

CAROLINA BERGER

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE CARVÃO ATIVADO COM
OZÔNIO E FOTOINSERÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS**

**FLORIANÓPOLIS
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

CAROLINA BERGER

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE CARVÃO ATIVADO COM
OZÔNIO E FOTOINSERÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira.

Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Humeres e Prof. Dr. Moisés Canle López

Área de Concentração: Engenharia de Reações Químicas e Desenvolvimento de Materiais.

**FLORIANÓPOLIS
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Berger, Carolina

Modificação Superficial de Carvão Ativado com Ozônio e Fotoinserção de Moléculas Orgânicas / Carolina Berger ; Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira ; coorientador, Eduardo Humeres ; Moisés Cance Lopes.

133 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. carvão ativado. 3. ozonização. 4. fotoinserção. 5. Albumina. I. Moreira, Regina de Fátima Peralta Muniz. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Modificação Superficial de Carvão Ativado com Ozônio e Fotoinserção de Moléculas Orgânicas

por

Carolina Berger

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^a. Dr^a. Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira
orientadora

Prof. Dr. Juan Jacob Eduardo Humeres Allende
coorientador

Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares
coordenadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Humberto Jorge José

Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Salvador Ferreira

Prof^a. Dr^a. Rosely Aparecida Peralta

Prof. Dr. Jean Carlo Salomé dos Santos Menezes

Prof^a. Dr^a. Gean Delise Leal Pasquali Vargas

Florianópolis, 21 de setembro de 2015.

Àquele que me amou primeiro, meu Deus
Àqueles que amo muito, minha família

AGRADECIMENTOS

Meu Deus, Paizinho

Muito obrigada por ter me presenteado com este doutorado. Obrigada por ter me trazido até aqui, por vezes Tu me carregaste no colo, pois eu não tinha mais forças pra continuar.

“Entregue suas preocupações ao Senhor, e Ele o susterá; jamais permitirá que o justo venha a cair.” Salmos 55:22

Te agradeço, Senhor, pela vida da minha orientadora Regina, que me ensinou, complementou meu crescimento profissional, mas mais do que isso, me mostrou como ser forte e superar meus limites.

Obrigada também pelos meus co-orientadores, Eduardo e Moisés, que sempre estiveram dispostos a me auxiliar.

Obrigada pelos colegas e amigos do LEMA, pelas meninas da Universidade da Coruña, pelos meus colegas do IFTO, e pelos colegas do IFSC, pessoas que participaram em algum momento desta trajetória.

Obrigada pelas pessoas que o Senhor escolheu para minha banca examinadora, Dr. Jean, Dra. Gean, Dr. Humberto, Dra. Rosely e Dra. Sandra pela disponibilidade dessas pessoas para a leitura da minha dissertação.

Obrigada por permitir que os meus estudos fossem financiados em parte pela Capes e Cnpq, e obrigada pela oportunidade de estudar um ano na Espanha.

Obrigada pela minha amada família: pelo meu marido João, que atravessou o oceano e o Brasil me apoiando e pelo meu maior tesouro, Moisés.

Mas acima de tudo, Senhor, obrigada por ter me trazido a Sua palavra, pois é por ela que estou aqui.

“Aqueles que semeiam com lágrimas, com cantos de alegria colherão. Aquele que sai chorando enquanto lança a semente, voltará com cantos de alegria, trazendo os seus feixes.” Salmos 126:5-6

Procure conseguir sabedoria e compreensão. Não esqueça, nem se afaste do que eu digo. Não abandone a sabedoria, e ela protegerá você. Ame-a, e ela lhe dará segurança. Para ter sabedoria, é preciso primeiro pagar o seu preço. Use tudo o que você tem para conseguir a compreensão. Ame a sabedoria, e ela o tornará importante; abrace-a e você será respeitado. A sabedoria será para você um enfeite, como se fosse uma linda coroa. Provérbios 4:6-9

RESUMO

Carvões ativados (AC) são utilizados como substratos na adsorção de biomateriais, pois permitem o carregamento de grandes quantidades de proteínas. Além disso, estes materiais podem ser incorporados para uma rápida transferência de elétrons. O tratamento de AC com ozônio tem demonstrado ser uma ótima técnica para inserção de grupos oxigenados na superfície do carvão, melhorando suas características e aplicações. O carvão ativado pode ser utilizado como suporte para a imobilização de proteínas, possibilitando o reuso e estabilidade das mesmas. A albumina (BSA), principal componente do sangue, é uma proteína capaz de ser excitada por luz UV, desencadeando reações fotoquímicas, tornando a fotoinserção uma alternativa para a ligação entre carvão ativado e BSA. O objetivo deste trabalho é a oxidação do carvão ativado com ozônio em diferentes condições e utilizar a luz UV (254nm) para inserir a albumina nos diferentes produtos de oxidação do carvão. Foram preparados três carvões por meio da oxidação com ozônio: AC.O₃, AC.O₃-H₂O e AC.O₃-NaOH. Os carvões preparados e o carvão comercial foram caracterizados por TGA/FTIR, FTIR, análise elementar e análise superficial pelo método BET. Os carvões foram fotolisados em um reator isotérmico com luz UV 254 nm durante 10 min, a reação foi acompanhada por quantificação do carbono orgânico total presente em solução e o sólido resultante caracterizado por FTIR, TGA/FTIR e análise elementar. As reações de fotoinserção ocorreram no mesmo reator UV com 1 g L⁻¹ de albumina e 2 g L⁻¹ de carvão. As caracterizações dos carvões demonstraram que os diferentes tratamentos produzem carvões com distintos graus de oxidação, sendo o AC.O₃ o carvão que apresentou maior porcentagem de grupos carboxílicos em sua superfície e menor área superficial. As caracterizações das fotólises dos carvões apontaram para a liberação de grupos orgânicos dos carvões durante a reação, gerando assim grupos ativos a inserção. As análises de FTIR dos produtos das reações de fotoinserções com albumina indicaram o aparecimento de novas bandas, os termogramas a maior perda de massa, a análise elementar para a maior porcentagem de oxigênio em comparação aos respectivos carvões originais e a análise de XPS para o

surgimento de ligações de nitrogênio (400,3 eV) características de amina de albumina.

Palavras chave: Carvão ativado, ozonização, fotoinserção, albumina.

ABSTRACT

Activated carbon (AC) is used as support in the adsorption of biomaterials, since it allows the charging of large amounts of proteins. Moreover, these materials can be incorporated for quick electron transference. The treatment of AC with ozone has shown to be a great technic for insertion of oxygenated groups onto carbon surface, improving its characteristics and application. The AC can be used as support to immobilize proteins, making possible the reutilization and stability of these proteins. Albumin (BSA), main blood component, is a protein capable of being excited by UV light, starting photochemical reactions, making photoinsertion an alternative to connect AC and BSA. The goal of this study is the oxidation of AC with ozone, in diverse conditions, and to use UV light (254nm) to insert albumin in different products of carbon oxidation. Three carbons were prepared by ozone oxidation: AC.O₃, AC.O₃-H₂O and AC.O₃-NaOH. The manufactured carbon and the commercial carbon were characterized by TGA/FTIR, FTIR, elemental analysis and surface analysis by BET method. The carbons were photolysed in an isothermal reactor by UV light 254 nm for 10 minutes, the reaction was followed by measuring the total organic carbon present in the solution and the resulting solid was characterized by TGA/FTIR, FTIR and elemental analysis. The photoinsertion occurred in the same UV reactor with 1 gL⁻¹ of albumin and 2 gL⁻¹ of carbon. The carbon characterization showed that the different treatment resulted in carbons with diverse degrees of oxidation, being the AC.O₃ the carbon that exhibited the largest percentage of carboxylic groups in its surface and the smallest superficial area. The carbon photolysis characterization pointed to the release of organic groups during the reaction, resulting in groups active to insertion. The FTIR analyses of albumin photoinsertion products indicated the appearance of new bands, the thermograms indicated bigger mass loss, elemental analysis showed more percentage of oxygen in those samples when compared with the original carbons, the XPS analysis indicated the presence of new nitrogen bonds (400.3 eV) typical of the amide from albumin.

Keywords: Activated carbon, ozonation, photoinsertion, albumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da albumina bovina - BSA	37
Figura 2 - Sequência de aminoácidos e de pontes dissulfetos para albumina bovina (Adaptado de Peter, 1985).	38
Figura 3 - Principais métodos para imobilização de proteínas. Fonte: Dalla-Vecchia et al. 2004	41
Figura 4 - Imobilização da enzima sobre uma superfície aminada por (A) carbodiimida ou (B) glutaraldeído (Sassolas et al, 2012).	43
Figura 5 - Imobilização induzida por luz UV ilustrada com um fragmento Fab de imunoglobulina em uma superfície derivatizada com tiol. A ponte de dissulfeto (vermelho) localizado perto do resíduo de triptofano (azul) (aminoácido aromático) está localizado afastado do sítio de ligação com o antígeno (Neves-Petersen et al, 2006).	46
Figura 6 - (a) A reação entre o-ftaldialdeído (OPA) e tiol com formação de hemitioacetal. A reação do hemitioacetal com aminas primárias resulta na formação do complexo entre o isoindol fluorescente. R ₁ -SH representa uma molécula de tiol; R ₂ -NH ₂ uma amina primária. (b) Representação esquemática do processo utilizado para a imobilização de proteínas utilizando a reação descrita no item (a) (Kyprianou et al, 2010).....	47
Figura 7 - Aplicações de microarranjos da proteína. Existem dois tipos gerais de microarranjo da proteína: microarranjos proteicos analíticos e funcionais (Zhu e Snyder, 2003).....	51
Figura 8 - Grupos funcionais que podem ser encontrados na superfície de um carvão ativado (Bandosz, 2006).	54
Figura 9 - Caminhos de reação propostos para reação O ₃ com carvão ativado (Chiang et al, 2002b).	55
Figura 10 – Propostas de Harries e Staudinger para a estrutura do ozônio.....	57
Figura 11 – Primeira proposta feita por Criegee, em 1953 (Oliveira e Wosch, 2012).....	58
Figura 12 – Proposta do mecanismo de Criegee (1975), adaptado de (Oliveira e Wosch, 2012).	58
Figura 13 - Reator utilizado na fotoinserção.	62
Figura 14: Organização da apresentação dos resultados e discussões da tese.....	67

Figura 15 - Análise termogravimétrica dos carvões AC, AC.O ₃ , AC.O ₃ .H ₂ O e AC.O ₃ -NaOH (taxa de aquecimento: 5°C min ⁻¹ ; gás de arraste: N ₂	69
Figura 16 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC durante a análise termogravimétrica.....	71
Figura 17 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ durante a análise termogravimétrica.	72
Figura 18 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -H ₂ O durante a análise termogravimétrica.	72
Figura 19 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -NaOH durante a análise termogravimétrica.....	73
Figura 20 - Espectro de FTIR dos carvões: AC, AC.O ₃ , AC.O ₃ -H ₂ O e AC.O ₃ -NaOH.	74
Figura 21 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC (a 77K).....	78
Figura 22 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC.O ₃ (a 77K)	78
Figura 23 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC.O ₃ -H ₂ O (a 77K)	79
Figura 24 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC.O ₃ -NaOH (a 77K).....	79
Figura 25 - Termogramas do carvão ativado antes (AC) e após a fotólise (AC.F).	80
Figura 26 - Termogramas do carvão AC.O ₃ e do mesmo após a fotólise (AC.O ₃ .F)	80
Figura 27 - Termogramas do carvão AC.O ₃ -H ₂ O e do mesmo após a fotólise(AC.O ₃ -H ₂ O.F)	81
Figura 28 - Termogramas do carvão AC.O ₃ -NaOH e do mesmo após a fotólise (AC.O ₃ -NaOH.F).....	81
Figura 29 - Espectros de FTIR dos carvões fotolisados.....	83
Figura 30 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.F durante a análise termogravimétrica.	84
Figura 31 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ .F durante a análise termogravimétrica.	84
Figura 32 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -H ₂ O.F durante a análise termogravimétrica.	85
Figura 33 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -NaOH.F durante a análise termogravimétrica.....	85
Figura 34 -A) Espectro de Fluorescência durante a fotólise da albumina. B) Decréscimo na intensidade de fluorescência no	

comprimento de 340 nm com o tempo (concentração inicial de albumina :100 mg/L; radiação UV 245 nm).	87
Figura 35- A) Espectro de absorbância da fotólise da albumina. B) Incremento da absorbância da molécula de albumina a 10 min de reação em 270 nm (concentração de albumina: 100 mg/L; comprimento de onda na fotólise: 254 nm).....	88
Figura 36–Cinética de interação física de BSA sobre os diferentes carvões ([BSA]= 1g L ⁻¹ ; dosagem de carvão: 1 g L ⁻¹)	89
Figura 37 -Análise Termogravimétrica do AC antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	91
Figura 38- Análise Termogravimétrica do AC.O ₃ antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	91
Figura 39 - Análise Termogravimétrica do AC.O ₃ -H ₂ O antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	92
Figura 40 -Análise Termogravimétrica do AC.O ₃ -NaOH antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	92
Figura 41 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.BSA durante a análise termogravimétrica.	94
Figura 42 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ .BSA durante a análise termogravimétrica.	95
Figura 43 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -H ₂ O.BSA durante a análise termogravimétrica.	95
Figura 44 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -NaOH.BSA durante a análise termogravimétrica.	96
Figura 45 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier dos carvões após a reação de fotoinserção em presença de albumina.	97
Figura 46 - Espectros de XPS de carbono das amostras (a) AC.O ₃ e (b) AC.O ₃ .BSA.....	101
Figura 47 - Espectros de XPS de oxigênio das amostras (a) AC.O ₃ e (b) AC.O ₃ .BSA.....	102
Figura 48 -Espectros de XPS para o nitrogênio nas amostras AC.O ₃ e AC.O ₃ .BSA.....	103

Figura 49 – Espectro de MALDI-TOF de BSA*	105
Figura 50 - Espectro de MALDI-TOF de AC.O ₃ -BSA	106
Figura 51 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier dos carvões após a reação de fotoinserção de tirosina.	109
Figura 52 - Análise Termogravimétrica do AC antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	109
Figura 53 - Análise Termogravimétrica do AC.O ₃ antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	110
Figura 54 - Análise Termogravimétrica do AC.O ₃ -H ₂ O antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	110
Figura 55 - Análise Termogravimétrica do AC.O ₃ -NaOH antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N ₂	111
Figura 56 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.T durante a análise termogravimétrica.	113
Figura 57 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ .T durante a análise termogravimétrica	114
Figura 58 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -H ₂ O.T durante a análise termogravimétrica.	114
Figura 59 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O ₃ -NaOH.T durante a análise termogravimétrica.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos aminoácidos da albumina do soro bovino (BSA)	39
Tabela 2 – Perda de massa em diferentes intervalos de temperatura	70
Tabela 3–Análise elementar dos carvões.....	76
Tabela 4 - Área superficial específica calculada por isoterma de BET com a adsorção-desorção de N ₂	77
Tabela 5 - Concentração de carbono orgânico total liberada para a fase aquosa pela fotólise (UV-254 nm).....	82
Tabela 6– Perda de massa das amostras após a reação de fotólise na presença de albumina e respectivas atribuições	93
Tabela 7-Análise elementar da albumina, dos carvões ativado e carvões modificados, e seus respectivos após a reação de fotoinserção de albumina.	99
Tabela 8 - Bandas de energias do espectro XPS.....	101
Tabela 9 - Cálculos considerando a massa de BSA obtidos na análise elementar da mesma.	104
Tabela 10 - Composição do espectro XPS do carvão ativado ozonizado (AC.O ₃) e na presença de albumina de soro bovino (AC.O ₃ .BSA)	104
Tabela 11 - Análise elementar dos carvões ativado e modificados, e seus respectivos após a reação de fotoinserção de tirosina.	107
Tabela 12 – Perda de massa em diferentes intervalos de temperaturas	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
AC	Carvão Ativado
AC.BSA	Carvão ativado com albumina
AC.F	Carvão ativado fotolisado
AC.T	Carvão Ativado com tirosina
AC.O ₃	Carvão Ativado tratado com ozônio direto
AC.O ₃ .BSA	Carvão ativado tratado com ozônio direto e com albumina
AC. O ₃ .F	Carvão ativado tratado com ozônio direto fotolisado
AC. O ₃ .T	Carvão Ativado tratado com ozônio direto com tirosina
AC.O ₃ -H ₂ O	Carvão Ativado tratado com ozônio em meio úmido
AC.O ₃ -H ₂ O. BSA	Carvão ativado tratado com ozônio em meio úmido com albumina
AC.O ₃ -H ₂ O.F	Carvão ativado tratado com ozônio em meio úmido fotolisado
AC.O ₃ -H ₂ O.T	Carvão Ativado tratado com ozônio em meio úmido com tirosina
AC.O ₃ -NaOH	Carvão Ativado tratado com ozônio em meio básico

AC.O ₃ -NaOH BSA	Carvão ativado tratado com ozônio em meio básico e com albumina
AC.O ₃ -NaOH.F	Carvão ativado tratado com ozônio em meio básico fotolisado
AC.O ₃ -NaOH.T	Carvão Ativado tratado com ozônio em meio básico com tirosina
BSA	Albumina de Soro Bovino
BET	Brunauer-Emmentt-Teller
COT	Carbono Orgânico Total
CHNOS	Análise elementar dos elementos carbono, hidrôgênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre.
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
MALDI-TOF	Espectrometria de massa por tempo de voo com dessorção a laser
TGA	Análise termogravimétrica
TGA-FTIR	Análise termogravimétrica e análise de Infravermelho com transformada de Fourier dos gases
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
XPS	Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos Específicos	33
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1	Albumina	35
3.2	Imobilização de biomoléculas em materiais suportes	40
3.2.1	Técnicas de Imobilização	41
3.3	Fotoimobilização de biomoléculas	45
3.3.1	Suporte de Imobilização de Proteínas	47
3.4	Biossensores e microarranjos de proteínas	48
3.5	Uso do Carvão como suporte e estudo da funcionalização	52
3.5.1	Grupos ácidos da superfície de carvões ativados	54
3.6	Ozônio	56
3.7	Estado da Arte	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1	Modificações do carvão	61
4.2	Fotólise	62
4.2.1	Fotólise da Albumina	62
4.2.2	Fotólise na presença de AC, AC.O ₃ , AC.O ₃ -H ₂ O e AC.O ₃ -NaOH	63
4.3	Fotoinserção de albumina ou tirosina	63
4.4	Reações de Imobilização Física	63
4.5	Caracterização dos carvões	64
4.5.1	Análise Termogravimétrica das amostras sólidas	64
4.5.2	Análise Elementar das amostras sólidas-CHNOS	64

4.5.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	64
--	----

4.6 Métodos de Acompanhamento das reações 65

4.6.1 Fluorescência	65
4.6.2 Espectrofotometria UV-vis	65
4.6.3 Carbono orgânico total (COT)	65
4.6.4 Espectrometria de massa por tempo de voo com desorção a laser e ionização assistida por Matriz (MALDI-TOF MS)	65
4.6.5 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X (XPS)	66

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 67

5.1 Caracterização dos Carvões 68

5.1.1 Análise Termogravimétrica acoplado a um analisador de gases por Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (TGA/FTIR)	68
5.1.2 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos sólidos resultantes da oxidação do AC.	74
5.1.3 Análise Elementar dos sólidos antes e após os diferentes tratamentos com ozônio	75
5.1.4 Determinação da Área Superficial pelo Método BET	76

5.2 Caracterização dos carvões após fotólise 79

5.3 Estudos preliminares da Fotólise da Albumina 86

5.3.1 Reações de Imobilização Física da albumina (BSA) nos diferentes carvões	89
---	----

5.4 Fotoinserção da albumina 90

5.4.1 Análise Termogravimétrica acoplado a um analisador de gases por Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (TGA/FTIR)	90
5.4.2 Acompanhamento da Fotoinserção de Albumina por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – Análises dos carvões após as reações de fotoinserção	97
5.4.3 Análise elementar – CHNOS	98
5.4.4 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X (XPS)	100

5.4.5	Espectrometria de massa por tempo de voo com desorção a laser e ionização assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) de BSA e AC.O ₃ .BSA	105
5.5	Reações de Fotoinserção da tirosina (T) nos diferentes carvões	107
6	CONCLUSÕES	117
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1 INTRODUÇÃO

A albumina tem sido uma das proteínas mais estudadas devido a sua numerosa aplicação bioquímica, incluindo ELISA, imunotransferência e imunohistoquímica. Também se utiliza como nutriente em células e cultivo microbiano. Em digestões de restrições, a BSA é utilizada para estabilizar algumas enzimas durante a digestão de DNA e para evitar a adesão da enzima aos tubos de reação, pontas de pipetas e demais vidrarias. BSA também é usada comumente para determinar a quantidade de outras proteínas, mediante a comparação de uma quantidade desconhecida da proteína e quantidades conhecidas de BSA. Outros fatores que a tornam uma ótima proteína para ser estudada é à sua estabilidade e baixo custo.

A dificuldade em se recuperar a proteína do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e freqüente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização. A proteína imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à proteína livre, com a vantagem adicional de possibilitar a realização de um processo contínuo (Carvalho et al, 2006).

Embora a imobilização covalente ainda seja o método mais amplamente empregado na imobilização de biomoléculas, as condições adversas aplicadas durante a imobilização podem causar a desnaturação das proteínas. Isto tem motivado o desenvolvimento de novas estratégias para a imobilização covalente de biomoléculas em variadas superfícies (Naqvi et al, 2002). Dentre estas estratégias está a fotoimobilização a qual usa a parte aromática de alguns aminoácidos para captura de energia no comprimento de onda da região de UV e transfere esta energia para as pontes de dissulfeto das proteínas, que se tornam altamente reativas favorecendo a imobilização seletiva por estas pontes.

Um grande número de suportes tem sido usado para a imobilização de proteínas, esses devem ser inertes e possuir características desejadas de acordo com a aplicação da imobilização (Gékas, e Lopez-Leiva, 1985, Di Serio et al., 2003, Fitchorov, et al., 2010).

Os carvões ativados (AC) são conhecidos por serem excelentes adsorventes, por sua abundância natural, propriedades e textura variável e sua grande área superficial e sua biocompatibilidade (Xiao et al., 2014). A superfície do AC apresenta predominantemente estruturas aromáticas, apolares e hidrofóbicas, resultando em interações maiores com moléculas apolares ou fracamente polares, ademais, sua adsorção se dá por forças de van der Waals não específica.

A reatividade do carvão ativado está diretamente relacionado com suas propriedades químicas, e esta reatividade pode ser atribuída à presença de grupos carboxílicos, radicais livres de hidroquinona, quinonas e íons metálicos (Valdés et al., 2002).

O oxigênio em carbonos está presente em locais que são geralmente responsáveis por seu comportamento superficial em processos de adsorção e reações químicas, Isto ocorre pois o oxigênio modifica significativamente as propriedades de superfícies de átomos de carbono. Como resultado, a adsorção de oxigênio influencia sua capacidade, taxas e atividades catalíticas intrínsecas e extrínsecas (Gómez-Serrano, et al., 2001).

Os grupos com oxigênio são os mais estudados pois interferem na interação do carvão com outras espécies (Kim et al, 2005). Os óxidos da superfície do carvão criam sítios hidrofílicos sobre uma superfície hidrofóbica. Quanto maior a concentração dos óxidos, maior o caráter hidrofílico do AC, e este se dispersa bem na água. A dissociação dos grupos carboxílicos facilita ainda mais a dispersão, pois cria uma carga negativa na superfície (Bandosz, 2006).

Grupos oxigenados podem ser fixados sobre o carvão utilizando-se soluções oxidantes (ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e persulfato de amônio) ou gases (ar, oxigênio e ozônio).

A utilização de ozônio como gás oxidante tem se mostrado como o melhor método para inserção de grupos oxigenados, principalmente grupos carboxílicos (Bradley et al., 1995).

Existem poucos estudos na literatura que focam na utilização da luz ultravioleta para ligar um suporte de carvão ativado a uma proteína. Este trabalho visa modificar o carvão ativado por oxidação do mesmo com ozônio em diferentes atmosferas (O_3 , O_3 em meio úmido e O_3 em meio básico) de

modo a obter melhor oxidação da superfície do AC, gerando maior número de sítios ativos a ligação com a albumina.

O estudo inclui a comparação e caracterizações dos carvões ativados e oxidados com ozônio, e a influência desta modificação frente à fotoinserção da albumina.

2 OBJETIVOS

Obter e caracterizar partículas de carvão ativado modificadas com O₃ e funcionalizadas com albumina e tirosina.

2.1 Objetivos Específicos

- Modificar a superfície de carvão ativado através de ozonização direta, em meio úmido e em meio básicos.
- Avaliar as diferentes metodologias de oxidação na formação de grupos superficiais oxigenados;
- Promover a fotoinserção de albumina de soro bovino em carvão ativado oxidado;
- Determinar as características físico-químicas de carvões ativados funcionalizados com albumina de soro bovino e tirosina

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Albumina

As proteínas são copolímeros de condensação que usam como monômeros 20 aminoácidos de ocorrência natural, são biomoléculas, de estrutura complexa e de alta massa molecular existentes em todos os organismos vivos.

Do mesmo modo que todas as moléculas poliméricas, as proteínas podem ser descritas em termos de níveis de organização, nesse caso, suas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária de uma proteína é a sequência de aminoácidos de suas cadeias peptídicas e seus resíduos estão ligados por ligações peptídicas.

O termo estrutura secundária se refere a qualquer segmento de uma cadeia polipeptídica e descreve o arranjo espacial de seus átomos na cadeia principal, sem considerar a posição das cadeias laterais ou sua relação com outros segmentos. Existem alguns tipos de estruturas secundárias que são particularmente estáveis e ocorrem extensamente em proteínas. As mais conhecidas são as hélices α e as conformações β ; outro tipo comum é a volta β . Quando um padrão regular não é observado, a estrutura secundária algumas vezes é chamada de indefinida ou espiral aleatória (Nelson e Cox, 2014).

Na hélice α o esqueleto polipeptídico é firmemente enrolado em torno de um eixo imaginário desenhado longitudinalmente no centro da hélice, e os grupos dos resíduos de aminoácidos se projetam para fora do esqueleto helicoidal. A estrutura é estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio eletronegativo de uma ligação peptídica e o átomo de oxigênio eletronegativo de uma carbonila do quarto aminoácido no lado aminoterminal da ligação peptídica (Nelson e Cox, 2014).

A conformação β é a mais estendida das cadeias peptídicas, e sua estrutura é também definida pelos esqueletos dos átomos arranjados de acordo com grupo característicos de ângulos diedro. O esqueleto da cadeia peptídica está estendido em forma de zigue-zague, em vez de estrutura helicoidal. O arranjo de vários segmentos lado a lado, os quais estão na conformação β ,

é chamado de folha β . Esta estrutura em zigue-zague dá origem a uma aparência pregueada da folha em geral. As ligações de hidrogênio são formadas entre os segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica, dentro da folha (Voet, et al., 2008)

As voltas β são particularmente comuns e conectam as extremidades de dois segmentos adjacentes de uma folha β antiparalela. A estrutura é uma volta de 180° que envolve quatro resíduos de aminoácidos, com o oxigênio carbonílico do primeiro resíduo formando uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do grupo amino do quarto resíduo (Nelso e Cox, 2014).

O arranjo tridimensional total de todos os átomos de uma proteína é chamado de estrutura terciária. Enquanto o termo “estrutura secundária” se refere ao arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos adjacentes em um segmento polipeptídico, a estrutura terciária inclui aspectos de alcance mais longo da sequência de aminoácidos. Aminoácidos que estão bem distantes na sequência polipeptídica e em diferentes tipos de estruturas secundárias podem interagir na estrutura da proteína completamente dobrada.

Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas distintas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. O arranjo destas subunidades proteicas em complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária.

As proteínas podem ser classificadas também de acordo com a sua forma tridimensional em: *fibrosa* (insolúvel, como por exemplo, o colágeno e a queratina), as quais são formadas por cadeias de polipeptídios organizados “lado a lado” em longos filamentos; e *globulares* (solúveis, são exemplos a hemoglobina e a insulina), que tem estrutura compacta e esférica. São importantes, entre as forças que estabilizam a estrutura terciária das proteínas, as interações hidrofóbicas, que repelem água das cadeias laterais hidrocarbonicas dos aminoácidos neutros, as pontes de dissulfetos e as forças por atração iônica entre os sítios positivos e negativos das várias cadeias laterais de aminoácidos do interior da proteína contribuem para complementar a estrutura terciária.

Peter (1985) relatou que a estrutura secundária da BSA é composta por 50-55% α -hélice, 15-18% β folhas e 27-35% de enrolamento aleatório, esta molécula possui massa molecular de

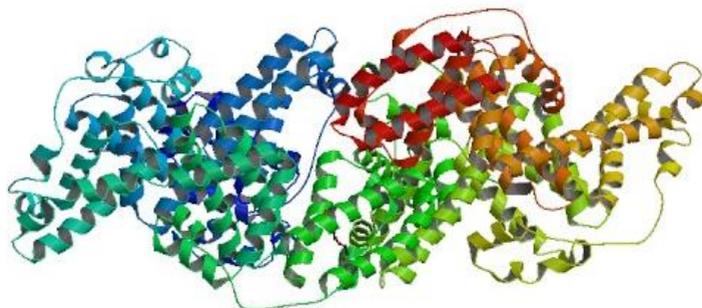
66 kD, composta de 583 resíduos, possui 17 pontes de dissulfeto capazes de estabilizar a molécula (Nakamura et. al., 1997).

A albumina tem sido uma das proteínas mais estudadas devido a sua numerosa aplicação bioquímica, estabilização de outras proteínas, solubilização de lipídios, aplicações em ELISA, imunotransferência e imunohistoquímica. BSA é a proteína de referência universal para quantificação de proteína total (Furlán e Campderrós, 2015). Outros fatores que a tornam uma ótima proteína para ser estudada é à sua estabilidade e baixo custo.

Esta proteína foi reconhecida como principal componente do sangue antes de 1839. As pesquisas anteriores referem-se à proteína como *albúmen* derivado do latim *albus* após a aparição da cor branca nos precipitados floculentos produzidos por várias proteínas. A albumina é a proteína mais abundante no sistema circulatório com concentração sanguínea típica de 5g/100mL contribuindo com 80 % da pressão osmótica sanguínea, além disso, é também a responsável pela manutenção do pH sanguíneo (Figge *et al.*, 1991).

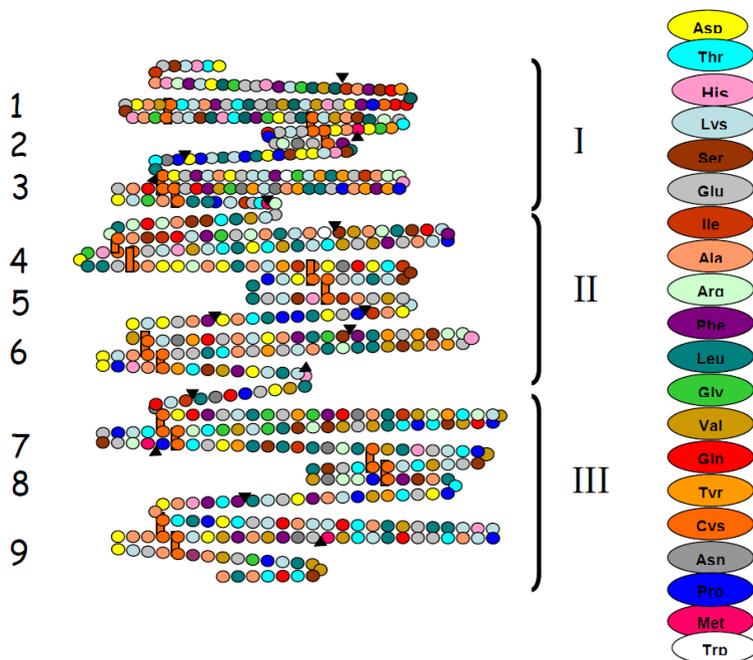
Esta proteína funciona como uma transportadora ligando-se a uma variedade de moléculas endógenas e exógenas. A BSA é também utilizada frequentemente no bloqueio da superfície, tal como nos ensaios de ELISA, ou biochips (Wright, 2002). É sintetizada no fígado tendo meia vida de 21 dias. Ácidos graxos, hematita, bilirrubina, cisteína, cobre, níquel, mercúrio, prata, ouro, são algumas das muitas moléculas que se ligam com a albumina (Cartér, 1994).

Figura 1 - Estrutura da albumina bovina – BSA



Pela Figura 2 observa-se a sequência de aminoácidos e das pontes dissulfetos para albumina bovina. Nota-se também a presença de 9 alças organizadas nos 3 domínios, semi-autônomos, mas homólogos. Este esquema foi proposto com base no alinhamento vertical das sequências Cys-Cys que ocorrem nas alças duplas. Os triângulos pretos mostrados na Figura 2 representam os sítios de clivagem específica para produzir os respectivos fragmentos. A albumina é constituída de uma única cadeia polipeptídica e, portanto, não é composta por subunidades (Peter, 1985).

Figura 2 - Sequência de aminoácidos e de pontes dissulfetos para albumina bovina (Adaptado de Peter, 1985).



Os mamíferos em geral possuem baixa quantidade de metionina e triptofano, e por outro lado alta quantidade de cisteína e ácidos aspártico e glutâmico. A albumina humana é muito semelhante à bovina, sendo diferenciadas principalmente pela quantidade de triptofanos, BSA apresenta dois (Trp 134 e

Trp 212) e HSA apenas um (Trp 214). Comparativamente existe uma sequência homóloga de 76% entre as albuminas bovina e humana.

Tabela 1 - Composição dos aminoácidos da albumina do soro bovino (BSA)

Aminoácidos	BSA	Aminoácidos	BSA
Ácido aspártico	41	Cisteína	35
Aspargina	13	Metionina	4
Treonina	34	Isoleucina	14
Serina	28	Leucina	61
Ácido glutâmico	59	Tirosina	19
Grutamina	20	Fenilalanina	27
Prolina	28	Lisina	59
Glicina	16	Histidina	17
Alanina	46	Triptofano	2
Valina	36	Arginina	23

Os resíduos de aminoácidos principais responsáveis pela fluorescência intrínseca das proteínas são triptofano, tirosina e fenilalanina (Simonelli e Arancibia, 2015). Estes resíduos têm de absorção e emissão de comprimentos de onda distintos e diferem nos rendimentos quânticos. O triptofano é muito mais fluorescente do que tirosina ou fenilalanina. A tirosina pode ser excitada em comprimentos de onda semelhantes à do triptofano, mas emite a um comprimento de onda distintamente diferente. Apesar da tirosina ser menos fluorescente que o triptofano, esta fornece um sinal importante, pois está presente em grande número de proteínas. A fenilalanina é muito fracamente fluorescente e apenas pode ser observada na ausência de ambos triptofano e tirosina (Held, 2003).

A albumina quando em solução apresenta uma estrutura terciária em forma de elipse, com dimensão de aproximadamente de 41 Å x 141 Å, seu interior é também constituído por moléculas de águas além das cadeias pépticas. (Rondeau e Bourdon, 2011).

Dentre as diversas propriedades da albumina, uma das mais importantes seja a sua capacidade de ligar-se reversivelmente a uma série de moléculas e íons. A BSA é também grande transportadora de ácidos graxos, insolúveis no plasma sanguíneo. Possui ainda a capacidade de sequestrar radicais livres de oxigênio e inativar vários metabólitos lipofílicos tóxicos como a bilirrubina. Sua afinidade com ácidos graxos, hematita, bilirrubina e por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados, torna esta proteína muito útil nos estudos de biotecnologia, quando suportada em uma base de carbono pode ser direcionada a um sítio específico de atuação (Swain; Sarkar, 2013).

3.2 Imobilização de biomoléculas em materiais suportes

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e freqüente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização. A enzima imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à enzima livre, com a vantagem adicional de possibilitar a realização de um processo contínuo (Carvalho et al, 2006).

Biomoléculas podem ser imobilizadas em diferentes materiais, estes suportes podem ser monocamadas auto-organizadas (Solanki et al., 2008), carvões (Zhou et al, 2013), bicamadas lipídicas (Murgida e Hildebrandt, 2005), matrizes poliméricas (Fritzen-Garcia et al., 2009).

Conjugados biomoléculas-suporte possuem ampla aplicações nas áreas biomédicas e biotecnológicas (Garcia, 2010). As proteínas podem ser imobilizadas em suporte por meio de duas metodologias principais: químico e físico (Romaškevič et al., 2006).

O método químico se baseia na imobilização das biomoléculas no suporte por meio de ligações covalentes e covalentes cruzada. A imobilização física está alicerçada em interações fracas como as forças de van der Waals, entre a proteína e o suporte (Trevizam et al., 2010).

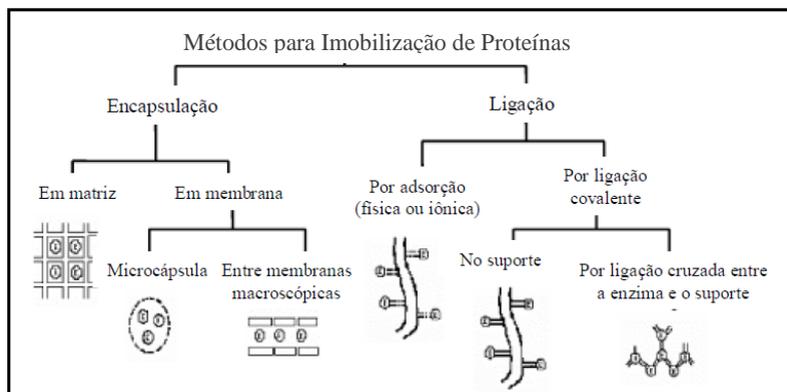
Tanto os métodos físicos quanto os químicos de imobilização oferecem alguns prós e contras. Na imobilização química ocorre

a maior perda de sítios ativos, porém as ligações covalentes formadas são fortes e estáveis entre biomolécula e suporte. Já os métodos físicos se baseiam em ligações fracas podendo ocorrer dessorção da proteína do suporte, porém esta interação pode ocorrer sem modificar a estrutura da proteína. (Duran et al., 2002).

3.2.1 Técnicas de Imobilização

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes são baseadas em mecanismos físicos e químicos (Girelli e Mattei, 2006). Os principais processos de imobilização podem ser promovidos através da encapsulação ou ligação (Dalla-Vecchia et al., 2004; Vitolo, 2001) conforme demonstra a Figura 3:

Figura 3 - Principais métodos para imobilização de proteínas. Fonte: Dalla-Vecchia et al. 2004



A imobilização por encapsulação pode ser feita de duas formas, por separação por membranas e por entrelaçamento em polímero ou matriz.

Na separação por membranas a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável, e que por sua vez pode ser subdividida em: encapsulamento, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não-rígidas, cujo envoltório é constituído

por um polímero geleiforme e semipermeável; ou em membranas fibrosas semipermeáveis, que consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semipermeável. A separação por membranas acarreta em limitações difusivas intensas.

Na imobilização por entrelaçamento em polímero ou matriz – neste caso, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do entrelaçamento a permeabilidade do gel a sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do monômero utilizado.

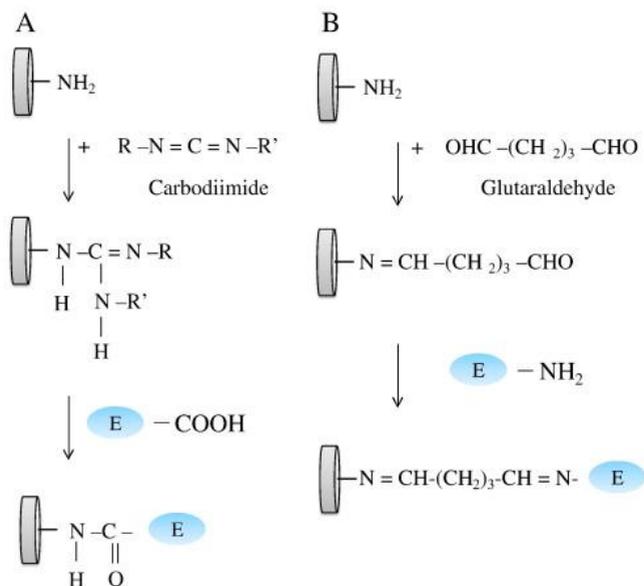
Na imobilização por ligação química, a adsorção e a ligação covalente são as principais formas de fixação de proteínas. A imobilização por adsorção consiste na adsorção que ocorre por meio de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der Waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da proteína, se comparado aos outros tipos de imobilização e por isso, geralmente não promove perda de suas propriedades.

A adsorção depende do pH da solução, obtendo-se valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada (Sheldon, 2007). A adsorção de proteínas em superfícies pode induzir algumas alterações conformacionais na molécula da proteína, devido a interações entre a proteína e o suporte. Suportes hidrofóbicos conseguem adsorver maiores quantidades de proteínas e a densidade da camada de adsorção também pode ser maior, relativamente aos suportes hidrofílicos. Estes resultados indicam que as interações entre a enzima e o suporte são bastante fortes nos suportes hidrofílicos, o que pode causar, em alguns casos, maiores alterações conformacionais na proteína. Quando se utiliza suportes menos hidrofílicos, a retenção das propriedades aumenta, mas a quantidade de proteína adsorvida diminui e as interações entre a proteína e o suporte serão menores. Este tipo de imobilização pode também ser considerado como uma etapa de purificação parcial da proteína, uma vez que esta pode ser seletivamente adsorvida sobre o suporte (Sheldon, 2007).

Na imobilização por ligação covalente a proteína é ligada ao suporte mediante ligações químicas covalentes ou através de ligações cruzadas, que são normalmente estabelecidas entre os grupamentos amino primários ou o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima, com os grupos reativos do suporte. Como as interações entre a enzima e o suporte são fortes, pode ocorrer perda da atividade causada por modificações na estrutura do sítio ativo (Foresti e Ferreira, 2007).

Dentre os agentes convencionais de imobilização covalente, as carbodiimidas e o glutaraldeído são os mais amplamente estudados. As carbodiimidas permitem a ligação entre os grupos amino do suporte e a função carboxila de enzima. A imobilização de enzimas também pode ser conseguida usando glutaraldeído como agente de ativação. A primeira reação com formação da base de Schiff ocorre entre um dos grupos aldeído do glutaraldeído e uma função amina do suporte. Em seguida, o segundo grupo aldeído de glutaraldeído reage com uma função amina da enzima (Sassolas et al, 2012).

Figura 4 - Imobilização da enzima sobre uma superfície aminada por (A) carbodiimida ou (B) glutaraldeído (Sassolas et al, 2012).



A imobilização covalente pode ocorrer por meio de ligações multipontuais envolvendo múltiplos locais na superfície da enzima. Em pH 7, o único grupo reativo na superfície da enzima é o terminal amino, uma vez que outros grupos amino são ionizados e não reagem com o suporte (Poppe et al, 2013). Estes resíduos de aminoácidos estão presentes na maioria das proteínas, são geralmente colocados sobre a superfície da proteína e são muito reativos com a maioria dos grupos reativos inseridos nos suportes (aldeídos, epóxi, brometo cianogênicos, tosil, etc.), sem necessidade de qualquer tipo de ativação prévia. À primeira vista, é possível distinguir, pelo menos, dois tipos de grupos amina em proteínas expostas ao meio. As mais abundantes são a porção ϵ -amina dos resíduos de lisina (Lys). Uma Lys externa e exposta deve apresentar um pKa próximo do aminoácido livre, cerca de 10,5-10,7. Embora alguns resíduos de Lys podem ter o seu pKa diferente do grupo amina de referência, mas isso deve ocorrer principalmente quando o Lys está situado em cavidades internas com micro-ambientes alterados e por consequência disto podem não participam na reação com a superfície do suporte. Desta forma, os obstáculos estéricos impedem a reação entre o suporte e estes grupos internos. Outro grupo amino com valor de pKa alterado é o grupo amino localizado na porção terminal da proteína, com um pKa em torno de 7-8 (Mateo et al, 2005).

Embora a imobilização covalente ainda seja o método mais amplamente empregado na imobilização de biomoléculas, as condições adversas aplicadas durante a imobilização podem causar a desnaturação das proteínas. Isto tem motivado o desenvolvimento de novas estratégias para a imobilização covalente de biomoléculas em variadas superfícies (Naqvi et al, 2002). Dentre estas estratégias está a fotoimobilização a qual usa a parte aromática de alguns aminoácidos para captura de energia no comprimento de onda da região de UV e transfere esta energia para as pontes de dissulfeto das proteínas, que se tornam altamente reativas favorecendo a imobilização seletiva por estas pontes.

3.3 Fotoimobilização de biomoléculas

Os aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano presentes em proteínas funcionam como captadores nanométricos de luz UV (de ~250-298nm). Uma vez excitados por luz ultravioleta podem ser desencadeadas reações fotoquímicas que têm efeitos nocivos sobre estruturas de proteínas. A excitação dos grupamentos aromáticos pela luz UV provoca a ejeção de elétrons de suas cadeias laterais. No entanto, as pontes de dissulfeto nas proteínas são excelentes supressores do estado excitado dos resíduos aromáticos, contribuindo deste modo para a estabilidade da proteína. Estes elétrons podem ser capturados por meio de pontes de dissulfeto, levando à formação de um aduto de elétrons transiente de radicais dissulfeto, os quais irão se dissociar conduzindo à formação de radicais tiol livres na proteína (Neves-Petersen et al, 2012).

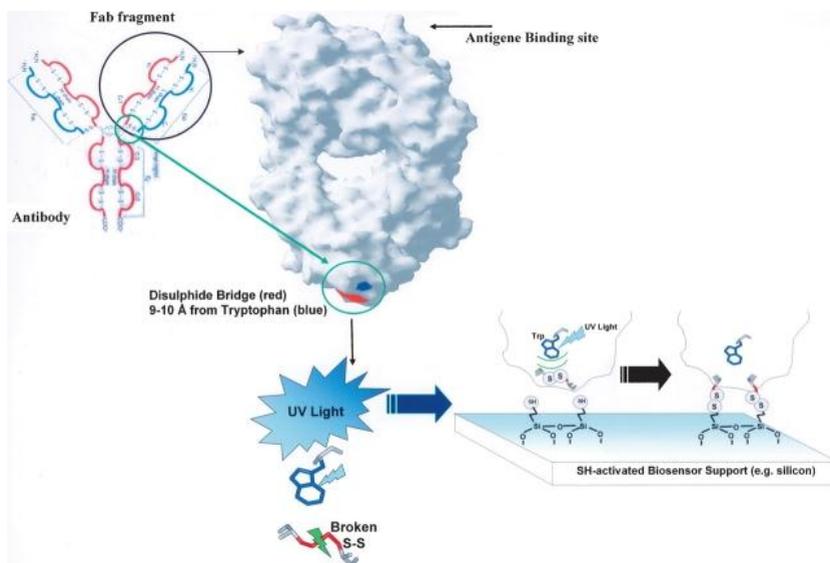
Com a observação destes fatores, a imobilização molecular por fotoimobilização é uma alternativa usada para funcionalizar superfícies com biomoléculas. Esta tecnologia está sendo utilizada, a fim de criar uma nova geração de biossensores com densidade insuperável (Neves-Petersen et al, 2012).

A fotoimobilização sobre uma superfície sólida oferece vantagens únicas em relação aos outros métodos, dentre os quais se pode citar que (i) qualquer biomolécula independentemente do seu grupo funcional pode ser imobilizada por um método fotoquímico, (ii) que é um método não-invasivo e não há necessidade de quaisquer condições de reação severas, e (iii) a micromodelagem pode ser efetuada facilmente por técnica de microarranjo, controlando a exposição à luz (Kumar e Nahar, 2007).

Este método permite o conhecimento preciso do ponto de ligação das proteínas à superfície enquanto preserva as propriedades estruturais e funcionais da proteína nativa imobilizada, evitando o uso de um ou mais passos químicos/térmicos de imobilização. A imobilização utilizando esta tecnologia tem sido aplicada a muitas famílias de proteínas, tais como hidrolases, oxidoredutases, transferases, liases, complexo principal de histocompatibilidade classe I e proteínas receptoras de membrana, e está presente em todos os membros da família das imunoglobulinas (Neves-Petersen et al, 2006, Putzbach e

Ronkainen, 2013). O grupo suportes mais amplamente utilizados ainda são os siliconados, que permitem ser precipitados de forma polimérica, porém ainda deixando livre um grupo reativo que facilita a captura e imobilização das enzimas.

Figura 5 - Imobilização induzida por luz UV ilustrada com um fragmento Fab de imunoglobulina em uma superfície derivatizada com tiol. A ponte de dissulfeto (vermelho) localizado perto do resíduo de triptofano (azul) (aminoácido aromático) está localizado afastado do sítio de ligação com o antígeno (Neves-Petersen et al, 2006).

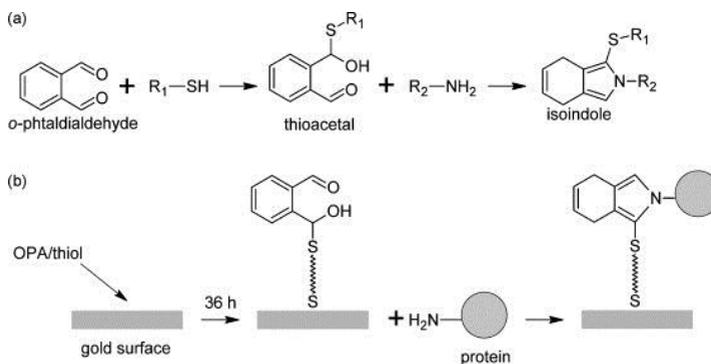


O fato da iluminação UV ser capaz de quebrar a ponte dissulfeto torna o grupamento tiol da proteína reativa aos grupos tiol de outras moléculas ou agentes oxidantes presentes na reação. Se for deixada sozinha, a proteína reforma sua ponte dissulfeto interna, mas se forem expostos a grupos tiol em superfícies ou outras proteínas pode introduzir um novo estado imobilizado (Petersen et al, 2006).

A afinidade de grupamentos tiol orgânicos por metais e superfícies contendo sulfetos metálicos é bastante conhecida sendo bastante discutida na literatura (Bain et al, 1989; Li et al, 2005;). Alcanotióis de cadeia longa, $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$ adsorvem sobre

superfícies de metais como o ouro de forma ordenada, formando filmes orientados em monocamada (Bain et al, 1989). Da mesma forma, os grupamentos tiol da cisteína presente nos resíduos de aminoácidos das proteínas possuem elevada afinidade com nanopartículas de ouro (Andreescu e Luck, 2008).

Figura 6 - (a) A reação entre o-ftaldialdeído (OPA) e tiol com formação de hemitioacetal. A reação do hemitioacetal com amina primária resulta na formação do complexo entre o isoindol fluorescente. R_1 -SH representa uma molécula de tiol; R_2 -NH₂ uma amina primária. (b) Representação esquemática do processo utilizado para a imobilização de proteínas utilizando a reação descrita no item (a) (Kyprianou et al, 2010).



3.3.1 Suporte de Imobilização de Proteínas

Uma variedade de suportes tem sido usado para a imobilização de proteínas, esses devem ser inertes e possuir características desejadas de acordo com a aplicação da imobilização (Gékas, e Lopez-Leiva, 1985, Di Serio *et al.*, 2003, Fitchorov, *et al.*, 2010).

Para a seleção do suporte devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de recuperação do material. Dentre as características de um suporte, as listadas abaixo devem ser observadas (Mendes *et al.*, 2011):

- Área superficial;
- Permeabilidade;

- Insolubilidade, capacidade de regeneração;
- Morfologia e composição;
- Natureza hidrofílica ou hidrofóbica;
- Resistência ao ataque microbiano;
- Resistência mecânica;
- Custo.
- Inércia

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, porosos, não porosos e de estrutura de gel (Dalla-Vecchia, 2004, Jegannathan, 2008, Cardoso, 2009, Mateo, 2007, Freitas, 2007).

Os porosos são caracterizados por uma grande área superficial interna disponível para a imobilização, porém a maior parte dessa área está em difícil acesso. O diâmetro dos poros deve ser grande o suficiente para permitir a ligação da biomolécula com o suporte (Dalla-Vechia, 2004). Já os materiais não-porosos apresentam baixa área superficial e menor resistência de massa interna. (Mendes et al., 2011).

3.4 Biossensores e microarranjos de proteínas

Embora a bioeletrônica seja um campo relativamente maduro, esta continua a ser uma área de pesquisa muito ativa. O reconhecimento de um evento biológico, tal como uma reação de ligação anticorpo-antígeno, a conversão de um substrato por uma enzima ou uma reação de transferência de elétrons de uma proteína redox utilizando métodos eletroquímicos tem levado ao desenvolvimento de novos sensores ou ainda mais a compreensão dos processos redox de proteína (Murphy, 2006).

Uma abordagem promissora para a compreensão das interações biomoleculares é o desenvolvimento de biossensores. Estes biossensores estão encontrando crescente aplicação na área de biotecnologia, física, química, medicina, aeronáutica, oceanografia, controle ambiental e aplicações em produtos alimentícios (Morris e Sadana, 2005).

Até pouco tempo atrás, a maioria dos biossensores eram baseados em uma ou mais enzimas utilizadas em conjunto com um eletrodo. A reação enzimática pode ser detectada eletroquimicamente através da medição da perda ou de

formação de um substrato ou de produtos, com o uso de uma espécie mediadora que transporta elétrons entre a enzima e o eletrodo. A transferência direta de elétrons pode ser difícil de alcançar, uma vez que o centro de redox de uma enzima é normalmente escondido no interior desta. Uma abordagem próxima do local de redox para o eletrodo é muitas vezes impossível sem a aplicação de uma grande sobretensão, o que pode levar ao envenenamento da superfície do eletrodo e a desnaturação da enzima. Os avanços na obtenção de transferência eletrônica direta foram feitas pela modificação de uma superfície de enzima ou eletrodo com um mediador (Murphy, 2006).

Os imunossensores capacitivos são aplicados principalmente em áreas em que são necessárias a alta sensibilidade e a alta seletividade, determinando pequenas mudanças de capacitância interfacial por causa da interação entre um anticorpo e um antígeno. Tal como para a construção de um imunossensor baseado em um transdutor capacitivo, o primeiro e provavelmente o mais importante passo é a imobilização de elementos de reconhecimento de proporcionar os sítios de interação anticorpo-antígeno (Li et al, 2005).

O estudo do genoma ao nível da proteína tornou-se o núcleo de várias áreas de pesquisa, e é o próximo passo na compreensão da função do gene. Existem muitas proteínas que, quando se considera as suas relações complexas dentro de qualquer um organismo, torna-se inevitável uma abordagem sistemática criteriosa para a análise da proteína. Os microarranjos proteicos estão ganhando popularidade, e são capazes de medir a abundância de proteínas de uma forma de alto rendimento, que é semelhante aos microarranjos de DNA. (Purdue, 2013). A fenotipagem por microarranjo é a terceira maior tecnologia utilizada na era da pesquisa genômica e desenvolvimento de medicamentos, ao lado do sequenciamento de DNA e tecnologia proteômica. Da mesma forma que para os outros dois tipos de ensaios citados, há a possibilidade de análise de milhares genes ou proteínas de uma vez, a fenotipagem por microarranjo torna possível avaliar quantitativamente milhares de fenótipos celulares de uma só vez (Bioscan, 2014).

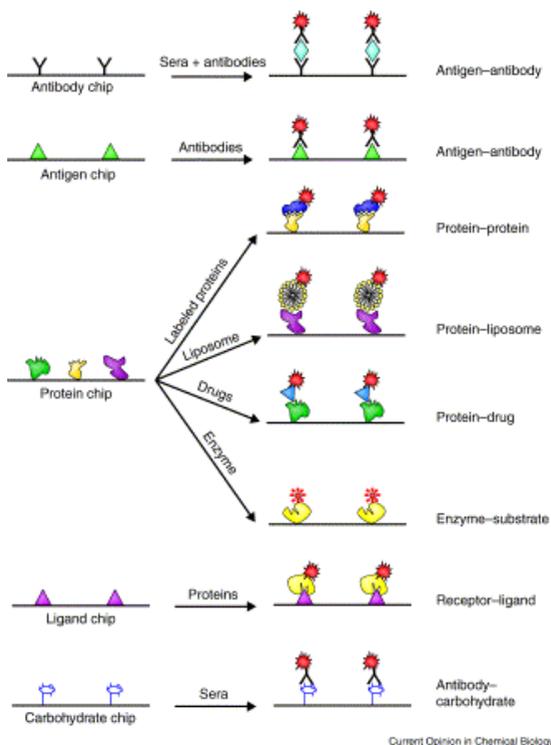
Em contraste com os ácidos nucleicos, os anticorpos e proteínas em geral são química e estruturalmente muito mais

complexos, heterogêneos, e muitas vezes imprevisíveis em relação aos seus perfis de interação. Portanto, é difícil de definir estratégias de detecção de proteínas e de imobilização gerais que não discriminam entre proteínas. Uma das principais diferenças entre DNA e microarranjos de proteínas é o fato de que as concentrações de proteína numa única amostra biológica variam muito mais (Pavlickova et al, 2004; Purdue, 2013).

Os microarranjos analíticos envolvem uma matriz de alta densidade de reagentes de afinidade (por exemplo, anticorpos ou antígenos) que são utilizados para a detecção de proteínas em uma mistura complexa. Chips de proteína funcionais são construídos por meio da imobilização de grandes quantidades de proteínas purificadas em uma superfície sólida. Ao contrário dos chips de anticorpo-antígeno, os chips de proteína têm um enorme potencial no ensaio para uma vasta gama de atividades bioquímicas (por exemplo, as interações proteína-proteína, proteína-lipídeo, proteína-ácido nucleico, e enzima-substrato), bem como medicamentos e identificação de drogas específicas. Pequenas moléculas de hidrato de carbono e microarranjos de outros tipos têm sido úteis no estudo das atividades de proteína de ligação a ligantes e os hidratos de carbono (Zhu e Snyder, 2003).

O processo para a identificação de antígenos que reagem com os anticorpos do soro é simples; investigar a matriz com soro, lavar, e realizar o teste para anticorpo secundário (humano) (Schweitzer et al, 2003). Os antígenos microbianos, por exemplo, podem ser usados para a detecção de IgG e IgM humanos dirigidos para estes antígenos no soro (por exemplo os antígenos de parasitas e virais, incluindo *Toxoplasma Gondii*, o citomegalovírus (CMV), vírus da rubéola, e o vírus *Herpes Simplex* (HSV) tipos 1 e 2) com um bom acordo com os ensaios de ELISA convencional (Mezzasoma et al, 2002).

Figura 7 - Aplicações de microarranjos da proteína. Existem dois tipos gerais de microarranjo da proteína: microarranjos proteicos analíticos e funcionais (Zhu e Snyder, 2003).



Um problema está relacionado à propensão das proteínas desnaturarem muitas vezes nas interfaces líquido-sólido e líquido-ar, aumentando ainda mais a possibilidade de desnaturação. Além disso, a química de superfície por si só podem desnaturar as proteínas ou resultar na perda de atividade (Mitchell, 2002).

Outro problema está relacionado à imunomarcagem não específica em ensaios de microarranjo. Para reduzir este efeito são usados agentes de bloqueio. Estes reagentes impedem a não especificidade de ligações causadas pela atração eletrostática ou por reação com grupos químicos presentes nos suportes. Alguns exemplos de agentes de bloqueio são albumina de soro de bovino (BSA), a ovalbumina e o soro fetal bovino. A

BSA é o reagente mais vulgarmente utilizado e é também barato e confiável, e, por conseguinte, frequentemente usado em estudos de imunomarcção específica. (Brorson, 1997).

Sob iluminação UV, a BSA adsorvida em suportes seleciona proteínas de interesse para posterior imobilização como um agente de ligação cruzada, bem como, inibe a ligação não específica de proteína. O mecanismo de fotorreação proposto consiste na clivagem das ligações dissulfeto da BSA sob iluminação de luz UV induzindo a formação de radicais tiol. A seguir, estes radicais reagem com o grupo amino da cadeia lateral de ácido ou peptídeo do analito (Kim et al., 2012).

3.5 Uso do Carvão como suporte e estudo da funcionalização

Os carvões são compostos hidrofóbicos, com baixa reatividade, pouco solúveis em água em qualquer faixa de pH. Além disso, estes materiais podem ser incorporados para uma rápida transferência de elétrons e sensibilidades melhoradas. No entanto, estes materiais têm uma deficiência restringe a sua utilização em biossensores; a superfície dos nanomateriais de carbono é composta por elementos hidrofóbicos, sendo que o biossensor deve funcionar num ambiente hidrófilo. A baixa afinidade interfacial entre a superfície de nanomateriais de carbono hidrofóbicos e hidrofílicos resultados do biomaterial em baixa sensibilidade devido à reduzida transferência de elétrons (Kim et al, 2014).

No processo de ativação, o carvão é submetido a tratamento térmico seletivo, sob condições apropriadas, que resulta na formação de inúmeros poros, fissuras e rachaduras. A ativação pode ser química ou física. Na ativação química a matéria prima é tratada com o agente ativante inorgânico (ex: $ZnCl_2$ ou H_3PO_4) e posteriormente carbonizada (Smísek e Cerný, 1970). Na ativação física o carvão é tratado com gases oxidantes (vapor d'água, CO_2 ou O_2) a elevada temperaturas (750-950 °C).

Todos os carvões ativados possuem não só carbono, mas também pequenas quantidades de oxigênio e de hidrogênio quimicamente ligado, sob a forma de vários grupos funcionais que normalmente dá caráter ácido ao carbono sólido, além de matérias minerais, que são geralmente indicadas como cinzas ou resíduos após ignição. As cinzas (inorgânico) têm efeitos

catalíticos durante a carbonização, ativação e processos de adsorção. O teor de cinzas, sua composição, a natureza química da superfície e do pH do carbono são as propriedades químicas mais importantes de carvão ativado. A presença de H, O, e outros átomos de carbono ativado tem efeitos importantes sobre a adsorção (Mohammad-Khah e Ansari, 2009).

Além da estrutura física e porosa, a capacidade de adsorção de um dado carvão ativado é influenciada fortemente pela natureza química da superfície (Nevskaia, et al., 1999). A química da superfície dos carvões determina seu conteúdo de umidade, propriedades catalíticas e caráter ácido-base (Salame e Bandoz, 1999) e é governada pela quantidade de cinzas e heteroátomos incorporados na matriz carbônica. Os átomos mais importantes são: oxigênio, nitrogênio, fósforo e hidrogênio. Eles são responsáveis pela presença de vários grupos funcionais ácidos ou básicos, análogos aos compostos orgânicos (Bandoz, 1999). Devido a esses grupos funcionais os carvões têm um caráter ácido-base (Aygün, et al., 2003).

Os grupos funcionais na superfície de carvões microporosos estão sujeitos a uma grande variedade de interações inter e intramoleculares, incluindo indutivo, mesomérico, tautomérica, estérica e de ligação de hidrogênio. Estas interações podem alterar fortemente as suas características de ácido-base de Brønsted, de tal maneira que, na maioria dos casos, eles podem não se assemelhar aos de compostos químicos contendo os mesmos grupos. Como resultado, uma distribuição contínua de propriedades químicas de superfície (acidez, basicidade) está prevista para cada tipo de grupo de superfície (ácidos carboxílicos, fenóis, etc) e, na maioria dos casos, os domínios de pK partilhados por vários grupos quimicamente diferentes podem sobrepor-se. A heterogeneidade na química de superfície torna difícil qualquer tentativa de delinear as funcionalidades de superfície em carbonos de acordo apenas com suas propriedades ácido-base (Contescu et al., 1996).

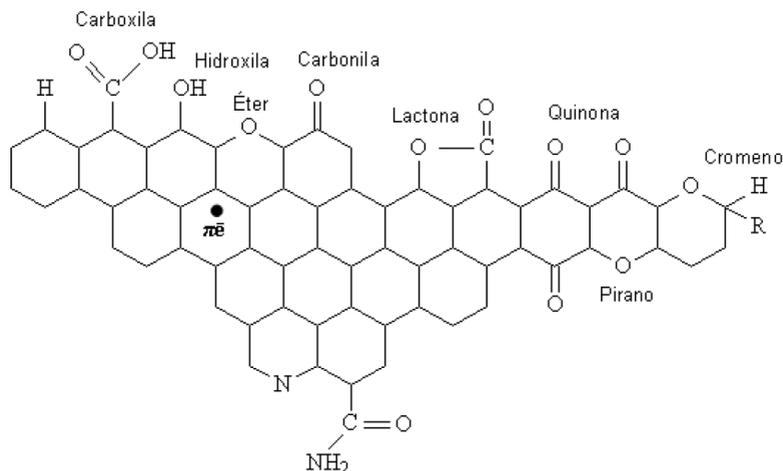
Técnicas de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) são frequentemente utilizadas para analisar o nível de oxidação e os grupos funcionais introduzidos na superfície de carvões tratados com ozônio (Sutherland, 1996).

3.5.1 Grupos ácidos da superfície de carvões ativados

Os grupos com oxigênio são os mais estudados pois eles interferem na interação do carvão com outras espécies (Kim et al, 2005). Os óxidos da superfície do carvão criam sítios hidrofílicos sobre uma superfície hidrofóbica. Quanto maior a concentração dos óxidos, maior o caráter hidrofílico do AC, e este se dispersa bem na água. A dissociação dos grupos carboxílicos facilita ainda mais a dispersão, pois cria uma carga negativa na superfície (Bandosz, 2006).

O caráter ácido de um AC está comprovadamente relacionado ao conteúdo de oxigênio do mesmo. Quanto maior o conteúdo de oxigênio, mais ácida é a dispersão aquosa do AC. A presença de grupos ácidos na superfície do AC confere propriedades de trocadores catiônicos, enquanto que carvões ativados que apresentam baixo conteúdo de oxigênio têm propriedades básicas e são trocadores aniônicos (Boehm, 2002).

Figura 8 - Grupos funcionais que podem ser encontrados na superfície de um carvão ativado (Bandosz, 2006).



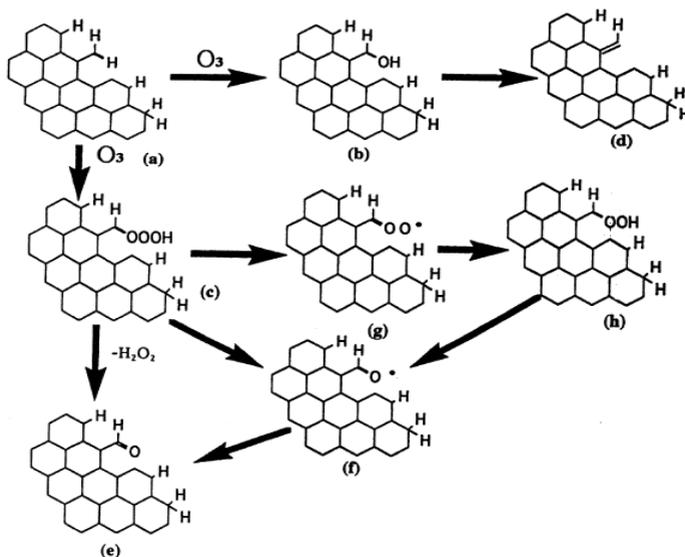
O pré-tratamento de carvão ativado aumenta sua área superficial e a concentração de grupos funcionais de superfície, o que, por sua vez, podem melhorar a capacidade de adsorção.

Dois mecanismos estão envolvidos na oxidação de carbono por ozônio: (I) o de oxidação direta de carbono elementar em CO_2 e (II) a oxidação de carbono elementar a intermediários que são solúveis em soluções alcalinas e são subsequentemente oxidados a CO_2 . Tem sido relatado que a oxidação em fase gasosa de ozônio ocorre na borda e parte frontal da estrutura de grafite e parte traseira, e, posteriormente, fura a superfície (Chiang et al., 2002).

Os carbonos vítreos são bastante inertes a oxidação, e, por conseguinte, só as substâncias fortemente oxidantes são capazes de introduzir grupos superficiais químicos sobre as superfícies desses materiais numa quantidade apreciável. Devido ao ozônio ser um oxidante muito forte (potencial de redução padrão, $E^0 = 2,076 \text{ V}$), tem sido utilizado com sucesso na modificação da superfície de carbono vítreo, que é um material carbonáceo quimicamente muito estável (López-Garzón et al., 2003).

A Figura 9 mostra a ativação do carvão com ozônio molecular.

Figura 9 - Caminhos de reação propostos para reação O_3 com carvão ativado (Chiang et al, 2002b).



A superfície de carvão ativado é pensado para ser conjuntos de estrutura hexagonal (a) e o local de reação é a ligação carbono-hidrogênio. A reação de ligação carbono-hidrogênio e ozônio seguem duas vias, uma é a formação de compostos de hidróxido (b) e a outra é a geração de intermediários hidrotrióxido (c). O local da ligação hidróxido pode ser ainda transformado de ligação dupla carbono-carbono (d). Os intermediários hidrotrióxido passarão por três caminhos de reação. Em primeiro lugar, as perdas um peróxido de hidrogênio (H_2O_2), para formar a ligação dupla carbono-oxigênio (e). Em segundo lugar, o hidrotrióxido perde um O_2H para produzir radical óxido (f). Em terceiro lugar, a desprotonação do hidrotrióxido produz o radical peróxido (g). Os compostos de peróxido de oxigênio e de radicais, pode ser ainda transformado em compostos de carboxila e, posteriormente, compostos de carbonila (h) (Chiang et al, 2002b).

Bailey (1982) propôs dois extremos mecanísticos para a oxidação de carbono por ozônio: por um radical, a auto-oxidação é iniciada por ozônio; e outra por uma reação concertada.

A altas temperaturas acima de $270^\circ C$ o oxigênio molecular também participa da reação. A baixas temperaturas, o mecanismos de reação fase vapor é semelhante a ozonização em fase líquida, pelo menos quando somente ozônio molecular está envolvido. À temperatura normal, em geral, as reações ocorrem através de um mecanismo de inserção do ozônio que envolve o intermediário hidrotrióxido (RO_3^\bullet), peróxidos (RO_2^\bullet) e outros radicais (Chiang, et al., 2002)

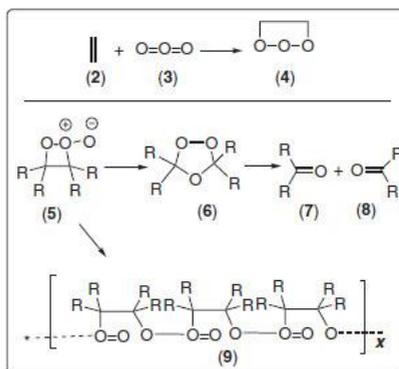
3.6 Ozônio

O ozônio é um forte oxidante ($E^0 = 2,1 V$), não é uma fonte intrínseca de poluição, uma vez que seu produto preferencial de degradação é o oxigênio (Manahan, 2000). O ozônio a temperatura ambiente e em baixas concentrações, é um gás incolor, porém em altas concentrações pode se apresentar na coloração azulada.

Em valores elevados de pH favorecem a decomposição do ozônio e a formação de diferentes tipos de compostos oxidantes com reatividades diferentes (Di Bernardo e Dantas, 2005).

Várias possibilidades a respeito da estrutura molecular do ozônio foram sugeridas e até 1905 apenas duas pareciam ser as mais prováveis: a estrutura **1**, sugerida por Soret, e um arranjo linear (O=O=O) **3**, proposto por Harries, pela similaridade com O=S=O. Utilizando a estrutura **3**, Harries propôs que a reação de adição a uma dupla ligação deveria formar o ozonídeo **4** (Figura 10), porém não foi possível confirmar este fato usando os dados experimentais obtidos (Oliveira e Wosch, 2012).

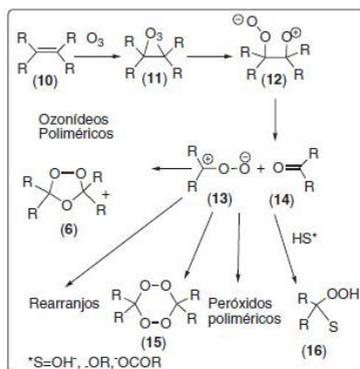
Figura 10 – Propostas de Harries e Staudinger para a estrutura do ozônio



Staudinger (1925) sugeriu que a estrutura **6**, nomeada de isozonídeo, explicaria melhor os resultados observados. Assim, a ligação carbono-carbono já estaria quebrada e, a decomposição de **6** levaria à formação apenas dos produtos carbonílicos e justificaria a inexistência de glicóis por reação de redução. O molozonídeo **5** foi proposto como o possível precursor do isozonídeo, que poderia ser estabilizado, após rearranjo (Bayle, 1973).

Criegee sua atenção ao estudo dos produtos mais oxigenados proveniente da ozonólise, em 1953 propôs o seguinte mecanismo (Figura 11).

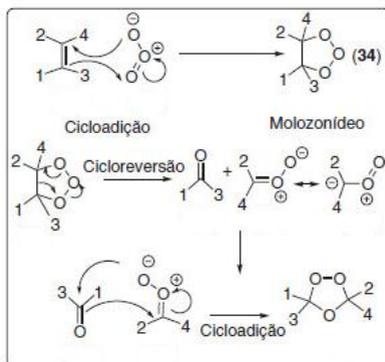
Figura 11 – Primeira proposta feita por Criegee, em 1953 (Oliveira e Wosch, 2012)



Criegee sugeriu a existência do zwitterion **13** e quatro caminhos possíveis para a sua decomposição. A estrutura dos ozonídeos foi comprovada pelo isolamento a partir da ozonólise do 1,2 – dimetilciclopenteno.

Em 1975, Criegee propôs que a etapa inicial formasse o molozonídeo instável e posteriormente por ciclorreversão formar-se-iam o zwitterion e um composto carbonílico. O ozônídeo seria formado na última etapa, por meio de uma cicloadição.

Figura 12 – Proposta do mecanismo de Criegee (1975), adaptado de (Oliveira e Wosch, 2012).



Existem dois mecanismos distintos de reação para o ozônio, o primeiro é via reação direta, na qual o O_3 molecular ataca um composto orgânico; a segunda é uma reação indireta, a oxidação se dá via radical hidroxila (OH^\bullet).

3.7 Estado da Arte

Simonelli e Arancibia (2015) estudaram a interação entre óxido de zinco (ZnO) e BSA. ZnO foi funcionalizado com ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA) sem modificar a estrutura do suporte e que a ligação entre 3-MPA e ZnO se deu pelo grupo COOH. Os estudos apontam para a preservação da BSA quando esta interagem com as partículas de ZnO.

Shamsipur e colaboradores (2015) utilizaram BSA imobilizada em nanopartículas de ouro combinados com líquidos iônicos com o intuito de melhorar a sensibilidade e estabilidade de aptasensor. Devido à elevada área superficial e grupos funcionais ativos abundantes da proteína, os mesmos atuam como agentes de estabilização eficazes para a fixação de aptâmeros

Kam e colaboradores (2004) modificaram nanotubos de carbono permitindo assim a ligação de proteínas. As proteínas por si só não conseguem penetrar nas células, porém quando complexados com os nanotubos passam a possuir esta capacidade de penetração, podendo ser utilizados como carregadores de drogas.

Mandal e colaboradores (2010) estudaram a interação entre albumina imobilizada em nanopartículas de ouro e o aminoácido L-aspartico, indicando uma pequena mudança na estrutura secundária da albumina causada pela interação. Os estudos indicaram também que os conjugados de nanopartículas de ouro revestidos com albumina são importantes para o estudo da sua interação com as células do sangue, podendo desempenhar papel importante em aplicações biomédicas e terapêuticas.

Nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas juntamente com polímeros dando origem a microesferas magnéticas. BSA foi imobilizada nestas microesferas afim de torná-las biocompatíveis, possibilitando seu uso como biosensores, liberação de fármacos entre outros (Zhang et al., 2011).

Albumina foi imobilizada em uma membrana de polipropileno tratado com plasma. O tratamento com plasma permitiu a funcionalização da membrana, tornando-a hidrofílica e capaz de

formar ligações covalentes com a BSA. A imobilização se deu por meio dos grupos carboxílicos, tornando a membrana modificada hemocompatível (Zhang et al., 2013).

Carvão ativado foi oxidado por ozônio em meio aquoso sob diferentes condições (alcalino, ácido e neutro). O estudo foi conduzido de modo a aumentar a adsorção de tiofeno e assim o carvão que melhor adsorveu o composto estudado foi o oxidado em presença de NaOH seguido de H_2SO_4 e por último H_2O (Wu et al., 2014).

Zhou e colaboradores (2009) estudaram a modificação oxidativa de materiais de carbono, e relataram que os grupos funcionais contendo oxigênio na superfície do carbono desempenham um papel importante no aumento da capacidade de adsorção de enxofre, esta interação ocorre principalmente por meio dos grupos ácidos contendo oxigênio.

Simmons e colaboradores (2007) estudaram a oxidação de nanotubos de carbono de parede única por ozônio e relataram a redução das ligações PI, devido a geração de espécies de carbonos oxidados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes principais utilizados neste trabalho foram: carvão ativado granular Norit GAC 1240 (Norit, The Netherlands), Albumina de soro bovino (98% Sigma-Aldrich) e tirosina (Sigma-Aldrich).

4.1 Modificações do carvão

A superfície do carvão ativado foi modificada pelo tratamento com ozônio sob diferentes condições experimentais. O protocolo padrão envolvia a permeação de ozônio em sentido ascendente através de uma coluna de leito fixo contendo 5 g de sólido. A vazão de ozônio era de 46,8 mg/min, esta vazão foi escolhida por ser a com maior concentração de ozônio disponível no equipamento utilizado. A concentração de ozônio foi mantida constante no interior do reator. O tempo total de reação era de 12h para assim possibilitar maior oxidação dos carvões.

O sólido que preenchia a coluna era o carvão ativado submetido a diferentes condições experimentais:

- i) Carvão ativado seco (AC);
- ii) Carvão ativado úmido (AC-H₂O), resultante da mistura de 5g de carvão ativado com 3 mL de água destilada;
- iii) Carvão ativado úmido alcalinizado (AC-NaOH), resultante da mistura de 5g de carvão ativado com 3 mL de solução aquosa de NaOH 5 M.

As diferentes condições experimentais, as quais o carvão ativado foi submetido, tem por objetivo avaliar as distintas concentrações de grupos oxigenados formados na superfície do AC.

Após o período de 12 horas de permeação de ozônio com os diferentes sólidos (AC, AC-H₂O e AC-NaOH), os sólidos eram removidos da coluna, armazenados em frascos sob atmosfera inerte (N₂) e foram denominados como AC.O₃, AC.O₃-H₂O e AC.O₃-NaOH, respectivamente.

4.2 Fotólise

4.2.1 Fotólise da Albumina

A fotólise da albumina ocorreu em um reator descontínuo isotérmico conforme Figura 13 de volume igual a 400 mL, sob irradiação de luz ultravioleta monocromática 254 nm, com agitação constante. A concentração inicial de albumina utilizada foi de 1 g L^{-1} , amostras foram coletadas em tempos pré determinados até o máximo de 10 minutos. Este tempo de reação foi selecionado baseado nas reações de fotodegradação da albumina.

Figura 13 - Reator utilizado na fotoinserção.



Fonte: UV-Consulting Peschl

4.2.2 Fotólise na presença de AC, AC.O₃, AC.O₃-H₂O e AC.O₃-NaOH

Utilizou-se o mesmo reator e lâmpada das fotólises de albumina. O protocolo geral de reações consistia da adição de 400 mL de água destilada a 0,8 g de sólido (AC, AC.O₃, AC.O₃-H₂O ou AC.O₃-NaOH), que era mantido em suspensão utilizando-se um agitador magnético. Em intervalos determinados de tempo, uma alíquota do líquido era retirada, filtrada e armazenada no abrigo de luz para posterior análise. Após 10 minutos o sólido era removido por filtração e posteriormente seco em atmosfera inerte a 70 °C.

4.3 **Fotoinserção de albumina ou tirosina**

As reações de fotoinserção foram conduzidas no mesmo aparato experimental acima descrito. A dosagem de sólido e a concentração dos compostos a serem fotoinseridos (BSA ou Tirosina) foram definidos como 2 g L⁻¹ e 1 g L⁻¹, respectivamente. Os sólidos eram colocados em contato com a solução aquosa de BSA ou tirosina e, após tempos pré-determinados, amostras do líquido eram coletadas, filtradas e posteriormente analisadas. Após 10 minutos os sólidos eram removidos por filtração, lavados com água destilada e secos em atmosfera inerte a 30 °C.

4.4 **Reações de Imobilização Física**

Com o intuito de observar a quantidade de BSA que é inserida nos distintos carvões estudados, fez-se o teste de adsorção física. Assim, os carvões foram colocados em distintos frascos Erlenmeyer na concentração de 1 g L⁻¹ juntamente com uma solução de BSA, também na concentração de 1 g L⁻¹ e volume de 100 mL, pH 7 e 20 °C. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos, filtradas e então analisadas por espectrometria UV-vis no comprimento de onda 270 nm.

4.5 Caracterização dos carvões

Os carvões foram caracterizados por: determinação da área superficial pelo método BET, análise termogravimétrica, análise elementar, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia fotoeletrônica de raio-X.

4.5.1 Análise Termogravimétrica das amostras sólidas

Para os ensaios ATG-FTIR empregou-se um analisador ATG-ATD simultâneo da marca TA Instruments e modelo TA2960, que permite o registro simultâneo da análise termogravimétrica (ATG) e da análise térmica diferencial (ATD), acoplada a um espectrômetro de infravermelho Bruker Vector 22 para o registro do espectro infravermelho dos gases despreendidos durante o programa de temperatura. Para as análises termogravimétrica foi usada uma rampa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 800°C , a atmosfera utilizada foi inerte com N_2 .

4.5.2 Análise Elementar das amostras sólidas- CHNOS

As análises químicas para avaliação da composição elementar (carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio e enxofre) das amostras de carvão foram realizadas por combustão a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$. As medidas Universidade da Coruña, este equipamento possui uma faixa de medida de 0,01 a 100% foram realizadas no equipamento Carlo Erba Instruments – Instruments modelo EA 1108.

4.5.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram adquiridos em modo ATR, empregando um espectrômetro de infravermelho médio marca Bruker e modelo Vector 22, equipado com módulo de ATR de

diamante de reflexão única, marca Specac e modelo Golden Gate

4.6 Métodos de Acompanhamento das reações

4.6.1 Fluorescência

As medidas de decaimento da fluorescência foram feitas em Espectrômetro de Luminescência Aminco Bowman série 2. As amostras foram excitadas em 280 nm e medidas em 340 nm, a intensidade utilizada foi de 500 v.

4.6.2 Espectrofotometria UV-vis

Para as medidas de absorvância foi utilizado o Espectrofotômetro Hitachi modelo U-3000.

4.6.3 Carbono orgânico total (COT)

As análises da concentração de carbono orgânico total (COT) foram realizadas pelo método de combustão com detecção por sensor de infravermelho, utilizando o equipamento TOC-V CPH – Total Organic Carbon Analyzer/TNM-1 (Shimadzu).

4.6.4 Espectrometria de massa por tempo de voo com dessorção a laser e ionização assistida por Matriz (MALDI-TOF MS)

As amostras foram analisadas num instrumento MALDI-TOF/TOF 4800 (ABSciex) e utilizando o software Explorer v.4.2 de série 4000 para gerar os espectros e lista de picos. Após a deposição manual dos calibradores de massa, o modelo de placa e a calibração padrão da placa MALDI foram feitos com uma tensão de laser de 3400 kV e 1000 disparos/espectros. As amostras foram analisadas, automaticamente, no modo MS

Linear com uma tensão de laser de 5800 kV e 1500 disparos/espectro.

4.6.5 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X (XPS)

A análise das amostras foi realizada utilizando o Thermo Scientific K-alpha ESCA, equipado com radiação monocromática de alumínio $K\alpha$ a 1486.6 eV. Devido à natureza das amostras não condutoras foi necessário o uso de uma forma de inundação de elétrons para minimizar a carga de superfície. A neutralização de carga superficial foi realizada utilizando tanto um canhão de indução de baixa energia (elétrons na faixa de 0 a 14 eV) e canhão de íons de Argônio com baixo consumo de energia. Fotoelétrons foram coletados a partir de um ângulo de partida de 90° em relação à superfície da amostra. A medida foi feita por meio de um Analisador de Energia Constante (AEC), com uma energia de 100 eV para os espectros de pesquisa e 20 eV para espectros de alta resolução.

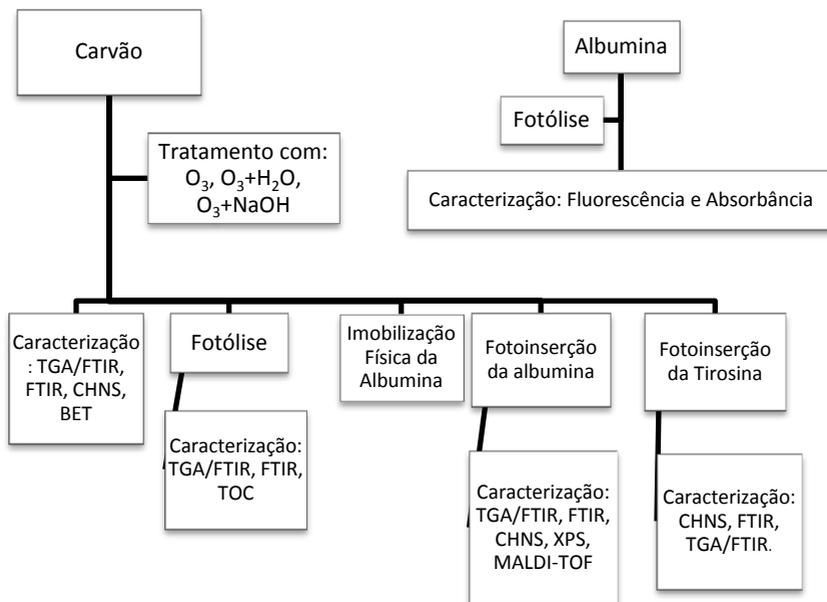
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados deste trabalho estão organizados como mostrado na Figura 14. Primeiramente serão apresentados e discutidos os resultados da oxidação do carvão ativado com diferentes tratamentos com ozônio. Este pré-tratamento garante a existência de maiores quantidades de funcionalidades oxigenadas que, segundo a literatura, são fundamentais para a fotoinserção de moléculas orgânicas (Chiang, et al, 2002).

Em seguida, serão apresentados os resultados de caracterização dos carvões ativado e modificados após a fotólise, bem como os resultados da fotólise da albumina, isoladamente.

Finalmente, serão apresentados os resultados da fotoinserção de albumina ou tirosina na superfície dos carvões ativados.

Figura 14: Organização da apresentação dos resultados e discussões da tese.



5.1 Caracterização dos Carvões

Os carvões ativados e seus derivados oxidados com ozônio foram caracterizados pela determinação da perda de massa sob aquecimento (termogravimetria) acoplada com espectrometria de infravermelho, pois a presença de grupos funcionais oxidados causa perda de massa devido à liberação de gases (CO, CO₂ e outros compostos voláteis). Logo, a extensão da perda de massa poderia indicar a maior ou menor extensão da oxidação superficial causada pelos tratamentos com ozônio. Além disso, os gases liberados deste aquecimento foram detectados por espectrofotometria de infravermelho.

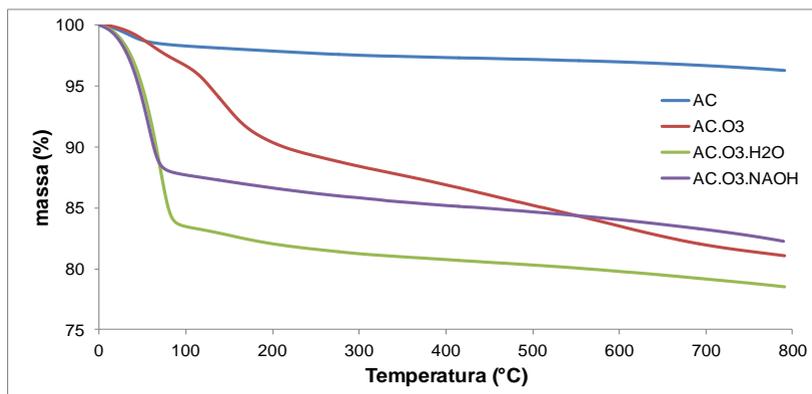
Além da caracterização térmica, os sólidos foram caracterizados pela análise elementar, área superficial e FTIR.

5.1.1 Análise Termogravimétrica acoplado a um analisador de gases por Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (TGA/FTIR)

As análises termogravimétricas são úteis para identificar a estabilidade térmica das funcionalidades oxigenadas inseridas no carvão após os tratamentos oxidativos. A Figura 15 mostra que o carvão ativado usado como precursor apresenta perda de massa total relativamente pequena (3,8%), o que é incomum para carvões ativados comerciais, indicando a pequena extensão de oxidação superficial.

Desta forma, o tratamento com processos oxidativos parece ser necessário para a funcionalização superficial. A Figura 15 mostra os resultados das análises termogravimétricas dos carvões obtidos antes e após o tratamento com ozônio sob diferentes condições experimentais.

Figura 15 - Análise termogravimétrica dos carvões AC, AC.O₃, AC.O₃.H₂O e AC.O₃-NaOH (taxa de aquecimento: 5°C min⁻¹; gás de arraste: N₂).



A Figura 15 resume os valores de perda de massa dos carvões resultantes dos diferentes tratamentos, com as suas respectivas atribuições.

Tabela 2 – Perda de massa em diferentes intervalos de temperatura

T (°C)	AC	AC.O ₃	AC.O ₃ -H ₂ O	AC.O ₃ -NaOH	Atribuição
< 100	1,10	3,60	17,00	12,50	perda de água da umidade do sólido;
450-600	0,29	2,59	0,75	0,93	liberação de CO ₂ derivado da decomposição de grupos ácidos carboxílicos superficiais;
600 - 750	0,52	2,06	0,97	1,29	liberação de CO, resultante da decomposição de grupamentos C=O, e matéria volátil. (Strzemieska et al., 2014; Santiago et al., 2005).
Perda de massa total, %	3,80	18,90	21,50	6,60	

Observa-se claramente que os tratamentos com ozônio produzem carvões funcionalizados menos estáveis termicamente do que o carvão ativado precursor. A instabilidade dos grupos funcionais oxigenados é maior no carvão tratado com ozônio na presença de umidade, que mostrou perda de massa total de 21,5%. Aparentemente, os tratamentos com ozônio introduzem grupos funcionais ácidos carboxílicos, que estão presentes em maior quantidade no carvão tratado com ozônio (AC.O₃) e são liberados na forma de CO₂, como mostram os resultados da análise dos gases coletados à saída do analisador termogravimétrico (Figura 17). As Figuras 16 a 19 apresentam o resultado da análise dos gases liberados pela amostras de carvões, causado pelo aquecimento das mesmas em atmosfera de nitrogênio, simultaneamente à análise termogravimétrica.

Figura 16 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC durante a análise termogravimétrica.

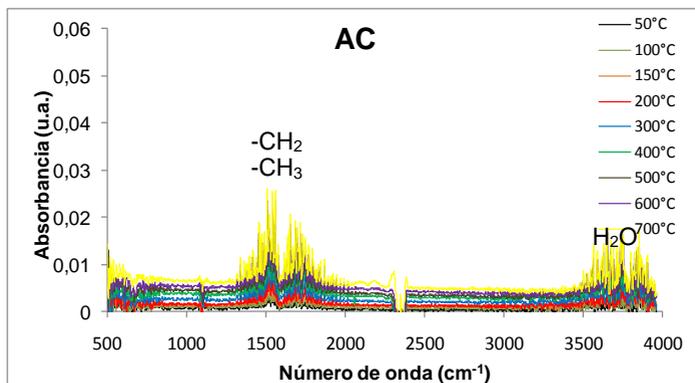


Figura 17 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃ durante a análise termogravimétrica.

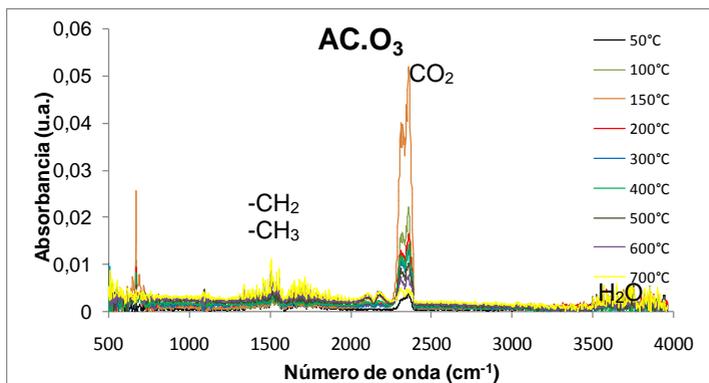


Figura 18 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-H₂O durante a análise termogravimétrica.

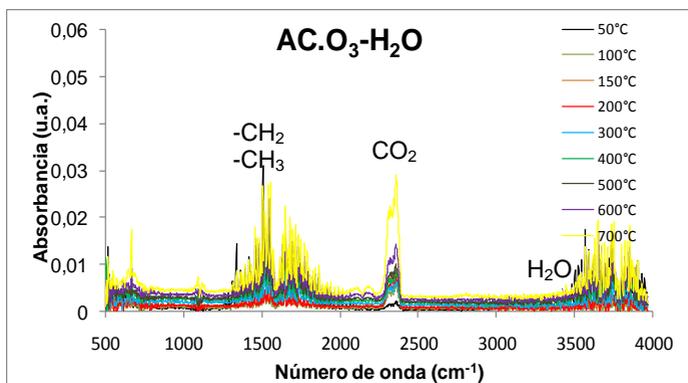
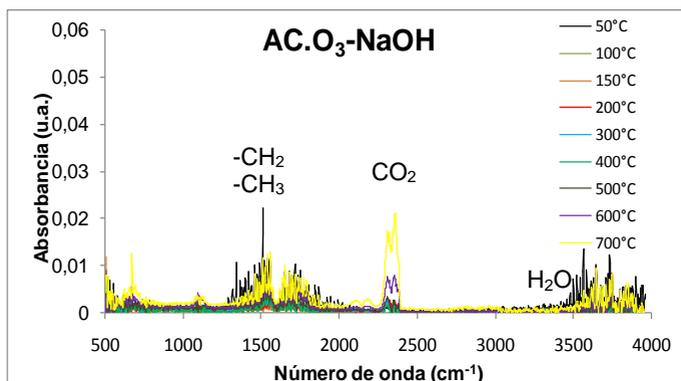


Figura 19 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-NaOH durante a análise termogravimétrica.



A sequência de picos identificados na região entre 1500 e 1660 cm^{-1} são característicos das vibrações do esqueleto aromático residual de lignina presente no carvão que sofre pirólise durante a análise termogravimétrica em atmosfera inerte (Zhao e Liu, 2010). Os eventos de pirólise de lignina com liberação de anéis aromáticos ocorrem principalmente na faixa de temperatura entre 500 e 700 $^{\circ}\text{C}$ (Zhang, et al., 2012), tal qual verificado no resultado da análise. É também nesta banda que se intensificam os sinais oriundos das vibrações assimétricas dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2-$ dos hidrocarbonetos pirolisados. Pode-se ainda verificar o incremento na intensidade do sinal com o aumento da temperatura (Zhao e Liu, 2010).

A banda que caracteriza a presença de vapores de H_2O se apresenta entre 3500-4000 cm^{-1} (Cao, et al., 2013) e é originária na sua maior parte da umidade adsorvida na superfície do carvão e em menor magnitude atribuída à decomposição de grupamentos hidroxila.

Além das estruturas aromáticas identificados na análise dos gases resultantes do tratamento térmico do carvão AC, as amostras tratadas com ozônio gasoso, mostraram a presença de CO_2 dentre os gases liberados durante o tratamento térmico. A banda entre 2250-2400 cm^{-1} é característica do estiramento assimétrico da ligação $\text{C}=\text{O}$ do CO_2 (Singh et al., 2012). Este sinal

se intensificou com o aumento da temperatura, assim como as demais bandas.

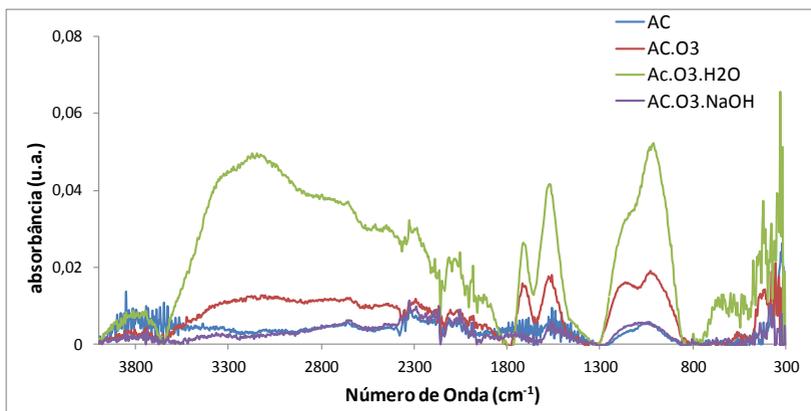
O tratamento do ozônio molecular aumenta a presença de grupos oxigenados na superfície do carbono sendo isto confirmado pelas emissões predominantes de CO_2 ($2250\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$) (Singh, et al., 2012) resultante da decomposição destes grupos sob ação da temperatura. O pico mais intenso de liberação de CO_2 ocorre em temperatura próxima de 150°C , verificado também no termograma (Figura 15), como a região de maior taxa de perda de massa.

O tratamento do AC com ozônio (amostra AC.O₃) portanto, é aquele que produz a maior quantidade de grupos funcionais ácidos carboxílicos, que são decompostos e formam CO_2 sob aquecimento em atmosfera inerte, em temperaturas moderadas.

5.1.2 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos sólidos resultantes da oxidação do AC.

A espectrometria de infravermelho dos sólidos foi utilizada com a finalidade de identificar funcionalidades oxigenadas na superfície do carvão antes e após os diferentes tratamentos. A Figura 20 mostra os espectros FTIR dos diferentes sólidos.

Figura 20 - Espectro de FTIR dos carvões: AC, AC.O₃, AC.O₃-H₂O e AC.O₃-NaOH.



Na região entre 900 e 1350 cm^{-1} a banda observada é referente às características do estiramento assimétrico da ligação C-O-C presente no ozonídeo secundário formado pela reação de ozonização do carvão (Stobinski, et al., 2010; Barbosa, 2008; Manchester et al, 2008).

O estiramento que aparece entre 1550 a 1750 cm^{-1} é atribuído à presença de carbonila de ácidos carboxílicos, anidridos, éteres, ésteres e lactonas (Pedersen, et. al., 2011; Barbosa, 2008). Somente os carvões AC.O₃ e AC.O₃-H₂O apresentam as banda de C=O, indicando a ocorrência de reações de oxidação distintas em cada amostra de carvão.

Observa-se também na amostra AC.O₃-H₂O uma larga banda a partir de 2500 cm^{-1} referente a presença de umidade na amostra analisada. Os carvões são naturalmente hidrofóbicos, mas a inserção de grupamentos ácidos na superfície favorece o aumento da hidrofiliidade (Moreno-Castilla et al, 1995) e conseqüentemente a isto a água é adsorvida em maior quantidade que em outras formas de tratamento. Os ruídos observados nas proximidades de 500 cm^{-1} são interferências espectrais relacionadas à absorção de energia da própria pastilha de KBr.

Assim, os diferentes tratamentos com ozônio produzem funcionalidades orgânicas em diferentes extensões na superfície do carvão ativado. Tanto dos estudos termogravimétricos como a identificação espectroscópica no infravermelho revelam que o tratamento com ozônio ou ozônio na presença de umidade produzem maior quantidade de funcionalidades oxigenadas, que se decompõem termicamente para liberar principalmente CO₂ em temperaturas relativamente baixas.

5.1.3 Análise Elementar dos sólidos antes e após os diferentes tratamentos com ozônio

A Tabela 3 apresenta a análise elementar dos carvões estudados. Conforme se pode observar na Tabela 3, ocorre a geração de graus de oxidação diferentes. Em comparação com o AC, o AC.O₃ e o AC.O₃-H₂O apresentaram aumento de 5,66 % e de 2,38 % de oxigênio respectivamente. O tratamento feito com ozônio e NaOH porém, obteve diminuição na porcentagem de

oxigênio no carvão tratado, resultando em um decréscimo de 8,7%.

Tabela 3—Análise elementar dos carvões

Amostra	%N	%C	%H	%S	%O
AC	0,39	84,58	0,30	0,55	14,18
AC O ₃	0,35	78,87	0,53	0,41	19,84
AC O ₃ -H ₂ O	0,36	82,15	0,44	0,49	16,56
AC O ₃ .NaOH	0,37	86,00	0,23	0,46	12,94

O ozônio em presença de umidade forma radicais hidroxila, que são caracterizados por sua alta reatividade (Beltran, et al., 2002). Em meio básico, ou seja, em presença de NaOH a formação destes radicais torna-se ainda maior e a presença de ozônio molecular é minimizada (Mahmoud e Freire, 2007).

Acredita-se que o ozônio molecular seja responsável pela oxidação dos carvões e que a presença de radicais hidroxila iniba a oxidação, pois apesar de sua alta reatividade este radical não é seletivo e age na decomposição do próprio ozônio molecular. Assim, quanto maior a presença de radicais hidroxila, menor a oxidação dos carvões tratados, devido às reações competitivas que ocorrem em paralelo à oxidação da superfície do carvão.

Tais observações levam a conclusão de que o contato direto do ozônio com o carvão favorece a formação mais controlada da quantidade de grupos oxigenados na superfície e que o tratamento via úmida tornam este controle mais difícil de ser controlado nas condições experimentais estudadas.

5.1.4 Determinação da Área Superficial pelo Método BET

Tem sido relatado que a área superficial de carvões ativados permanece praticamente inalterada após tratamento oxidativos com peróxido de hidrogênio, ozônio ou ácido nítrico (Santiago et al., 2005). Entretanto, neste trabalho todos os tratamentos oxidativos com ozônio resultaram em diminuição da área BET, como mostrado na Tabela 4.

A diminuição da área BET poderia estar associada com o colapso de algumas paredes de poros, que causa uma diminuição do volume de microporos, e/ou bloqueio parcial na entrada dos microporos pela presença de grupos funcionais oxigenados introduzidos no tratamento com ozônio, assim como relatado por Danish et al. (2014) e Wu et al., (2014).

Tabela 4 - Área superficial específica calculada por isoterma de BET com a adsorção-desorção de N_2 .

Amostra	Área superficial ($m^2 g^{-1}$)
AC	941,5
AC.O ₃	754,0
AC.O ₃ -H ₂ O	806,8
AC.O ₃ -NaOH	851,8

De fato, o carvão tratado com ozônio (AC.O₃) é o que resultou em maior decréscimo da área BET, como resultado da maior extensão de oxidação superficial (Figura 20).

As amostras AC, AC.O₃ e AC.O₃-H₂O apresentaram estrutura típica de sólidos microporosos, com aparecimento de histerese muito estreita (Figura 21, Figura 22 e Figura 23). A amostra AC.O₃-NaOH (Figura 24) foi a que apresentou maior área superficial em relação às outras amostras oxidadas, porém a característica de sua curva de adsorção-desorção demonstra uma tendência a adsorção em monocamadas para materiais microporosos (Scheer, 2002).

Figura 21 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC (a 77K)

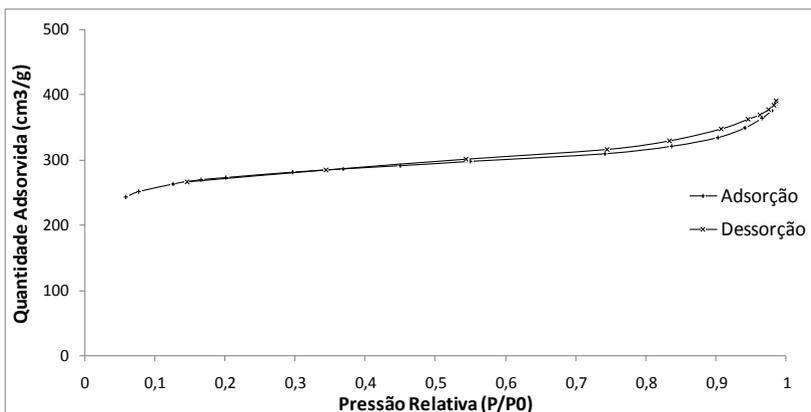


Figura 22 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC.O₃ (a 77K).

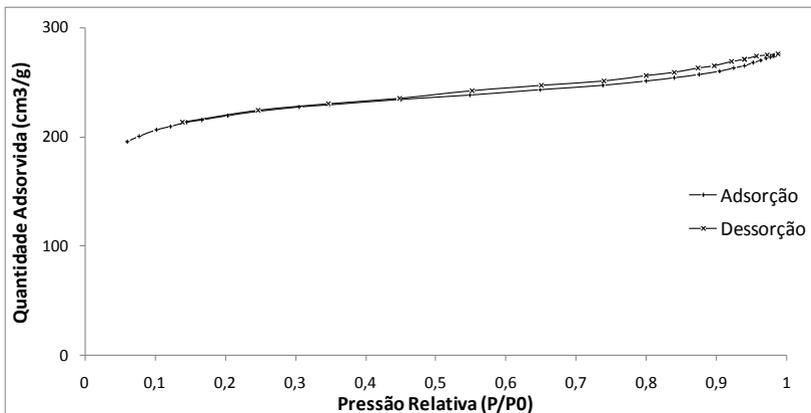


Figura 23 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC.O₃-H₂O (a 77K)

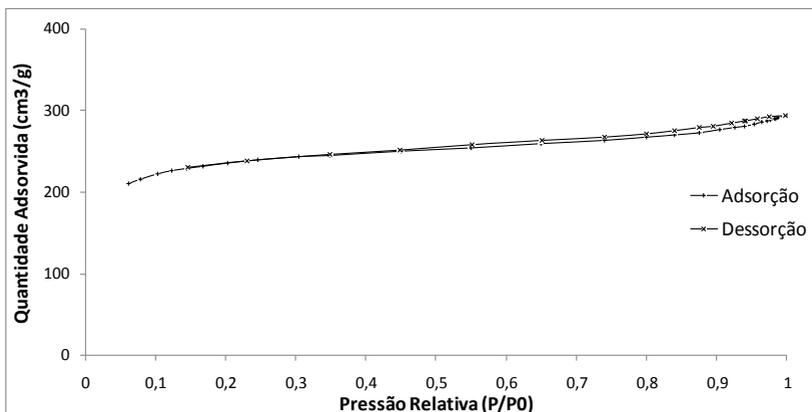
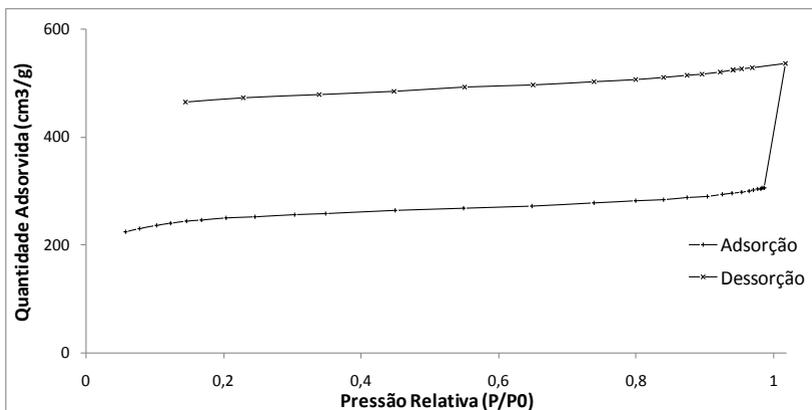


Figura 24 – Isoterma de Adsorção de Nitrogênio sobre o sólido AC.O₃-NaOH (a 77K)



5.2 Caracterização dos carvões após fotólise

Os termogramas dos carvões antes e após a reação de fotólise são apresentados nas Figuras 25 a Figura 28.

Figura 25 - Termogramas do carvão ativado antes (AC) e após a fotólise (AC.F).

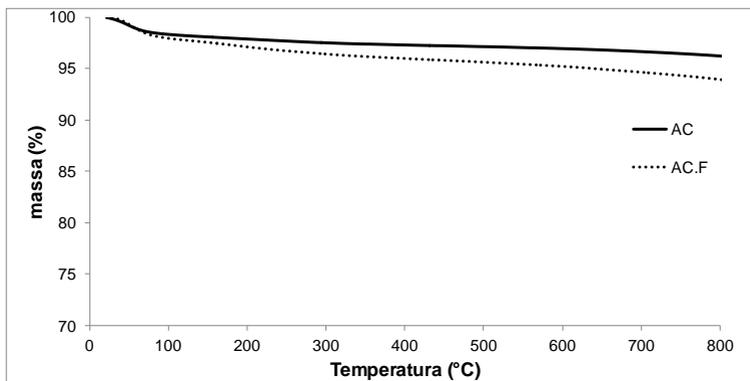


Figura 26 - Termogramas do carvão AC.O₃ e do mesmo após a fotólise (AC.O₃.F).

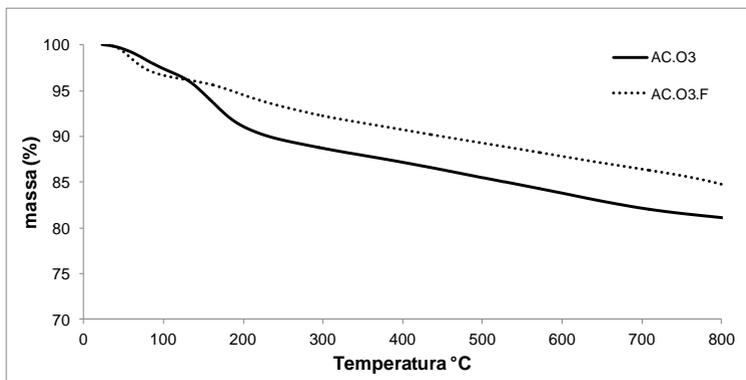


Figura 27 - Termogramas do carvão AC.O₃-H₂O e do mesmo após a fotólise (AC.O₃-H₂O.F)

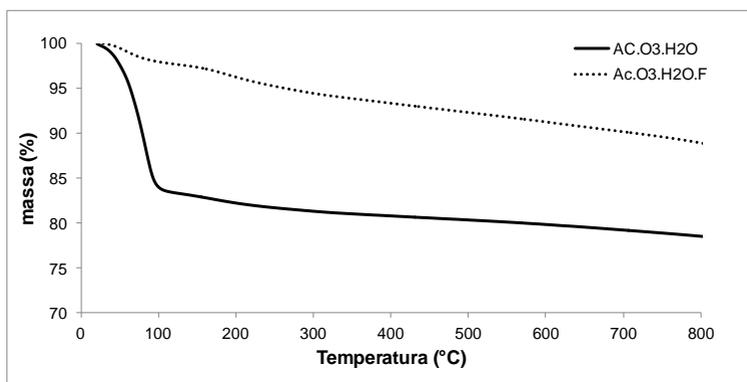
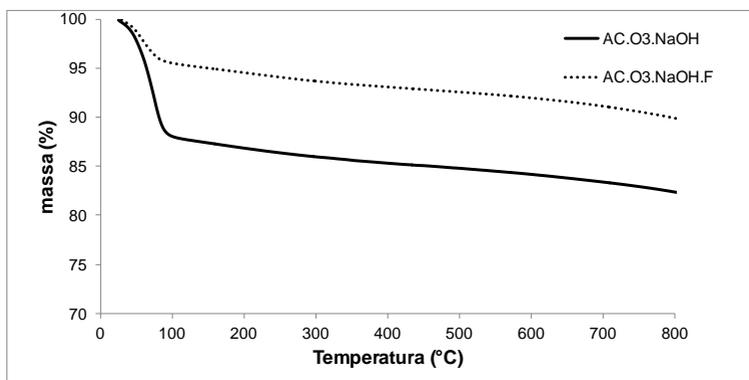


Figura 28 - Termogramas do carvão AC.O₃-NaOH e do mesmo após a fotólise (AC.O₃-NaOH.F)



As análises termogravimétricas mostram que após a fotólise, os carvões têm maior estabilidade térmica em relação aos carvões originais, possivelmente devido à perda dos grupos funcionais oxigenados durante a fotólise.

Porém para o carvão AC.F seu decréscimo de massa é levemente maior que a do carvão antes da fotólise. As perdas de massa foram menores que os carvões de origem e seus valores

comparativamente cresceram em 10,44 %, 7,68 %, 3,7 % para AC.O₃-H₂O.F, AC.O₃-NaOH.F, AC.O₃.F, respectivamente. Para o Carvão AC.F sua diminuição de massa foi maior em cerca 2,22 % ao fim dos 800°C.

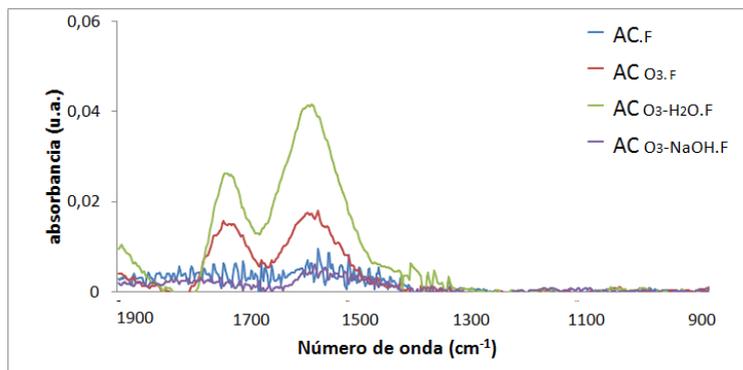
É esperado que o tratamento por fotólise em meio aquoso dos carvões ativados possa alterar a quantidade e tipo de grupos funcionais (Zeng, et al., 2013). Neste caso, seria presumida a liberação de compostos orgânicos para a água durante a fotólise. Para quantificar a perda de carbono dos sólidos durante a reação com luz UV, foram feitas medidas da concentração de carbono orgânico total da fase aquosa após os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de carbono orgânico total liberada para a fase aquosa pela fotólise (UV-254 nm)

Amostra	Carbono Orgânico Total (mg×L ⁻¹)	
	t=0	t=10 min
AC	13,0	3,0
AC.O ₃	11,0	4,2
AC.O ₃ -H ₂ O	15,0	5,3
AC.O ₃ -NaOH	12,1	7,7

Os resultados indicam que, quando os carvões são fotolisados, os grupamentos oxigenados superficiais são parcialmente decompostos, uma vez que é detectada a presença de material de natureza orgânica na fase aquosa após a reação.

Os sólidos resultantes da fotólise mostraram ainda a presença de grupos superficiais oxigenados no espectro IR (Figura 25) mas também a extinção da banda entre 1350 e 950 cm⁻¹ presentes nos carvões oxidados se comparado aos espectros obtidos na Figura 20.

Figura 29 - Espectros de FTIR dos carvões fotolisados.

Esta decomposição por fotólise pode indicar sítios mais reativos a excitação pela luz e também sítios favoráveis à inserção dos compostos estudados.

Estes resultados estão de acordo com aqueles de FTIR (Figura 29) que evidenciam a perda da banda entre 1350 e 950 cm^{-1} , característica de ligações C-O. Devido a este efeito de quebra de partículas de carbono orgânico do carvão, tornou-se impossível acompanhar as fotoinserções pela técnica de COT, uma vez que não seria possível distinguir a fotoinserção da decomposição dos sólidos.

As análises de FTIR dos gases liberados pela pirólise dos carvões após a reação de fotólise são apresentadas da Figura 30 a Figura 33.

Figura 30 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.F durante a análise termogravimétrica.

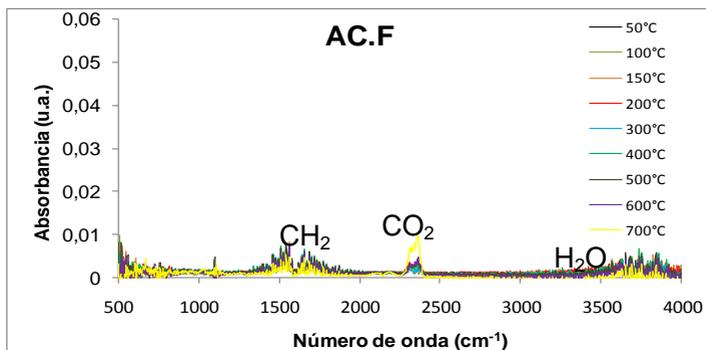


Figura 31 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃.F durante a análise termogravimétrica.

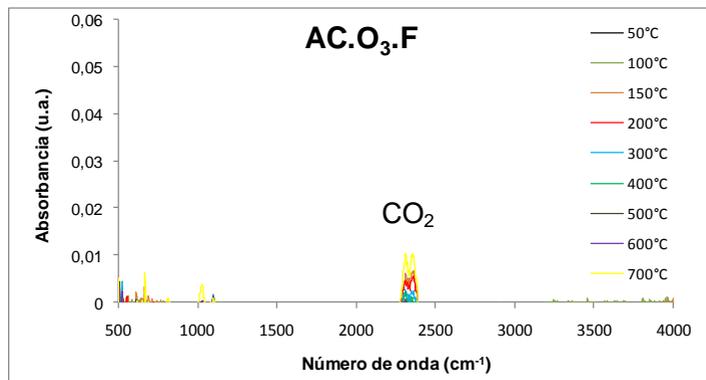


Figura 32 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-H₂O.F durante a análise termogravimétrica.

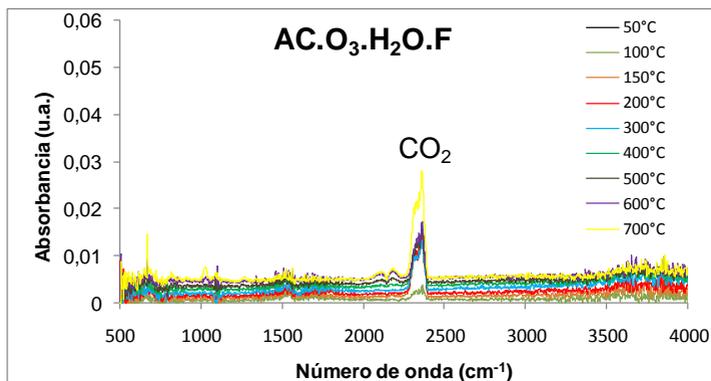
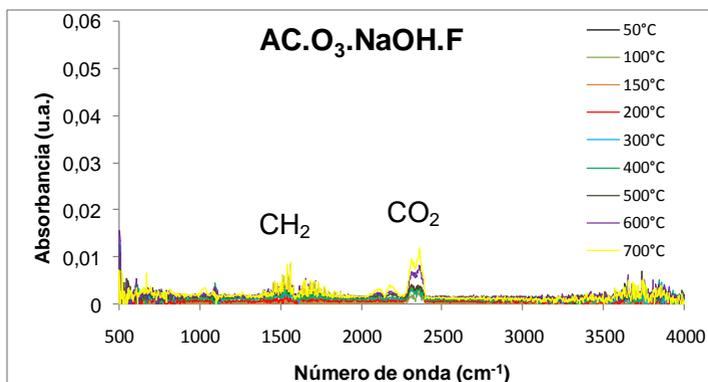


Figura 33 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-NaOH.F durante a análise termogravimétrica.



As análises de FTIR (Figura 29) confirmam o desaparecimento de grupos oxigenados com a extinção da banda entre 900-1350 cm⁻¹. De fato, durante a fotólise em fase aquosa, existe a liberação de carbono orgânico total, como mostrado na Tabela 5.

Este fato também pode ser observado nos termogramas, uma vez que a perda de massa é menor que os carvões

originais, indicando que o carvão resultante da fotólise é mais estável por conter menos grupos oxigenados.

Observa-se que os gases liberados durante as análises termogravimétricas dos carvões apresentam comportamentos distintos comparados aos carvões originários. O AC.F tem a liberação do grupo CO_2 em aproximadamente 2300 cm^{-1} , fato anteriormente não observado para o AC, as demais bandas presentes ($1600\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$ aromáticos e $3500\text{-}4000$ água) perderam sua intensidade após a reação de fotólise.

O espectro do carvão AC.O₃.F apresenta apenas pequena liberação de CO_2 ($2250\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$), não são mais observados outros picos que caracterizem o desprendimento de outros gases (aromáticos $1600\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$, água $3500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ e alceno 670 cm^{-1}).

Nota-se que os carvões AC.O₃-H₂O.F e AC.O₃-NaOH.F também possuem bandas menos intensas em seus espectros de FTIR que seus carvões de origem, há menos gases sendo emitidos após a reação de fotólise dos mesmos.

A menor liberação de gases pelos carvões posteriormente a reação com a luz UV 254 nm era esperada, tendo em vista que as análises de FTIR (Figura 29) dos mesmos sinaliza a perda dos grupos C-O ($900\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$).

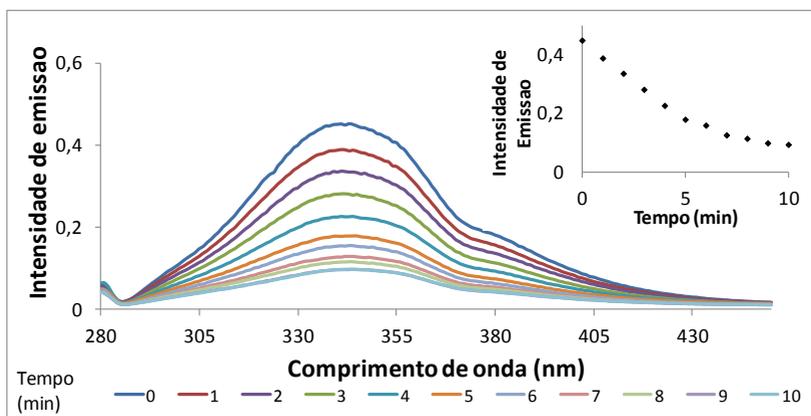
Assim, em todos os carvões utilizados neste trabalho, observou-se que a fotólise em fase aquosa causa a eliminação de grupamentos superficiais oxigenados, que são parcialmente perdidos juntamente com fragmentos orgânicos para a fase aquosa, resultando em superfícies menos oxidadas.

5.3 Estudos preliminares da Fotólise da Albumina

Estudos preliminares dos efeitos da fotólise na albumina são necessários para estabelecer as melhores condições experimentais para se realizar a fotoinserção de albumina nos carvão ativados. Desta forma, uma solução aquosa contendo albumina foi fotolisada, como descrito no Capítulo Material e Métodos, acompanhando a cinética de fotólise por espectroscopia de fluorescência (Figura 34) e UV/vis (Figura 35)

De fato, a albumina pode ser decompor por fotólise, produzindo fragmentos (-Asp-Glu-Thr-Tyr-Val-Pro-Lys-) que segundo Yokoyama e colaboradores (2002) podem ser relacionados a sítios ativos da albumina. Assim também são obtidos fragmentos menores de Tyr-Val devido a quebra da ligação N-terminal entre Pro e Val com liberação de CO.

Figura 34 -A) Espectro de Fluorescência durante a fotólise da albumina. B) Decréscimo na intensidade de fluorescência no comprimento de 340 nm com o tempo (concentração inicial de albumina :100 mg/L; radiação UV 245 nm).

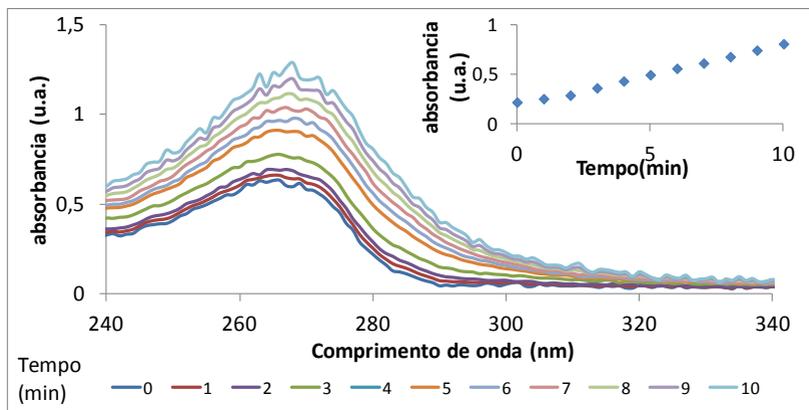


Os resultados mostram que após 10 min de reação há perda de 78,8% de sua intensidade de fluorescência. Assim, este tempo foi utilizado como o tempo máximo nos ensaios de fotoinserção nos carvões. A fluorescência medida é atribuída principalmente à presença de resíduos de tirosina presentes na BSA conforme demonstrado na Tabela 1. Este aminoácido tem a maior intensidade de fluorescência a 340 nm (Held, 2003), comprimento de onda em que se pode observar de forma mais intensa a fotólise da BSA.

Devido a grande perda de intensidade de fluorescência no período de 10 minutos, e com o intuito de manter o maior tempo possível para a interação e imobilização da proteína, determinou-se que o período de 10 minutos seria o melhor tempo para a fotoinserção.

O espectro de UV-Vis da albumina com o decorrer da reação de fotólise está descrito na Figura 35.

Figura 35- A) Espectro de absorvância da fotólise da albumina. B) Incremento da absorvância da molécula de albumina a 10 min de reação em 270 nm (concentração de albumina: 100 mg/L; comprimento de onda na fotólise: 254 nm)



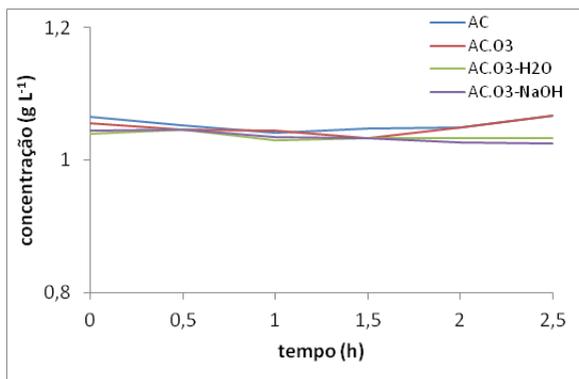
Comparativamente com a fluorescência, a absorção no UV-vis tem um acréscimo na sua intensidade, mostrando efeito hipercrômico devido a modificações na estrutura da albumina durante a fotólise, possivelmente na modificação da α -hélice (Figura 1). A luz UV é capturada pelos aminoácidos contendo grupos aromáticos da molécula da albumina e sofre modificações em sua estrutura, deixando assim mais expostos os grupos cromóforos, aumentando a intensidade de sua absorvância, esse acréscimo se deu em aproximadamente 55 % do valor inicial. Os dados deste efeito são apresentados na Figura 35. Da mesma forma que para a análise por fluorescência, a tirosina é a principal responsável pelo aumento na absorvância a 270 nm conforme medido durante este ensaio.

Assim, como previamente apresentado, a albumina se fragmenta por fotólise produzindo tirosina (Yokoyama et al., 2002).

5.3.1 Reações de Imobilização Física da albumina (BSA) nos diferentes carvões

Os ensaios de imobilização por adsorção física da albumina nos carvões visam determinar a quantidade de BSA que se une ao carvão por interações fracas, como por exemplo, Van der Waals, ou seja, no contexto global, quantificar a influência da adsorção frente à fotoimobilização. Embora seja esperado uma pequena extensão de adsorção física, pois os carvões são microporosos e as macromoléculas de BSA podem não penetrar na área, interna, estes resultados são importantes para que se possa desprezar as possível interação BSA.carvão. Os resultados são mostrados na Figura 36.

Figura 36–Cinética de interação física de BSA sobre os diferentes carvões ($[BSA]= 1\text{ g L}^{-1}$; dosagem de carvão: 1 g L^{-1})



De fato, a Figura 36 mostra que não houve adsorção significativa de BSA nos suportes estudados durante o tempo de ensaio realizado. Isto mostra a incompatibilidade dos suportes com a proteína. Um dos impedimentos atribuídos a este fato se deve ao grande tamanho da molécula BSA em relação ao tamanho dos poros dos carvões. Além disso, não poderia se descartada a natureza química superficial dos carvões. Os grupos superficiais formados na superfície dos carvões, predominantemente ácidos carboxílicos, requereriam que a interação com a proteína ocorresse através de seus grupos

amino terminais, o uso de um agente de ligação covalente. Neste caso, para este estudo haveria a necessidade do uso de carbodiimidias para realizar esta ligação de natureza covalente, o que foge do escopo deste trabalho (Sassolas, et al, 2012).

Para viabilizar os ensaios de imobilização covalente se faz necessário o estudo da quantificação e da especificação destes possíveis grupos amino disponíveis na molécula de BSA, para então ser calculado o pH ideal de imobilização. Levando em conta a **natureza** ácida da superfície do carvão preparado neste trabalho, qualquer troca de pH no meio reacional pode influenciar diretamente no mecanismo da reação da carbodiimida com os grupos ativos de interesse e considerando a possibilidade de desnaturação da proteína durante todos estes ajustes, tal estudo pode até se inviabilizar devido a quantidade de variáveis a serem ajustadas. Este fato justifica novamente a importância dos estudos do uso da fotoimobilização da proteína BSA na superfície do carvão como uma alternativa viável a esta proposta.

5.4 Fotoinserção da albumina

5.4.1 Análise Termogravimétrica acoplado a um analisador de gases por Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (TGA/FTIR)

Os termogramas dos carvões após a reação de fotoinserção da albumina (BSA) são na Figura 37, sendo que as perdas de massa nos diferentes intervalos de temperatura resumidas na Tabela 6.

Figura 37 -Análise Termogravimétrica do AC antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.

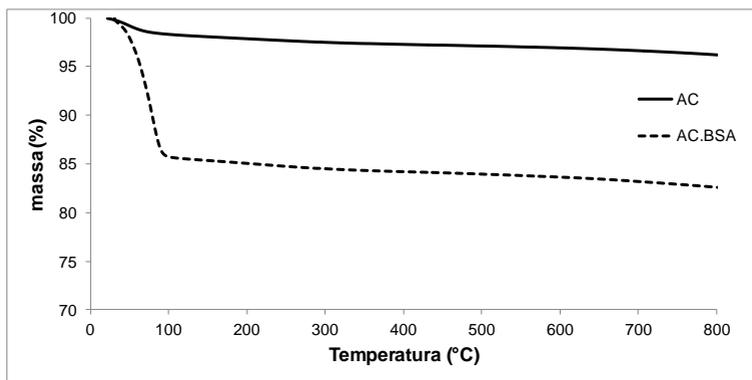


Figura 38- Análise Termogravimétrica do AC.O₃ antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.

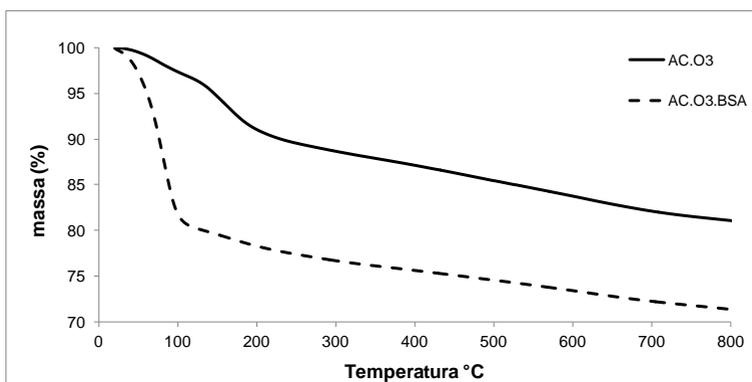


Figura 39 - Análise Termogravimétrica do AC.O₃-H₂O antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.

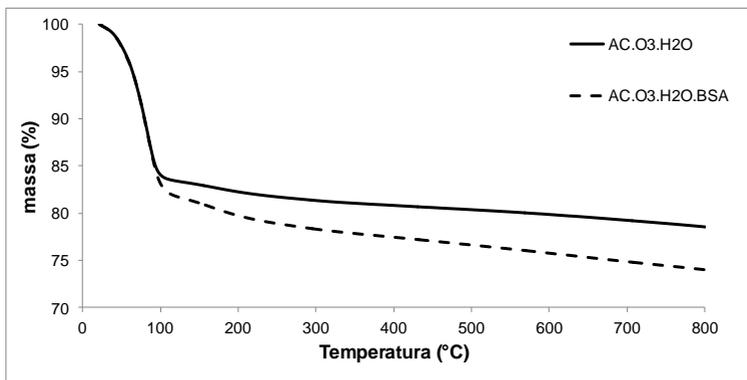


Figura 40 -Análise Termogravimétrica do AC.O₃-NaOH antes e após a reação de fotoinserção com albumina (BSA), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.

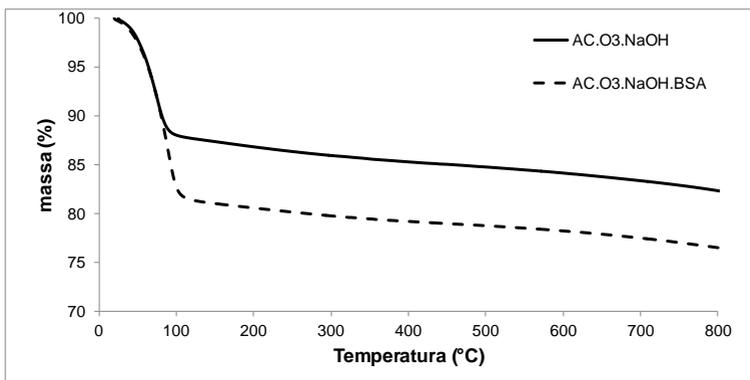


Tabela 6– Perda de massa das amostras após a reação de fotólise na presença de albumina e respectivas atribuições

T(°C) (%)	AC.BSA	AC.O ₃ .BSA	AC.O ₃ .H ₂ O.BSA	AC.O ₃ .NaOH.BSA	Atribuição
< 100	2,22	5,95	15,74	15,71	Perda da água
100 a 180	12,58	15,21	1,60	5,86	Desnaturação da BSA
180 a 500	1,22	4,22	3,59	1,99	Decomposição da BSA (Csach et al., 2011)
500 a 800	1,34	3,18	2,61	2,25	Liberção de CO ₂ , CO e outros compostos orgânicos voláteis(Strzemiecka et al., 2014; Santiago et al., 2005).
Total, %	17,36	22,61	23,54	25,81	

Os valores de perda de massa são superiores aqueles resultantes do TGA das amostras antes da reação de fotólise, indicando que ocorre a reação com fotoinserção, se não da molécula de albumina, de seus fragmentos produzidos na reação de fotólise. Observa-se que o carvão AC.O3, que é o que possivelmente contém a maior quantidade de grupos oxigenados superficiais (Tabela 3) é o que também produz a maior perda de massa entre 180 e 500°C, que é atribuída neste trabalho à decomposição da BSA (Csach, et al., 2011). Logo, aparentemente a fotoinserção de BSA pode estar, de fato, sendo realizada nas funcionalidades oxigenadas do carvão.

Durante o tratamento térmico das amostras após as reações de fotoinserção, os gases produzidos foram coletados e identificados por espectroscopia de infravermelho (Figura 41 a Figura 44).

Figura 41 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.BSA durante a análise termogravimétrica.

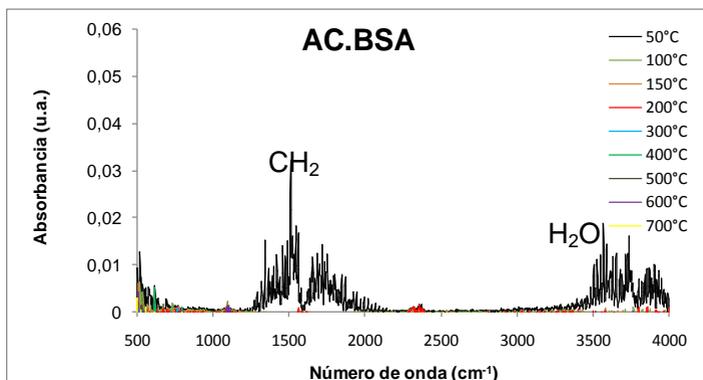


Figura 42 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃.BSA durante a análise termogravimétrica.

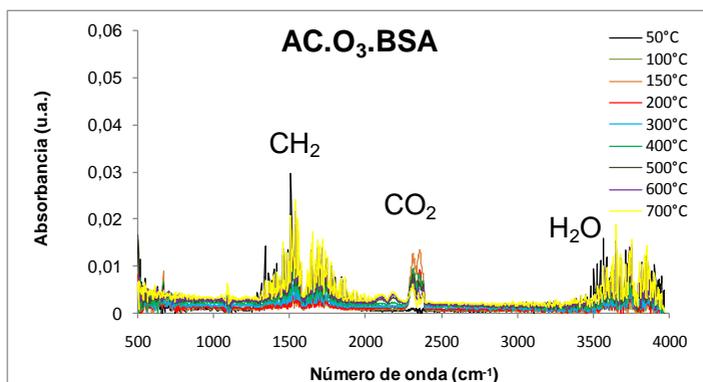


Figura 43 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-H₂O.BSA durante a análise termogravimétrica.

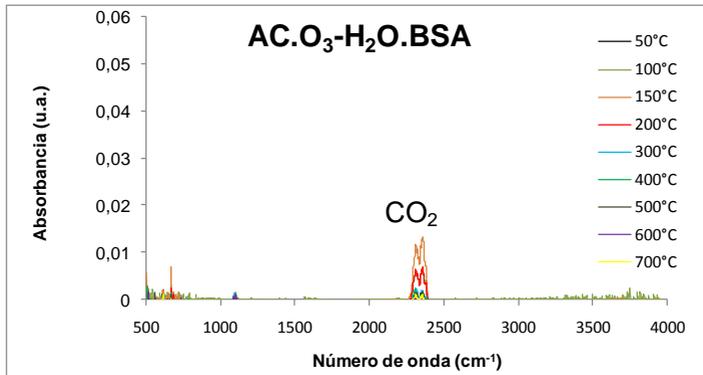
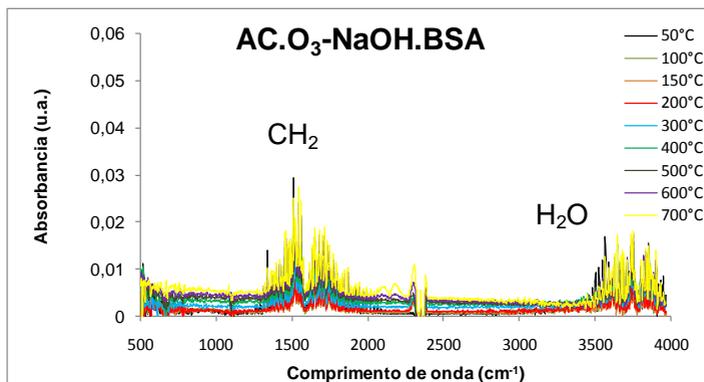


Figura 44 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-NaOH.BSA durante a análise termogravimétrica.



Na Figura 44 pode-se observar algumas mudanças, em comparação aos carvões antes da reação de inserção de BSA, quanto a liberação dos gases durante a análise de TGA: AC.BSA apresenta em seu espectro a liberação de gases apenas na temperatura de 50 °C.

A análises de FTIR dos gases de AC.O₃.BSA mostra a diminuição do pico atribuído à liberação de CO₂ (2250-2400 cm⁻¹) e o aumento dos picos do grupo carbonilo (1600-1900 cm⁻¹) e aquo (3500-4000 cm⁻¹).

O espectro de AC.O₃.H₂O.BSA demonstra a extinção das bandas do grupo carbonilo e aquo, sendo que apenas CO₂ é liberado durante o aquecimento.

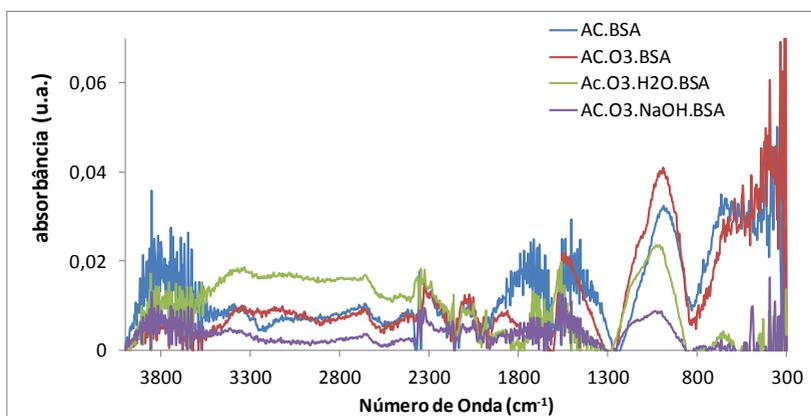
Na análise de AC.O₃.NaOH.BSA, observa-se que as bandas entre 1600-1900 cm⁻¹ e 3500-4000 cm⁻¹ são reforçadas quando comparadas com AC.O₃.NaOH (Figura 20).

Estes resultados indicam que a BSA é inserida de diferentes formas nas amostras pré-tratadas com ozônio, mas não permitem identificar quais grupamentos funcionais são os principais responsáveis pelas reações de fotoinserção.

5.4.2 Acompanhamento da Fotoinserção de Albumina por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – Análises dos carvões após as reações de fotoinserção

Os espectros de FTIR dos carvões após a reação de fotoinserção são demonstrados na Figura 45.

Figura 45 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier dos carvões após a reação de fotoinserção em presença de albumina.



Observa-se que após a reação de fotoinserção há surgimento de várias bandas largas de natureza complexa, comportamento característico na análise de proteínas como a albumina a qual possui variados grupos funcionais (Swain e Sarkar, 2013) e estes são apresentados em zonas muito próximas umas às outras.

Não é possível assim afirmar precisamente qual ou quais são exatamente os grupos inseridos. Contudo, torna-se evidente que as reações de fotólise foram responsáveis pela inserção de várias novas funcionalidades superficiais no carvão, decorrentes da albumina ou de seus fragmentos de fotólise.

As bandas entre 1600 e 1900 cm^{-1} (que no material suporte foram atribuídas presença de grupamentos carbonila, -C=O em 1650 cm^{-1}), após as reações de fotoinserção aumentaram de intensidade devido à presença de grupos N-H.

As regiões características de amida I que é a única banda mais amplamente usada em estudos de estrutura secundária da proteína, e amida II (flexão da ligação N-H acoplado aos estiramentos de C=O e C=C em 1540 cm^{-1}), inseridas pela adsorção da BSA ao suporte (Iucci et al, 2004; Song, 2010; Rondeau et al, 2007).

A hipótese da presença de resíduos aromáticos residuais de lignina, conforme observado na análise de FTIR dos gases liberados durante a análise termogravimétrica, são confirmados através do surgimento de picos intensos na região entre 1500 e 1600 cm^{-1} com uma sequência de bandas harmônicas entre 1670 e 2000 cm^{-1} (Barbosa, 2008).

Por motivos anteriormente explicados, a amostra AC.O₃-NaOH não apresentou importante alteração no seu comportamento por não ter significativa capacidade de adsorção da BSA pela ausência de grupamentos oxigenados ativos. Na região entre 2600 e 3400 cm^{-1} tem-se a região que indica o estiramento O-H da presença de água e de 3000 a 3500 cm^{-1} a presença da ligação N-H de amins oriundas dos aminoácidos componentes da proteína imobilizada, sendo esta região mais intensificada nas amostras de AC.O₃ e AC.O₃-H₂O.

5.4.3 Análise elementar – CHNOS

As análises elementares dos carvões antes e após a reação de fotoinserção com a albumina são demonstradas na Tabela 7.

Tabela 7-Análise elemental da albumina, dos carvões ativado e carvões modificados, e seus respectivos após a reação de fotoinserção de albumina.

Amostra	%N	%C	%H	%S	%O
Albumina	15,12	49,11	6,59	1,92	27,22
AC	0,39	84,58	0,30	0,55	14,18
AC:BSA	0,40	81,63	0,44	0,50	17,03
AC O ₃	0,35	78,87	0,53	0,41	19,84
AC O ₃ .BSA	0,42	70,72	0,91	0,38	27,57
AC O ₃ .H ₂ O	0,36	82,15	0,44	0,49	16,56
AC O ₃ . H ₂ O.BSA	0,32	68,71	1,16	0,33	29,48
ACO ₃ .NaOH	0,37	86,00	0,23	0,46	12,94
AC O ₃ .NaOH.BSA	0,47	80,39	0,55	0,46	18,13

As análises elementares das amostras de carvão após a reação de fotoinserção de albumina apresentam ganho na porcentagem de oxigênio para todos os carvões, sendo que o maior ganho de oxigênio foi observado para o AC.O₃-H₂O.BSA (12,92 %), seguido pelo AC.O₃.BSA (7,73 %), AC.O₃-NaOH.BSA (5,19 %) e AC.BSA (2,85 %).

Com relação ao elemento carbono, observa-se que a porcentagem deste elemento decresce após a exposição à luz UV, assim como foi evidenciado nos experimentos realizados em presença de luz e ausência de Albumina (Tabela 3). Como previamente discutido, parte da estrutura carbonosa do carvão é liberada para a fase aquosa, sendo detectada nas análises de carbono orgânico total.

Os teores de nitrogênio também aumentaram em quase todas as reações de fotólise na presença de albumina, com exceção da amostra AC O₃-H₂O.

Pode-se notar uma diminuição do teor deste elemento na amostra AC O₃-H₂O, isto ocorre, pois mesmo sendo constatada a presença de ligações características de proteína detectadas na análise de FTIR do sólido, a hidrofiliçidade deste suporte é superior a dos outros suportes, portanto, a quantidade de água retida durante a imobilização se torna um fator expressivo, notado inclusive pela elevação do teor do elemento hidrogênio, fato diferenciado das outras amostras de carvão estudadas.

O cálculo da quantidade de albumina imobilizada (molecular ou seus fragmentos) é impossibilitado, uma vez que há uma parte da estrutura carbonosa que é perdida por solubilização na fase aquosa, além de parte da albumina sofrer reações de fotólise em fase aquosa, na ausência de carvão.

5.4.4 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X (XPS)

As amostras AC.O₃ e AC.O₃.BSA (carvão oxidado com ozônio e carvão oxidado com ozônio e fotoinserido), foram selecionadas e analisadas por espectroscopia fotoeletrônica de raio-X. Os elementos C, O, N e S foram identificados e seus espectros de energia de ligação foram caracterizados por meio da deconvolução dos picos.

A Tabela 8 apresenta as bandas de energia de interesse observadas nos resultados destas análises.

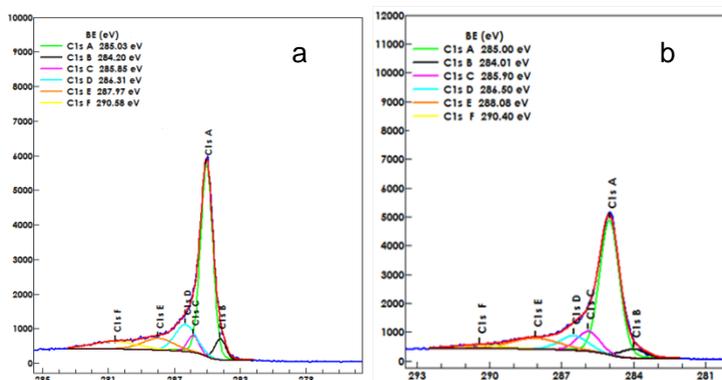
Tabela 8 - Bandas de energias do espectro XPS.

Tipo	Banda de energia (eV)
C	
Csp ³ (A)*	285
Csp ² (B)*	284-284.2
C-O (C)*	285.8-285.9
C-O (D)*	286.3-286.5
C=O (E)*	287.9-288
C=C (eletrons π de anel aromático (F))	290.4-290.6
O	
C=O	531.5
C-O (éter, éster, álcool e -O-Ar)	532.51-532.76
Oxigênio (ácido carboxílico)	533.78-533.93

* Letras relacionadas ao correspondente no espectro de XPS na Figura 46

A Figura 46 mostra os resultados dos espectros de XPS obtidos com referência ao elemento carbono.

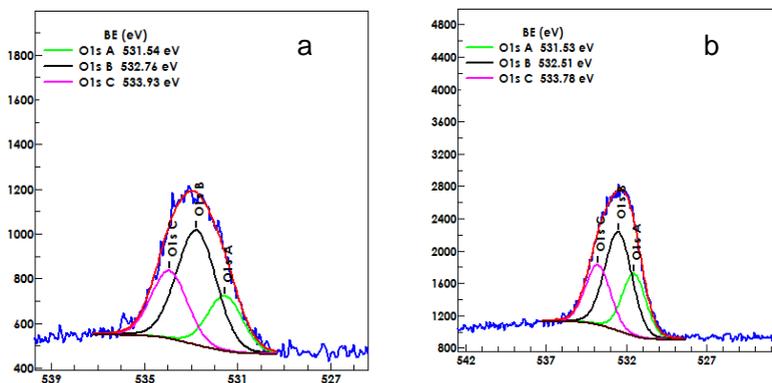
Figura 46 - Espectros de XPS de carbono das amostras (a) AC.O₃ e (b) AC.O₃.BSA.



As análises das ligações de carbono mostraram os mesmos picos característicos tanto no AC.O₃ quanto AC.O₃.BSA (Figura 46 e Figura 47), porém suas intensidades variaram. As análises de carbono para AC.O₃ e AC.O₃.BSA mostram um decréscimo na intensidade dos picos após a reação de fotoinserção, este fato também foi observado nas análises elementares demonstradas na Tabela 7 na qual a porcentagem de carbono diminui após a reação com a luz. A análise de COT do líquido coletado durante a fotólise dos carvões (Tabela 5) também apontam para o rompimento das ligações entre os carbonos com a liberação de pequenos fragmentos do carvão ativado na forma de carbono orgânico.

A Figura 47 mostra os resultados dos espectros de XPS obtidos com referência ao elemento oxigênio.

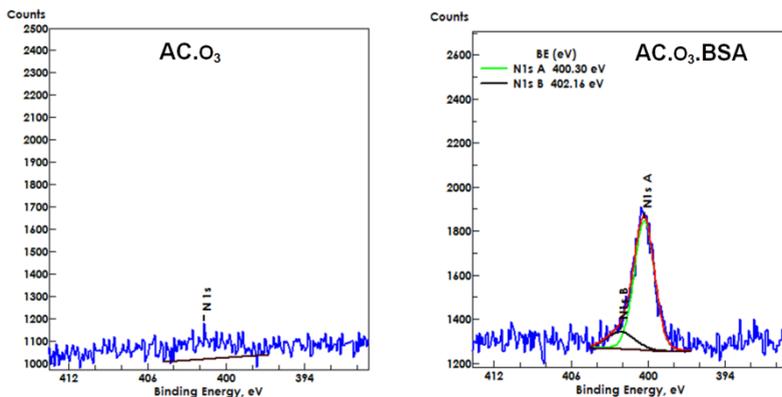
Figura 47 - Espectros de XPS de oxigênio das amostras (a) AC.O₃ e (b) AC.O₃.BSA.



A natureza dos picos observados na análise das ligações de oxigênio é a mesma para as duas amostras, porém, os picos tiveram aumento de 150 % na intensidade, indicando assim a inserção de novos grupos oxigenados após a reação com a luz UV.

A Figura 48 apresenta os resultados obtidos para a análise de XPS em relação as ligações feitas pelo elemento nitrogênio.

Figura 48 -Espectros de XPS para o nitrogênio nas amostras AC.O₃ e AC.O₃.BSA.



Os espectros relacionado ao nitrogênio da amostra AC.O₃ indicam a ausência de ligações deste elemento, como ilustrado na Figura 48. Em contrapartida as análises realizadas com a amostra AC.O₃.BSA indicam a presença de uma forte banda em 400.3 eV, esta banda de energia é característica de aminas. Ithurbide e colaboradores (2007) encontraram este mesmo sinal para albumina BSA. Assim também neste trabalho, acredita-se que o sinal de nitrogênio presente apenas na amostra AC.O₃.BSA indica a fotoinserção de albumina, ou fragmentos da proteína.

Por meio da análise elementar da BSA mostrados na Tabela 9 foi possível obter a composição atômica da BSA, levando em consideração a massa molecular da mesma que é de 66.462 g mol⁻¹ (Sigma-aldrich). Considerando também que no início a amostra de carvão AC.O₃ não apresentava porcentagens em massa de enxofre (S2p) nem nitrogênio (N1s), utilizou-se então o N para cálculo de inserção da BSA, tendo em vista que este elemento é característico para a inserção de proteínas.

Tabela 9 - Cálculos considerando a massa de BSA obtidos na análise elementar da mesma.

Elemento	massa% ^a	Mol em 100 g	Mol em 66.462 g	Aprox. ^b
C	49.11	0,41	2720,29	2720
H	6.59	6.59	4379,85	4380
N	15.12	1.08	717,79	718
S	1.52	0.05	31,90	32
O	27.66	1.73	1149,13	1149
Total	100		66.462	

^a Dados obtidos da análise elementar (Tabela 5). ^b composição atômica C₂₇₂₀H₄₃₈₀O₁₁₄₉N₇₁₈S₃₂.

Na Tabela 10 estão os valores calculados para as porcentagens de elementos esperados após a fotoinserção da BSA completa e também os dados obtidos via a análise de espectrometria de raio-x (XPS).

Tabela 10 - Composição do espectro XPS do carvão ativado ozonizado (AC.O₃) e na presença de albumina de soro bovino (AC.O₃.BSA)

Amostra	Inicial AC.O ₃ ^b	Final AC.O ₃ .BSA	Calculado ^a
elemento	%	%	%
S2p		0,49	0,15
C1s	90,99	85,14	83,87
O1s	9,02	10,91	12,53
N1s		3,45	3,45
Total	100	99,98	

^aCalculado da reação: carvão +BSA →Carvão.BSA

Observa-se que para o elemento carbono calculou-se uma porcentagem de 83,87 % de massa na amostra após a fotoinserção e, comparativamente, observou-se 85,14 % nas análises de XPS, ou seja, os dados calculados são próximos dos obtidos pela análise, podendo assim reforçar a possível fotoinserção da BSA.

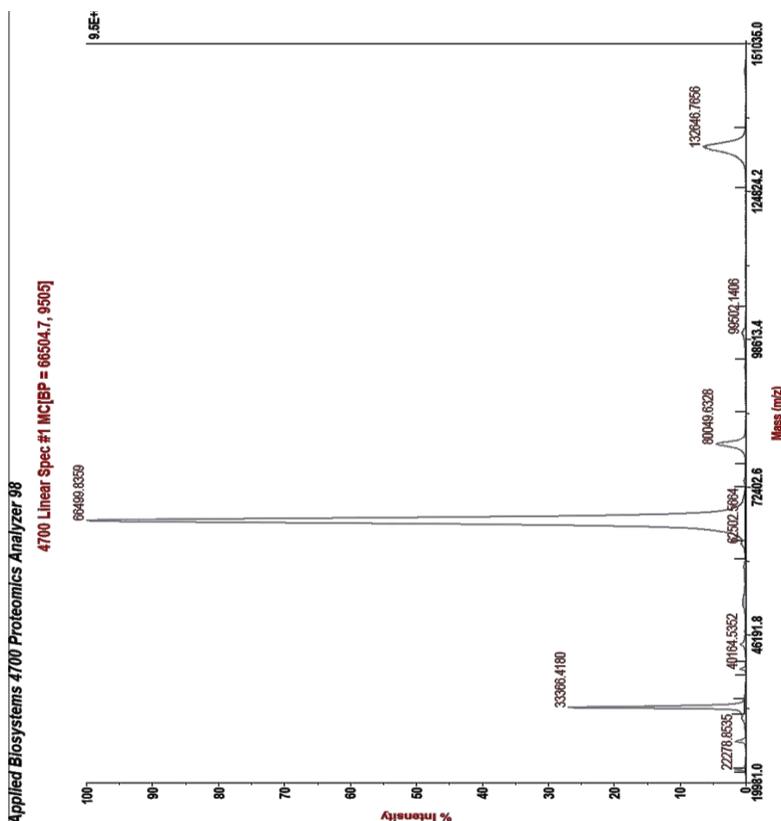
Considerando também que no início a amostra de carvão AC.O₃ não apresentava porcentagens em massa de enxofre (S2p) nem nitrogênio (N1s), utilizou-se então o N para cálculo de

inserção da BSA, tendo em vista que este elemento é característico de proteínas, comprovando a inserção.

5.4.5 Espectrometria de massa por tempo de voo com desorção a laser e ionização assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) de BSA e AC.O₃.BSA

Esta análise foi realizada como padrão de ionização e determinação dos picos característicos da molécula conforme a **Figura 49** Figura 49.

Figura 49 – Espectro de MALDI-TOF de BSA*



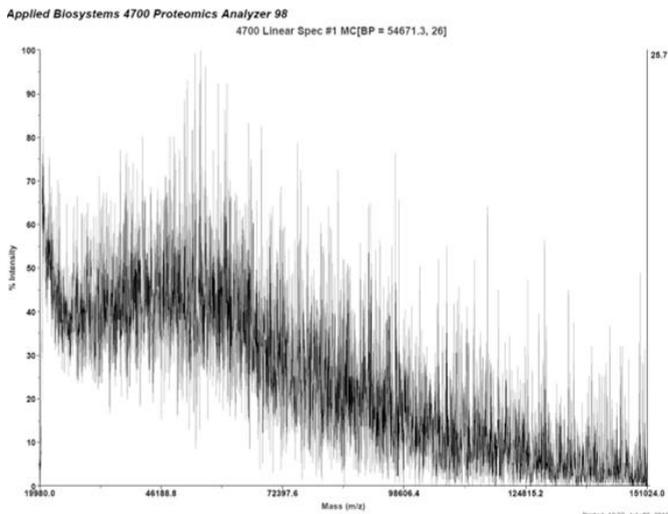
* análise realizada no Serviço de Análises Médicas de Corunha, Espanha.

As análises de MALDI-TOF realizadas com albumina BSA mostram picos de massa característicos da massa molecular da albumina, ou seja, em torno de 66500 g mol^{-1} por carga, há também o pico de 33366 que caracteriza a massa de BSA quando há duas cargas ionizadas por molécula.

Porém as análises realizadas com as amostras de carvão não apresentam ionização, sendo assim impossível observar os picos de massas dos admissíveis fragmentos orgânicos fotoinseridos.

A Figura 50 apresenta o espectro da amostra AC.O₃.BSA, porém as demais análises também apresentam espectros muito semelhantes, observa-se comparativamente que a intensidade de sinal das amostras com o carvão-albumina estão na faixa de 25.7 kv, o que é característico de amostras pouco ionizáveis (Kailasa e Wu, 2012), observando-se o espectro da albumina evidencia-se a intensidade de 9500 (Figura 49) Este resultado demonstra a forte ligação entre os carvões e os ligantes, pois a energia utilizada para ionizar uma carga positiva da amostra não foi o suficiente para romper a ligação carvão-BSA, e assim, não houve dados de tempo de voo para serem coletados, bem como obter o tamanho da molécula fotoinserida.

Figura 50 - Espectro de MALDI-TOF de AC.O₃.BSA



5.5 Reações de Fotoinserção da tirosina (T) nos diferentes carvões

As reações de fotoinserção de Tirosina foram realizadas com o objetivo de compreender melhor as reações com albumina, tendo em vista que este aminoácido é um dos produtos da decomposição da BSA (Yokoyama et. al., 2002)

A Tabela 11 apresenta os resultados das amostras de carvão submetidas aos testes de fotoinserção em solução de tirosina 100mg L^{-1} .

Tabela 11 - Análise elementar dos carvões ativado e modificados, e seus respectivos após a reação de fotoinserção de tirosina.

Amostra	%N	%C	%H	%S	%O
AC	0,39	84,58	0,30	0,55	14,18
AC.T	0,70	78,11	1,04	0,44	19,71
AC O ₃	0,35	78,87	0,53	0,41	19,84
AC O ₃ .T	0,42	77,66	0,87	0,47	20,58
AC O ₃ -H ₂ O	0,36	82,15	0,44	0,49	16,56
AC O ₃ -H ₂ O.T	0,32	79,79	0,63	0,48	18,78
AC O ₃ .NaOH	0,37	86,00	0,23	0,46	12,94
AC O ₃ .NaOH.T	0,75	84,81	0,50	0,45	13,49

Diferentemente da análise feita com a molécula de albumina durante a fotoinserção sobre os suportes estudados, no caso da tirosina, a análise da tabela de composição elementar obtida deve ser feita com base na estrutura da molécula de tirosina e sua composição molecular. Cada molécula de tirosina é composta em massa por 59,85 % de carbono, 6,08 % de hidrogênio, 7,73 % de nitrogênio e 26,52% de oxigênio. A análise da Tabela 11 em termos de oxigênio não permite observação clara da inserção da tirosina sobre o carvão. Tampouco a molécula de enxofre representaria algum valor sobre o total inserido devido a composição do aminoácido naturalmente não apresentar este elemento.

Os teores de carbono e hidrogênio medidos nesta análise também não apresentaram importância relevante em relação à quantidade de tirosina ligada aos suportes uma vez que o próprio carbono apresenta estes elementos em concentração considerável e os tratamentos realizados tendem a modificar a distribuição destes elementos no adsorvente.

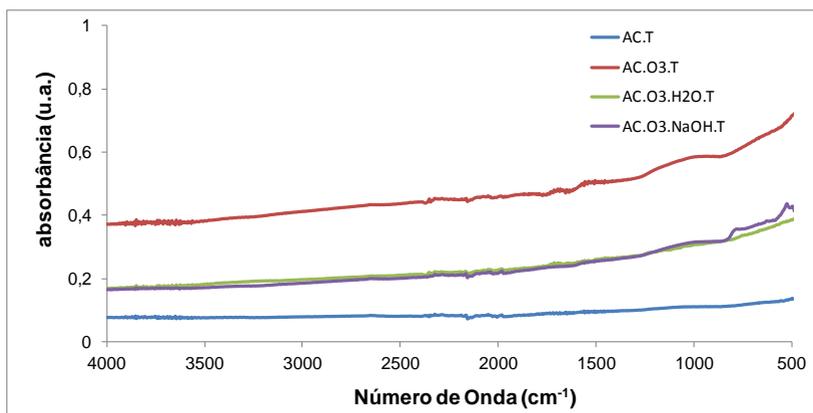
Em relação ao nitrogênio se pode observar o acréscimo de 0,31 e 0,38 % do teor medido deste elemento nas amostras AC.T e AC.O₃.NaOH.T, respectivamente. O potencial de inserção de moléculas pequenas observado no carvão ativado *in natura* teve seu potencial reduzido nas amostras ozonizadas com ozônio puro e contendo água. Este fato se deve principalmente à destruição da estrutura microporosa do carvão diminuindo sua afinidade com a matriz carbonácea produzida. Porém, a quantidade de tirosina ligada na amostra ozonizada em meio alcalino, tomando como base o teor de nitrogênio, mostra comportamento semelhante ao observado no ensaio realizado com o carvão ativo sem tratamento.

Sabe-se que a estrutura do carvão sofre modificações com a ozonização em diferentes condições reacionais. Para a amostra ozonizada em meio alcalino se pode constatar que esta contém estrutura predominantemente microporosa, fato o qual foi um obstáculo para a imobilização da albumina, porém agora favoreceu a reação com a tirosina, devido ao seu tamanho molecular reduzido em comparação com a albumina.

Embora a análise elementar dos sólidos após a reação de fotoinserção da tirosina tenham apontado pela inserção bem sucedida, nenhum dos grupamentos funcionais esperados nos sólidos foi identificado nos espectros de FTIR dos sólidos (Figura 51).

Eram esperados picos intensos entre 1600 a 1500 que caracterizariam a presença de ligações C=O de ácidos carboxílicos (1615 cm⁻¹), vibrações das ligações C-C de aromáticos (1596 cm⁻¹) e ligações NH₂ (1565 cm⁻¹) da tirosina (Wojciechowska, et al., 2012).

Figura 51 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier dos carvões após a reação de fotoinserção de tirosina.



As análises termogravimétricas dos sólidos com tirosina inserida (Figura 52 a Figura 55) revelaram que existe uma maior perda de massa para seus precursores com exceção do carvão ativado sem tratamento, o qual apresenta a maior perda de massa, o termograma do AC.T pode indicar para a inserção de tirosina, assim como observado na análise elementar para o mesmo carvão, que indicou um acréscimo de nitrogênio.

Figura 52 - Análise Termogravimétrica do AC antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.

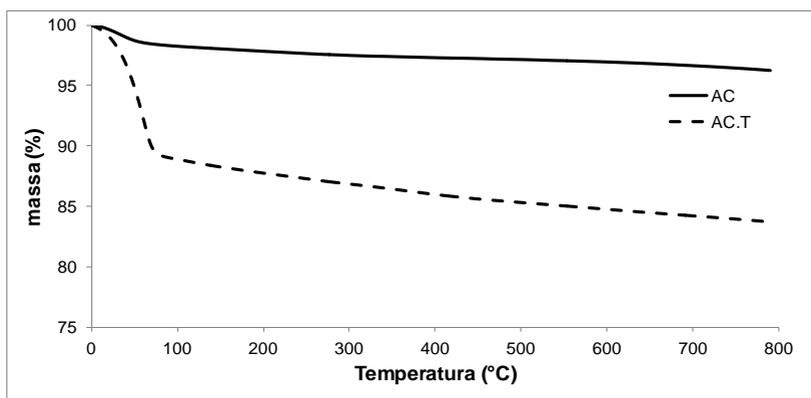


Figura 53 - Análise Termogravimétrica do AC.O₃ antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.

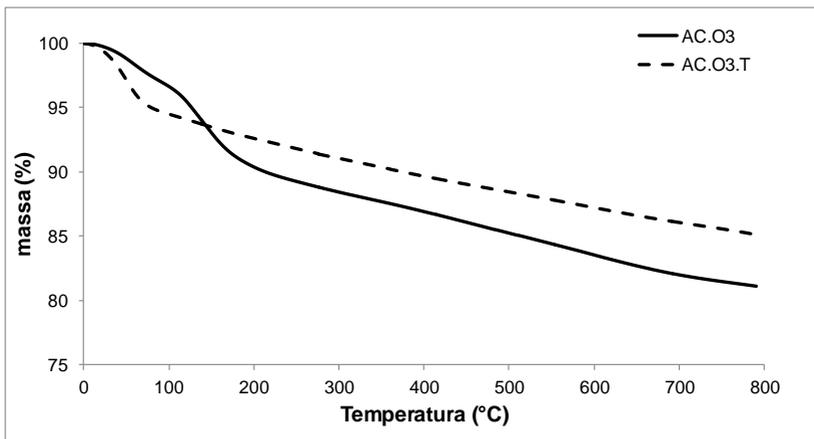


Figura 54 - Análise Termogravimétrica do AC.O₃-H₂O antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.

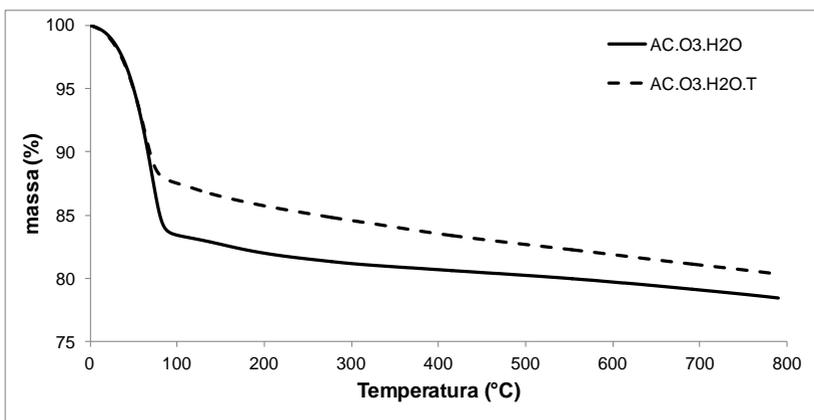
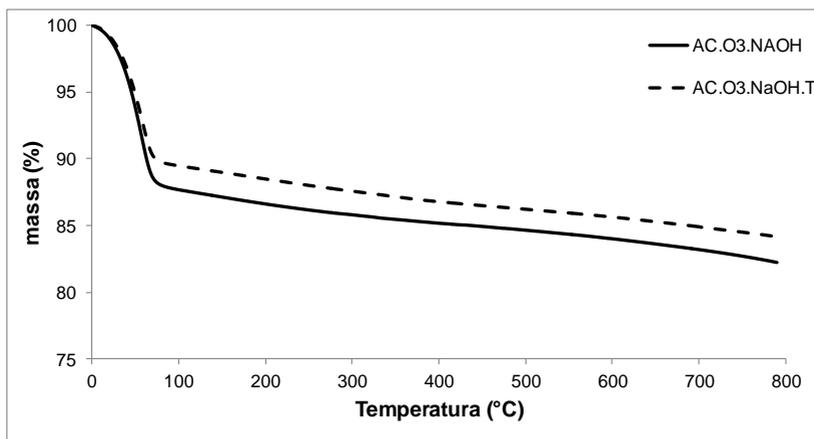


Figura 55 - Análise Termogravimétrica do AC.O₃-NaOH antes e após a reação de fotoinserção com tirosina (T), taxa de aquecimento de 5°C até o máximo de 800°C em atmosfera de N₂.



A Tabela 12 resume os valores de perda de massa dos carvões resultantes dos diferentes tratamentos, após a reação de fotoinserção, e suas respectivas atribuições.

Contudo comparando-se, a qual apresenta a perda de massa dos carvões tratados antes das reações de fotoinserção, observa-se que alguns intervalos de perda de massa também são caracterizados pela perda de matéria volátil e decomposição de ácidos carboxílicos.

O carvão que se destaca na maior perda de massa em comparação ao carvão original é o carvão ativado, com o aumento de aproximadamente 12,5 %.

Tabela 12 – Perda de massa em diferentes intervalos de temperaturas

T(°C)	AC.T	AC.O ₃ .T	AC.O ₃ . H ₂ O.T	AC.O ₃ . NaOH.T	Atribuição
<100	11,13	5,52	12,42	10,54	Perda de água da umidade do sólido
196-338	1,24	2,14	1,80	1,26	Decomposição da tirosina em p-hidróxi ácido benzoico e fenol (Culita, et al. 2008)
338-640	2,02	3,81	2,45	1,88	Decomposição do fenol (Culita et al. 2008)
Total %	16,27	14,89	19,64	15,84	

Durante o tratamento térmico, os gases emitidos do aquecimento de cada uma das amostras (Figura 56 a Figura 59) foram analisados e revelaram a presença de CO_2 , H_2O , e compostos orgânicos voláteis, principalmente.

Da mesma forma que identificado para o carvão ativado e para os carvões modificados, a sequência de picos identificados na região entre 1500 e 1660 cm^{-1} são característicos das vibrações do esqueleto aromático residual de lignina presente no carvão. Também foram identificadas as bandas atribuídas à presença de CO_2 na região entre 2250 - 2400 cm^{-1} característicos do estiramento assimétrico da ligação $\text{C}=\text{O}$ e na região entre 3500 - 4000 cm^{-1} os picos atribuídos à presença de água gerada pela liberação de umidade presente na amostra, bem como originadas pela decomposição dos grupos hidroxila.

Não foi possível identificar a presença de compostos nitrogenados ocasionalmente gerados pela decomposição da tirosina imobilizada em nenhum das amostras estudadas. Tal fato é atribuído ao tamanho médio das macromoléculas presentes no carvão em relação ao tamanho reduzido e definido da tirosina não podendo então esta técnica detectar de forma precisa a quantidade de matéria liberada exclusivamente pela tirosina sem a influência do carvão.

Figura 56 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.T durante a análise termogravimétrica.

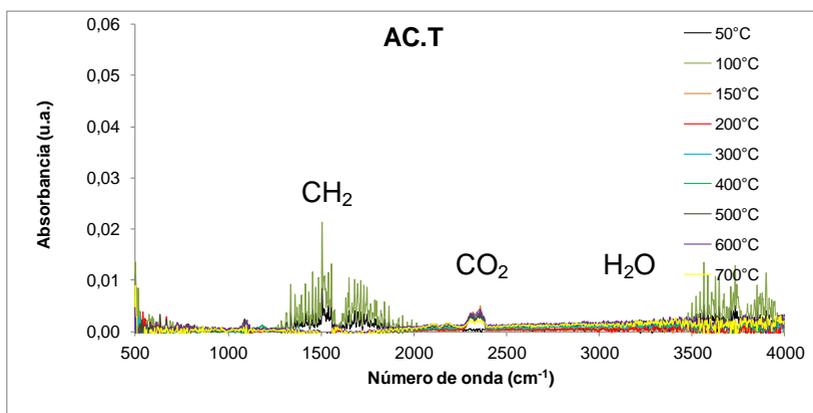


Figura 57 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃.T durante a análise termogravimétrica

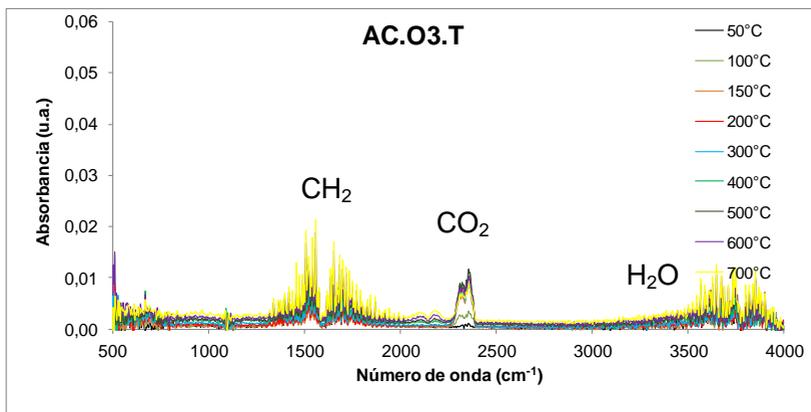


Figura 58 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-H₂O.T durante a análise termogravimétrica.

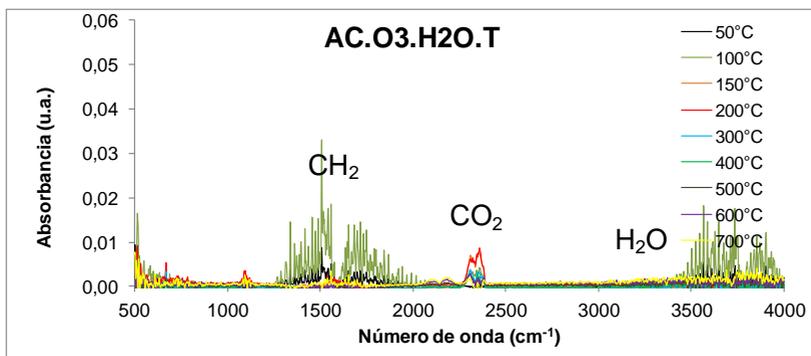
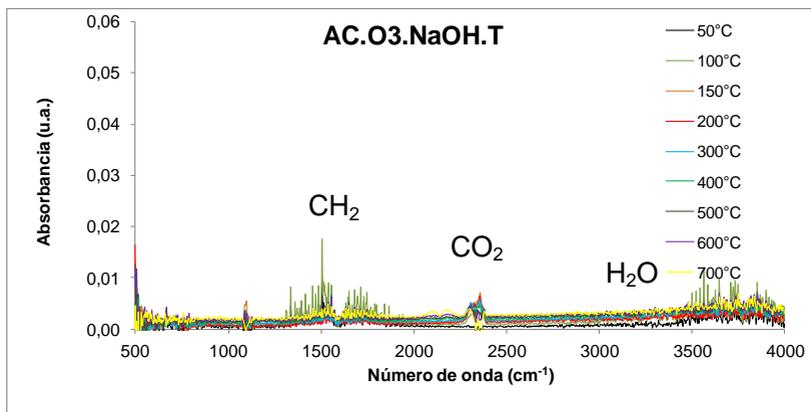


Figura 59 - Análise de FTIR dos gases coletados da amostra AC.O₃-NaOH.T durante a análise termogravimétrica.



As análises realizadas com tirosina apresentaram comportamento distinto a fotoinserção com albumina. Devido ao menor tamanho da molécula de Tyr em comparação com a proteína, a mesma não apresentou impedimento a fotoinserção com carvão ativado sem tratamento.

Já as reações com os carvões tratados com ozônio não evidenciaram a possível inserção do aminoácido, a análise elementar apresentou acréscimo na porcentagem de nitrogênio apenas para os carvões AC e AC.O₃.NaOH. Já os termogramas destacam a maior perda de massa apenas para AC em comparação com o carvão antes da reação de fotoinserção.

Assim, a tirosina não é apenas o único fragmento a se inserir durante as reações, é possível a inserção de outro fragmento maior de albumina (-Asp-Glu-Thr-Tyr-Val-Pro-Lys-) (Yokoyama et al., 2002) ou mesmo a BSA completa, tendo em vista o maior número de picos presentes no FTIR da albumina (figura 45) maior perda de massa em seus termogramas (Figura 37 a 40) em comparação as reações com tirosina.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram realizados estudos de oxidação do carvão ativado com ozônio em meios diferenciados (ozônio, ozônio em meio úmido e ozônio em meio básico). Averiguou-se que os diferentes tratamentos com ozônio produzem funcionalidades orgânicas em diferentes extensões na superfície do carvão ativado. Tanto os estudos termogravimétricos como a identificação espectroscópica no infravermelho revelaram que o tratamento com ozônio ou ozônio na presença de umidade produziram maior quantidade de funcionalidades oxigenadas, que se decompueram termicamente para liberar principalmente CO_2 em temperaturas relativamente baixas.

O ozônio molecular foi responsável pela oxidação dos carvões e a presença de radicais hidroxila, presente na formação de $\text{AC.O}_3\text{-H}_2\text{O}$ e $\text{AC.O}_3\text{-NaOH}$, inibiu a oxidação, pois apesar de sua alta reatividade este radical não é seletivo e age na decomposição do próprio ozônio molecular. Assim, quanto maior a presença de radicais hidroxila, menor a oxidação dos carvões tratados, devido às reações competitivas que ocorrem em paralelo à oxidação da superfície do carvão.

Conclui-se de que o contato direto do ozônio com o carvão favoreceram a formação mais controlada da quantidade de grupos oxigenados na superfície e que o tratamento via úmida tornaram este controle mais difícil nas condições experimentais estudadas.

Por meio das análises superficiais BET pode-se perceber que a oxidação por ozônio causou um decréscimo na área dos carvões após a oxidação, AC.O_3 obteve a maior redução com uma área de $754 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, como resultado da maior extensão de oxidação superficial. A ozonização causou um colapso de algumas paredes dos poros, diminuindo o volume ou bloqueio dos microporos pela inserção dos grupos funcionais. $\text{AC.O}_3\text{-NaOH}$ foi a amostra que apresentou a maior área superficial dentre as amostras oxidadas, porém este carvão demonstrou ter uma tendência para adsorção em monocamadas, um dos motivos pela pequena inserção de albumina.

A fotólises dos carvões foram realizadas e observou-se por meio das análises termogravimétricas, Infravermelho e Carbono Orgânico Total que durante as reações com luz UV houve

liberação de compostos orgânicos. Os termogramas demonstraram a obtenção de carvões mais estáveis termicamente, devido à perda de grupos oxidantes, confirmados pelos espectros IR com a extinção das bandas entre 1350 e 950 cm^{-1} . Logo, pode-se induzir que a decomposição por fotólise indicou sítios mais reativos a excitação pela luz e também sítios favoráveis à inserção dos compostos estudados.

Os estudos de fotólise da albumina mostraram que 78,8 % de sua intensidade de fluorescência foi perdida e que em contrapartida a absorbância no UV-vis apresentou um acréscimo de 55%. Modificações na estrutura da molécula deixaram mais expostos aminoácidos como a tirosina que tem maior absorbância em 270 nm, assim também este aminoácido é um dos responsáveis pela fluorescência da proteína.

As reações de fotoinserção de BSA apontaram para a ligação da albumina ou fragmentos da mesma. Os termogramas indicaram que os carvões obtidos das reações de inserção apresentaram maior perda de massa que seus respectivos carvões de partida. Os espectros IR evidenciaram o surgimento de bandas largas e complexas, com comportamentos característicos de proteína. E as análises elementares apresentaram ganho na porcentagem de oxigênio para todos os carvões. Já os gases liberados durante TGA analisados por FTIR mostraram distintos gases sendo liberados para cada amostra, indicando que a BSA inseriu-se de forma diferente em cada carvão.

Dentre os carvões estudados o que apresentou melhor inserção foi o carvão AC.O_3 .BSA, suas análises de área superficial indicam a menor área superficial, ou seja, maior oxidação do seu carvão de partida. Assim também, seu termograma apresentou maior perda de massa nos intervalos de 100 a 180°C e 180 a 500°C característicos da desnaturação e decomposição da BSA respectivamente.

Por este motivo analisou-se o carvão AC.O_3 e AC.O_3 .BSA por espectroscopia fotoeletrônica de Raio-x e confirmou-se a fotoinserção pelo aumento dos picos de oxigênio em 150% na amostra AC.O_3 .BSA, o espectro de nitrogênio que não estava presente em AC.O_3 foi evidenciado na amostra com albumina este pico de nitrogênio em 400,3 eV é característico de amina da albumina.

Por ser destacado na literatura que a tirosina é um dos fragmentos da fotólise de albumina fez-se o estudo da fotoinserção deste aminoácido nos carvões. Porém as análises realizadas com tirosina apresentaram comportamento distinto à fotoinserção com albumina. Concluindo-se assim, que a as reações com albumina não inseriram apenas tirosina, ligaram-se fragmentos maiores ou até toda a proteína.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreescu, S., Luck, L. A.; Studies of the binding and signaling of surface-immobilized periplasmic glucose receptors on gold nanoparticles: A glucose biosensor application. **Anal. Biochem.** v. 375, p. 282,290, 2008.

Aygun, A., Yeniosoy-Karakas, S., Duman, I.; Production of granular activated carbon from fruit stones and nutshells and evaluation of their physical, chemical and adsorption properties. **Micropor. Mesopor. Mater.** v. 66, p. 189- 214, 2003.

Bailey, P. S.; Carter, T. P.; Fischer, C. M.; Thompson, J. A.; **Can. J. Chem.** v. 51, p. 1278,1973.

Bain, C. D., Trought, E. B., Tao, Y. Ewall, J., Whitesides, G. M., Nuzzo, R.; Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold. **J. Am. Chem. SOC.** v. 111, p. 321-335, 1989.

Bandoz, T. J.; Effect of pore structure and surface chemistry of virgin activated carbons on removal of hydrogen sulfide. **Carbon.** v. 37, p. 483-489, 1999.

Bandoz, T. J.; Activated carbon surfaces in environmental remediation, **New York: Elsevier.** v. 7, p. 571, 2006.

Barbosa, I. C. A., Pereira, U. A., Teixeira, R. R. Maltha, C. R. A., Fernandes, S. A., Forlani, G.; Synthesis and Phytotoxic Activity of Ozonides. **J. Agric. Food Chem.** v.56, p. 9434-9440, 2008.

Beltrán, F.J.; Rivas, J.; Álvarez, P.; Montero-de-Espinosa, R. Kinetics of Heterogeneous Catalytic Ozone Decomposition in Water on an Activated Carbon. **Ozone Sci. Eng.** v. 24, p.227-237, 2002.

Bioscan:

<http://www.bioscan.com.br/industria/biotecnologia/fenotipagemmicroarranjo/comofuncionafenotipagemmicroarranjo/comofuncionafenotipagemmicroarranjo.html> acessado em maio de 2014.

Bradley, R.H., Sutherland, I., Sheng, E. Relationship between Carbon Black Surface Chemistry and Energy. **J. Chem. Soc. Faraday. Trans.** v.91 (18), p. 3201-3207, 1995.

Boehm, H. P.; Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment. **Carbon.** v. 40, p. 145-152, 2002.

Brorson, S.; Bovine Serum Albumin (BSA) as a Reagent Against Non-specific Immunogold Labeling on LR-White and Epoxy Resin. **Pergamon.** v. 28 (3), p. 189-195, 1997.

Bujacz, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. **Biological Crystallography.** v. 68 (10), p. 1278-1289, 2012.

Cao, J., Xiao, G., Xu, X., Shen, D., Jin, B.. Study on carbonization of lignin by TG-FTIR and high-temperature carbonization reactor. **Fuel Processing Technology.** v.106, p. 41-47, 2013.

Cardoso, C. L., Morales, M. C., Cass, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quím. Nova.** v. 32, 2009.

Carpio, C.; González, P., Ruales, J., Batista-Viera, F.; Bone-bound enzymes for food industry application. **Food Chem.** v. 68. p.403-407, 2000.

Carter, D. C., Ho, J. X.. Structure of Serum-Albumin. **Adv. Prot. Chem.** v. 45, p. 153-203, 1994.

Carvalho, W., Canilha, L., da Silva, S. S.; Uso de Biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de Bioprocessos. **Revista Analytica.** v.23, p. 60-72, 2006.

Chen, C-X., Huang, B., Li, T., Wu, Preparation of phosphoric acid activated carbon from sugarcane bagasse by mechanochemical processing. **Bio Resources.** v.7(4), p. 5109-5116, 2012.

Chiang H.-L., C.P. Huang, P.C. Chiang, Ozonation of activated carbon and its effects on the adsorption of VOCs exemplified by

methylethylketone and benzene. **Chemosphere**. v. 47, p. 267-275, 2002.

Chiang H.-L., C.P. Huang, P.C. Chiang, The surface characteristics of activated carbon as affected by ozone and alkaline treatment, **Chemosphere**. v.47, p. 257–265. 2002 b

Contescu, A., Contescu, C., Putyera, K., Schwarz, J. A.; Surface acidity of carbons characterized by their continuous pK distribution and boehm titration. **Carbon**. v. 35 (1), p. 83-94, 1997.

Csach, K., Juríkov, Miskuf, J., Koneracká, M., Závisová, V., Kubovčíková M., Kopcanský, P.; Thermogravimetric Study of the Decomposition of BSA-Coated Magnetic Nanoparticles. **Acta Physica Polonica A**. v. 121, p. 1293-1295, 2012.

Culita, D. C., Marinescu, G. Patron, L., Carp, O., Cizmas, C. B., Diamandescu, L. Superparamagnetic nanomagnetites modified with histidine and tyrosine. **Mater. Chem. Phys.** v. 111, p. 381-385, 2008.

Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M. G., Soldi, V.; Aplicações sintéticas de Lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**. v. 4, p. 623-630, 2004.

Danish, M., Hashim, R., Ibrahim, M., Sulaiman, O.; Optimized preparation for large surface area activated carbon from date (*Phoenix dactylifera* L.) stone biomass. **Biomass and Bioenergy**. v. 61, p. 167-178, 2014.

Di Bernardo, L.; Dantas, A. D. B. Métodos e técnicas de tratamento de água. São Carlos: Rima, 2005. v. 2, 784 p.

Di Serio, M.; Maturo, C., Alteris, E.; Parascandola, P.; Tesser, R.; Santa Cesaria, E.; Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**. v.79-80, p. 333-339, 2003.

Durán, N., et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, p. 907-931, 2002.

Figge J., Rossing T. H., Fencel V., The role of serum proteins in acid-base equilibria. **J Lab Clin Med.** v.117, p. 453-467, 1991.

Fitchorov, A. A. K., Amiji, M., Sridhar, S.. Sustained drug release from non eroding nanoporous templates. **Small** v. 6, p. 213-216, 2010.

Foresti, M. L.; Ferreira, M. L. Chitosan-Immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology.** v.40, p. 769-777, 2007.

Freitas, L., Perez, V. H., Santos, J. C., De Castro, H. F., Enzymatic Synthesis of glyceride Esters in solvent-Free System: Influence of the Molar Ratio, Lipase Source and Functional Activating Agent of the Support. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 18, p. 1360, 2007.

Fritzen-garcia et al. Atomic force microscopy imaging of polyurethane nanoparticles onto different solid substrates. **Mater. Sci. Eng.**, C, v. 29, p. 405-409, 2009.

Furlán, L. T.; Campderrós, M. E. Effect Mg^{2+} binding on transmission of bovine serum albumin (BSA) through ultrafiltration membranes. **Separation and Purification Technology.** v.150, p. 1-12, 2015.

Garcia, M. B. F.; **Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase imobilizada em bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas.** Florianópolis, 2010. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

Gékas, V.; Lopez-Leiva, M.; Hydrolysis of lactose: A literature Review. **Process Biochemistry.** v. 20, p.2-12, 1985.

Girelli, A. M., Mattei, E.; Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **J. Chromatogr. B.** v. 819, p. 3-16, 2005.

Goldberg, R. J. A Theory of Antigen Reactions. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody. **Journal of the American Chemical Society.** v.74 (22), p. 5715-5725, 1952.

Gómez-Serrano, V., Alvarez, P. M., Jaramillo, J., Beltrán, F. J. Formation of oxygen complexes by ozonation of carbonaceous materials prepared from cherry stones I. Thermal effects. **Carbon.** v. 40, p. 513 -522, 2002.

Held, P.; Quantitation of Peptides and Amino Acids with a Synergy™HT using UV Fluorescence. **Biotek**, 2003.

Ithurbide, A., Frateur, I., Galtayries, A., Marcus, P.. XPS and flow-cell EQCM study of albumin adsorption on passivated chromium surfaces: influence of potential and pH. **Electrochimica Acta.** v.53, p. 1336-1345, 2007.

Iucci, G., Polzonetti, G., Infante G., Rossi, L.; XPS and FT-IR spectroscopy study of albumin adsorption on the surface of a p-conjugated polymer film. **Surface and Interface Analysis.** v. 36, p. 724-728, 2004.

Jegannathan, K.R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., Ravindra, P.; Production of biodiesel using immobilized lipase critical review. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 28, p. 580-588, 2011.

Kailasa, S. K., Wu, H., Functionalized quantum dots with dopamine dithiocarbamate as the matrix for the quantification of efavirenz in human plasma and as affinity probes for rapid identification of microwave tryptic digested proteins in MALDI-TOF-MS. **J. Proteomics.** v. 75 (10), p. 2924-2933, 2012.

Kim, D., Lee, H. I., Yei, J. E., Kim, S. J., Kim, J. M.; Ordered mesoporous carbons: implication of surface chemistry, pore structure and adsorption of methyl mercaptan. **Carbon.** v. 43, p. 1868-1873, 2005.

Kim, J-H, Cho, S., Bae, T-S, Lee, Y-S.; Enzyme biosensor based on an N-doped activated carbon fiberelectrode prepared by a thermal solid-state reaction. **Sensors and Actuators B**. v 197, p. 20-27, 2014.

Kim, W., Huh, Kim, A., Huh, C., Park, C. W., Ah, C. S., Kim, B. K., Yang, J-H., Chung, K. H., Choi, Y. H., Hong, J., Sung, G. Y.; Photo selective protein immobilization using bovine serum albumin. **Applied Surface Science**. v. 261, p. 880-889, 2012.

Kumar, S., Nahar, P.; Sunlight-induced covalent immobilization of proteins. **Talanta**. v.71, p. 1438-1440, 2007.

Kyprianou, D., Guerreiro, A. R., Nirschi, M., Chianella, I., Subrahmanyam, S., Turner, A. P. F., Piletsky, S.; The application of polythiol molecules for protein immobilisation on sensor surfaces. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25, p. 1049-1055, 2010.

Li, J., Wu, Z., Wang, H., Shen, G., Yu, R.; A reusable capacitive immunosensor with a novel immobilization procedure based on 1,6-hexanedithiol and nano-Au self-assembled layers. **Sensors and Actuators B**. v 110, p. 327-334, 2005.

Li, J., Wu, Z., Wang, H., Shen, Yu, R.; A reusable capacitive immunosensor with a novel immobilization procedure based on 1,6-hexanedithiol and nano-Au self-assembled layers. **Sensors and Actuators B**. v. 110. p. 327-334, 2005.

López-Garzón, F. J, Domingo-García, M., Pérez-Mendoza, M., Alvarez, P. M., Gómez-Serrano, V.; Textural and Chemical Surface Modifications Produced by Some Oxidation Treatments of a Glassy Carbon. **Langmuir**. v. 19, p. 2838-2844, 2003.

Manahan, S. E. Environmental Chemistry: **Photochemical smog**; Boca Raton: CRC Press LLC. 2000.

Manchester, S., Wang, X., Kulaots, I., Gao, Y., Hurt, R. H.; High capacity mercury adsorption on freshly ozone-treated carbon surfaces. **Carbon**. v. 46 (3), p. 518-524, 2008.

Mandal, G.; Bardhan, M.; Ganguly, T.; Interaction of bovine serum albumin and albumin-gold nanoconjugates with L-aspartic acid. A spectroscopic approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.81(1), p.178-184, 2010.

Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Grazu, V., Pessela, B. C. C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Vieira, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J. M.; Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 456-462, 2005.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente-Fernandez, R.; Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.** v. 40, p 1451-1463, 2007.

Mendes, A. A., Castro, H. F., Rodrigues, D. S., Adriano, W. S., Tardioli, P. W., Mammarella, E. J.; Giordano, R. C., Giordano, R. L. C.; Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 38, p. 1055-1062, 2011.

Mezzasoma, L., Bacarese-Hamilton, T., Di Cristina, M., Rossi, R., Bistoni, F., Crisanti, A.; Antigen Microarrays for Serodiagnosis of Infectious Diseases. **Clinical Chemistry**. v. 48 (1). p. 121-130, 2002.

Mitchell, P.; A perspective on protein microarrays. **Nature biotechnology**. v. 20. p. 225-229, 2002.

Mohammad-Khah, A., Ansari, R.; Activated Charcoal: Preparation, characterization and Applications: A review article. **Int.J. ChemTech Res.** v. 1 (4), p. 859 – 864, 2009.

Moreno-Castilla, C., Ferro-García, M. A., Joly, J. P., Bautista-Toledo, I., Carrasco-Marín, F., Rivera-Utrilla, J.; Activated Carbon Surface Modifications by Nitric Acid, Hydrogen Peroxide, and

Ammonium Peroxydisulfate Treatments. **Langmuir**. v. 11, p. 4382-4392, 1995.

Morris, B. A., Sadana, A.; A fractal analysis for the binding of riboflavin binding protein to riboflavin immobilized on a SPR biosensor. **Sensors and Actuators B**. v. 106. p.498-505, 2005.

Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces. **Phys . Chem. Chem. Phys.** , v. 7 , p. 3773-3784, 2005.

Murphy, L.; Biosensors and bioelectrochemistry, **Currente Opinion in Chemical Biology**. v. 10. p. 177-184, 2006.

Nakamura, K.; ERA, S.; OZAKI, Y.; SOGAMI, M.; HAYASHI, T.; MURAKAMI, M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. **Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.**, v.417, p. 375-378, 1997.

Naqvi, A., Nahar, P., Ganghi, R. P.; Introduction of Functional Groups onto Polypropylene and Polyethylene Surfaces for Immobilization of Enzymes. **Analytical Biochemistry**. v. 306, p. 74-78, 2002.

Nevskaia, D. M., Santianes, A.; Munõz, V., Ruiz, A. G., Interaction of aqueous solution of phenol with commercial activated carbons: na adsorption and kinetc study. **Carbon**. v.37, p. 1065-1070, 1999.

Neves- Petersen, M. T., Snabe, T., Klitgaard, S., Duroux, M., Petersen, S. B.; Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces. **Protein Science**. v. 15, p. 343-351, 2006.

Neves-Petersen, M. T., Gajula, G. P., Petersen, S. B.; UV Light Effects on Proteins: From Photochemistry to Nanomedicine. **Molecular Photochemistry**. p.125- 158, 2012.

Oliveira, A. R. M., Wosch, C. L. Ozonólise: a busca por um mecanismo. **Química Nova**. v.35, 2012.

Pavlickova, P., Shneider, E. M., Hug, H.; Advances in recombinant antibody microarrays. **Clinica Chimica Acta**. v. 343. p. 17-35, 2004.

Pedersen, J. A., Simpson, M. A., Bockheim, J. G., Kumar, K. Characterization of soil organic carbon in drained thaw-lake basins of Arctic Alaska using NMR and FTIR photoacoustic spectroscopy. **Org. Geochem**. v.42 (8), p. 947-954, 2011.

Perdue Science :

http://www.stat.purdue.edu/sbc/protein_array_analysis.html
acessado em maio de 2014.

Peter, J. T., Serum Albumin. **Adv Protein Chem**. v. 17, p. 161 1985.

Petersen, S. B., Neves-Petersen, M. T., Klitgaard, S., Douroux, M. C.; Micrometer sized immobilization of protein molecules onto Quartz, Silicium and Gold. **Photon Processing in Microelectronics and Photonics**. v.6, 2006.

Poppe, J. K.; Costa, A. P. O; Brasil, M. C.; Rodrigues, R. C.; Ayub, M. A. Multipoint covalent immobilization of lipase on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 94, p. 57-62, 2013.

Putzbach, W., Ronkainen, N.; Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**. v. 13, p. 4811-4840, 2013.

Romaškevič, T., et al. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, v. 17, p. 74–89, 2006.

Rondeau, P.; Bourdon, E.; The glycation of albumin: Structural and functional impacts. **Biochimie**. v. 93(4), p. 645-658, 2011.

Rondeau, P., Armenta, S., Caillens, H., Chesne, S., Bourdon, E.; Assessment of temperature effects on b-aggregation of native and glycated albumin by FTIR spectroscopy and PAGE: Relations between structural changes and antioxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 460, p. 141-150, 2007.

Salame, I. I.; Bandoz, T. J.; Study of water adsorption on activated carbon with different degree of surface oxidation. **J. Colloid Interface Sci.** p. 201-367, 1999.

Santiago, M., Stüber, F., Fortuny, A., Fabregat, A., Fonte, J.. Modified activated carbons for catalytic wet air oxidation of phenol. **Carbon**. v.43 (10), p. 2134-2145, 2005.

Sassolas, A., Blum, L. J., Leca-Bouvier, B. D.; Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol. Adv.** v.30, p. 489-511, 2012.

Scheer, A. P.; **Desenvolvimento de um Sistema para Simulação e Otimização do Processo de Adsorção para Avaliação da Separação de Misturas Líquidas**. Campinas, 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química.

Schweitzer, B., Predki, P. Snyder, M.; Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. **Proteomics**. v. 3. p. 2190-2199, 2003.

Sheldon, R. A., Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Syntesis & Catalysis**. v.349 (8-9), p. 1289-1307, 2007.

Simonelli, G.; Arancibia, E. L.; Effects of size surface of zinc oxide (ZnO) particles on interactions with bovine serum albumin (BSA). **Journal of Molecular Liquids**. v. 211, p. 742-746, 2015.

Singh, Surjit; Wu, Chunfei; Williams, Paul T.. Pyrolysis of waste materials using TGA-MS and TGA-FTIR as complementary characterisation techniques. **J. Anal and Appl Pyrolysis**. v.94, p.99-107, 2012.

Smísek, M.; Cerný, S. Active carbon: manufacture, properties and applications. **New York: Elsevier**, 1970.

Solanki, P. R., et al. Application of self-assembled monolayer of 10-carboxy-1-decanethiol for cholesterol biosensor. **J. Biomed. Pharm. Eng.**, v. 2, p. 7-13, 2008.

Song, L. **Sorption of Bovine Serum Albumin on Nano and Bulk Oxide Particles**. Dissertation (Master of Science), Massachusetts, 2010. University of Massachusetts – Amherst.

Stobinski, L., Lesiak, B., Kover, L., Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. **Journal of Alloys and Compounds**. v. 501, p. 77– 84, 2010

Strzemiecka, B., Voelkel, A., Donate-Robles, J., Martín-Martínez, J. M., Assessment of the surface chemistry of carbon blacks by TGA-MS, XPS and inverse gas chromatography using statistical chemometric analysis. **Applied Surface Science**. v. 316, p. 315-323, 2014.

Sutherland, E., Sheng, R. H., Brandley, P. K., Freakley, P. K.; Effects of ozone oxidation on carbon black surfaces. **Journ. Of. Mater. Sci.** v. 31, p. 5651-5655, 1996.

Swain, S. K.; Sarkar, D.; Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles. **Applied Surface Science**. v. 286, p. 99-103, 2013

Trevizan, A. R., Villanuevaç F. C. A.; Muraoka, T.; Nascimento Filho; V. F.; Abreu Junior, C. H.; Aplicação de fósforo para imobilização do cádmio em solo contaminado. **Química Nova**. v. 33 (6), 2010

Valdés, H., Sánchez-Polo, M., Rivera-Urtilla, J., Zaror, C. A., Effect of Ozone Treatment on Surface Properties of Activated Carbon. **Lagmuir**. v.18, p. 2111-2116, 2002.

Vitolo, M. Imobilização de enzimas. **Biotecnologia industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgar Blücher, v. 3, p. 391-412, 2001.

Werner, R. *Essential Biochemistry and Molecular Biology*, **Appleton & Lange**, v.304, p.443, 1992.

Wojciechowska, A., Gagor, A., Trusz-Zdybek, A. Synthesis, structure and properties of [Zn(L-Tyr)₂(bpy)]₂·3H₂O·CH₃OH complex: Theoretical, spectroscopic and microbiological studies. **J. Inorg. Biochem.** v. 117, p. 93-102, 2012.

Wright, J., et al., Micropatterning of myosin on O-acryloyl acetophenone oxime (AAPO), layered with bovine serum albumin (BSA). **Biomedical Microdevices**. V. 4(3): p. 205-211, 2002.

Wu, L., Sitamraju, S., Xiao, J., Liu, B., Li, Z., Janik, M. J., Song, C. Effect of liquid-phase O₃ oxidation of activated carbon on the adsorption of thiophene. **Chem. Eng. Journal**. v.242, p. 211-219, 2014.

Xiao, J., Wu, L., Wu, Y., Liu, B., Daí, L., Li, Z., Xia, Q., Xi, H., Effect of gasoline composition on oxidative desulfurization using a phosphotungstic acid/activated carbon catalyst with hydrogen peroxide. **Appl. Energy**. v.113, p. 78-85, 2014.

Yokoyama, Y., Sato, H., Tsuchiya, M., Elucidation study of thermal decomposition products of human serum albumin using liquid ionization mass spectrometry. **Talanta**. v.57, p. 667-673, 2002.

Zang, M., Resende, F. L. P., Moutsoglou, A., Rayane, D. E.; Pyrolysis of lignin extracted from prairie cordgrass, aspen, and Kraft lignin by Py-GC/MS and TGA/FTIR. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 98, p. 65-71, 2012.

Zhao, X., Liu, D.; Chemical and thermal characteristics of lignins isolated from Siam weed stem by acetic acid and formic acid delignification. **Industrial Crops and Products**. v.32, p. 284-291, 2010.

Zeng, M-X., Li, Y-J., Ma, M-Y., Chen, W., Li, L-Y.. Photocatalytic activity and kinetics for acid yellow degradation over surface composites of TiO₂-coated activated carbon under different photocatalytic conditions. **Trans. Nonferrous. Met. Soc. China.** v. 23, p. 1019-1027, 2013.

Zhou, X., Gao, Q., Feng, W., Pan, K.; Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase on Bamboo Charcoal to Resolve (R,S)-Phenylethanol in Organic Medium. **Chem EngTechnol.** v. 36 (7), p. 1249-1254. 2013.

Zhu, H., Snyder, M.; Protein Chip technology. **Current Opinion.** v. 7, p 55-63, 2003