado por ser a porosidade um fator importante para

o desempenho do material adsorvente. Não obstante, essa baixa quantidade de oxidante também foi usada com o intuito de depositar a camada mais fina possível de PEDOT para que todo o material ativo (PEDOT) estivesse exposto, de modo a ser capaz de adsorver o corante. Dessa maneira, ao estabelecermos a concentração e volume de oxidante (ver Seção 4.2.2), realizamos um estudo da cinética de polimerização do PEDOT na superfície das membranas de PVDF. Na Fig. 58 é mostrada a quantidade de PEDOT polimerizado sobre as membranas de PVDF, para diferentes tempos de exposição ao monômero de EDOT. Como pode ser visto, a partir de 45 min de polimerização a massa de PEDOT se mantém constante ($\sim 1,1 \mu\text{g}$), indicando que todo o oxidante disponível foi consumido na reação. Esse resultado de cinética, junto as imagens de microscopia – onde é observado apenas uma fina camada de PEDOT, sem a formação de aglomerados, aponta que, como desejávamos, fomos realmente capazes de revestir a membrana sem comprometer consideravelmente sua porosidade. Em detalhe, na Fig. 58 é apresentada a membrana de PVDF pura e com o PEDOT incorporado.

Figura 58 – Estudo de cinética de polimerização da camada PEDOT na membrana de PVDF. Em detalhe, a membrana de PVDF antes e depois da polimerização do PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

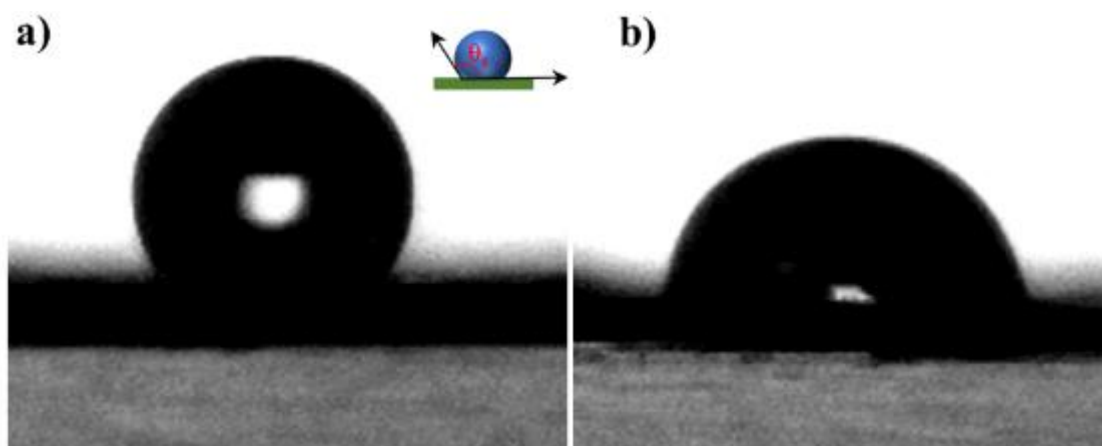
4.3.1.2 Medidas de ângulo de contato

Uma característica importante das membranas a ser analisada é sua hidrofilicidade, ou seja, a afinidade que o material tem pela água. Essa propriedade está

relacionada diretamente com a composição química e a morfologia do material (Law and Zhao 2016), sendo a técnica de ângulo de contato (θ_c) usada como padrão para determinar as características de molhabilidade de uma superfície. Essa técnica consiste em medir o ângulo formado entre a superfície em estudo e uma gota de fluido (geralmente água) depositada sobre a superfície (ver detalhe na Fig. 59a). As superfícies recebem três classificações de acordo com o valor de ângulo de contato: super-hidrofóbica ($\theta_c > 150^\circ$), hidrofóbica ($150^\circ \geq \theta_c \geq 90^\circ$), e hidrofílica ($\theta_c < 90^\circ$) (Law and Zhao 2016). É importante investigar tais propriedades, uma vez que como já evidenciado, as membranas serão utilizadas em meio aquoso para a remoção de corante.

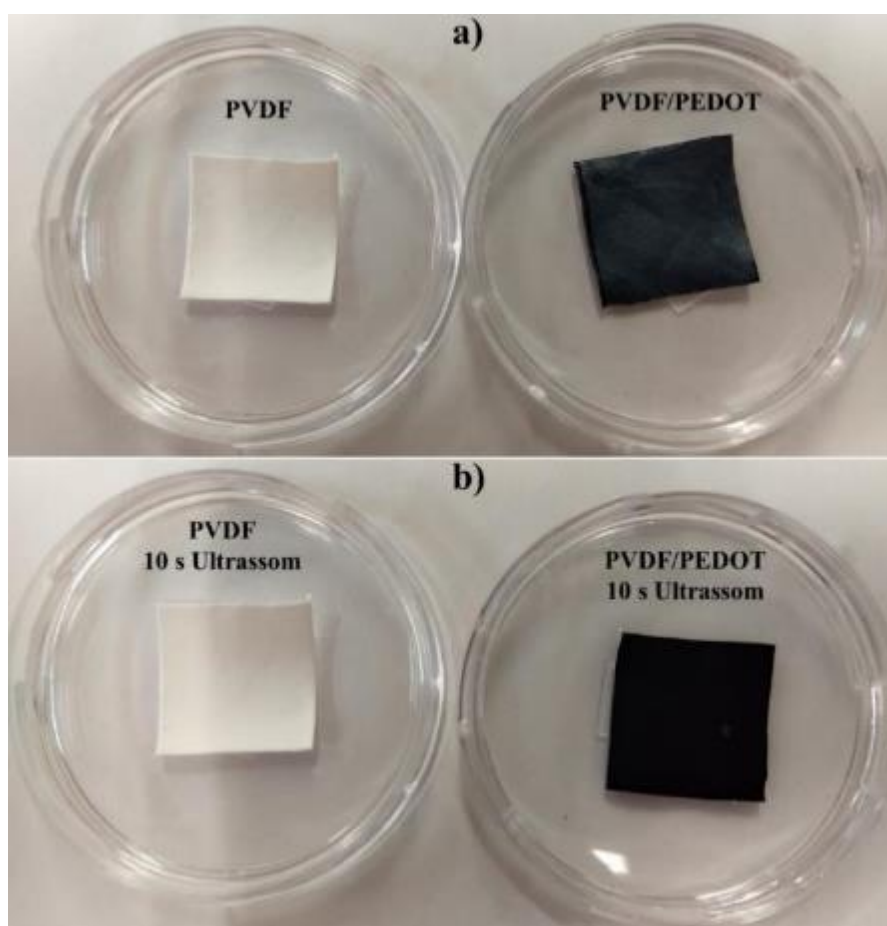
Na Fig. 59 são mostradas as imagens obtidas quando da determinação do ângulo de contato das membranas de PVDF puras (Fig. 59a) e das membranas com sua superfície modificada com PEDOT (Fig. 59b). Como era esperado, as membranas de PVDF apresentaram caráter hidrofóbico com um ângulo de contato de $(126,4 \pm 9,1)^\circ$, o que está de acordo com o reportado na literatura (Banerjee, Wehbi et al. 2017, Dong, Thomas et al. 2017, Zhou, He et al. 2017). Já após a incorporação do PEDOT, o ângulo diminuiu para um valor de $(81,3 \pm 7,2)^\circ$. Essa diminuição, como aguardada, está associada à presença do PEDOT na superfície das membranas, uma vez que o ângulo de contato para diversos filmes de PEDOT tem seu valor na faixa de $78 - 87^\circ$ (Mulfort, Ryu et al. 2003, Lee, Joo et al. 2005, Mauger, Chang et al. 2012, Duc, Vlandas et al. 2016), o que novamente corrobora a modificação da superfície das membranas de PVDF com o PEDOT. Além disso, com um caráter mais hidrofílico das membranas de PVDF/PEDOT foi possível molhar as membranas em água de forma fácil, com apenas poucos segundos em banho ultrassom, o que não ocorre para as membranas de PVDF puras, como se pode observar na Fig. 60. Essa melhora da molhabilidade da membrana é de suma relevância para sua aplicação como adsorvente de MO em meio aquoso, pois caso a hidrofobicidade das membranas de PVDF não fosse superada, a interação entre o MO e PEDOT não seria possível.

Figura 59 – Imagens de ângulo para da membrana de PVDF pura a) e as membranas de PVDF/PEDOT b).



Fonte: O autor (2019)

Figura 60 – Membranas de PVDF e PVDF/PEDOT submersas em água antes a) e depois de 10 segundo em banho ultrassônico b).

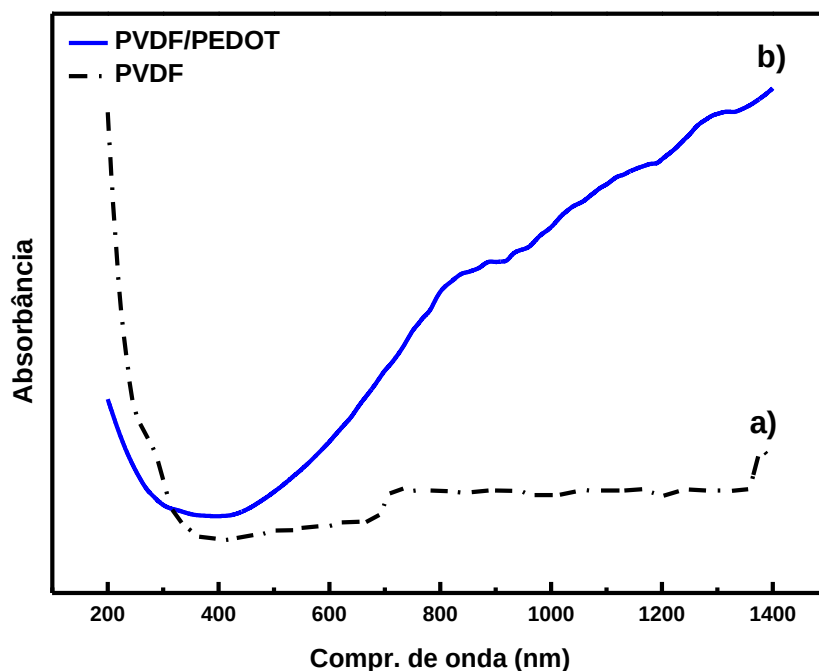


Fonte: O autor (2019)

4.3.1.3 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Como se sabe, além da identificação da composição química, para muitos polímeros condutores uma das propriedades adicionais que podem ser acompanhadas por espectroscopia UV-Vis é seu estado de condução, uma vez que os defeitos da cadeia polimérica (pólarons e bipólarons, ver seções 2.1 e 2.1.1 do Capítulo 2) apresentam bandas de absorção características na região do visível e infravermelho próximo (NIR) (Li 2015). Na Fig. 61 são mostrados os espectros de absorção das membranas de PVDF pura (curva a) e de PVDF/PEDOT (curva b). Como pode ser observado, a membrana de PVDF pura exibe transparência na maior parte da região do visível e infravermelho próximo, conforme identificado em outros trabalhos (Dutta, Kar et al. 2015). Já para a membrana de PVDF/PEDOT, é possível notar uma ampla banda de absorção, que se inicia por volta de 700 nm e cobre toda a faixa NIR do equipamento (até 1400 nm). A presença dessa larga banda na região do infravermelho é característica da presença de uma grande quantidade de bipólarons na estrutura polimérica do PEDOT (Stepien, Roch et al. 2016, Li and Ma 2018), uma vez que, em seu estado neutro (reduzido, sem a presença de defeitos) o espectro do PEDOT apresenta uma banda bem definida em 600 nm, enquanto que com a cadeia parcialmente oxidada (ou seja, com a presença de pólarons), há a formação de uma banda centrada em 900 nm (Massonnet, Carella et al. 2014, Stepien, Roch et al. 2016, Shi, Yao et al. 2017). Essas condições não foram identificadas no espectro. Dessa forma, é possível dizer que conseguimos efetivamente modificar a superfície das membranas de PVDF com o PEDOT, que foi identificado como estando em sua forma oxidada, devido à presença de uma grande quantidade de bipólarons. Sabe-se, pelas propriedades químicas do PEDOT, que esses defeitos tornam o polímero positivamente carregado.

Figura 61 – Espectros UV-Vis - NIR para as membranas de PVDF a) e PVDF/PEDOT.



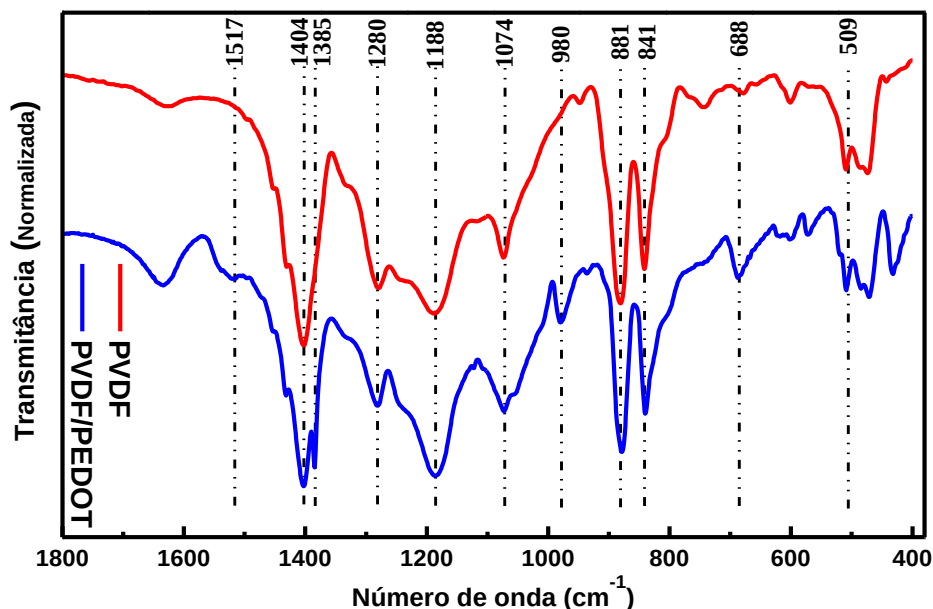
Fonte: O autor (2019)

4.3.1.4 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Análises de FTIR foram também realizadas a fim de confirmar a composição das membranas de PVDF, assim como a modificação de sua superfície pela incorporação de cadeias de PEDOT. Na Fig. 62 apresentamos os espectros da membrana de PVDF pura e da membrana modificada com PEDOT. Para a membrana pura (curva a), observamos a presença das bandas características de 1402, 1074 e 841 cm^{-1} atribuídas respectivamente às vibrações de alongamento e às deformações angulares fora do plano do grupo CH_2 (Lanceros-Méndez, Mano et al. 2001, Elashmawi and Hakeem 2008, Zeng, Yu et al. 2016). Já os picos em 1280, 881 e 841 cm^{-1} , juntamente com aqueles em 1188 e 509 cm^{-1} , são associados aos modos de estiramento assimétrico e simétrico do grupo CF_2 , nessa ordem (Elashmawi and Hakeem 2008, Zeng, Yu et al. 2016, Singh and Gaur 2018). Concomitantemente, o pico em 881 cm^{-1} é relacionado ao estiramento C – C da cadeia polimérica (Bachmann and Koenig 1981, Peng and Wu 2004, Zeng, Yu et al. 2016). Em sua totalidade, todos os picos presentes no espectro são coerentes com os esperados para o PVDF. No caso do espectro para as membranas modificadas com o PEDOT (curva b), podemos observar que enquanto as bandas pertencentes ao PVDF permanecem inalteradas, há, contudo, o aparecimento de novas bandas, características do PEDOT. Os

picos atribuídos ao PEDOT em 1515 e 1385 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento $\text{C} = \text{C}$ dos anéis quinóides do grupo tiofeno (Pang, Zhou et al. 2016, Xie, Xu et al. 2016), e os encontrados em 980 e 688 cm^{-1} estão relacionados à ligação $\text{C} - \text{S}$ do anel tiofeno do polímero (Kang, Park et al. 2013, Pang, Zhou et al. 2016). Essa composição de bandas, juntamente com os resultados de microscopia, UV-Vis e ângulo de contato, confirmam, como esperado, que foi possível realizar de forma eficiente o revestimento da superfície das membranas de PVDF com o PEDOT em seu estado oxidado.

Figura 62 – Espectros infravermelho das membranas de PVDF a) e PVDF/PEDOT a).



Fonte: O autor (2019)

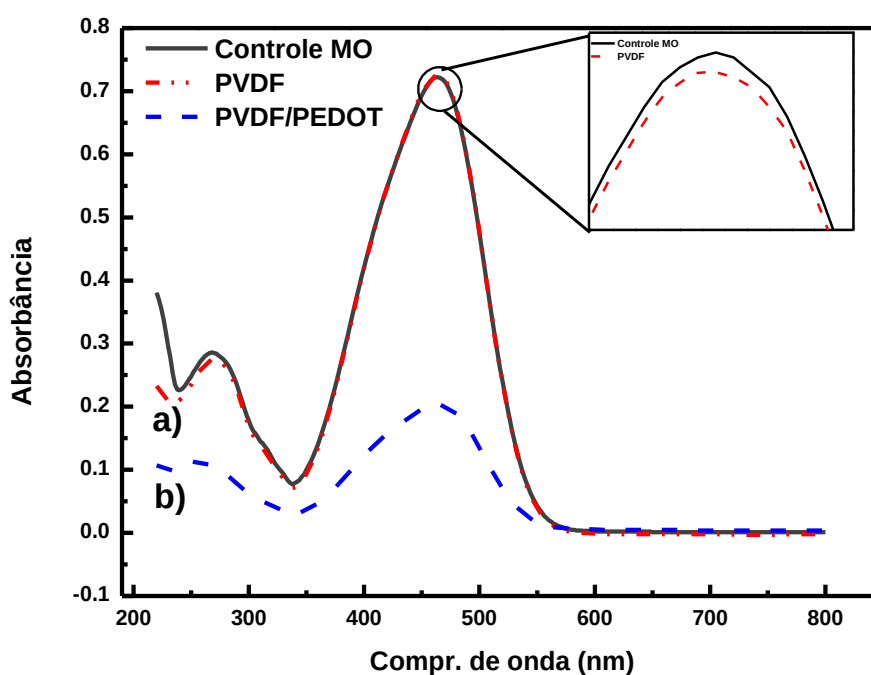
4.3.2 Estudos de adsorção

Como já apresentado, temos como objetivo incorporar o polímero condutor PEDOT em uma matriz porosa para fazer com que sejam superados os problemas de solubilidade e melhoradas as propriedades mecânicas do PEDOT, de modo a que esse polímero possa vir a ser utilizado como adsorvente de corantes em processos de descontaminação de efluentes.

Para investigar a capacidade do PEDOT adsorver MO, assim como para determinar a influência da matriz de PVDF na remoção de MO, em um primeiro experimento o processo de adsorção foi realizado com as membranas de PVDF/PEDOT,

assim como com a membrana de PVDF pura. Para isso, cada uma das membranas foi colocada em um erlenmeyer contendo 20 mL de uma solução aquosa de MO (10 mg/L, pH 6) e deixado interagir por 2h sob agitação orbital de 160 rpm. Após esse intervalo de tempo, uma alíquota da solução foi utilizada para a obtenção dos espectros UV-Vis antes e depois da interação, os quais são apresentados na Fig. 63. Como é possível observar, a maior diminuição da absorção da banda do MO (transição $\pi - \pi^*$ (Masoud and Hammud 2001)) ocorreu após a interação com a membranas de PVDF-PEDOT (71%), enquanto que com a membrana de PVDF pura não foi identificada qualquer redução significativa na intensidade que indique ter ocorrido a adsorção do MO na superfície do PVDF. Desse modo, podemos concluir que a adsorção ocorre exclusivamente pela interação do MO com as cadeias poliméricas de PEDOT, sendo o PVDF apenas um suporte mecânico para o PEDOT.

Figura 63 – Espectros de UV-Vis da solução de MO após 2 h de interação com as membranas de PVDF a) e PVDF/PEDOT b).



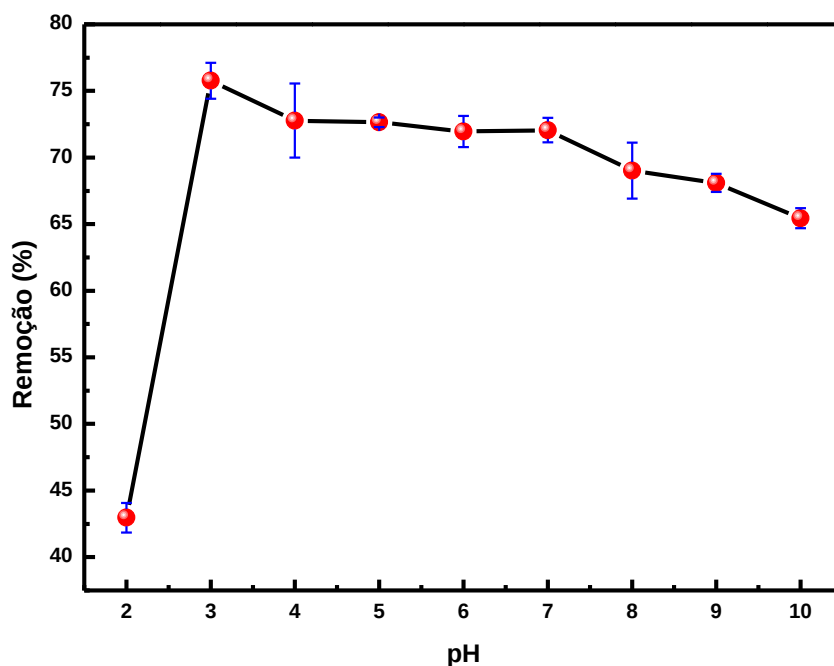
Fonte: O autor (2019)

4.3.2.1 Influência do pH

A análise da eficiência de adsorção em função do pH do meio é uma importante ferramenta para estabelecer o possível mecanismo de adsorção, e para encontrar a melhor condição de pH para que isso ocorra, pois o pH do meio pode afetar a carga superficial

do adsorvente, o grau de ionização do corante e sua estrutura (Yagub, Sen et al. 2014). Para investigar a influência do pH do meio, realizamos experimentos de adsorção na faixa de pH de 2 – 10, como descrito na Seção 4.2.4. Na Fig. 64 são apresentados os resultados obtidos nesses experimentos, onde vemos que em pH=2 a remoção de MO (42%) é menor, o que está associado com a interação química do MO e a superfície da membrana (carregada positivamente). Como é conhecido, em meio ácido o corante MO tem uma carga positiva devido à protonação do átomo de nitrogênio (Pires, Ferra et al. 2012), e dessa forma o processo de adsorção não é favorecido sob essas condições. Devido ao fato do MO possuir um pKa próximo de 3,4 (Sabnis 2008), a partir desse valor ele torna-se carregado negativamente, o que possibilita a interação eletrostática com a membrana, como vemos com o aumento da adsorção (75%) em torno do pH 3. Podemos observar também que o valor de adsorção é constantemente até o pH neutro e diminuiu ligeiramente para o meio básico, saindo do máximo de 75% em pH 3 para 65% no pH 10. Esse comportamento indica que o processo de adsorção de MO pela membrana de PVDF/PEDOT se deve principalmente à interação eletrostática entre o grupo sulfônico do corante e as cargas positivas do revestimento de PEDOT das membranas.

Figura 64 – Efeito do pH do meio na porcentagem de remoção do corante MO pela membrana PVDF/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

Diante desse resultado, todos os demais experimentos de adsorção de MO com as membranas de PVDF/PEDOT foram realizados para o valor de $\text{pH}=3$, dado que a maior eficiência de adsorção foi observada nessa condição. Além disso, o fato da eficiência de remoção não se altera de forma acentuada (apenas 10%) dentro da longa faixa de pH (3 – 10) deve ser destacado, uma vez que isso possibilita o tratamento de efluentes sem a necessidade de alteração do pH do meio. Para o tratamento de efluentes, processos de acidificação ou de aumento da alcalinidade do rejeito podem se tornar caros devido aos grandes volumes envolvidos. Soma-se a isso o fato de que muitos materiais relatados na literatura para remediação adsorvem apenas em uma região de pH muitas vezes restrita, o que torna inviável sua aplicação prática.

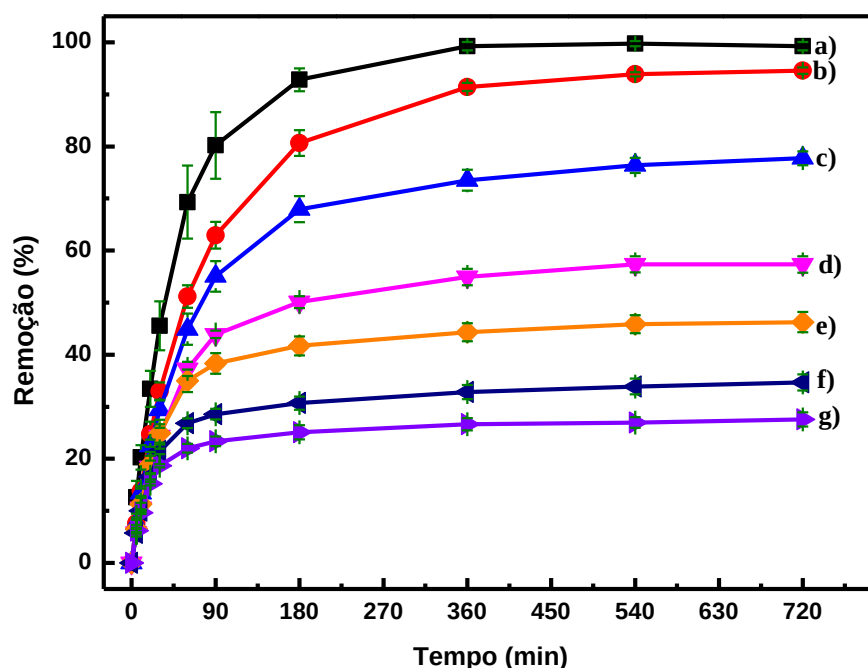
4.3.2.2 Influência da concentração inicial de MO e do tempo de interação

Os estudos dos efeitos do tempo de interação e da concentração inicial de MO na solução sobre a capacidade de adsorção da membrana de PVDF/PEDOT foram conduzidos à temperatura ambiente, com o pH da solução fixado como igual a 3 e variando as concentrações iniciais de MO de 1 a 40 mg/L (ver Seção 4.2.4).

A Fig. 65 mostra a porcentagem de remoção (%) de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT em função do tempo de interação a partir de meios aquosos para diferentes concentrações iniciais de corante (1, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 mg/L). como observamos, em todas as concentrações a remoção ocorre de forma mais rápida nos 180 min iniciais, apresentando uma taxa de remoção mais lenta após este ponto, como vemos pela inclinação da curva. Isso está associado com a disponibilidade dos sítios ativos do PEDOT na superfície da membrana, os quais tem grande parcela ocupados nos primeiros minutos de interação. Como consequência, há uma redução no número de sítios, que juntamente com a presença de moléculas de corante aderidas na superfície da membrana causam impedimentos levando a uma adsorção mais lenta conforme a interação da membrana e as moléculas de MO continua. Quanto a porcentagem de remoção, ela foi maior (acima de 70%) em baixas concentrações (1, 5 e 10 mg/L), enquanto concentrações mais altas apresentaram uma porcentagem de remoção substancialmente menor (20 % no caso de 40 mg/L), mas com uma taxa de adsorção mais rápida. Ou seja, conforme é aumentada a concentrações inicial de MO mais rápido o sistema atinge o equilíbrio de adsorção. Isso possivelmente está associado com a maior quantidade de moléculas de MO na solução, o que aumenta a transferência de massa entre a fase líquida e a fase sólida. Além disso, podemos ver que para todos as concentrações estudadas o equilíbrio começa

a ser atingido a partir de 360 min, tempo este que foi adotado para os experimentos posteriores.

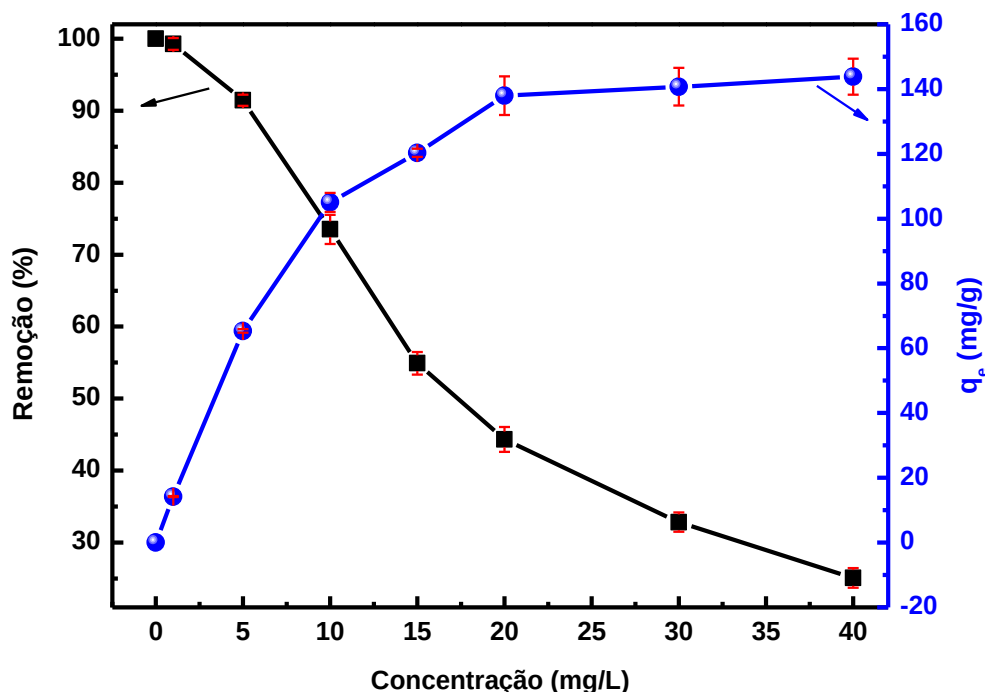
Figura 65 – Efeito do tempo de interação na porcentagem de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT para diferentes concentrações iniciais de corante: a) 1 mg/L, b) 5 mg/L, c) 10 mg/L, d) 15 mg/L, e) 20 mg/L, f) 30 mg/L e 40 mg/L.



Fonte: O autor (2019)

Uma vez estimado o tempo de equilíbrio, realizamos os cálculos da capacidade de adsorção q_e (mg/g) e da eficiência de remoção (%) em função das diferentes concentrações iniciais do corante MO que são mostrados na Fig. 66. Como podemos observar, conforme a concentração inicial aumenta, ocorre um decréscimo na eficiência de remoção, ao mesmo tempo em que a capacidade de adsorção das membranas de PVDF/PEDOT aumenta, até atingir seu valor máximo (143 mg/g), o que se dá a partir da concentração de 20 mg/L. Como mencionado, esse aumento da capacidade de adsorção em função do gradiente da concentração inicial de corante é possivelmente uma consequência de um maior número de moléculas de corante disponíveis para interagir com os sítios ativos de PEDOT, o que potencializa a força motriz de transferência de massa entre as fases e leva a um aumento do processo de adsorção por inteiro (Gorza, Pedro et al. 2018). Considerando tanto a porcentagem de remoção quanto a capacidade de adsorção, a melhor condição é 10 mg/L, com remoção de 73% e q_e de 105 mg/g.

Figura 66 – Efeito da concentração inicial de MO sobre a porcentagem (%) e capacidade de remoção (mg/g) da membrana PVDF/PEDOT.



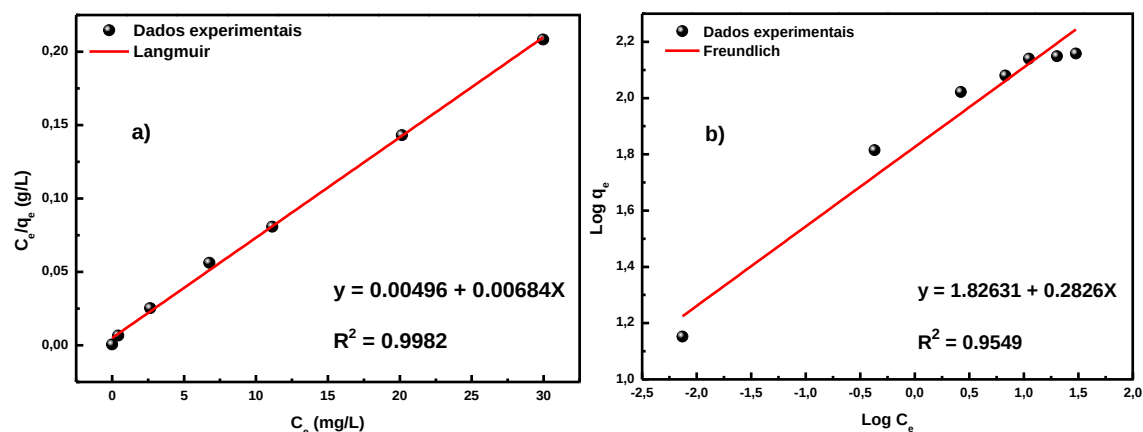
Fonte: O autor (2019)

4.3.2.3 Isotermas de adsorção

Como apresentado no Capítulo 2 (ver Seção 2.3.2.1.4), o uso de modelos é uma ferramenta que ajuda a melhor entender a natureza dos processos envolvidos na adsorção de um adsorvato por um adsorvente, assim como permite estimar o valor de parâmetros relevantes, como a capacidade de adsorção do adsorvente e a heterogeneidade energética dos sítios ativos, dentre outros. Por tais motivos, utilizamos os modelos de Langmuir e de Freundlich para realizar o ajuste dos dados experimentais de adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT. As equações linearizadas, variáveis para cada modelo (Eq. 3.4, Langmuir; Eq. 3.5, Freundlich), e a descrição fenomenológica de adsorção, foram também previamente tratadas na Seção 3.3.2.1.4 do Capítulo 3.

Na Fig. 67 são apresentados os ajustes lineares dos dados experimentais para os modelos de isotermas de Langmuir (a) e Freundlich (b). Como podemos ver, o modelo de Langmuir foi aquele que levou ao melhor ajuste, apresentando um coeficiente de correlação (R^2) de 0,998 (contra 0,954 para o modelo Freundlich), um valor que indica que esse modelo descreve de forma satisfatória o mecanismo de adsorção de MO nas membranas de PVDF/PEDOT.

Figura 67 – Ajustes lineares dos modelos de isotermas de Langmuir a) e Freundlich b) para os dados experimentais de adsorção de MO das membranas de PVDF/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

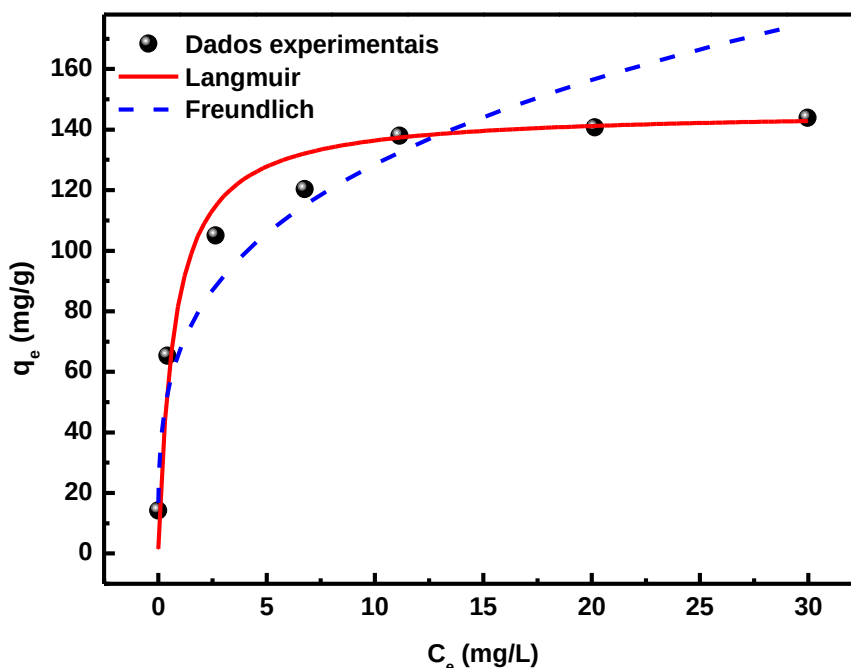
Na Tabela 7 apresentamos de forma resumida os parâmetros de isotermas obtidos a partir da regressão linear dos modelos Langmuir e Freundlich, juntamente com os respectivos coeficientes de correlação. Conforme indicado, para o modelo de Langmuir não só temos uma melhor reprodução dos dados obtidos experimentalmente ($R^2 = 0,998$), mas também a capacidade máxima de adsorção (q_m) das membranas de PVDF/PEDOT calculada a partir desse modelo foi de 146 mg/g, um valor muito próximo do obtido experimentalmente (143 mg/g). De acordo com o modelo de Langmuir, esses resultados sugerem que a adsorção do MO ocorre na forma de uma monocamada, onde os sítios de adsorção na superfície da membrana são energeticamente idênticos, proporcionando a interação de uma molécula de MO com um único sítio, e vice-versa (Chávez-Guajardo, Medina-Llamas et al. 2015). Na Fig. 68 são apresentados os ajustes dos modelos estudados (Langmuir e Freundlich) aos nossos dados experimentais.

Tabela 7 – Parâmetros calculados das isotermas de Langmuir e Freundlich para adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT.

Langmuir			Freundlich		
q_m	b	R^2	K_F	$1/n$	R^2
(mg/g)	(L/mg)		(mg/g)/(mg/L) ^{1/n}		
146,194	1,378	0,999	67,037	3,546	0,954

Fonte: O autor (2019)

Figura 68 – Ajuste das isotermas de adsorção de Langmuir (linha contínua), e Freundlich (linha tracejada) junto aos dados experimentais de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT (●).



Fonte: O autor (2019)

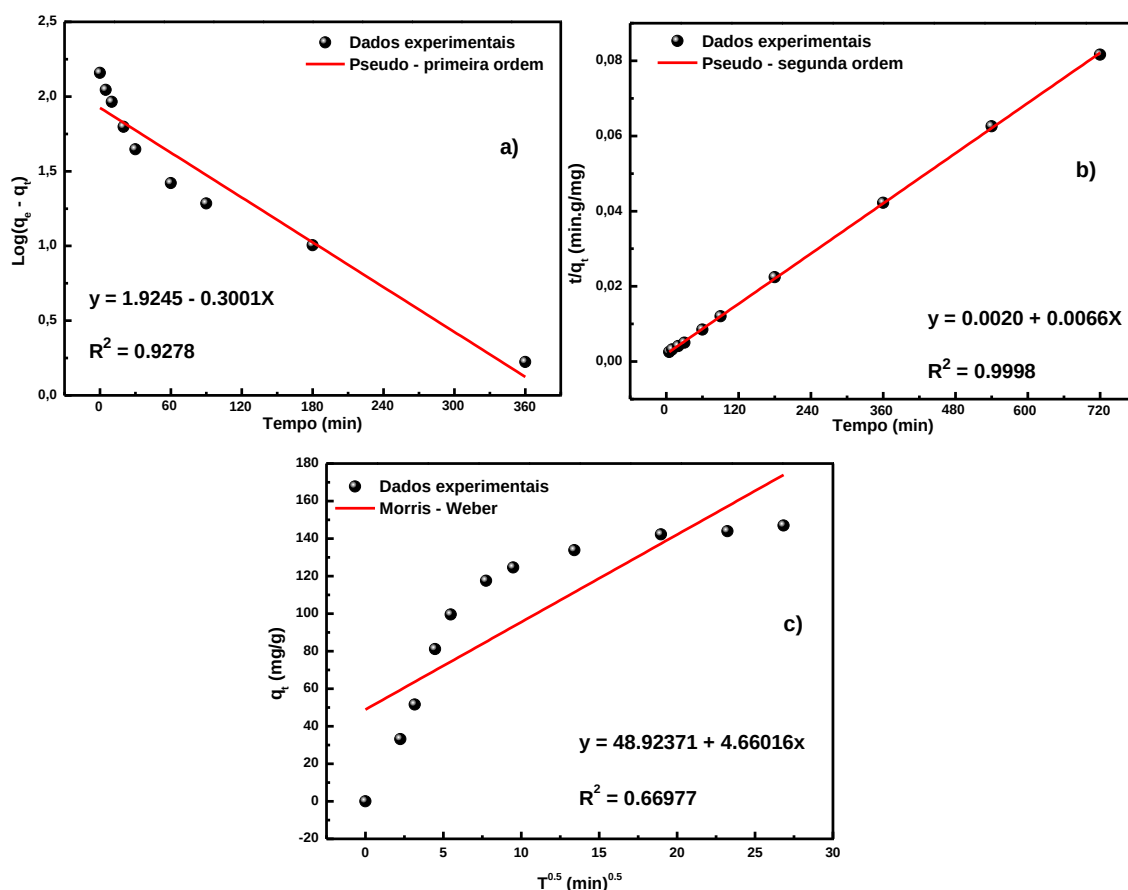
4.3.2.4 Cinética de adsorção

Para compreender o mecanismo de adsorção (físico, químico ou difusão) do MO na superfície do PVDF-PEDOT, realizamos análises da cinética do processo sob temperatura ambiente. Para isso, utilizamos os modelos pseudo-primeira Ordem (PPO), pseudo-segunda Ordem (PSO), e Morris-Weber (MW) para o ajuste dos dados experimentais. Assim como feito para o caso dos modelos de isotermas, as formas linearizadas das equações de cada modelo e suas descrições fenomenológicas foram previamente discutidos no Capítulo 3 desta tese (ver Seção 3.3.2.1.5).

Através dos ajustes lineares, que são mostrados na Fig. 69, os parâmetros cinéticos como k_1 , k_2 , k_{id} , capacidade de adsorção (q_e), e os respectivos coeficientes de correlação (R^2) foram obtidos, e eles retratados de forma sucinta na Tabela 8. Como se pode observar, o PSO foi o modelo que melhor descreve o processo de adsorção de MO na superfície das membranas de PVDF/PEDOT, com o maior valor de R^2 (0,999) mostrando um ótimo ajuste entre os valores experimentais e calculados. O valor da capacidade de adsorção calculado a partir desse modelo (q_e , calc; 149 mg/g) é muito próximo da capacidade obtida experimentalmente (q_e , exp; 143 mg/g). Com isso, o modelo de PSO nos diz que o mecanismo de adsorção está associado à quimissorção e exibe interações físico-químicas entre a superfície da membrana e as moléculas MO. Esse resultado,

juntamente com os resultados de pH e as características químicas do PEDOT (isto é, o fato de ser um policação) reforçam a suposição de que a interação é predominantemente de caráter eletrostático. Contudo, essa interação será discutida com mais detalhes na Seção 4.3.2.9.

Figura 69 – Ajustes lineares dos dados experimentais de remoção de MO com os modelos cinéticos de PSO a), PSO b), e MW c).



Fonte: O autor (2019)

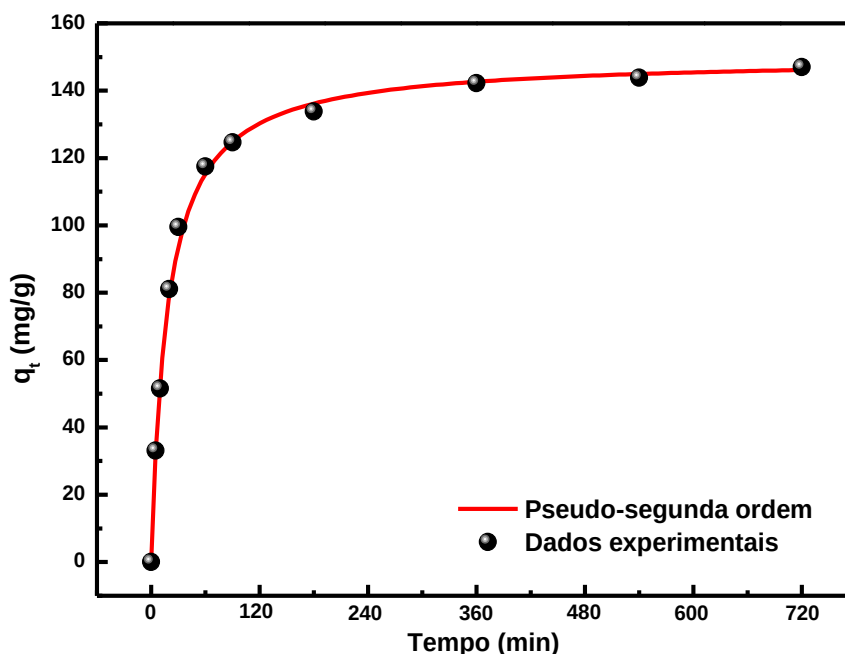
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos de adsorção de MO pelos tapetes PVDF-PEDOT para os modelos de PPO, PSO e MW.

$q_{e, \text{exp}}$ (mg/g)	PPO			PSO				MW	
	k_1 (h ⁻¹)	$q_{e, \text{calc}}$ (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.h)	$q_{e, \text{calc}}$ (mg/g)	h (mg/g.h)	R^2	k_{id} (mg/g.h ⁻¹)	R^2
143,864	0,692	84,043	0,927	0,022	149,701	500,0	0,999	36,097	0,669

Fonte: O autor (2019)

Na Fig. 70 é apresentado o ajuste do modelo de PSO aos dados obtidos experimentalmente.

Figura 70 – Ajuste do modelo cinético de adsorção de PSO (linha contínua) junto aos dados experimentais (●) de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT.

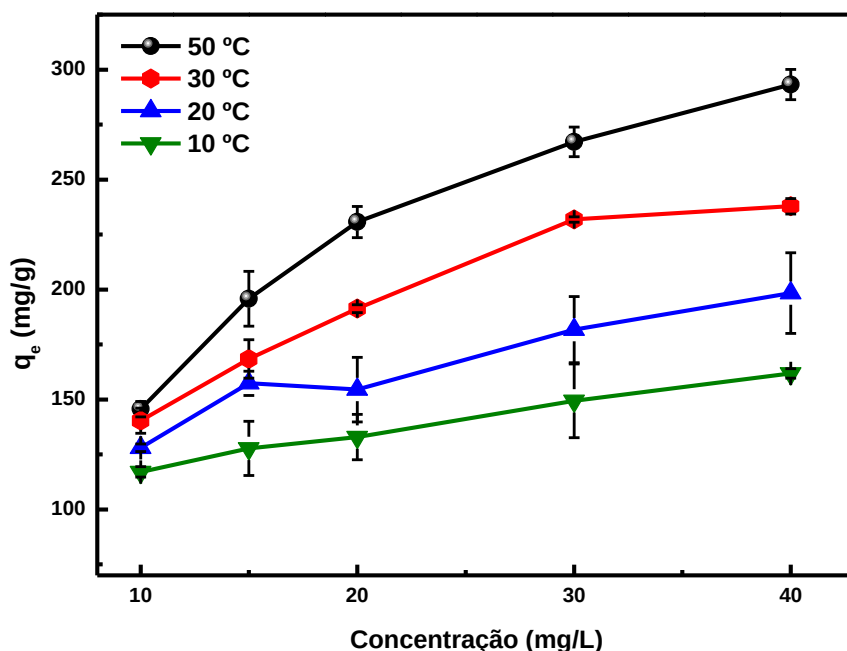


Fonte: O autor (2019)

4.3.2.5 Estudos termodinâmicos

Para avaliar o efeito da temperatura na capacidade de adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT, foram realizados estudos de adsorção em modo batelada para as temperaturas de 10, 20, 30 e 50 °C, para diferentes concentrações iniciais do corante (ver Seção 4.2.5). Como mostrado na Fig. 71, a capacidade de adsorção (q_e) aumenta conforme a temperatura do sistema se eleva, sendo esse aumento significativo; por exemplo, no caso da concentração de 40 mg/L, a capacidade máxima passa de 143 mg/g à temperatura de 10 °C para 293 mg/g a 50 °C. Isto pode estar associado ao movimento térmico das moléculas de corante. O aumento da temperatura causa um aumento na frequência do movimento das moléculas, e isso por sua vez favorece a interação com a superfície da membrana. Além disso, a taxa de difusão das moléculas de corante cresce com o aumento da temperatura, devido à diminuição da viscosidade da solução (Ge, #xe7 et al. 2013).

Figura 71 – Efeito da temperatura sobre a capacidade de remoção das membranas de PVDF/PEDOT para diferentes concentrações iniciais de MO.



Fonte: O autor (2019)

O aumento da adsorção a partir do aumento da temperatura pode ser explicado com base em parâmetros termodinâmicos de sorção, os quais possibilitam definir se as propriedades de adsorção apresentam caráter endotérmico ou exotérmico, e se o processo é espontâneo ou não. A partir dos dados de adsorção obtidos para as diferentes temperaturas, é possível calcular os parâmetros termodinâmicos de energia livre de Gibbs (ΔG), entropia (ΔS) e entalpia (ΔH) ao correlacionar a constante de adsorção b das isothermas de Langmuir através das relações:

a)

$$\Delta G_t = -RT \ln b_t, \quad (4.4)$$

para a energia livre de Gibbs, onde ΔG_t e b_t (L/mol) são a energia livre de Gibbs e a constante de Langmuir na temperatura t , respectivamente, R é a constante universal dos gases (J / K . mol), e T a temperatura em Kelvin,

b)

$$\ln b_{tf} - \ln b_{ti} = - \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_f} - \frac{1}{T_i} \right), \quad (4.5)$$

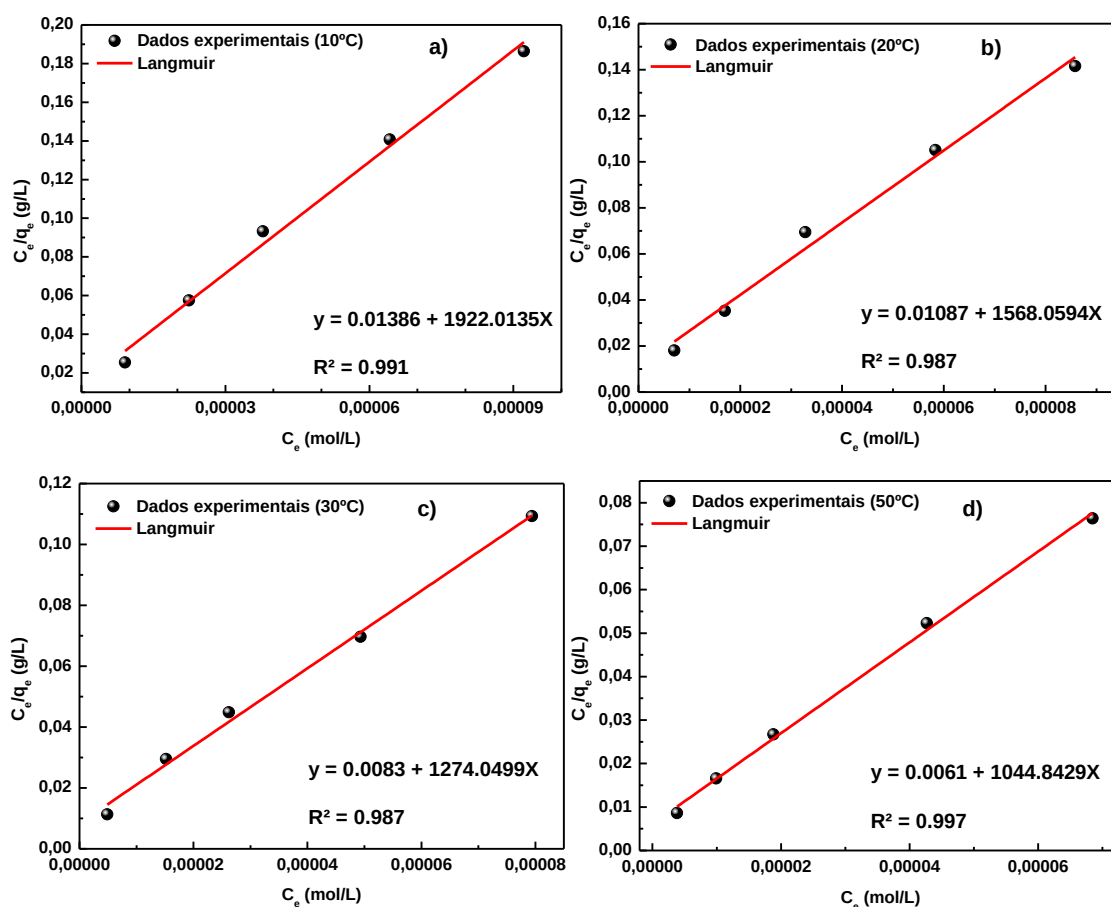
para a entalpia, onde b_{tf} e b_{ti} são as constantes de Langmuir da isoterma de maior e menor temperatura (nessa ordem), ΔH é a entalpia, e T_f e T_i as temperaturas das isothermas em maior e menor temperatura utilizadas, respectivamente, e

$$c) \quad \Delta S = - \frac{\Delta G - \Delta H}{T}, \quad (4.6)$$

para a entropia (Li, Di et al. 2005).

Uma das formas de se obter o valor da constante b é através da inclinação da curva do gráfico de C_e/q_e versus C_e , o método que adotamos. Na Fig. 72 são apresentados os ajustes lineares das isotermas de adsorção para as temperaturas de 10, 20, 30 e 50 °C.

Figura 72 – Ajustes lineares do modelo de isoterma Langmuir para o processo de remoção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT à temperatura de 10 a), 20 b), 30 c) e 50 °C d).



Fonte: O autor (2019)

Na Tabela 9 estão listados os parâmetros termodinâmicos e os respectivos valores obtidos para o processo de adsorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT. Como pode ser visto, ΔG tem valores negativos em toda a faixa de temperatura investigada, o que mostra que o processo é de natureza espontânea. Além disso, a diminuição da energia livre (de ~ -27 à 10 °C, para -32 kJ/mol em 50 °C) com o aumento da temperatura, juntamente com o valor positivo de ΔH ($4,123$ kJ/mol), evidenciam ser o processo endotérmico, com a quantidade adsorvida no equilíbrio aumentando com o acréscimo da

temperatura (Unnithan and Anirudhan 2001), o que é observado no gráfico da Fig. 71. Por sua vez, já um valor positivo de ΔS (112,91 J/mol.K) denota também a natureza endotérmica do processo de adsorção, pois sendo essa variação positiva, ocorre um aumento da aleatoriedade na interface sólido/líquido durante a adsorção de MO na camada de PEDOT, o que favorece a adsorção (Fakhri 2017), o que é percebido em nossos resultados.

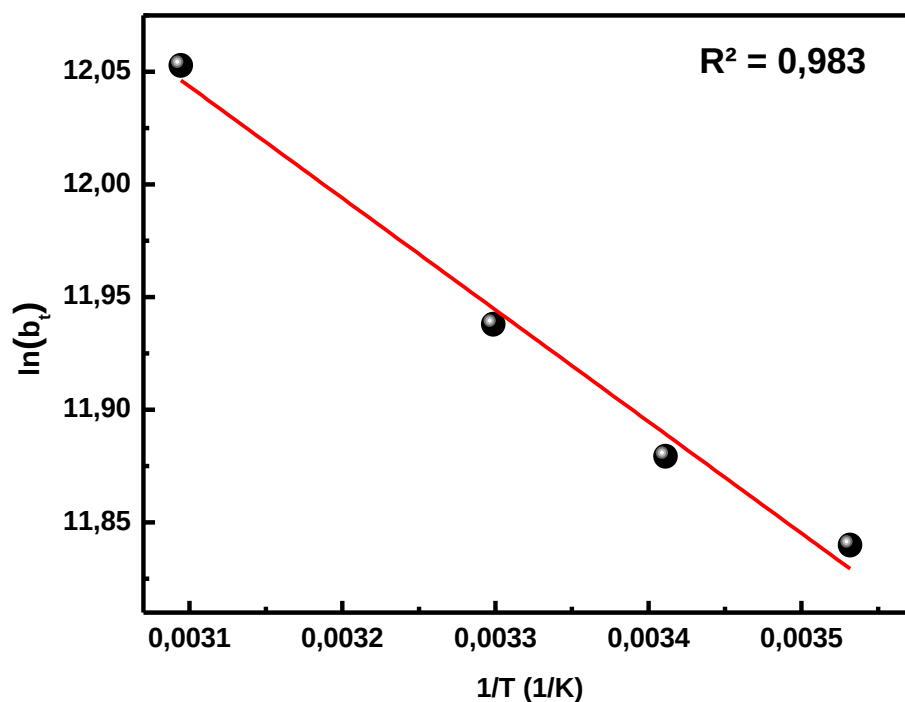
Tabela 9 – Parâmetros termodinâmicos para adsorção de MO com as membranas PVDF/PEDOT.

T (°C)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol.K)
10	-27,872	4,123	112,91
20	-28,952		
30	-30,088		
50	-32,381		

Fonte: O autor (2019)

Na Fig. 73 é mostrado o ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir em função da temperatura de adsorção.

Figura 73 – Ajuste linear da constante de adsorção de Langmuir em função da temperatura (em Kelvin) de adsorção.



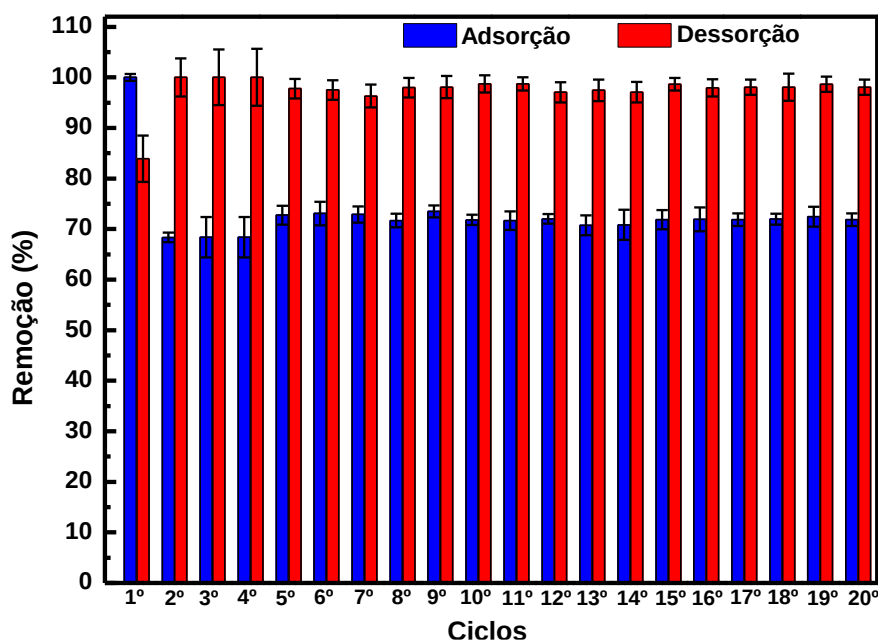
Fonte: O autor (2019)

4.3.2.6 Estudos da reutilização das membranas de PVDF/PEDOT

A capacidade de regeneração e reutilização é uma característica que agrega valor e funcionalidade para o desempenho global de um material adsorvente, além de contribuir para uma melhor elucidação dos mecanismos de adsorção. Em razão disso, utilizamos as membranas em sucessivos ciclos de adsorção/dessorção, fazendo uso de uma solução do surfactante SDS (0,1 M, pH 5.8) como solução de eluição (ver Seção 4.2.6). A escolha do SDS como eluente se deve à natureza da interação de caráter eletrostático que supomos estar ocorrendo entre as regiões carregadas positivamente (pólarons e bipólarons) da cadeia polimérica do PEDOT e os grupos sulfonados do MO. Como o SDS é uma molécula aniônica pequena, que possui também um grupo sulfonado, se esperava que por serem menores as moléculas de SDS substituíssem as moléculas de MO junto aos grupos do PEDOT, o que realmente foi observado.

Na Fig. 74 é mostrada a eficiência de adsorção/dessorção das membranas de PVDF/PEDOT para 20 ciclos consecutivos em temperatura ambiente. Pode ser observado que no primeiro ciclo a membrana atinge o máximo de adsorção, tendo, porém, uma dessorção de apenas aproximadamente 85%. Já a partir do segundo ciclo, a adsorção se estabiliza por volta de 70% da capacidade de adsorção inicial, enquanto a dessorção média se mantém acima de 97% durante os 19 ciclos restante, com exceção do 2º ao 4º ciclo, nos quais o valor superior a 100% de dessorção está associado ao MO remanescente do 1º ciclo. Isso mostra que as membranas de PVDF/PEDOT têm uma ótima estabilidade química, como esperado para o PEDOT, o que permite que elas sejam utilizadas em pelo menos 20 repetidos ciclos de adsorção/dessorção, sem perda expressiva em sua eficiência de remoção.

Figura 74 – Porcentagem de adsorção e dessorção de MO pelas membranas de PVDF/PEDOT em ciclos sucessivos de reutilização.



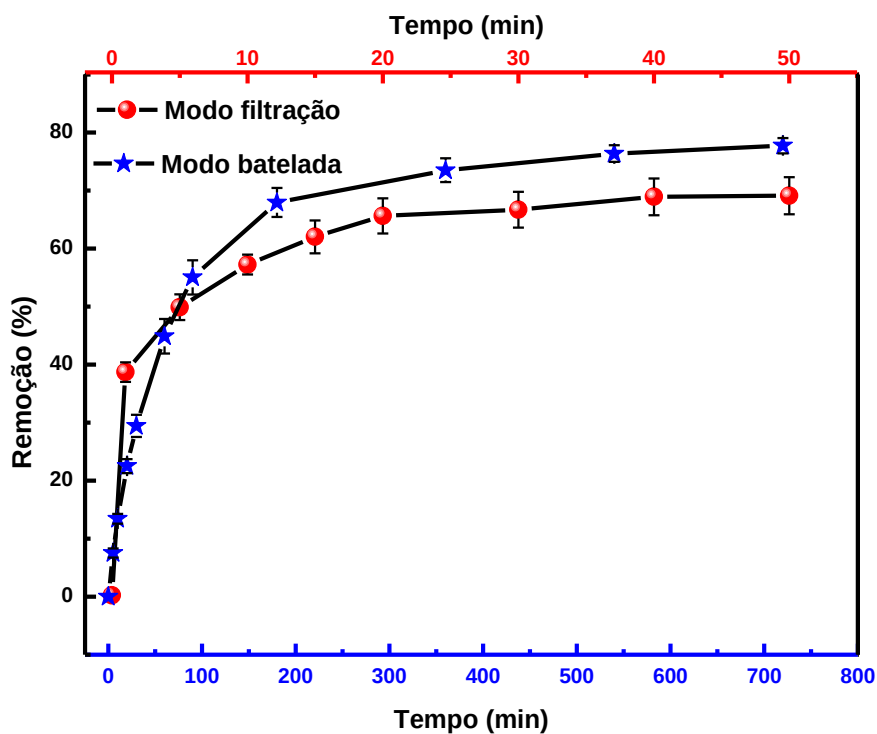
Fonte: O autor (2019)

4.3.2.7 Estudos da remoção de MO a partir de sistemas de filtração

Um fator importante no desempenho e na vida útil de membranas utilizadas em processos de remoção de contaminantes é a configuração na qual ela é utilizada. No âmbito acadêmico, as membranas utilizadas em estudos de remoção em meios aquosos são comumente submetidas a estudos em modo de batelada e de filtração, com as membranas apresentando diferentes desempenhos de acordo com sua composição química, porosidade, resistência mecânica, dentre outros fatores. No caso de sistemas de filtração, dois tipos são possíveis: o primeiro é a filtração de fluxo cruzado (*cross-flow filtration*), onde as membranas são dispostas de forma tangencial ao fluxo de resíduos, e a segunda, conhecida como filtração sem saída (*dead-end filtration*), na qual o fluxo é perpendicular à membrana, de modo que a remoção se dá tanto pela interação físico-química com as espécies (contaminantes), como também por uma barreira física imposta pela membrana, que varia de acordo com a porosidade (Cheremisinoff 2002). Apesar do modo de filtração sem saída apresentar problemas como acúmulo na superfície da membrana, esse modo de filtragem tem se mostrado eficaz no tratamento de águas com baixo nível de contaminação, sendo muitas vezes adaptado em etapas de pós-tratamento de efluente, e em sistemas de osmose reversa (Yoon 2015).

Dessa forma, para investigar a eficiência de remoção da membrana de PVDF/PEDOT em uma configuração por filtração e estabelecer uma comparação quando utilizadas em batelada, elaboramos um aparato experimental de recirculação no qual a filtração foi obtida pelo modo sem saída (ver Seção 4.2.7). Na Fig. 75 mostramos de forma comparativa a cinética de remoção (MO com 10mg/L, pH 3) para o modo de filtração (●) e de batelada (★). É possível observar pelas curvas que a remoção por filtração atingiu o regime de saturação com apenas 20 min, o que só é alcançado a partir de 360 min quando em batelada. Isso demonstra que, na configuração utilizada, o método de filtração tem uma taxa de adsorção no mínimo 18 vez maior e que, como esperado, a performance das membranas de PVDF/PEDOT tem grande dependência do modo em que são usadas.

Figura 75 – Efeito do modo de utilização das membranas de PVDF/PEDOT na cinética remoção de MO. Em modo batelada a) e filtração do tipo dead-end b).



Fonte: O autor (2019)

O acréscimo da taxa de adsorção observada possivelmente deve estar correlacionado a uma maior interação entre a membrana e a solução de MO, uma vez que na configuração utilizada a solução é forçada a passar entre os poros das membranas de PVDF/PEDOT, o que melhora a interação entre as moléculas de MO e as cadeias de PEDOT. Além disso, isso pode favorecer o acesso do corante a sítios ativos mais internos da membrana.

4.3.2.8 Comparação com outros adsorventes de MO

Na Tabela 10 é apresentada uma comparação do desempenho das membranas de PVDF/PEDOT com o de outros adsorventes utilizados para a remoção de MO reportados na literatura. Como podemos ver, quanto à capacidade, as membranas de PVDF/PEDOT apresentam um valor intermediário em relação a outros materiais, como os óxidos metálicos relatados nos trabalhos de Arshadi (381 mg/g) (Arshadi, Salimi Vahid et al. 2013), Zhe-Ming (181,9 mg/g) (Ni, Xia et al. 2007), e Tanhaei (417 mg/g) (Tanhaei, Ayati et al. 2015), assim como também para sistemas semelhantes ao nosso, com adsorventes que utilizam membranas poliméricas eletrofiadas, como evidenciadas por Satilmis (301,4 mg/g) (Satilmis and Uyar 2018), Shen (351,3 mg/g) (Shen, Li et al. 2015), e Ma (633 mg/g) (Ma, Zhang et al. 2016), ou com adsorventes baseados em polímeros condutores como os trabalhos de Zhao (445 mg/g) (Zhao, Chen et al. 2015), Xin (169,5 mg/g) (Xin, Fu et al. 2015), e Ai (154,5 mg/g) (Ai, Jiang et al. 2010). Contudo, mesmo com um (q_e) maior e um tempo de equilíbrio menor que aqueles observados para as membranas de PVDF/PEDOT, como apresentado em alguns desses trabalhos (Ni, Xia et al. 2007, Ai, Jiang et al. 2010, Arshadi, Salimi Vahid et al. 2013, Shen, Li et al. 2015, Xin, Fu et al. 2015, Shahabuddin, Sarih et al. 2016), as membranas de PVDF/PEDOT se mostram superiores quanto à porcentagem (acima de 97%) e ao tempo de dessorção (60 min), assim como no grande número de ciclos possíveis de reutilização (no mínimo 20 ciclos). Esses aspectos mostram que a membrana, apesar de ter uma capacidade intermediária, exibe uma vida útil muito superior aos outros materiais, uma vez que, como demonstrado nos estudos de reutilização, a membrana manteve suas propriedades de adsorção inalteradas por 20 ciclos, um número que pode ser ainda estendido. Por outro lado, as membranas de PVDF/PEDOT se mostram mais eficientes que muitos outros adsorventes, como, por exemplo, materiais baseados em óxido de grafeno e em nanotubos de carbono, os quais possuem um grande valor agregado. Tais fatos, aliados à capacidade das membranas poderem ser utilizadas em diferentes modos (de filtração) a fim de potencializar sua capacidade de adsorção (ver Seção 4.3.2.7) mostram que as membranas de PVDF/PEDOT realmente aparecem como um material promissor para uso em protocolos de remediação de água. Além disso, ao melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a reportar a utilização do polímero condutor PEDOT como um material eficiente para a adsorção de corantes, o que abre a perspectiva de novas pesquisas

que, através da nanotecnologia, visem otimizar as características de adsorção de efluentes com materiais baseados no PEDOT.

Tabela 10– Comparação de diferentes propriedades adsorptivas das membranas de PVDF/PEDOT com outros adsorventes de MO reportados na literatura.

Adsorvente	pH	Capacidade de adsorção (mg/g)	Tempo de adsorção (min)	Dessorção (%)	Tempo de dessorção (min)	Reutilização (ads/des)	Ref.
MOF	5,6	194	~250	-	-	-	(Haque, Lee et al. 2010)
MWCNT	2,0	64,7	90	-	-	-	(Yao, Bing et al. 2011)
Resina PS	-	60	600	-	-	-	(Huang, Huang et al. 2008)
Exúvia do bicho da seda	7,0	77,7	720	17,2	720	-	(Chen, Zhao et al. 2011)
CS/ γ -Fe ₂ O ₃ /MWCNTs	4,3	61,4	120	-	-	-	(Zhu, Jiang et al. 2010)
OG	3,0	16,8	100	-	-	-	(Robati, Mirza et al. 2016)
MOF/SiO ₂ -Al ₂ O ₃	6,5	381	50	-	-	-	(Arshadi, Salimi Vahid et al. 2013)
Montmorillonita	3,0	149,2	60	-	-	-	(Chen, Chen et al. 2011)
MWCNT/Fe ₃ O ₄ /PANI	4,5	445	600	-	-	4	(Zhao, Chen et al. 2015)
LDO - Zn/Al	6,0	181,9	120	100	-	4	(Ni, Xia et al. 2007)
MC/C	6,0	102,1	5000	67,1	1440	6	(Hosseini, Khan et al. 2011)
CS/Al ₂ O ₃ / γ -Fe ₂ O ₃	6,0	417	90	100	2160	5	(Tanhaei, Ayati et al. 2015)
OG/Ni/MMO	-	84,2	960	-	120	5	(Yang, Ji et al. 2013)
AgNPs/CA	7,0	27,4	960	100	-	10	(Pal, Deb et al. 2013)
CS/Montmorillonita	2,0	70,4	60	81	1440	3	(Umpuch and Sakaew 2013)
NEF – PIM/amina	6,0	301,4	1440	78,4	60	4	(Satilmis and Uyar 2018)
NEF - Poliacrilonitrila	7,0	102	1440	-	-	3	(Xu, Sun et al. 2015)
NEF - PVP/Al ₂ O ₃	5,5	351,3	80	100	180	5	(Shen, Li et al. 2015)
NEF- PCL/PEO/PDA		60,2	180	95	-	8	(Wang, Yin et al. 2019)
NEF - PEI/PVDF	7,0	633	1440	87,5	60	10	(Ma, Zhang et al. 2016)
NEF – EDTA/EDA/PAN	4,0	99,2	480	-	-	5	(Cháuque, Dlamini et al. 2017)
PPY	7,0	169,5	300	79,4	-	3	(Xin, Fu et al. 2015)
PANI	-	154,5	120	-	-	-	(Ai, Jiang et al. 2010)
PANI	10	75,9	60	-	-	-	(Tanzifi, Hosseini et al. 2017)
PPY/SiO ₂	6,5	41,6	30	-	-	-	(Boukoussa, Hakiki et al. 2018)
Co ₃ O ₄ /PANI	7,0	103,1	45	-	120	5	(Shahabuddin, Sarih et al. 2016)
NEF – PVDF/PEDOT	3,0 – 6,0	143,8	360	97	60	20	Este trabalho

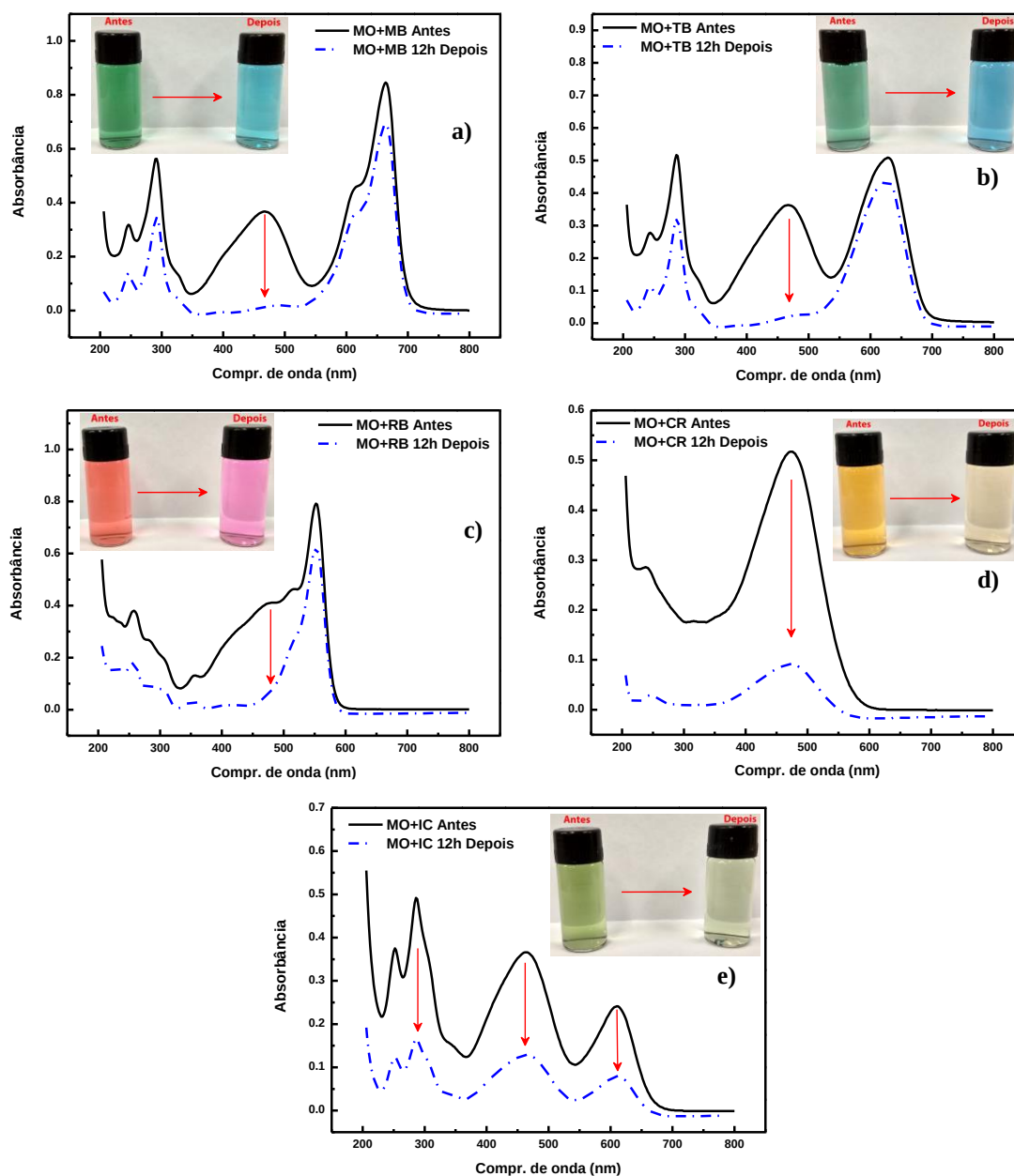
Fonte: O autor (2019)

MOF – Rede Metal-Orgânica; **MWCNT** – Nanotubos de carbono Multicamadas; **PS** – Poliestireno; **CS** – Quitosana; γ -**Fe₂O₃** – Maghemita; **OG** – Óxido de Grafeno; **Fe₃O₄** – Magnetita; **PANI** – Polianilina; **LDO** – Dupla camada de Hidróxidos; **MC/C** – Monólito Cerâmico revestido com Carbono; **MMO** – Mistura de Óxidos Metálicas; **AgNPs** – Nanopartículas de Prata; **CA** – Carbono Ativado; **NEF** – Nanofibras Eletrofiadas; **PIM** – Polímeros Intrinsicamente Microporosos; **PVP** – Polivinilpirrolidona; **PDA** – Polidopamina; **PCL** – Policaprolactona; **PEO** - Óxido de polietileno; **PEI** – Polietilenimina; **EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético; **EDA** - Etilenodiamina; **PAN** – Poliacrilonitrila; **CoNiFe₂O₃** – Ferrita de níquel-cobalto; **PPY** - Polipirro

4.3.2.9 Estudos seletividade e mecanismo de interação

Como é conhecido, o PEDOT apresenta um comportamento químico policationico que se deve às conjugações de pólarons e bipólarons (Elschner 2011), o que é favorável para adsorver corantes aniônicos como moléculas MO, a depender do pH da solução. Como já levantado, acredita-se que as interações entre as membranas de PVDF/PEDOT e as moléculas de MO são de caráter eletrostáticas. A fim de comprovar este mecanismo, experimentos de seletividade foram realizados utilizando a mistura de diferentes corantes catiônicos e aniônicos. Para isso, o corante MO (corante aniônico) foi misturado com corantes catiônicos como azul de metileno (MB), azul de toluidina (TB), rodamina B (RB) e com os corantes aniônicos vermelho do congo (CR) e índigo carmim (IC), sendo os espectros de absorbância correspondentes coletados após 12 h de adsorção (ver Seção 4.2.8). Como pode ser visto na Fig. 76, para corantes catiônicos (a, b, c) MB, TB e RB, nota-se uma diminuição preferencial na faixa centrada em 460 nm, que corresponde a moléculas de MO, e uma diminuição mínima nas bandas correspondentes aos corantes catiônicos. Isso deve estar associado a uma possível repulsão eletrostática entre os pólarons e bipólarons de PEDOT dispostos na superfície da membrana de PVDF/PEDOT e as cargas positivas desses corantes. Por outro lado, para os corantes aniônicos CR e IC (d, e), nota-se uma diminuição significativa para todas as bandas. Como esperado, esses comportamentos indicam que a superfície das membranas de PVDF/PEDOT se mostra preferencial para a captura de corantes aniônicos. A seletividade para os corantes aniônicos pôde ser também acompanhada visualmente através da mudança na coloração das soluções, como apresentado no detalhe nas imagens mostradas na Fig. 76.

Figura 76 – Espectros UV-Vis antes e depois da interação com as membranas de PVDF/PEDOT para as diferentes misturas entre corantes aniônicos e catiônicos. Em detalhe é apresentada a imagem com a coloração das misturas de corantes antes e depois da interação.

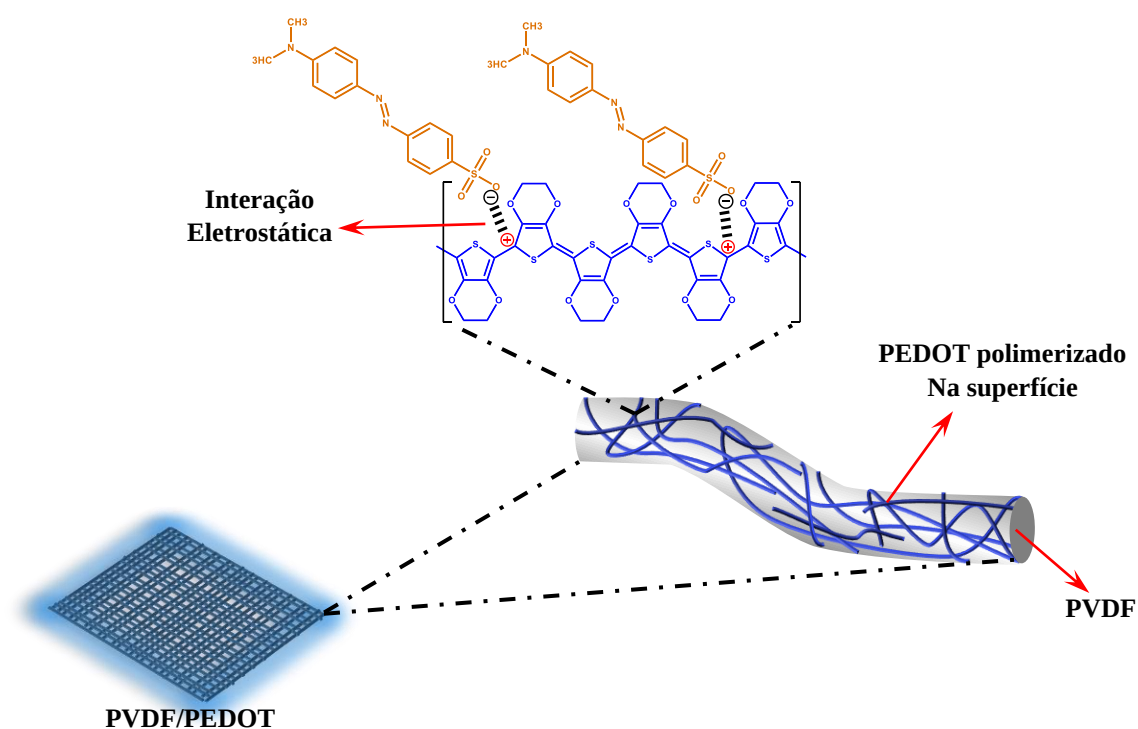


Fonte: O autor (2019)

Deste modo, ao cruzarmos as características químicas do PEDOT, para o qual por meio da espectroscopia UV-Vis (ver Seção 4.3.1.3) comprovamos a formação de pólarons e bipólarons ao longo da cadeia polimérica, junto as do corante MO (pKa) e os resultados dos experimentos de pH (adsorção a partir do pKa do MO), seletividade (preferencialmente para corantes aniônicos), cinética (processo de quimissorção) e dessorção (utilização de surfactante aniônico com grupo sulfônico), podemos concluir

que a interação entre as membranas de PVDF/PEDOT e o corante MO ocorre principalmente via um processo eletrostático. Sendo assim, supomos que a interação se dá pela interação entre os pólarons e bipólarons do PEDOT ($S + -H$), os quais servem como sítios de carga positiva que adsorvem o MO através do grupo sulfonado (SO_3^-), que se encontra carregado negativamente para valores de pH acima de 3,0. Na Fig. 77 é apresentado de forma esquemática o mecanismo proposto para a remoção de MO em meio aquoso.

Figura 77 – Esquema ilustrativo do mecanismo de interação proposto entre as membranas de PVDF/PEDOT e o corante MO.



Fonte: O autor (2019)

4.4 CONCLUSÃO

No presente capítulo apresentamos uma metodologia simples e de baixo custo para a obtenção de membranas compósitas de PVDF/PEDOT através da utilização da técnica de eletrofiação, seguida da modificação da superfície da membrana por meio da polimerização em fase vapor do monômero de EDOT. Tal metodologia foi empregada a fim de superar as limitadas propriedades mecânicas e baixa solubilidade do PEDOT e possibilitar sua aplicação de forma eficiente como um adsorvente de efluentes contaminados com corantes.

As caracterizações utilizadas mostraram que realmente conseguimos produzir membranas eletrofiadas de PVDF, as quais exibiram fibras uniformes com uma distribuição de tamanhos de 100 nm a 2 μ m, com um diâmetro médio de $(0,9 \pm 0,7)$ μ m. Já quanto a modificação das membranas, comprovamos que a mesma ocorreu de forma superficial, recobrindo as fibras de PVDF com uma camada de PEDOT, o que foi comprovado pelas caracterizações de FTIR, UV-Vis, ângulo de contato, e por microscopia eletrônica de varredura. Adicionalmente, as micrografias indicam que a camada de PEDOT incorporada é fina, e que a porosidade não foi drasticamente alterada, o que é importante para aplicações adsorptivas como filtração.

Os resultados de adsorção evidenciam que a eficiência das membranas de PVDF/PEDOT para a remoção de MO ocorre em uma grande faixa de pHs (3 – 10), alcançando a capacidade máxima de 143,8 mg/g em pH 3. A partir desse comportamento, e juntamente com os dados obtidos pelos ajustes de cinética e das isothermas (que mostraram melhor concordância com o modelo de pseudo-segunda ordem, no caso da cinética, e de Langmuir, para as isothermas), podemos supor que o mecanismo de adsorção é de caráter predominantemente eletrostático. Segundo nossa proposta, os defeitos pontuais (pólarons e bipólarons) de carga positiva atuam como sítios ativos para os grupos sulfônicos aniônicos do corante. Essa hipótese foi corroborada por meio de experimentos de seletividade, que mostraram que as membranas de PVDF/PEDOT adsorvem preferencialmente corantes aniônicos.

Por sua vez, os dados dos estudos termodinâmicos, através dos valores de entropia, energia de Gibbs e entalpia, revelaram que o processo de adsorção é de natureza espontânea e endotérmico, com a capacidade no equilíbrio aumentando com o acréscimo da temperatura de adsorção do sistema, o que foi observado pelo aumento da q_e de 143 para 290 mg/g quando a temperatura passou de 10 para 50 °C. Também foi demonstrado que as membranas exibem uma ótima estabilidade físico-química, sem que ocorra perda da capacidade de adsorção e dessorção após 20 ciclos consecutivos de reutilização. Em acréscimo, por meio de um exemplo experimental, no qual as membranas foram incorporadas em um sistema de filtração, pôde ser verificado que a velocidade da cinética de adsorção de MO aumenta de forma significativa, atingindo a saturação em apenas 20 min, enquanto em modo batelada isso só é alcançado a partir de 360 min.

Na comparação com outros adsorventes de MO encontrados na literatura, pudemos estabelecer que, apesar das membranas de PVDF/PEDOT apresentavam uma capacidade intermediária, outros aspectos como uma elevada porcentagem (acima

de 97%) e um baixo tempo de dessorção (60 min) dessorção, o grande número de ciclos de reutilização (no mínimo 20 ciclos), e a possibilidade de serem utilizadas em diferentes modos como filtração (que diminui a cinética de saturação), sugerem que as nossas membranas possam vir a ter uma vida útil superior à de outros materiais. Ademais, como já mencionado, este é o primeiro trabalho a usar o PEDOT como um adsorvente efetivo para a remoção de corantes, deixando em perspectiva a necessidade de novas pesquisas que possam vir a otimizar as características de adsorção do PEDOT para efluentes. Por fim, ao considerarmos todos estes pontos, esperamos que as membranas de PVDF/PEDOT possam, por exemplo, vir a ser empregadas como um filtro eficiente de corantes aniônicos em sistemas secundários de tratamento de efluentes.

5 USO DE NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO γ -Fe₂O₃/PANI PARA PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMÍDEO

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais adotados para a síntese de um nanocompósito magnético composto por nanopartículas de maghemita revestidas com o polímero condutor polianilina, juntamente com as caracterizações do mesmo. Além disso, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para o uso desse nanocompósito como material adsorvente de fase sólida para a purificação de DNA plasmídeo a partir de suspensões aquosas de *Escherichia coli*. Ainda neste capítulo, também serão apresentados resultados referentes à captura de células bacterianas presentes em meios aquosos.

5.1 MOTIVAÇÃO

O DNA do plasmídeo (pDNA) são moléculas de DNA extra-cromossômicas de fita dupla circulares e de tamanho relativamente pequeno, que podem se replicar de forma autônoma do DNA cromossômico. Existindo em forma livre no citoplasma de células procarióticas, o pDNA geralmente carrega a maioria dos genes bacterianos ligados a funções adaptativas, como conjugação, funções metabólicas de degradação, resistência a antibióticos e à presença de íons metálicos, bem como a fatores de virulência (Grinsted 1988, Thomas 2000, Lipps 2008, Esser, Kück et al. 2012, Clewell 2014). Atualmente, o pDNA é uma ferramenta indispensável para a engenharia genética, sendo um dos vetores mais utilizados no campo da tecnologia do DNA recombinante para a expressão de proteínas e hormônios, como insulina, interferon-gama, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Burnouf 2011), hormônio de crescimento (Raiti and Tolman 1986), vacinas (Levy, Clowes et al. 1981, Schleef 2001, Manthorpe, Hobart et al. 2005), e terapia gênica (Prud'Homme, Draghia-Akli et al. 2007), entre outros. O pequeno tamanho característico confere às moléculas de pDNA uma alta estabilidade, permitindo que elas possam ser transferidas não apenas para todas as células descendentes, mas que também possam atuar como vetores na transferência gênica horizontal ou nas transformações induzidas, aquelas nas quais são introduzidas nas células hospedeiras alvo. Como um número abundante de cópias delas existe em cada célula, no caso de sistemas de expressão, por exemplo, uma grande quantidade de proteína pode ser produzida (Stein and Stein 1984, Griffiths 2000, Brown 2010, Lodish 2013).

Uma alta pureza e boa integridade são requisitos essenciais para que uma amostra de DNA possa ser usada como material de partida na maioria dos procedimentos de biotecnologia, e assim há uma busca permanente pelo desenvolvimento de novos protocolos eficientes para extração de pDNA a partir de células bacterianas. Idealmente, esses novos métodos devem fornecer procedimentos de isolamento simples e rápidos que possam resultar em um alto rendimento de DNA de boa qualidade, com presença mínima de proteínas, sais, RNA e outros contaminantes (Chiang, Sung et al. 2005, Schrader, Schielke et al. 2012). Atualmente, os principais protocolos disponíveis para a purificação de plasmídeos são baseados na adsorção em fase líquida (fenol-clorofórmio) ou em fase sólida, como sílica porosa e cromatografia de troca iônica. Esses protocolos podem envolver o uso de solventes tóxicos e geralmente consomem tempo, exigindo muitas etapas e um grande número de centrifugações repetitivas (Berensmeier 2006, Tan and Yiap 2009). Por outro lado, mais recentemente, vários adsorventes alternativos com capacidade de interagir eletrostaticamente com biomoléculas de interesse (como DNA total e pDNA) foram investigados para uso em processos simples, seguros e de alto rendimento. Alguns exemplos destes novos materiais são resinas de troca iônica e micropartículas poliméricas (Giraffa, Rossetti et al. 2000, Wang, Xing et al. 2014), silicato de cálcio (Winters, Richter et al. 2003), óxido de alumínio nanoporoso (Elgort, Herrmann et al. 2004, Kim and Gale 2008), quitosana (Cao, Easley et al. 2006, Reedy, Price et al. 2011), celulose (Demirci, Celebioglu et al. 2014), e partículas magnéticas funcionalizadas (Chiang, Sung et al. 2005, Berensmeier 2006, Chiang, Sung et al. 2006, He, Huo et al. 2007, Shan, Wu et al. 2010, Chen, Mao et al. 2012, Perçin, Karakoç et al. 2012), entre outros.

Como os adsorventes de fase sólida podem ser incorporados em processos de purificação rápidos e práticos que dispensam a necessidade de reagentes tóxicos, nos últimos anos ganhou destaque seu uso para a recuperação de pDNA e outros ácidos nucleicos, ou biomoléculas em geral. A esse respeito, protocolos de extração baseados no uso de nanopartículas magnéticas merecem atenção especial por propiciarem uma separação direta do adsorvente pela simples aplicação de um campo magnético externo (Berensmeier 2006, Kharissova, Dias et al. 2015); Além disso, eles são submetidos a requisitos menos rigorosos em relação à quantidade da amostra inicial, uma vez que as nanopartículas exibem uma alta capacidade de adsorção, devido à sua grande área superficial (Chiang, Sung et al. 2005). Para favorecer as interações eletrostáticas com os grupos fosfato negativos dos ácidos nucleicos, nanopartículas desse tipo podem ter a sua

superfície alterada, tanto fisicamente por meio de um revestimento adequado, como quimicamente, pela ligação covalente de grupos funcionais ou polímeros catiônicos (Yoza, Matsumoto et al. 2002, Bruce and Sen 2005, Chiang, Sung et al. 2005). Na literatura pertinente, pode-se encontrar uma grande variedade de nanopartículas revestidas por inúmeros materiais e que são utilizadas para a extração de pDNA de amostras bacterianas, como sílica (Chiang, Sung et al. 2006, Shao, Xia et al. 2008, An, Choi et al. 2017), polietilenoimina (PEI) (Chiang, Sung et al. 2005), grupos carboxílicos (Shan, Wu et al. 2010), hemoglobina (Chen, Mao et al. 2012), aminosilano (He, Huo et al. 2007), e zircônia (Saraji, Yousefi et al. 2017). No entanto, a síntese de alguns destes nanocompósitos híbridos pode não ser apenas complicada e dispendiosa, mas também requer o uso de reagentes tóxicos, como o tiocianato de guanidina, no decorrer do processo de purificação do DNA. Assim, continua a ser de grande interesse o desenvolvimento de materiais adsorventes simples e de baixo custo, que possam combinar características ecologicamente satisfatórias com maiores capacidades de adsorção.

Além de suas propriedades elétricas peculiares, os polímeros intrinsecamente condutores geralmente apresentam boa estabilidade química e um rico comportamento redox. Alguns deles exibem uma forte afinidade por diferentes biomoléculas, por conta dessas características físico-químicas favoráveis encontraram uso em uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, como em sistemas de liberação controlada de drogas e procedimentos de regeneração de tecidos, ou como materiais ativos em dispositivos de biossensores, moduladores da atividade celular, e sondas neurais (Guimard, Gomez et al. 2007). Entre esses polímeros especiais, a polianilina (Pani) merece atenção especial por sua síntese simples e barata, e pelo fato de que a carga líquida de suas cadeias conjugadas pode ser controlada pela variação do pH do meio (Ray, Asturias et al. 1989, Jing, Wang et al. 2005). Em seu estado base esmeraldina (isolante), as cadeias de Pani podem ser protonadas por ácidos fortes (Brønsted, por exemplo), de modo que até metade dos átomos de nitrogênio ao longo do esqueleto do polímero se tornam positivamente carregados, resultando no estado de sal esmeraldina (condutor) - o equilíbrio geral de carga sendo atingido pela atração dos contra-íons negativos dissolvidos (Ray, Asturias et al. 1989). A protonação da cadeia polimérica tem um caráter reversível, de modo que, uma vez restauradas as condições de pH neutro, os átomos de nitrogênio ao longo da cadeia polimérica perdem sua carga e Pani retorna ao estado base esmeraldina. Estas

características particularmente úteis tornam atrativo o desenvolvimento de materiais adsorventes em fase sólida que contenham Pani.

Considerando isso, neste capítulo trabalho descrevemos a síntese e uma caracterização mais completa de um nanocompósito magnético híbrido composto por nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) revestida com Pani, e seu uso em um novo, prático e eficiente protocolo de extração e purificação de pDNA. Ao melhor do nosso conhecimento, o uso de polímeros condutores para a extração e purificação de pDNA de soluções bacterianas não foi ainda discutido na literatura. Este trabalho representa mais um passo no esforço contínuo de nosso grupo no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos magnéticos eficientes para a purificação de ácidos nucleicos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

Persulfato de amônia (APS), e ampicilina foram obtidos da Sigma-Aldrich (*Estados Unidos*). Os reagentes dodecil sulfato de sódio (SDS), tris(hidroximetil) aminometano (THAM), glicina, ribonuclease A (RNase), agarose, e Tris-Acetato-EDTA (TAE) 40X, bem como o corante ácido nucleico Diamond TM e corante de carregamento Blue/Orange, foram adquiridos da Promega (*Estados Unidos*). Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), ácido acético glacial (CH_3COOH), álcool metílico (CH_3OH) e o álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) foram adquiridos da Química Moderna (*Brasil*). O fosfato monossódico (NaH_2PO_4), fosfato dissódico (Na_2HPO_4) e anilina ($\text{C}_6\text{H}_7\text{N}$) da Nuclear (*Brasil*). Acetato de potássio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$) e meio de cultura Luria-Bertani foram obtidos das empresas Vetec (*Estados Unidos*), AppliChem (*Alemanha*) e Kasvi (*Brasil*), respectivamente. A estirpe DH5 α de *E. coli* com o vector plasmídeo pUC19 foi adquirida a partir do repositório de plasmídeos Addgene (*Estados Unidos*). Todos os reagentes foram de grau analítico ou molecular, sendo usados como comprados, exceto a anilina, que foi submetida a um processo de destilação a vácuo antes do uso. Em todos os experimentos, utilizamos água ultrapura (18 M Ω /cm) obtida após o tratamento com um sistema Synergy (*Millipore, Estados Unidos*).

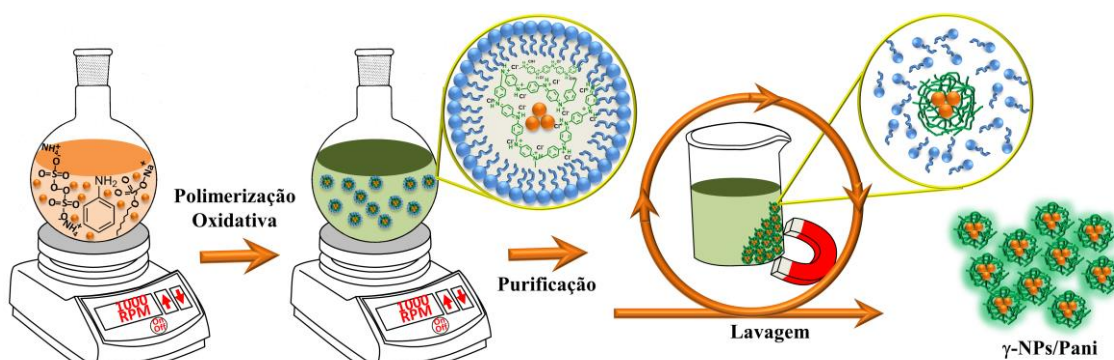
5.2.2 Síntese do nanocompósito polianilina e maghemita (γ – NPs/Pani)

Para o revestimento das γ -NPs com o polímero condutor Pani, escolhemos o método químico de polimerização por emulsão da anilina (Kim, Oh et al. 2001,

Palaniappan and John 2008). Este método é bastante utilizado devido ao fato de ser simples e pode ser realizado em meio aquoso, além de oferecer flexibilidade para a síntese que pode ser adaptada de acordo com o interesse e limitações experimentais, como o uso de diferentes meios ácidos, agentes oxidantes e surfactantes, entre outros (Haghanifar, Pishvaei et al. 2013).

Em um balão de 250 mL de fundo redondo foram adicionados 100 mL de HCl com 0,1 M, colocado então sob agitação magnética. Em seguida, 2,1 g de SDS e 60 mg de γ -NPs foram consecutivamente dispersos na solução de HCl do balão, e deixados 5 min em agitação. Posteriormente, 136,8 μ L do monômero de anilina foram adicionados e mantidos em agitação por 15 min. Após este período, 40 mg de APS foram dissolvidos em 20 mL de HCl (0,1 M) e cuidadosamente adicionados à reação, que permaneceu sob agitação por 24 h para uma completa polimerização da anilina. Terminada a polimerização, a solução foi transferida para um béquer de 250 mL, sendo em seguida acrescentados 130 mL de álcool metílico para que ocorresse a precipitação do γ -NPs/Pani. Após esta primeira precipitação, o material resultante foi lavado mais 2 vezes com álcool metílico e 3 vezes com água ultrapura. Neste processo de lavagem utilizou-se um ímã para a decantação do material, eliminando qualquer parte não magnética durante a lavagem. Por fim, o γ -NPs/Pani foi deixado secar em uma capela com o exaustor ligado por 24 h, e em seguida pulverizado com almofariz. A Fig. 78 mostra esquematicamente os principais estágios da síntese do γ -NPs/Pani.

Figura 78 – Sequência esquemática da síntese do nanocompósito γ -NPs/Pani.



Fonte: O autor (2019)

5.2.3. Métodos de caracterização

5.2.3.1 Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível das γ -NPs e do γ -NPs/Pani foram obtidos em um espectrofotômetro *UV-2600 (Shimadzu, Japão)*, na faixa de 200 – 1200 nm e com resolução de 2 nm. O procedimento de preparação foi distinto para cada uma das amostras. Para as γ -NPs, dispersamos 1 mg do material em 3,5 mL de água ultrapura por 30 min em banho ultrassom. Enquanto para o γ -NPs/Pani, uma alíquota de 200 μ L foi retirada direto do balão de reação após 24 h de polimerização, sendo diluída em 3 mL de água ultrapura. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

5.2.3.2 Espectroscopia FTIR, microscopia MEV, e medidas magnéticas

Os procedimentos de preparação de amostras, equipamentos utilizados, e parâmetros adotados para as análises de espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, e medidas magnéticas foram apresentados anteriormente nas Seções 3.2.3.1, 3.2.3.2, e 3.2.3.3, respectivamente (ver Capítulo 3).

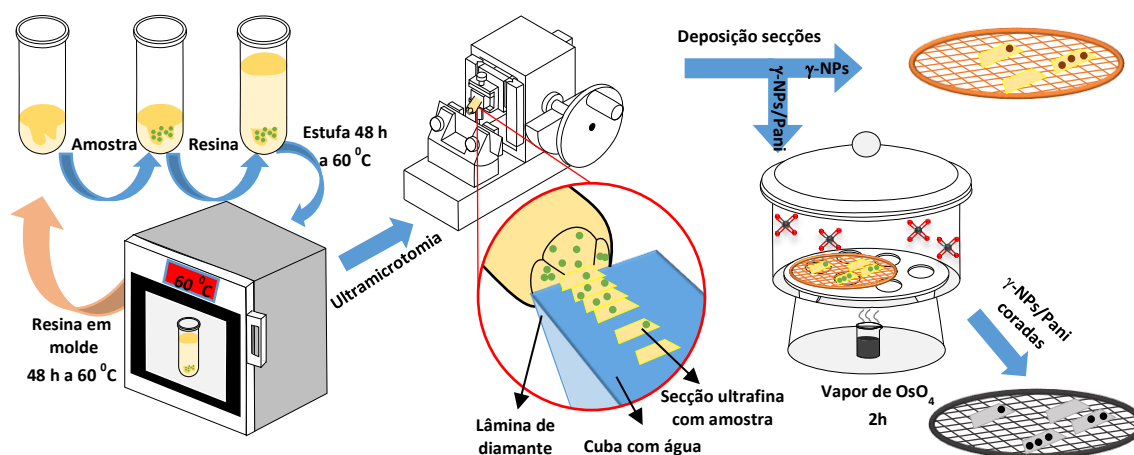
5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A técnica de MET foi usada para a determinação do tamanho de partículas e também para as análises morfológicas das γ -NPs e γ -NPs/Pani. O equipamento utilizado para a obtenção das micrografias foi um *Tecnai20 (FEI, Estados Unidos)*, com tensão de aceleração de 200 kV, disponível no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Devido ao fato de se tratar de partículas magnéticas, a preparação das amostras foi realizada através de inclusão em resina epóxi (EPON) no laboratório de preparação de amostras do CETENE. Basicamente, o protocolo correspondente considera várias etapas. Primeiramente, uma pequena quantidade de resina é colocada em um molde, que é levado a uma estufa por 48 horas em uma temperatura de cura de 60 °C. Posteriormente, uma pequena quantidade de amostra é espalhada sobre a superfície da resina curada, quando então é vertido um segundo volume de resina sobre a amostra (em uma estrutura tipo sanduíche), sendo o material resultante levado a um tratamento térmico. Após a cura, cortes ultrafinos com espessura de secção transversal inferior a 100 nm são realizados por ultramicrotomia com navalha de diamante. Por fim, os cortes

obtidos são transferidos para uma grade de transmissão, que no caso dos nossos materiais foi de cobre.

Para os γ -NPs/Pani foi preciso submeter as amostras a um processo de coloração da Pani, para que se pudesse diferenciar a camada polimérica do núcleo de maghemita durante as análises microscópicas. Para isso, os cortes ultrafinos já dispostos na grade de cobre, foram submetidos a vapor de tetróxido de ósmio (OsO_4) em solução com concentração de 100 mM por um período de 2 h. Todo o procedimento de preparação das amostras é ilustrado na Fig. 79.

Figura 79 – Procedimento de preparação das amostras (γ -NPs e γ -NPs/Pani) para MET.



Fonte: O autor (2019)

5.2.3.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para a determinação do tamanho médio do nanocompósito sintetizadas utilizamos a técnica de espalhamento dinâmico de luz DLS (do inglês *Dynamic Light Scattering*). As análises foram realizadas a partir de suspensões colidais de γ -NPs/Pani, usando um equipamento *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern, Reino Unido), com uma fonte de luz laser (633 nm), detectores a 90° do caminho ótico do laser, e condições ambientes. O preparo das amostras consistiu em retirar uma alíquota de 200 μL da solução de reação de polimerização dos γ -NPs/Pani direto do balão após 24 h, e após sua diluição em 3 mL de água ultrapura, as medidas foram tomadas.

5.2.4 Aplicação do nanocompósito γ -NPs/Pani para a captura de *E. coli* e purificação de pDNA

Nesta seção serão descritos os procedimentos experimentais adotados para a utilização do nanocompósito magnético γ -NPs/Pani para a captura de bactérias Gram-

negativas em meios aquosos, bem como o protocolo desenvolvido para a purificação de DNA plasmídeo. Primeiramente (Seção 5.2.4.1), serão apresentadas as metodologias utilizadas para a captura de *E. coli*, e posteriormente será apresentado o protocolo desenvolvido para a purificação de pDNA será detalhado (Seção 5.2.4.2).

5.2.4.1 Captura de *E. coli* em meios aquosos

5.2.4.1.1 Cultivo celular da *E. coli*

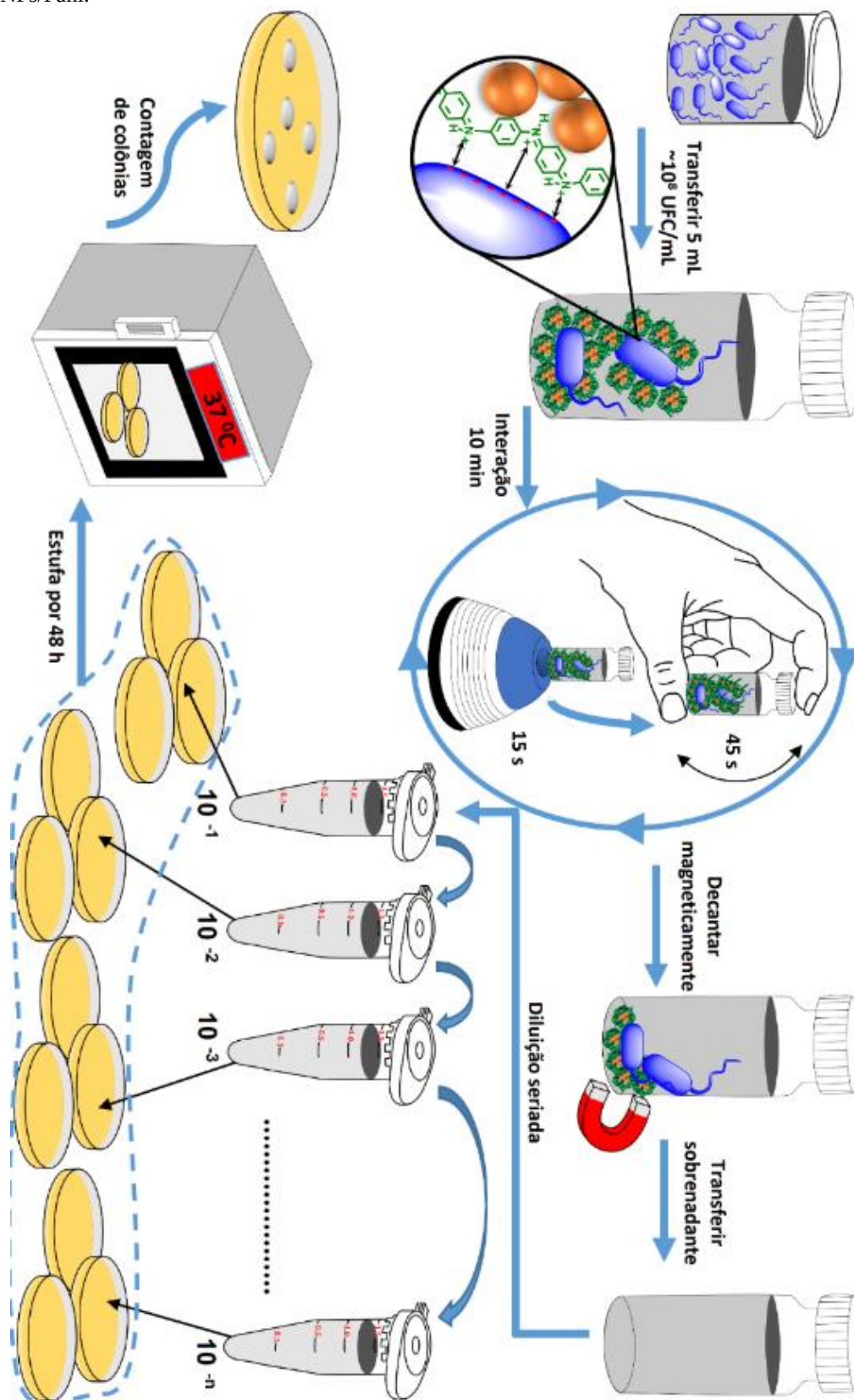
As amostras de *E. coli* utilizadas tanto para os experimentos de captura celular, como para os experimentos de purificação de pDNA foram obtidas a partir do protocolo de cultivo celular apresentado previamente na Seção 3.2.4.3.1 do Capítulo 3 desta tese.

5.2.4.1.2 Experimentos de captura de *E. coli*

O procedimento implementado para a captura bacteriana em solução aquosa foi desenvolvido com o intuito do uso do nanocompósito γ -NPs/Pani como agente de captura e concentração de microrganismos, seja no âmbito ambiental e de tratamento de água, assim como visando sua utilização em um procedimento que pudesse a vir substituir a centrifugação (formação de *pellet*) adotado em protocolos convencionais de purificação de amostras.

Para os experimentos, inicialmente uma suspensão de *E. coli* obtida de acordo com a seção anterior (5.2.4.1.1) foi ajustada para um valor de DO₆₀₀ de 0,2 de absorbância, e pH 4 pela adição de HCl 0.1 M. Em seguida, um volume de 5 mL foi transferido para frascos de vidros, contendo diferentes massas de nanocompósito γ -NPs/Pani (6,2 mg; 12,5 mg; 25 mg; 50 mg). A solução de *E. coli* e o γ -NPs/Pani foram deixados em interação por 10 min. Essa interação consistiu em submeter o frasco em agitação em vortex nos 15 s iniciais de cada minuto, que foi seguido de inversão manual pelos 45 s restantes de cada minuto. Após a interação, os γ -NPs/Pani foram decantados magneticamente e a suspensão de *E. coli* transferida para um frasco limpo. A partir das soluções transferidas, foram então realizadas diluições seriadas com razão 1:10, as quais foram semeadas em placas de petri com meio LB sólido, para obter a contagem de colônia. A contagem de colônia das amostras foi realizada 48 h após a inoculação, e somente placas com 20 – 250 colônias foram consideradas contáveis para serem utilizadas nos cálculos para a obtenção dos dados. Todo o experimento foi realizado em triplicata e acompanhado por DO₆₀₀. O experimento é representado de forma esquemática na Fig. 80.

Figura 80 – Representação esquemática do experimento de captura de *E. coli* em solução aquosa utilizando os γ -NPs/Pani.



Fonte: O autor (2019)

Nas condições nas quais a adsorção é realizada, a quantidade de células adsorvidas (capturadas) por unidade de massa dos γ -NPs/Pani para, chamada de q_t , foi estipulada segundo a relação (Esfandian, Jafari et al. 2012).

$$q_t = \frac{V(C_0 - C_{10})}{M_{\gamma\text{-NPs/Pani}}}, \quad (5.1)$$

onde V é o volume de solução utilizado, C_0 a concentração de células (UFC/mL) no tempo zero, C_{10} a concentração de células (UFC/mL) após 10 min de interação, e $M_{\gamma\text{-NPs/Pani}}$ a massa (g) de nanopartículas γ -NPs/Pani utilizada.

Os cálculos para determinar a concentração de células a partir dos dados obtidos pela contagem de placas das diluições seriadas foram realizados por meio da relação (Yousef and Carlstrom 2003).

$$UFC = N_c * 10 * 10^n, \quad (5.2)$$

onde N_c é o número de colônias, e n o número de diluições realizadas para a placa que se está contando.

5.2.4.2 Experimentos de purificação de pDNA

Apresentaremos nesta seção o protocolo desenvolvido para a utilização dos γ -NPs/Pani na purificação de pDNA de amostras de *E. coli*. Como mencionado anteriormente, para estes experimentos foi utilizada uma estirpe que possui o vetor plasmídeo pUC19, que é resistente à ampicilina. Isto se tornou necessário para que pudessemos ter um maior controle de possíveis contaminações da estirpe, e para que as análises de biologia molecular subsequentes de pureza e qualidade pudessem ser realizadas. O pUC19 tem toda sua sequência genômica muito bem descrita na literatura, sendo bastante usado em sistemas modelo (Kieleczawa 2005). O protocolo desenvolvido para o uso dos γ -NPs/Pani consiste em duas etapas principais, sendo a primeira referente à lise celular, que será abordada na Seção 5.2.4.2.1, e a segunda (Seção 5.2.4.2.2) voltada especificamente para a purificação em si do pDNA.

5.2.4.2.1 Protocolo de lise celular

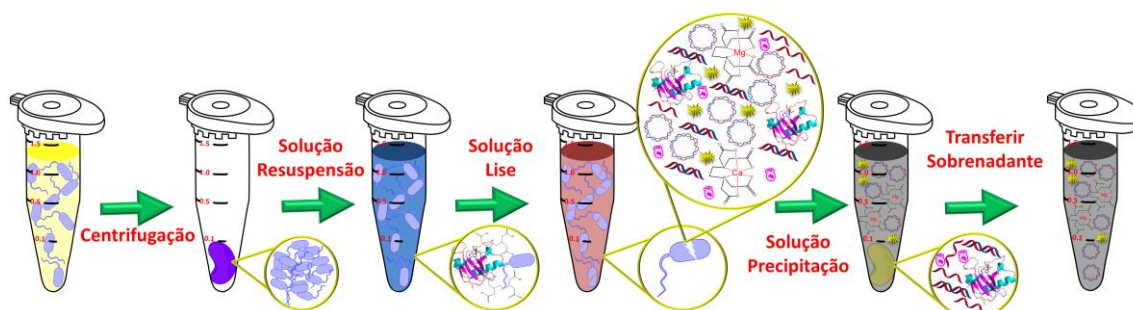
As amostras de *E. coli* utilizadas foram obtidas conforme o protocolo de cultivo celular descrito anteriormente (ver Seção 3.2.4.3.1, Capítulo 3), ajustando a absorbância da suspensão para 0,5 no comprimento de onda de 600 nm. Deste modo, pode-se assumir

que a concentração de células em solução é da ordem de 10^8 UFC/mL. O protocolo utilizado foi o de lise alcalina, no qual uma série de soluções são empregadas (Casali and Preston 2003). Como já informado em seções anteriores, a descrição de todas as soluções e de seus modos de preparação é feito no Apêndice B, sendo aqui apenas apresentado o protocolo em si, que foi executado da seguinte forma:

- Transferiu-se 5 mL da solução de suspensão de *E. coli* para um tubo falcon de 15 mL.
- Foi realizada a centrifugação do tubo por 10 min a 10.000 rpm, até a formação do *pellet* na parte inferior do tubo, e descartado o sobrenadante.
- Adicionou-se 250 μ L da solução de resuspensão (Tris-EDTA-Rnase) no tubo falcon e o mesmo foi agitado em vortex por 30 s.
- Transferiu-se a resuspensão para um microtubo com capacidade de 2 mL.
- Foram acrescidos 250 μ L da solução de lise (NaOH-SDS) ao microtubo.
- Inverte-se gentilmente o microtubo por 4 vezes, que foi deixado em repouso por um período de 4 min.
- Adiciona-se 350 μ L da solução de precipitação (CH_3COOK -Ác. acético) ao microtubo e realiza-se a inversão do microtubo por 4 vezes.
- Centrifuga-se o microtubo por 10 min a 14.000 rpm.
- O sobrenadante (~ 700 μ L) foi transferido para um microtubo limpo.

Ao final deste protocolo, o pDNA lisado obtido foi utilizado na etapa seguinte de purificação com o nanocompósito γ -NPs/Pani. Uma representação esquemática do protocolo de lise alcalina adotado é apresentada na Fig. 81.

Figura 81 – Esquema representativo das principais etapas do protocolo de lise alcalina celular para bactérias Gram-negativas.



Fonte: O autor (2019)

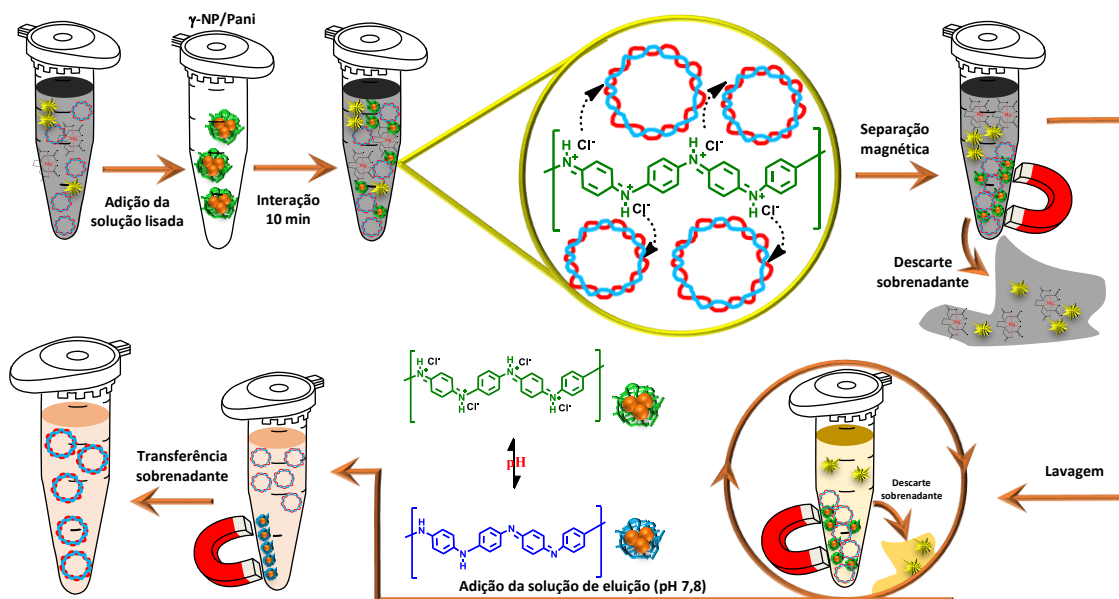
5.2.4.2.1 Protocolo de purificação de pDNA

O procedimento de purificação de pDNA por nós elaborado para a utilização dos γ -NPs/Pani como adsorventes é apresentado a seguir.

1. Em um microtubo de 2 mL contendo 4 mg de nanocompósito (desdopado), foram adicionados 250 μ L de solução de ativação (Glicina-HCl-NaCl).
 - Agitou-se o microtubo em vortex por 10 s.
 - Separou-se o nanocompósito com o auxílio de um ímã, sendo a solução descartada.
2. Repetiu-se o procedimento do item 1 por uma segunda vez.
3. Foram adicionados 600 μ L da solução contendo o DNA de *E. coli* obtido no procedimento de lise (ver Seção 4.2.4.2.1).
4. Deixou-se a solução interagir por 10 min sob agitação, com o microtubo sendo submetido a vortex nos primeiros 15 s de cada minuto, o que foi seguido de inversões sucessivas do mesmo até o próximo minuto.
5. O nanocompósito foi separado com o auxílio de um ímã, e se descartou a solução do microtubo.
6. Adicionou-se 250 μ L de solução de lavagem (CH_3COOK – Tris – EDTA – Etanol).
 - O microtubo foi agitado em vortex por 10 s.
 - Separou-se o nanocompósito com o auxílio de um ímã, e foi realizado o descarte da solução.
7. Repetiu-se o procedimento do item 6 por mais 2 vezes consecutivas.
8. Adicionou-se 100 μ L de solução de eluição (fosfato/fosfato).
 - Deixou-se a solução interagir sob agitação por 5 min do mesmo modo que no item 4.
 - O nanocompósito foi confinado com o auxílio de um ímã.
9. Por fim, transferiu-se a solução para um microtubo esterilizado.

Na Fig. 82 apresentamos de forma esquemática os principais passos do protocolo de purificação magnética desenvolvido para os nanocompósitos γ -NPs/Pani.

Figura 82 – Esquema ilustrativo das etapas do protocolo de purificação de pDNA utilizando os γ -NPs/Pani como adsorvente.



Fonte: O autor (2019)

Ao fim deste processo de purificação, três diferentes análises de biologia molecular foram realizadas com as amostras. A primeira foi relativa ao rendimento, através da quantificação do pDNA com espectroscopia UV-Visível (pelo uso de um espectrofotômetro *Nanodrop*, *Thermo Fisher*, *Estados Unidos*) no comprimento de onda de absorção característico dos ácidos nucleicos ($\lambda = 260 \text{ nm}$). A segunda, que foi relacionada com a pureza e o tamanho dos fragmentos (pares de bases, pb), onde se utilizou a técnica de eletroforese em gel de agarose. Por fim, uma última que consistiu na amplificação do pDNA pela técnica PCR, onde se visou a verificação da qualidade do pDNA purificado para sua utilização em técnicas padrão de biologia molecular. A metodologia adotada para a técnica de eletroforese foi previamente apresentada no Capítulo 3 (ver Seção 3.2.4.2.4.1). Já o protocolo de PCR aqui utilizado foi a técnica convencional, a qual por envolver várias etapas e reagentes, como será apresentada na próxima seção.

5.2.4.2.3 Protocolo de PCR convencional

A técnica de PCR foi empregada para que pudessemos avaliar a qualidade do pDNA obtido pelo método de purificação por nós proposto. Vale lembrar que além de ser de uso de rotina em biologia molecular, essa técnica é um procedimento muito susceptível à contaminação e agentes inibidores da reação da polimerase (Pelt-Verkuil, Belkum et al. 2008). Como meio de comparação do rendimento da amplificação PCR,

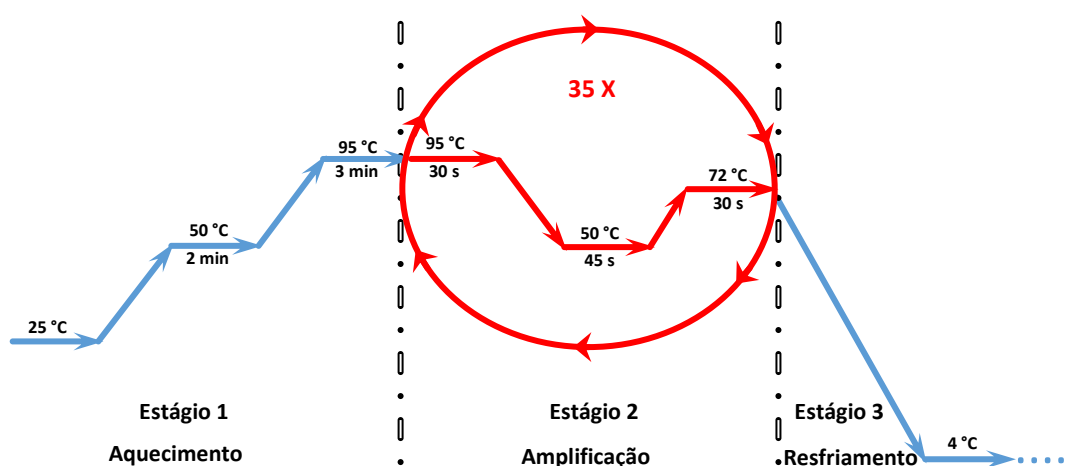
utilizamos um kit comercial (*Wizard Plus SV Minipreps, Promega, Estados Unidos*) de purificação de pDNA. As amostras de pDNA purificadas com o kit comercial foram obtidas a partir das mesmas condições de cultivo e concentração de células realizados para o protocolo dos γ -NPs/Pani (ver Seção 3.2.4.3.1). A amplificação foi realizada em um termociclador *StepOnePlus (Applied Biosystems, Estados Unidos)*. O conjunto de primers utilizado foi o M13/pUC, que é padrão para o pUC19. Eles foram adquiridos comercialmente (*Invitrogen, Estados Unidos*), e suas sequências são mostradas no protocolo a seguir, que descreve o procedimento de preparação da mastermix (solução de reação PCR).

- Em um microtubo com capacidade para 500 μ L foram adicionados 129,6 μ L de água livre de RNase (*Promega, Estados Unidos*).
- Adicionou-se 20 μ L da solução tampão 10X PCR Buffer (*Invitrogen, Estados Unidos*).
- Adicionou-se 20 μ L da solução tampão com dNTP's (*Gold Star 10X buffer, Promega, Estados Unidos*), de maneira que sua concentração final foi de 0,2 mM no volume total da mastermix.
- Adicionou-se 6 μ L da solução tampão de cloreto de magnésio (50mM $MgCl_2$, *Invitrogen, Estados Unidos*), de modo que no volume total da mastermix a concentração foi de 1,5 mM.
- Adicionou-se 1 μ L da proteína Taq polimerase (*Platinum® Taq DNA Polimerase, Invitrogen, Estados Unidos*).
- Foram acrescidos 4 μ L do primer sentido M13/pUC Forward (5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3'), com concentração de 10 pmol.
- Foram acrescidos 4 μ L do primer anti-sentido M13/pUC Reverse (5'-GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G-3'), com concentração de 10 pmol.
- O microtubo foi agitado em vortex por 10 s.
- Foram transferidos 23,5 μ L da solução mastermix para 8 diferentes poços de uma placa de ampliação PCR.
- Foram adicionados 1,5 μ L de água livre de RNase em 2 poços, para controle negativo.
- Foram adicionados 1,5 μ L das amostras de pDNA purificadas com os γ -NPs/Pani nos 6 poços restantes.

O mesmo protocolo de preparação foi seguido para a preparação da mastermix das amostras de pDNA purificado com o kit comercial. As condições de ciclagem empregadas para a realização da amplificação são listadas abaixo e podem ser visualizadas de modo diagramático na Fig. 83:

- I. 50 °C por 2 min.
- II. 95 °C por 3 min.
- III. 35 ciclos sequenciais de 95 °C por 30 s, 50 °C por 45 s, 72 °C por 30 s.
- IV. Arrefecimento a 4 °C.

Figura 83 – Diagrama do procedimento executado para a amplificação por reação em cadeia da polimerase para as amostras de pDNA purificadas com o γ -NPs/Pani e com o kit comercial.



Fonte: O autor (2019)

Posteriormente, as amostras foram purificadas utilizando o kit QIAquick PCR (Qiagen, Estados Unidos), e, em seguida, realizamos análises de espectrofotometria ($\lambda=260$ nm) e eletroforese para verificar o rendimento, a qualidade, e o tamanho dos amplicons gerados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 Síntese do nanocompósito γ -NPs/Pani

Como discutido anteriormente, a síntese do nanocompósito γ -NPs/Pani ocorreu em ambiente aquoso e ácido contendo uma suspensão de γ -NPs, e utilizando concentrações de surfactantes (neste caso o SDS) acima da concentração micelar crítica. Nestas condições, e sob severa agitação, tanto os monômeros de anilina como as γ -NPs

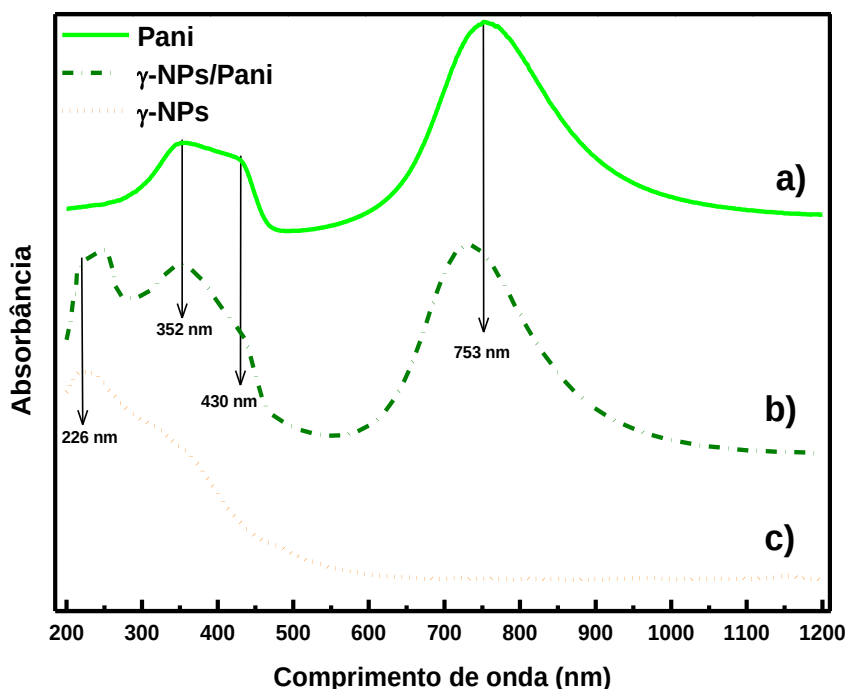
tendem a migrar para o interior das micelas, criando um ambiente reativo reduzido, o que após a adição do oxidante (APS) melhora a polimerização da Pani, assim como a interação da mesma com as γ -NPs, e consequentemente a adesão do polímero na superfície da partícula (Medina-Llamas 2015). Ao fim da reação, metanol é adicionado à solução para que aconteça a quebra das micelas, permitindo a precipitação do material e sua purificação, que é realizada por meio de repetidas lavagens com água deionizada.

5.3.1.1 Caracterizações

5.3.1.1.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Utilizamos a espectroscopia na região do ultravioleta-visível para identificar se as γ -NPs/Pani não degradaram (dissolveram) por terem sido submetidas ao ambiente ácido durante a tentativa de revesti-las com o polímero polianilina, assim como para determinar se houve a formação do polímero como resultado da síntese oxidativa da anilina. Na Fig. 84 são mostrados os espectros de absorção para a Pani (a), para o nanocompósito γ -NPs/Pani (b), e para as γ -NPs (c). Para o caso da Pani pura (a), podemos observar três bandas, em 352 nm, 430 nm e 753 nm, que são características da Pani em seu estado condutor sal esmeraldina, como relatado na literatura (Yang, Du et al. 2009, Khan, Aldwayyan et al. 2010, Kuczynska, Uygun et al. 2010). A primeira banda em 352 nm se deve às transições π - π^* dos anéis benzenóides, enquanto as outras duas (430 nm, e 753 nm) são atribuídas às transições polarón- π^* e π -polarón dos anéis quinoides (Dallas, Moutis et al. 2006, Dennany, Innis et al. 2011). Já para as γ -NPs (c), como discutido no Apêndice A, foram encontradas as bandas de transições entre o Fe^{3+} e o oxigênio, e as de transições eletrônicas do Fe^{3+} . Porém, devido a efeitos de escala, aqui só foi destacada a banda de 226 nm (Fe-O), de modo a permitir uma melhor comparação.

Figura 84 – Espectros UV-Vis da Pani (a), do nanocompósito γ -NPs/Pani (b), e da γ -NPs (c).



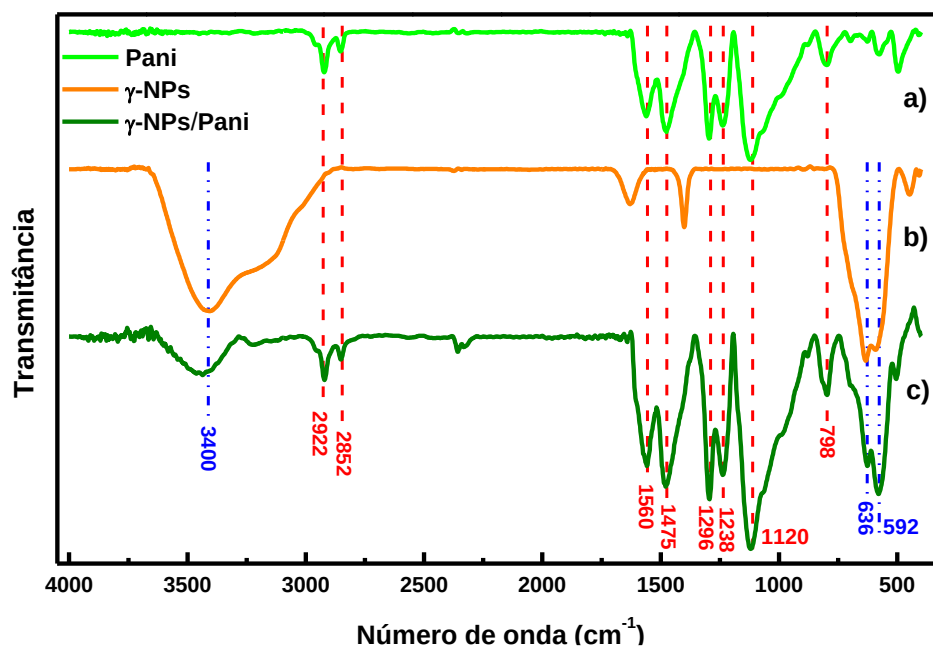
Fonte: O autor (2019)

Por último, ao analisarmos o espectro do nanocompósito γ -NPs/Pani (b), podemos constatar que o mesmo apresentou bandas pertencentes tanto ao óxido de ferro (226 nm e 253 nm), como à Pani em sua forma condutora (352 nm, 430 nm, e 733 nm). Dessa maneira, pudemos concluir que conseguimos polimerizar com sucesso a Pani por meio da síntese oxidativa, e que as γ -NPs não se degradaram durante o processo de síntese.

5.3.1.1.2 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Como os espectros UV-Vis da Pani e dos γ -NPs/Pani foram obtidos de amostras retiradas direto do balão de síntese, sem passar pelo processo de purificação para a retirada do material não magnético, não foi possível afirmar que a γ -NPs foi realmente revestida com Pani. Desse modo, após realizarmos a purificação e secarmos as amostras em estufa, obtivemos um pó fino de cor verde muito escura e bastante magnético, o que nos mostrou que de alguma maneira as γ -NPs foram revestidas com Pani (isso foi também comprovado por MET, como será discutido posteriormente). Uma vez obtidas essas amostras, utilizamos a espectroscopia de infravermelho para confirmar se a incorporação da Pani nas γ -NPs de fato teria ocorrido. Os espectros da Pani pura (a), das γ -NPs (b), e do nanocompósito γ -NPs/Pani (c) são apresentados na Fig. 85 abaixo.

Figura 85 – Espectros infravermelho da polianilina (a), γ -NPs (b), e do nanocompósito γ -NPs/Pani (c)



Fonte: O autor (2019)

Ao examinarmos o espectro da Pani, podemos observar a presença de oito picos típicos da forma condutora da polianilina (Deng, He et al. 2003, Hsieh, Ho et al. 2010, Alves, Felix et al. 2012), o que está de acordo com os resultados da espectroscopia UV-Vis. Os picos que aparecem em 2922 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} são atribuídos, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico do $-\text{CH}_2-$ [56], o de 1560 cm^{-1} é referente ao estiramento dos anéis quinóides, o de 1475 cm^{-1} se deve ao estiramento dos anéis benzenóides (Khan, Aldwayyan et al. 2010), os de 1296 cm^{-1} e 1238 cm^{-1} são pertencentes ao estiramento C-N que caracteriza o estado condutor da polianilina (Kuczynska, Uygun et al. 2010), o de 1120 cm^{-1} é originado da vibração da ligação C-H no anel, e por último, o pico em 798 cm^{-1} é pertinente à deformação do C-H do anel fora do plano (Jiang, Li et al. 2008). No caso do espectro das γ -NPs tratado no Apêndice A, podem ser identificados os picos de absorção em 592 cm^{-1} e 636 cm^{-1} pertinentes ao estiramento Fe-O, e um em 3400 cm^{-1} , que está associado a hidroxilas da água adsorvida na superfície das partículas.

Já no espectro do nanocompósito γ -NPs/Pani, observamos os picos em (580, 626, 796, 1118, 1238, 1294, 1479, 1558, 2852, 2920, e 3435 cm^{-1}), que mostram claramente a presença da Pani em sua fase sal de esmeraldina e das γ -NPs, confirmando que de fato incorporamos a Pani nas nanopartículas de maghemita. Para uma melhor comparação, na Tabela 11 apresentamos os picos de absorção dos espectros da Fig. 85, com seus respectivos modos de vibração.

Tabela 11 – Comparação da posição em cm^{-1} entre os picos de absorção IR obtidos para a Pani, γ -NP, e o nanocompósito γ -NPs/Pani.

Vibração-Ligação	γ -NPs	Pani	γ -NPs/Pani
ν -Fe-O	592 – 636	-	580 - 626
δ -C-H	-	798	796
ν -C-H	-	1120	1118
ν -C-N	-	1238 - 1296	1238 – 1294
ν -N-B-N	-	1475	1479
ν -N=Q=N	-	1560	1558
ν_{as} -CH ₂ -	-	2852	2852
ν_{s} -CH ₂ -	-	2922	2920
ν -O-H	3400	-	3435

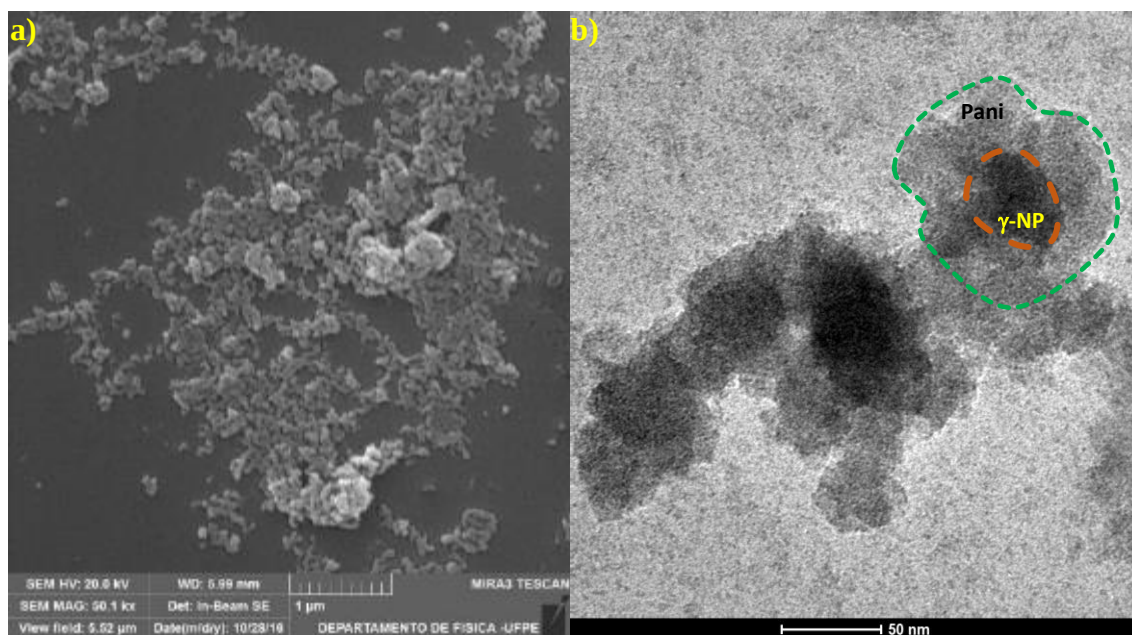
Fonte: O autor (2019)

5.3.1.1.3 Microscopia eletrônica: Varredura e Transmissão (MEV, MET)

Posteriormente à confirmação da incorporação da Pani nas γ -NPs, utilizamos as microscopias de varredura (a) e transmissão (b) (Fig 86) para estudar como ocorreu esta incorporação e a morfologia das amostras resultantes.

Por micrografia de varredura, vemos que o nanocompósito γ -NPs/Pani apresenta dimensões nanométricas, com suas partículas tendendo a se aglomerar, o que pode estar associado a uma alta energia de superfície, e elevada área superficial (Raichman, Kazakevich et al. 2006). Já a partir do MET, conseguimos observar duas regiões, que estão destacadas em (b); uma central e mais escura (traço laranja), conferida às γ -NPs pelo elevado número atômico do ferro (Z) em relação ao polímero, e a segunda (traço verde), mais clara e que envolve toda a primeira, atribuída à Pani. Deste modo, por meio da microscopia eletrônica confirmamos que, através da síntese micelar, de fato recobrimos as γ -NPs com uma camada de Pani (ver Seção 5.3.1), confirmando assim as conclusões obtidas a partir da análise dos espectros de UV-Vis e FTIR.

Figura 86 – Micrografias do nanocompósito γ -NPs/Pani obtidas por MEV (a), e TEM (b).



Fonte: O autor (2019)

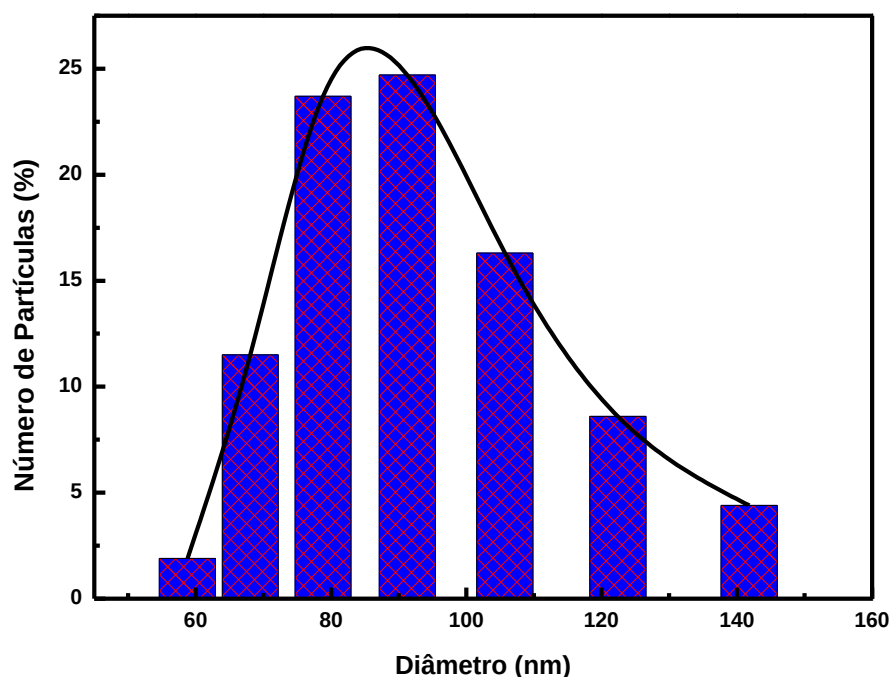
5.3.1.1.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Uma vez comprovado o revestimento das γ -NPs (como estabelecido nas seções anteriores), procuramos obter uma estimativa do tamanho dos nanocompósitos γ -NPs/Pani. Porém, diferentemente do que foi realizado para as γ -NPs, a microscopia de varredura não apresentou resultados conclusivos, pelo fato do nanocompósito γ -NPs/Pani se agregar (ver Fig. 86). Além disso, mesmo tendo conseguido micrografias por MET, devido à grande dificuldade de acesso ao equipamento para obtê-las, e também a complexidade de preparação de amostras requerida, poucas imagens foram adquiridas, o que não nos permitiu realizar uma estatística confiável do tamanho médio do γ -NPs/Pani.

Deste modo, uma maneira alternativa para se estimar o tamanho médio foi utilizar a técnica de DLS. Para que não tivéssemos o problema com a agregação, as amostras para tais medidas foram retiradas direto do balão de síntese após a polimerização. Adotando este passo, conseguimos evitar a aglomeração, uma vez que, como discutido na Seção 5.3.1, utilizamos uma síntese micelar, e nestas condições o nanocompósito está no interior das micelas, garantindo tanto a não aglomeração entre os γ -NPs/Pani, como uma suspensão coloidal estável necessária para se realizar as medidas. Na Fig. 87 é mostrado o histograma para os nanocompósitos γ -NPs/Pani, que revela uma distribuição de

tamanhos entre 60 – 140 nm, com tamanho médio de $(95,2 \pm 29,9)$ nm, o que é coerente com o observado na Fig. 86b.

Figura 87 – Histograma de distribuição de tamanho de partículas do nanocompósito γ -NPs/Pani obtido por DLS.



Fonte: O autor (2019)

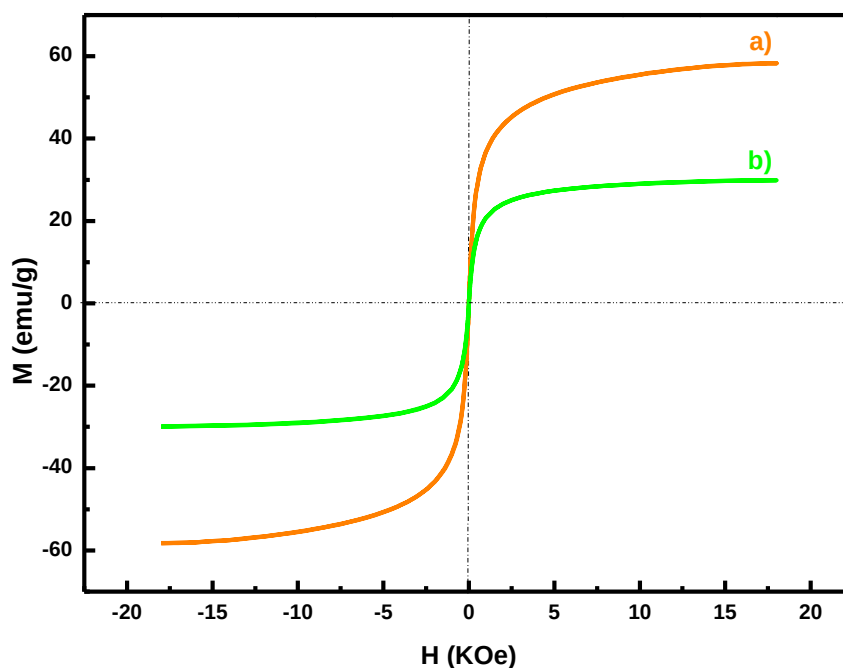
5.3.1.1.5 Propriedades magnéticas

Assim como no caso das γ -NPs (ver Apêndice A), realizamos medidas de magnetização do γ -NPs/Pani para que pudéssemos avaliar sua resposta magnética, posto que esta propriedade é de importância primária para a utilização do nanocompósito como adsorvente para captura bacteriana e purificação de pDNA, uma propriedade que deve ser explorada como uma maneira de fácil separação e concentração do γ -NPs/Pani.

Na Fig. 88 são apresentadas as curvas de magnetização em função do campo aplicado (298K) para as γ -NPs (a), e para o γ -NPs/Pani (b). Como discutido no Apêndice A, a curva das γ -NPs (aqui inserida apenas para comparação), apresentou um valor de magnetização de saturação de 58,26 emu/g. Logo, o γ -NPs/Pani mostrou uma M_s de 29,92 emu/g, valor que é de aproximadamente 48% da obtida para as γ -NPs. Esta redução da M_s para o γ -NPs/Pani tem origem no fato de que, para este tipo de medida, a massa da amostra é levada em consideração (Medina-Llamas 2015). Assim, como as partículas estão revestidas com a Pani, que não tem resposta magnética, há uma menor quantidade

de γ -NPs nas amostras de γ -NPs/Pani, sendo que uma mesma massa foi utilizada para as medidas de ambas as amostras. Ainda sobre isto, vale evidenciar que, mesmo existindo esta diferença, o nanocompósito permaneceu com uma intensa resposta ao campo magnético.

Figura 88 – Curva de magnetização da γ -NP (a), e do nanocompósito γ -NP/Pani (b) em função do campo externo aplicado.



Fonte: O autor (2019)

5.3.2 Aplicação do nanocompósito γ -NPs/Pani para a captura de *E. coli* e purificação de pDNA

Nesta seção apresentamos e discutimos os resultados referentes à utilização do γ -NPs/Pani para a captura de microrganismos (*E. coli*) em soluções aquosas, assim como em um protocolo de purificação de pDNA. Para isso, esta seção será dividida em duas subseções, onde a primeira (Seção 5.3.2.1) estará dedicada à parte de captura de microrganismos, e a segunda (Seção 5.3.2.2) à purificação de DNA plasmídeo.

5.3.2.1 Uso do nanocompósito γ -NPs/Pani na captura de *E. coli* em meios aquosos

Como já mencionado anteriormente, utilizamos o γ -NPs/Pani como um agente adsorvente para a captura e concentração de *E. coli*, com a finalidade, por exemplo, do mesmo substituir o estágio de centrifugação necessário em protocolos convencionais de

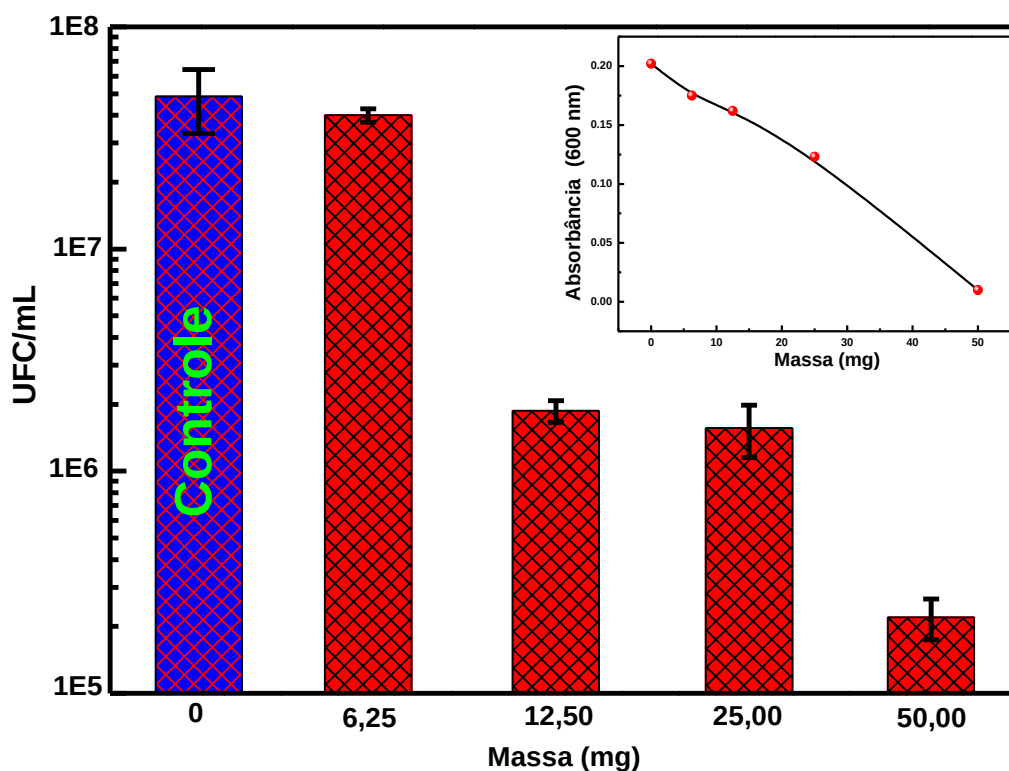
purificação de DNA a partir de células bacterianas, ou como agente para aplicações em remediação ambiental. A principal vantagem em se utilizar o γ -NPs/Pani é sua praticidade, pois bastariam poucos minutos de interação, seguidos da aplicação de um campo magnético, para se concentrar as células. Isso seria de grande vantagem quando de atendimentos em pontos primários para coletas e/ou diagnósticos, onde não se dispõem de um mais variado aparato laboratorial. Um grande exemplo pode ser dado se pensarmos em coletas de urina para a identificação de infecção urinária em regiões remotas, em que os agentes dispõem de poucos recursos e espaço físico. Nessas condições, em vez de se realizar a coleta tradicional, em que é necessário recolher um volume de 10-30 mL de cada paciente (Anjos 2012, Unifesp 2014), que precisa ser acondicionado e transportado para o laboratório, poderia ser utilizado o γ -NPs/Pani (algumas mg) para capturar as células bacterianas, e só depois desse procedimento as amostras passariam a ser armazenadas em microtubos, aumentando substancialmente o número de coletas possíveis de serem realizadas e transportadas por uma mesma unidade.

A escolha da *E. coli* como sistema modelo não foi exclusivamente pelo maior controle de cultivo, mais também por ser ela amplamente utilizada como tal. Além disso, a estirpe escolhida tem seu sequenciamento genético muito bem reportado na literatura, como já tratado anteriormente, e a *E. coli* é o principal agente infeccioso em infecções urinárias (Neto 2003, Rané and Dasgupta 2013, Freitas, Resende et al. 2016). Por fim, temos de que o monitoramento da *E. coli* no tratamento de água potável é essencial para determinar a presença de coliformes fecais (FUNASA 2004). Tal como no caso da infecção urinária, o método de identificação de coliformes atualmente utilizado pelos órgãos de saúde ainda é por cultura em placa, que demandam no mínimo 24 h para o diagnóstico, e é susceptível à concentração inicial da amostra colhida (FUNASA 2004). Esse intervalo de resposta pode levar a um grande problema de saúde pública.

Com os pontos acima argumentados em mente, realizamos os experimentos de captura em um sistema aquoso controlado (como foi apresentado na Seção 5.2.4.1.2), para verificarmos se o γ -NPs/Pani era realmente capaz de capturar *E. coli*. Os resultados de captura são apresentados na Fig. 89, que mostra a concentração de células bacterianas em função das diferentes massas de γ -NPs/Pani utilizadas para captura. Como pode-se observar, a quantidade de UFC diminui de forma significativa de acordo com o aumento da massa de γ -NPs/Pani utilizada, passando de uma concentração inicial (controle) com ordem de grandeza de 10^7 para 10^5 com 50 mg do γ -NPs/Pani. Essa redução foi também

acompanhada por D_{600} (detalhe da Fig. 89), o que, como vemos, corrobora o resultado da contagem de placas. Mediante tais resultados, pudemos constatar que o uso do γ -NPs/Pani é de fato apropriado para a captura de *E. coli* em meio aquoso, como esperávamos.

Figura 89 – Contagem em placa de unidades formadoras de colônias (UFC) em função da massa de γ -NPs/Pani utilizada para a captura. No detalhe, a densidade ótica (600 nm) das suspensões de *E. coli* após 10 min de interação com as diferentes massas de γ -NPs/Pani.



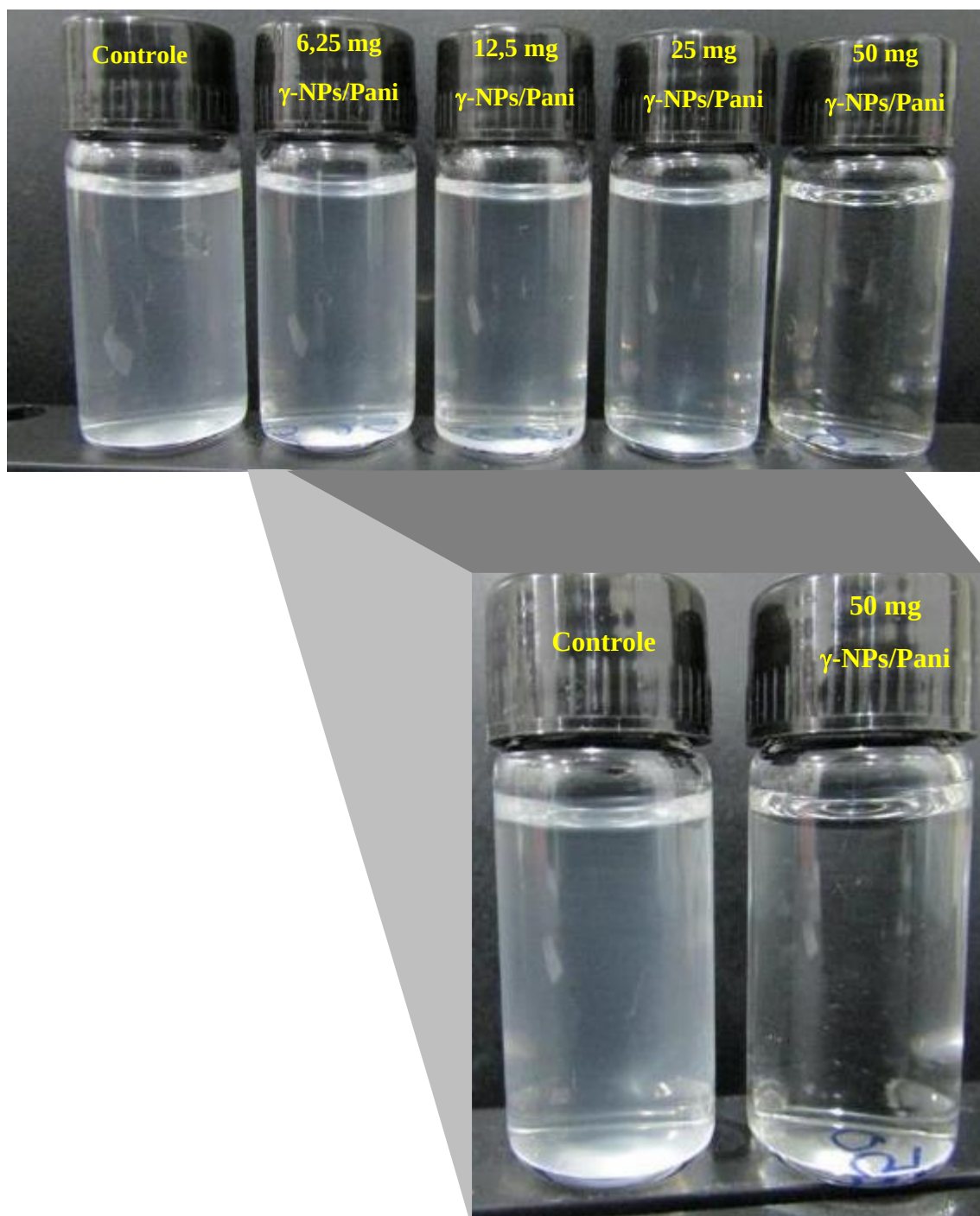
Fonte: O autor (2019)

A partir dos dados de concentração (UFC), pelo uso da Eq. 5.1 estimamos como sendo de $(10,04 \pm 6,11) \cdot 10^6$ UFC/mg a quantidade de células adsorvidas por mg de γ -NPs/Pani (q_t) para as condições de captura. Nas buscas realizadas na literatura até o presente momento, não encontramos nenhum relato da utilização de polímeros condutores, em especial a Pani, para a captura de microrganismos. Já para γ -NPs, encontramos inúmeros sistemas, nos quais em sua maioria as γ -NPs são revestidas com polieletrólitos para a captura por interação eletrostática através de grupos carboxílicos e aminos (Jin, Liu et al. 2014), anticorpos e antibióticos para captura específica de vírus e bactérias (Gu, Ho et al. 2003, Pal and Alocilja 2009, SHIELDS, HAHN et al. 2012, Chen, Razavi et al. 2013, Sung, Suk et al. 2013), grafeno (Zhan, Zhu et al. 2015), e sistemas conjugados de antibióticos e fluoróforo (vancomicina+fluoresceína) para detecção (Gao,

Li et al. 2006, Chitra and Annadurai 2014, Bohara and Pawar 2015). Ao compararmos a eficiência de captura destes sistemas com o de γ -NPs/Pani, observamos que muitos se mostram mais efetivos, variando de 20 - 98% com concentrações de 0.1 a 2 mg/mL de adsorvente. Deve ser levado em conta, porém, que esses casos se referem a sistemas diferentes, e que os apresentados resultados que são ainda iniciais. De fato, o nosso protocolo de captura precisa ainda passar por otimizações, como estudos de pH e tempo de interação, fatores que são relevantes para a interação eletrostática, que é o mecanismo que acreditamos estar ocorrendo, tanto para a captura como para a purificação do pDNA, como será discutido na Seção 5.3.4.3.

O processo de captura pode ser acompanhado também de forma visual através da turbidez, como apresentado na Fig. 90, que mostra a amostra controle e após a interação de 10 min com diferentes massas de γ -NPs/Pani: podemos observar um grande contraste, principalmente para a solução com 50 mg, como destacado na Fig. 90.

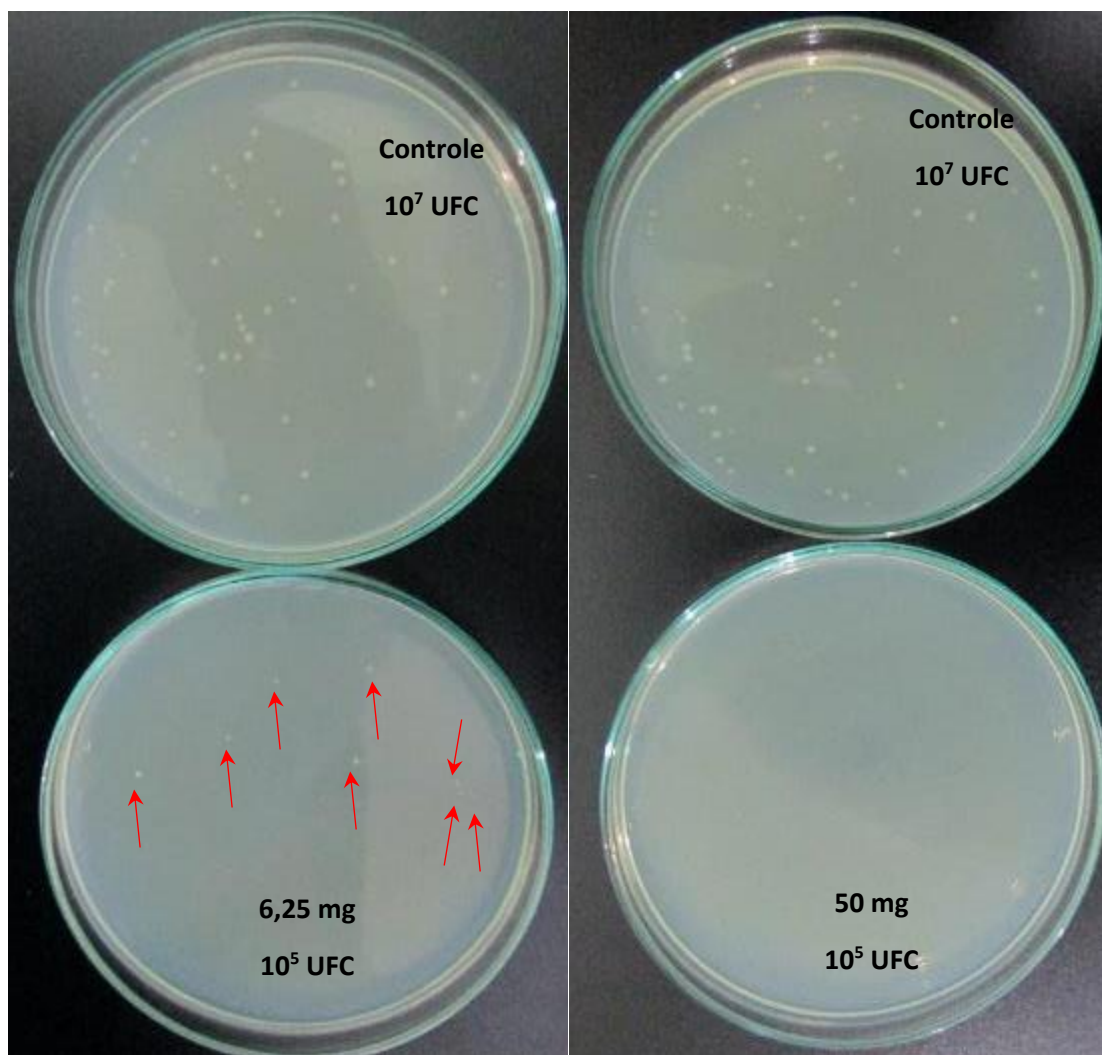
Figura 90 – Suspensão de *E. coli* antes (controle), e após interagir com as diferentes massas de γ -NPs/Pani.



Fonte: O autor (2019)

Além disso, mostramos ainda na Fig. 91 os resultados para a contagem de colônias, para a mínima e máxima concentração de γ -NPs/Pani (6,25 e 50 mg) utilizadas, que são contrastados com os da solução controle.

Figura 91 – Placas semeadas com a solução controle e com as soluções submetidas a captura com as massas de 6,25 mg e 50 mg.



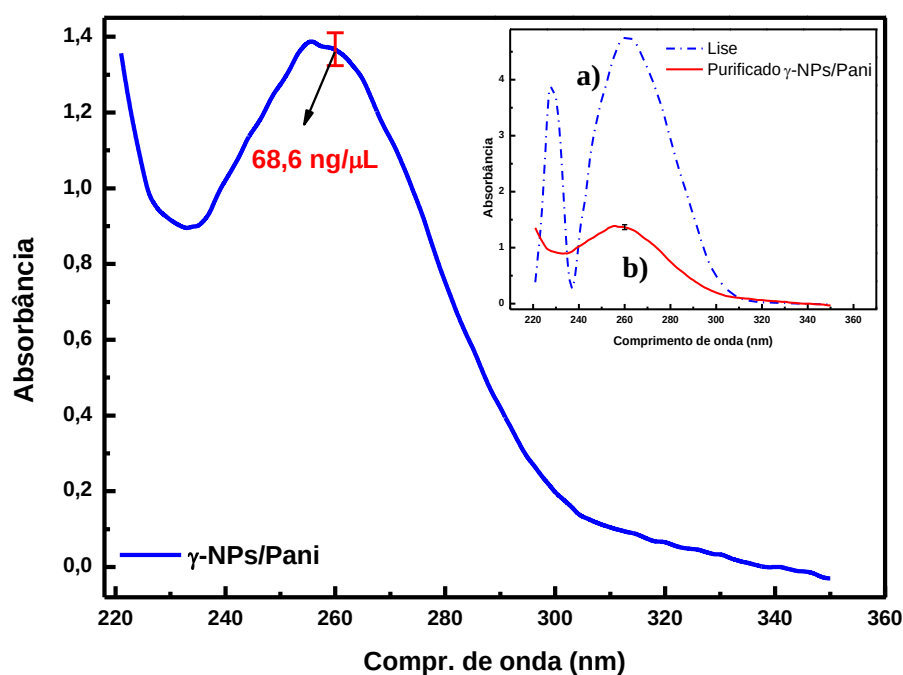
Fonte: O autor (2019)

5.3.2.2 Uso do Nanocompósito γ -NPs/Pani na purificação de pDNA

Como discorrido na Seção 2.2.1 do capítulo 2, o pDNA é uma biomolécula de grande importância para técnicas de biologia molecular, devido a seu tamanho reduzido em relação ao DNA genômico, sua característica de replicação independente, e às diversas funções adaptativas desenvolvidas pelo mesmo, que possibilitam sua principal utilização na tecnologia do DNA recombinante (Tolmasky and Alonso 2015). Desse modo, a qualidade de partida é um fator decisivo para o sucesso dos passos subsequentes nas aplicações que o envolvem. Assim, desenvolvemos e otimizamos o protocolo de purificação magnética de pDNA baseado em adsorção com polímero condutor (Pani) (ver Seção 5.2.4.2.2). A Fig. 92 mostra os espectros de absorção ($\lambda=260$ nm) do pDNA obtido após o protocolo. Através de várias purificações, conseguimos um valor médio de

rendimento de $\sim 6,9 \mu\text{g}$, mostrando que realmente foi possível purificar DNA a partir de amostras de *E. coli*. Outra informação importante obtida através da espectroscopia UV-Vis foi a razão $A_{260/280}$, que variou entre 1,68 – 1,82. Esta razão mostra o quão puro está o DNA em relação à contaminação por proteínas e, segundo a literatura, uma boa pureza do DNA é admitida para uma razão ~ 1.8 (Fisher 2010), o que mostra que nosso protocolo exhibe um grau de pureza satisfatório.

Figura 92 – Espectro de absorção do pDNA purificado com o γ -NPs/Pani. No detalhe, antes (a), e depois (b) da purificação com o γ -NPs/Pani.



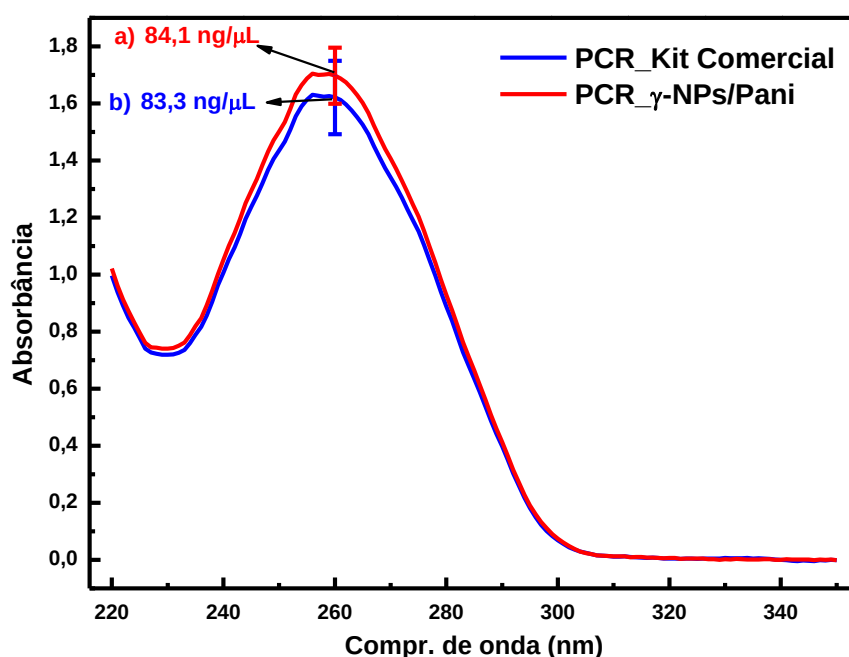
Fonte: O autor (2019)

No detalhe da Fig. 92 mostramos o espectro do pDNA após a lise celular (a), e depois de ser purificado com o protocolo do nanocompósito γ -NPs/Pani (b), onde podemos ver uma acentuada banda de absorção no espectro (a) centrada em 230 nm, que é associada com a interferência dos solventes utilizados na lise (Fisher 2010); a mesma não aparece no espectro após a purificação com γ -NPs/Pani, o que corrobora a estimativa sobre a eficiência do processo de purificação.

Posteriormente ao processo de purificação com o γ -NPs/Pani, realizamos a técnica de PCR para verificarmos se o pDNA teria qualidade suficiente para ser empregado em biologia molecular. Como mencionado na Seção 5.2.4.2.3, nesta etapa utilizamos amostras de pDNA purificadas com um kit comercial (*Wizard Plus SV Minipreps*, *Promega*), a fim de estabelecermos uma comparação. Na Fig. 93 são apresentados os

espectros de absorção para as amostras amplificadas como o pDNA purificado com o γ -NPs/Pani (a), e para o purificado com o kit comercial (b). Como podemos ver, rendimentos muito similares foram obtidos, com valores médios de concentrações finais de 84,1 ng/ μ L para o γ -NPs/Pani, e 83,3 ng/ μ L para o kit comercial, comprovando assim a boa qualidade do DNA plasmídeo purificado com o γ -NPs/Pani, e sua aplicabilidade em técnicas sofisticadas de biologia molecular como a PCR.

Figura 93 – Espectro de absorção das amostras de pDNA amplificadas por PCR para as amostras purificadas com o γ -NPs/Pani (a), e com o kit comercial (b).

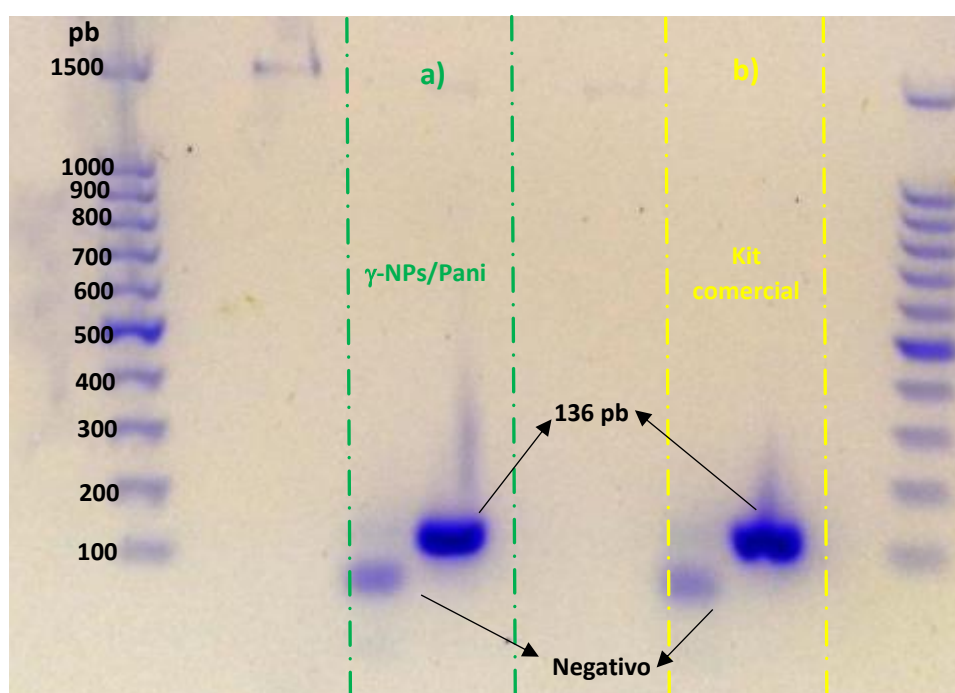


Fonte: O autor (2019)

Como última caracterização, empregamos a técnica de eletroforese em gel de agarose para as amostras amplificadas com a PCR (ver Capítulo 3, Seção 3.2.4.2.4.1), de modo que pudéssemos verificar o tamanho dos amplicons (fragmentos), e através destes confirmar que o pDNA purificado fosse realmente o pUC19. A Fig. 94 mostra a corrida para as amostras amplificadas com o pDNA com o protocolo do γ -NPs/Pani (a), e com o kit comercial (b), junto a um padrão (loader) de 1Kpb. Como pode-se notar, ambas amostras têm uma única banda com intensidade semelhante, e localizada aproximadamente entre as bandas de 100 e 200 pares de bases (pb) do loader. Isto mostra que os amplicons têm o mesmo tamanho, aparentemente um pouco menores que 150 pb. Este valor está de acordo com o esperado para os fragmentos da região LacZ do pUC19,

gerados pelos primers usados (M13_F – M13_R), que é de 136 pb (Lagally, Simpson et al. 2000, Lagally, Medintz et al. 2001, Chen, Manz et al. 2007). Assim, com tais resultados, comprovamos que de fato foi purificado o DNA plasmídeo pUC19 usando o γ -NPs/Pani, obtendo uma boa pureza, bom rendimento, e amplificação (PCR) idêntica ao obtido pelo uso de kits comerciais. Além disso, a amplificação mostra também que nosso protocolo não possui inibidores da reação em cadeia da polimerase.

Figura 94 – Eletroforese em gel de agarose (1%) das amostras de pDNA amplificadas por PCR para amostras purificadas com o γ -NPs/Pani (a), e com o kit comercial (b).



Fonte: O autor (2019)

Novamente, vale ressaltar que outra vantagem deste protocolo de purificação, como dos outros desenvolvidos ao longo dessa tese, é o fato dos mesmos não fazerem uso de compostos fenólicos, utilizados na maioria dos protocolos tradicionais (extração orgânica), e também o tiocionato de guanidina, usado em protocolos de adsorção baseados em sílica porosa (extração de fase sólida), uma vez que estes reagentes são tóxicos tanto para quem os manipula, como para o meio ambiente. Além disso, a contaminação do DNA purificado com tais compostos pode provocar interferência em técnicas de biologia molecular sensíveis como a PCR.

5.3.4 Mecanismo de interação

O mecanismo de interação que acreditamos estar ocorrendo tanto entre o γ -NPs/Pani e a parede celular da *E. coli*, como entre o γ -NPs/Pani e o pDNA, é de natureza eletrostática. Tal afirmação é baseada nas propriedades físico-químicas das moléculas com as quais estamos trabalhando. No que diz respeito à polianilina, como comprovamos pelas técnicas de caracterização de UV-Vis e FTIR (ver seções 5.3.1.2.1, e 5.3.1.2.2), estamos trabalhando com sua forma sal esmeraldina, na qual uma parcela de seus grupos aminos estão protonados, o que os tornam carregados positivamente. Para a questão da parede celular da *E. coli*, é reportado na literatura que em ambientes com pH entre 4,0 – 8,0 várias bactérias (como a *E. coli*), possuem uma carga superficial negativa (Li and McLandsborough 1999, AlAbbas, Kakpovbia et al. 2012, Kurinčič, Jeršek et al. 2016). Já para o DNA, é muito bem estabelecido que o mesmo é um poliânion, no qual os grupos fosfatos são responsáveis pelo caráter negativo dessa molécula (Sinden 1994). Assim, supomos que para o caso da captura, os grupos aminos protonados são responsáveis por adsorverem os γ -NPs/Pani ao longo de toda a superfície da parede celular da *E. coli*, e para a purificação, as moléculas de DNA são adsorvidas na superfície do nanocompósito γ -NPs/Pani, através da troca iônica dos grupos aminos da Pani e fosfatos do DNA.

Outro ponto a se ressaltar a favor deste mecanismo advém do protocolo de purificação, mais especificamente do fato do γ -NPs/Pani ter desorvido o pDNA quando utilizamos a solução tampão de fosfato pH 8. Isso é relevante, pois em ambiente alcalino (acima do pH 5) a Pani sofre a desprotonação dos grupos aminos, passando para seu estado base esmeraldina, que é neutro (Chiang and MacDiarmid 1986); nessa condição, não existe interação eletrostática, o que faria com que o pDNA seja liberado, como de fato observamos.

5.4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui apresentados, podemos constatar que conseguimos revestir as nanopartículas de maghemita com o polímero condutor polianilina, obtendo um tamanho de partícula de $(95,2 \pm 29,9)$ nm, e magnetização de saturação com valor 29,92 emu/g, com uma boa resposta magnética. Em relação às aplicações, conseguimos realizar a captura celular de *E. coli* em meio aquoso de maneira efetiva e prática, sendo o

nanocompósito capaz de adsorver $\sim 10^6$ células por cada mg utilizado, as quais foram facilmente separadas da solução com o auxílio de um pequeno imã.

Quanto a purificação de DNA plasmídeo, nós descrevemos o que, ao melhor do nosso conhecimento, é o primeiro uso de polímeros condutores como material adsorvente de fase sólida para a purificação do pDNA bacteriano. Os resultados obtidos a partir do protocolo utilizado demonstraram um bom rendimento final com $\sim 6,9 \mu\text{g}$, uma boa pureza evidenciada pela razão 260/280, que se manteve entre 1,68 e 1,82. Além disso, através da realização de PCR mostramos que o pDNA purificado com o uso do nanocompósito γ -NPs/Pani tem de fato uma ótima pureza, com um rendimento para amplificação equivalente aqueles observados quando kits de extração comercial são empregados, o que mostra que o protocolo de purificação aqui discutido pode se mostrar promissor para uso geral na área de biologia molecular.

6 PREPARAÇÃO DE ELETRODOS ORGÂNICOS FLEXÍVEIS DE PEDOT/NANOESTRUTURAS DE CARBONO E SUA APLICAÇÃO EM SUPERCAPACITORES

No presente capítulo discutiremos as metodologias adotadas para a preparação de eletrodos orgânicos flexíveis baseados em substratos de membranas de casca de ovo, nanoestruturas de carbono e o polímero condutor PEDOT. Além disso, também abordaremos a aplicação desses eletrodos em dispositivos supercapacitores flexíveis de estado sólido para armazenamento de energia.

6.1 MOTIVAÇÃO

A tecnologia emergente de eletrônicos flexíveis e vestíveis⁹ (Kao, Chuang et al. 2019, Lim, Shin et al. 2019, Qiu, Zhu et al. 2019) ainda enfrenta o desafio de superar os problemas associados com a rigidez e volume relativamente grande dos materiais usualmente adotados em baterias e capacitores eletroquímicos (Patil, Lokhande et al. 2019). Além disso, os dispositivos convencionais de armazenamento de energia apresentam limitações intrínsecas, como baixa densidade de potência (baterias) ou baixa densidade de energia (capacitores). Por estas razões, há um interesse crescente no desenvolvimento de supercapacitores (SC), um novo tipo de dispositivos de armazenamento de energia com desempenho energético global aprimorado em relação aos capacitores convencionais (Kuperman and Aharon 2011, González, Goikolea et al. 2016). Diferentemente do que ocorre com as baterias e capacitores usuais, o funcionamento das SC se baseia em diferentes mecanismos de transferência de carga eletroquímica (onde são permitidas contribuições simultâneas faradaicas e não faradaicas), que permitem combinar uma alta densidade de potência a altas densidades de energia (Poonam, Sharma et al. 2019).

Em termos gerais, a capacitância elétrica de dupla camada (EDLC) e a pseudocapacitância são os dois mecanismos básicos envolvidos no processo de armazenamento de energia em supercapacitores (Li, Horn et al. 2019). Processos de EDLC (ver Seção 1.7 do capítulo 1) são dominantes em nanoestruturas de carbono (NEC), tais como grafeno ou nanotubos de carbono, e ocorrem na interface do material com o

⁹ **Tecnologias vestíveis** – Engloba tanto dispositivos eletroeletrônicos que podem ser usados como uma peça de roupa ou um acessório, assim como também tecnologias que possuem características que a conectem a outros aparelhos ou à internet.

eletrólito. Em resposta a um potencial aplicado, espécies iônicas de carga oposta são deslocadas para próximo dos locais disponíveis (carregados) na superfície da NEC, resultando no acúmulo local de carga. Portanto, a área de superfície da NEC disponível é um dos parâmetros limitantes para alcançar uma alta capacitância específica em um SC.

Por sua vez, os processos de pseudocapacitância redox (ver Seção 1.8 do capítulo 1) envolvem mecanismos de EDLC que ocorrem de modo concomitante com uma transferência de carga faradaica. Exemplos de materiais nos quais esse fenômeno se manifesta incluem óxidos de metais de transição e polímeros intrinsecamente condutores (PIC) (Nan, Hu et al. 2019, Zhang, Yuan et al. 2019). Uma característica vantajosa do uso de materiais pseudocapacitivos é o aumento em pelo menos uma ordem de grandeza da capacitância SC, quando comparado com os SCs produzidos com materiais EDLC de área superficial equivalente (Conway 1999).

Os PICs se destacam como uma importante classe de materiais pseudo-capacitivos e, diferentemente dos óxidos de metais de transição, eles possuem uma alta condutividade, boa flexibilidade e leveza. Por tais razões, PICs - como polipirrol (PPy) (Lima, Alcaraz-Espinoza et al. 2018), polianilina (PAni) (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018) e poli (3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) (Lee, Jin et al. 2019) - têm sido considerados potenciais candidatos para uso em supercapacitores flexíveis com bom desempenho em termos de potência e densidade de energia. No entanto, os PICs sofrem uma quantidade considerável de estresse mecânico durante o processo de descarga de carga, do que resulta a degradação do dispositivo, e a consequente redução na capacitância e no ciclo de vida - isto é, baixa estabilidade de ciclo (Han and Dai 2019).

Para superar as limitações acima mencionadas quando do uso de PICs puros, uma estratégia consiste em produzir nanocompósitos binários com NECs. Entre as diversas vantagens do uso de compósitos PICs/NECs, merece menção especial a notável melhora na estabilidade eletroquímica e na condutividade (Han and Dai 2019). De fato, os SCs baseados nesses tipos de nanocompósitos binários exibem maior capacidade de energia, menor resistência à transferência de carga e uma maior taxa de transferência de carga, quando comparado com suas contrapartes utilizadas isoladamente (Alcaraz-Espinoza, de Melo et al. 2017, Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018).

Apesar da disponibilidade de múltiplas estratégias para sintetizar compósitos PICs/NECs, tais como polimerizações eletroquímicas, interfaciais ou *in situ*, o material resultante é geralmente depositado sobre substratos rígidos (um método não adequado

para a construção de dispositivos flexíveis), ou obtido como um pó, o que dificulta um posterior processamento (de Oliveira, Sydlik et al. 2013). Recentemente, várias estratégias têm sido desenvolvidas não apenas para modificar o isolamento elétrico de substratos, mas também a utilização de substratos flexíveis, como fibras têxteis, papel, membranas poliméricas eletrofiadas, entre outros (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018, Lima, Alcaraz-Espinoza et al. 2018). Essas abordagens tiram vantagem das propriedades mecânicas dos substratos flexíveis e de sua grande área de superfície disponível para a deposição ou desenvolvimento de nanoestruturas ativas. No entanto, uma das principais dificuldades de se lidar com NECs é a tendência de que se formem aglomerados e emaranhados (Ma, Mo et al. 2010), um fenômeno que leva a dispositivos com baixa capacitância específica. Para o design de dispositivos flexíveis, a superação dessas limitações passa a ser um passo crítico para a obtenção de uma melhor adesão dos materiais ativos (ou seja, derivados de carbono e polímero condutor) no substrato e para que se torne mais fácil alcançar o limiar de percolação da corrente ao longo das vias condutoras formadas pela presença de tais compósitos. Assim, o tratamento físico-químico da superfície dos substratos adotados e o uso de polímeros, surfactantes ou materiais nanoestruturados são estratégias úteis para que venha a ocorrer a dispersão das NECs e sua melhor adesão na superfície dos substratos.

Dentre os PCIs utilizados em dispositivos SCs, o PEDOT tem merecido atenção especial na literatura recente, uma vez que este polímero condutor combina várias características vantajosas, como propriedades elétricas superiores (ou seja, uma alta condutividade), uma grande janela ativa para operação eletroquímica, capacitância específica alta (Zhao, Zhang et al. 2017), estado oxidado estável (Zhu, Li et al. 2018), rápida taxa de dopagem/dedução e estabilidade ambiental a longo prazo (Tong, Skorenko et al. 2015). No entanto, na sua forma original o PEDOT apresenta um limitado desempenho mecânico e uma baixa solubilidade, propriedades que dificultam sua aplicação direta na eletrônica vestível (Zhao, Zhang et al. 2017). De fato, é difícil a síntese de PEDOT em meio aquoso por conta de sua escassa solubilidade em água, o que faz com que a polimerização aquosa ou interfacial seja dificultada pela tendência à aglomeração, um problema que pode forçar a adoção de um processo solvotérmico em temperaturas elevadas. Uma possível estratégia para contornar a questão associada com as propriedades mecânicas é depositar as cadeias poliméricas sobre substratos flexíveis, como algodão, plástico, papel entre outros (Tahir, He et al. 2019), ou usar compósitos de PEDOT e nanoestruturas de carbono na preparação de todos os dispositivos de estado sólido (Lota,

Khomenko et al. 2004). Contudo, um dos parâmetros mais críticos ainda é a natureza do substrato adotado. Por exemplo, Tahir e colaboradores (Tahir, He et al. 2019), relataram o desenvolvimento de microsupercapacitores baseados em filmes casting de PEDOT/GNP em substratos de polipropileno.

No presente capítulo, discutimos o uso de membranas de casca de ovo modificadas pela incorporação de nanoestruturas de carbono (isto é, nanotubos e grafeno) e PEDOT na preparação dos eletrodos de supercapacitores simétricos. Motivados por isso, o trabalho descrito neste capítulo corresponde à busca e exploração da imobilização de diferentes tipos de nanoestruturas de carbono (NEC) (nanotubos funcionalizados com poucas (f-FWCNT) e multicamadas (f-MWCNT), e nanoplatelets de grafeno (GNP)) em um suporte maleável, para a fabricação de SCs orgânicos flexíveis. Dentre esses suportes, a membrana de casca de ovo (MCO) se apresenta como um ótimo material, uma vez que, além de abundante (e, conseqüentemente, de baixo custo), a MCO tem uma estrutura microporosa singular, por ser composta por fibras proteicas que exibem inúmeros grupos funcionais, tais como $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ e $-\text{CONH}_2$ (Carvalho, Araujo et al. 2011, Mittal, Teotia et al. 2016). Além disso, a MCO exibe uma grande resistência mecânica e boa estabilidade química (Lin, Mertens et al. 2004), o que é fundamental para o desenvolvimento de eletrodos flexíveis. Deste modo, primeiramente buscamos incorporar as NECs na MCO, permitindo a produção de um substrato condutor, a ser usado no posterior revestimento da superfície da membrana com PEDOT via polimerização por fase vapor (um método simples e versátil para, de forma homogênea, recobrir superfícies com uma camada fina do polímero). Em seguida, serão discutidos a produção dos SCs e os trabalhos feitos na caracterização do comportamento eletroquímico dos dispositivos obtidos.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Materiais

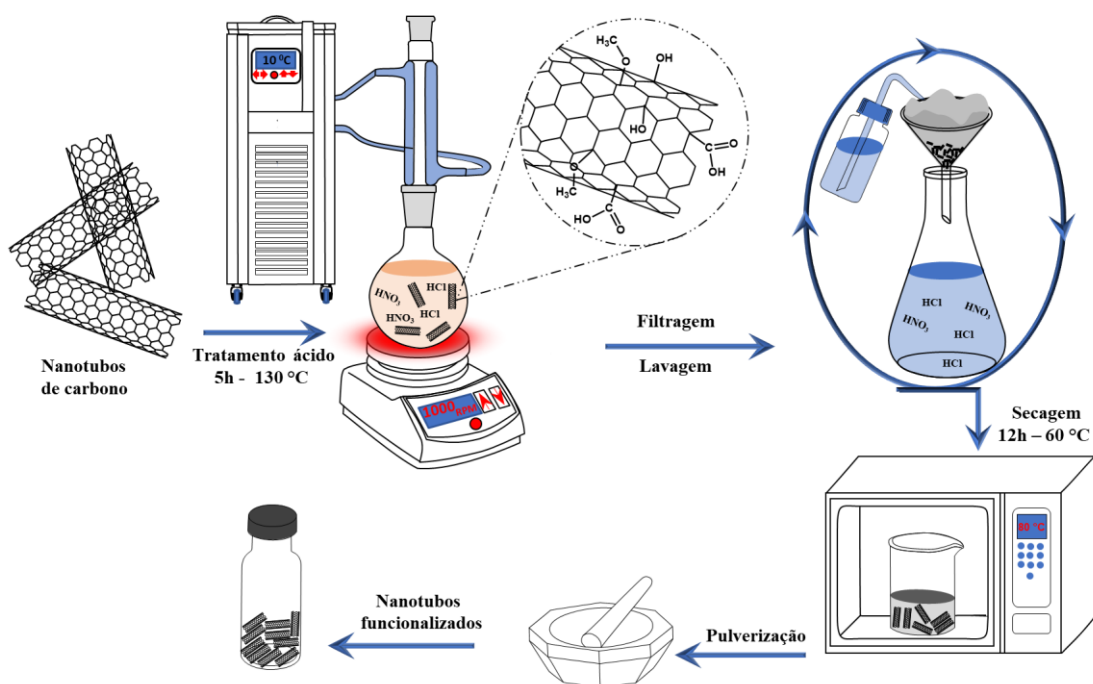
O perclorato de ferro (III) hidratado ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), poli(álcool vinílico) - PVA (MW 86-145 kDa), nanoplatelets de grafeno de grau C (GNP – com área superficial 750 m^2/g) com um diâmetro médio de partícula menor que 2 μm , e o 3,4-etilenodioxitiofeno (EDOT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (*Estados Unidos*). Nanotubos de carbono multicamadas (MWCNT) com dimensões médias de 6-9 nm x 5 μm , e nanotubos de carbono com poucas camadas (FWCNT), 3-9 nm x 100-200 μm , foram obtidos da CTNano (*Brasil*). As MCO foram extraídas de ovos comprados no mercado regular da

cidade do Recife, Brasil. O ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃), álcool metílico (CH₃OH), ácido fosfórico (H₃PO₄) e álcool etílico (C₂H₅OH) foram adquiridos da Dinâmica (*Brasil*). Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados como recebidos, com exceção dos nanotubos MWCNT e FWCNT, que foram submetidos a um processo de funcionalização sob condição ácida. Em todos os experimentos, usamos água tratada (condutividade de 18 MΩ) em um sistema de ultrapurificação (*Millipore, Estados Unidos*).

6.2.2 Funcionalização dos nanotubos

A funcionalização dos NTCs foi realizada por via química através de tratamento ácido com temperatura, conforme descrito na literatura (Alcaraz-Espinoza, de Melo et al. 2017), e foi realizada da seguinte forma; primeiramente, em um balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 50 mL de uma solução de HCl-HNO₃ na proporção de 1:3, respectivamente. Posteriormente, 1 grama de NTCs foi colocado no balão, e em seguida o sistema foi colocado em um banho de óleo a 130 °C sob refluxo e agitação magnética. A reação ocorreu por 5 h, e subsequentemente o material foi filtrado e lavado com água ultrapura até a remoção completa do ácido. Finalmente, os NTCs foram secos em estufa a 60 °C por 12 h e pulverizados. Na Fig. 95 é mostrada uma representação pictográfica das principais etapas do processo de funcionalização os nanotubos de carbono.

Figura 95 – Esquema ilustrativo das principais etapas do processo de funcionalização ácida dos nanotubos de carbono.



Fonte: O autor (2019)

6.2.3 Preparação do substrato de MCO

As membranas de casca de ovo utilizadas como matriz para a preparação dos eletrodos foram submetidas a um processo de limpeza que ocorreu da seguinte forma; inicialmente, o ovo dentro do material (célula) foi removido cuidadosamente através de um pequeno furo. Em seguida, as cascas foram imersas em uma solução de HCl 1M por 30 min para a degradação da estrutura calcinada. Posteriormente, as membranas foram separadas e submetidas a um prolongado processo de lavagem com água ultrapura até a remoção completa do ácido. Sequencialmente, as membranas foram padronizadas em quadrados de 2x2 cm, com a ajuda de um molde.

6.2.3.1 Incorporação das NECs e polimerização com PEDOT

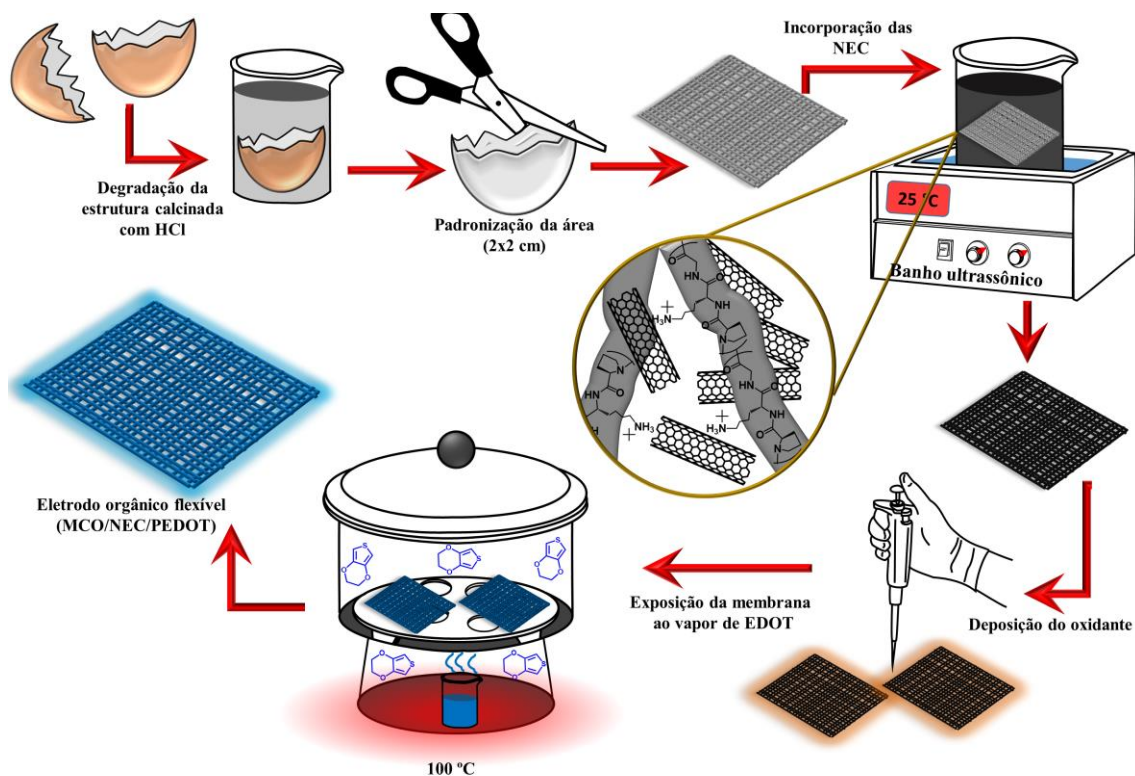
Os eletrodos MCO/NEC/PEDOT foram obtidos em duas etapas; a primeira consistiu na incorporação as diferentes nanoestruturas de carbono (NTCs e GNP). Para isso, em cada caso, as MCO foram colocadas em uma dispersão de 1 mg/mL do material (MWCNT, FWCNT, ou GNP) em $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ e levados a banho ultrassônico por 5 h, sendo que a cada 1 h o tratamento era interrompido, e realizado um severo procedimento de

lavagem da MCO em água ultrapura, a fim de remover as nanoestruturas fracamente incorporadas.

Após a incorporação das nanoestruturas de carbono, o próximo passo consistiu na polimerização do PEDOT sob as MCO/NEC por meio da polimerização em fase de vapor, que foi realizada da seguinte forma; primeiro, foram dispensados 200 μL de uma solução de $(\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O})$ com concentração de 0,4 M em CH_3OH nas MCO/NEC, e o solvente foi evaporado por 30 min nas condições ambientes. Subsequentemente, as MCO/NEC foram transferidas para um suporte dentro de um dessecador, no fundo do qual foram adicionados 40 μL do monômero 3, 4-etilenodioxitiofeno (EDOT). O sistema foi então selado e colocado em uma placa de aquecimento a 100 $^\circ\text{C}$ por 2 h, para que a polimerização ocorresse.

Após a polimerização, os eletrodos MCO/NEC/PEDOT foram imersos 3 vezes em $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (30 min cada), e uma vez com HCl 6 M por 2 h com o objetivo de promover a remoção do excesso de oxidante. Finalmente, os eletrodos foram lavados várias vezes em água ultrapura e condicionados sob refrigeração. Na Fig. 96, indicamos as principais etapas do protocolo de síntese dos eletrodos MCO/NEC/PEDOT.

Figura 96 – Representação esquemática das principais etapas da preparação dos eletrodos flexíveis baseados em MCO/NECs/PEDOT.

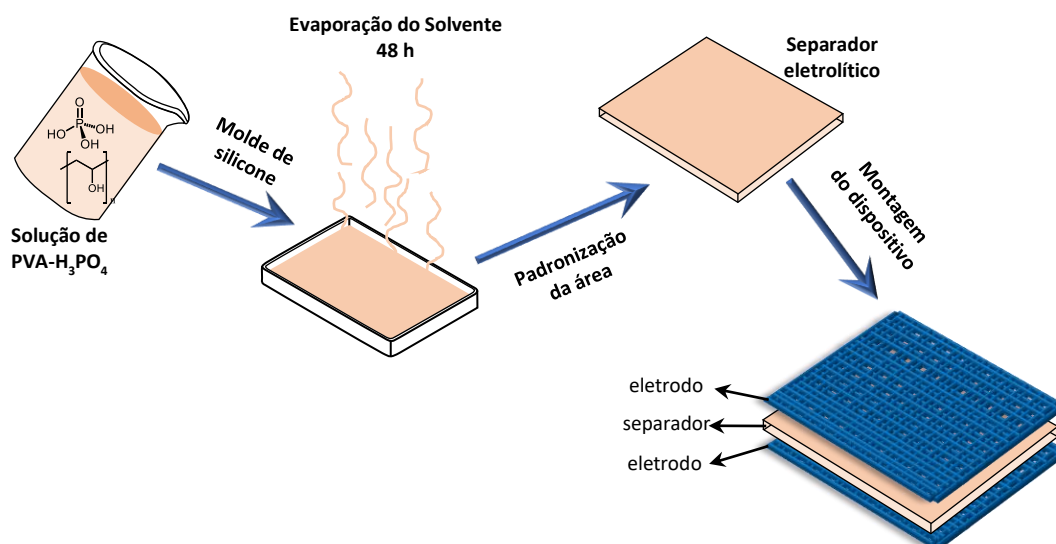


Fonte: O autor (2019)

6.2.4 Fabricação dos SC com eletrodos MCO/NEC/PEDOT e MCO/PEDOT

Para a montagem dos dispositivos supercapacitores de estado sólido, utilizamos os eletrodos MCO/NEC/PEDOT e MCO/PEDOT em uma configuração simétrica de placas paralelas padrão (Yang and Mai 2014), com a disposição entre os eletrodos de um eletrólito consistindo em um gel separador de PVA- H_3PO_4 . Para a preparação desse filme (gel) de eletrólito polimérico semi-sólido, a ser usado como separador, primeiro dispersamos 1 g de PVA em 10 mL de água ultrapura, sob agitação magnética a 80 ° C em um banho térmico por 4 h. Após a solução ter esfriado até a temperatura ambiente, adicionamos 1 mL de H_3PO_4 (85%) e agitamos por um período de 1 h. Posteriormente, um volume de 4,5 mL da solução foi transferido para um molde de silicone (3x4 cm) e deixado repousar em condições ambientes por 48 h, para que ocorresse a evaporação do solvente. Como resultado, obtivemos um filme autossustentável (membrana) translúcido e flexível, com uma espessura na faixa de 10 - 50 μm (como determinado pelo uso de um micrômetro). Esse gel foi utilizado como um separador sólido (rico em eletrólitos) entre as membranas de casca de ovo modificadas. Na Fig. 97 são ilustradas de forma esquemática as principais etapas seguidas para a fabricação dos diferentes SC.

Figura 97 – Sequência esquemática do método adotado para a fabricação dos dispositivos supercapacitores flexíveis de estado sólido.



Fonte: O autor (2019)

6.2.5 Métodos de caracterização

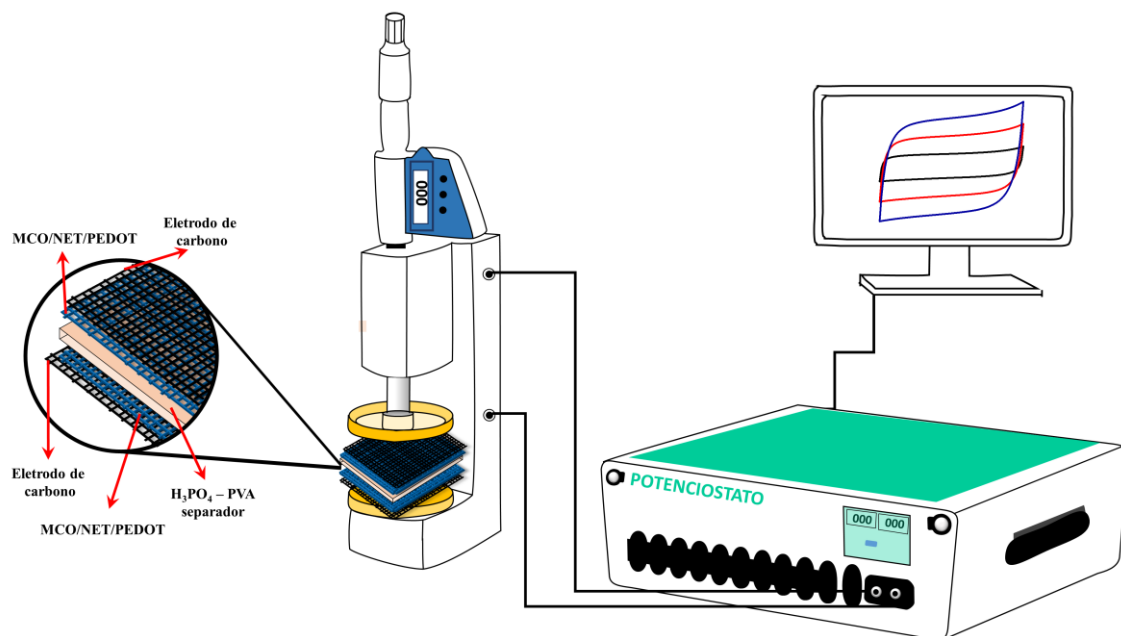
6.2.5.1 Caracterização dos eletrodos MCO/NEC/PEDOT

A composição química da COM e dos eletrodos foi analisada através das espectroscopias na região do infravermelho e Raman. Os espectros de infravermelho (FTIR) foram obtidos usando um espectrofotômetro IRTracer-100 (Shimadzu, Japão), quando uma pequena fração de MCO e dos eletrodos com as diferentes modificações foi misturada com KBr e pressionada durante 10 min com uma carga de 2 toneladas para a formação de pastilhas. Por sua vez, os espectros Raman correspondentes foram obtidos em um espectrômetro LabRAM HR Evolution (Horiba Jobin Yvon, França), equipado com um laser de excitação de 532 nm e potência de 2,5 mW. As propriedades morfológicas dos eletrodos foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura usando um microscópio Mira3-LM FEG (TESCAN, República Tcheca), tendo as amostras sido preparadas pela deposição de uma fina camada de ouro com um sistema de pulverização Quick Coater SC-701 (Sany Electron, Japão). As medidas de área superficial da MCO antes e após a incorporação das NECs foram realizadas pelo método BET usando um analisador de área superficial Gemini 2390A (*Micromeritics, Estados Unidos*).

6.2.5.2 Caracterização eletroquímica dos dispositivos SCs

As caracterizações eletroquímicas dos diferentes dispositivos SC foram realizadas adotando uma configuração de dois eletrodos paralelos, utilizando um potenciostato Autolab PGSTAT 302 N (*Metrohm, Suíça*). As curvas de voltametria cíclica (CV) foram obtidas com taxas de varredura na faixa de 5 - 300 mV.s⁻¹. Já as curvas galvanométricas (CG) foram tomadas com uma janela de potencial de 0 - 0,8 V, pela aplicação de correntes na faixa de 0,3 - 3,0 mA.cm⁻². A impedância de cada dispositivo SC foi medida no intervalo de frequência de 1 MHz a 1 Hz, sob um potencial de 10 mV em corrente alternada (CA). Na Fig. 98 é mostrada de forma esquemática a configuração adotada para a realização das caracterizações eletroquímicas.

Figura 98 – Esquema ilustrativo da configuração experimental adotada para a caracterização eletroquímica de dispositivos.



Fonte: O autor (2019)

A capacitância em função da área foi inicialmente estimada a partir dos dados da galvanometria, de acordo com (Alcaraz-Espinoza, de Melo et al. 2017),

$$C_{ar} = \frac{2 \cdot D_{ar} \cdot I}{V^2 \cdot A}, \quad (6.1)$$

onde V é o potencial (em Volts) onde a queda de IV (uma característica associada à resistência interna dos eletrodos (Stoller and Ruoff 2010)) deve ocorrer, A é a área do eletrodo, I é a corrente aplicada à descarga, e D_{ar} a área sob a curva de descarga, que é obtida através da integral da curva de descarga.

Para a construção do diagrama de Ragone (Christen and Carlen 2000), a densidade de energia foi determinada de acordo com (Alcaraz-Espinoza, de Melo et al. 2017),

$$E_D = \frac{C_{ar} \cdot V^2}{2.3600}, \quad (6.2)$$

enquanto a densidade de potência é dada por (Alcaraz-Espinoza, de Melo et al. 2017),

$$P_D = \frac{3600 \cdot E_D}{\Delta t}. \quad (6.3)$$

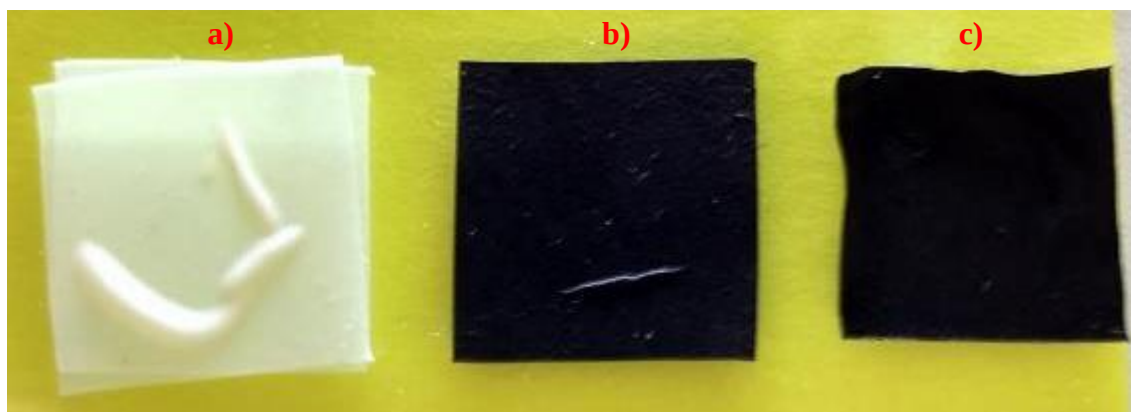
onde E_D é a densidade de energia dada em $W.h.cm^{-2}$, P_D a densidade de potência em $W.cm^{-2}$, V o potencial (em Volts), Δt o tempo de descarga do dispositivo, e C_{ar} a capacitância calculada de acordo com a Eq. 6.1.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1 Caracterização dos eletrodos MCO/NEC/PEDOT

A razão para termos escolhido a MCO como sendo o substrato flexível a ser usado para a deposição dos materiais ativos se deve à sua arquitetura interna elaborada, com a presença de uma matriz hierárquica de fibras que confere uma macroporosidade adequada à sua estrutura geral. Além disso, por sua natureza proteica rica em aminoácidos, a MCO exhibe muitos grupos funcionais potencialmente ativos capazes de estabelecer interações eletrostáticas e não covalentes com diferentes nanoestruturas ou moléculas. Isso representa uma vantagem química, por tornar desnecessário procedimentos adicionais de funcionalização. Na Fig. 99 é mostrado o aspecto das membranas de MCO nos diferentes estágios do processo de obtenção dos eletrodos, desde sua forma pura (Fig. 99a), após as etapas de incorporação das NECs (Fig. 99b) e depois da polimerização do PEDOT via fase-vapor (Fig. 99c). Como é possível observar na Fig. 99b, a incorporação das NECs pode ser visualmente percebida pelo escurecimento da membrana. Além disso, as NECs se mantêm fixadas à membrana mesmo após ciclos de lavagem vigorosos, em uma demonstração indireta de que realmente ocorreu a interação entre os diferentes grupos funcionais proteicos disponíveis na MCO e as nanoestruturas de carbono. Outro ponto que deve ser ressaltado diz respeito à flexibilidade das MCO, que é mantida ao longo de todo o processo de preparação dos eletrodos.

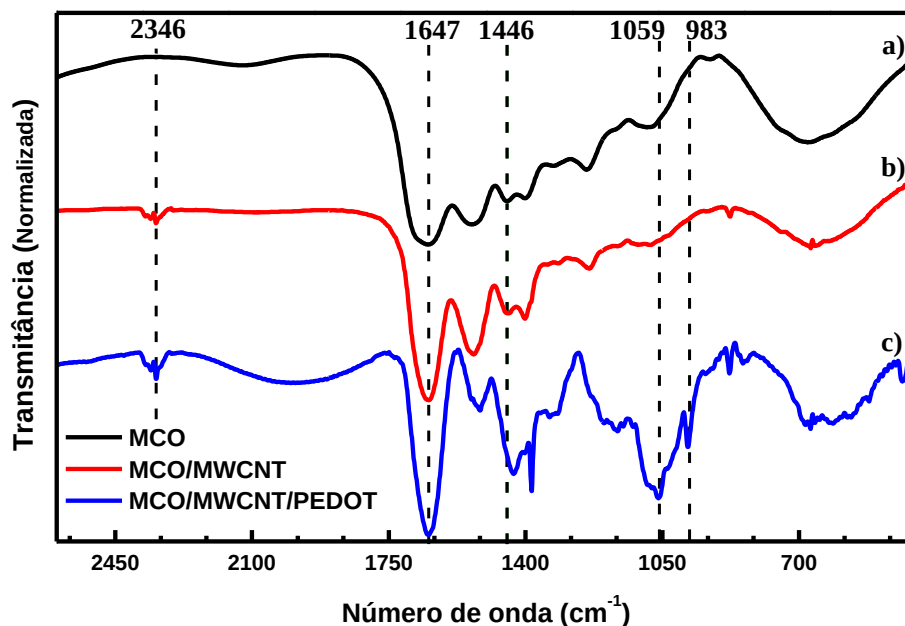
Figura 99 – Imagens dos eletrodos em diferentes estágios de fabricação: MCO pura a), após a incorporação das NECs por meio de banho ultrassom b), e em seu estado final após o recobrimento com PEDOT via polimerização em fase-vapor c).



Fonte: O autor (2019)

A composição química e as características dos materiais sintetizados foram avaliadas por análises Raman e FTIR. Na Fig. 100 apresentamos os espectros de FTIR das diferentes amostras de MCO modificadas que foram usadas como eletrodos. Na curva (a) podem ser observados os picos das vibrações características da MCO, como o modo de alongamento em 1655 cm^{-1} da $\text{C}=\text{O}$ na amida I, e o modo de flexão em 1547 cm^{-1} referente a ligação N-H na amida II (Hsieh, Chou et al. 2013, Liu, Luo et al. 2017). Já na curva b), após a incorporação por ultrassom das NECs (especificamente os nanotubos de carbono funcionalizados) na MCO há o aparecimento do pico em 2346 cm^{-1} , que é associado ao estiramento O-H dos grupos carboxílicos fortemente ligados as nanoestruturas de carbono (Yee, Mubarak et al. 2018). Desse modo, o aparecimento desse pico comprova que a funcionalização realmente ocorreu de forma satisfatória. Por fim, na curva c), onde temos o eletrodo em sua forma final, a presença do PEDOT é confirmada através da presença dos picos em 1060 cm^{-1} e 984 cm^{-1} , referentes a vibração de alongamento dos grupos etilenodioxilos e a vibração C-S do anel tiofeno, respectivamente (Cho, Wu et al. 2015, Pang, Zhou et al. 2016, Xie, Xu et al. 2016). Assim, foi possível confirmar que realmente conseguimos incorporar as NECs (e funcionalizar) e o polímero condutor PEDOT na superfície das MCO, obtendo eletrodos orgânicos flexíveis, como desejado.

Figura 100 – Espectros de FTIR das amostras de MCO pura a), após a incorporação de MWCNT (MCO/MWCNT) b), e depois do revestimento com PEDOT por meio da polimerização fase-vapor (MCO/MWCNT/PEDOT) c).

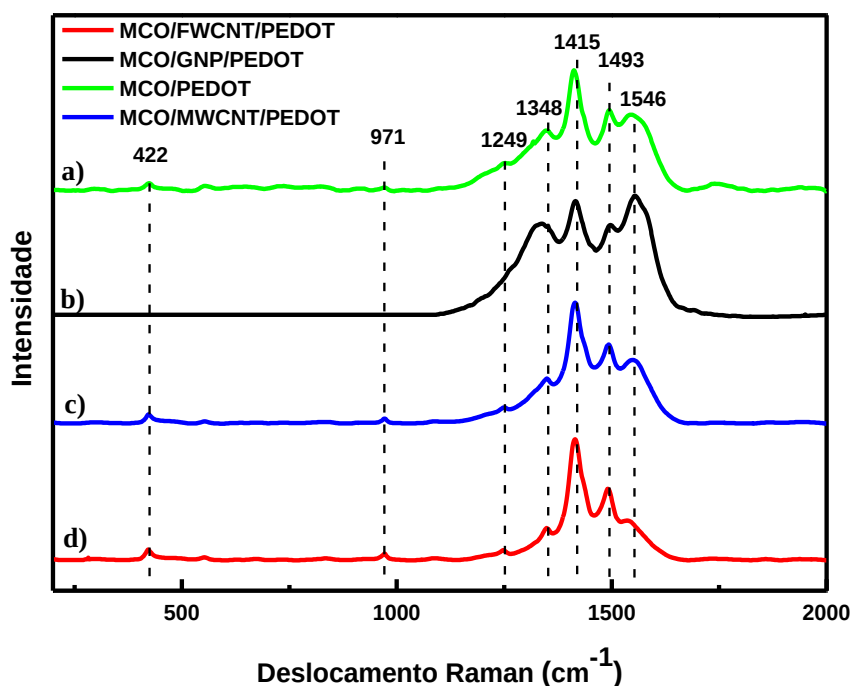


Fonte: O autor (2019)

Utilizamos ainda a espectroscopia Raman para confirmar que a polimerização do PEDOT foi bem-sucedida, e para coletar informações importantes relacionadas às diferenças entre os vários compósitos incorporados no MCO. Na Fig. 101, apresentamos os espectros Raman dos diferentes eletrodos preparados, onde é possível observar a presença das bandas características do PEDOT em todas as amostras. As bandas em 421, 551 e 970 cm^{-1} correspondem à deformação do anel oxietileno, enquanto que em 665 e 834 cm^{-1} temos a deformação simétrica e assimétrica C-S-C, respectivamente. A banda em 1348 cm^{-1} corresponde ao alongamento da $\text{C}\beta = \text{C}\beta$. Já as bandas em 1415, 1490 e 1535 cm^{-1} estão relacionadas ao alongamento simétrico de $\text{C}\alpha = \text{C}\beta$ (-O), o alongamento assimétrico de $\text{C} = \text{C}$ e as vibrações de alongamento das ligações C-C (Garreau, Louarn et al. 1999, Im and Gleason 2007), na devida ordem. Para avaliar o grau de conjugação do PEDOT, analisamos as bandas em torno de 1440 e 1415 cm^{-1} , que são associados respectivamente aos anéis benzenóides e quinóides. No espectro de todas as amostras, pode-se observar que apenas uma banda muito definida em 1415 cm^{-1} é exibida, sem a presença de um ombro próximo a 1440 cm^{-1} , em uma indicação de um alto grau de dopagem (Im and Gleason 2007). Porém, apesar de importante, não foi possível a presença das bandas correspondentes das NECs nos diferentes eletrodos, por conta da sobreposição das bandas G, D e D' (em 1336, 1536 e 1590 cm^{-1}) (Im and Gleason 2007)

com as bandas do PEDOT. A banda D é tipicamente atribuída a defeitos e impurezas em derivados de carbono, enquanto que a banda G é tomada como uma medida do grau de cristalinidade dos átomos de carbono ligados sp^2 (Pimenta, Dresselhaus et al. 2007, Chen, Ling et al. 2018).

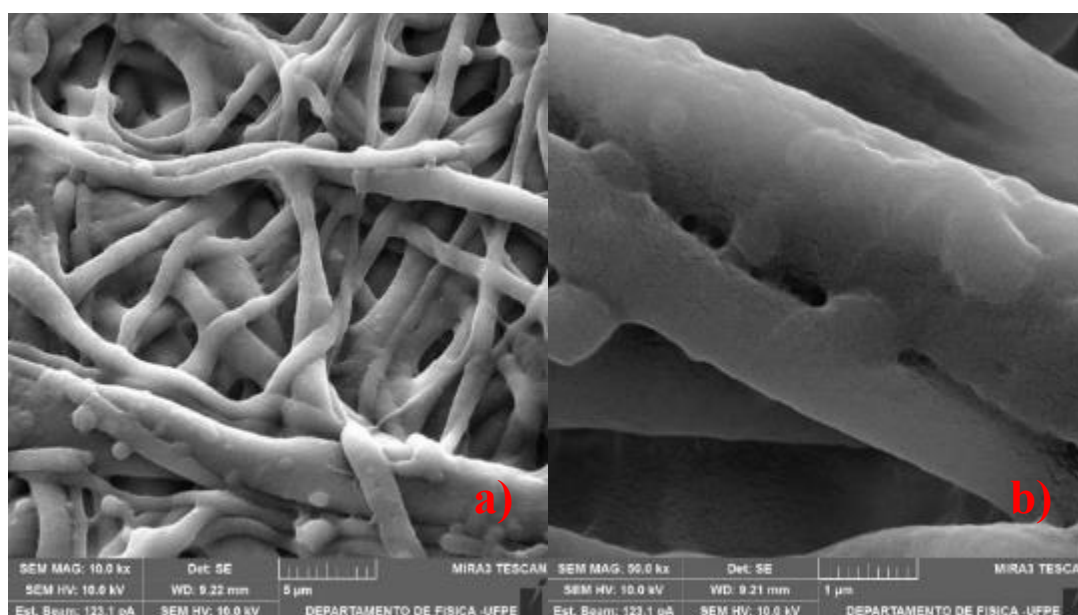
Figura 101 – Espectros Raman dos eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/GNP/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/FWCNT/PEDOT d).



Fonte: O autor (2019)

Ao analisarmos as propriedades morfológicas das amostras a partir da análise das micrografias de MEV obtidas em diferentes ampliações, podemos ver que a estrutura da MCO é preservada mesmo após a remoção da casca de $CaCO_3$ pela exposição à solução de HCl como esperado. Como se pode observar na Fig. 102a, a MCO pura é uma membrana porosa formada por fibras de proteínas distribuídas aleatoriamente e reticuladas. As fibras têm diâmetros na escala micrométrica, com um valor médio de 2,2 μm , como observado através do histograma da Fig. 105a. Em ampliações mais altas (Fig. 102b), é possível notar que a superfície das fibras é essencialmente lisa, sem evidência de uma topografia ou padrão peculiar.

Figura 102 – Micrografias eletrônicas de varredura da membrana MCO em diferentes ampliações.



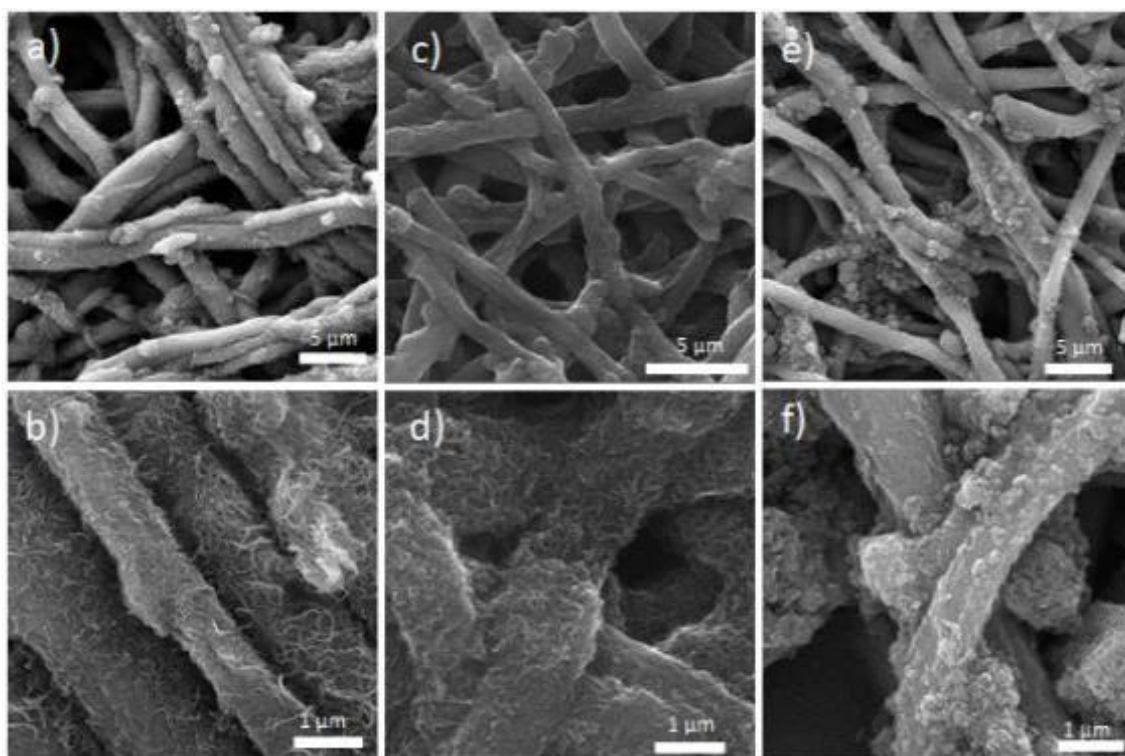
Fonte: O autor (2019)

Para modificar a MCO incorporando as NECs, ela foi submetida à banho ultrassom em dispersão etanólica da respectiva NEC de interesse. O ultrassom cria microjatos e ondas de choque perto de superfícies sólidas (Pol, Grisaru et al. 2005), e isso impede a aglomeração das NECs, favorecendo sua incorporação nas fibras de colágeno da MCO. Através das micrografias apresentadas na Fig. 103, podemos ver que a estrutura microporosa da MCO foi preservada após submetidas a banho ultrassom em dispersões etanólicas de FWCNTs, MWCNTs e GNPs (Figs. 103a, 103c e 103e, respectivamente). Como já discutido, após a incorporação, as membranas ESM ficaram pretas e mais flexível. Possivelmente, essa maior flexibilidade das membranas está associada a uma relaxação nas regiões de reticulação das fibras devido ao estresse mecânico sofrido durante o tratamento ultrassônico.

Em ampliações maiores (Figs. 103b, 103d e 103f), é possível confirmar que os FWCNTs são de fato mais longos que os MWCNTs, enquanto que as nanoplaquetas de grafeno são mais curtas que os dois (ver a Seção 6.2.1). O tamanho característico das diferentes NECs pode explicar a razão pela qual agregados podem ser formados na superfície das fibras e entre os poros: NECs mais curtas se moveriam mais rápido e penetrariam mais fundo no MCO, se chocando com as fibras a uma maior energia. No entanto, enquanto isso levaria a um revestimento mais uniforme, NECs menores podem

formar aglomerados mais facilmente entre os poros das membranas, como é o caso dos GNP (Fig. 103f), que se organizam em pilhas. Essas observações são semelhantes às relatadas por Gao e colaboradores (Gao, Hu et al. 2012), que usaram a ultrassom para modificar as fibras de poliuretano eletrofiadas com MWCNTs limpos e tratados.

Figura 103 – Micrografias das membranas MCO após a incorporação dos nanotubos de carbono de poucas camadas (MCO/FWCNT) a) e b), nanotubos multicamadas (MCO/MWCNT) c) e d), e os nanopellets de grafeno (MCO/GRP) e) e f).



Fonte: O autor (2019)

Para incorporar as cadeias PEDOT e produzir os eletrodos compostos, selecionamos o método de polimerização por vapor químico por conta de suas vantagens comparativas substanciais sobre os procedimentos químicos *in situ*, em termos de um nível reduzido de aglomeração e, conseqüentemente, de uma oclusão mais limitada da porosidade das membranas MCO. Na Fig. 104, mostramos as micrografias MEV das diferentes amostras de MCO/NECs/PEDOT preparadas após a polimerização PEDOT. Como se pode observar, a macroporosidade da MCO em todas as amostras é consideravelmente preservada, com apenas a superfície das fibras sendo coberta com camadas poliméricas. As micrografias de maior ampliação (Figs. 104b, 104d, 104f e 104h) revelam que as cadeias PEDOT se organizam de forma mais densa e granular, envolvendo as fibras e as NECs depositadas.

Para comprovar a incorporação e a influência das NECs na área superficial das

MCOs, nós realizamos análises BET da área superficial das membranas puras e após o processo de incorporação das NECs, com os valores correspondentes sendo apresentados na Tabela 12. Como pode ser observado a partir dos valores mostrados nessa tabela, a MCO pura exibiu uma área de $2,4 \text{ m}^2/\text{g}$. Maiores valores de área são encontrados após a incorporação das NECs; MCO/FWCNT ($6,6 \text{ m}^2/\text{g}$), MCO/MWCNT ($7,8 \text{ m}^2/\text{g}$) e MCO/GNP ($15,0 \text{ m}^2/\text{g}$). Esse resultado, além de comprovar a incorporação das NECs e o consequente aumento esperado na área superficial das MCO, também está em acordo com a suposição de que as NECs de menor tamanho têm sua deposição favorecida por possuírem maior mobilidade e energia cinética. Isso se torna perceptível ao compararmos a área superficial das membranas com o tamanho das NECs informado pelos fabricantes, $\text{FWCNT} > \text{MWCNT} > \text{GNP}$, e a área dos eletrodos $\text{MCO/GNP} > \text{MCO/MWCNT} > \text{MCO/FWCNT}$.

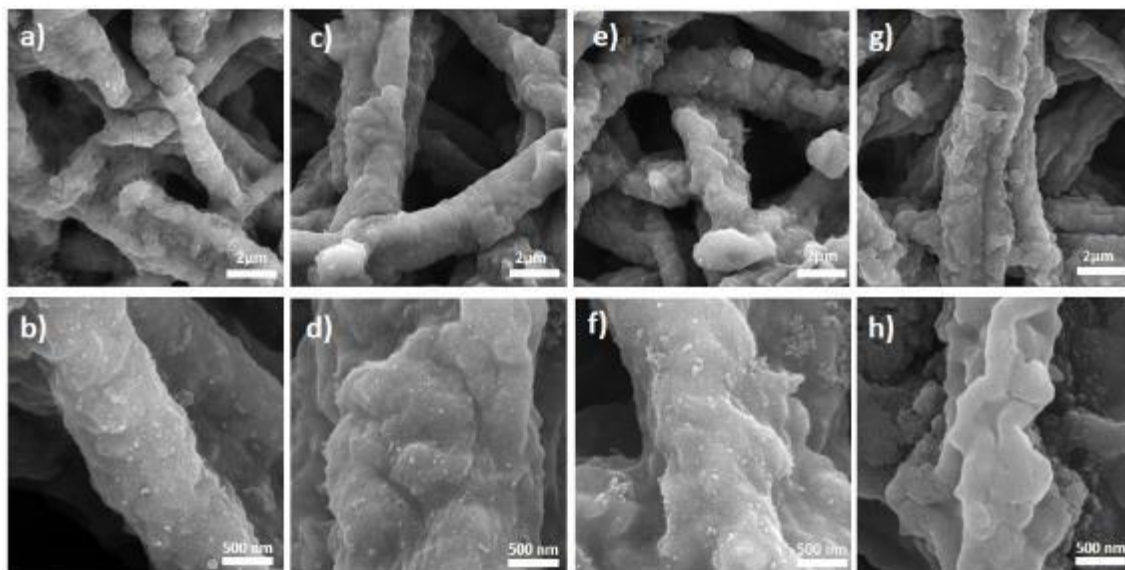
Tabela 12 – Área de superfície BET para a MCO pura e modificada com diferentes NECs.

Amostra	Área superficial (BET) (m^2/g)
MCO	$2,407 \pm 0,151$
MCO/PEDOT	$2,814 \pm 0,184$
MCO/FWCNT	$6,643 \pm 0,230$
MCO/MWCNT	$7,826 \pm 0,086$
MCO/GNP	$15,026 \pm 0,294$

Fonte: O autor (2019)

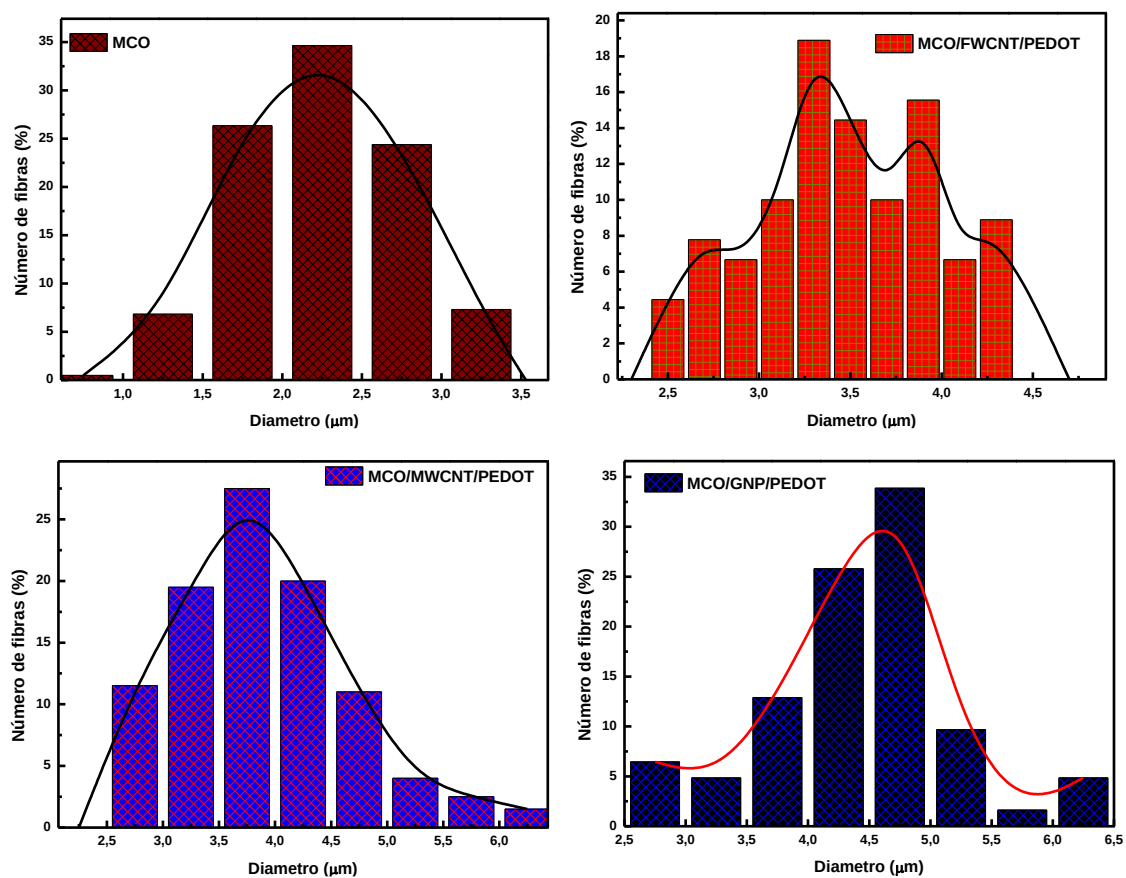
Para obter informações sobre o efeito das NECs na deposição de PEDOT, medimos a espessura média das fibras MCO e dos diferentes eletrodos preparados. Fazendo uso do software ImageJ, construímos os histogramas com a medição de 300 fibras cada. Os resultados mostrados na Fig. 105 revelaram diâmetros médios de fibra de 2,2, 3,3, 3,6 e $4,5 \text{ }\mu\text{m}$ para o MCO, MCO/FWCNT/PEDOT, MCO/MWCNT/PEDOT e MCO/GNP/PEDOT, respectivamente. Tais diferenças na espessura das camadas PEDOT podem estar associadas à quantidade e ao tipo de NEC previamente depositado. A incorporação das NECs na MCO primitiva aumenta a área da superfície (como comprovado por BET), ao mesmo tempo em que fornece locais mais ativos (COOH , CO , OH) para a adsorção de espécies do oxidante perclorato de ferro, o que, consequentemente, leva a um número maior de locais de nucleação para a polimerização de PEDOT.

Figura 104 – Micrografias das membranas MCO após incorporação da incorporação das NECs e a polimerização PEDOT: MCO/PEDOT a) e b), MCO/FWCNT/PEDOT c) e d), MCO/MWCNT/PEDOT e) e f), e MCO/GNP/PEDOT g) e h).



Fonte: O autor (2019)

Figura 105 – Histogramas do diâmetro das fibras MCO puras a), e para os eletrodos MCO/FWCNT/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d).

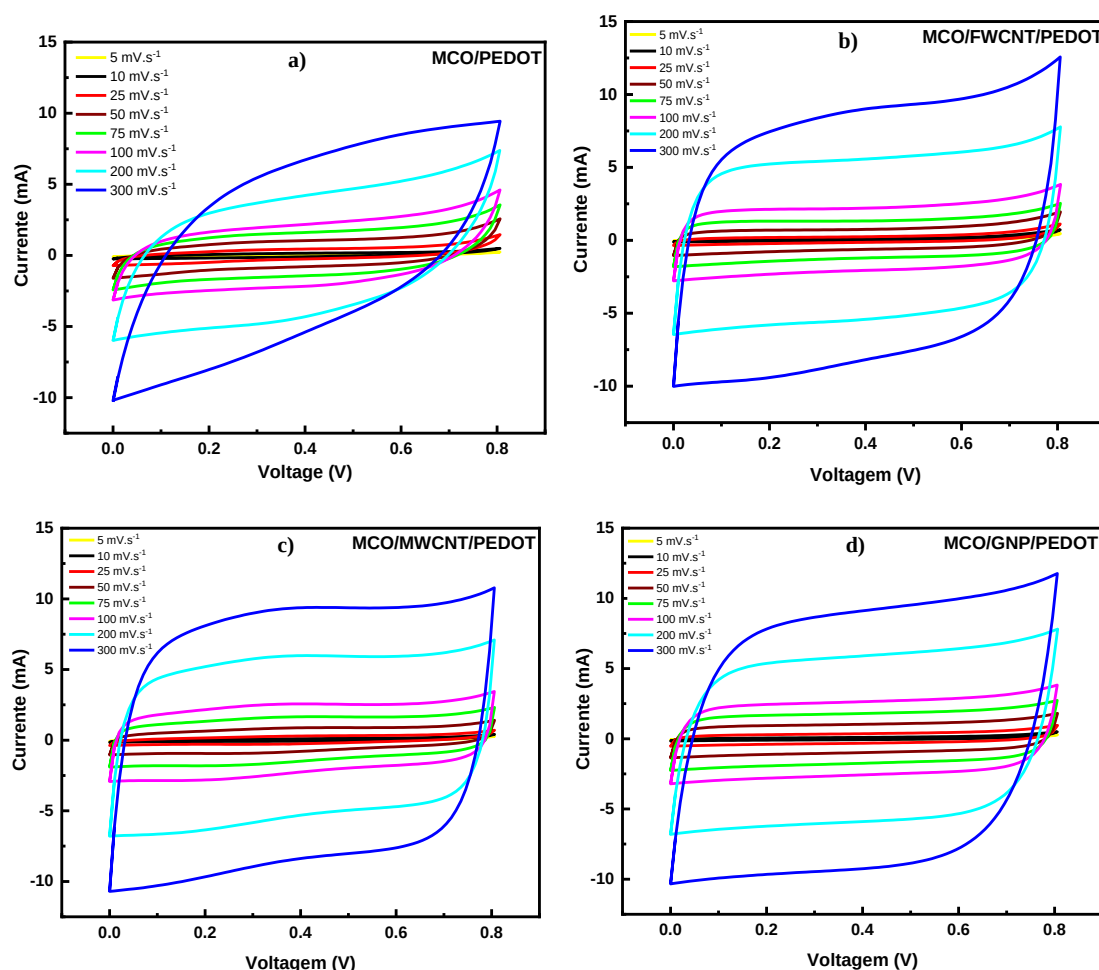


Fonte: O autor (2019)

6.3.2 Caracterização eletroquímica dos SC baseados em MCO/NEC/PEDOT

Após a caracterização química e morfológica dos eletrodos, a fim de mostrar a aplicabilidade deles na fabricação de dispositivos supercapacitores, foram examinadas as características eletroquímicas de dispositivos simétricos de $(2 \times 2) \text{ cm}^2$, nos quais os eletrodos consistiam em duas membranas de casca de ovo modificadas com NEC/PEDOT idênticas, separadas por um eletrólito sólido de $(\text{PVA} + \text{H}_3\text{PO}_4)$. Para todas as amostras, as curvas CV mostradas na Fig. 106 foram avaliadas usando uma taxa de varredura na faixa de 5 mV.s^{-1} a 300 mV.s^{-1} .

Figura 106 – Voltametria cíclica em diferentes taxas de varredura para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/FWCNT/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d).



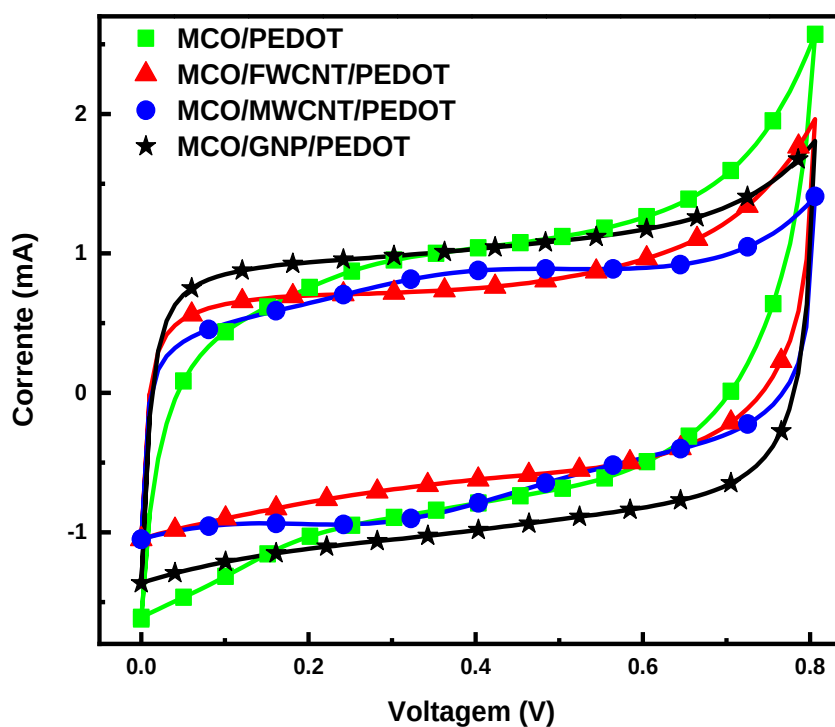
Fonte: O autor (2019)

Sabe-se que a forma de um voltamograma pode ser fortemente afetada pela taxa de varredura adotada, como resultado do fato de que em pseudocapacitores os

mecanismos estão relacionados à distribuição de poros e defeitos (Elgrishi, Rountree et al. 2018, Liu, Wang et al. 2018). Consequentemente, para extrair informações relevantes sobre os processos predominantes de armazenamento de energia faradaica/não-faradaica, é importante comparar respostas eletroquímicas que tenham sido obtidas usando a mesma taxa de varredura. Além disso, quando os mecanismos capacitivos se fazem dominantes (isto é, em uma resposta EDLC), as curvas CV apresentam uma forma mais retangular, enquanto que a presença de distorções como um comportamento esferoide prolato ou uma forma cônica costuma estar associada a processos pseudocapacitivos (Jiang and Liu 2019).

Na Fig. 107 apresentamos as curvas CV adquiridas a 50 mVs^{-1} para os diferentes tipos de amostras preparadas. Pode-se observar que a curva mais prolata corresponde ao dispositivo MCO/PEDOT, no qual não foi incorporado nenhuma nanoestrutura de carbono, sugerindo que o comportamento pseudocapacitivo do PEDOT domina os processos de armazenamento de energia correspondentes (Bryan, Santino et al. 2016). Por outro lado, amostras baseadas em carbono cobertas pelo PEDOT (curva preta (GNP), azul (MWCNT) e vermelha (FWCNT)) normalmente exibem uma forma mais retangular, enquanto um grau de desvio de uma forma de prolato pode ser observado para as amostras com um comportamento EDLC mais pronunciado (devido à incorporação de MWCNT, GNP e FWCNT).

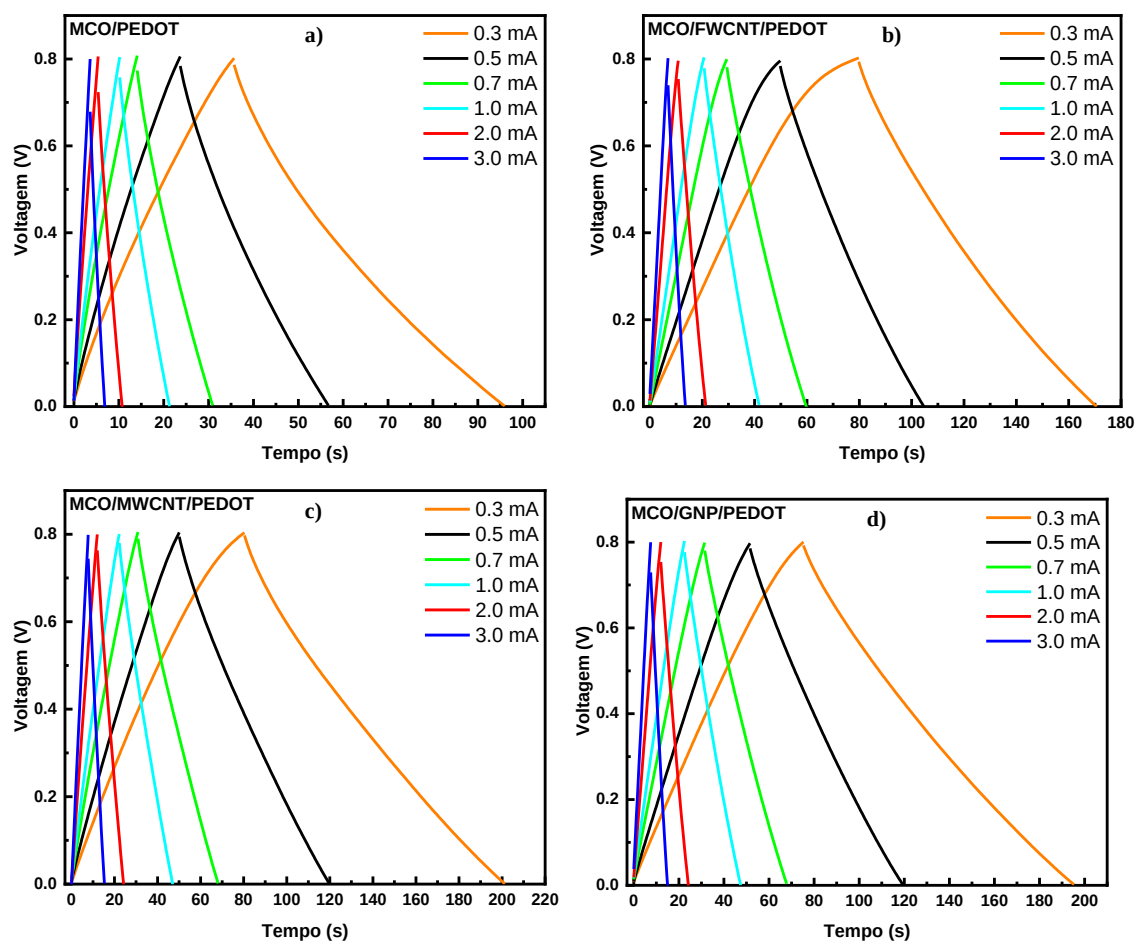
Figura 107 – Curvas de voltametria cíclica com uma taxa de varredura de 50 mV.s^{-1} para os dispositivos preparados com os diferentes eletrodos.



Fonte: O autor (2019)

Realizamos ainda ensaios de carga e descarga dos dispositivos (isto é, carga/descarga galvanostática - GCD), o que permitiu avaliar a capacitância dos dispositivos através do cálculo das áreas de descarga. O conjunto completo de curvas GCD obtidas para todas as amostras em diferentes densidades de corrente está resumido na Fig. 108.

Figura 108 – Curvas galvanométricas obtidas a diferentes valores de corrente para os dispositivos produzidos com os eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/FWCNT/PEDOT b), MCO/MWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d).

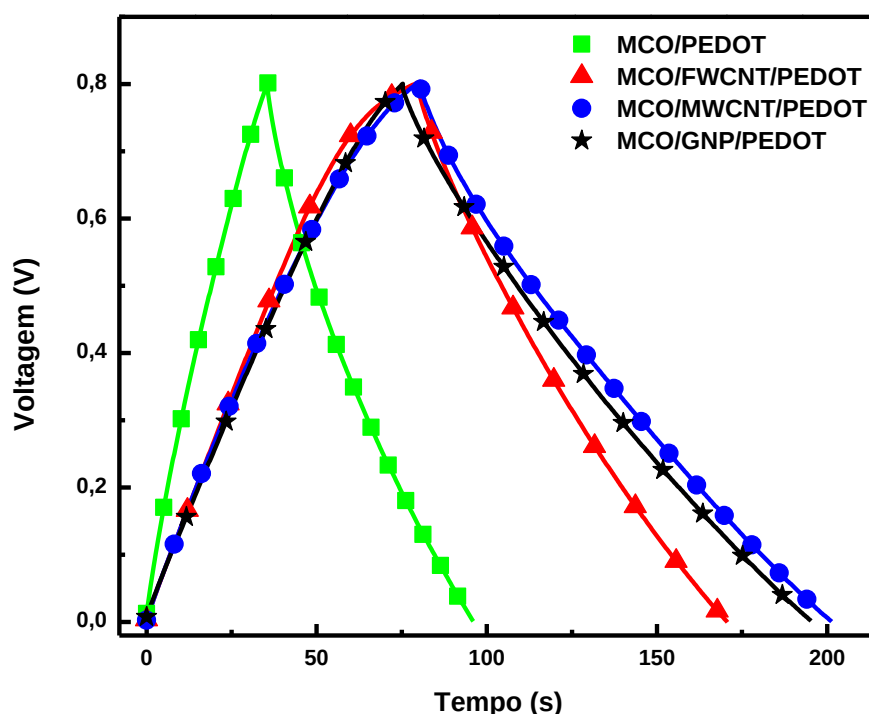


Fonte: O autor (2019)

Para efeito de comparação, na Fig. 109 também são mostradas as curvas de carga/descarga coletadas para as diferentes amostras a 0,3 mA. Como pode ser observado, para todas as amostras as curvas de carga/descarga tendem a segmentos retilíneos, ou seja, curvas com uma inclinação definida única, o que indica uma taxa de descarga constante associada a uma queda ôhmica (IR) muito pequena (isto é, a tensão inicial de descarga coincide com a tensão limite do processo de carregamento) (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018). Essa pequena queda IR indica a ocorrência de uma perda desprezível associada a resistências internas, e que há tanto uma boa difusão dos íons eletrolíticos, como um rápido acúmulo de cargas na superfície de contato entre o gel eletrolítico e os eletrodos (Chen, Cai et al. 2017). Além do mais, isso confirma que os eletrodos orgânicos flexíveis baseados em MCO/NECs/PEDOT têm baixa resistência, o que é uma vantagem importante para dispositivos de SC. Isso mostra que esses SCs híbridos são de fato dispositivos eletroquímicos muito promissores para aplicações de armazenamento de

energia (Alcaraz-Espinoza and de Oliveira 2018). Deve-se notar também que, além das características lineares das curvas de descarga, os dispositivos preparados com eletrodos MCO modificados com NECs exibiram um tempo de descarga mais longo e, portanto, um desempenho mais alto para armazenamento de energia – devido à capacitância específica superior correspondente. Deste modo, as contribuições simultâneas dos processos EDLC, que estão associados aos derivados de carbono incorporados, e dos mecanismos de pseudocapacitância (devidos à fração MCO/PEDOT) fazem com que os dispositivos obtidos tenham um desempenho eletroquímico mais eficiente.

Figura 109 – Curvas galvanométricas obtidas com corrente de 0,3 mA para os dispositivos preparados com os diferentes eletrodos.

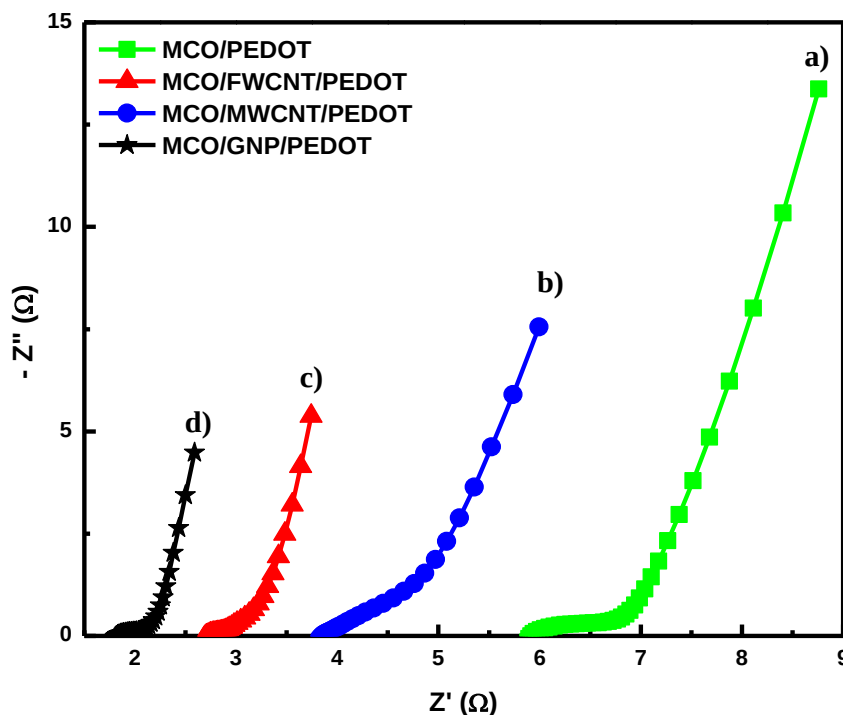


Fonte: O autor (2019)

O valor insignificante da queda de IR observada nas curvas GCD é uma consequência da alta condutividade dos eletrodos utilizados. A medição da impedância das amostras (expressa em termos de gráficos de Nyquist (Mei, Munteshari et al. 2018)) fornece informações relevantes sobre as propriedades elétricas dos dispositivos, uma vez que a resistência dos dispositivos pode ser obtida a partir da interseção das curvas $Z''(\Omega)$ com o eixo $Z'(\Omega)$. Como mostrado na Fig. 110, a resistência dos diferentes dispositivos cobertos pelo PEDOT observa a ordem decrescente PEDOT > MWCNT > FWCNT > GNP, com a variação relativamente pequena dos valores (na faixa de 2 Ω a 6 Ω) revelando

que as propriedades elétricas correspondentes são boas, como um resultado de ótima interação sinérgica entre o PEDOT e os derivados de carbono que foram incorporados nos eletrodos MCO.

Figura 110 – Impedância elétrica dos dispositivos SCs preparados com os eletrodos MCO/PEDOT a), MCO/MWCNT/PEDOT b), MCO/FWCNT/PEDOT c), e MCO/GNP/PEDOT d).



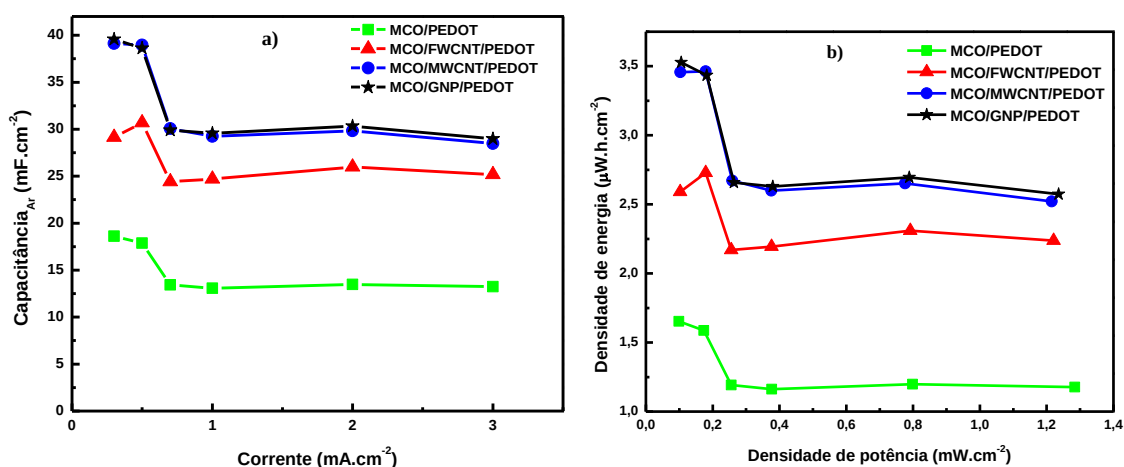
Fonte: O autor (2019)

Na Fig. 111a é mostrada a capacitância por área calculada a partir da Eq. 6.1 para os diferentes SCs. Como mostrado no gráfico, os diferentes dispositivos apresentaram o máximo valor de capacitância para a densidade de corrente de $0,3 \text{ mA.cm}^{-2}$ (MCO/GNP/PEDOT = $39,62$; MCO/MWCNT = $39,11$; MCO/FWCNT/PEDOT = $29,14$; e MCO/PEDOT = $18,61 \text{ mF.cm}^{-2}$), o que se reduz à medida que a densidade aplicada aumenta. No caso dos dois melhores SCs (MCO/GNP/PEDOT e MCO/MWCNT/PEDOT), a capacitância passa de $39,62$ e $39,11 \text{ mF.cm}^{-2}$ para $28,97$ e $28,46 \text{ mF.cm}^{-2}$, respectivamente, quando a densidade aumenta de $0,3$ para 3 mA.cm^{-2} , em uma redução de mais 26% da capacitância. Esse comportamento, como já esperado, pode estar associado a dois fatos: o primeiro se refere à velocidade dos processos de oxirredução (do PEDOT) responsáveis pela parte de armazenamento pseudocapacitivo. Por serem lentos tais processos, em altas densidades de corrente nem todas as reações eletroquímicas acabam ocorrendo na totalidade de sítios disponíveis no eletrodo (Sarkar

and Gopal Khan 2018). Por outro lado, em um segundo ponto, em elevadas densidades de corrente os íons eletrolíticos (H_3PO_4) não possuem tempo suficiente para penetrar ao longo dos poros e ter acesso aos sítios internos, dando-se o acúmulo de carga apenas nos sítios dispostos na superfície dos eletrodos (Kularatna 2014).

Como já apresentado, os SCs preparados a partir dos eletrodos MCO/GNP/PEDOT e MCO/MWCNT/PEDOT se mostraram os melhores dispositivos. Essa resposta superior observada para esses SCs está possivelmente associada de modo fundamental ao tamanho das NECs incorporadas. Como discutido, o método de incorporação por ultrassom cria microjatos e ondas de choque, que aliados a NECs de menor tamanho, como é o caso dos GNP (diâmetro médio de partícula menor que $2\text{ }\mu\text{m}$) e dos MWCNT (dimensões médias de $6\text{-}9\text{ nm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$), permitiria hipoteticamente uma maior penetração dessas nanoestruturas, e consequentemente a incorporação de uma maior quantidade de material nas membranas de MCO. Isso por sua vez forneceria uma maior área superficial para a adsorção de oxidante, resultando em mais pontos de nucleação para o crescimento de cadeias de PEDOT, levando desse modo a uma maior capacitância em relação aos outros eletrodos, como observado. Ademais, essa conclusão é corroborada pela análise dos tamanhos médios das fibras (ver Fig. 105) e a área superficial (ver Tabela 12) de cada eletrodo, onde vemos que esses dois eletrodos têm os maiores diâmetros ($\text{MCO/GNP/PEDOT} = 4,5 \pm 1,08\text{ }\mu\text{m}$; $\text{MCO/MWCNT/PEDOT} = 3,6 \pm 0,79\text{ }\mu\text{m}$), o que mostra que uma maior quantidade de material ativo compõe esses eletrodos.

Figura 111 – Capacitância elétrica em função da densidade de corrente aplicada a), e o diagrama de Ragone para os dispositivos SCs preparados com os diferentes eletrodos baseados em MCO/NECs/PEDOT.



Fonte: O autor (2019)

O diagrama de Ragone é uma ferramenta muito importante para comparar as

propriedades de armazenamento dos mais variados dispositivos (baterias, capacitores, células combustíveis, entre outros). Conceitualmente, ele descreve a quantidade de energia que pode ser armazenada (eixo Y), e a rapidez com que a energia pode ser fornecida (eixo X), de um dado dispositivo (Kularatna 2014). Desse modo, por meio do uso das Eqs. 6.2 e 6.3 foi estimado tanto a densidade de potência (DP) quanto a densidade de energia (DE) dos dispositivos preparados, com as quais foram construídos os diagramas de Ragone correspondentes, mostrados na Fig. 111b. Como se pode observar pelo desempenho dos dispositivos MCOESM/NEC/PEDOT dos correspondentes diagrama, a combinação dos valores de densidade de energia e densidade de potência segue a ordem decrescente $GNP > MWCNT > FWCNT > PEDOT$ puro. Assim como no caso da capacitância, no diagrama vemos que a densidade de energia e a potência dos dispositivos (com corrente 0,3 mA) que utilizam os eletrodos de MCO/GNP/PEDOT ($DE = 3,57 \mu W.h.cm^{-2}$; $DP = 0,11 mW.cm^{-2}$) e MCO/MWCNT/PEDOT ($DE = 3,43 \mu W.h.cm^{-2}$; $DP = 0,10 mW.cm^{-2}$) apresentam os maiores valores, que inclusive são muito similares.

Diante de tais resultados, mesmo que muito próximos, vemos que a inclusão do GNP no eletrodo MCO levou a um menor valor de impedância. Além disso, como mostrado por medidas de BET (ver Tabela 12) sua incorporação resulta em uma área de superfície aumentada, permitindo assim uma maior contribuição dos mecanismos EDLC para os processos de armazenamento de carga, como pode ser percebido pelo perfil mais retangular (ver Fig. 106) das curvas de voltametria (Jiang and Liu 2019). Dessa forma, estabelecemos os SCs baseados em eletrodos de MCO/GNP/PEDOT como dispositivos modelos que podem ser utilizados nos experimentos relacionados ciclabilidade e estresse mecânico.

6.3.2.1 Testes de ciclabilidade e estabilidade mecânica

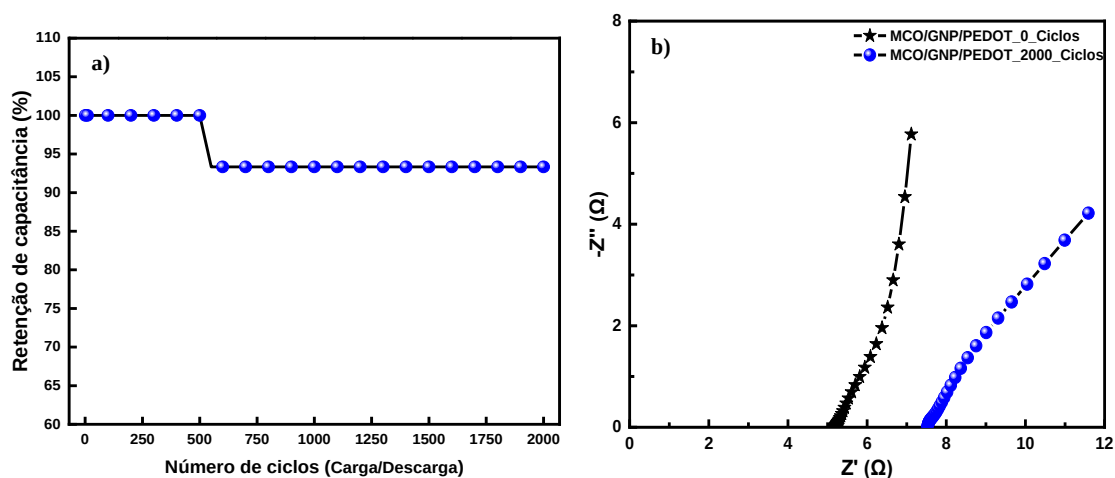
O desempenho de um dispositivo SC não deve ser medido apenas por parâmetros relacionados às suas características de acumulação de carga (como densidade de energia, capacitância específica e densidade de potência), apesar da importância de tais parâmetros. De fato, a operação prática de um SC depende também de sua resistência a repetidos ciclos de trabalho e, especialmente no caso de dispositivos flexíveis (dobráveis), à sua resistência mecânica a ensaios de sucessivas flexões, isto é, da estimativa de quão resiliente será a flexibilidade do dispositivo. Um bom supercapacitor deve ser capaz de preservar suas propriedades eletroquímicas sob um uso contínuo (ciclos de carga/descarga) e permanente estresse mecânico. À vista disso, avaliamos o desempenho

do dispositivo modelo MCO/GNP/PEDOT em termos dessas propriedades, ao medir suas propriedades elétricas enquanto submetido a 2000 ciclos de carga/descarga com uma densidade de corrente de 6 mA.cm^{-2} , e a 2000 operações consecutivas de dobragem de 0 a 180° .

Na Fig. 112a é mostrado o comportamento capacitivo em função do número de ciclos de carga/descarga do SC. Como podemos ver, a capacitância do dispositivo MCO/GNP/PEDOT é minimamente afetada pelos ciclos repetidos de carga/descarga, e retém mais de 93% do seu valor inicial mesmo após os 2000 ciclos. Isso mostra que o dispositivo é muito estável, e pode vir a ser usado de forma prolongada, quando comparado com outros dispositivos SCs baseados em PEDOT, como aquele relatado por Sen e colaboradores (Sen and De 2010), que apresenta a retenção de 84 % da capacitância após apenas 500 ciclos de carga/descarga. Já nos trabalhos de Fu (Fu, Li et al. 2016, Fu, Zhou et al. 2016), Tang (Tang, Han et al. 2014), Xie (Xie, Du et al. 2015), e Xu (Xu, Huang et al. 2014) são reportadas retenções na faixa de 80 – 89 % para um número de 2000 ciclos. Por outro dado, é possível encontrar valores de retenção inferiores a 70 % (Liu 2008, Suppes, Cameron et al. 2010, Pandey and Rastogi 2012, Hsu, Chen et al. 2013), e outros acima de 95 % (Zhou, Han et al. 2014, Kurra, Wang et al. 2015, Lehtimäki, Suominen et al. 2015, Qu, Cheng et al. 2016, Zhou, Zhai et al. 2016, Zhou and Zhi 2017), mostrando uma menor estabilidade capacitiva desses dispositivos.

Na Fig. 112b, é apresentada a impedância do supercapacitor MCO/GNP/PEDOT antes e depois dos 2000 ciclos de carga/descarga. A mudança na interseção da curva característica com o eixo $Z'(\Omega)$, que corresponde a um aumento na resistência característica, está associada à degradação dos mecanismos de transporte induzidos pelo envelhecimento operacional do dispositivo. Mesmo assim, pode-se notar que esse aumento é relativamente pequeno, na faixa de 3 ohms.

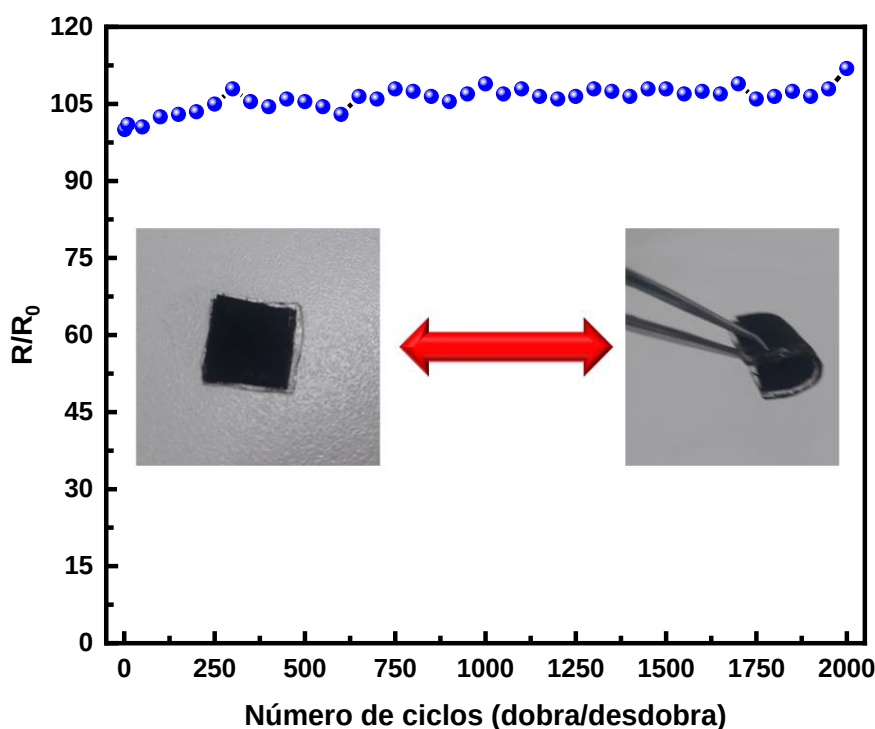
Figura 112 – Estudos de estabilidade dos dispositivos SC preparados com eletrodos MCO/GNP/PEDOT; a) eficiência de retenção da capacitância, e b) variação da impedância após 2000 ciclos de carga/descarga.



Fonte: O autor (2019)

De maneira semelhante, nos estudos de dobramento do dispositivo (Fig. 113), a resistência global medida do dispositivo MCO/GNP/PEDOT é essencialmente invariável durante 2000 etapas repetidas de dobramento (0° a 180°). Esses resultados confirmam que os supercapacitores baseados em eletrodos de MCO/NECs/PEDOT combinam boas características elétricas e uma resistência física confiável, o que permite que venham a ser usados como dispositivos dobráveis práticos. No detalhe da Fig. 113 é mostrado o SC de MCO/GNP/PEDOT em seu estado estendido a 0° , e dobrado a 180° .

Figura 113 – Variação da resistência elétrica dos dispositivos SCs MCO/GNP/PEDOT quando submetido a 2000 ciclos consecutivos de dobramento de 0 a 180°. Em detalhe, o dispositivo SCs de MCO/GNP/PEDOT em sua configuração (0°) normal e dobrado (180°).



Fonte: O autor (2019)

6.3.3 Comparação com dispositivos relatados na literatura

Na Tabela 13, comparamos algumas características relevantes dos supercapacitores MCO/NECs/PEDOT com as de outros dispositivos baseados em PEDOT, recentemente relatados na literatura. Como se pode observar, a capacitância da área (com densidade de corrente de $0,3 \text{ mA.cm}^{-2}$) dos dispositivos MCO/GNP/PEDOT variou entre $29 - 39,6 \text{ mF.cm}^{-2}$. Como podemos observar, esse valor de capacitância está em uma faixa intermediária. Porém, quando os dispositivos MCO/NECs/PEDOT são comparados a outros de maior capacitância (Zhou (Zhou, Han et al. 2014, Zhou, Zhai et al. 2016), Xie (Xie, Du et al. 2015), e Kurra (Kurra, Wang et al. 2015), por exemplo), vemos que a vantagem do substrato ESM sobre estes está associada a sua flexibilidade, que permite a obtenção de dispositivos maleáveis. Além disso, os SCs (especificamente o MCO/GNP/PEDOT) apresentaram um ótimo desempenho em termos de ciclabilidade, como uma alta retenção capacitiva superior a 93% após 2000 ciclos. Isso os coloca entre os dispositivos quando se considera o uso prolongado dos SCs. Adicionalmente, esse tipo de dispositivo não só pode ser fabricado a um custo menor, uma vez que se baseia em um material extraído de resíduos, como também combina características operacionais

vantajosas, como uma capacitância estável de alto nível e uma resposta mecânica resiliente. Portanto, os supercapacitores MCO/NECs/PEDOT mantém a promessa de permitir a construção de dispositivos dobráveis práticos e confiáveis.

Tabela 13 – Comparação dos SC CMO/PEDOT modificados com nanoestruturas de carbono com outros SCs baseados em PEDOT relatados na literatura.

Material ativo	Substrato	Síntese	Separador	Capacitância (mF.cm ⁻²)	Ciclabilidade (carga/descarga)	Retenção da capacitância (%)	Ref.
PEDOT/CNT/GO	Vidro	Eletroquímica	-	150,6	10000	95,2	(Zhou and Zhi 2017)
PEDOT/CNT/GO	-	Eletroquímica	PVA/H ₃ PO ₄	33,4	5000	97,5	(Zhou, Zhai et al. 2016)
PEDOT/SDS-GO	Vidro	Eletroquímica	Papel/KCl	79,6	5000	97,5	(Zhou, Han et al. 2014)
Grafite/PEDOT/MnO ₂	celulose	Eletroquímica	Comercial (celulose)	316,4	2000	81,1	(Tang, Han et al. 2014)
MOF/GO/PEDOT	Blenda polimérica (PVDF)	Eletroquímica	PVA/H ₃ PO ₄	128,0	2000	89,8	(Fu, Li et al. 2016)
Nanotudo de TiO ₂ /PEDOT TiO ₂ /PEDOT	Folha de titânio	Eletroquímica	PVA/H ₂ SO ₄	255,5 62,3	200	84,3	(Xie, Du et al. 2015)
Vitamina C/GO/PEDOT:PSS	Fibra têxtil	-	PVA/H ₃ PO ₄	304,5	10000	96,0	(Qu, Cheng et al. 2016)
GO/PEDOT	MOF/filmes CNT	Eletroquímica	-	30,0	1000	89,0	
Carvão ativado/PEDOT:PSS Carvão ativado/PEDOT	Folha de titânio	Eletroquímica	-	26,0 42,0	—	—	(SONIA, MINI et al. 2013)
MWCNT/ PEDOT:PSS	MWCNT alinhados	-	Solução de PBS	32,9	1000	95,0	(Sim, Choi et al. 2018)
PEDOT/Au – Pani/Au	Grafite	Eletroquímica	PVA/H ₂ SO ₄	66,0	10000	87,0	(Kurra, Wang et al. 2015)
PEDOT/GNP	Grafite	Eletroquímica	BMIBF ₄ /P(VdF -HFP)/ LiClO ₄	66,2	—	—	(Obeidat and Rastogi 2016)
PEDOT:PSS	PET	-	PVA/H ₃ PO ₄	4,7	1000	97,0	(Cheng, Zhang et al. 2016)
PEDOT/GO	PET	Eletroquímica	Líquido iônico	25,0	2000	93,0	(Lehtimäki, Suominen et al. 2015)
PEDOT:PSS/CNT	Sylgard 184	-	PVA/H ₃ PO ₄	64,0	3000	80,0	(Zhu, Li et al. 2018)
PEDOT:PSS/MWCNT	Wafer silício	Eletroquímica	PVA/H ₂ SO ₄	20,6	2000	99,0	(Tahir, He et al. 2019)
PEDOT	Folha de grafite	Eletroquímica	BMIBF ₄ /P(VdF -HFP)	88,4	10000	75,0	(Pandey and Rastogi 2012)
PEDOT-PANI-PSS-MnO ₂	Vidro/ITO	<i>In Situ</i>	-	61,5	500	68,0	(Liu 2008)
PEDOT/GNP				39,6	2000	93,3	Este trabalho
PEDOT/MWCNT	Membrana de ovo	Fase-Vapor	PVA/H₃PO₄	39,1			
PEDOT/FWCNT				29,2			

Fonte: O autor (2019)

CNT – Nanotubo de carbono; GO – Óxido de grafeno; MnO_2 – Dióxido de magnésio; MOF – Redes Metal – orgânicas; TiO_2 – Dióxido de titânio; SDS – Dodecilsulfato de sódio; PSS – Poli(estirenosulfonato); GNP – Nanoplaquetas de grafeno; PANI – Polianilina; PVDF – Poli(Fluoreto de vinilideno); BMIBF₄ – 1-metil-3- butilimidazólio tetrafluoroborato.

6.4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados ao longo deste capítulo comprovam ter sido possível alcançar os objetivos de preparar eletrodos orgânicos flexíveis usando como substrato membranas de casca de ovo e utilizá-los para a construção de supercapacitores orgânicos flexíveis. A estratégia de incorporação de nanoestruturas de carbono por meio de banho ultrassom e polimerização do PEDOT via fase-vapor se mostrou interessante devido sua simplicidade e ao uso de um material ecologicamente correto como a COM.

Por meio de caracterizações químicas (FTIR e Raman) e morfológicas (MEV e BET) comprovamos que de fato a incorporação das diferentes NECs e do polímero condutor PEDOT nas MCO foi realizada com sucesso. Além disso, verificamos que as dimensões das NECs (GNP<MWCNT<FWCNT) têm influência direta sobre o diâmetro final dos eletrodos, de modo a que quanto menor a NEC, maior o diâmetro do eletrodo e, por consequência, maior a quantidade de material ativo e mais elevada a capacitância dos respectivos dispositivos SCs. Os diâmetros médios das fibras foram determinados como sendo iguais a 2,2, 3,3, 3,6 e 4,5 μm para a MCO pura, MCO/FWCNT/PEDOT, MCO/MWCNT/PEDOT e MCO/GNP/PEDOT, respectivamente.

No que diz respeito à aplicação dos eletrodos em dispositivos de armazenamento de energia, a partir da junção de dois eletrodos separados por um gel eletrolítico (separador) de PVA/ H_3PO_4 conseguimos construir diferentes supercapacitores orgânicos de estado sólido e de configuração simétrica, que foram posteriormente caracterizados eletroquimicamente. Os resultados obtidos demonstraram que os SCs construídos com base em diferentes eletrodos exibiram capacitâncias de 18,61 a 39,62 mF.cm^{-2} , e densidades de energia e potência na faixa de 1,65 – 3,57 $\mu\text{W.h.cm}^{-2}$ e 0,09 – 0,11 mW.cm^{-2} , respectivamente. Os baixos valores de impedância encontrados (2 – 6 Ohms) confirmam que os eletrodos ESM modificados devem ter uma alta condutividade, como resultado da ótima interação sinérgica entre o PEDOT e os derivados de carbono incorporados na MCO. Os maiores valores de capacitâncias e densidades (energia e potência) foram encontrados para os dispositivos MCO/GNP/PEDOT e MCO/MWCNT/PEDOT, nessa ordem. Essa resposta está de acordo com a análise feita a partir das caracterizações morfológicas correspondentes, já que, como mencionado, uma maior quantidade de material ativo foi incorporada nesses dois tipos de eletrodos.

A investigação das propriedades mecânicas e de ciclabilidade feitas para os SCs modelo do tipo MCO/GNP/PEDOT revelou que esses dispositivos apresentam uma alta

retenção capacitiva (ou seja, ele consegue manter sua capacitância máxima durante vários ciclos de car/descarga) e não sofrem perdas eletroquímicas significativas quando sob estresse mecânico. Nesses ensaios, mais de 93% da capacitância inicial foi preservada após 2000 ciclos de carga/descarga, ao mesmo tempo em que a resistência do dispositivo se manteve inalterada quando ele era submetido a 200 ciclos de dobramento de 0 a 180°. Desse modo, os dispositivos compostos resultantes, que foram produzidos de uma maneira sustentável (isto é, usando um resíduo como material para o suporte), são mecanicamente flexíveis, apresentando bom desempenho eletroquímico, resistência interna negligenciável, e uma alta retenção capacitiva - características que representam vantagens competitivas para a utilização mais extensiva desses materiais na construção de dispositivos SCs.

7 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Ao longo deste trabalho discutimos os métodos de preparação e caracterização de materiais nanoestruturados baseados em polímeros condutores e suas aplicações para a purificação de ácidos nucleicos, a remoção de contaminantes em meios aquosos e dispositivos eletroquímicos de armazenamento de energia. Os materiais nanoestruturados desenvolvidos foram nanocompósitos magnéticos híbridos de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com os polímeros PEDOT e Pani, membranas eletrofiadas de PVDF modificadas com PEDOT e eletrodos orgânicos obtidos a partir da incorporação de nanotubos de carbono, nanopellets de grafeno e PEDOT em membranas proteicas da casca de ovo.

Os nanocompósitos magnéticos de γ -NPs/PEDOT e γ -NPs/Pani obtidos através das rotas de polimerização em fase-vapor e emulsão, respectivamente, foram utilizados com sucesso como novos materiais adsorventes de fase sólida para a purificação de DNA total e plasmídeo a partir de amostras biológicas complexas. Os resultados demonstraram que, com base nos protocolos de purificação desenvolvidos, os dois nanocompósitos levaram à obtenção de DNA de pureza adequada e com bons rendimentos médios para a purificação de DNA total e DNA plasmídeo.

Mostramos ainda que esses nanocompósitos (especificamente, usando o γ -NPs/Pani) podem ser usados como agentes eficientes para a captura de células bacterianas em meio aquoso. Além disso, mostramos que o nanocompósito γ -NPs/PEDOT apresenta características vantajosas, tais como: i) se manter em condições funcionais por um período de no mínimo 12 meses, ii) não ser um inibidor da reação de PCR, e que pode ser adicionado diretamente na reação, tornando desnecessária uma etapa prévia de eluição, e iii) apresentar valores de rendimento e pureza comparáveis aos de diferentes kits comerciais de purificação magnética de DNA a partir de amostras de sangue. Deste modo, acreditamos que os nanocompósitos desenvolvidos podem ter aplicações práticas na área de biologia molecular, como, por exemplo, serem disponibilizados na forma de kits comerciais de purificação de DNA.

Como principais perspectivas relacionadas com a aplicação dos nanocompósitos magnéticos, temos:

- Melhorar a pureza (ou seja, otimizar o valor da razão 280/260) da fração de DNA total purificada a partir de amostras bacterianas Gram-negativas, o que pode

envolver, por exemplo, a adição de etapas de lavagem com isopropanol, ou ainda um aumento no volume de agentes digestores como proteinase e RNase;

- Buscar o desenvolvimento de metodologias para a purificação de DNA a partir de diferentes amostras biológicas, como vírus, tecidos, saliva, plantas, bactérias Gram-positivas, entre outras;
- Realizar experimentos a fim de explorar a aplicação desses materiais em protocolos de purificação de outras biomoléculas como RNA e proteínas;
- Otimizar a metodologia de captura celular em meios aquosos e investigar sua aplicação como agente concentrador de amostras em etapas preliminares de identificação de contaminação ambiental, ou ainda no diagnóstico de doenças como a infecção de trato urinário.

Por sua vez, as membranas de PVDF/PEDOT apresentaram uma boa performance ao serem usadas para a remoção de corantes em meios aquosos, exibindo uma capacidade máxima de 143 mg/g à temperatura ambiente, e 293 mg/g quando a temperatura do sistema é elevada para 50 °C. Essas membranas também possuem ótima estabilidade química, podendo ser reutilizadas em sucessivos ciclos de adsorção/dessorção (no presente trabalho, elas foram utilizadas em 20 ciclos consecutivos), sem perda significativa de sua eficiência. Mostramos ainda que as membranas de PVDF/PEDOT podem ser utilizadas em sistemas de remoção arranjados em diferentes configurações, sendo esse um fator de grande influência sobre a cinética de adsorção. Além do mais, estudos preliminares nos permitiram mostrar que elas possuíam a capacidade de adsorver outros corantes catiônicos, como o vermelho do congo e o índigo carmim. Apesar de que estudos mais completos se fazerem ainda necessários para melhor estabelecer suas reais propriedades adsorptivas para cada um desses corantes, é nossa expectativa que essas membranas possam vir a ser usadas para a remoção de outros contaminantes, tais como:

- outros corantes catiônicos;
- íons de metais pesados, como cromo, cobre, manganês, chumbo, mercúrio, entre outros;
- amostras reais de efluentes provenientes de indústrias têxteis ou couro, para o que seriam necessários estudos mais detalhados;
- tratamento secundário em sistemas de descontaminação de efluentes, ao serem utilizadas para a preparação de cartuchos de filtração;
- e, adicionalmente, na adsorção de biomoléculas, em protocolos específicos de separação e purificação.

Deve ser também destacado que, em uma perspectiva distinta de outro tipo de aplicações de nanocompósitos poliméricos, mostramos ser possível a preparação de eletrodos orgânicos flexíveis cujo suporte era feito a partir de resíduos da casca de ovo (sendo assim, um material de natureza sustentável). Esses eletrodos foram então utilizados para a confecção de dispositivos eletroquímicos supercapacitores simétricos de estado sólido. Os resultados obtidos demonstraram que os dispositivos assim obtidos apresentavam uma baixa resistência interna, boa capacitância e alta retenção capacitiva (mantendo mais de 93% do valor da capacitância inicial, após dois mil ciclos de carga/descarga). Os estudos com os diferentes tipos de nanoestruturas de carbono mostraram que as nanoestruturas têm influência sobre a resposta capacitiva dos dispositivos, sendo que os melhores valores de capacitância foram obtidos quando as menores nanoestruturas (no sentido de tamanho) eram utilizadas no processo de preparação dos eletrodos. Foi mostrado também que, quando submetidos a ensaios mecânicos de sucessivos ciclos de dobramento, esses dispositivos não sofriam perdas eletroquímicas significativas. Dessa maneira, esses eletrodos exibiram um conjunto de vantagens competitivas para seu uso mais extensivo para a construção de dispositivos SCs. Assim, temos os seguintes pontos como possíveis perspectivas de futuros trabalhos de desenvolvimento:

- A incorporação de outras nanoestruturas (como óxido de grafeno), seguida de sua redução química, para o aumento da condução e da área superficial do eletrodo;
- Adição de óxidos metálicos, com o intuito de que se possa aumentar a contribuição da pseudocapacitância por meio das reações oxiredutivas desses materiais;
- A utilização de outros eletrólitos, como cloreto de lítio, ácido sulfúrico, cloreto de potássio entre outros, a fim de melhorar a mobilidade de íons;
- Aumentar a quantidade de polímero incorporado no eletrodo, de modo a obter uma maior quantidade de sítios de oxirredução aumentando o armazenamento de carga faradaica;
- Explorar rotas químicas ou físicas que possam levar ao aumento do tamanho das membranas da casca de ovo, como, por exemplo, usar ultrassom para romper a reticulação das fibras proteicas através de um intenso estresse mecânico, de modo a criar suspensões que possam ser utilizadas para a preparação de membranas com diferentes formas e espessuras.

Finalmente, deve ser mencionado que alguns dos projetos relatados nesta tese levaram a desdobramentos e resultados que não foram aqui discutidos.

Esse é o caso, por exemplo, da síntese de outros nanocompósitos, como aquele constituído pelo revestimento de nanopartículas de óxido de ferro com o polímero politiofeno (γ -NPs/PTh), por meio da síntese baseada na reação Fenton, resultando em um material que mostrou bom desempenho na adsorção de DNA e corantes dissolvidos em meios aquosos, estando este trabalho em fase de escrita do artigo, e já sido apresentado em 2 congressos internacionais na modalidade de poster. Por sua vez, estão em fase inicial testes desses nanocompósitos magnéticos como agentes teranósticos¹⁰ que exibam ação terapêutica em células tumorais, em uma colaboração com pesquisadores do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz). Além disso, a empresa Nanomark (www.nanomark.com.br), que mantém colaboração com o grupo PNC, demonstrou interesse no uso do nanocompósito γ -NPs/PEDOT para o desenvolvimento de um kit comercial (100% nacional) de purificação de DNA a partir de amostras de sangue humano total.

Já em relação ao trabalho com os dispositivos supercapacitores, que foi desenvolvido em colaboração com o laboratório LEIMO (UNIVASF), desde junho de 2019 foi firmado um acordo de colaboração com a empresa Sunew (www.sunew.com.br), uma subsidiária da CSEM Brasil, em um projeto de P&D para o desenvolvimento de eletrodos impressos para supercapacitores.

Finalmente, conseguimos nos últimos meses resultados preliminares na preparação de membranas compósitas de nanotubos de carbono e fibras proteicas após implementarmos a desreticulação das membranas de casca de ovo por meio de intenso estresse mecânico (ultrassom). Esse processo permite uma incorporação maior e mais homogênea das nanoestruturas de carbono na membrana, o que viria solucionar o problema do limitado tamanho das membranas “*in natura*”.

Por fim, as membranas de casca de ovo vêm também sendo investigadas como uma plataforma para a imobilização de nanopartículas de ouro (explorando assim a grande quantidade de grupos funcionais de suas glicoproteínas constituintes, como o dermatan sulfato e o sulfato de condroitina, que fornecem sítios com enxofre para a

¹⁰ **Agentes teranósticos:** materiais que atuam tanto para o diagnóstico de uma doença, assim como agentes terapêuticos para essa doença.

imobilização), em estruturas a serem usadas para o sensoriamento de ácidos nucleicos. Provas de conceito realizadas até o momento demonstraram ser bastante promissor esse sistema de bioreconhecimento.

REFERÊNCIAS

- (2017). *Advanced Environmental Analysis: Applications of Nanomaterials*, volume 1. Cambridge, Royal of Chemistry.
- ADDGENE. (2012). "Inoculating a Liquid Bacterial Culture." Retrieved 05/09, 2017, from <https://www.addgene.org/protocols/inoculate-bacterial-culture/>.
- AHMADI, R., M. MALEK, H. R. M. HOSSEINI, M. A. SHOKRGOZAR, M. A. OGHABIAN, A. MASOUDI, N. GU and Y. ZHANG (2011). "Ultrasonic-assisted synthesis of magnetite based MRI contrast agent using cysteine as the biocapping coating." *Materials Chemistry and Physics* 131(1): 170-177.
- AI, L., J. JIANG and R. ZHANG (2010). "Uniform polyaniline microspheres: A novel adsorbent for dye removal from aqueous solution." *Synthetic Metals* 160(7): 762-767.
- ALABBAS, F. M., A. KAKPOVBIA, D. L. OLSON, B. MISHRA and J. R. SPEAR (2012). "The Role of Bacterial Attachment to Metal Substrate and Its Effects on Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) in Transporting Hydrocarbon Pipelines." *Biomaterials Science: Processing, Properties and Applications II: Ceramic Transactions*, Volume 237: 131-144.
- ALBERTS, B. (2019). *Essential cell biology*. New York, W.W. Norton & Company.
- ALCARAZ-ESPINOZA, J. J., A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO, J. C. MEDINA-LLAMAS, C. A. S. ANDRADE and C. P. de MELO (2015). "Hierarchical Composite Polyaniline–(Electrospun Polystyrene) Fibers Applied to Heavy Metal Remediation." *ACS Applied Materials & Interfaces* 7(13): 7231-7240.
- ALCARAZ-ESPINOZA, J. J., C. P. de MELO and H. P. de OLIVEIRA (2017). "Fabrication of Highly Flexible Hierarchical Polypyrrole/Carbon Nanotube on Eggshell Membranes for Supercapacitors." *ACS Omega* 2(6): 2866-2877.
- ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. and H. P. de OLIVEIRA (2018). "Flexible supercapacitors based on a ternary composite of polyaniline/polypyrrole/graphite on gold coated sandpaper." *Electrochimica Acta* 274: 200-207.
- ALEMÁN, C., B. TEIXEIRA-DIAS, D. ZANUY, F. ESTRANY, E. ARMELIN and L. J. del VALLE (2009). "A comprehensive study of the interactions between DNA and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)." *Polymer* 50(8): 1965-1974.
- ALLOCATI, N., M. MASULLI, M. F. ALEXEYEV and C. DI ILIO (2013). "Escherichia coli in Europe: an overview." *International journal of environmental research and public health* 10(12): 6235-6254.
- ALVES, K. G. B., J. F. FELIX, E. F. de MELO, C. G. dos SANTOS, C. A. S. ANDRADE and C. P. de MELO (2012). "Characterization of ZnO/polyaniline nanocomposites prepared by using surfactant solutions as polymerization media." *Journal of Applied Polymer Science* 125(S1): E141-E147.
- AN, G. S., S. W. CHOI, D. H. CHAE, H. S. LEE, H.-J. KIM, Y. KIM, Y.-G. JUNG and S.-C. CHOI (2017). " γ -Fe₂O₃@SiO₂ core-shell structured nanoparticle: Fabrication via

surface treatment and application for plasmid DNA purification." *Ceramics International* 43(15): 12888-12892.

ANANDHAKUMAR, S., J. MATHIYARASU, K. L. N. PHANI and V. YEGNARAMAN (2011). "Simultaneous Determination of Cadmium and Lead Using PEDOT/PSS Modified Glassy Carbon Electrode." *American Journal of Analytical Chemistry* Vol.02No.04: 5.

ANJOS, M. P. D., BERTONCINI, R. C. C. (2012). "Manual de orientação para coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas " Retrieved 04/26, 2017, from <http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/MCT01.pdf>.

ANSARI, M. O., R. KUMAR, N. PARVEEN, M. A. BARAKAT and M. H. CHO (2015). "Facile strategy for the synthesis of non-covalently bonded and para-toluene sulfonic acid-functionalized fibrous polyaniline@graphene-PVC nanocomposite for the removal of Congo red." *New Journal of Chemistry* 39(9): 7004-7011.

ARSHADI, M., F. SALIMI VAHID, J. W. L. SALVACION and M. SOLEYMANZADEH (2013). "A practical organometallic decorated nano-size SiO₂-Al₂O₃ mixed-oxides for methyl orange removal from aqueous solution." *Applied Surface Science* 280: 726-736.

ASHTARI, P., X. He, K. WANG and P. GONG (2005). "An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles." *Talanta* 67(3): 548-554.

ASKELAND, D. R., PHULÉ, P. P. (2014). *Ciência e Engenharia dos Materiais*, Cengage.

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

AZIZIAN, S. (2004). "Kinetic models of sorption: a theoretical analysis." *Journal of Colloid and Interface Science* 276(1): 47-52.

BACHMANN, M. A. and J. L. KOENIG (1981). "Vibrational analysis of phase III of poly (vinylidene fluoride)." *The Journal of Chemical Physics* 74(10): 5896-5910.

BAGOTSKII, V. S., A. M. SKUNDIN and Y. M. VOLFKOVICH (2015). *Electrochemical power sources : batteries, fuel cells, and supercapacitors*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

BALASUBRAMANIAM, C., Y. KHOLLAM, I. BANERJEE, P. BAKARE, S. DATE, A. DAS and S. BHORASKAR (2004). "DC thermal arc-plasma preparation of nanometric and stoichiometric spherical magnetite (Fe₃O₄) powders." *Materials Letters* 58(30): 3958-3962.

BALOUIRI, M., M. SADIKI and S. K. IBNSOUDA (2016). "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review." *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): 71-79.

BANERJEE, S., M. WEHBI, A. MANSERI, A. MEHDI, A. ALAAEDDINE, A. HACHEM and B. AMEDURI (2017). "Poly (vinylidene fluoride) Containing

- Phosphonic Acid as Anticorrosion Coating for Steel." *ACS Applied Materials & Interfaces* 9(7): 6433-6443.
- BEE, A., R. MASSART and S. NEVEU (1995). "Synthesis of very fine maghemite particles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 149(1-2): 6-9.
- BÉGUIN, F. o. and E. b. FRĄCKOWIAK (2010). *Carbons for electrochemical energy storage and conversion systems*. Boca Raton, CRC Press.
- BENNETT, P. M. and J. GRINSTED (1988). *Methods in Microbiology: Plasmid technology*. Vol.21, Academic Press.
- BERENSMEIER, S. (2006). "Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids." *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(3): 495-504.
- BERG, H. C. (2004). *E. coli in Motion*. New York, United States, Springer.
- BHADRA, S., D. KHASTGIR, N. K. SINGHA and J. H. LEE (2009). "Progress in preparation, processing and applications of polyaniline." *Progress in Polymer Science* 34(8): 783-810.
- BHATTACHARYYA, D., R. M. HOWDEN, D. C. BORRELLI and K. K. GLEASON (2012). "Vapor phase oxidative synthesis of conjugated polymers and applications." *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 50(19): 1329-1351.
- BINI, R. A., R. F. C. MARQUES, F. J. SANTOS, J. A. CHAKER and M. JAFELICCI (2012). "Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes." *Journal of magnetism and magnetic materials* 324(4): 534-539.
- BIRCH, W. D., A. PRING, A. RELLER and H. W. SCHMALLE (1993). "Bernalite, Fe (OH) 3, a new mineral from Broken Hill, New South Wales: description and structure." *American Mineralogist* 78(7-8): 827-834.
- BOEVA, Z. A. and V. G. SERGEYEV (2014). "Polyaniline: Synthesis, properties, and application." *Polymer Science Series C* 56(1): 144-153.
- BOHARA, R. A. and S. H. PAWAR (2015). "Innovative Developments in Bacterial Detection with Magnetic Nanoparticles." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176(4): 1044-1058.
- BOUKOUSSA, B., A. HAKIKI, S. MOULAI, K. CHIKH, D. E. KHERROUB, L. BOUHADJAR, D. GUEDAL, K. MESSAOUDI, F. MOKHTAR and R. HAMACHA (2018). "Adsorption behaviors of cationic and anionic dyes from aqueous solution on nanocomposite polypyrrole/SBA-15." *Journal of Materials Science* 53(10): 7372-7386.
- BRAHMASANDRA, S. N., E. CRAIG and K. HANDIQUE (2010). *Polynucleotide Capture Materials, and Method of Using Same*, Google Patents.
- BREVENOV, M. G., J. SHEWALE, M. R. FURTADO and H. S. PAWAR (2010). *Methods and kits for extraction of dna*, Google Patents.
- BROWN, T. A. (2001). *Gene Cloning and DNA Analysis*. Oxford, England, Blackwell

BROWN, T. A. (2010). Gene cloning and DNA analysis : an introduction. Oxford ; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell.

Brown, T. L., H. E. LeMay and B. E. Bursten (2014). Chemistry : the central science. Upper Saddle River, N.J., Prentice Hall.

BRUCE, I. J. and T. SEN (2005). "Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations." *Langmuir* 21(15): 7029-7035.

BRYAN, A. M., L. M. SANTINO, Y. LU, S. ACHARYA and J. M. D'ARCY (2016). "Conducting Polymers for Pseudocapacitive Energy Storage." *Chemistry of Materials* 28(17): 5989-5998.

BURNOUF, T. (2011). "Recombinant plasma proteins." *Vox Sang* 100(1): 68-83.

BUTLER, J. M. (2012). Chapter 2 - DNA Extraction Methods. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. J. M. Butler. San Diego, Academic Press: 29-47.

BUXBAUM, G., PFAFF, G. (2005). Industrial inorganic pigments. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.

CAI, P., Q. HUANG, X. ZHANG and H. CHEN (2006). "Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol." *Soil Biology and Biochemistry* 38(3): 471-476.

CALLADINE, C. R. (2004). Understanding DNA the molecule & how it works. San Diego, CA, Elsevier Academic Press,: 1 online resource (xiii, 334 p).

CAO, W., C. J. EASLEY, J. P. FERRANCE and J. P. LANDERS (2006). "Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system." *Anal Chem* 78(20): 7222-7228.

CARDOSO, L. H. G. (2008). Nanopartículas de magnetioferrita produzidas pelo método sol-gel/combustão. Mestrado, Exército Brasileiro.

CARLSON, L. and U. SCHWERTMANN (1980). "Natural occurrence of feroxyhite (δ' -FeOOH)." *Clays and Clay Minerals* 28(4): 272-280.

CARVALHO, J., J. ARAUJO and F. CASTRO (2011). "Alternative Low-cost Adsorbent for Water and Wastewater Decontamination Derived from Eggshell Waste: An Overview." *Waste and Biomass Valorization* 2(2): 157-167.

CASALI, N. and A. PRESTON (2003). E. coli plasmid vectors : methods and applications. Totowa, N.J., Humana Press.

CAVALIERE, S. (2016). Electrosinching for advanced energy and environmental applications. Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group.

CHACON-CORTES, D. and L. R. GRIFFITHS (2014). "Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives." *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2014(2): 1-9.

- CHANG, J., R. W. CHADWICK, J. C. ALLISON, Y. O. HAYES, D. L. TALLEY and C. E. AUTRY (1994). "Microbial succession and intestinal enzyme activities in the developing rat." *Journal of Applied Bacteriology* 77(6): 709-718.
- CHAÚQUE, E. F. C., L. N. DLAMINI, A. A. ADELODUN, C. J. GREYLING and J. C. NGILA (2017). "Electrospun polyacrylonitrile nanofibers functionalized with EDTA for adsorption of ionic dyes." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 100: 201-211.
- CHAVES, L. H. (2005). "The role of green rust in the environment: a review." *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9(2): 284-288.
- CHÁVEZ-GUAJARDO, A. E., J. C. MEDINA-LLAMAS, L. Maqueira, C. A. S. ANDRADE, K. G. B. ALVES and C. P. de MELO (2015). "Efficient removal of Cr (VI) and Cu (II) ions from aqueous media by use of polypyrrole/maghemite and polyaniline/maghemite magnetic nanocomposites." *Chemical Engineering Journal* 281: 826-836.
- CHECKOL, F., A. ELFWING, G. GRECZYNSKI, S. MEHRETIE, O. INGANÄS and S. ADMASSIE (2018). "Highly Stable and Efficient Lignin-PEDOT/PSS Composites for Removal of Toxic Metals." *Advanced Sustainable Systems* 2(1): 1700114.
- CHEN, D., J. CHEN, X. LUAN, H. JI and Z. XIA (2011). "Characterization of anionic surfactants modified montmorillonite and its application for the removal of methyl orange." *Chemical Engineering Journal* 171(3): 1150-1158.
- CHEN, H., M. LING, L. HENCZ, H. Y. LING, G. LI, Z. LIN, G. LIU and S. ZHANG (2018). "Exploring Chemical, Mechanical, and Electrical Functionalities of Binders for Advanced Energy-Storage Devices." *Chemical Reviews* 118(18): 8936-8982.
- CHEN, H., J. ZHAO, J. WU and G. DAI (2011). "Isotherm, thermodynamic, kinetics and adsorption mechanism studies of methyl orange by surfactant modified silkworm exuviae." *Journal of Hazardous Materials* 192(1): 246-254.
- CHEN, J., Y. LIU, A. I. MINETT, C. LYNAM, J. WANG and G. G. WALLACE (2007). "Flexible, Aligned Carbon Nanotube/Conducting Polymer Electrodes for a Lithium-Ion Battery." *Chemistry of Materials* 19(15): 3595-3597.
- CHEN, L., A. MANZ and P. J. R. DAY (2007). "Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices." *Lab on a Chip* 7(11): 1413-1423.
- CHEN, L., F. S. RAZAVI, A. MUMIN, X. GUO, T.-K. SHAM and J. ZHANG (2013). "Multifunctional nanoparticles for rapid bacterial capture, detection, and decontamination." *RSC Advances* 3(7): 2390-2397.
- CHEN, X.-W., Q.-X. MAO, J.-W. LIU and J.-H. WANG (2012). "Isolation/separation of plasmid DNA using hemoglobin modified magnetic nanocomposites as solid-phase adsorbent." *Talanta* 100: 107-112.
- CHEN, Y., K. CAI, C. LIU, H. SONG and X. YANG (2017). "High-Performance and Breathable Polypyrrole Coated Air-Laid Paper for Flexible All-Solid-State Supercapacitors." *Advanced Energy Materials* 7(21): 1701247.

CHENG, T., Y.-Z. ZHANG, J.-D. ZHANG, W.-Y. LAI and W. HUANG (2016). "High-performance free-standing PEDOT:PSS electrodes for flexible and transparent all-solid-state supercapacitors." *Journal of Materials Chemistry A* 4(27): 10493-10499.

CHEREMISINOFF, N. P. (2002). *Handbook of water and wastewater treatment technologies*. Boston, Butterworth-Heinemann.

CHIANG, C.-L., C.-S. SUNG and C.-Y. CHEN (2006). "Application of silica–magnetite nanocomposites to the isolation of ultrapure plasmid DNA from bacterial cells." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 305(2): 483-490.

CHIANG, C.-L., C.-S. SUNG, T.-F. WU, C.-Y. CHEN and C.-Y. HSU (2005). "Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells." *Journal of Chromatography B* 822(1): 54-60.

CHIANG, C. L., C. S. SUNG, T. F. WU, C. Y. CHEN and C. Y. HSU (2005). "Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 822(1-2): 54-60.

CHIANG, J.-C. and A. G. MACDIARMID (1986). "'Polyaniline': Protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime." *Synthetic Metals* 13(1): 193-205.

CHITRA, K. and G. ANNADURAI (2014). "Rapid capture and exemplary detection of clinical pathogen using surface modified fluorescent silica coated iron oxide nanoparticles." *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 34(4): 230-237.

CHO, W., J. WU, B. S. SHIM, W.-F. KUAN, S. E. MASTROIANNI, W.-S. YOUNG, C.-C. KUO, I. I. I. T. H. EPPS and D. C. MARTIN (2015). "Synthesis and characterization of bicontinuous cubic poly(3,4-ethylene dioxythiophene) gyroid (PEDOT GYR) gels." *Physical Chemistry Chemical Physics* 17(7): 5115-5123.

CHRISTEN, T. and M. W. CARLEN (2000). "Theory of Ragone plots." *Journal of Power Sources* 91(2): 210-216.

CLEWELL, D. B. (2014). *Antibiotic Resistance Plasmids in Bacteria*. eLS.

CONWAY, B. E. (1999). *Electrochemical Capacitors Based on Pseudocapacitance. Electrochemical Supercapacitors: Scientific Fundamentals and Technological Applications*. Boston, MA, Springer US: 221-257.

CONWAY, B. E. (1999). *Electrochemical supercapacitors : scientific fundamentals and technological applications*. New York, Plenum Press.

CONWAY, B. E. and W. G. PELL (2003). "Double-layer and pseudocapacitance types of electrochemical capacitors and their applications to the development of hybrid devices." *Journal of Solid State Electrochemistry* 7(9): 637-644.

CORNELL, R. M. and U. SCHWERTMANN (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses*. Weinheim, Wiley-VCH.

COSTENTIN, C. and J.-M. SAVÉANT (2019). "Energy storage: pseudocapacitance in prospect." *Chemical Science* 10(22): 5656-5666.

- da SILVA, R. J., B. G. MACIEL, J. C. MEDINA-LLAMAS, A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO, J. J. ALCARAZ-ESPINOZA and C. Pinto de MELO (2019). "Extraction of plasmid DNA by use of a magnetic maghemite-polyaniline nanocomposite." *Analytical Biochemistry* 575: 27-35.
- DALE, J. W., PARK, S. (2004). *Molecular Genetics of Bacteria* Chichester, England, John Wiley & Sons
- DALLAS, P., N. MOUTIS, E. DEVLIN, D. NIARCHOS and D. PETRIDIS (2006). "Characterization, electrical and magnetic properties of polyaniline/maghemite nanocomposites." *Nanotechnology* 17(19): 5019-5026.
- DANTHANARAYANA, A. N., D. C. MANATUNGA, R. M. De SILVA, N. V. CHANDRASEKHARAN and K. Nalin De SILVA (2018). "Magnetofection and isolation of DNA using polyethyleneimine functionalized magnetic iron oxide nanoparticles." *Royal Society open science* 5(12): 181369.
- DAS, T. K. and S. PRUSTY (2012). "Review on Conducting Polymers and Their Applications." *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 51(14): 1487-1500.
- DAVISON, J. (2002). "Genetic tools for pseudomonads, rhizobia, and other gram-negative bacteria." *BioTechniques* 32(2): 386-401.
- DAWOOD, S. and T. SEN (2014). "Review on dye removal from its aqueous solution into alternative cost effective and non-conventional adsorbents." *Journal of Chemical and Process Engineering* 1(104): 1-11.
- de ARAÚJO, A., R. de OLIVEIRA, S. A. JÚNIOR, A. RODRIGUES, F. MACHADO, F. CABRAL and W. de AZEVEDO (2010). "Synthesis, characterization and magnetic properties of polyaniline-magnetite nanocomposites." *Synthetic Metals* 160(7): 685-690.
- de OLIVEIRA, H. P., S. A. SYDLIK and T. M. SWAGER (2013). "Supercapacitors from Free-Standing Polypyrrole/Graphene Nanocomposites." *The Journal of Physical Chemistry C* 117(20): 10270-10276.
- DEMIRCI, S., A. CELEBIOGLU and T. UYAR (2014). "Surface modification of electrospun cellulose acetate nanofibers via RAFT polymerization for DNA adsorption." *Carbohydrate Polymers* 113: 200-207.
- DENG, J., C. HE, Y. PENG, J. WANG, X. LONG, P. Li and A. S. C. CHAN (2003). "Magnetic and conductive Fe₃O₄-polyaniline nanoparticles with core-shell structure." *Synthetic Metals* 139(2): 295-301.
- DENNANY, L., P. C. INNIS, S. T. MCGOVERN, G. G. WALLACE and R. J. FORSTER (2011). "Electronic interactions within composites of polyanilines formed under acidic and alkaline conditions. Conductivity, ESR, Raman, UV-vis and fluorescence studies." *Physical Chemistry Chemical Physics* 13(8): 3303-3310.
- DIAS, A. M. G. C., A. HUSSAIN, A. S. MARCOS and A. C. A. ROQUE (2011). "A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides." *Biotechnology Advances* 29(1): 142-155.

- DING, B. (2014). *Electrospun nanofibers for energy and environmental applications*. New York, Springer.
- DONG, Y., N. L. THOMAS and X. LU (2017). "Electrospun dual-layer mats with covalently bonded ZnO nanoparticles for moisture wicking and antibacterial textiles." *Materials & Design* 134: 54-63.
- DONNENBERG, M. (2013). *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. London, England, Academic Press.
- DORAK, M. T. (2007). *Real-time PCR*, Taylor & Francis.
- DRAGAN, A. I., R. PAVLOVIC, J. B. MCGIVNEY, J. R. CASAS-FINET, E. S. BISHOP, R. J. STROUSE, M. A. SCHENERMAN and C. D. GEDDES (2012). "SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA." *Journal of Fluorescence* 22(4): 1189-1199.
- DUC, C., A. VLANDAS, G. G. MALLIARAS and V. SENEZ (2016). "Wettability of PEDOT:PSS films." *Soft Matter* 12(23): 5146-5153.
- DUTTA, B., E. KAR, N. BOSE and S. MUKHERJEE (2015). "Significant enhancement of the electroactive β -phase of PVDF by incorporating hydrothermally synthesized copper oxide nanoparticles." *RSC Advances* 5(127): 105422-105434.
- EFTEKHARI, A. (2010). *Nanostructured conductive polymers*. Chichester, West Sussex, U.K. ; Hoboken, N.J., Wiley.
- ELASHMAWI, I. S. and N. A. HAKEEM (2008). "Effect of PMMA addition on characterization and morphology of PVDF." *Polymer Engineering & Science* 48(5): 895-901.
- ELAZEZY, M. and S. A. JOOSSE (2018). "Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16: 370-378.
- ELGORT, M. G., M. G. HERRMANN, M. ERALI, J. D. DURTSCHI, K. V. VOELKERDING and R. E. SMITH (2004). "Extraction and amplification of genomic DNA from human blood on nanoporous aluminum oxide membranes." *Clin Chem* 50(10): 1817-1819.
- ELGRISHI, N., K. J. ROUNTREE, B. D. MCCARTHY, E. S. ROUNTREE, T. T. EISENHART and J. L. DEMPSEY (2018). "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry." *Journal of Chemical Education* 95(2): 197-206.
- ELSCHNER, A. (2011). *PEDOT : principles and applications of an intrinsically conductive polymer*. Boca Raton, FL, CRC Press.
- EPSTEIN, A. J., J. M. GINDER, F. ZUO, H. S. WOO, D. B. TANNER, A. F. RICHTER, M. ANGELOPOULOS, W. S. HUANG and A. G. MACDIARMID (1987). "Insulator-to-metal transition in polyaniline: Effect of protonation in emeraldine." *Synthetic Metals* 21(1): 63-70.

ERLICH, H. A., D. GELFAND and J. J. SNINSKY (1991). "Recent advances in the polymerase chain reaction." *Science* 252(5013): 1643-1651.

ESFANDIAN, H., M. JAFARI, M. ALIZADEH, H. T. RAHMATI and R. KATAL (2012). "Synthesis of polyaniline nanocomposite and its application for chromium removal from aqueous solution." *Journal of Vinyl and Additive Technology* 18(4): 250-260.

ESSER, K., U. KÜCK, C. LANG-HINRICHS, P. LEMKE, H. D. OSIEWACZ, U. STAHL and P. TUDZYNSKI (2012). *Plasmids of eukaryotes : fundamentals and applications*. New York, New York, U. S., Springer-Verlag.

EWING, F. J. (1935). "The Crystal Structure of Lepidocrocite." *The Journal of Chemical Physics* 3(7): 420-424.

FAEZ, R., C. REIS, P. d. FREITAS, O. K. KOSIMA, G. RUGGERI and M.-A. De PAOLI (2000). "Polímeros condutores." *Química nova na escola* 11(1): 13-18.

FAIVRE, D. (2016). *Iron Oxides: From Nature to Applications*. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.

FAKHRI, A. (2017). "Adsorption characteristics of graphene oxide as a solid adsorbent for aniline removal from aqueous solutions: Kinetics, thermodynamics and mechanism studies." *Journal of Saudi Chemical Society* 21: S52-S57.

FENG, Q., D. WU, Y. ZHAO, A. WEI, Q. WEI and H. FONG (2018). "Electrospun AOPAN/RC blend nanofiber membrane for efficient removal of heavy metal ions from water." *Journal of Hazardous Materials* 344: 819-828.

FERNANDEZ-MARTINEZ, A., V. TIMON, G. ROMAN-ROSS, G. J. CUELLO, J. E. DANIELS and C. AYORA (2010). "The structure of schwertmannite, a nanocrystalline iron oxyhydroxysulfate." *American Mineralogist* 95(8-9): 1312-1322.

FICHO, D. (1999). *Handbook of oligo- and polythiophenes*. Weinheim ; New York, Wiley-VCH.

FISHER, T. (2010). "NanoDrop Nucleic Acid Technical Guide." Retrieved 05/13, 2017, from <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf>.

FITZGERALD-HAYES, M. and F. REICHSMAN (2010). *DNA and biotechnology*. Burlington, MA, Academic Press/Elsevier.

FOCARETE, M. L. (2018). *Filtering media by electrospinning : next generation membranes for separation applications*. New York, NY, Springer Berlin Heidelberg.

FORMO, E., E. LEE, D. CAMPBELL and Y. XIA (2008). "Functionalization of Electrospun TiO₂ Nanofibers with Pt Nanoparticles and Nanowires for Catalytic Applications." *Nano Letters* 8(2): 668-672.

FREITAS, R. B., J. A. RESENDE, B. G. MENDONÇA, T. ANTONIO, R. S. FORTUNATO and M. A. C. OLIVEIRA (2016). "Infecções do trato urinário de origem

hospitalar e comunitária: revisão dos principais micro-organismos causadores e perfil de susceptibilidade." *Revista Científica FAGOC-Saúde* 1(1).

FU, D., H. LI, X.-M. ZHANG, G. HAN, H. ZHOU and Y. CHANG (2016). "Flexible solid-state supercapacitor fabricated by metal-organic framework/graphene oxide hybrid interconnected with PEDOT." *Materials Chemistry and Physics* 179: 166-173.

FU, D., H. ZHOU, X.-M. ZHANG, G. HAN, Y. CHANG and H. LI (2016). "Flexible solid-state supercapacitor of metal-organic framework coated on carbon nanotube film interconnected by electrochemically -codeposited PEDOT-GO." *ChemistrySelect* 1(2): 285-289.

FU, Y. and T. VIRARAGHAVAN (2001). "Fungal decolorization of dye wastewaters: a review." *Bioresource Technology* 79(3): 251-262.

FUNASA. (2004). "Manual Prático de Análise de Água." Retrieved 04/20, 2017, from http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf.

GAI, L., X. HAN, Y. HOU, J. CHEN, H. JIANG and X. CHEN (2013). "Surfactant-free synthesis of Fe₃O₄@PANI and Fe₃O₄@PPy microspheres as adsorbents for isolation of PCR-ready DNA." *Dalton Transactions* 42(5): 1820-1826.

GAO, J., M. HU and R. K. Y. LI (2012). "Ultrasonication induced adsorption of carbon nanotubes onto electrospun nanofibers with improved thermal and electrical performances." *Journal of Materials Chemistry* 22(21): 10867-10872.

GAO, J., L. LI, P.-L. HO, G. C. MAK, H. GU and B. XU (2006). "Combining Fluorescent Probes and Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Rapid Detection of Bacteria in Human Blood." *Advanced Materials* 18(23): 3145-3148.

GARREAU, S., G. LOUARN, J. P. BUISSON, G. FROYER and S. LEFRANT (1999). "In Situ Spectroelectrochemical Raman Studies of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT)." *Macromolecules* 32(20): 6807-6812.

GE, #xe7, gel, #xdc, nal, #xd6, G. zcan, #xfc, lce, #xfc, rp, #x131, G. nar, #xc7, #x11f and la (2013). "Removal of Methylene Blue from Aqueous Solution by Activated Carbon Prepared from Pea Shells (*Pisum sativum*)." *Journal of Chemistry* 2013: 9.

GESSINGER, H. Nunca Se Sabe. In: *Ouçá o Que Eu Digo: não Ouça Ninguém*. Faixa, 06. 1988.

GHAEMI, M. and G. ABSALAN (2014). "Study on the adsorption of DNA on Fe₃O₄ nanoparticles and on ionic liquid-modified Fe₃O₄ nanoparticles." *Microchimica Acta* 181(1): 45-53.

GHOSAL, K., T. KRASIA-CHRISTOFOROU, E. MELE, A. TOWNSEND-NICHOLSON, H. KRIEL, A. AKBARZADEH, S. ARUNA, H. ZHANG, S. CAVALIERE and J. LAGARON (2018). *Electrospinning: From Basic Research to Commercialization*, Royal Society of Chemistry.

- GIRAFFA, G., L. ROSSETTI and E. NEVIANI (2000). "An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria." *J Microbiol Methods* 42(2): 175-184.
- GONG, R., J. YE, W. DAI, X. YAN, J. HU, X. HU, S. LI and H. HUANG (2013). "Adsorptive Removal of Methyl Orange and Methylene Blue from Aqueous Solution with Finger-Citron-Residue-Based Activated Carbon." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52(39): 14297-14303.
- GONZÁLEZ, A., E. GOIKOLEA, J. A. BARRENA and R. MYSYK (2016). "Review on supercapacitors: Technologies and materials." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58: 1189-1206.
- GOPI, S., P. BALAKRISHNAN, A. PIUS and S. THOMAS (2017). "Chitin nanowhisker (ChNW)-functionalized electrospun PVDF membrane for enhanced removal of Indigo carmine." *Carbohydrate Polymers* 165: 115-122.
- GORZA, F. D. S., G. C. PEDRO, R. J. DA SILVA, J. C. MEDINA-LLAMAS, J. J. ALCARAZ-ESPINOZA, A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO and C. P. de MELO (2018). "Electrospun polystyrene-(emeraldine base) mats as high-performance materials for dye removal from aqueous media." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 82: 300-311.
- GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J.H.,SUZUKI, D.T.,LEWONTIN, R.C.,GELBART, W.M. (2000). *Introduction to Genetic Analysis*. New York, United States, W. H. Freeman.
- GRINSTED, J. (1988). *Methods in Microbiology: Plasmid technology*. San Diego, California, U.S., Academic Press.
- GU, H., P.-L. HO, K. W. T. TSANG, L. WANG and B. XU (2003). "Using Biofunctional Magnetic Nanoparticles to Capture Vancomycin-Resistant Enterococci and Other Gram-Positive Bacteria at Ultralow Concentration." *Journal of the American Chemical Society* 125(51): 15702-15703.
- GUIMARD, N. K., N. GOMEZ and C. E. SCHMIDT (2007). "Conducting polymers in biomedical engineering." *Progress in Polymer Science* 32(8-9): 876-921.
- GUPTA, A. K. and M. GUPTA (2005). "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications." *Biomaterials* 26(18): 3995-4021.
- GUPTA, V. K. and I. ALI (2013). *Environmental water : advances in treatment, remediation and recycling*. Amsterdam, Elsevier.
- HAGHANIFAR, M., M. PISHVAEI, S. POURMAHDIAN and A. PAKDEL (2013). *Synthesis of Nano-Structured Polyaniline by Direct Emulsion Polymerization*, Sumy State University.
- HALL, L. E. (2011). *DNA and RNA*. New York, Rosen Pub.
- HAN, Y. and L. DAI (2019). "Conducting Polymers for Flexible Supercapacitors." *Macromolecular Chemistry and Physics* 220(3): 1800355.

- HAQUE, E., J. E. LEE, I. T. JANG, Y. K. HWANG, J.-S. CHANG, J. JEGAL and S. H. JHUNG (2010). "Adsorptive removal of methyl orange from aqueous solution with metal-organic frameworks, porous chromium-benzenedicarboxylates." *Journal of Hazardous Materials* 181(1): 535-542.
- HASHEMI, E., O. AKHAVAN, M. SHAMSARA, S. VALIMEHR and R. RAHIGHI (2014). "DNA and RNA extractions from eukaryotic and prokaryotic cells by graphene nanoplatelets." *RSC Advances* 4(105): 60720-60728.
- HE, F. (2011). "E. coli Genomic DNA Extraction." *Bio-protocol* 1(14): e97.
- HE, X., H. HUO, K. WANG, W. TAN, P. GONG and J. GE (2007). "Plasmid DNA isolation using amino-silica coated magnetic nanoparticles (ASMNPs)." *Talanta* 73(4): 764-769.
- HEEGER, A. J. (2001). "Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials." *The Journal of Physical Chemistry B* 105(36): 8475-8491.
- HERITAGE, J., EVANS, E. G. V., KILLINGTON, R. A. (1996). *Introductory Microbiology*. Cambridge, England, Cambridge University Press.
- HERNÁNDEZ-RIVERA, D., G. RODRÍGUEZ-ROLDÁN, R. MORA-MARTÍNEZ and E. SUASTE-GÓMEZ (2017). "A Capacitive Humidity Sensor Based on an Electrospun PVDF/Graphene Membrane." *Sensors* 17(5): 1009.
- HOLLAENDER, A. (1977). *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*. New York, United States, PLENUM PRESS
- HOSSEINI, S., M. A. KHAN, M. R. MALEKBALA, W. CHEAH and T. S. Y. CHOONG (2011). "Carbon coated monolith, a mesoporous material for the removal of methyl orange from aqueous phase: Adsorption and desorption studies." *Chemical Engineering Journal* 171(3): 1124-1131.
- HOU, Y., X. HAN, J. CHEN, Z. LI, X. CHEN and L. GAI (2013). "Isolation of PCR-ready genomic DNA from *Aspergillus niger* cells with Fe₃O₄/SiO₂ microspheres." *Separation and Purification Technology* 116: 101-106.
- HSIEH, S., H.-H. CHOU, C.-W. HSIEH, D.-C. WU, C.-H. KUO and F.-H. LIN (2013). "Hydrogen peroxide treatment of eggshell membrane to control porosity." *Food Chemistry* 141(3): 2117-2121.
- HSIEH, T.-H., K.-S. HO, X. BI, C.-H. HUANG, Y.-Z. WANG, Y.-K. HAN, Z.-L. CHEN, C.-H. HSU, P.-H. LI and Y.-C. CHANG (2010). "Effects of [SDS]/[H₂O] molar ratio on the electromagnetic properties of polyaniline/maghemite nanocomposites." *Synthetic Metals* 160(15): 1609-1616.
- HSU, Y.-K., Y.-C. CHEN, Y.-G. LIN, L.-C. CHEN and K.-H. CHEN (2013). "Direct-growth of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanowires/carbon cloth as hierarchical supercapacitor electrode in neutral aqueous solution." *Journal of Power Sources* 242: 718-724.

- HU, L.-L., B. HU, L.-M. SHEN, D.-D. ZHANG, X.-W. CHEN and J.-H. WANG (2015). "Polyethyleneimine–iron phosphate nanocomposite as a promising adsorbent for the isolation of DNA." *Talanta* 132: 857-863.
- HUANG, J.-H., K.-L. HUANG, S.-Q. LIU, A. T. WANG and C. YAN (2008). "Adsorption of Rhodamine B and methyl orange on a hypercrosslinked polymeric adsorbent in aqueous solution." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 330(1): 55-61.
- HUBER, D. L. (2005). "Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles." *Small* 1(5): 482-501.
- HUSSAIN, C. M. (2018). *Nanomaterials in chromatography: current trends in chromatographic research technology and techniques*, Elsevier.
- IBANEZ, J. G., M. E. RINCÓN, S. GUTIERREZ-GRANADOS, M. H. CHAHMA, O. A. JARAMILLO-QUINTERO and B. A. FRONTANA-URIBE (2018). "Conducting Polymers in the Fields of Energy, Environmental Remediation, and Chemical–Chiral Sensors." *Chemical Reviews* 118(9): 4731-4816.
- IDALIA, V.-M. N. and F. BERNARDO (2017). *Escherichia coli as a model organism and its application in biotechnology. Escherichia coli-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*, IntechOpen.
- IM, S. G. and K. K. GLEASON (2007). "Systematic Control of the Electrical Conductivity of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) via Oxidative Chemical Vapor Deposition." *Macromolecules* 40(18): 6552-6556.
- INAMUDDIN, T. A. RANGREEZ, M. NAUSHAD and A. AL-AHMAD (2015). "Synthesis and characterisation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) (PEDOT:PSS) Zr(IV) monothiophosphate composite cation exchanger: analytical application as lead ion selective membrane electrode." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95(4): 312-323.
- IWASAKI, T., K. KOSAKA, T. YABUUCHI, S. WATANO, T. YANAGIDA and T. KAWAI (2009). "Novel mechanochemical process for synthesis of magnetite nanoparticles using coprecipitation method." *Advanced Powder Technology* 20(6): 521-528.
- JANATA, J. and M. JOSOWICZ (2003). "Conducting polymers in electronic chemical sensors." *Nature Materials* 2(1): 19-24.
- JANTAWASU, P., T. SREETHAWONG and S. CHAVADEJ (2009). "Photocatalytic activity of nanocrystalline mesoporous-assembled TiO₂ photocatalyst for degradation of methyl orange monoazo dye in aqueous wastewater." *Chemical Engineering Journal* 155(1): 223-233.
- JIA, B.-B., J.-N. WANG, J. WU and C.-J. LI (2014). "'Flower-Like' PA6@Mg(OH)₂ electrospun nanofibers with Cr (VI)-removal capacity." *Chemical Engineering Journal* 254: 98-105.

- JIANG, H. H., Y. ZHOU, X. Y. HAN, X. C. CHEN, Y. H. HOU and L. G. GAI (2013). Core-Shell Structured Fe₃O₄/PPy Microspheres with High Magnetization for Purification of Plasmid DNA. *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publ.
- JIANG, J., L. LI and M. ZHU (2008). "Polyaniline/magnetic ferrite nanocomposites obtained by in situ polymerization." *Reactive and Functional Polymers* 68(1): 57-62.
- JIANG, Y. and J. LIU (2019). "Definitions of Pseudocapacitive Materials: A Brief Review." *ENERGY & ENVIRONMENTAL MATERIALS* 2(1): 30-37.
- JIN, Y., F. LIU, C. SHAN, M. TONG and Y. HOU (2014). "Efficient bacterial capture with amino acid modified magnetic nanoparticles." *Water Research* 50: 124-134.
- JING, X., L. WANG, X. WANG, Y. GENG and F. WANG (2005). "Synthesis, structure, properties and applications of conducting polyaniline." *Acta Polymerica Sinica* 5: 655.
- JOHANSSON, B. G. (1972). "Agarose Gel Electrophoresis." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 29(sup124): 7-19.
- KANG, H. S., S.-Y. PARK, K. KIM, J.-W. KIM, H. JEONG, S. H. LEE and M.-H. LEE (2013). "Preparation of PEDOT/PSSA conductive nanoparticles for dielectrophoretic display." *Macromolecular Research* 21(6): 693-698.
- KAO, H.-L., C.-H. CHUANG, L.-C. CHANG, C.-L. CHO and H.-C. CHIU (2019). "Inkjet-printed silver films on textiles for wearable electronics applications." *Surface and Coatings Technology* 362: 328-332.
- KAPER, J. B., J. P. NATARO and H. L. MOBLEY (2004). "Pathogenic escherichia coli." *Nature Reviews Microbiology* 2(2): 123-140.
- KATANČIĆ, Z., I. GAVRAN, J. SMOLKOVIĆ and Z. HRNJAK-MURGIĆ (2018). "Fly ash supported photocatalytic nanocomposite poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/TiO₂ for azo dye removal under simulated solar irradiation." *Journal of Applied Polymer Science* 135(22): 46316.
- KAUSHAL, S., J. K. BOPARAI, R. KAUR, G. SINGH, T. S. KANG, R. BADRU, P. SINGH and P. K. SHARMA (2018). "Purification of Metagenomic DNA Using Novel Nanocomposite Titanium Dioxide-polyaniline Tin (IV) Antimonophosphate, Insights into the Mechanism Underlying Purification Process." *Current Biotechnology* 7(5): 349-354.
- KHAN, A., A. S. ALDWAYYAN, M. ALHOSHAN and M. ALSALHI (2010). "Synthesis by in situ chemical oxidative polymerization and characterization of polyaniline/iron oxide nanoparticle composite." *Polymer International* 59(12): 1690-1694.
- KHANIABADI, Y. O., R. HEYDARI, H. NOURMORADI, H. BASIRI and H. BASIRI (2016). "Low-cost sorbent for the removal of aniline and methyl orange from liquid-phase: Aloe Vera leaves wastes." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 68: 90-98.

- KHARISSOVA, O. V., H. V. R. DIAS and B. I. KHARISOV (2015). "Magnetic adsorbents based on micro- and nano-structured materials." *RSC Advances* 5(9): 6695-6719.
- KHOLLAM, Y., S. DHAGE, H. POTDAR, S. DESHPANDE, P. BAKARE, S. KULKARNI and S. DATE (2002). "Microwave hydrothermal preparation of submicron-sized spherical magnetite (Fe_3O_4) powders." *Materials Letters* 56(4): 571-577.
- KHORSHIDI, H. R., H. EISAZADEH and A. R. KHESALI (2011). "Preparation and characterization of polyaniline containing Fe_3O_4 nanoparticles using sodium dodecylbenzenesulfonate as a surfactant." *High Performance Polymers* 23(2): 125-131.
- KIELECZAWA, J. (2005). *DNA sequencing : optimizing the process and analysis*. Sudbury, Mass., Jones and Bartlett Publishers.
- KIM, B.-J., S.-G. OH, M.-G. HAN and S.-S. IM (2001). "Synthesis and characterization of polyaniline nanoparticles in SDS micellar solutions." *Synthetic Metals* 122(2): 297-304.
- KIM, D., Y. ZHANG, W. VOIT, K. RAO and M. MUHAMMED (2001). "Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225(1): 30-36.
- KIM, J. and B. K. GALE (2008). "Quantitative and qualitative analysis of a microfluidic DNA extraction system using a nanoporous AlO_x membrane." *Lab Chip* 8(9): 1516-1523.
- KIM, Y. H., J. LEE, S. HOFMANN, M. C. GATHER, L. MÜLLER-MESKAMP and K. LEO (2013). "Achieving High Efficiency and Improved Stability in ITO-Free Transparent Organic Light-Emitting Diodes with Conductive Polymer Electrodes." *Advanced Functional Materials* 23(30): 3763-3769.
- KLUG, H. P., ALEXANDER, L. (1954). *X-ray diffraction procedures: For Polycrystalline and Amorphous Materials*. New York, United States, Wiley
- KOLLEK, R., W. OERTEL and W. GOEBEL (1978). "Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1." *Molecular and General Genetics* 162(1): 51-57.
- KRISTYANNE, E., R. CANDAU and J. L. SEED (2003). *Ion exchange method for DNA purification*, Google Patents.
- KUBISTA, M., J. M. ANDRADE, M. BENGTSSON, A. FOROOTAN, J. JONÁK, K. LIND, R. SINDELKA, R. SJÖBACK, B. SJÖGREEN and L. STRÖMBOM (2006). "The real-time polymerase chain reaction." *Molecular aspects of medicine* 27(2): 95-125.
- KUCZYNSKA, A., A. UYGUN, A. KAIM, H. WILCZURA-WACHNIK, A. G. YAVUZ and M. ALDISSI (2010). "Effects of surfactants on the characteristics and biosensing properties of polyaniline." *Polymer International* 59(12): 1650-1659.

KULARATNA, N. (2014). Energy storage devices for electronic systems : rechargeable batteries and supercapacitors. Waltham, MA, Elsevier.

KUMAR, P. S., J. SUNDARAMURTHY, S. SUNDARRAJAN, V. J. BABU, G. SINGH, S. I. ALLAKHVERDIEV and S. RAMAKRISHNA (2014). "Hierarchical electrospun nanofibers for energy harvesting, production and environmental remediation." *Energy & Environmental Science* 7(10): 3192-3222.

KUPERMAN, A. and I. AHARON (2011). "Battery–ultracapacitor hybrids for pulsed current loads: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15(2): 981-992.

KURINČIČ, M., B. JERŠEK, A. KLANČNIK, S. S. MOŽINA, R. FINK, G. DRAŽIĆ, P. RASPOR and K. BOHINC (2016). "Effects of natural antimicrobials on bacterial cell hydrophobicity, adhesion, and zeta potential / Vpliv naravnih protimikrobnih snovi na bakterijsko hidrofobnost, adhezijo in zeta potencial." 67(1): 39.

KURRA, N., R. WANG and H. N. ALSHAREEF (2015). "All conducting polymer electrodes for asymmetric solid-state supercapacitors." *Journal of Materials Chemistry A* 3(14): 7368-7374.

KYZAS, G. Z., J. FU and K. A. MATIS (2013). "The Change from Past to Future for Adsorbent Materials in Treatment of Dyeing Wastewaters." *Materials* 6(11): 5131-5158.

LABORATORY, E. U. R. (2013). "Protocol for PCR amplification of campylobacter jejuni and E. coli recommended by the EURL-AR." Retrieved 12/05, 2017, from https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/21-protocols/280_protocol-for-campylobacter-november-2013.pdf.

LAGALLY, E. T., I. MEDINTZ and R. A. MATHIES (2001). "Single-Molecule DNA Amplification and Analysis in an Integrated Microfluidic Device." *Analytical Chemistry* 73(3): 565-570.

LAGALLY, E. T., P. C. SIMPSON and R. A. MATHIES (2000). "Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system." *Sensors and Actuators B: Chemical* 63(3): 138-146.

LAKAY, E. M. (2009). Superparamagnetic iron-oxide based nanoparticles for the separation and recovery of precious metals from solution. Master, University of Stellenbosch.

LALIA, B. S., V. KOCHKODAN, R. HASHAIKEH and N. HILAL (2013). "A review on membrane fabrication: Structure, properties and performance relationship." *Desalination* 326: 77-95.

LANCEROS-MÉNDEZ, S., J. F. MANO, A. M. COSTA and V. H. SCHMIDT (2001). "FTIR AND DSC STUDIES OF MECHANICALLY DEFORMED β -PVDF FILMS." *Journal of Macromolecular Science, Part B* 40(3-4): 517-527.

LARGITTE, L. and R. PASQUIER (2016). "A review of the kinetics adsorption models and their application to the adsorption of lead by an activated carbon." *Chemical Engineering Research and Design* 109: 495-504.

LAW, K.-Y. and H. ZHAO (2016). Surface wetting: characterization, contact angle, and fundamentals, Springer Switzerland.

LEE, C. S., J. JOO, S. HAN and S. K. KOH (2005). "An approach to durable PVDF cantilevers with highly conducting PEDOT/PSS (DMSO) electrodes." *Sensors and Actuators A: Physical* 121(2): 373-381.

LEE, H. U., J.-H. JIN and S. W. KIM (2019). "Effect of gel electrolytes on the performance of a minimized flexible micro-supercapacitor based on graphene/PEDOT composite using pen lithography." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 71: 184-190.

LEHTIMÄKI, S., M. SUOMINEN, P. DAMLIN, S. TUUKKANEN, C. KVARNSTRÖM and D. LUPO (2015). "Preparation of Supercapacitors on Flexible Substrates with Electrodeposited PEDOT/Graphene Composites." *ACS Applied Materials & Interfaces* 7(40): 22137-22147.

LEVY, S. B., R. C. CLOWES and E. L. KOENIG (1981). *Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids*. New York, N.Y., Plenum Press.

LI, J.-X. and Y.-X. MA (2018). "Study on Fabricating PEDOT Electrodes by Liquid Phase Depositional Polymerization of EDOT and Direct Patterning with 172 nm Vacuum Ultraviolet Radiation." *ACS Applied Energy Materials* 1(1): 134-142.

LI, J. and L. A. MCLANDSBOROUGH (1999). "The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle." *International Journal of Food Microbiology* 53(2): 185-193.

LI, L., M. FAN, R. C. BROWN, J. VAN LEEUWEN, J. WANG, W. WANG, Y. SONG and P. ZHANG (2006). "Synthesis, properties, and environmental applications of nanoscale iron-based materials: a review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 36(5): 405-431.

LI, Q., M. HORN, Y. WANG, J. MACLEOD, N. MOTTA and J. LIU (2019). "A Review of Supercapacitors Based on Graphene and Redox-Active Organic Materials." *Materials* 12(5): 703.

LI, X., M. WANG, C. WANG, C. CHENG and X. WANG (2014). "Facile Immobilization of Ag Nanocluster on Nanofibrous Membrane for Oil/Water Separation." *ACS Applied Materials & Interfaces* 6(17): 15272-15282.

LI, X., J. ZHANG and H. GU (2011). "Adsorption and Desorption Behaviors of DNA with Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles." *Langmuir* 27(10): 6099-6106.

LI, Y.-H., Z. DI, J. DING, D. WU, Z. LUAN and Y. ZHU (2005). "Adsorption thermodynamic, kinetic and desorption studies of Pb²⁺ on carbon nanotubes." *Water Research* 39(4): 605-609.

LI, Y. (2015). *Conducting polymers*. Organic Optoelectronic Materials, Springer: 23-50.

LI, Z. and C. WANG (2013). *One-dimensional nanostructures: electrospinning technique and unique nanofibers*, Springer.

- LIAO, Y., C.-H. LOH, M. TIAN, R. WANG and A. G. FANE (2018). "Progress in electrospun polymeric nanofibrous membranes for water treatment: Fabrication, modification and applications." *Progress in Polymer Science* 77: 69-94.
- LIM, C., Y. SHIN, J. JUNG, J. H. KIM, S. LEE and D.-H. KIM (2019). "Stretchable conductive nanocomposite based on alginate hydrogel and silver nanowires for wearable electronics." *APL Materials* 7(3): 031502.
- LIMA, R. M. A. P., J. J. ALCARAZ-ESPINOZA, F. A. G. DA SILVA and H. P. de OLIVEIRA (2018). "Multifunctional Wearable Electronic Textiles Using Cotton Fibers with Polypyrrole and Carbon Nanotubes." *ACS Applied Materials & Interfaces* 10(16): 13783-13795.
- LIN, H., K. MERTENS, B. KEMPS, T. GOVAERTS, B. DE KETELAERE, J. DE BAERDEMAEKER, E. DECUYPERE and J. BUYSE (2004). "New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: mechanical and material properties of eggshell and membrane." *British Poultry Science* 45(4): 476-482.
- LIN, J. W.-P. and L. P. DUDEK (1980). "Synthesis and properties of poly(2,5-thienylene)." *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* 18(9): 2869-2873.
- LIPPS, G. (2008). *Plasmids : current research and future trends*. Norfolk, U.K., Caister Academic Press.
- LIU, B. (2018). *Conjugated Polymers for Biological and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons.
- LIU, F.-J. (2008). "Electrodeposition of manganese dioxide in three-dimensional poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–poly(styrene sulfonic acid)–polyaniline for supercapacitor." *Journal of Power Sources* 182(1): 383-388.
- LIU, J., J. WANG, C. XU, H. JIANG, C. LI, L. ZHANG, J. LIN and Z. X. SHEN (2018). "Advanced Energy Storage Devices: Basic Principles, Analytical Methods, and Rational Materials Design." *Advanced Science* 5(1): 1700322.
- LIU, M., G. LUO, Y. WANG, R. XU, Y. WANG, W. HE, J. TAN, M. XING and J. WU (2017). "Nano-silver-decorated microfibrillar eggshell membrane: processing, cytotoxicity assessment and optimization, antibacterial activity and wound healing." *Scientific Reports* 7(1): 436.
- LIU, M., Y. ZHANG, M. WANG, C. DENG, Q. XIE and S. YAO (2006). "Adsorption of bovine serum albumin and fibrinogen on hydrophilicity-controllable surfaces of polypyrrole doped with dodecyl benzene sulfonate—A combined piezoelectric quartz crystal impedance and electrochemical impedance study." *Polymer* 47(10): 3372-3381.
- LIU, Q., J. ZHU, L. ZHANG and Y. QIU (2018). "Recent advances in energy materials by electrospinning." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 81: 1825-1858.
- LIU, Z., H. WANG, Q. LU, G. DU, L. PENG, Y. DU, S. ZHANG and K. YAO (2004). "Synthesis and characterization of ultrafine well-dispersed magnetic nanoparticles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 283(2): 258-262.

- LODDER, G., S. SCHWARZ, P. GREGORY and K. DYKE (1996). "Tandem duplication in ermC translational attenuator of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid pSES6 from *Staphylococcus equorum*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40(1): 215-217.
- LODISH, H. F. (2013). *Molecular cell biology*. New York, W.H. Freeman and Co.
- LOTA, K., V. KHOMENKO and E. FRACKOWIAK (2004). "Capacitance properties of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotubes composites." *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 65(2): 295-301.
- LU, X., C. WANG and Y. WEI (2009). "One-Dimensional Composite Nanomaterials: Synthesis by Electrospinning and Their Applications." *Small* 5(21): 2349-2370.
- LU, Z., Z. YU, J. DONG, M. SONG, Y. LIU, X. LIU, Z. MA, H. SU, Y. YAN and P. HUO (2018). "Facile microwave synthesis of a Z-scheme imprinted ZnFe₂O₄/Ag/PEDOT with the specific recognition ability towards improving photocatalytic activity and selectivity for tetracycline." *Chemical Engineering Journal* 337: 228-241.
- LUND-OLESEN, T., M. DUFVA and M. F. HANSEN (2007). "Capture of DNA in microfluidic channel using magnetic beads: Increasing capture efficiency with integrated microfluidic mixer." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311(1): 396-400.
- MA, P.-C., S.-Y. MO, B.-Z. TANG and J.-K. KIM (2010). "Dispersion, interfacial interaction and re-agglomeration of functionalized carbon nanotubes in epoxy composites." *Carbon* 48(6): 1824-1834.
- MA, Y., B. ZHANG, H. MA, M. YU, L. LI and J. LI (2016). "Polyethylenimine nanofibrous adsorbent for highly effective removal of anionic dyes from aqueous solution." *Science China Materials* 59(1): 38-50.
- MA, Z. and S. RAMAKRISHNA (2008). "Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification." *Journal of Membrane Science* 319(1): 23-28.
- MACIEL, B. G., R. J. da SILVA, A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO, J. C. MEDINA-LLAMAS, J. J. ALCARAZ-ESPINOZA and C. P. de MELO (2018). "Magnetic extraction and purification of DNA from whole human blood using a γ -Fe₂O₃@Chitosan@Polyaniline hybrid nanocomposite." *Carbohydrate Polymers* 197: 100-108.
- MACKAY, I. M. (2007). *Real-time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Norfolk, United Kingdom, Academic Press.
- MADL, C. M., P. N. KARIUKI, J. GENDRON, L. F. J. PIPER and W. E. JONES (2011). "Vapor phase polymerization of poly (3,4-ethylenedioxythiophene) on flexible substrates for enhanced transparent electrodes." *Synthetic Metals* 161(13): 1159-1165.
- MAKOVETS, S. (2013). *DNA electrophoresis : methods and protocols*. New York, Humana Press.

- MANSOUR, H. B., D. BARILLIER, D. CORROLER, K. GHEDIRA, L. CHEKIR-GHEDIRA and R. MOSRATI (2009). "In vitro study of DNA damage induced by acid orange 52 and its biodegradation derivatives." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(3): 489-495.
- MANTHORPE, M., P. HOBART, G. HERMANSON, M. FERRARI, A. GEALL, B. GOFF and A. ROLLAND (2005). *Plasmid Vaccines and Therapeutics: From Design to Applications. Gene Therapy and Gene Delivery Systems*. D. V. Schaffer and W. Zhou. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 41-92.
- MARGOLIS, J. M. (1989). *Conductive polymers and plastics*. New York, Chapman and Hall.
- MARTINEZ, J. M. F. and V. C. PAYA (2009). *Electrochemistry*, EOLSS Publications.
- MASOUD, M. S. and H. H. HAMMUD (2001). "Electronic spectral parameters of the azo indicators: methyl red, methyl orange, PAN, and fast black K-salt." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57(5): 977-984.
- MASSONNET, N., A. CARELLA, O. JAUDOUIN, P. RANNOU, G. LAVAL, C. CELLE and J.-P. SIMONATO (2014). "Improvement of the Seebeck coefficient of PEDOT:PSS by chemical reduction combined with a novel method for its transfer using free-standing thin films." *Journal of Materials Chemistry C* 2(7): 1278-1283.
- MAUGER, S. A., L. CHANG, C. W. ROCHESTER and A. J. MOULÉ (2012). "Directional dependence of electron blocking in PEDOT:PSS." *Organic Electronics* 13(11): 2747-2756.
- MCCULLOUGH, R. D. (1998). "The Chemistry of Conducting Polythiophenes." *Advanced Materials* 10(2): 93-116.
- MEAD, P. S. and P. M. GRIFFIN (1998). "Escherichia coli O157: H7." *The Lancet* 352(9135): 1207-1212.
- MEDEIROS, E. S., J. E. OLIVEIRA, N. CONSOLIN-FILHO, L. PATERNO and L. H. MATTOSO (2012). "Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores." *Embrapa Instrumentação-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- MEDINA-LLAMAS, J. C. (2015). *Uso de nanocompósitos magnéticos de polianilina/maghemita e polipirrol/maghemita para recuperação de dna presente em sistemas biológicos ou em meios aquosos*. Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco.
- MEDINA-LLAMAS, J. C., A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO, C. A. S. ANDRADE, K. G. B. ALVES and C. P. de MELO (2014). "Use of magnetic polyaniline/maghemite nanocomposite for DNA retrieval from aqueous solutions." *Journal of Colloid and Interface Science* 434: 167-174.
- MEI, B.-A., O. MUNTESHARI, J. LAU, B. DUNN and L. PILON (2018). "Physical Interpretations of Nyquist Plots for EDLC Electrodes and Devices." *The Journal of Physical Chemistry C* 122(1): 194-206.

- MENDES, A. C., C. GORZELANNY, N. HALTER, S. W. SCHNEIDER and I. S. CHRONAKIS (2016). "Hybrid electrospun chitosan-phospholipids nanofibers for transdermal drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 510(1): 48-56.
- MENDES, J. B. S., O. ALVES SANTOS, J. P. GOMES, H. S. ASSIS, J. F. FELIX, R. L. RODRÍGUEZ-SUÁREZ, S. M. REZENDE and A. AZEVEDO (2017). "Efficient spin transport through polyaniline." *Physical Review B* 95(1): 014413.
- MERCANTE, L. A., V. P. SCAGION, F. L. MIGLIORINI, L. H. C. MATTOSO and D. S. CORREA (2017). "Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 91: 91-103.
- MIAO, Y.-E., R. WANG, D. CHEN, Z. LIU and T. LIU (2012). "Electrospun Self-Standing Membrane of Hierarchical SiO₂@ γ -AlOOH (Boehmite) Core/Sheath Fibers for Water Remediation." *ACS Applied Materials & Interfaces* 4(10): 5353-5359.
- MIN, J. H., M.-K. WOO, H. Y. YOON, J. W. JANG, J. H. WU, C.-S. LIM and Y. K. KIM (2014). "Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid." *Analytical Biochemistry* 447: 114-118.
- MITCHELL, G. R. (2015). *Electrospinning: principles, practice and possibilities*, Royal Society of Chemistry.
- MITTAL, A., A. MALVIYA, D. KAUR, J. MITTAL and L. KURUP (2007). "Studies on the adsorption kinetics and isotherms for the removal and recovery of Methyl Orange from wastewaters using waste materials." *Journal of Hazardous Materials* 148(1): 229-240.
- MITTAL, A., M. TEOTIA, R. K. SONI and J. MITTAL (2016). "Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents: A review." *Journal of Molecular Liquids* 223: 376-387.
- MOHANTY, S. P. and E. KOUGIANOS (2006). "Biosensors: a tutorial review." *Ieee Potentials* 25(2): 35-40.
- MOSTAFAEI, A. and A. ZOLRIASATEIN (2012). "Synthesis and characterization of conducting polyaniline nanocomposites containing ZnO nanorods." *Progress in Natural Science: Materials International* 22(4): 273-280.
- MULFORT, K. L., J. RYU and Q. ZHOU (2003). "Preparation of surface initiated polystyrenesulfonate films and PEDOT doped by the films." *Polymer* 44(11): 3185-3192.
- NALWA, H. S. (1997). *Handbook of organic conductive molecules and polymers*. Chichester ; New York, Wiley.
- NAN, H.-S., X.-Y. HU and H.-w. TIAN (2019). "Recent advances in perovskite oxides for anion-intercalation supercapacitor: A review." *Materials Science in Semiconductor Processing* 94: 35-50.
- NAZARI, M., N. GHASEMI, H. MADDAH and M. M. MOTLAGH (2014). "Synthesis and characterization of maghemite nanopowders by chemical precipitation method." *Journal of Nanostructure in Chemistry* 4(2): 1.

NETO, O. M. V. (2003). "Infecção do trato urinário." *Medicina (Ribeirao Preto. Online)* 36(2/4): 365-369.

NEZHADALI, A., Z. Es'HAGHI and A. KHATIBI (2016). "Selective extraction of progesterone hormones from environmental and biological samples using a polypyrrole molecularly imprinted polymer and determination by gas chromatography." *Analytical Methods* 8(8): 1813-1827.

NGADIMAN, N. H. A., M. NOORDIN, A. IDRIS and D. KURNIAWAN (2017). "A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions." *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 231(7): 597-616.

NGUYEN, T. A. and R.-S. JUANG (2013). "Treatment of waters and wastewaters containing sulfur dyes: A review." *Chemical Engineering Journal* 219: 109-117.

Ni, Z.-M., S.-J. Xia, L.-G. WANG, F.-F. XING and G.-X. PAN (2007). "Treatment of methyl orange by calcined layered double hydroxides in aqueous solution: Adsorption property and kinetic studies." *Journal of Colloid and Interface Science* 316(2): 284-291.

OBEIDAT, A. M. and A. C. RASTOGI (2016). "Graphene and Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) based Hybrid Supercapacitors with Ionic Liquid Gel Electrolyte in Solid State Design and their Electrochemical Performance in Storage of Solar Photovoltaic Generated Electricity." *MRS Advances* 1(53): 3565-3571.

ORGANIZATION, W. H. and UNICEF (2017). "Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines."

OZAKI, M. (2004). "Magnetic particles: Preparation, properties, and applications." *Surface and Colloid Science*: 1-26.

ÖZDEMİR, Ö., D. J. DUNLOP and B. M. MOSKOWITZ (1993). "The effect of oxidation on the Verwey transition in magnetite." *Geophysical Research Letters* 20(16): 1671-1674.

PAL, J., M. K. DEB, D. K. DESHMUKH and D. VERMA (2013). "Removal of methyl orange by activated carbon modified by silver nanoparticles." *Applied Water Science* 3(2): 367-374.

PAL, S. and E. C. ALOCILJA (2009). "Electrically active polyaniline coated magnetic (EAPM) nanoparticle as novel transducer in biosensor for detection of *Bacillus anthracis* spores in food samples." *Biosensors and Bioelectronics* 24(5): 1437-1444.

PALANIAPPAN, S. and A. JOHN (2008). "Polyaniline materials by emulsion polymerization pathway." *Progress in Polymer Science* 33(7): 732-758.

PANDEY, G. P. and A. C. RASTOGI (2012). "Solid-State Supercapacitors Based on Pulse Polymerized Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Electrodes and Ionic Liquid Gel Polymer Electrolyte." *Journal of The Electrochemical Society* 159(10): A1664-A1671.

PANG, R., S. ZHOU, X. HU, Z. XIE, X. LIU, H. DUADI and D. FIXLER (2016). "New diffusion reflection imaging system using gold nanorods coated with poly-(3,4-ethylenedioxythiophene)." *Optical Materials Express* 6(4): 1238-1246.

PARK, D.-H., J.-M. OH, Y.-G. SHUL and J.-H. CHOY (2008). "Fe₃O₄ @ Polypyrrole Core-Shell Nanohybrid for Efficient DNA Retrieval." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8(10): 5014-5017.

PATIL, A. M., V. C. LOKHANDE, T. JI and C. D. LOKHANDE (2019). "New design of all-solid state asymmetric flexible supercapacitor with high energy storage and long term cycling stability using m-CuO/FSS and h-CuS/FSS electrodes." *Electrochimica Acta* 307: 30-42.

PAUL, A., M. AVCI-ADALI, G. ZIEMER and H. P. WENDEL (2009). "Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX." *Oligonucleotides* 19(3): 243-254.

PEDRO, G. C., F. D. S. GORZA, R. J. da SILVA, K. T. O. do NASCIMENTO, J. C. MEDINA-LLAMAS, A. E. CHÁVEZ-GUAJARDO, J. J. ALCARAZ-ESPINOZA and C. P. de MELO (2019). "A novel nucleic acid fluorescent sensing platform based on nanostructured films of intrinsically conducting polymers." *Analytica Chimica Acta* 1047: 214-224.

PELT-VERKUIL, E. v., A. v. BELKUM and J. P. HAYS (2008). *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Dordrecht, Springer.

PENG, Y. and P. WU (2004). "A two dimensional infrared correlation spectroscopic study on the structure changes of PVDF during the melting process." *Polymer* 45(15): 5295-5299.

PERÇİN, I., V. KARAKOÇ, S. AKGÖL, E. AKSÖZ and A. DENİZLİ (2012). "Poly(hydroxyethyl methacrylate) based magnetic nanoparticles for plasmid DNA purification from *Escherichia coli* lysate." *Materials Science and Engineering: C* 32(5): 1133-1140.

PEREIRA, M. C., E. M. GARCIA, A. Cândido da SILVA, E. LORENÇON, J. D. ARDISSON, E. MURAD, J. D. FABRIS, T. MATENCIO, T. de Castro RAMALHO and M. V. J. ROCHA (2011). "Nanostructured δ -FeOOH: a novel photocatalyst for water splitting." *Journal of Materials Chemistry* 21(28): 10280-10282.

PETCHAROEN, K. and A. SIRIVAT (2012). "Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method." *Materials Science and Engineering: B* 177(5): 421-427.

PIMENTA, M. A., G. DRESSELHAUS, M. S. DRESSELHAUS, L. G. CANÇADO, A. JORIO and R. SAITO (2007). "Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy." *Physical Chemistry Chemical Physics* 9(11): 1276-1290.

PIRES, M. J. R. G. R., M. I. A. FERRA and A. M. M. MARQUES (2012). "Ionization of methyl orange in aqueous sodium chloride solutions." *The Journal of Chemical Thermodynamics* 53: 93-99.

POL, V. G., H. GRISARU and A. GEDANKEN (2005). "Coating Noble Metal Nanocrystals (Ag, Au, Pd, and Pt) on Polystyrene Spheres via Ultrasound Irradiation." *Langmuir* 21(8): 3635-3640.

- POONAM, K. SHARMA, A. ARORA and S. K. TRIPATHI (2019). "Review of supercapacitors: Materials and devices." *Journal of Energy Storage* 21: 801-825.
- POPLI, S. and U. D. PATEL (2015). "Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review." *International Journal of Environmental Science and Technology* 12(1): 405-420.
- PRUD'HOMME, G., R. DRAGHIA-AKLI and Q. WANG (2007). "Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus." *Gene therapy* 14(7): 553-564.
- QIE, F., G. ZHANG, J. HOU, X. SUN, S.-z. LUO and T. TAN (2012). "Extracting genomic DNA of foodstuff by polyamidoamine (PAMAM)–magnetite nanoparticles." *Talanta* 93: 166-171.
- QIU, Q., M. ZHU, Z. LI, K. QIU, X. LIU, J. YU and B. DING (2019). "Highly flexible, breathable, tailorable and washable power generation fabrics for wearable electronics." *Nano Energy* 58: 750-758.
- QU, G., J. CHENG, X. LI, D. YUAN, P. CHEN, X. CHEN, B. WANG and H. PENG (2016). "A Fiber Supercapacitor with High Energy Density Based on Hollow Graphene/Conducting Polymer Fiber Electrode." *Advanced Materials* 28(19): 3646-3652.
- RADOVANOVIĆ, M., B. JUGOVIĆ, M. GVOZDENOVIĆ, B. JOKIĆ, B. GRGUR, B. BUGARSKI and Z. KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ (2016). "Immobilization of α -amylase via adsorption on magnetic particles coated with polyaniline." *Starch - Stärke* 68(5-6): 427-435.
- RAICHMAN, Y., M. KAZAKEVICH, E. RABKIN and Y. TSUR (2006). "Inter-Nanoparticle Bonds in Agglomerates Studied by Nanoindentation." *Advanced Materials* 18(15): 2028-2030.
- RAITI, S. and R. A. TOLMAN (1986). *Human growth hormone*. New York, New York, U. S., Springer.
- RANÉ, A. and R. DASGUPTA (2013). *Urinary tract infection : clinical perspectives on urinary tract infection*. London, Springer.
- RANGEL, J. M., P. H. SPARLING, C. CROWE, P. M. GRIFFIN and D. L. SWERDLOW (2005). "Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982–2002." *Emerging infectious diseases* 11(4): 603.
- RAY, A., G. E. ASTURIAS, D. L. KERSHNER, A. F. RICHTER, A. G. MACDIARMID and A. J. EPSTEIN (1989). "Polyaniline: Doping, structure and derivatives." *Synthetic Metals* 29(1): 141-150.
- REDDY, L. H., J. L. ARIAS, J. NICOLAS and P. COUVREUR (2012). "Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications." *Chemical Reviews* 112(11): 5818-5878.
- REEDY, C. R., C. W. PRICE, J. SNIEGOWSKI, J. P. FERRANCE, M. BEGLEY and J. P. LANDERS (2011). "Solid phase extraction of DNA from biological samples in a

post-based, high surface area poly(methyl methacrylate) (PMMA) microdevice." *Lab Chip* 11(9): 1603-1611.

RITTICH, B. and A. ŠPANOVA (2013). "SPE and purification of DNA using magnetic particles." *Journal of Separation Science* 36(15): 2472-2485.

ROBATI, D., B. MIRZA, M. RAJABI, O. MORADI, I. TYAGI, S. AGARWAL and V. K. GUPTA (2016). "Removal of hazardous dyes-BR 12 and methyl orange using graphene oxide as an adsorbent from aqueous phase." *Chemical Engineering Journal* 284: 687-697.

ROBINSON, T., G. MCMULLAN, R. MARCHANT and P. NIGAM (2001). "Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative." *Bioresource Technology* 77(3): 247-255.

RÖCKEN, C., K. NEUMANN, S. CARL-MCGRATH, H. LAGE, M. P. A. EBERT, J. DIERKES, C. A. JACOBI, S. KALMUK, P. NEUHAUS and U. NEUMANN (2007). "The Gene Polymorphism of the Angiotensin I-Converting Enzyme Correlates with Tumor Size and Patient Survival in Colorectal Cancer Patients." *Neoplasia* 9(9): 716-722.

RYAN, K. J., RAY, C. G. (2004). *Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. New York, United States MCGRAW-HILL

SABNIS, R. W. (2008). *Handbook of acid-base indicators*. Boca Raton, CRC Press.

SAEED, K. B. and N. S. AHMAD (2013). "Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications in Diagnostic Microbiology." *International Journal of Medical Students* 1(1): 28-36.

SAHOO, S. L. and C.-H. LIU (2015). "Adsorption behaviors of DNA by modified magnetic nanoparticles: Effect of spacer and salt." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 482: 184-194.

SARAJI, M., S. YOUSEFI and M. TALEBI (2017). "Plasmid DNA purification by zirconia magnetic nanocomposite." *Anal Biochem* 539: 33-38.

SARICIFTCI, N. S., M. BARTONEK, H. KUZMANY, H. NEUGEBAUER and A. NECKEL (1989). "Analysis of various doping mechanisms in polyaniline by optical, FTIR and Raman spectroscopy." *Synthetic Metals* 29(1): 193-202.

SARKAR, A. and G. GOPAL KHAN (2018). "Synthesis of BiFeO₃ nanoparticle anchored TiO₂-BiFeO₃ nano-heterostructure and exploring its different electrochemical aspects as electrode." *Materials Today: Proceedings* 5(3, Part 3): 10177-10184.

SARKAR, T. R. and J. IRUDAYARAJ (2008). "Carboxyl-coated magnetic nanoparticles for mRNA isolation and extraction of supercoiled plasmid DNA." *Analytical Biochemistry* 379(1): 130-132.

SATILMIS, B. and T. UYAR (2018). "Amine modified electrospun PIM-1 ultrafine fibers for an efficient removal of methyl orange from an aqueous system." *Applied Surface Science* 453: 220-229.

- SAVIOLLI, J. Y. (2010). Pesquisa e Caracterização de Escherichia coli patogênica (E.coli produtora de toxina Shiga – STEC; E.coli aviária patogênica – APEC) de fragatas (Fregata magnificens) da Costa do Estado de São Paulo. Mestrado, Universidade de São Paulo.
- SCHIMANKE, G. and M. MARTIN (2000). "In situ XRD study of the phase transition of nanocrystalline maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) to hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)." Solid State Ionics 136: 1235-1240.
- SCHLEEF, M. (2001). Plasmids for therapy and vaccination. Weinheim ; New York, Wiley-VCH.
- SCHMID, F. X. (2001). "Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry." eLS.
- SCHOPF, G. and G. KOSSMEHL (1997). Polythiophenes : electrically conductive polymers. Berlin; New York, Springer.
- SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK and R. JOHNE (2012). "PCR inhibitors - occurrence, properties and removal." J Appl Microbiol 113(5): 1014-1026.
- SCHWARZENBACH, R. P., T. EGLI, T. B. HOFSTETTER, U. v. GUNTEN and B. WEHRLI (2010). "Global Water Pollution and Human Health." Annual Review of Environment and Resources 35(1): 109-136.
- SCHWERTMANN, U. and R. M. CORNELL (2000). Iron oxides in the laboratory : preparation and characterization. Weinheim ; New York, Wiley-VCH.
- SCIENTIFIC, T. (2008). "260/280 and 260/230 Ratios." T009-Technical Bulletin: 1-2.
- SEN, P. and A. DE (2010). "Electrochemical performances of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-NiFe₂O₄ nanocomposite as electrode for supercapacitor." Electrochimica Acta 55(16): 4677-4684.
- SERNA, C. and M. MORALES (2004). "Maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$): a versatile magnetic colloidal material." Surface and colloid science: 27-81.
- SEYMOUR, R. B. (1981). Conductive polymers. New York, Plenum Press.
- SHAHABUDDIN, S., N. M. SARIH, S. MOHAMAD and S. N. ATIKA BAHARIN (2016). "Synthesis and characterization of Co₃O₄ nanocube-doped polyaniline nanocomposites with enhanced methyl orange adsorption from aqueous solution." RSC Advances 6(49): 43388-43400.
- SHAKHMAEVA, I. I., E. R. BULATOV, O. V. BONDAR, D. V. SAIFULLINA, M. CULHA, A. A. RIZVANOV and T. I. ABDULLIN (2011). "Binding and purification of plasmid DNA using multi-layered carbon nanotubes." Journal of Biotechnology 152(3): 102-107.
- SHAN, Z., X. LI, Y. GAO, X. WANG, C. LI and Q. WU (2012). "Application of magnetic hydroxyapatite nanoparticles for solid phase extraction of plasmid DNA." Analytical Biochemistry 425(2): 125-127.

- SHAN, Z., Q. WU, X. WANG, Z. ZHOU, K. D. OAKES, X. ZHANG, Q. HUANG and W. YANG (2010). "Bacteria capture, lysate clearance, and plasmid DNA extraction using pH-sensitive multifunctional magnetic nanoparticles." *Analytical Biochemistry* 398(1): 120-122.
- SHAO, D., A. XIA, J. HU, C. WANG and W. YU (2008). "Monodispersed magnetite/silica composite microspheres: Preparation and application for plasmid DNA purification." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 322(1-3): 61-65.
- SHARMA, P. and T. S. BHATTI (2010). "A review on electrochemical double-layer capacitors." *Energy Conversion and Management* 51(12): 2901-2912.
- SHARMA, P., H. KAUR, M. SHARMA and V. SAHORE (2011). "A review on applicability of naturally available adsorbents for the removal of hazardous dyes from aqueous waste." *Environmental Monitoring and Assessment* 183(1): 151-195.
- SHARMA, S. K. and R. SANGHI (2012). *Advances in water treatment and pollution prevention*. Dordrecht ; New York, Springer.
- SHEEHAN, D. (2009). *Physical biochemistry : principles and applications*. Chichester, UK ; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell.
- SHEN, J., Z. LI, Y.-n. WU, B. ZHANG and F. LI (2015). "Dendrimer-based preparation of mesoporous alumina nanofibers by electrospinning and their application in dye adsorption." *Chemical Engineering Journal* 264: 48-55.
- SHERMAN, D. M. and T. D. WAITE (1985). "Electronic spectra of Fe³⁺ oxides and oxide hydroxides in the near IR to near UV." *American Mineralogist* 70(11-12): 1262-1269.
- SHI, W., Q. YAO, S. QU, H. CHEN, T. ZHANG and L. CHEN (2017). "Micron-thick highly conductive PEDOT films synthesized via self-inhibited polymerization: roles of anions." *Npg Asia Materials* 9: e405.
- SHIELDS, M. J., K. R. HAHN, T. W. JANZEN, N. GOJI, M. C. THOMAS, C. I. B. KINGOMBE, C. PAQUET, A. J. KELL and K. K. AMOAKO (2012). "Immunomagnetic Capture of *Bacillus anthracis* Spores from Food." *Journal of Food Protection* 75(7): 1243-1248.
- SIM, H. J., C. CHOI, D. Y. LEE, H. KIM, J.-H. YUN, J. M. KIM, T. M. KANG, R. OVALLE, R. H. BAUGHMAN, C. W. KEE and S. J. KIM (2018). "Biomolecule based fiber supercapacitor for implantable device." *Nano Energy* 47: 385-392.
- SINDEN, R. R. (1994). *DNA structure and function*. San Diego, Academic Press.
- SINGH, P. K. and M. S. GAUR (2018). "Enhancement of β -phase of P(VDF-TrFE)60/40 by BaTiO₃ nanofiller." *Ferroelectrics* 524(1): 37-43.
- SINGH, R. L., P. K. SINGH and R. P. SINGH (2015). "Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review." *International Biodeterioration & Biodegradation* 104: 21-31.

- SONIA, T. S., P. A. MINI, R. NANDHINI, K. SUJITH, B. AVINASH, S. V. NAIR and K. R. V. SUBRAMANIAN (2013). "Composite supercapacitor electrodes made of activated carbon/PEDOT:PSS and activated carbon/doped PEDOT." *Bulletin of Materials Science* 36(4): 547-551.
- SOUSA, Â., F. SOUSA and J. A. QUEIROZ (2012). "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification." *Journal of Separation Science* 35(22): 3046-3058.
- SRINIVASAN, S. (2006). *Fuel cells : from fundamentals to applications*. New York, Springer.
- STÅHL, K., K. NIELSEN, J. JIANG, B. LEBECH, J. C. HANSON, P. NORBY and J. van LANSCHOT (2003). "On the akaganéite crystal structure, phase transformations and possible role in post-excavational corrosion of iron artifacts." *Corrosion Science* 45(11): 2563-2575.
- STANGER, J., N. TUCKER and M. STAIGER (2009). *Electrospinning*, iSmithers Rapra Publishing.
- STEIN, G. S. and J. L. STEIN (1984). *Recombinant DNA and cell proliferation*. Orlando, Fla., Academic Press.
- STAPIEN, L., A. ROCH, S. SCHLAIER, I. DANI, A. KIRIY, F. SIMON, V. LUKOWICZ MARIAN and C. LEYENS (2016). Investigation of the Thermoelectric Power Factor of KOH-Treated PEDOT:PSS Dispersions for Printing Applications. *Energy Harvesting and Systems*. 3: 101.
- STOLLER, M. D. and R. S. RUOFF (2010). "Best practice methods for determining an electrode material's performance for ultracapacitors." *Energy & Environmental Science* 3(9): 1294-1301.
- SUN, H., X. ZHU, L. ZHANG, Y. ZHANG and D. WANG (2010). "Capture and release of genomic DNA by PEI modified Fe₃O₄/Au nanoparticles." *Materials Science and Engineering: C* 30(2): 311-315.
- SUN, K., S. ZHANG, P. LI, Y. XIA, X. ZHANG, D. DU, F. H. ISIKGOR and J. OUYANG (2015). "Review on application of PEDOTs and PEDOT:PSS in energy conversion and storage devices." *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 26(7): 4438-4462.
- SUNG, Y. J., H.-J. SUK, H. Y. SUNG, T. LI, H. POO and M.-G. KIM (2013). "Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* in milk." *Biosensors and Bioelectronics* 43: 432-439.
- SUPPES, G. M., C. G. CAMERON and M. S. FREUND (2010). "A Polypyrrole/Phosphomolybdic Acid | Poly (3 , 4-ethylenedioxythiophene) /Phosphotungstic Acid Asymmetric Supercapacitor." *Journal of The Electrochemical Society* 157(9): A1030-A1034.

- SUTTON, S. (2006). Measurement of cell concentration in suspension by optical density. Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter.
- SUTTON, S. (2011). "Measurement of microbial cells by optical density." *Journal of Validation technology* 17(1): 46.
- SZAJDA, M. and J. N. LAM (1996). "Thiophenes and their Benzo Derivatives: Structure." *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*: 438-490.
- TAHIR, M., L. HE, W. A. HAIDER, W. YANG, X. HONG, Y. GUO, X. PAN, H. TANG, Y. LI and L. MAI (2019). "Co-Electrodeposited porous PEDOT–CNT microelectrodes for integrated micro-supercapacitors with high energy density, high rate capability, and long cycling life." *Nanoscale* 11(16): 7761-7770.
- TAN, S. C. and B. C. YIAP (2009). "DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009.
- TANG, J., M. MYERS, K. A. BOSNICK and L. E. BRUS (2003). "Magnetite Fe₃O₄ nanocrystals: spectroscopic observation of aqueous oxidation kinetics." *The Journal of Physical Chemistry B* 107(30): 7501-7506.
- TANG, P., L. HAN and L. ZHANG (2014). "Facile Synthesis of Graphite/PEDOT/MnO₂ Composites on Commercial Supercapacitor Separator Membranes as Flexible and High-Performance Supercapacitor Electrodes." *ACS Applied Materials & Interfaces* 6(13): 10506-10515.
- TANG, Y., Y. REN and X. SHI (2013). "Bifunctional Mesoporous Zirconium Phosphonates for Delivery of Nucleic Acids." *Inorganic Chemistry* 52(3): 1388-1397.
- TANHAEI, B., A. AYATI, M. LAHTINEN and M. SILLANPÄÄ (2015). "Preparation and characterization of a novel chitosan/Al₂O₃/magnetite nanoparticles composite adsorbent for kinetic, thermodynamic and isotherm studies of Methyl Orange adsorption." *Chemical Engineering Journal* 259: 1-10.
- TANZIFI, M., S. H. HOSSEINI, A. D. KIADEHI, M. OLAZAR, K. KARIMIPOUR, R. REZAIEMEHR and I. ALI (2017). "Artificial neural network optimization for methyl orange adsorption onto polyaniline nano-adsorbent: Kinetic, isotherm and thermodynamic studies." *Journal of Molecular Liquids* 244: 189-200.
- TECHNOLOGY, O. G. (2011). "Understanding and measuring variations in DNA sample quality." Retrieved 05/10, 2017, from https://www.ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality.
- TEIXEIRA-DIAS, B., D. ZANUY, L. J. del VALLE, F. ESTRANY, E. ARMELIN and C. ALEMÁN (2010). "Influence of the Doping Level on the Interactions between Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and Plasmid DNA." *Macromolecular Chemistry and Physics* 211(10): 1117-1126.
- TENAILLON, O., D. SKURNIK, B. PICARD and E. DENAMUR (2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*." *Nature Reviews Microbiology* 8(3): 207-217.

- TENG, Z., J. LI, F. YAN, R. ZHAO and W. YANG (2009). "Highly magnetizable superparamagnetic iron oxide nanoparticles embedded mesoporous silica spheres and their application for efficient recovery of DNA from agarose gel." *Journal of Materials Chemistry* 19(13): 1811-1815.
- TER-OGANESSIAN, N. V., A. A. GUDA AND V. P. SAKHNENKO (2017). "Linear magnetoelectric effect in göthite, α -FeOOH." *Scientific Reports* 7(1): 16410.
- TEWARI, P. H. and American Chemical Society. Division of Colloid and Surface Chemistry. (1981). *Adsorption from aqueous solutions*. New York, Plenum Press.
- THOMAS, C. M. (2000). *The horizontal gene pool : bacterial plasmids and gene spread*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.
- TIAN, Y., M. WU, R. LIU, Y. LI, D. WANG, J. TAN, R. WU and Y. HUANG (2011). "Electrospun membrane of cellulose acetate for heavy metal ion adsorption in water treatment." *Carbohydrate Polymers* 83(2): 743-748.
- TOLMASKY, M. and J. C. ALONSO (2015). *Plasmids : biology and impact in biotechnology and discovery*. Washington, DC, ASM Press.
- TONG, L., K. H. SKORENKO, A. C. FAUCETT, S. M. BOYER, J. LIU, J. M. MATIVETSKY, W. E. BERNIER and W. E. JONES (2015). "Vapor-phase polymerization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) on commercial carbon coated aluminum foil as enhanced electrodes for supercapacitors." *Journal of Power Sources* 297: 195-201.
- TUČEK, J., L. MACHALA, S. ONO, A. NAMAI, M. YOSHIKIYO, K. IMOTO, H. TOKORO, S.-I. OHKOSHI and R. ZBOŘIL (2015). "Zeta-Fe₂O₃ – A new stable polymorph in iron(III) oxide family." *Scientific Reports* 5: 15091.
- TUČEK, J., R. ZBOŘIL, A. NAMAI and S.-i. OHKOSHI (2010). " ϵ -Fe₂O₃: An Advanced Nanomaterial Exhibiting Giant Coercive Field, Millimeter-Wave Ferromagnetic Resonance, and Magnetoelectric Coupling." *Chemistry of Materials* 22(24): 6483-6505.
- UMPUCH, C. and S. SAKAEW (2013). "Removal of methyl orange from aqueous solutions by adsorption using chitosan intercalated montmorillonite." *Songklanakarin Journal of Science & Technology* 35(4).
- UNIFESP. (2014). "Manual de coleta de material biológico." Retrieved 04/26, 2017, from http://www.unifesp.br/dmed/patologiaclinica/laboratorio-central/manuais/manual-de-coleta-2014-2015/at_download/file.
- UNNITHAN, M. R. and T. S. ANIRUDHAN (2001). "The Kinetics and Thermodynamics of Sorption of Chromium(VI) onto the Iron(III) Complex of a Carboxylated Polyacrylamide-Grafted Sawdust." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 40(12): 2693-2701.
- VAN OORSCHOT, R. A. H., K. N. BALLANTYNE and R. J. MITCHELL (2010). "Forensic trace DNA: a review." *Investigative Genetics* 1(1): 14.

- VASANTHAKUMAR, R. (2009). Practical Microbiology. New Delhi, India, BI Publications.
- VERCOUTERE, W. and M. AKESON (2002). "Biosensors for DNA sequence detection." *Current Opinion in Chemical Biology* 6(6): 816-822.
- VIDAL, C., R. NASCIMENTO, G. RAULINO, A. CLECIUS and D. MELO (2014). Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais.
- WANG, C., J. YIN, R. WANG, T. JIAO, H. HUANG, J. ZHOU, L. ZHANG and Q. PENG (2019). "Facile Preparation of Self-Assembled Polydopamine-Modified Electrospun Fibers for Highly Effective Removal of Organic Dyes." *Nanomaterials* 9(1): 116.
- WANG, J. (2000). "Survey and summary: from DNA biosensors to gene chips." *Nucleic acids research* 28(16): 3011-3016.
- WANG, X. and B. S. HSIAO (2016). "Electrospun nanofiber membranes." *Current Opinion in Chemical Engineering* 12: 62-81.
- WANG, X., L. XING, Y. SHU, X. CHEN and J. WANG (2014). "Novel polymeric ionic liquid microspheres with high exchange capacity for fast extraction of plasmid DNA." *Anal Chim Acta* 837: 64-69.
- WANG, Y., X. MA, C. DING and L. JIA (2015). "pH-responsive deoxyribonucleic acid capture/release by polydopamine functionalized magnetic nanoparticles." *Analytica Chimica Acta* 862: 33-40.
- WATANABE, A., K. MORI, Y. IWASAKI, Y. NAKAMURA and S. NIIZUMA (1987). "Electrochromism of polyaniline film prepared by electrochemical polymerization." *Macromolecules* 20(8): 1793-1796.
- WATSON, J. D. (2014). Molecular biology of the gene. Boston, Pearson.
- WATSON, N. (1988). "A new revision of the sequence of plasmid pBR322." *Gene* 70(2): 399-403.
- WEN, J., J. P. FERRANCE and J. P. LANDERS (2015). DNA extraction using a photopolymerized monolith in a capillary, Google Patents.
- WEN, J., L. A. LEGENDRE, J. M. BIENVENUE and J. P. LANDERS (2008). "Purification of Nucleic Acids in Microfluidic Devices." *Analytical Chemistry* 80(17): 6472-6479.
- WEN, Y. and J. XU (2017). "Scientific Importance of Water-Processable PEDOT-PSS and Preparation, Challenge and New Application in Sensors of Its Film Electrode: A Review." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 55(7): 1121-1150.
- WENDORFF, J. H., S. AGARWAL and A. GREINER (2012). Electrospinning : materials, processing, and applications. Weinheim, Germany, Wiley-VCH.
- WENDORFF, J. H., S. AGARWAL and A. GREINER (2012). Electrospinning: materials, processing, and applications, John Wiley & Sons.

- WILSON, K. and J. M. WALKER (2000). Principles and techniques of practical biochemistry. Cambridge ; New York, Cambridge University Press.
- WINK, M. (2011). An introduction to molecular biotechnology : fundamentals, methods, and applications. Weinheim, Wiley-Blackwell.
- WINKEL, P., B. E. STATLAND, A. M. SAUNDERS, H. OSBORN and H. KUPPERMAN (1981). "Within-day Physiologic Variation of Leukocyte Types in Healthy Subjects as Assayed by Two Automated Leukocyte Differential Analyzers." American Journal of Clinical Pathology 75(5): 693-700.
- WINTERS, M. A., J. D. RICHTER, S. L. SAGAR, A. L. LEE and R. J. LANDER (2003). "Plasmid DNA purification by selective calcium silicate adsorption of closely related impurities." Biotechnol Prog 19(2): 440-447.
- WU, W., Q. HE and C. JIANG (2008). "Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies." Nanoscale research letters 3(11): 397.
- WU, W., X. XIAO, S. ZHANG, H. LI, X. ZHOU and C. JIANG (2009). "One-pot reaction and subsequent annealing to synthesis hollow spherical magnetite and maghemite nanocages." Nanoscale research letters 4(8): 926.
- XIE, Q., Y. XU, Z. WANG, C. XU, P. ZOU, Z. LIN, C. XU, C. YANG, F. KANG and C.-P. WONG (2016). "Vapor-Phase Polymerized Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) on a Nickel Nanowire Array Film: Aqueous Symmetrical Pseudocapacitors with Superior Performance." PLOS ONE 11(11): e0166529.
- XIE, Y., H. DU and C. XIA (2015). "Porous poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoarray used for flexible supercapacitor." Microporous and Mesoporous Materials 204: 163-172.
- XIN, Q., J. FU, Z. CHEN, S. LIU, Y. YAN, J. ZHANG and Q. XU (2015). "Polypyrrole nanofibers as a high-efficient adsorbent for the removal of methyl orange from aqueous solution." Journal of Environmental Chemical Engineering 3(3): 1637-1647.
- XIONGWEI, L., D. JIANJUN, F. JINGHUI, W. LANLAN and K. XUEJUN (2018). Comparison of extraction efficiency of three nanofibers for four heavy metals in aqueous solution. 2018 7th International Conference on Energy, Environment and Sustainable Development (ICEESD 2018), Atlantis Press.
- XU, K., X. HUANG, Q. LIU, R. ZOU, W. LI, X. LIU, S. LI, J. YANG and J. HU (2014). "Understanding the effect of polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on enhancing the supercapacitor performance of NiCo₂O₄ electrodes." Journal of Materials Chemistry A 2(39): 16731-16739.
- XU, K., Y. WANG, H. ZHANG, Q. YANG, X. WEI, P. XU and Y. ZHOU (2017). "Solid-phase extraction of DNA by using a composite prepared from multiwalled carbon nanotubes, chitosan, Fe₃O₄ and a poly(ethylene glycol)-based deep eutectic solvent." Microchimica Acta 184(10): 4133-4140.

- XU, P., G. M. ZENG, D. L. HUANG, C. L. FENG, S. HU, M. H. ZHAO, C. LAI, Z. WEI, C. HUANG and G. X. XIE (2012). "Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review." *Science of the Total Environment* 424: 1-10.
- XU, S., X. SONG, J. GUO and C. WANG (2012). "Composite Microspheres for Separation of Plasmid DNA Decorated with MNPs through in Situ Growth or Interfacial Immobilization Followed by Silica Coating." *ACS Applied Materials & Interfaces* 4(9): 4764-4775.
- XU, Y., J. SUN, H. CHEN and L. BAI (2015). "Cobalt(iii) acetylacetonate initiated RAFT polymerization of acrylonitrile and its application in removal of methyl orange after electrospinning." *RSC Advances* 5(72): 58393-58402.
- XUE, J., T. WU, Y. DAI and Y. XIA (2019). "Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications." *Chemical Reviews* 119(8): 5298-5415.
- YAGUB, M. T., T. K. SEN, S. AFROZE and H. M. ANG (2014). "Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review." *Advances in Colloid and Interface Science* 209: 172-184.
- YAMAMOTO, T., K. SANECHIKA and A. YAMAMOTO (1980). "Preparation of thermostable and electric-conducting poly(2,5-thienylene)." *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* 18(1): 9-12.
- YANG, B., Y. WANG and P.-Y. QIAN (2016). "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis." *BMC Bioinformatics* 17(1): 135.
- YANG, C., J. DU, Q. PENG, R. QIAO, W. CHEN, C. XU, Z. SHUAI and M. GAO (2009). "Polyaniline/Fe₃O₄ Nanoparticle Composite: Synthesis and Reaction Mechanism." *The Journal of Physical Chemistry B* 113(15): 5052-5058.
- YANG, P. and W. MAI (2014). "Flexible solid-state electrochemical supercapacitors." *Nano Energy* 8: 274-290.
- YANG, X., K. QIAO, Y. YE, M. YANG, J. LI, H. GAO, S. ZHANG, W. ZHOU and R. LU (2016). "Facile synthesis of multifunctional attapulgite/Fe₃O₄/polyaniline nanocomposites for magnetic dispersive solid phase extraction of benzoylurea insecticides in environmental water samples." *Analytica Chimica Acta* 934: 114-121.
- YANG, Z., S. JI, W. GAO, C. ZHANG, L. REN, W. W. TJIU, Z. ZHANG, J. PAN and T. LIU (2013). "Magnetic nanomaterial derived from graphene oxide/layered double hydroxide hybrid for efficient removal of methyl orange from aqueous solution." *Journal of Colloid and Interface Science* 408: 25-32.
- YAO, Y., H. BING, X. FEIFEI and C. XIAOFENG (2011). "Equilibrium and kinetic studies of methyl orange adsorption on multiwalled carbon nanotubes." *Chemical Engineering Journal* 170(1): 82-89.

- YEE, M. J., N. M. MUBARAK, M. KHALID, E. C. ABDULLAH and P. JAGADISH (2018). "Synthesis of polyvinyl alcohol (PVA) infiltrated MWCNTs buckypaper for strain sensing application." *Scientific Reports* 8(1): 17295.
- YIN, M., Z. CHEN, B. DEEGAN and S. O'BRIEN (2011). "Wüstite nanocrystals: Synthesis, structure and superlattice formation." *Journal of Materials Research* 22(7): 1987-1995.
- YOON, S.-H. (2015). *Membrane bioreactor processes: principles and applications*, CRC press.
- YOUSEF, A. E. and C. CARLSTROM (2003). *Food microbiology : a laboratory manual*. Hoboken, N.J., John Wiley & Sons.
- YOZA, B., A. ARAKAKI and T. MATSUNAGA (2003). "DNA extraction using bacterial magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer." *Journal of Biotechnology* 101(3): 219-228.
- YOZA, B., M. MATSUMOTO and T. MATSUNAGA (2002). "DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound." *Journal of Biotechnology* 94(3): 217-224.
- YU, A. (2013). *Electrochemical supercapacitors for energy storage and delivery : fundamentals and applications*. Boca Raton, Taylor & Francis.
- YU, B. Y. and S.-Y. KWAK (2010). "Assembly of magnetite nanocrystals into spherical mesoporous aggregates with a 3-D wormhole-like pore structure." *Journal of Materials Chemistry* 20(38): 8320-8328.
- ZENG, Z., D. YU, Z. HE, J. LIU, F.-X. XIAO, Y. ZHANG, R. WANG, D. BHATTACHARYYA and T. T. Y. TAN (2016). "Graphene Oxide Quantum Dots Covalently Functionalized PVDF Membrane with Significantly-Enhanced Bactericidal and Antibiofouling Performances." *Scientific Reports* 6: 20142.
- ZHAN, S., D. ZHU, S. MA, W. YU, Y. JIA, Y. LI, H. YU and Z. SHEN (2015). "Highly Efficient Removal of Pathogenic Bacteria with Magnetic Graphene Composite." *ACS Applied Materials & Interfaces* 7(7): 4290-4298.
- ZHANG, Y., H. FENG, X. WU, L. WANG, A. ZHANG, T. XIA, H. DONG, X. LI and L. ZHANG (2009). "Progress of electrochemical capacitor electrode materials: A review." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(11): 4889-4899.
- ZHANG, Y., X. YUAN, W. LU, Y. YAN, J. ZHU and T.-W. CHOU (2019). "MnO₂ based sandwich structure electrode for supercapacitor with large voltage window and high mass loading." *Chemical Engineering Journal* 368: 525-532.
- ZHANG, Z., L. ZHANG, L. CHEN, L. CHEN and Q.-H. WAN (2006). "Synthesis of Novel Porous Magnetic Silica Microspheres as Adsorbents for Isolation of Genomic DNA." *Biotechnology Progress* 22(2): 514-518.
- ZHAO, D., Q. ZHANG, W. CHEN, X. YI, S. LIU, Q. WANG, Y. LIU, J. LI, X. LI and H. YU (2017). "Highly Flexible and Conductive Cellulose-Mediated

PEDOT:PSS/MWCNT Composite Films for Supercapacitor Electrodes." *ACS Applied Materials & Interfaces* 9(15): 13213-13222.

ZHAO, Y., H. CHEN, J. LI and C. CHEN (2015). "Hierarchical MWCNTs/Fe₃O₄/PANI magnetic composite as adsorbent for methyl orange removal." *Journal of Colloid and Interface Science* 450: 189-195.

ZHOU, C., Y. REN, J. HAN, Q. XU and R. GUO (2019). "Chiral Polyaniline Hollow Nanotwists toward Efficient Enantioselective Separation of Amino Acids." *ACS Nano* 13(3): 3534-3544.

ZHOU, H., G. HAN, D. FU, Y. CHANG, Y. XIAO and H.-J. ZHAI (2014). "Petal-shaped poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/sodium dodecyl sulfate-graphene oxide intercalation composites for high-performance electrochemical energy storage." *Journal of Power Sources* 272: 203-210.

ZHOU, H., H.-J. ZHAI and G. HAN (2016). "Superior performance of highly flexible solid-state supercapacitor based on the ternary composites of graphene oxide supported poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-carbon nanotubes." *Journal of Power Sources* 323: 125-133.

ZHOU, H. and X. ZHI (2017). "Ternary composite electrodes based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotubes-carboxyl graphene for improved electrochemical capacitive performances." *Synthetic Metals* 234: 139-144.

ZHOU, M., H. SÄRKKÄ and M. SILLANPÄÄ (2011). "A comparative experimental study on methyl orange degradation by electrochemical oxidation on BDD and MMO electrodes." *Separation and Purification Technology* 78(3): 290-297.

ZHOU, Y., J. HE, H. WANG, N. NAN, K. QI and S. CUI (2017). Fabrication of superhydrophobic nanofiber fabric with hierarchical nanofiber structure. *e-Polymers*. 17: 249.

ZHOU, Z., U. S. KADAM and J. IRUDAYARAJ (2013). "One-stop genomic DNA extraction by salicylic acid-coated magnetic nanoparticles." *Analytical Biochemistry* 442(2): 249-252.

ZHU, H. Y., R. JIANG, L. XIAO and G. M. ZENG (2010). "Preparation, characterization, adsorption kinetics and thermodynamics of novel magnetic chitosan enwrapping nanosized γ -Fe₂O₃ and multi-walled carbon nanotubes with enhanced adsorption properties for methyl orange." *Bioresource Technology* 101(14): 5063-5069.

ZHU, Y., N. LI, T. LV, Y. YAO, H. PENG, J. SHI, S. CAO and T. CHEN (2018). "Ag-Doped PEDOT:PSS/CNT composites for thin-film all-solid-state supercapacitors with a stretchability of 480%." *Journal of Materials Chemistry A* 6(3): 941-947.

ZIJLSTRA, H. (1967). *Experimental methods in magnetism*. Amsterdam,, North-Holland Pub. Co.

ZUO, Y., J. XU, X. ZHU, X. DUAN, L. LU, Y. GAO, H. XING, T. YANG, G. YE and Y. YU (2016). "Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanorods/graphene oxide

nanocomposite as a new electrode material for the selective electrochemical detection of mercury (II)." *Synthetic Metals* 220: 14-19.

APÊNDICE A – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO (γ -Fe₂O₃)

Nesta seção apresentaremos a metodologia adotada para a obtenção das nanopartículas de óxido de ferro utilizadas como núcleo magnético para a síntese dos diferentes nanocompósitos por nós desenvolvidos para a purificação de DNA. Além disso, discutiremos ainda as caracterizações realizadas para determinar a composição, forma, fase, tamanho e o comportamento magnético das nanopartículas sintetizadas.

A.1. INTRODUÇÃO

Os óxidos de ferro são moléculas constituídas por átomos de ferro (Fe) ligados a átomos de oxigênio (O) e/ou grupos hidroxilas (OH). No total, existem 16 tipos diferentes de óxidos de ferro (listados na Tabela 14), que se diferenciam basicamente pela estrutura cristalina, o estado de oxidação do ferro (Fe³⁺, Fe²⁺, ou Fe³⁺+Fe²⁺), e a posição que o átomo de ferro ocupa na rede cristalina. Estes óxidos ocorrem comumente na natureza, podendo ser encontrados na forma de minerais, rocha, plantas, animais, oceano, entre outras (Faivre 2016).

Tabela 14 – Classificação dos diferentes óxidos de ferro relatados na literatura. Adaptado de (2017).

Nome	Fórmula	Estrutura	Ref.
Óxido			
Hematita	α – Fe ₂ O ₃	Romboédrico	(2017)
Magnetita	Fe ₃ O ₄	Espinélio inversa	(Cornell and Schwertmann 2003)
Maghemita	γ – Fe ₂ O ₃	Espinélio inversa	(Cornell and Schwertmann 2003)
-	β – Fe ₂ O ₃	Cúbica	(Tuček, Machala et al. 2015)
-	ε – Fe ₂ O ₃	Ortorrômbica	(Tuček, Zbořil et al. 2010)
Wüstita	FeO	Cúbica	(Yin, Chen et al. 2011)

Hidróxido			
Goethita	$\alpha - \text{FeOOH}$	Ortorrômbica	(Ter-Oganessian, Guda et al. 2017)
Lepidocrocita	$\gamma - \text{FeOOH}$	Ortorrômbica	(Ewing 1935)
Akaganéita	$\beta - \text{FeOOH}$	monoclínica	(Ståhl, Nielsen et al. 2003)
Schwertmannita	$\text{Fe}_{16}\text{O}_{16}(\text{OH})_y(\text{SO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Tetragonal	(Fernandez-Martinez, Timon et al. 2010)
-	$\delta - \text{FeOOH}$	Hexagonal	(Pereira, Garcia et al. 2011)
Feroxyhyta	$\delta' - \text{FeOOH}$	Hexagonal	(Carlson and Schwertmann 1980)
FeOOH – Alta pressão	FeOOH	Ortorrômbica	(2017)
Ferridrita	$\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Hexagonal	(2017)
Bernalita	$\text{Fe}(\text{OH})_3$	Ortorrômbica	(Birch, Pring et al. 1993)
Continuação da Tabela A.1			
Nome	Fórmula	Estrutura	Ref.
Green rust	$(\text{Fe}_x^{\text{III}}\text{Fe}_y^{\text{II}}(\text{OH})_{3x+2y-z}(\text{A}^-)_z$ $\text{A}^- = \text{Cl}^- \text{ } 1/2 \text{ SO}_4^{2-}$	Hexagonal	(Chaves 2005)
-	$\text{Fe}(\text{OH})_2$	Hexagonal	(2017)

Fonte: O autor (2019)

Na escala manométrica, os materiais podem apresentar propriedades (ópticas, magnéticas, elétricas, mecânicas, catalíticas, entre outras) diferentes quando comparados com os mesmos constituintes em escala macroscópica. Com o advento da nanotecnologia, o uso e o desenvolvimento de nanomateriais vêm se tornando uma área que tem experimentado grandes avanços tecnológicos. Um exemplo disso é a diferença no comportamento magnético dos óxidos de ferro, para os quais podemos observar o fenômeno de superparamagnetismo se as partículas têm dimensões inferiores a 30 nm,

enquanto que partículas com dimensões micrométricas têm comportamento ferrimagnético (Schwertmann and Cornell 2000, Faivre 2016).

Na atualidade, as nanopartículas de óxido de ferro, principalmente na fase magnetita e maghemita, têm sido utilizadas em uma vasta gama de aplicações, desde armazenamento de dados, sensoriamento, pigmentos, contraste de imageamento por ressonância magnética nuclear (RMN), catálise, remediação ambiental, tratamentos por hipertermia, armazenamento de energia, liberação controlada de drogas, purificação de moléculas biológicas, entre outras. Toda essa versatilidade das nanopartículas de óxido de ferro se faz possível devido a suas propriedades de biocompatibilidade, grande área superficial, comportamento superparamagnético, além de rotas sintéticas simples, rápidas, baratas, e com possibilidade de produção em grande escala (Cornell and Schwertmann 2003).

A.2. MATERIAIS E MÉTODOS

A.2.1. Materiais

Na Tabela 15 são mostrados os reagentes utilizados para a síntese das nanopartículas de óxido de ferro. Todos os reagentes usados eram de grau analítico, e foram utilizados como recebidos. Durante os experimentos, utilizamos água ultrapura proveniente de um sistema de tratamento Synerg (Millipore, Estados Unidos).

Tabela 15 – Propriedades dos reagentes utilizados nas sínteses.

Síntese das γ -NP de γ -Fe ₂ O ₃				
Reagente	Fórmula Molecular	Fabricante	Peso Molecular (g/mol)	Pureza (%)
Cloreto ferroso	FeCl ₂ ·4H ₂ O	Sigma-Aldrich/EUA	198,81	98,0
Cloreto férrico	FeCl ₃ ·6H ₂ O	Vetec/EUA	270,30	97,0
Hidróxido de amônia	NH ₄ OH	Química Moderna/BR	35,04	-

Fonte: O autor (2019)

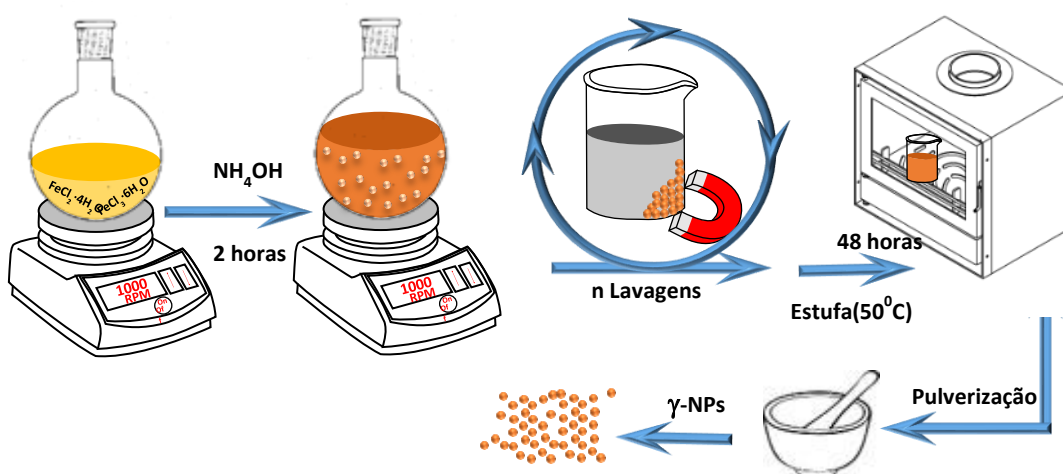
A.2.2. Síntese das nanopartículas magnéticas de maghemita (γ -NPs)

Para a síntese das nanopartículas γ -NPs, usamos o método de co-precipitação química, já muito bem estabelecido e descrito na literatura (Li, Fan et al. 2006, Wu, He et al. 2008, Petcharoen and Sirivat 2012, Xu, Zeng et al. 2012). Entre as principais vantagens deste método pode-se destacar a facilidade de síntese, que pode ser realizada em condições ambiente e usando reagentes comuns, e escalonada para o âmbito industrial

(Schwertmann and Cornell 2000, Wu, He et al. 2008, Lakay 2009, Nazari, Ghasemi et al. 2014).

Assim, em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 50 mL de duas fontes de ferro; os primeiros 25 ml foram de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ com concentração de 1 M, e o volume restante com uma solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ com concentração de 2 M. Esta mistura foi mantida sob forte agitação magnética por 10 min, sendo posteriormente, adicionados 125 mL de uma solução aquosa de NH_4OH com relação molar 1:1 de água. A reação foi deixada ocorrer por duas horas, e após este tempo as nanopartículas foram decantadas com o auxílio de um ímã. Então foi seguido um ciclo de várias lavagens com água ultrapura para a retirada de quaisquer impurezas e/ou reagentes. O produto foi seco a 50°C em uma estufa por 48 horas e pulverizado com almofariz de ágata, obtendo-se no fim um pó fino de cor marrom escuro. As principais etapas da síntese são apresentadas esquematicamente na Fig. 114.

Figura 114 – sequência esquemática da síntese por co-precipitação das nanopartículas de óxido de ferro (γ -NPs).



Fonte: O autor (2019)

A.2.3. Caracterização das γ -NPs

As caracterizações químicas das γ -NPs foram realizadas a partir das técnicas de espectroscopia na região do ultravioleta-visível (ver seção 5.2.3.1 do Capítulo 5) e do infravermelho (ver seção 3.2.3.1 do Capítulo 3). As caracterizações morfológicas foram realizadas a partir das microscopias eletrônicas de varredura (ver seção 3.2.3.2 do Capítulo 3) e transmissão (ver seção 5.2.3.3 do Capítulo 5). Já as propriedades magnéticas foram investigadas por meio da curva de magnetização (ver seção 3.2.3.3 do Capítulo 3).

Os procedimentos adotados para a preparação das amostras e os equipamentos utilizados são os mesmo que os previamente utilizados, como indicado nas diferentes seções dos capítulos da tese.

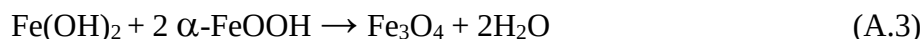
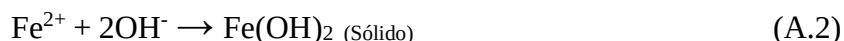
Quanto aos estudos de identificação da estrutura cristalina das γ -NPs, utilizamos a difração de Raios-X em pó. Os difratogramas foram obtidos com um difratômetro de raios-X D5000 (Siemens, Alemanha), com radiação referente a $K\alpha$ do Cu de comprimento de onda 1,54 Å, no intervalo (2θ) de $10^\circ - 70^\circ$, e resolução de $0,02^\circ$.

A.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A.3.1. Síntese das nanopartículas magnéticas γ -NPs

Como mencionado anteriormente, para a preparação das γ -NPs adotamos a rota de síntese por co-precipitação química. Neste tipo de síntese são utilizados dois sais como fontes de ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}), de modo que fatores como tamanho de partícula, formato e composição são diretamente dependentes dos sais precursores (cloretos, sulfatos, percloratos, nitratos, entre outros), da razão molar entre as fontes, e do pH da reação (Bee, Massart et al. 1995, Kim, Zhang et al. 2001).

Em nosso caso, usamos sais cloretos como as fontes de ferro. Mais especificamente, o cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi o provedor de íons de Fe^{3+} e o cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) de íons de Fe^{2+} , em uma razão 2:1 respectivamente, e usando NH_4OH como agente precipitante. Como mostrado nas equações A.1 – A.3, a reação ocorre da seguinte maneira. Primeiramente, e de acordo com as reações A.1 e A.2, existe a formação dos hidróxidos sólidos de goethita para o Fe^{3+} , e hidróxido de ferro (II) para o Fe^{2+} . Posteriormente à formação destas fases sólidas, ocorre uma terceira reação (Eq. A.3) entre estes hidróxidos, do que resulta o óxido de ferro na fase magnetita (Fe_3O_4) (Iwasaki, Kosaka et al. 2009).



Na Fig. 115 é mostrado o aspecto visual das nanopartículas de óxido de ferro obtidas segundo esse procedimento.

Figura 115 – Aspecto visual das γ -NPs sintetizadas pelo método de co-precipitação.



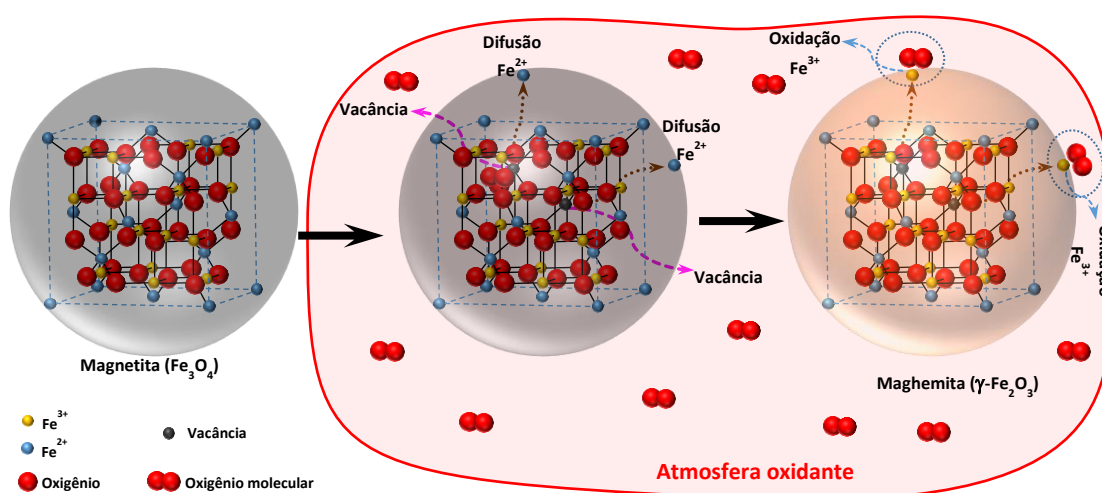
Fonte: O autor (2019)

Como pode ser observado, obtivemos um pó fino de cor marrom-avermelhada. Esta característica nos levou a questionar se realmente o produto da síntese seria a fase maghemita (γ -Fe₂O₃) e não a magnetita, uma vez que na literatura é relatado ser a maghemita uma fase mais estável que a magnetita e que – apesar dessas duas fases terem a mesma estrutura cristalina de espinela inversa com parâmetros de rede muito próximos ($a_{\text{mag}} = 0,839$ nm, $a_{\gamma\text{mag}} = 0,834$ nm) e apresentarem propriedades muito parecidas – a fase magnetita exibe uma coloração bastante escura, tendendo ao preto, enquanto que a maghemita tende a ser mais clara, com tons marrons (Schwertmann and Cornell 2000, Cornell and Schwertmann 2003, Faivre 2016). Outro fato a ser considerado é que geralmente as sínteses que levam à obtenção de nanopartículas de magnetita são realizadas em atmosfera inerte (argônio ou nitrogênio), a fim de evitar a oxidação dos íons de Fe²⁺ para Fe³⁺ (Cornell and Schwertmann 2003, Iwasaki, Kosaka et al. 2009), enquanto que nós trabalhamos em atmosfera ambiente (oxidante), o que pode ter causado a oxidação ao longo e/ou após a síntese, convertendo a magnetita em maghemita conforme a equação (Buxbaum 2005)



A reação da Eq. A.4, conhecida como reação topotática, consiste na redistribuição atômica sem alterações estruturais (cristalina) e do formato das partículas (Cornell and Schwertmann 2003, Serna and Morales 2004). No caso específico da transformação das γ -NPs de Fe_3O_4 para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, segundo descrito na literatura, os íons de Fe^{2+} têm raio atômico menor que o do oxigênio (82 e 140 pm, respectivamente) e se difundem do interior das nanopartículas para a superfície, onde reagem com o oxigênio do ar, mudando seu estado de oxidação para Fe^{3+} e deixando vacâncias nos sítios octaédricos da espinela invertida (Özdemir, Dunlop et al. 1993, Schwertmann and Cornell 2000). Este processo é representado de maneira ilustrativa na Fig. 116.

Figura 116 – Esquema ilustrativo dos principais eventos da oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} em nanopartículas de magnetita



Fonte: O autor (2019)

A taxa de conversão de magnetita em maghemita é diretamente dependente de fatores como o tamanho da partícula (que influenciará no comprimento de difusão dos íons de Fe^{2+}). Assim, quanto maior o diâmetro, maior será o comprimento de difusão e, consequentemente, mais lenta será a conversão entre as fases, que passa de alguns meses, para partículas inferiores a 10 nm, para anos, para partículas na faixa de 100 – 300 nm (Tang, Myers et al. 2003, Liu, Wang et al. 2004). E também da atmosfera a qual as partículas são submetidas como já discutido em parágrafos acima.

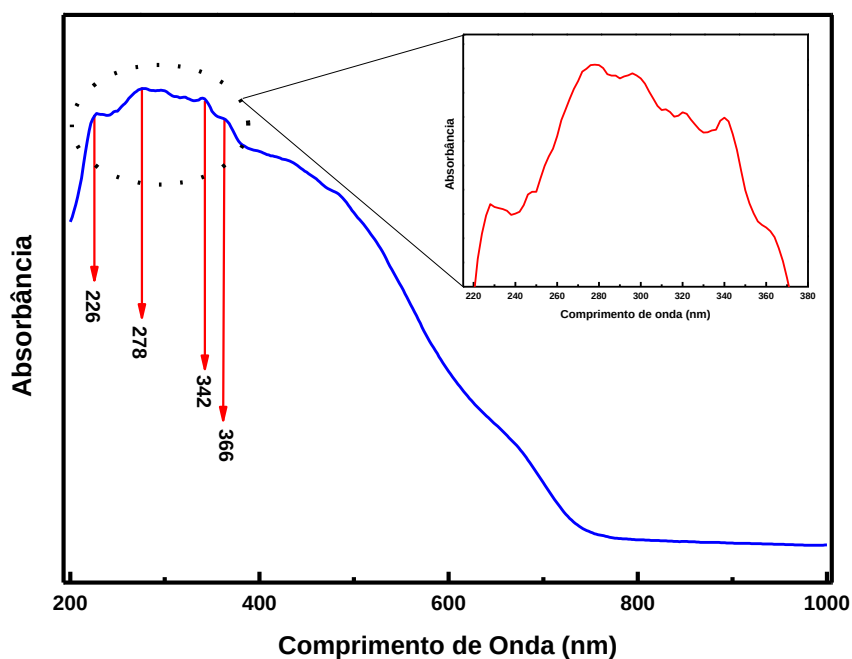
Com a intenção de melhor esclarecer a natureza da fase por nós sintetizada, e assim estabelecer as propriedades destas nanopartículas, realizamos uma série de caracterizações, que serão tratadas a seguir.

A.3.2. Caracterizações das nanopartículas magnéticas γ -NPs

A.3.2.1. Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Na Fig. 117 é apresentado o espectro de absorção das γ -NPs na região do ultravioleta-visível. Como evidenciado no gráfico, as nanopartículas sintetizadas exibem quatro bandas de absorção, em 226 nm, 278 nm, 342 nm, e 366 nm. Estes valores estão de acordo com a literatura, e as duas primeiras bandas (226 nm, 278 nm) correspondem às transições de carga entre os íons de Fe^{3+} e oxigênio, enquanto as demais (342 nm e 366 nm) são características das transições eletrônicas do Fe^{3+} (Sherman and Waite 1985, Cornell and Schwertmann 2003). Dessa forma, podemos concluir que fomos capazes de realizar com sucesso a síntese do óxido de ferro.

Figura 117 – Espectro de absorção UV-Vis das γ -NPs.



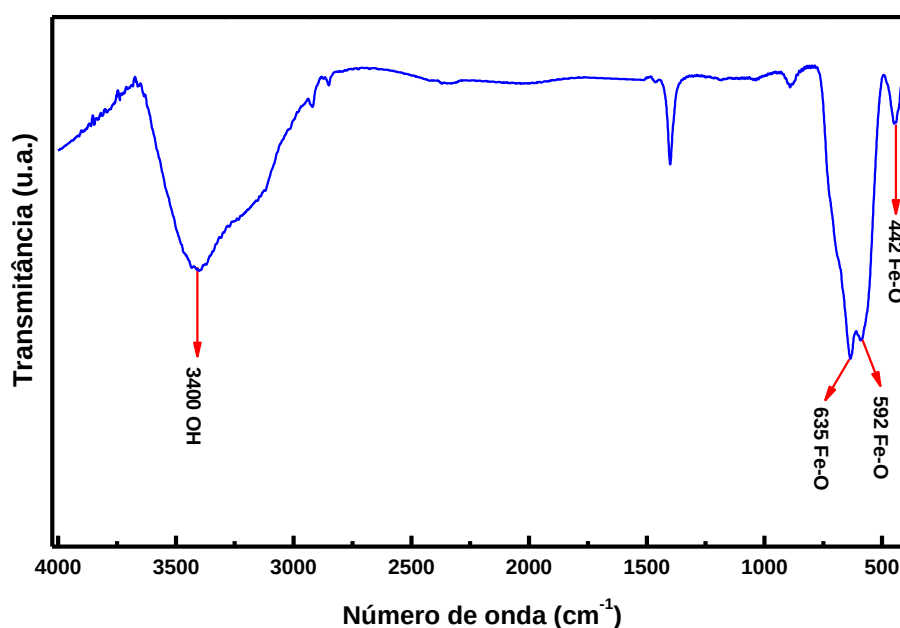
Fonte: O autor (2019)

A.3.2.2. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Com a indicação de que realmente sintetizamos o composto óxido de ferro, conforme a análise da espectroscopia UV-Vis discutida na seção anterior, prosseguimos para a questão previamente levantada sobre qual fase do óxido de ferro foi por nós sintetizada (ver Seção A.3.1). Para obtermos maiores informações sobre a fase em estudo e sua composição, realizamos então medidas de absorção na região do infravermelho, cujo espectro é mostrado na Fig. 118, onde podem ser observados picos de absorção em

442 cm^{-1} , 592 cm^{-1} , 635 cm^{-1} , e 3400 cm^{-1} . Podemos analisar os dados em três frentes. A primeira se concentra na presença dos picos de 442 cm^{-1} e 592 cm^{-1} , que são provenientes do estiramento característico dos íons Fe-O, comprovando assim que conseguimos de fato sintetizar as γ -NPs (Schwertmann and Cornell 2000, Cornell and Schwertmann 2003). A segunda diz respeito ao aparecimento do pico de 635 cm^{-1} , que na literatura é observado apenas para a fase maghemita, enquanto que para a magnetita tem-se apenas os picos na faixa de 400 cm^{-1} e 580 cm^{-1} (Schwertmann and Cornell 2000, Cornell and Schwertmann 2003, Tang, Myers et al. 2003, Serna and Morales 2004, Faivre 2016). À vista desse último resultado, e em associação com as condições de síntese, armazenamento e aspecto visual (coloração), podemos inferir que a fase por nós sintetizada realmente é a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Para uma afirmação mais categórica nesse sentido, outras técnicas de caracterização se fariam ainda necessárias, como a espectroscopia de Mössbauer, que fornece os valores de campo magnético hiperfino, que são consideravelmente distintos entre as fases (Khollam, Dhage et al. 2002, Balasubramaniam, Khollam et al. 2004). Em terceiro e último lugar, a presença do pico de 3400 cm^{-1} corresponde ao estiramento das hidroxilas da água adsorvida na superfície das γ -NPs, que pode estar associada ao método de síntese adotada e/ou à energia de superfície das mesmas (de Araújo, de Oliveira et al. 2010, Khorshidi, Eisazadeh et al. 2011).

Figura 118 – Espectro de absorção na região do infravermelho das γ -NPs.



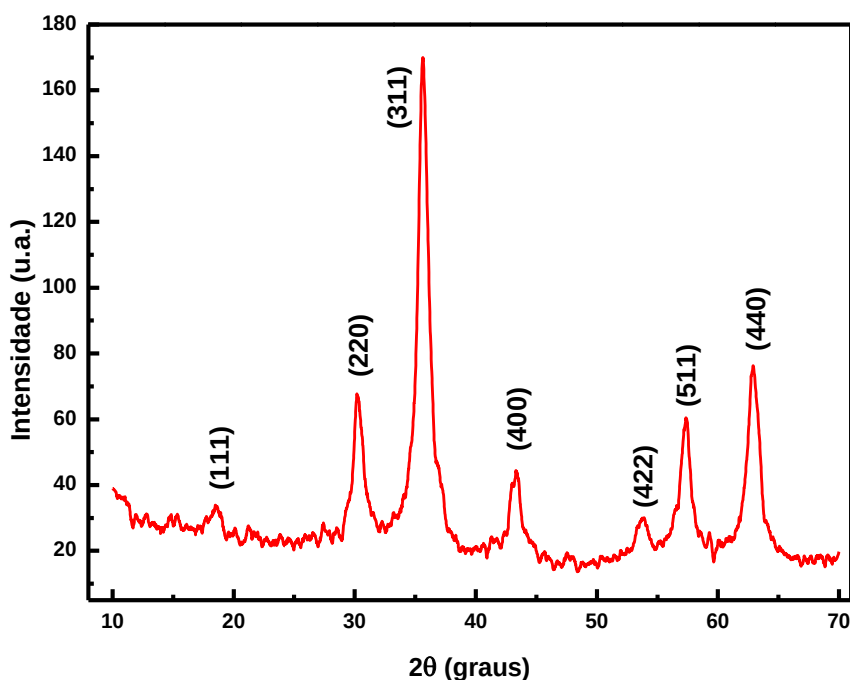
Fonte: O autor (2019)

A.3.2.3. Difração de Raios-X (DRX)

Outra técnica comumente utilizada para a caracterização de partículas é a difração de Raios-X em pó, que permite a determinação de parâmetros relevantes para a identificação da estrutura cristalina das amostras, como a distância interplanar, os índices de Miller, o tamanho do cristalito e, em especial para o nosso caso, as diferentes fases cristalinas de um material quando o mesmo apresenta polimorfismo.

Na Fig. 119 é exibido o difratograma das γ -NPs. Como pode ser visualizado, são identificados sete picos de difração preponderantes situados em $2\theta = 18,48^\circ$; $30,18^\circ$; $35,62^\circ$; $43,38^\circ$; $53,90^\circ$; $57,36^\circ$; $62,92^\circ$. Comparando este difratograma com os da magnetita e da maghemita reportados na literatura (Schimanke and Martin 2000, Wu, Xiao et al. 2009, Yu and Kwak 2010, Ahmadi, Malek et al. 2011, Bini, Marques et al. 2012), e com os encontrados no banco de dados JCPDS (do inglês, Joint Committee on Powder Diffraction Standards) (JCPDS 19-0629, JCPDS 39-1346), vemos que os picos presentes coincidem com aqueles atribuídos à magnetita ou maghemita. Porém, como já discutido previamente, as duas fases compartilham a mesma estrutura cristalina de espinela invertida, e isso impossibilita a identificação da fase via o número de picos e suas posições de difração.

Figura 119– Difratograma de Raios-X das γ -NPs.



Fonte: O autor (2019)

Contudo, é possível determinar o parâmetro de rede (a_0) através da lei de Bragg (Eq. A.5) e da relação da distância interplanar (Eq. A.6), utilizando os dados do difratograma (Askeland 2014).

$$d_{hkl} = \frac{n\lambda}{2\sin\theta}, \quad (\text{A.5})$$

$$a = d_{hkl} * \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}, \quad (\text{A.6})$$

onde h , k , e l são os índices de Miller, λ o comprimento de onda do raio X incidente, a o parâmetro de rede do plano cristalográfico em análise, e d_{hkl} a distância interplanar para sistemas cúbicos. O cálculo de a_0 se torna importante, dado que há uma pequena diferença entre os tamanhos dos parâmetros teóricos de rede da magnetita e maghemita, que são de 8,3960 Å e 8,3474 Å, respectivamente (Schwertmann and Cornell 2000, Cornell and Schwertmann 2003, Ozaki 2004). Esta diferença se origina no processo de oxidação dos íons de Fe^{2+} , que se difundem para a superfície, deixando os sítios octaédricos desocupados, de modo a causar uma redução no número de átomos de ferro por célula, passando de 24 (magnetita) para aproximadamente 21 (maghemita), o que consequentemente ocasiona a contração da célula cristalina (Ozaki 2004). Na Tabela A.3 estão tabulados os valores calculados de d_{hkl} , dos índices de Miller e seus referentes planos cristalográficos, e (a) a partir do difratograma. Como podemos observar, todos os valores de a estão bem próximos do a_0 teórico da maghemita, onde podemos destacar os planos (111) e (440), com $a_{111} = 8,3472$ Å e $a_{440} = 8,3488$ Å. Isto, por sua vez, vem a corroborar os resultados de FTIR e as observações visuais (coloração), reforçando a hipótese de que estamos trabalhando com a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Tabela 16 – Resultados dos cálculos das distâncias interplanares d_{hkl} , e o parâmetro de rede.

Pico	2 θ (graus)	d_{hkl} (Å)	$\sin^2\theta$	$\sin^2\theta/\text{menor}$	$h^2+k^2+l^2$	hkl	a (Å)
1	18,48	4,8193	0,0257	0,9999	3	(111)	8,3472
2	30,18	2,9492	0,0677	2,6342	8	(220)	8,3415
3	35,62	2,5184	0,0935	3,6381	11	(311)	8,3525
4	43,38	2,0851	0,1365	5,3112	16	(400)	8,3404
5	53,90	1,7034	0,2054	7,9922	24	(422)	8,3450
6	57,36	1,6050	0,2303	8,9610	27	(511)	8,3398
7	62,92	1,4759	0,2723	10,5953	32	(440)	8,3488

Fonte: O autor (2019)

Como última análise por DRX, estimamos o tamanho médio do cristalito (τ) por meio da equação de Scherrer (164):

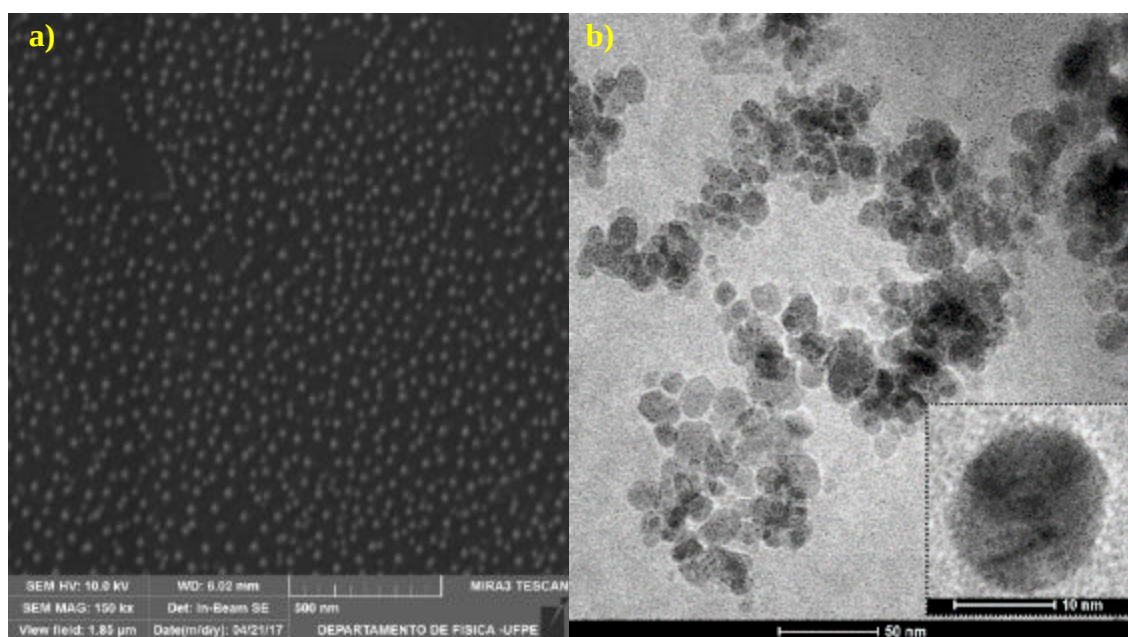
$$\tau = \frac{k\lambda}{B \cos \theta_B}, \quad (3.7)$$

onde B é a largura a meia altura em radianos, θ_B o ângulo do pico de difração analisado, λ o comprimento de onda incidente (1,5406 Å), k um termo dependente do formato da partícula, sendo 0,9 para partículas esféricas e 1 para os demais formatos (Klug 1954). Em nossos cálculos, utilizamos o valor de 0,9, uma vez que quando observadas por microscopia de varredura e transmissão, as nanopartículas apresentavam a forma esférica, como será discutido na próxima seção. Assim, utilizando os valores dos parâmetros acima, os cálculos mostraram que as γ -NPs têm tamanho médio de cristalito de aproximadamente 10 nm.

A.3.2.4. Microscopia eletrônica: Varredura e Transmissão (MEV, MET)

A determinação do formato e tamanho das partículas se fez por meio das microscopias de varredura e transmissão. Na Fig. 120 são mostradas as micrografias obtidas para MEV (a) e MET (b). Ao analisarmos as micrografias, é possível notar que as partículas apresentam forma quase esférica e que possuem uma aparente pequena distribuição de tamanhos.

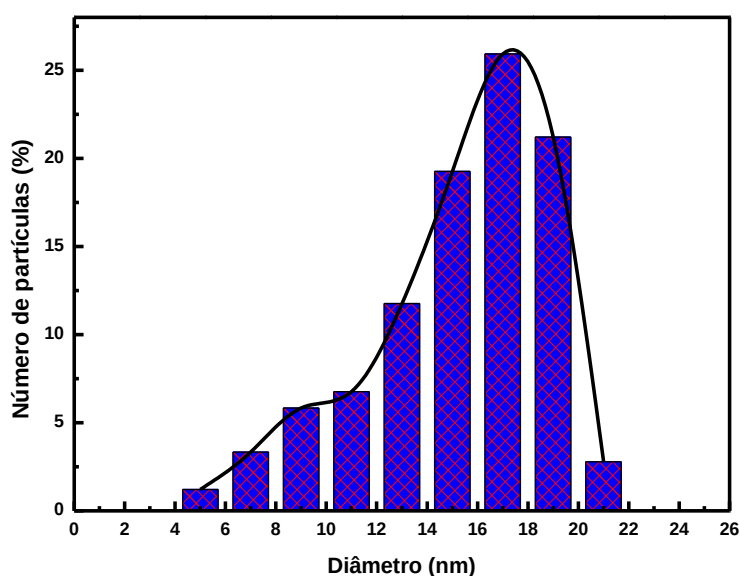
Figura 120 – Micrografias das γ -NPs obtidas por MEV (a), e MET (b).



Fonte: O autor (2019)

Para estimar a distribuição de tamanhos das γ -NPs foram utilizadas as micrografias obtidas por MEV, as quais foram tratadas com o software ImageJ, onde se mediu o diâmetro de 1000 nanopartículas, a partir do qual foi construído o histograma da Fig. 121. Como pode-se verificar, as γ -NPs apresentaram uma distribuição de diâmetro de 5,0 – 21,0 nm, com um valor médio de $(15,0 \pm 6,7)$ nm.

Figura 121 – Histograma de distribuição de tamanhos de partículas das γ -NPs obtidos das micrografias de MEV com auxílio do software ImageJ.

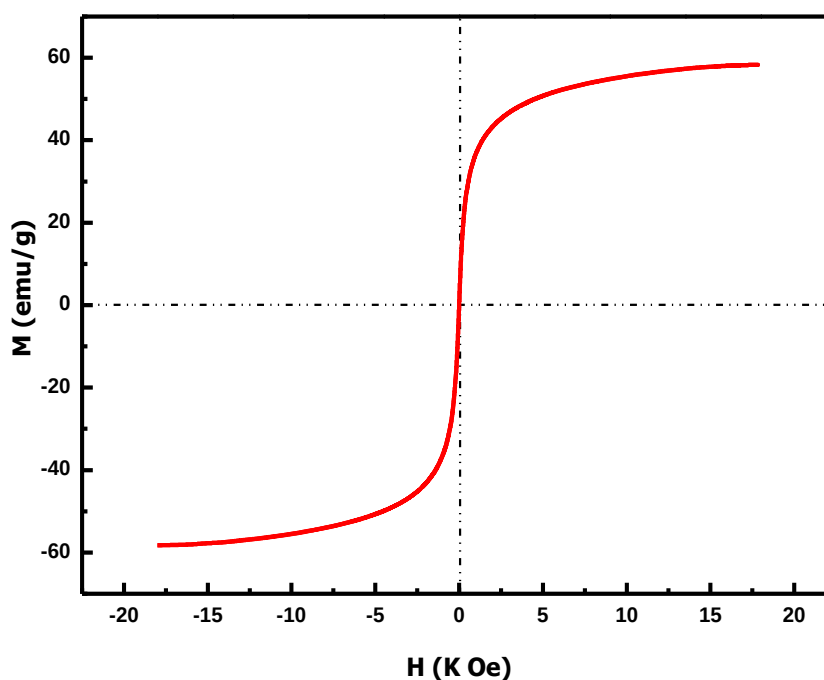


Fonte: O autor (2019)

A.3.2.5. Propriedades Magnéticas

A análise das propriedades magnéticas das γ -NPs foi realizada através da curva de magnetização. Como podemos notar na Fig. 122, as γ -NPs por nós sintetizadas possuem uma magnetização de saturação (M_s) de 58,26 emu/g, o que está de acordo com o que é relatado na literatura. Para a distribuição de tamanho por nós estimada por microscopias eletrônicas, os valores para nanopartículas de maghemita oscilam entre 53 – 65 emu/g, à temperatura ambiente (298 K) (Ozaki 2004), uma vez que, tamanho, formato, e rota de síntese podem interferir nas propriedades magnéticas das γ -NPs (Ozaki 2004). Outro ponto a ser salientado é o fato de que o valor da M_s para nanopartículas é inferior ao do óxido de ferro macroscópico (92-100 emu/g para magnetita, e 60-80 emu/g para a maghemita) (Schwertmann and Cornell 2000, Ozaki 2004). Este comportamento se deve ao fato que em sistemas nanoparticulados os átomos da superfície não estão ordenados, assim os spins desses átomos não se acoplam como os spins do interior da partícula. Isso faz com que uma camada magneticamente inerte seja formada na partícula pelos átomos da superfície. Deste modo, conseqüentemente, quanto menores forem as partículas maior será a área superficial e a porcentagem de átomos que não contribuirão para a resposta magnética, diminuindo a M_s (Liu, Wang et al. 2004).

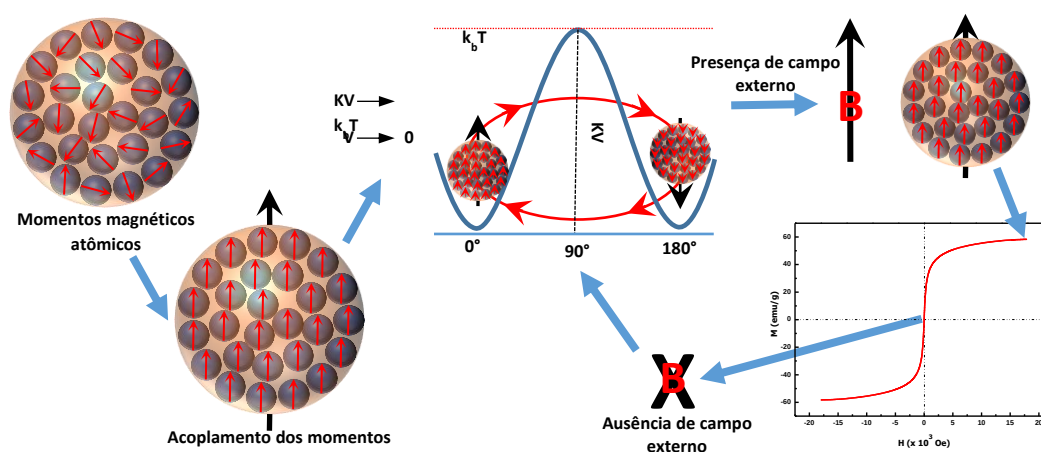
Figura 122 – Curva de magnetização das γ -NPs à temperatura ambiente.



Fonte: O autor (2019)

Uma informação adicional que podemos retirar da curva de magnetização se refere ao tipo de resposta magnética das γ -NPs. É possível observar que as γ -NPs não mostraram magnetização remanescente e campo coercitivo, do que decorre a ausência de histerese observada na curva de magnetização; ou seja, após a retirada do campo magnético externo B , as γ -NPs perdem completamente a magnetização, o que é uma resposta característica de um material superparamagnético (Ozaki 2004). Este fenômeno tem origem no acoplamento ferromagnético dos momentos magnéticos atômicos que constituem uma γ -NPs, de forma que estes momentos acoplados se comportam como um único momento paramagnético gigante (Schwertmann and Cornell 2000, Ozaki 2004, Faivre 2016), como ilustrado na Fig. 123. O comportamento superparamagnético para as γ -NPs pode ser explicado como se devendo ao pequeno tamanho das partículas que, conforme estimado por microscopia, têm uma distribuição com valor médio de $(15,0 \pm 6,7)$ nm. Segundo o encontrado na literatura, tal comportamento é visto em partículas de óxido de ferro com diâmetros inferiores a 30 nm (Huber 2005, Faivre 2016). As nanopartículas com estes tamanhos estão desbloqueadas, ou seja, podem alterar a direção de seu momento magnético entre as direções preferenciais de magnetização. Isso ocorre porque as partículas com essas dimensões têm energia de anisotropia (a energia que determina o sentido preferencial de magnetização) – que é o produto entre a constante anisotrópica K e o volume (V) da γ -NPs – igual ou menor que a energia térmica ($k_b T$), permitindo assim o livre movimento do momento das partículas (Cardoso 2008, Faivre 2016). Assim, na ausência de um campo, a energia térmica é suficiente para inverter os momentos magnéticos, o que leva as γ -NPs apresentar propriedades magnéticas análogas a materiais paramagnéticos, contudo com momentos magnéticos relativamente superiores.

Figura 123 – Esquema ilustrativo do fenômeno de superparamagnetismo.



Fonte: O autor (2019)

A.4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui apresentados, podemos constatar que, por meio da rota co-precipitação química à temperatura ambiente do FeCl_2 e FeCl_3 em meio alcalino, conseguimos realizar de forma satisfatória a síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Os resultados de caracterização espectroscópica (UV-Vis e FTIR), juntamente com os cálculos de difração de Raios-X, demonstraram que as nanopartículas obtidas têm como fase predominante a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Através das análises morfológicas de MEV e TEM foi possível observar que as nanopartículas apresentaram uma morfologia quase esférica, com um tamanho médio de partícula de $(15,0 \pm 6,7)$ nm. Além disso, as medidas de magnetização demonstraram que as nanopartículas sintetizadas têm um comportamento superparamagnético, com uma magnetização de saturação M_s de 58,26 emu/g à temperatura ambiente. A partir dessas características, podemos concluir que as nanopartículas obtidas dispõem de características desejadas (como dimensões nanométricas, alta magnetização de saturação, e morfologia regular) para o uso como núcleo magnético para a síntese de compósitos magnéticos que possam ser utilizados em protocolos de adsorção.

APÊNDICE B – PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES TAMPÃO UTILIZADAS NOS CAPÍTULOS 3 E 5

Neste Apêndice é apresentada a preparação das soluções tampão utilizadas nos protocolos de lise celular e purificação DNA nos referentes capítulos. Como os protocolos desenvolvidos compartilham de soluções em comum, estas serão apresentadas em ordem cronológica, sem ser feita sua repetição no próximo protocolo que faz uso dessas soluções.

B.1. Soluções utilizadas no Capítulo 3

B.1.1 experimentos de adsorção de DNA (sistema aquoso)

❖ Solução de ligação (Glicina-HCl)

1. Pesar 375,3 mg de glicina,
2. Colocar em balão volumétrico e aferir para 100 mL com água deionizada,
3. Aferir,
4. Com o auxílio de um pHmetro, adicionar pequenas alíquotas (fazer uso de micropipeta) de HCl 1M, até que o valor de pH desejado seja alcançado.

B.1.2 experimentos de purificação de DNA total a partir de sangue

❖ Solução de lise (Triton 1%)

1. Adicionar 1 mL de Triton X – 100x em um balão volumétrico de 100 mL,
2. Aferir,
3. Levar à agitação magnética, até completa dissolução.

❖ Solução de ativação (Glicina-HCl-NaCl, pH 3,2)

1. Pesar 375,3 mg de glicina,
2. Colocar em balão volumétrico de 25 mL e aferir,
3. Pesar 17,5 g de NaCl,
4. Em um balão volumétrico de 100 mL adicionar o NaCl e os 25 mL de glicina (passo 2),
5. Adicionar 2,5 ml de HCl 0,2 Molar,
6. Aferir.

❖ Solução de lavagem (CH₃COOK – Tris – EDTA – Etanol)

1. Pesar 798,7 mg de acetato de potássio,
 2. Pesar 136,9 mg de Tris base,
 3. Pesar 1,6 mg de EDTA,
 4. Colocar em balão volumétrico e aferir para 50 mL com água deionizada,
- Adicionar 1,7 mL de etanol para cada 1 mL da solução de lavagem.

❖ Solução de eluição fosfato/fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,8)

1. Pesar 239,6 mg de fosfato monossódico,
2. Colocar em balão volumétrico e aferir para 10 mL com água deionizada,
3. Pesar 1,4 g de fosfato dissódico,
4. Colocar em balão volumétrico e aferir para 50 mL com água deionizada,
5. Transferir para um balão volumétrico de 100 ml 6,5 mL da solução de fosfato monossódico, e 43,5 mL da solução de fosfato dissódico,
6. Aferir.

❖ Solução TAE 0,5 X

1. Adicionar 12,5 mL de TAE 40X em um balão volumétrico de 1000 mL,
2. Aferir.

B.1.3 experimentos de purificação de DNA total a partir de bactérias (*E. coli*)

❖ Solução de lise (SDS 1%)

1. Adicionar 100 mg de SDS em um balão volumétrico de 10 mL,
2. Aferir.

❖ Solução de precipitação (CH_3COOK -Ác. Acético)

1. Pesar 14,7 g de acetato de potássio,
2. Colocar em balão volumétrico de 50 mL e aferir,
3. Ajustar o pH com ácido acético para 5,5.

B.2. Soluções utilizadas no Capítulo 5

B.2.1 experimentos de purificação de DNA plasmídeo a partir de *E. coli*

❖ Solução de ressuspensão celular (Tis-EDTA-Rnase)

- Pesar 151,5 mg de Tis base,
 - Pesar 146,5 mg de EDTA,
 - Colocar em balão volumétrico e aferir para 50 mL com água deionizada,
 - Ajustar o pH com HCl 1Molar para 8.
- Adicionar 5 μ L de RNase A (*Promega, Estados Unidos*) para cada 1 mL da solução de ressuspensão.

❖ Solução de lise (NaOH-SDS)

1. Pesar 400 mg de hidróxido de sódio,
2. Pesar 500 mg de Dodecil sulfato de sódio,
3. Colocar em balão volumétrico e aferir para 50 mL com água deionizada.

APÊNDICE C – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O DOUTORADO

❖ Artigos Publicados



Effects of electric field and temperature on the shape of chlorophyll aggregates in casting films

Graciela da C. Pedro, Filipe D.S. Gorza, **Romario J. da Silva**, Nara C. de Souza, Josmary R. Silva *

Grupo de Materiais Nanocamadas, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:
Fractal dimension
Light microscopy
Diffusion-limited aggregation
Wetting contact angle

ABSTRACT

We have prepared chlorophyll (Chl) casting films and characterize the effects of temperature and electric field on the fractal forms of Chl aggregates formed therein. The amount of fractal aggregates increased with increasing temperature. Their fractal dimensions (1.54–1.66) were close to those predicted by the diffusion-limited aggregation model. The surface morphology change of Chl films with temperature did not affect their wettability, i.e., these films remained hydrophilic, exhibiting contact angles θ_c of $35.3 \pm 4.9^\circ$. The application of an electric field induced a Brownian-tree to chain-shaped aggregate form change, which was rationalized by the effect of electric drag on Chl diffusion. In contrast to the case of temperature-induced morphology change, the corresponding variation caused by the applied electric field have changed the film wettability and turned the originally hydrophilic ($\theta_c = 35.3 \pm 4.9^\circ$) films into hydrophobic ($\theta_c = 86.6 \pm 4.0^\circ$) ones. This find was consistent with the change in shape of the fractal aggregates.

1. Introduction

Chlorophyll (Chl) molecules in plants act as natural light-harvesting devices during photosynthesis. Due to their transduction properties, they have been employed as components of dye-sensitized solar cells (DSSCs) [1,2,3,4]. In view of the fact that the efficiency of solar cells is known to depend on their surface morphology [5,6,7], then fractal-shaped structures, which determine the surface morphologies of films, can influence the energy conversion efficiency of these cells.

Fractal objects, such as molecular aggregates, exhibit forms with fractal dimensions exceeding their topological dimensions and assuming non integer values [8]. Importantly, such structures can induce the wide-scale-range self-assembly of weakly interacting systems [9]. In this systems the particles arrange themselves in self-affine fractal structures exhibiting dimensions and shapes dependent on the kinetics of the studied system [10]. Fractal aggregates are well described by the diffusion-limited aggregation (DLA) model [10,11], which assumes that each immobile cluster grows by diffusion of monomer particles with a unitary probability of sticking. Such a model has been applied to numerous experimental systems [12]. Regarding on inorganic films, aggregates with fractal shapes has been investigated by transmission electron microscopy [13] and grazing incidence small-angle X-ray scattering [12]. On the other hand, organic films investigations has been

carried out using techniques such as scanning electron microscopy [14] and atomic force microscopy [1,15].

Chl films can be prepared by Langmuir–Blodgett [16], evaporation [2], layer-by-layer self-assembly [17], spin-coating [3], and casting [18] techniques. Despite the fact that several properties of Chl films have been extensively investigated, little is known about the aggregates present therein, although this information could be useful for the future development of Chl film-based DSSCs. Herein, we build on the results of our previous work [19], which demonstrated the formation of fractal aggregates in cast films fabricated at different Chl concentrations, and explore the effects of temperature and electric field on the formation of fractal aggregates in cast Chl films using light microscopy and contact angle measurements. The fractal dimensions of the observed structures were determined using the box count method, and the obtained results were discussed in contexts of the DLA model and a theory accounting for the influence of the electric field on the DLA process.

2. Materials and methods

Chl (MP Biomedicals, LLC) was used as received. Thin films were obtained by casting solutions of Chl (0.12 mg mL^{-1}) in purified water onto hydrophilized BK7 slices and drying them in air at 5, 23, 30,

* Corresponding author.
Email address: silvajosmary@gmail.com (J.R. Silva)



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Extraction of plasmid DNA by use of a magnetic maghemite-polyaniline nanocomposite

Romário Justino da Silva^a, Bruna Gomes Maciel^a, Juan Carlos Medina-Llamas^b, Alicia Elizabeth Chávez-Guajardo^c, José Jarib Alcaraz-Espinoza^d, Celso Pinto de Melo^{a,d,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 18, Instituto Politécnico Nacional, 98160, Zacatecas, Zac, Mexico

^c Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98058, Zacatecas, Zac, Mexico

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Plasmid DNA
Magnetic nanocomposite
Magnetic purification
Conducting polymers
Escherichia coli

ABSTRACT

We describe the use of a hybrid magnetic nanocomposite (HMNC) for the extraction and purification of plasmid DNA (pDNA) from *Escherichia coli* aqueous solutions. The HMNC, which was synthesized via emulsion polymerization, was characterized by transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, UV–Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering and magnetic measurements. The results confirmed the incorporation of polyaniline (Pani) in its conducting form onto a core formed by the magnetic iron oxide, with the hybrid particles presenting an average size of (95 ± 30) nm and a saturation magnetization of 30 emu/g. The yield, purity and quality of the pDNA purified by using the Pani HMNC were evaluated by UV–Vis spectroscopy, agarose gel electrophoresis, and Polymerase Chain Reaction (PCR), respectively. An average yield of ~ 6.9 μ g was obtained in the DNA extraction process, with the collected material presenting a good purity (a A260/280 ratio in the 1.68–1.82 range) and an excellent quality, as confirmed by subsequent PCR assays. Hence, this HMNC appears as a promising material for use in pDNA purification protocols, and we suggest that this novel HMNC-based methodology can be of general interest and find widespread application in different biomedical procedures.

1. Introduction

Plasmid DNA (pDNA) are double-stranded extra-chromosomal DNA molecules of a relatively small size that can replicate autonomously from the chromosomal DNA. Existing in free form in the cytoplasm of prokaryotic cells, pDNA usually carry most of the bacterial genes linked to adaptive functions, such as conjugation, metabolic functions of degradation, resistance to antibiotics and to the presence of metal ions, as well as to virulence factors [1–5]. Currently, pDNA is an indispensable tool for genetic engineering, and it is one of the most used vectors in the field of recombinant DNA technology for the expression of proteins and hormones, such as insulin, interferon-gamma, platelet-derived growth factor (PDGF) [6], growth hormone [7], vaccines [8–10], and gene therapy [11], among others. The characteristic small size confers a high stability to the pDNA molecules, which can be transferred not only to all descending cells but can also act as vectors either in horizontal gene transfer or in induced transformations, those in which they are introduced into target host cells. As an abundant number of copies of

them exists in each single cell, in the case of expression systems a large amount of protein can be produced [12–15].

High purity and good integrity are essential requirements for a DNA sample to be used as starting material in most biotechnology procedures, and so there is a permanent search for the development of new efficient protocols for pDNA extraction from bacterial cells. Ideally, such novel methods should provide for simple and rapid isolation procedures that could result in a high yield of good quality DNA, with minimum presence of proteins, salts, RNA, and other contaminants [16,17]. Nowadays, the main protocols available for plasmid purification are based on either liquid phase (phenol-chloroform) or solid phase adsorption, such as porous silica and ion exchange chromatography (molecular exclusion, reverse phase). These protocols may involve the use of toxic solvents and are usually time consuming, for demanding many steps and a large number of repetitive centrifugations [18,19]. On the other hand, more recently several alternative adsorbents with the capacity to interact electrostatically with biomolecules of interest (such as total DNA and pDNA) have been investigated for use in simple, safer

* Corresponding author. Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.
E-mail address: celso@df.ufpe.br (C. Pinto de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.013>

Received 23 November 2018; Received in revised form 21 March 2019; Accepted 21 March 2019

Available online 24 March 2019

0003-2697/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.



A novel nucleic acid fluorescent sensing platform based on nanostructured films of intrinsically conducting polymers

Graciela C. Pedro ^a, Filipe D.S. Gorza ^a, Romário J. da Silva ^a, Kamila T.O. do Nascimento ^a, Juan C. Medina-Llamas ^b, Alicia E. Chávez-Guajardo ^c, José J. Alcaraz-Espinoza ^d, Celso P. de Melo ^{a,d,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 18, Instituto Politécnico Nacional, 98160, Zacatecas, Zac. Mexico

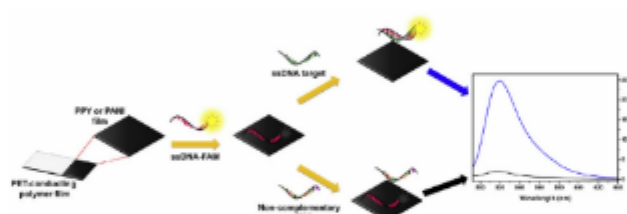
^c Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98058, Zacatecas, Zac. Mexico

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

HIGHLIGHTS

- This is the first report on the use of conducting polymer-based films as fluorescence quenchers for DNA sensing.
- The biosensor developed is highly sensitive and selective for detecting specific nucleic acid sequences.
- These polymeric films are easy to handle and require simple and low-cost preparation procedures.
- These polymeric films can be used in the convenient form of test strips.
- This type of biosensor could be used as a universal DNA fluorescence detection platform.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2018

Received in revised form

5 October 2018

Accepted 8 October 2018

Available online 12 October 2018

Keywords:

Nanostructured films

Conducting polymers

Molecular diagnosis

Fluorescent detection

Test strips

ABSTRACT

When fluorophores attach to nanostructured films of intrinsically conducting polymers (ICPs), a quenching of their fluorescence may occur. We have exploited these characteristics for the development of polymeric films that can be used in a simple and efficient molecular diagnosis protocol based on the selective detection of nucleic acids. Our procedure rests on the fact that the fluorescence of 5-carboxyfluorescein-labeled single-stranded DNA (FAM-ssDNA) probes is quenched upon their immobilization on nanostructured ICP – polypyrrole (PPY) and polyaniline (PANI) – films deposited on polyethylene terephthalate (PET) substrates. Hybridization occurs whenever a sample with the complementary sequence is brought in contact with the immobilized probe, with the newly formed ds-DNA chains detaching from the flexible polymeric film and causing the restoration of the fluorescence. This sensing system exhibits a low background signal that depends on both the thickness and hydrophobicity of the films. As a model system, we used a FAM-ssDNA probe specific for the *Leishmania infantum* parasite. The results confirm this procedure as a simple, fast and highly sensitive scheme for the recognition of the target DNA, with a detection limit of the 1.1 nM and 1.3 nM for the PPY/PET and PANI/PET films, respectively. In addition, this biosensor has excellent stability and exhibits a good and

* Corresponding author. Departamento de Física and Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.
E-mail address: celso@df.ufpe.br (C.P. de Melo).



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Magnetic extraction and purification of DNA from whole human blood using a γ -Fe₂O₃@Chitosan@Polyaniline hybrid nanocomposite

Bruna Gomes Maciel^a, Romário Justino da Silva^a, Alicia Elizabeth Chávez-Guajardo^b, Juan Carlos Medina-Llamos^c, José Jarib Alcaraz-Espinoza^d, Celso Pinto de Melo^{a,d,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98058 Zacatecas, Zac, Mexico

^c Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 18, Instituto Politécnico Nacional, 98160 Zacatecas, Zac, Mexico

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Magnetite
Chitosan
Polyaniline
Magnetic hybrid nanocomposite
DNA extraction
Human blood

ABSTRACT

We examined the properties of the nanocomposite γ -Fe₂O₃@Chi@PANI as an adsorbent of deoxyribonucleic acid (DNA). As a model system, we used an aqueous solution of salmon sperm DNA, whose decreasing concentration was followed by monitoring the 260 nm UV–vis absorption. After adjusting the data collected to a Langmuir isotherm curve, we estimated the adsorption capacity (q_m) of the nanocomposite as 49.5 mg/g. We also observed that the kinetic model of the DNA capture presents a mixed character, with both chemical mechanisms and intraparticle diffusion processes involved. When the MNC was used to extract the DNA from complex samples (human blood), a capture rate of 80 ng/ μ L was achieved, with the collected fraction exhibiting good quality, as evaluated by PCR analysis and electrophoresis assays. These results suggest that the γ -Fe₂O₃@Chi@PANI nanocomposite is a promising adsorbent for use in protocols for purification of DNA from complex samples.

1. Introduction

The elucidation of DNA function in organisms represented an unprecedented revolution in science, with special impact on the methods used for studying living beings. Nowadays, isolating, analyzing, and manipulating the DNA are essential steps in different areas of knowledge, such as i) the development of new biotechnological processes (Baesken et al., 2014; Demain & Adrio, 2007) and new drugs (Dehouck & Goodfellow, 1999), ii) finding the origin of diseases (Kruglyak, 1999), iii) making diagnostics (Drmanac et al., 1998), iv) broadening the scope of anthropological studies (Fernández et al., 2014), and v) solving legal issues with the help of DNA forensic research (Gill, Jeffreys, & Werrett, 1985). Nonetheless, to achieve success in those endeavors one needs first to extract and purify the DNA of interest, a challenging step that continues to be laborious and time-consuming (Tan & Yap, 2009). In spite of the vast amount of procedures already available for DNA purification, as a general rule the current liquid–liquid and solid phase extraction methods protocols still face important drawbacks to be overcome. In pursuing a more efficient extraction of DNA, several alternatives based on novel solid extraction matrices have been developed in the last decades. Among these methods, those that employ nanoparticles (NPs) to adsorb the nucleic acid molecules

deserve special mention, since the characteristic high surface to volume ratio of the NPs favors the achievement of high yields in the capture of the targeted molecules (Martin & Mitchell, 1998; Yeung & Hsing, 2006).

Extraction methods based on the use of magnetic nanoparticles (MNPs) appear as specially convenient for their simplicity, since in this case the fraction of interest can be easily separated from the reaction medium by use of a small magnet, thus avoiding the necessity of further laborious separation procedures (Lu, Salabas, & Schüth, 2007; Medina-Llamos, Chávez-Guajardo, Andrade, Alves, & de Melo, 2014). These MNPs typically consist of a superparamagnetic nucleus (usually Fe₃O₄ or γ -Fe₂O₃) enveloped by a corona of a DNA affinity ligand (Wierucka & Bizziuk, 2014).

Examining the recent literature, it is possible to identify two main alternative methods for coating the MNPs, either by enveloping the magnetic core using silica (Li, Zhang, & Gu, 2012; Sheng et al., 2016; Torney, Trewyn, Lin, & Wang, 2007) or by employing polymeric materials for this (Kievit et al., 2009; Medina-Llamos et al., 2014; Samal et al., 2012). Silica MNPs possess the advantage of exhibiting high porosity, and the charge distribution over their enormous superficial area can be adjusted to better capture DNA by changes of pH or by the controlled presence of chaotropic agents (Li et al., 2012). In spite of

* Corresponding author at: Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.
E-mail address: celso@df.ufpe.br (C.P. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.034>

Received 21 December 2017; Received in revised form 9 May 2018; Accepted 11 May 2018
Available online 22 May 2018

0144-8617/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtice

Electrospun polystyrene-(emeraldine base) mats as high-performance materials for dye removal from aqueous media

Filipe D.S. Gorza^a, Graciela C. Pedro^a, Romário J. da Silva^a, Juan C. Medina-Llamas^b, José J. Alcaraz-Espinoza^{c,d}, Alicia E. Chávez-Guajardo^e, Celso P. de Melo^{a,d,*}

^a Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 18, Instituto Politécnico Nacional, 98160 Zacatecas, Zac, Mexico

^c Instituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 48920-370 Juazeiro, Bahia, Brazil

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^e Unidad Académica de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Zacatecas, 98058 Zacatecas, Zac, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2017

Revised 28 October 2017

Accepted 30 October 2017

Available online 6 December 2017

Keywords:

Electrospinning

Composite mats

Emeraldine base polyaniline

Dye removal

Water remediation

ABSTRACT

A more widespread use of conducting polymer nanostructures in environmental remediation is limited by their tendency to form agglomerates. In this study, we report the development of electrospun polystyrene/polyaniline composite membranes that can be used as efficient agents for the removal of dye molecules from aqueous solutions. These nonwoven polystyrene-polyaniline (NW PS-PANI) mats are formed after the incorporation of the conducting polymer into the surface of nonwoven polystyrene (NW PS) mats produced via the electrospinning method. The composite mats were characterized by contact angle measurements, SEM, FTIR and UV-vis spectroscopy. By performing experiments in batch mode, we examined the capacity of these mats for removing Congo red (CR) molecules, a prototypical azo dye, as a function of pH, interaction time and dye initial concentration. These membranes are hydrophilic and have a large CR removal efficiency. The zero point charge pH of the NW PS-PANI membranes was determined as 6.4, and we have found that their adsorption capacity reaches a maximum of 380.0 mg/g at pH 6.0. An easy recovery of the contaminant is possible by using these mats, which can be reutilized in at least 13 consecutive adsorption/desorption cycles, without significant losses in their adsorption capacity. In addition, they can be adapted for usage in compact filtration systems for an even faster removal of the dissolved dye molecules.

© 2017 Taiwan Institute of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Water pollution is a major global problem, whose severity has dramatically increased with the continuous population growth and the accelerated industrial development observed in the last decades. Worldwide, water contamination is responsible for 1.6 million of human deaths every year [1], which can be associated with the presence of pollutants of a varied nature, such as organic matter [2], pathogenic microorganisms [3,4], and chemical residues (mostly drugs, dyes and heavy metals) [5–8]. Non-biodegradable chemical pollutants can remain reactive in the environment for years, while organic dyes have extensive presence in the wastewater of the textile, paper, plastic, leather, food, pharmacy, and cosmetic industries [9–12]. When dissolved in aqueous media even

in concentrations as low as 1 ppm, azo compounds such as Congo red can endanger the ecosystem through an ecological imbalance caused by the decrease in sunlight penetration on the water body, which reduces photosynthesis and oxygenation rates [13,14]. Moreover, azo dye molecules present in drinking water can accumulate in living organisms and eventually lead to the long-term development of cancer in humans [7,15]. In fact, several consolidated technologies for wastewater remediation exist today. The interested reader can find appropriated references, for instance, in the work of Gupta and collaborators concerning the use of TiO₂ particles, carbon nanotubes and waste materials for the treatment of dye and heavy metal contamination of water resources [8,10–12,16–18]. However, it seems likely that some of the current separation methods [18] will become obsolete in the coming years due to the growing demand for high quality water that should be obtained at lower costs and by use of less energy consuming methods [19].

Nanotechnology holds the promise of providing for new materials that could be used to address those issues by allowing both the improvement of the current purification methods and the creation

Abbreviations: NW, nonwoven; PS, polystyrene; PANI, polyaniline; CR, Congo red; ES, electrospinning; ICPs, intrinsically conducting polymers.

* Corresponding author.

E-mail address: celso@df.ufpe.br (C.P. de Melo).

<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.10.034>

1876-1070/© 2017 Taiwan Institute of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Incorporation of triclosan and acridine orange into liposomes for evaluating the susceptibility of *Candida albicans*



Karla B. Romio, Kevin F. dos Santos, Romário J. da Silva, Maria F.C. Pedro, Alessandro S. Kalck, Marcos da Silva Sousa, Leandro M. Possamai, Paula C.S. Souto, Josmary R. Silva, Nara C. de Souza^{*}

Grupo de Materiais Nanoestruturados, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Triclosan
Photodynamic inactivation
Liposome
Layer-by-layer films
Atomic force microscopy

ABSTRACT

Candida albicans is responsible for many of the infections affecting immunocompromised individuals. Although most *C. albicans* are susceptible to antifungal drugs, uncontrolled use of these drugs has promoted the development of resistance to current antifungals. The clinical implication of resistant strains has led to the search for safer and more effective drugs as well as alternative approaches, such as controlled drug release using liposomes and photodynamic inactivation (PDI), to eliminate pathogens by combining light and photosensitizers. In this study, we used layer-by-layer (LBL) assembly to immobilize triclosan and acridine orange encapsulated in liposomes and investigated the possibility of controlled release using light. Experiments were carried out to examine the susceptibility of *C. albicans* to PDI. The effects of laser irradiation were investigated by fluorescence microscopy, atomic force microscopy, and release kinetics. Liposomes were successfully prepared and immobilized using the self-assembly LBL technique. Triclosan was released more quickly when the LBL film was irradiated. The release rate was approximately 40% higher in irradiated films (fluence of 15 J/cm²) than in non-irradiated films. The results of the susceptibility experiments and surface morphological analysis indicated that *C. albicans* cell death is caused by photodynamic inactivation. Liposomes containing triclosan and acridine orange may be useful for inactivating *C. albicans* using light. Our results lay the foundation for the development of new clinical strategies to control resistant strains.

1. Introduction

Oral candidiasis can be treated with topical [1] or systemic [2] medications or a combination; treatment approaches depend on the severity of infection, oral and general health, and patient age [3]. Specifically, when mechanical cleaning is insufficient, proper oral health can be maintained by complementation with anti-microbial chemical agents. These chemical agents are found in hygiene products such as mouthwash and serve as prophylactic measures for reducing oral diseases [4]. Triclosan (TCS), 2-(2,4-dichlorophenoxy)-5-chlorophenol or *chlorinated biphenyl ether* is a phenolic compound that exists as a crystalline powder with low solubility in water but is soluble in organic solvents. TCS is widely used in the oral care products industry [5]. TCS has broad-spectrum antimicrobial activity and affect fungi and their primary site of action: the cytoplasmic membrane [6]. In addition to its use in many oral hygiene products, TCS is present in cleaning materials, textiles, footwear, plastic utensils, toiletries, medical devices, and other materials. Because of its indiscriminate use, TCS has been detected in

river waters, sewage and human urine samples, plasma, and breast milk, raising concerns regarding its potential negative and long-term impact and toxicity on environment and human health. There is evidence that TCS can disrupt endocrine signaling and immune functions, as well as cause microbial resistance [7]. A useful alternative approach may be the use of systems that control drug release, thus enabling control over the absorption and tissue distribution of the drug as well as reduction in local toxicity. Low-density lipoproteins, biodegradable nanoparticles, and liposomes [8,9,10] are among the most widely studied drug delivery systems [11,12,13].

In vitro drug release studies are useful for evaluating the molecular profile release per unit time and provide information for *in vivo* tests and clinical studies [11]. Drugs incorporated into liposomes can be released following photochemical or photophysical activation [11]. The possibility of releasing the contents of liposomes using a laser light can be exploited in combination with photodynamic therapy (PDT) [11]. Low-intensity PDT is used in clinical dentistry to effectively treat infections directly using photosensitizers (PS).

^{*} Corresponding author.

E-mail address: ncsouza@ufmt.br (N.C. de Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.034>

Received 21 December 2016; Received in revised form 20 June 2017; Accepted 24 June 2017

Available online 24 June 2017

1011-1344/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Spray layer-by-layer films for photodynamic inactivation



Kevin F. dos Santos, Romário J. da Silva, Karla B. Romio, Paula C.S. Souto, Josmary R. Silva, Nara C. de Souza^{*}

Grupo de Materiais Nanoestruturados, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2016

Received in revised form 1 June 2016

Accepted 20 June 2016

Available online 21 June 2016

Keywords:

Acridine orange

UV light

Fluorescence microscopy

Atomic force microscopy

ABSTRACT

Background: A novel approach for photodynamic inactivation of *Candida albicans* is proposed. This method consists of realizing inactivation using ultraviolet light (254 nm) combined with spraying layer-by-layer films of acridine orange.

Methods: To evaluate the effectiveness of the approach, the *C. albicans* were immobilized on quartz slices and covered with the spray layer-by-layer films. The fungi were analyzed using experiments to determine cell viability, as well as by fluorescence and atomic force microscopy.

Results: Viability analysis of *C. albicans* after photodynamic inactivation assisted by the films indicates cell death. The extent of cell death increases as the number of film layers increases. Fluorescence and atomic force microscopy analyses corroborated the cell death of *C. albicans*, which is posited to be due to damages to the fungi cell wall.

Conclusions: Our approach has the potential to be used as an alternative for photodynamic inactivation of *C. albicans*. In addition, this method could be used in clinical procedures, such as for the decontamination of medical devices.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Candida albicans is known for being responsible for the majority of nosocomial infections that affect immunocompromised individuals [1,2]. Methods to control this microorganism primarily rely on the use of antibiotics such as amphotericin b [3,4]. However, interest has been growing in alternative clinical approaches such as photodynamic inactivation (PDI) of microorganisms [5,6]. PDI can occur when light (visible or invisible) is combined with a photosensitizer (PS) compound [7] and molecular oxygen. These components can react with each other to form reactive oxygen species (ROS) and/or singlet oxygen. Such species can lead to irreversible damage to the cell wall of a microorganism, causing its death [8]. Among the more common PSs for PDI experiments are methylene blue [5] and cationic porphyrins [9]. Commonly used light sources are incandescent lamps [10], LEDs [11], lasers [5], and UV lamps [12]. One of the advantages to using PDI against infectious microorganisms is its multi-faceted and nonspecific nature which does not lead to the development of microorganisms resistant to this approach. For instance, *C. albicans* [13] is one of the fungi commonly used to investigate PDI, and studies have been performed

using combinations of 683 nm laser light and methylene blue [14], LED light (684 nm) and toluidine blue O [15].

A PDI experiment is performed by placing a PS in contact with a microorganism (bacteria, virus, fungi protozoa, and pathogenic algae) [16,17], followed by local light irradiation of the PS with the wavelength at the absorption maximum [18]. In addition to the parameters associated with the light, such as its wavelength and fluence, and the PS concentration, another important factor for PDI is the process of PS administration to the microorganism. An ideal application condition is determined by the clinical use which employs, in general, either a topical or intravenous way of application [19]. With respect to the use of PDI for the decontamination of medical devices and surfaces, several administration approaches have been used [20]. A suitable method for administering a PS may be in the form of spray-LBL films [21]. These films are thinner and have a shorter manufacturing time than those produced by conventional LBL [22]. To our knowledge, this type of film has not been used in PDI studies.

This study reports for the first time the use of this approach – called herein PDI assisted by spray-LBL films – as an alternative strategy for using PDI against *C. albicans* in the decontamination of biomedical instruments. The PS used was acridine orange (AO), associated with ultraviolet light. The effectiveness of this procedure was evaluated by analyzing the viability of cells, their fluorescence and atomic force microscopy.

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: naracsouza@yahoo.com.br, ncsouza@ufmt.br (N.C. de Souza).



Immobilization of chlorophyll by using layer-by-layer technique for controlled release systems and photodynamic inactivation



Filipe D.S. Gorza, Romário J. da Silva, Tarquin F. Trescher, Graciela C. Pedro, Maria A. Oliveira de Sousa, Paula C.S. Souto, Josmary R. Silva, Nara C. de Souza*

Grupo de Materiais Nanoestruturados, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2016

Received in revised form 15 June 2016

Accepted 28 June 2016

Available online 29 June 2016

Keywords:

Liposomes

Candida albicans

Photodynamic inactivation

Atomic force microscopy

ABSTRACT

The development of systems for the controlled release of drugs is important because they allow the control of drug absorption and tissue distribution and also can reduce local toxicity. This study aimed to assemble and characterize two types of release systems, consisting of layer-by-layer films obtained from poly(allylamine) hydrochloride with chlorophyll (PAH/CHL films) or chlorophyll incorporated into dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes (PAH/Lip + CHL films). For these systems, the molecular aggregation, growth process, thermally stimulated desorption, wettability, and controlling release of CHL was studied by using UV–vis spectroscopy and wetting contact angle analysis. In addition, experiments of photodynamic inactivation using PAH/CHL or PAH/Lip + CHL films with a 633-nm laser light were performed and the susceptibility of *Candida albicans* (*C. albicans*) to this approach was examined. Fluorescence and atomic force microscopies were used to investigate the surface morphology after the application of the photoinactivation procedure. A redshift of the UV–vis spectrum associated to films when compared with the spectrum of the CHL solution indicated a molecular aggregation of CHL molecules in the films. The film growth process was determined by a nucleation and a growth of spheroids or rods for either PAH/Lip + CHL or PAH/CHL films, respectively. Thermally activated desorption experiments indicated that interactions between CHL and PAH (126 kJ/mol) in PAH/CHL or between Lip + CHL and PAH (140 kJ/mol) in PAH/Lip + CHL films may be governed by electrostatic interactions. The wettability of PAH/Lip + CHL films was larger than that for PAH/CHL films, which can be attributed to hydrophilic groups on the surface of the DPPC liposomes. Release experiments revealed that free CHL in PAH/CHL films was released more slowly than its partner incorporated into liposomes. After the photodynamic inactivation, results of survival fraction and fluorescence microscopy revealed that *C. albicans* presented similar susceptibility for the two kinds of films. AFM supported the fluorescence one suggesting that cell death of *C. albicans* may occur due to damages to its cell wall by *C. albicans*.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Systems for controlled release of drugs or drug delivery systems (DDSs) have been developed because they are an alternative to conventional pharmacodynamic treatments [1]. DDSs have gained importance due to the control of absorption, tissue distribution, and the reduction of local toxicity systemic. Conventional treatments used to combat infectious processes, for example, in the form of pills or injectable administration, require a long period of administration to maintain therapeutic drug levels in the body, which often is not achieved. When compared with conventional methods, DDSs have

the ability to potentiate the therapeutic effect by keeping the concentration of the drug constant for an extended period using a single dose. This does not happen with conventional systems, since most exhibit a drug concentration range that defines levels of security and efficiency, as well as concentrations above or below that level. This range can lead to inefficiencies in the treatment and/or serious toxic effects. In DDSs, the drug should be linked to biocompatible materials, chemically inert, free from impurities, and capable of performing delivery of a predetermined shape without suffering the effects of interaction with the environment. Low-density lipoproteins (LDL), biodegradable nanoparticles, and liposomes are among the most studied delivery systems to date [2].

Liposomes are a simple model for the study of biological membranes. They are not only biodegradable, but also biocompatible, and a suitable system to release drug in a controlled way [3]. The

* Corresponding author.

E-mail address: ncsouza.ufmt@gmail.com (N.C. de Souza).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpt.2016.06.010>

1572-1000/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

❖ **Artigos submetidos**

- RATKOVSKI, G. P.; NASCIMENTO, K. T. O.; PEDRO, G. C.; RATKOVSKI, D. R.; GORZA, F. D. S.; **SILVA, R. J.**; MACIEL, B. G.; MOJICA-SÁNCHEZ, L. C.; MELO, C. P. **Use of spinel cobalt ferrite nanoparticles for the sensing of phosphate ions in aqueous media and biological samples.** LANGMUIR.
- ROCHA, H. R.; REIS, E. S.; RATKOVSKI, G. P.; **SILVA, R. J.**; GORZA, F. D. S.; PEDRO, G. C.; MELO, C. P. **Use of PMMA/(rice husk ash)/polypyrrole membranes for the removal of dyes and heavy metal ions.** JOURNAL OF THE TAIWAN INSTITUTE OF CHEMICAL ENGINEERS.
- **SILVA, R. J.**; LIMA, R. M. A. P.; OLIVEIRA, M. C. A.; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J.; MELO, C. P.; OLIVEIRA, H. P. **Supercapacitors based on (carbon nanostructure)/PEDOT/(eggshell membrane) electrodes.** JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY.

❖ **Artigos em preparação**

- Kinetics and thermodynamic studies of methyl orange removal by polyvinylidene fluoride-PEDOT mats
- Chitosan/Alginate beads/Polypyrrole encapsulated Cobalt Ferrite nanoparticles for Methylene Blue removal
- Use of intrinsically conductive polymer bilayer films for the fluorescence-based molecular diagnosis of the Zika virus
- Synthesis of the nanocomposite γ -Fe₂O₃/PEDOT and its application for the purification of DNA from biological samples
- Retrieval of DNA from aqueous media using a γ -Fe₂O₃/Polythiophene hybrid nanocomposite
- DNA extraction from human blood using commercial kits and γ -Fe₂O₃/Pani and γ -Fe₂O₃/Chi/Pani magnetic nanocomposites: a comparative study
- Use of poly(methyl methacrylate)/chitosan/polyaniline membranes for retrieval of DNA from aqueous media
- Use of Fe₂O₃/PEDOT magnetic nanocomposites for a simple Turn-On fluorescent detection of nucleic acids

❖ Depósito de patentes nacionais

03/10/2019 870190098982
12:06
29409161811250806

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 020805 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FILMES NANOESTRUTURADOS DE POLÍMEROS CONDUTORES, PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEU USO COMO PLATAFORMAS PARA O SENSORIAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Resumo: A presente invenção estende-se à síntese de filmes finos de polímeros condutores (PC) sobre substratos flexíveis de polietileno tereftalato (PET) e a seu uso como uma plataforma para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos (isto é, o sensoriamento molecular) de agentes infecciosos, como *Leishmania infantum*, o vírus da Zika, o vírus do Papiloma Humano tipo 18 (HPV-18), dentre outras doenças de importância para a saúde pública. A presente metodologia é baseada na detecção de ácidos nucleicos (por meio de sua hibridização com sondas de caráter específico) e tem como objetivo permitir a incorporação do substrato polimérico assim preparado em protocolos simples, rápidos, e de baixo custo para o diagnóstico simplificado de doenças infecciosas ou genéticas em pontos primários de atendimento (possibilitando, em especial, maneiras de prevenção ou tratamento dessas doenças ainda em um estágio inicial), para o monitoramento ambiental e para uma rápida identificação de patógenos pela indústria alimentar.

Figura a publicar: 6

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 03/10/2019 às 12:06, Petição 870190098982



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 073701 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NANOCOMPÓSITO MAGNÉTICO HÍBRIDO DE ÓXIDO DE FERRO E POLITIOFENO E SEUS DERIVADOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS

Resumo: A presente invenção relata o uso de um nanocompósito magnético híbrido (NCMH) composto por partículas magnéticas revestidas pelo polímero condutor politiofeno (Ptf), ou algum de seus derivados, como material adsorvente de fase sólida em uma série de metodologias para a extração, separação, concentração e purificação de ácidos nucleicos e outras biomoléculas presentes em amostras biológicas ou em meios aquosos.

Figura a publicar: 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/11/2018 às 17:41, Petição 870180152384



06/09/2018 870180127246
10:24



29409161711545502

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 067992 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_cine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MEMBRANA COMPÓSITA POROSA DE POLIMETILMETACRILATO/QUITOSANA/POLIANILINA - PROCESSO PARA SUA OBTENÇÃO E SEU USO PARA A EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Resumo: A extração e purificação de biomoléculas são etapas-chave em vários protocolos de biologia molecular. Em particular, a concentração de ácidos nucleicos de boa qualidade e alta produtividade é cada vez mais necessária em procedimentos envolvendo sequenciamento genético, diagnóstico de doenças e criminologia forense, entre outras aplicações. Neste contexto, na presente invenção, é relatada a preparação de uma nova membrana compósita porosa e seu uso em kits ou protocolos para extração, purificação e concentração de biomoléculas. A membrana compósita consiste de uma membrana de polímero não-condutor produzida através da técnica de eletrofição, que, posteriormente, é funcionalizada com o uso de um polissacarídeo catiônico e, em seguida, por um polímero condutor.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 06/09/2018 às 10:24, Petição 870180127246

❖ Patentes em preparação

- RATKOVSKI, G. P.; PEDRO, G. C.; NASCIMENTO, K. T. O.; **SILVA, R. J.**; GORZA, F. D. S.; MELO, C. P. " **Deteção de fosfato em soro de sangue humano e meio aquoso por nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄)**". Patente em preparação para depósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial –INPI.
- **SILVA, R. J.**; MACIEL, B. G.; RATKOVSKI, G. P.; MELO, C. P. " **Processo de obtenção de eletrodos orgânicos flexíveis baseados em proteínas e nanoestruturas de carbono, e suas aplicações em dispositivos de armazenamento de energia**". Patente em preparação para depósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial –INPI.

❖ Resumos publicados em anais de eventos

- **SILVA, R. J.**; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. ; OLIVEIRA, H. P. . Organic electrochemical supercapacitor based on a hierarchical PEDOT/Carbon nanotubes/(Eggshell membrane) composite. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- MACIEL, B. G. ; **SILVA, R. J.** ; PEDRO, G. C. ; GORZA, F. D. S. ; NASCIMENTO, K. T. O. ; RATKOVSKI, G. P. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . DNA extraction from human blood using commercial kits and γ -Fe₂O₃/Pani and γ -Fe₂O₃/Chi/Pani magnetic nanocomposites: a comparative study. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- MACIEL, B. G. ; **SILVA, R. J.** ; GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; MELO, C. P. . Use of γ -Fe₂O₃/Chi/Pani nanocomposite for the multipurpose removal of water contaminants. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; ROCHA, H. D. ; **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . Use of Poly(methyl

methacrylate)/Chitosan/Polyaniline membranes for retrieval of DNA from aqueous media. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.

- PEDRO, G. C. ; GORZA, F. D. S. ; ROCHA, H. D. ; REIS, E. ; RATKOVSKI, G. P. ; **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; MELO, C. P. . Application of γ -Fe₂O₃/PEDOT magnetic nanocomposites as efficient agents for the removal of heavy metal ions and organic dyes. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- PEDRO, G. C. ; GORZA, F. D. S. ; REIS, E. ; ROCHA, H. D. ; RATKOVSKI, G. P. ; **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; MELO, C. P. . Use of Fe₂O₃/PEDOT magnetic nanocomposites for a simple Turn-On fluorescent detection of nucleic acids. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; RATKOVSKI, G. P. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . Magnetic retrieval of DNA from aqueous media using a γ -Fe₂O₃@Polythiophene nanocomposite. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- RATKOVSKI, G. P. ; NASCIMENTO, K. T. O. ; PEDRO, G. C. ; **SILVA, R. J.** ; REIS, E. ; GORZA, F. D. S. ; MACIEL, B. G. ; MELO, C. P. . Sensing phosphate by Cobalt Ferrite nanoparticles (CoFe₂O₄ NPs). In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- NASCIMENTO, K. T. O. ; PEDRO, G. C. ; RATKOVSKI, G. P. ; GORZA, F. D. S. ; **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; MELO, C. P. . Use of intrinsically conductive polymer bilayer films for the fluorescence-based molecular diagnosis of the Zika virus. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; NASCIMENTO, K. T. O. ; GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; REIS, E. ; RATKOVSKI, G. P. ; ROCHA, H. D. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; MELO, C. P. . Use of Polyvinylidene Fluoride-PEDOT mats for Methyl Orange removal: adsorption, desorption, kinetic and thermodynamic studies. In: XVII Brazilian MRS meeting, 2018, Natal/RN.
- **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . Retrieval of DNA from aqueous media using a maghemite-

- Polythiophene hybrid nanocomposite. In: XVI Brazilian MRS meeting, 2017, Gramado/RS.
- **SILVA, R. J.**; MACIEL, B. G. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . Plasmid DNA extraction using a Polyaniline@maghemite magnetic nanocomposite. In: XVI Brazilian MRS meeting, 2017, Gramado/RS.
 - MACIEL, B. G. ; **SILVA, R. J.** ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; MELO, C. P. . Application of Polyaniline/Chitosan/Fe₃O₄ magnetic nanocomposite for DNA retrieval in aqueous media and human blood. In: XVI Brazilian MRS meeting, 2017, Gramado/RS.
 - GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; **SILVA, R. J.** ; MACIEL, B. G. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . Polyaniline grafted Chitosan/Poly(methyl methacrylate) composite membranes applied to the retrieval of DNA from aqueous media. In: XVI Brazilian MRS meeting, 2017, Gramado/RS.
 - SANTOS, K. F. ; **SILVA, R. J.** ; ROMIO, K. B. ; SOUTO, P. C. S. ; SILVA, J. R. ; SOUZA, N. C. . Spray Layer-by-Layer films for photonic therapy. In: XVI Brazilian MRS meeting, 2017, Gramado/RS.
 - PEDRO, G. C. ; GORZA, F. D. S. ; **SILVA, R. J.** ; NASCIMENTO, K. T. O. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . A novel fluorescent sensing platform for nucleic acids based on nanostructured films of intrinsically conducting polymers. In: XVI Brazilian MRS meeting, 2017, Gramado/RS.
 - PEDRO, G. C. ; GORZA, F. D. S. ; **SILVA, R. J.** ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . A new device for detecting leishmaniasis based on nanostructured Polyaniline deposited on Polyester substrates. In: 22° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016, Nata/RN.
 - **SILVA, R. J.**; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; MELO, C. P. . Enhanced extraction and purification of plasmid DNA from *Escherichia coli* by applying a hybrid magnetic nanocomposite. In: 22° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016, Nata/RN.

- GORZA, F. D. S. ; PEDRO, G. C. ; SILVA, R. J. ; MEDINA-LLAMAS, J. C. ; ALCARAZ-ESPINOZA, J. J. ; CHAVEZ-GUAJARDO, A. E. ; MELO, C. P. . Polystyrene-Polyaniline mats as high performance adsorbents of congo red: adsorption, desorption and kinetic studies. In: 22º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016, Natal/RN.

APÊNDICE D – AGRADECIMENTOS INFORMAIS

Não é a primeira vez, eu sei...sempre desformato na busca por identidade...

Eu deveria ser reto, isento e narrar 4 anos (na verdade quase 5) da minha vida de forma anônima, na terceira do singular. Eu deveria ocultar todo o sofrimento, as angústias, alegrias, conquistas, frustrações, minhas percepções e pontos de vista sobre as diferentes esferas sociais, econômicas, culturais, morais e políticas que me pariram, e tudo mais que sustenta a primeira tartaruga que tornou possível cada uma dessas coisas, inclusive este documento. Nas convenções científicas eu não importo, mesmo esse período representando 13,33333333333333% do tempo que tenho respirado oxigênio. Eu digo que importo, não via um discurso anarquista, mas pelo simples fato deste ser meu único elemento de expressão. E mesmo correndo o risco de estar errado, o aroma de liberdade emancipadora que a ciência exala me faz acreditar que ela pode me conceder essa oportunidade.

Sem sombra de dúvidas, eu serei excessivo, raso, redundante, incoerente e muito, mas muito demorado. Mas isso sou eu! E se não for aqui, onde mais poderei regurgitar esse acervo de insensatez? Em um manifesto? Em textões virtuais onde ladramos simplesmente por ladrar, e exclusivamente para nossos nichos baterem palmas, o que por sua vez, não passam de engodos? Não! Quem sabe um dia quando a BrainNet for realidade, e a neblina humana de EGO e SuperEGO se dissipar. Por enquanto será aqui! Nesse espaço onde desde que me reconheço como um indivíduo me encantou, fascinou e me trouxe coesão para esse exorbitante fluxo sensorial que é a vida, a ciência. E sim!! Este texto vai ser péssimo, não sei pontuação e concordância. Além disso, eu falo muito e não digo nada. Eficiência me é um termo estranho.

O ano é 1989, aqui nesse exuberante elefante tropical, o tão valoroso sonho de um estado democrático de direito que me permitiu, e permite, estar construindo letra por letra esse agradecimento acabara de ser sedimentado com a constituinte datada dos últimos meses do ano anterior. Nesse chão de concreto ainda mole, experimentei indiretamente por meio de meus pais, assim como eles, o primeiro voto ao mandatário máximo dentro das nossas fronteiras, um caçador que foi caçado. Nessa atmosfera política também vi pelos olhos de meus genitores a primeira ousadia do sindicalista 35. Coexisti também a queda dos 4 metros verticais de concreto entre mundos. Ainda com um cordão umbilical recém expurgado, testemunhei o patriarca do rock brasileiro, Raul Seixas, com suas letras atemporais, nos deixar dois dias após a eclosão de o “A Panela do Diabo”.

Na década de 90, ainda inconscientemente, experimentei a minha primeira mudança monetária, o arrefecimento de uma guerra glacial com a dissolução dos Urais, e vivi em ares onde o relógio do Juízo Final marcou 11:43. Na ciência, nosso Ícaro de metal alçou voo e nos possibilitou a “visão além do alcance”, nasce a teoria das cordas e a ovelha Dolly, com nosso atrevimento iniciamos a decodificação da vida, ao mesmo tempo que a buscamos fora do nosso domo azul turquesa com a identificação de outros astros errantes. Fomos novamente afastados do centro de tudo com o fato de que a matéria bariônica não é quase nada na verdade, mas sim parte de um todo ainda indecifrável.

*“E os cientistas norte-americanos, depois de gastar zilhões de Dólares e trezentos anos,
Chegaram a estupefaciente conclusão de que geneticamente falando,
Não são muito diferentes, vermes, vacas e humanos,
Nós somos todos farinha do mesmo saco,
E nem entre numas de pensar que você está sozinho,
Bem do seu lado pode ter alguém precisando do seu carinho.”*
Maltz, 2002

Foi contemplado o ruir de uma lei, que por onde e quando foi concebida parecia tão absurda como realmente era. No final da década, vi das cinzas e sangue revelar-se um novo Czar, violento, agressivo e estadista, como se espera de um fruto de agências secretas.

*“Seria engraçado se não fosse triste,
Acesso negado, a gente não existe,
Arame farpado, silêncio de chumbo,
Seria absurdo se não fosse lei.
A serpente troca de pele,
A gente não esquece,
Seria ruído se não fosse um sinal,
Só pra iniciados, transe tribal.”*
Gessinger, 2002

Houve na música tantas ascensões e quedas (os dois lados da mesma moeda); Kurt Cobain, Mamonas Assassinas, Cazuza, Renato Russo, Freddie Mercury, Tim Maia, Leandro, Chico Science, e tantos outros. O resto (a partir do século XXI) não preciso contar, o resto eu vivi, senti, experimentei e vi florescer de forma consciente. E estão registrados em algum canto da memória, muitas vezes não os encontro quando quero, mas volta e sempre me vem na forma de epifanias desconexas dos meus porquês. Como

disse, mesmo não tendo consciência, a contemporaneidade entre minha existência e eventos sempre me emocionam por me mostrar o quanto somos pequenos e sutis, e que a liberdade da qual usufruo é infantil, e me ajuda a espantar meus fantasmas niilistas (que me assombram constantemente). Além de precisar deles para compor o mosaico de políticas educacionais públicas que me trouxeram até essa coordenada espaço-temporal-social e fundamentar a percepção de que tenho vivido em um tempo de grande prosperidade e paz para a humanidade.

Já é o suficiente dessas frases caóticas e sem sentido que me permeiam, preciso começar a discorrer sobre a essência do tópico, preciso agradecer. Não consigo começar por divindades abstratas, seres onipresentes, onipotentes e oniscientes, pelo simples fato de não me cativarem, e por não me fazerem sentido nenhum. O acaso das coisas me seduz muito mais, enquanto os dogmas me fazem muito mal!

Mas vou iniciar por divindades térreas, de carne e osso, e que sangram como nós e por nós. Um verdadeiro conceito, um conjunto aberto, a definição perfeita de Morfeus, os pais. Eu agradeço aos meus, Adevar e Silvânia, não só pela gênese, mas por tudo o que passaram para me permitirem sentir a iluminação que a educação irradia. Por serem pessoas fortes, em todos os sentidos. Por me mostrarem desde cedo o valor do trabalho e da perseverança. Pela rigidez em meus lapsos de rebeldia juvenil, me privando, ainda bem, de me tornar o rebelde que sonhava ser. Pelas palavras da minha mãe me pedindo paciência temporal, pois as coisas mudariam, que a vida não é estacionária como eu sentia. Também peço desculpas a meu pai, certamente não correspondi a suas expectativas, sempre me mantendo em um silêncio absoluto. Não é nada pessoal, é simplesmente como eu sou pai, eu me sinto estranho até a mim mesmo. Mas saiba que você sempre é minha referência, tanto para o certo como o errado, é a faca de dois gumes cravada em meu coração. Eu vi vocês, na verdade não vi, eu senti vocês passarem por tanta coisa, esvaírem a saúde, suas vidas (com toda a literalidade que seja possível aplicar a esse termo) para que possa estar aqui, como sempre, confuso com tudo o que sinto. E essa percepção é uma das coisas que mais me doem. Esse sentimento de responsabilidade que tudo isso me traz me corrói constantemente. Sim, eu sinto medo de não conseguir estar lá por vocês quando precisarem, e esse medo dá tanto desespero. Como eu já tive a oportunidade de dizer em outras vezes, isso nunca vai sair garganta acima, eu não sei o porquê. Isso é tão confuso, sentir tudo isso, ao mesmo tempo em que meu niilismo sussurra no meu ouvido que eu sou apenas mais um, apenas mais uma história, apenas

mais uma entre tantas que já existiram, existem e existirão. Sou apenas mais um garoto latino americano.

“Eu sou apenas um rapaz latino-americano,
Sem dinheiro no banco,
Sem parentes importantes,
E vindo do interior.

Mas trago de cabeça uma canção do rádio,
Em que um antigo compositor baiano me
dizia,
Tudo é divino, tudo é maravilhoso.

Tenho ouvido muitos discos,
Conversado com pessoas,
Caminhado meu caminho,
Papo, som, dentro da noite,
E não tenho um amigo sequer,
Que 'inda acredite nisso não,
Tudo muda!
E com toda razão.

Mas sei que tudo é proibido,
Aliás, eu queria dizer que tudo é permitido,
Até beijar você no escuro do cinema,
Quando ninguém nos vê.

Não me peça que eu lhe faça uma canção
como se deve,
Correta, branca, suave, muito limpa, muito
leve,
Sons, palavras, são navalhas,
E eu não posso cantar como convém,
Sem querer ferir ninguém.

Mas não se preocupe, meu amigo,
Com os horrores que eu lhe digo,
Isto é somente uma canção,
A vida realmente é diferente,
Quer dizer, ao vivo é muito pior.

E eu sou apenas um rapaz latino-americano,
Sem dinheiro no banco,
Por favor, não saque a arma no saloon,
Eu sou apenas o cantor.

Mas se depois de cantar,
Você ainda quiser me atirar,
Mate-me logo, à tarde, às três,
Que à noite eu tenho um compromisso e
não posso faltar,
Por causa de vocês.

Mas se depois de cantar,
Você ainda quiser me atirar,
Mate-me logo, à tarde, às três,
Que à noite eu tenho um compromisso e
não posso faltar,
Por causa de vocês.

Eu sou apenas um rapaz latino-americano,
Sem dinheiro no banco,
Sem parentes importantes,
E vindo do interior.

Mas sei que nada é divino,
Nada, nada é maravilhoso,
Nada, nada é secreto,
Nada, nada é misterioso, não.”
Belchior, 1976

É mãe, saiba que não mudei muito!

Mãe, eu ainda sou um garoto,
Que persegue os sonhos como um louco,
Mãe, sabe aquela estrada de pedras,
Ahh mãe, não existe mais,
Agora ela é de asfalto,
E o grito dos que a tomam é tão alto.

Mãe, sabe as promessas que fiz,
Viveria em maior paz sem elas,
Contudo, me faltaria o passado,
Mãe, lembra da fé que me deu,
Me desfiz e a recuperei tantas vezes.

Mãe, eu tenho guardado algumas lições
da vida.

É tudo o que é fisicamente meu,
Tudo o que os homens julgam real,
Certamente cabe em duas malas,
Mãe, talvez eu esteja a quem,
De uma pessoa moralmente normal,
Mas sinceramente,
É infernal minha luta entre bem e mal,
E o tempo não me dá chances de discutir
limites e lados,
Já que me mostrou o quão profundamente
estão atrelados.

Mãe, eu tenho consciência,
Do quanto sou estranho a meu pai,
Não o culpe pelo silêncio mortal entre
nós,
Eu sou constrangedoramente estranho até a
mim,
Não é que eu seja diferente,
É que eu me sinto extremamente igual a
todo mundo.

Sabe mãe,

No início eu queria mudar todos que me
cercaavam,
Não estava satisfeito,
Pensava que todos deviam me acompanhar,
Mas em algum ponto,
Eu vi que não lhes posso usurpar a
simplicidade,
Não lhes posso indicar certo e errado,
Vi que é um desrespeito julgamentos,
Vi que é assim que são felizes,
Que é assim que me deram tudo o que sou,
Que não tem preço vê-los intactos,
De não precisar forçar a memória para
lembrar de manias.

É mãe,

Hoje não deu para suportar o emocional,
As orações e a fé foram poucas,
É mãe,
Hoje promete ser bem anormal,
Acordei tão bem,
De madrugada até parei no sinal,
Ehh mãe,
Gostaria de saber o que tem mais poder,
A força de uma manada,
Ou a insistência de um beija-flor,
Ehh mãe,
Quantos mundos cabem em suas três
letras,
Ehh mãe,
É melhor parar,
Isso nunca vai acabar.

É mãe, desta vez, ao contrário do último evento de convergência acadêmica, eu tenho uma lista, não é muito extensa, até tem incrementos. Com algumas dessas pessoas recorrentes, os elos se aprofundaram a um nível que para mim se tornaram de sangue. Não me interessa a reciprocidade, não que não seja bom, sempre é bom sentimentos correspondidos, mas o significado dessas pessoas na minha vida transcende essa necessidade humana, e se tornou uma highway de sentido único. Em frente, mãe, peço permissão já atrasada para te usar como gancho nessas guinadas necessárias (ou que acho necessárias) entre as minhas pessoas importantes.

Gostaria de agradecer agora, a uma surpresa nordestina, uma pessoa arretada como dizem aqui em cima. Gostaria de dizer que ela deve agradecer ao Sandro por proporcionar tanta alegria à vida dela, por fazer o caminho desse ser perfeito aqui cruzar com o dela...rsrs. Sem brincadeiras, Bruna, mesmo sendo uma bola cantada por uma professora aí, eu vivia como um ermitão focado em todo o peso que carregava (e ainda carrego, mas agora com centenas de milhares de dezenas de toneladas de quilogramas a menos), no medo de não dar certo, de ser apenas um cara do interior que não conseguiu chegar lá. Do medo de perder a minhas aspirações científicas, de, em algum momento, ou por algum erro, me vetarem a oportunidade de participar da caminhada que trouxe tanta luz ao mundo. Bruna, eu me puni por muito tempo, por medo de criar raízes, e isso me impedir de ir a frente, de me levar ao fracasso. Além dessas pequenas coisas, eu nunca soube o que fazer comigo, e como diz meu eterno curandeiro da alma: “quase sempre a timidez se passa por arrogância”. Mas eu paguei para ver com você, e tenho sido muito feliz ao seu lado. A maturidade e sinceridade que pavimentaram esse caminho que trilhamos juntos me mostrou o quanto fui ingênuo durante todos esses anos. Quero te agradecer por todo o carinho, pelo apoio, por ser a pessoa que me mostrou que o amor não precisa ser complicado ou cheio de nuances, e que ele pode sim ser construído. Por suportar todo o peso caótico que compõem a minha caixa de pandora, e me acalantar em tantos momentos de angústias insensatas. Nosso convívio e amor também tem sido um sítio arqueológico de sentimentos muito fértil, que vem me ensinando intensamente sobre muitos aspectos da vida, inclusive de que sexo é bom, mas vira apenas um infundo ponto (assim como o ponto azul diante do cosmos), quando você passa a ter a capacidade de reconhecer que essa pessoa ao lado assim como você tem sonhos, objetivos, desejo de protagonismo, o que é um direito dela, mas acaba passando despercebido por conta de um macho-ego-alfa-heterocentrismo cultural. Tenho aprendido muito com você, e espero um dia ser tão importante na sua vida como você é na minha!

Eu sofro por ser assim,
 Não tente pensar que é diferente,
 É tanta gente,
 São bilhões de outros eu,
 Outros sonhos e medos,
 Outros eu não sei,
 Eu não sei se você me entende,
 Se consegue ver,
 Que meus sentimentos são todos
 meus,
 Que essa alquimia,
 Esse uníssono,
 De fissão e fusão de sentimentos,
 Em algum momento eclodirá,
 É tudo o que espero,
 É no processo não te machucar.

Key você,
 Deixe-me te avisar,
 O infinito é bem ali,
 Depois que se acaba o fim,
 É para chegar lá é um sacrifício,
 A gente mais chora do que ri,
 Independentemente do início,
 É querida,
 A deusa,
 A mãe,
 A divindade,
 A natureza,
 Tornou o ato de viver um vício,
 Um vício.

Eu já parei,
 Me enfurnei no limbo da razão,
 É tentei calcular,
 Quantificar,
 Limitar,
 Tornar finito,

Quanto tempo pode levar um
 momento,
 É dentre as tentativas,
 Contraí e dilatei coisas,
 Outras dividi até ser inconcebível
 entendê-las,
 Mais perguntei que respondi,
 Gastei mais energia do que
 conservei,
 É depois de tudo perdido,
 Quando mais nada era aplicável,
 Você os deriva,
 Me dando a força que preciso.

Key,
 Eu deveria ter lhe avisado,
 Que não há divisas e lados,
 Não dá para separar o certo do
 errado,
 É sim,
 O infinito é bem ali,
 Depois que se acaba o fim,
 É para chegar lá é um sacrifício,
 É sempre mais lágrimas que
 sorrisos,
 Não faz diferença o início,
 É querida,
 A regente do universo,
 A donzela da criação,
 A Rapunzel do tudo,
 A natureza,
 Tornou o estado de consciência um
 vício,
 Um vício.

Não sou rei,
 Ou se quer um mago,
 Para te presentear com a paz,

E nem se fosse o fãria,
 A conquista é o maior dos
 orgasmos,
 E essa vida de picos e vales,
 Essa superfície acidentada,
 Por onde lateamos às cegas,
 Muito raramente murmura sua
 rosa dos ventos,
 E estar atentos,
 Serenos e em completo transe,
 Para diferenciãr sinais e ruídos,
 Nesse (in)finito soma não-zero,
 Que aqui jogamos com a morte,
 Quem sabe talvez,
 Faça com que nós sejamos um
 para o outro,
 Nossa própria fórmula de paz.

Key,
Eu queria ter lhe contado,
Inexistem muros e arames farpados,
Que dívida a luz da escuridão,
É é claro,
O infinito é bem ali,
Depois que se acaba o fim,
É caminhar até lá é um suplício,
É sempre mais tristeza que alegrias,
Seja lá qual for o início,
É querida,
A mão de Deus,
O meio para seus fins,
O éter da existência,
A natureza,
Tornou essa disposição físico-
química um vício,
Um vício.

Estar aqui trancado,
 Com meus planos,
 Dentro de seis planos,
 Alguns paralelos,
 Outros não,
 Vigiado por oito vértices,
 Que os mantem unidos e coesos,
 Aceite você ou não,
 Me faz mais bem do que mal,
 Não preciso de razão ou lógica,
 De ser sensato,
 Uma pessoa moralmente,
 Ou politicamente correta,
 Não preciso me preocupar com
 outras coisas que não sejam as minhas,
 Aqui eu posso,
 Posso simplesmente deixar tudo,
 Tudo o que está atrasado de lado,
 Ignorar o agora digital passar do
 tempo,
 (é engraçado, não faz mais sentido
 dizer tic tac)
 E me prestar por bilhões de
 oscilações atômicas,
 A pôr em páginas brancas com
 listras paralelas,
 O meu significado de eu e você.

Key,
Eu desejei ter lhe advertido,
O quão illusório é esperar paredes e
grades,
Que possam desmembrar o bem do
mal,
E com certeza,
O infinito é bem ali,
Depois que se acaba o fim,
E a viagem até lá é um martírio,

Seja quanto for individual o início,
 É querida,
 A papoula da criação,
 O recipiente do ópio realidade,
 A parteira das Genesis,
 A natureza,
 Tornou essa simbiose orgânica um
 vício,
 Um vício.

Sim,
 É verdade,
 É você não faz ideia da dor que
 sinto,
 É um inferno aceitar que as coisas
 são assim,
 São assim como são,
 De que ninguém é o que é,
 De que não somos o que achamos
 que somos,
 De pensar a quão ácida e
 corrosiva é a verdade,

Dessa omissão diária diante da
 maioria esmagadora,
 Desse conjunto falso que dá voz a
 razão.
 Eu deveria ir dormir,
 É o que todos estão fazendo agora,
 Foi assim que a natureza e a
 ciclicidade do sol nos programaram,
 Mas meus bug's biológicos,
 As ranhuras em minhas trilhas
 mentais e morais,
 Sempre falam mais alto que
 minhas necessidades fisiológicas,
 E me perco noite a fora,
 Dia adentro,
 Com você agora no centro,
 No foco alfa,
 De minha elipse multifocal de
 sentimentos.

Bom, mãe, tenho que mudar a direção da minha rosa dos ventos agora, direcionar minha Gatling (de infinitos canos) de aleatoriedades para outro ponto focal. Preciso abater (rsrsrsrs) os professores Josmary e Nara, e vai ser fácil porque eu sei onde fica a casa das colinas, não adianta fugir. Professores, eu tenho um sentimento de dívida (no bom sentido) com vocês que, desde minha partida, sempre me causou uma grande dualidade (você dual, que novidade! Deve passar na sua mente agora, né Nara). Vocês são como já disse, “uma dessas questões que por serem tão simples e fundamentais, suas respostas ainda permanecem uma incógnita, uma utopia. Talvez para manter tudo em movimento, provir nossa fê, fornecer à humanidade uma razão para se manter sã, viva e coerente”. Eu deveria, mas não consegui me desvincular de vocês, pois eu me vi sendo guiado com muito carinho e cuidado para o ambiente acadêmico através de suas mãos. A intangibilidade do meu objetivo de ser um cientista (coisa ainda em aspiração) foi fragmentada por vocês ao me darem a oportunidade de fazer aquele filme de

$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$. Eu carrego essas coisas comigo, são bobas, eu sei, mas o bom do sonho de mudar o mundo, é que no frigar dos ovos pelo menos o sonhador sai mudado. É professor, realmente “as coisas não são simples”, até parece que a vida é uma sucessão de imprevistos e contratempos, é tudo tão caótico, e achamos que nunca estamos prontos para esses solavancos que subtraem voltas do nosso relógio biológico. Professor, eu mantenho esse distanciamento fóbico de todos os homens pelos quais nutro profunda admiração, e com o senhor não é diferente. Contudo, saiba que eu não digo, mas sinto! Passo meu tempo formulando o futuro e remoendo o passado, um erro que me impede de viver o agora. É por isso que esses momentos me são importantes, é quando eu lavo a alma, e, assim como meus pais e a professora Nara, você compõe um grande pedaço de quem sou. O medo de decepcionar vocês tem uma simetria ressonante de grau, número e gênero com o que carrego dos meus pais. Eu sei o quanto tudo parece falso, ou todas as interpretações que essas frases podem assumir (na verdade, quase tudo que faço e digo não parece o que é), mas sou mesmo essa pessoa boba e frágil que tem medo de crescer (um grande mal da minha geração).

Sabe,
 Antes de curvarmos tempo e espaço,
 Lá no início,
 Quando o universo se limitava ao
 horizonte,
 E o tempo ao dia e a noite,
 Já sabíamos que era questão de tempo
 tudo se repetir,
 Frio e quente, florescer e padecer,
 Eram ciclos temporais marcados por nossos
 sentidos,
 Em escalas tão menores, simples e
 funcionais.
 Hoje,
 Depois de alguns giros elipsoidais,
 Na vigência de calendários cristãos,
 Ainda permanecemos de pé,
 Um pouco tontos e incertos,
 Uma consequência do que fizemos a nós
 mesmo?

Não sei!! Quem saberia?
 O que posso afirmar é que fracionamos e
 expandimos nossos ciclos primordiais de
 tempo,
 Agora,
 Não é necessário considerar latitudes,
 longitudes, solstícios, e equinócios,
 Nossos relógios não têm mais ponteiros,
 E o tic tac é uma opção sonora estética,
 Não uma consequência mecânica.
 Os ciclos que nos regem agora são
 atômicos, e não mais astrais,
 Somos tão precisos atualmente,
 Que é perda de tempo ser indeciso,
 É uma falha optar por ponderar,
 Sim,
 Veja só como é que é,
 Fundimos grandezas sólidas,
 E criamos um tecido flexível que nos livrou
 da simultaneidade,

Nos revelando egocentricamente que tudo
o que acontece conosco é único e relativo
(nossas dores sempre são maiores),
Mas também paramos o tempo,
Fomos para frente e para trás,
Descobrimos que ele nem sempre existiu,
Chegamos até a singularidade da existência
de tudo,
E fomos capazes de projetar o fim.

Putz,
Mudamos nossa concepção de tempo,
E ele nos mudou (e nos muda, eternas
metamorfoses ambulantes),
O difícil é dizer o quanto e como,
E até quando instintos e sentimentos
primitivos nos serão importantes,
Sentimentos simples, como aceitar o
bendito tempo além de nossa escala,
E apreciarmos o mesmo que nos é dado,
Assim como apreciamos a inversa
proporcionalidade entre a simplicidade da
pergunta,
e a complexidade da resposta.

Enfim,
Aqui em cima,
Nessa geografia plana ou esférica,
Não importa,
Na verdade, historicamente nunca
importou,
Por que agora aqui importaria?
Deste lado de cá do tratado de
Tordesilhas,
Na porção mais oriental da América
latina,
Onde as capitais já foram heranças,
E o sol que aqui nos ilumina,

Se impõem como soberana fonte de
melanina,
Aqui,
Onde as esquinas revelam a coexistência de
mais amplo espectro de violência,
É difícil e quase lamentável o que se pode
sentir,
É tudo tão intenso,
Fora de escala,
Que meus sensores estão na maioria do
tempo completamente saturados,
Sim,
Da vontade de gritar, de falar, esbravejar,
brigar, reclamar, chorar, rezar, implorar,
lutar...

Essa frustração de ver o sonho de mudar o
mundo morrer,
Essa frustração que o tempo nos traz em
credidiário,
Como se diz,
Seria cônico,
Se não fosse essa dor no peito um escario,
A percepção ascendente ou descendente,
Depende de onde e de quem está olhando,
De que o sistema é muito mais sólido,
cruel e difundido que no cinema,
Para ser sincero,
É um obliterador celestial de esperanças,
Porque essa dança que chamamos de vida,
Executada sobre o palco do tempo,
Coreografada por deus,
Ou qualquer que seja a divindade,
Na verdade, se resume a nossa vaidade?
Eu sei, não é uma resposta simples,
Se é que existe uma resposta.

Talvez pela necessidade de soluções
 espirituais, emocionais, e sociais exatas,
 Eu desisti dos “por quês” e “como”,
 Das respostas diretas,
 E fiz meu reduto nos pantanosos, mas
 férteis “e se”,
 E se tudo fosse diferente?
 E se tudo o que dizem ser verdade,
 Na verdade não o for,
 E se verdade e realidade não possuíssem
 elos,
 E se fosse um fato universos paralelos,

E se a trigésima casa decimal não
 alterasse de forma global o resultado final,
 E se a disputa entre bem e mal,
 Na real,
 não fosse eterna e imoral,
 Mas sim algo simbiótico e natural,
 E se,
 E se,
 E se eu não precisasse de divagar tanto
 para dizer o que sinto por vocês,
 E se eu não fizesse de tudo um relicário,
 E se, e se, e se,...

É, Mãe, a vida é indiferente, eu sei, mas ela constrói caminhos torpes que vivem levando e trazendo pessoas ao longo dessa nossa condição simbiótica orgânica que se tornou lúcida sobre essa camada “silicática”, na qual floresceu e floresce a divindade da existência. Ela (a vida) me trouxe duas pessoas, que me ajudaram a desenhar meu próprio eu. Graciela e Filipe, eu agradeço por essa imensa amizade, por toda a sinceridade, por toda a força e apoio. Vocês são os irmãos que a ciência me concebeu, e montarmos juntos no lombo dessa truculenta besta que se chama doutorado é uma daquelas lembranças que ficarão registradas em meu hipocampo, a um nanômetro da região reptiliana. Dividimos muitas inseguranças, medos, vitórias, derrotas, alegrias, surpresas, e muito mais. Em resumo etecetera e tal, compartilhamos nossas vidas uns com os outros! Graci, o que seria de nós sem o Filipe para conter dois jacus do mato hein?...rsrsrsrs. Meninos, obrigada de coração por todo o suporte e apoio, companheirismo, colaboração (científica, emocional, pessoal, profissional...). Vocês estiveram ao meu lado em um dos meus momentos mais difíceis e me mostram o valor de uma verdadeira amizade. Para mim, em meu íntimo, a tempos converti vocês em entidades “supravitais” em minha caminha, e espero que as paralelas de nossas vidas continuem se cruzando.

Eu assim como vocês,
 procurei estar aqui,
 Mas assim que cheguei,
 Foi que descobri que talvez eu não consiga,
 Que por essa tentativa,
 De estar onde me faz bem,
 Eu literalmente me implodi,

Cruzei as linhas,
 E praticamente não resisti,
 Mas vocês estavam aqui,
 Por mim,
 E comigo.

Eu assim com vocês,
Sei cada reação que faz uma estrela brilhar,
Mas não consigo evitar que a noite me
falte ar,
Se conseguisse falar,
Se parasse de me sabotar,
Se eu liberasse tudo o que me faz sufocar,
Eu sei que estariam lá,
(na realidade vocês estiveram)
E não iriam se importar,
Vocês sabem,
Nunca me entenderam mal,
Que a única coisa que perguntaria a um
Deus,
É que me explique por que sou tão dual.

Vocês lembram?
Em outros carnavais,
Quando as coisas eram normais,
E Brasília não imperava nos jornais,
Quando acreditávamos que os sonhos eram
reais,

E ninguém precisava ser excessivamente
certo para ter ideais,
A felicidade pairava entre as necessidades
fúteis e as coisas banais,
E crianças como nós podiam fantasiar com
comerciais,
Vegetarianos se fartavam com plantas
canibais,
O fim era temido,
Mas não passava de causas naturais,
O próprio mundo tinha limites pessoais,
Eram apenas quatro pontos cardeais,
As dimensões cabiam nos dedos das mãos,
Antes das paralelas serem modificadas,
Só existiam as coisas euclidianas,
Antes da razão ser insana e extinguir as
coisas sobrenaturais,
Os homens eram simples, e as coisas
artesanaais,
Apollo 11 era uma caixa de papelão,
E a culpa era do sistema,
Crescemos, e isso é uma pena!!

É claro, mãe, está tudo muito demorado, bagunçado e repetitivo. Eu sei, sou caótico e excessivo, mas está acabando. A lista aumentou, e eu preciso cobrir todos os pontos. Ops, pontos, não, pessoas... rrsrrs. Vou voltar às raízes agora, mãe, tenho que agradecer aos meus tios Ana Cristina e Luciano. Tudo bem, não posso negar que a dificuldade que tenho em me apegar e diretamente proporcional à facilidade de me desconectar. Mas, no caso de vocês, tios, eu não me desconectei, apenas me ausentei. Eu agradeço a vocês por serem essas pessoas que sempre me apoiaram, que sempre me estenderam a mão, e nunca me negaram ajuda, mesmo mas coisas mais triviais. Eu me lembro de todas as falhas que cometi e que não impediram que vocês acreditassem em mim, e no que é importante para mim. Sem a contribuições de vocês, seja me abrigando, me chamando a atenção, ou dando aquele dinheiro da gasolina, pagando isso e aquilo, ou me defendendo dentro da família por muitos dela não entenderem por que um cara de 20 e tantos só estudava (hoje 30), eu não estaria aqui. Eu não posso desfazer erros, mas quero

registar a “fundamentalidade” de vocês na edificação dessa minha conquista. E do mesmo modo que para minha mãe, me repetirei aqui por em muitos pontos como esses, meus sentimentos não mudaram muito. Então não é por falta de comprometimento ou atenção, mas sim por inércia emocional.

Nunca quis laços,
Nunca quis casas,
Só queria que fossem de cera minhas asas,
Sempre quis tantas coisas.

Eu sempre começo, mas nunca término,
Eu só canto a primeira parte do hino,
E eu vou seguindo,
E eu vou seguindo,
Mesmo não sabendo onde estou indo,
Mesmo não sabendo qual é meu destino,
Eu não sei para onde meu caminho está
convergindo,
Eu não queria dizer adeus,
Eu não direi o porquê,
A última imagem de vocês eu quero
sorrindo.

O sim e o não me deram,
E este sentimento a tantos anos ouço em
alto-falantes,
Eu sou uma entre tantas metamorfoses
ambulantes,
Eu sempre sou mais do que era antes,
Eu aprendi as verdades dos gigantes,
Mas ainda guardo comigo a inocência dos
ignorantes,
E a pureza contida na simplicidade que faz
dos homens seres brilhantes,
Que nos faz reconhecer que desta imensidão
somos os últimos instantes.

Vocês me mostram sem quer,
Com apenas gestos,
Que uma pessoa deve viver pelo que
acredita ser verdadeiro e justo,
E em minha insurgência descobri que até
para se doar existe custo,
Que a verdade é a coexistência do que se
tem lá fora e aqui dentro,
Que nem sempre é necessário ter fortes
argumentos,
Para querer mudar o mundo e seus
desajustamentos,
Eu quero consertar todos estes erros,
E eu sei que eles não são meus,
São de um cara chamado deus.

Eu sempre começo, mas nunca término,
Eu só canto a primeira parte do hino,
E eu vou seguindo,
E eu vou seguindo,
Mesmo não sabendo onde estou indo,
Mesmo não sabendo qual é meu destino,
Eu não sei para onde meu caminho está
convergindo,
Eu não queria dizer adeus,
Eu não direi o porquê,
A última imagem de vocês eu quero
sorrindo.

Mais alguns minutos de paciência, mãe, minutos? Não seriam linhas? Certo, vou parar, vou ser mais direto porque a próxima pessoa não tem muita paciência com meu jeito enrolado de ser. Ele é a pessoa de mais fino trato que já conheci, além de possuir a maior densidade de conhecimento com a qual pude interagir. Isso é tão intimidador, que dá medo de quebrar o protocolo, e não o tratar com a distinção a qual merece. Mas o farei, eu disse lá no início que teceria todos esses agradecimentos de forma livre e pessoal, e peço desculpas desde já a qualquer imprudência ou gafe. Professor Celso, é um orgulho, e uma conquista híbrida (pessoal e profissional) ter sido (ou ser, nada está terminado, tudo se encontra em aberto) seu aluno. Isso é algo que tenho imenso estimo, e me traz muita alegria, saber que em algum nível, mesmo que se seja basal, consegui, esperou eu, corresponder às expectativas de um dos grandes cientistas desse país. E do mesmo modo que me sinto realizado em dizer que fui aluno dos professores Josmary e Nara, também terei esse prazer em carregar seu nome em minha formação. Aqui, professor, eu gostaria de reiterar meus agradecimentos por seu acolhimento, por ser essa pessoa sempre disposta a discutir, e por notar e entender rapidamente que sou uma pessoa de poucas palavras, sendo, para piorar a situação, essas poucas palavras atrapalhadas. Agradeço ao senhor pela orientação, cobrança, incentivo, paciência e pelo exemplo. Por toda a liberdade e confiança depositadas em mim, e não medir esforços para criar todo o ambiente necessário para o desenvolvimento desse nosso trabalho. Agradeço por compartilhar, mesmo que esporadicamente toda sua experiência de vida e científica, e por ser esse imenso muro de contenção de minhas frustrações com os assombrosos rumos da ciência e da nação como um todo. Espero que consigamos resistir a essa onda obscurantista, e essa ruptura que nós mesmo como país criamos.

Devemos imprimir nas florescentes gerações,
 De uma forma nobre, clara e concisa,
 Não a ferro e fogo,
 Não apartidáriamente (putz, é uma
 ideologia também),
 Pois a história em si é uma resultante,
 A soma multilateral de conjunturas,
 De pensamentos, atos e atores,
 Ela não é neutra,
 Mas é soberana quando alicerçada nos
 fatos por si só,
 Ela não vira pó,
 E não some quando varrida para um canto
 ou outro das tapeçarias viperinas,
 Enquanto a rassoura,
 O instrumento (poder),
 Oscila entre mãos calejadas e finas.

 Key amigo,
 Não é meu trabalho,
 Key companheiro,
 Não tenho por objetivo principal,
 Key camarada,
 Não me cabe te atentar,
 Que nada é simples,
 Que logicas e soluções baratas,
 Esteadas em frases feitas,
 Obscuramente trazem vontades tácitas,
 É um narcisismo travestido de boa fé,
 Que floresce inescrupulosamente em tudo
 que verte dogmas,
 Independente dos sistemas,
 Independente dos lemas,
 Das bandeiras,
 Do sangue que enverniza trincheiras,
 As governanças ordeiras sem pés nem
 estribeiras.

 Key colega,
 O passado de ontem,
 Que confunde-se com o hoje,
 Key irmão,
 A história vislumbrada de presente e futuro,
 O pessimismo que alimenta meu ser,
 Insensatamente me lembra,
 Me ressalta,
 Que deveria seguir de cabeça baixa,
 Mas a cada momento crepuscular,
 A fera da covardia me caça,
 Me testa,
 Afinal,
 É da bestialidade da nossa espécie eliminar
 o que não se encaixa,
 Todas as liberdades e coisas laicas,
 E por mais mediano que seja o meu bem
 querer,
 Nunca sangraria por minha nação,
 Essa nobriedade artificial e profanada de
 cadeiras macias e ergonômicas,
 Ou dos tamboretes duros da minha
 ignorância,
 Transcende o fato de nenhuma nação
 nunca ter sangrado por um filho teu.

 Key parceiro,
 A desinformação é a fonte infinda de
 verdades absolutistas e incontestáveis,
 Key meu chapa,
 Ela é uma onda monocromática e turva,
 É um tsunami que varre a pluralidade das
 cores,
 Que prega padrões, cadências e latências,
 Ela rege a previsibilidade de achar na
 dissonância a abominação.

Hey mano,
 Eu faria um manifesto,
 Mas eu detesto ser sóbrio, linear, coerente,
 consistente,
 Hey chegado,
 Eu perderia meu tempo com longos e
 objetivos jogos de certo e errado,
 Dividiria o joio do trigo nesse pântano que
 só cresce inço,
 Fragmentaria as multidões em amigos e
 inimigos,
 Usaria o poder divino concedido ao meu
 dedo e apontaria inocentes e culpados,
 Com uma linha intangível,
 Separaria o bem do mal,
 Mas em suma,
 A minha verdade é apenas uma verdade em
 um multiverso aos avessos de verdades
 verdadeiras,
 E me surpreende que gente como a gente,
 Gente que se diz gente mais decente que
 qualquer outra gente,
 Reduza de forma simplória,
 Até trágica,
 O imensurável e etéreo,
 É um combate de cruz e espada!
 Sabe,
 Se não for ofender,
 Ou usurpar a soberania de vossa verdade,
 Eu perguntaria aos messiânicos,
 Se é que me cabe tal infração,

O por que,
 O por que dêi tanto,
 A minha harmônica apresentar modos
 assimétricos,
 Concebido não só de periodicidades
 uníssonas,
 Mas também por tempo, incertezas e
 assincronias.
 Hey parça,
 Serei caçado por condensar a nuvem de
 metal que paira na troposfera,
 Abaixo do último milímetro que nos
 compõe e acima do pescoço,
 Na verdade,
 Na verdade não,
 De forma bizarra e incoerente,
 Poderia ser o certo uma construção de
 soberania particular originada em macro e
 micro interações que ao ressoar
 interpessoalmente se transforma em senso
 comum, e a partir daí não nos cabe mais o
 reivindicar??
 Ou o certo é o certo porque é certo?
 Ninguém sabe ao certo se estar certo é o
 correto,
 Mas ao se encontrar em dúvida, esvaído
 do certo,
 Certamente traz mais sobriedade e luz a
 verdade.

Olha, mãe, são as últimas pessoas, eu juro, sem delongas. Agradeço a minha irmã Adevânia por esse período de paz entre a gente, isso é muito importante para mim, apesar de não deixar transparecer (novidade!). Eu sei, não cabe culpa, além disso, uma coisa que eu não sou é uma pessoa fácil. Mas o tempo como sempre nos trouxe maturidade, e consequentemente, pelo menos para mim, ele sussurrou “quanta bobeira, isso vale mesmo

a pena?’. Agradeço a ela por ter me aturado, ter me estendido a mão mesmo em nossos momentos mais tempestuosos, e por ser uma pessoa forte. Isso eu sei que ela é porque vocês nos deram a mesma criação e exemplos. Também peço desculpas a ela por não ter tempo de escrever algo novo a ela, eu sempre funciono na pressão, e estou escrevendo esses agradecimentos os 99:999999999999 do sétimo tempo da quinta prorrogação. Apesar dessa falha, novamente com ela, o que escrevi a ela em algum desses momentos de reflexão súbitos ainda é válido.

*Minha irmã é mais verdadeira que eu,
Ela vive por sua própria fé,
Eu vivo por minhas dívidas,
Ela tem as coisas muito bem divididas,
As minhas são incomparavelmente confundidas,
Ela tenta cumprir prazos e pagar dívidas,
Eu ainda tento entender nossas vidas,
Ela luta para não ser vencida,
Eu continuo com as causas perdidas.*

Olha, mãe, esse era o fim, mas a Gabi me encheu tanto o saco, que para ter paz vou inventar qualquer coisa só para citar o nome dela. É, mãe, ela é uma daquelas patricinhas, que vive de Iphone, Ipad, Iaquilo, Iaquilo outro, Itudo. Ela nunca pisou em uma bosta de vaca (se bem que a Bruna também não!), é daquelas princesinhas criadas em condomínios da zona nobre de uma grande capital, um saco, mãe! Estou brincando, mãe, ela é uma das adições da lista, uma pessoa até que bacaninha, não consegue fazer nada sem minha supervisão, mas é bacaninha! Certo, vou parar de zuar! Agradeço a você (por tabela, ao Gatinho), e, por piedade, a Carolzeth, pela amizade sincera, por serem essas pessoas brincalhonas, e trazerem leveza. Por compartilharem o sentimento de que isso o que fazemos é mais que um trabalho (é o que escolhemos para a vida, por paixão, por curiosidade, e não por status ou para atualizar o status), de que estamos aqui graças a uma bolsa, não atrás de uma bolsa. Aiiiii, eu deveria ter dito isso quando estava agradecendo ao Filipe e a Graci, agora já foi, vai ficar assim, não tenho tempo de voltar lá. Agradeço a colaboração, os momentos de pizza, pastel, coxinha, bolo, lasanha, e todos os rodízios da vida, que usamos para terapia. E, apesar de toda a alegria, estarem sempre preocupados com a ciência que fazemos, por não terem medo e entenderem minhas críticas, e por me criticarem também! Afinal, segundo a história, não perdoamos nem o

filho do homem, né. Tá bom, parei, esse tipo de brincadeira é perigoso, a própria história também mostrou. Como já disse, não tenho muitos amigos, mas pelos que tenho, por natureza, a gente morre e mata, né Gabi... rrsrs. Olha, eu não estou com tempo, e vou ficar mais chateado do que já estou se não escrever algo para vocês. Então para tentar resolver isso, e por saber que vocês sabem que meu humor é bem pesado (queria falar negro, mas não sei como vai soar) vou colocar algo que escrevi em um desses momentos de bom humor (acho que o Gatinho vai rir). Não é uma tradução literal das minhas concepções, mas diz muito sobre meu péssimo tipo de humor.... rrsrs

Sempre me chateou tolos como eu,
Que na metade da história acha que sabe
o que aconteceu,
Você não é a primeira que comigo se
aborreceu,
Eu estaria ferrado na arena de um coliseu,
A primeira pedra a jogar seria deus,
E nessa hora qualquer um negaria que sou
um dos seus,
Até eu negaria três vezes que sou um ateu,
Tá lendo o que, ele também sabe os erros
que você cometeu,
Não adianta se arrepender, todo mundo se
fodeu,
Todo mundo se fodeu, todo mundo se fodeu.

Lá no horizonte o apocalipse apareceu,
Não vai escapar ninguém,
Não ponha debaixo dos panos o caminho
que escolheu,
Olhe para trás ele floresceu, ele floresceu,
E você?
Você se fodeu,
Você se fodeu.

Eu daria tudo pra estar lá,
Só pra ver se vale apenas o que ele
prometeu,

Se vale a pena tudo o que se debateu,
Ou se todo mundo se fodeu,
Todo mundo se fodeu,
Todo mundo se fodeu.

Agora que não dá tempo,
Tem gente que se converteu,
Tem gente dizendo que se arrependeru,
Tem gente jurando que do seu jeito sempre
“creu”,

Tem gente falando que ainda não entendeu,
Ahhh meu filho,
Deixa eu te explicar,
Agora é creu,
Todo mundo se fodeu,
Todo mundo se fodeu,
O catolicismo se fodeu,
O protestantismo se fodeu,
O budismo se fodeu,
O taoísmo se fodeu,
O espiritismo se fodeu,
O hinduísmo se fodeu,
O iluminismo se fodeu,
O judaísmo se fodeu,
O islamismo se fodeu,
O ocultismo se fodeu,
O ateísmo se fodeu,
Até o candomblé se fodeu.

Não chora não meu filho,
Não é só você e eu,
Todo mundo se fodeu,
Todo mundo se fodeu,
Tô achando que até Jeová se fodeu,
Ninguém subiu,
Todo mundo desceu,
E,
acho que é geral Genival,
Todo mundo vai se dar mal.

Enfim, mãe, eu queria falar mais sobre você e todas essas pessoas que listei, mas o cucu está aqui gritando no meu ouvido, se bem que não estou ouvindo mesmo... rrsrs. Chega, esse é o final, não tenho em mente qualquer outro evento acadêmico para convergir e me proporcionar a oportunidade de falar sobre as pessoas que me trouxeram até aqui. Mas espero continuar tendo a oportunidade de interagir com vocês ao longo dessas nossas atuais disposições físico-químicas.

Ai...a cascavel da sogra vou te falar (o bicho chato), fica fazendo a gente voltar em coisas nas quais já tinha colocado um ponto final. Tenho que agradecer se não minha vida vai virar um inferno...rrrs. Brincadeira! Obrigada dona Edilene por ter me acolhido como um filho, e por ser essa pessoa que compra até urubu voando...rrss, e por comprar aqueles dois ovos. Por sempre ser essa pessoa alegre e disposta a ajudar os outros. Para a Mary só tenho um recado; vai pagar a parcela do Iphone Mary!