



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS



TESE DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS QUITOSANA/SILICATOS EM CAMADAS PARA USO COMO SUPORTE ENZIMÁTICO NA CONSTRUÇÃO DE UM BIOSENSOR DE URÉIA

Aluna: Carla Ramalho Costa Braga

Orientadora: Profa. Dra. Suédina Maria de Lima Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande – Paraíba
Fevereiro de 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS
QUITOSANA/SILICATOS EM CAMADAS PARA USO COMO SUPORTE
ENZIMÁTICO NA CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR DE URÉIA**

Carla Ramalho Costa Braga

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Suédina Maria de Lima Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Agência Financiadora: CNPq/INAMI

Campina Grande - PB
Fevereiro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

B813d Braga, Carla Ramalho Costa.
Desenvolvimento e caracterização de membranas quitosana/silicatos em camadas para uso como suporte enzimático na construção de um biossensor de uréia / Carla Ramalho Costa Braga. - Campina Grande: UFCG, 2012.
118 f.: il. col.

Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Orientadora: Profa. PhD. Suédina Maria de Lima Silva e Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook.
Referências.

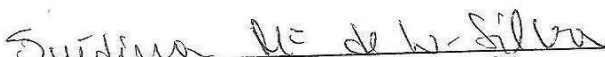
1. Quitosana. 2. Silicato. 3. Membrana. I. Título.


CDU 677.473(043)


**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS
QUITOSANA/SILICATOS EM CAMADAS PARA USO COMO SUPORTE
ENZIMÁTICO NA CONSTRUÇÃO DE UM BIOSENSOR DE URÉIA**

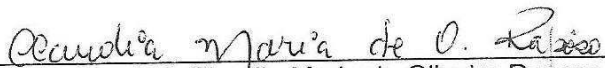
Aluna: CARLA RAMALHO COSTA BRAGA


Tese Aprovada em 03/02/2012 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:


Dr.^a. Suédina Maria de Lima Silva
Orientadora
UAEMa – UFCG


Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Co-Orientador
UAEMa – UFCG


Dr. Hélio de Lucena Lira
Examinador Interno
UAEMa/UFCG


Dr.^a. Claudia Maria de Oliveira Raposo
Examinador Externo
DMG/UFCG


Dr.^a. Lucina Rocha Sousa
Examinadora Externa
DCSS/UFPB

Campina Grande – Paraíba
Fevereiro de 2012

Dedicatória

*Aos meus pais Clodoaldo e Anilda
Aos meus irmãos Tércio e Túlio*

Agradecimentos

- ❖ *A Deus.*
- ❖ *Aos meus pais, Anilda e Clodoaldo, que sempre me apoiaram e que nunca mediram esforços para realização dos meus sonhos.*
- ❖ *Aos meus irmãos Tércio e Túlio pelo apoio e incentivo em todos os momentos.*
- ❖ *À professora Suédina Silva, pela valiosa contribuição, motivação e orientação para a concretização desta pesquisa.*
- ❖ *Ao professor Marcus Vinícius pela valiosa contribuição.*
- ❖ *Aos professores Laura Carvalho, Tomas Melo e Edcleide Araújo por me incentivarem a dar meus primeiros passos como pesquisadora sendo aluna de iniciação científica.*
- ❖ *Ao professor Marcelo Rabello pelos valiosos ensinamentos em disciplinas da graduação e da pós-graduação.*
- ❖ *Ao professor Heber Ferreira pelos valiosos ensinamentos e doação da montmorilonita sódica comercial Cloisite®.*
- ❖ *À professora Claudia Raposo, pelo apoio, sabedoria e amizade.*
- ❖ *À professora Lucina Rocha pela valiosa contribuição.*
- ❖ *À professora Denise Petri do instituto de química da USP pela valiosa contribuição para a realização dos ensaios de adsorção enzimática.*
- ❖ *À Marly Soldi do instituto de química da UFSC pela realização das análises termogravimétricas.*
- ❖ *À Daniela pela realização das análises por Difractometria de Raios X.*
- ❖ *À Kaline pela realização das análises por Espectroscopia na Região do Infravermelho.*
- ❖ *A Emanuel pela realização das análises por Microscopia Eletrônica de Varredura.*

- ❖ *À Daniella Cibele pela realização das análises por Calorimetria Exploratória Diferencial.*
- ❖ *Aos colegas do laboratório de nanocompósitos poliméricos (Nanopol) Kirlyanne, Luana, Luciane, Nadie, Pedro, Rafaella, Raquel, Rebeca e Rillen pelo companheirismo e auxílio no desenvolvimento experimental desta pesquisa.*
- ❖ *A Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais (UAEMA/UFCG) pela disponibilização dos laboratórios para preparação e caracterização das amostras.*
- ❖ *A Bentonit União Nordeste/PB pela doação da bentonita Argel 35.*
- ❖ *Ao Inct/INAMI e ao CNPq pelo suporte financeiro para participação e apresentação de trabalhos em eventos, além da disponibilização de recursos para concretização deste trabalho.*
- ❖ *A todos da UAEMA da UFCG, funcionários, graduandos e pós-graduandos pelo companheirismo.*
- ❖ *Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta pesquisa.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- Abs – Absorbância
- Ag/AgCl – Prata/cloreto de prata
- Al³⁺ – Íon alumínio (III)
- AN – Bentonita sódica Argel 35
- AP – Bentonita sódica Argel 35 purificada
- Atm – Atmosfera
- Ca²⁺ – Íon cálcio (II)
- CL – Montmorilonita sódica comercial Cloisite[®]
- CLT – Caulinita
- Cm – Centímetro
- CO₂ – Dióxido de Carbono
- Cr²⁺ – Íon cromo (II)
- Cr³⁺ – Íon cromo (III)
- CTC – Capacidade de Troca de Cátions
- d₀₀₁ – Distância interlamelar (interplanar) basal
- DRX – Difração de raios-X
- DSC – Calorimetria exploratória diferencial
- E – Enzima
- ES – Complexo enzima/substrato
- ESI – Eletrodos seletivos a íons
- F⁻ – Íon flúor (I)
- Fe²⁺ – Íon ferro (II)
- Fe³⁺ – Íon ferro (III)
- g – Grama
- g/cm³ – Grama por centímetro cúbico
- GPa – Giga pascal
- h – Hora
- IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

- IV – Infravermelho
- K_M – Constante de Michaelis
- kPa – Quilo pascal
- K_{AB}^{POT} – Coeficiente de seletividade potenciométrico
- L.D. – Limite de detecção
- L.N. – Limite nernstiano
- Li^+ – Íon lítio (I)
- meq/g – Miliequivalente por grama
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- Mg – Miligrama
- mg/dL – Miligrama por decilitro
- Mg^{2+} – Íon magnésio (II)
- mL – Mililitro
- mm – Milímetro
- mM – Milimolar
- MMT – Montmorilonita
- Mn^{2+} – Íon manganês (II)
- $molL^{-1}$ – Mol por litro
- MPa – Mega pascal
- mV – Milivolt
- Na^+ – Íon sódio (I)
- $-NH_3^+$ – Grupo amino protonado
- NH_4^+ – Íon amônio (I)
- Ni^{2+} – Íon níquel (II)
- nm – Nanômetro
- -OH – Grupo hidroxílicos
- P – Produto
- P.A – Pureza analítica
- PBS – tampão fosfato
- PNAs – Moléculas sintéticas que mimetizam o DNA e o RNA

- PVC – poli (cloreto de vinila)
- Q – Membrana de quitosana
- QTZ – Quartzo
- Q/AP – Membrana de quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada
- Q/CL – Membrana de quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®]
- S – Substrato
- t – Tempo
- T_{30%} – Temperatura de decomposição em 30% de perda de massa
- TG – Termogravimétrica
- THF – Tetra-hidrofurano
- T_{máx} – Temperatura máxima
- V – velocidade de uma reação
- V₀ – Velocidade inicial
- V_{máx} – Velocidade máxima
- Δ_{Abs} – Variação da absorbância
- ΔH – Variação de entalpia
- μm – Mícron
- ΔG – Variação da energia livre de Gibbs
- °C – Grau Celsius
- °K – Grau Kelvin

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Classificação dos biossensores a partir do transdutor utilizado	8
Tabela 3.2– Principais classes das enzimas conforme reportado por Champe	19
Tabela 5.1– Valores dos números de ondas das bandas de vibração correspondentes as moléculas de água associadas com os silicatos (CL e AP) e com o grupo amina protonada ($-NH_3^+$) nas cadeias de quitosana (Q)	69
Tabela 5.2– Distância interplanar basal (d_{001}) e morfologia dos silicatos (CL e AP) e das membranas Q/CL e Q/AP, nas proporções de 1/1, 5/1 e 10/1	77
Tabela 5.3– Resultados de resistência a tração, módulo de elasticidade e alongamento na ruptura das membranas de quitosana (Q) e das membranas quitosana/silicato (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1 , Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1)	85
Tabela 5.4– Etapas de decomposição	89
Tabela 5.5– Valores de temperatura máxima e entalpia dos eventos	92
Tabela 5.6– Ângulos de contato	93
Tabela 5.7– Valores de absorvância medidas a temperatura ambiente das soluções com pH igual a 5,6 que foram submetida a condição de 5 °C por toda a noite	94
Tabela 5.8– Valores de variação de absorvância das soluções com pH igual a 5,5 e a 7,2 que foram submetidas a condição de 41 °C por toda a noite	97
Tabela 5.9– Valores de variação de absorvância das soluções com pH igual a 7,2 que foram submetidas a condição de 25 °C por toda a noite	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1– Esquema representativo de um biossensor	5
Figura 3.2 – Esquema representativo de um sensor biocatalítico	6
Figura 3.3 – Estrutura do ionóforo nonactina	9
Figura 3.4 – Estrutura do solvente bis-2-(etilhexil)-adipato	10
Figura 3.5 – Representação de uma curva de calibração	12
Figura 3.6 – Esquema representativo de um biossensor sensível a uréia	15
Figura 3.7– Esquema da formação da ligação peptídica	17
Figura 3.8– Atividade enzimática através do modelo de encaixe induzido	20
Figura 3.9– Representação gráfica do curso energético de uma reação	22
Figura 3.10– Determinação gráfica da $V_{máx}$ e de K_M , a partir da curva obtida com a variação da velocidade da reação (V) em função do substrato [S]	26
Figura 3.11- Linearização de Lineweaver-Burk	27
Figura 3.12– Efeito da temperatura em uma reação catalisada por enzima	28
Figura 3.13– Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimática: (A) Adsorção, (B) Encapsulação, (C) Ligação covalente e (D) Ligação covalente cruzada	31
Figura 3.14– Estrutura química da quitosana	34
Figura 3.15 – Esquema ilustrativo da solubilidade da quitosana. Em pH < 6 os grupos amino da quitosana são protonados conferindo a quitosana um comportamento policatiônico. Em pH > 6 os grupos amino da quitosana são desprotonados e reativos	35
Figura 3.16– Representação esquemática da estrutura da montmorilonita	37
Figura 3.17– Argilas bentoníticas	39
Figura 3.18– Esquema da preparação de nanocompósitos pelo método de polimerização <i>in situ</i> e intercalação por solução e fusão, respectivamente	42

Figura 3.19 – Morfologias polímero/argila: intercalada, floculada e esfoliada	44
Figura 3.20 – Intercalação da quitosana em montmorilonita	47
Figura 4.1– Representação esquemática do eletrodo de trabalho	51
Figura 4.2– Representação do suporte condutor e dos componentes (A, B e grafite) utilizados na preparação da mistura	54
Figura 4.3– Deposição da gota para evaporação do solvente	55
Figura 5.1–Fotos das membranas de quitosana(Q) e das membranas de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 ; Q_5/CL_1 ; Q_{10}/CL_1) com razões mássicas de quitosana/montmorilonita equivalentes a 1/1, 5/1, 10/1	62
Figura 5.2– Fotos das membranas de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 ; Q_5/AP_1 ; Q_{10}/AP_1), com razões mássicas de quitosana/bentonita purificada equivalentes a 1/1, 5/1, 10/1	63
Figura 5.3– Espectro na região do infravermelho da montmorilonita (CL); da bentonita purificada (AP); da membrana de quitosana (Q); das membranas de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 ; Q_5/CL_1 ; Q_{10}/CL_1)e de quitosana/bentonita purificada(Q_1/AP_1 ; Q_5/AP_1 ; Q_{10}/AP_1)	64
Figura 5.4– Espectro na região do infravermelho da membrana de quitosana (Q)	66
Figura 5.5– Espectro na faixa de 1800 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} da membrana de quitosana (Q); das membranas de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 ; Q_5/CL_1 ; Q_{10}/CL_1) e das membranas de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 ; Q_5/AP_1 ; Q_{10}/AP_1)	68
Figura 5.6– Representação esquemática da forte (a) e da fraca (b) interação eletrostático entre os grupos $-NH_3^+$ da quitosana e as camadas aniônicas da argila	69
Figura 5.7– Difractogramas dos silicatos (montmorilonitas -CL e bentonita purificada – AP) e das membranas (Q_1/CL_1 1, Q_1/CL_1 2, Q_1/CL_1 3; Q_1/AP_1 1, Q_1/AP_1 2, Q_1/AP_1 3)	71
Figura 5.8– Difractogramas dos silicatos (montmorilonitas -CL e bentonita purificada – AP) e das membranas (Q_5/CL_1 1, Q_5/CL_1 2, Q_5/CL_1 3; Q_5/AP_1 1, Q_5/AP_1 2, Q_5/AP_1 3)	73
Figura 5.9– Difractogramas dos silicatos (montmorilonitas - CL e bentonita purificada – AP) e das membranas (Q_{10}/CL_1 1, Q_{10}/CL_1 2, Q_{10}/CL_1 3; Q_{10}/AP_1 1, Q_{10}/AP_1 2, Q_{10}/AP_1 3)	75

Figura 5.10– Imagem de microscopia eletrônica da varredura (MEV) da secção transversal da membrana de quitosana (Q)	78
Figura 5.11– Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da área superficial das membranas: a) Q ₁ /CL ₁ e b) Q ₁ /AP ₁	79
Figura 5.12– Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da área superficial das membranas: a) Q ₅ /CL ₁ e b) Q ₅ /AP ₁	79
Figura 5.13– Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da área superficial das membranas: a) Q ₁₀ /CL ₁ e b) Q ₁₀ /AP ₁	79
Figura 5.14– Resistência a tração nas membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q ₁ /CL ₁ , Q ₅ /CL ₁ e Q ₁₀ /CL ₁) e quitosana bentonita purificada (Q ₁ /AP ₁ , Q ₅ /AP ₁ e Q ₁₀ /AP ₁)	82
Figura 5.15– Módulo de elasticidade das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q ₁ /CL ₁ , Q ₅ /CL ₁ e Q ₁₀ /CL ₁) e quitosana bentonita purificada (Q ₁ /AP ₁ , Q ₅ /AP ₁ e Q ₁₀ /AP ₁)	84
Figura 5.16– Alongamento das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q ₁ /CL ₁ , Q ₅ /CL ₁ e Q ₁₀ /CL ₁) e quitosana bentonita purificada (Q ₁ /AP ₁ , Q ₅ /AP ₁ e Q ₁₀ /AP ₁)	84
Figura 5.17– Curvas de TGA, sob o fluxo de ar, das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q ₁ /CL ₁ , Q ₅ /CL ₁ e Q ₁₀ /CL ₁) e quitosana/bentonita purificada (Q ₁ /AP ₁ e Q ₅ /AP ₁)	88
Figura 5.18– Curvas de DTG, sob fluxo de ar, das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q ₁ /CL ₁ , Q ₅ /CL ₁ e Q ₁₀ /CL ₁) e quitosana/bentonita (Q ₁ /AP ₁ , Q ₅ /AP ₁ e Q ₁₀ /AP ₁)	88
Figura 5.19– Curvas DSC, sob atmosfera de nitrogênio (50ml/min), das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q ₁ /CL ₁ , Q ₅ /CL ₁ e Q ₁₀ /CL ₁) e quitosana/bentonita (Q ₁ /AP ₁ , Q ₅ /AP ₁ e Q ₁₀ /AP ₁)	91
Figura 5.20– Representação esquemática das interações entre a quitosana, o silicato e a urease	98
Figura 5.21– Foto do biossensor formado por: cuba eletrolítica, eletrodo de trabalho (W), eletrodo auxiliar (A) e eletrodo de referência – Ag/AgCl (R)	99
Figura 5.22 – Mecanismo de atuação do biossensor	100

PUBLICAÇÕES SOBRE O TEMA DA TESE

Trabalhos publicados em periódicos

1. Silva, S. M. L.; Braga, C. R. C.; Fook, M.V. L.; Raposo, C. M. O.; Carvalho, L. H. e Canedo, E. L. Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites. In: Theophanides, T. (Ed). **Infrared Spectroscopy/Book 1**. National Technical University of Athens, Chemical Engineering Department, Radiation Chemistry & Biospectroscopy, Greece, ISBN 979-953-307-362-9, 2012. Aceito para publicação.
2. Vitorino, I. F.; Santos, K. C. V.; Diniz, L. G. M.; Braga, C. R. C.; Fook, M. V. L.; Silva, S. M. L. Morfologia e propriedades mecânicas de filmes de quitosana/bentonita. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, 2012. Submetido.

Trabalhos publicados em congressos

1. Santos, K. C. V.; Diniz, N. K. S.; Braga, C. R. C.; Fook, M. V. L.; Silva, S. M. L. **Effect of nanoclay type on the morphology and thermal stability of biopolymer-clay nanocomposite based on chitosan**. In: X Encontro da SBPMat, realizado no período de 25 a 29 de Setembro de 2011, Gramado – RS.
2. Vitorino, I. F.; Braga, C. R. C.; Silva, S. M. L. **Biocompósito quitosana/bentonita: influência do tipo de argila na morfologia e propriedades mecânicas**. In: 66º Congresso da Associação Brasileira de Metalurgia, Materiais e Mineração – ABM, realizado no período de 18 a 22 de Julho de 2011, São Paulo – SP.

3. Diniz, L. G. M.; Trindade, L. C.; Braga, C. R. C.; Fook, M. V. L.; Silva, S. M. L. **O efeito dos silicatos em camadas na morfologia e tensão superficial em biofilmes de quitosana.** In: 55º Congresso Brasileiro de Cerâmica, realizado no período de 29 a 01 de Junho de 2011, Porto de Galinhas – PE.
4. Braga, C. R. C.; Melo, F. M. A.; Vitorino, I. F.; Fook, M. V. L.; Silva, S. M. L. **Bionanocompósitos quitosana/bentonita morfologia e comportamento mecânico.** In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, realizado no período de 21 a 25 de Novembro de 2010, Campos do Jordão – SP.
5. Braga, C. R. C.; Melo, F. M. A.; Vitorino, I. F.; Fook, A. C. B. M.; Fook, M. V. L.; Silva, S. M. L. **Morphological characterization of the chitosan/layer silicates bio-nanocomposite films.** In: 17º International Microscopy Congress - IMC, realizado no período de 19 a 24 de Setembro de 2010, Rio de Janeiro - RJ.
6. Braga, C. R. C.; Santos, K. C. V.; Diniz, N. K. S.; Fook, M. V. L.; Silva, S. M. L. **Chitosan/layer silicates nanocomposite films for application as vehicles for drug delivery system.** In: XII International Macromolecular Colloquium e o 7º International Symposium on Natural Polymers and composites, realizado no período de 7 a 10 de Setembro de 2010, Gramado – RS.
7. Braga, C. R. C.; Vitorino, I. F.; Silva, S. M. L. **Chitosan-clay nanocomposite for the development of biosensors.** In: 6º International ECNP Conference, realizado no período de 28 a 30 de Abril de 2010, Madri/Espanha.
8. Braga, C. R. C.; Barbosa, R. C.; Lima, R. C.; Fook, M. V. L.; Silva, S. M. L. **Nanocompósito quitosana/montmorilonita para aplicação em liberação controlada de fármacos.** In: 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, realizado no período de 13 a 17 de Outubro de 2009, Foz do Iguaçu - PR.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS QUITOSANA/SILICATOS EM CAMADAS PARA USO COMO SUPORTE ENZIMÁTICO NA CONSTRUÇÃO DE UM BIOSENSOR DE URÉIA

RESUMO

Neste estudo a bentonita Argel 35, proveniente da Bentonit União Nordeste, foi purificada visando eliminação de matéria orgânica e empregada na preparação e caracterização de membranas de quitosana/bentonita com razões mássicas de 1/1, 5/1 e 10/1. Para fins de comparação foram também preparadas membranas quitosana/montmorilonita (Cloisite[®] Na⁺) nas mesmas razões mássicas, a montmorilonita foi fornecida pela *Southern Clay Products*. As membranas de quitosana/bentonita e quitosana/montmorilonita foram preparadas pelo método de intercalação por solução e caracterizadas por espectroscopia no infravermelho, difratometria de raios X, microscopia eletrônica de varredura, propriedades mecânicas, termogravimetria, calorimetria exploratória diferencial, medida de ângulo de contato e a adsorção da enzima uréase pelas membranas foi avaliada por espectrofotometria a 280 nm. De acordo com os resultados fica evidenciado que o tipo e o teor de silicato afeta a morfologia, as propriedades mecânicas, térmicas e a hidrofiliabilidade das membranas quitosana/silicato. Bionanocompósitos quitosana/silicato com razões mássicas de 1/1, 5/1 e 10/1 apresentaram morfologias intercalada ordenada, intercalada desordenada e intercalada desordenada tendendo a esfoliada, respectivamente e com grau de hidrofiliabilidade e estabilidade térmica diminuindo nesta ordem. Com relação às propriedades mecânicas, os valores da resistência à tração e do módulo de elasticidade das membranas quitosana/silicato foram superiores aos das membranas de quitosana e o alongamento um tanto inferior. As membranas preparadas com bentonita Argel 35 purificada apresentaram comportamento semelhante ao das membranas preparadas com a montmorilonita sódica comercial Cloisite[®]. Quanto à avaliação da adsorção da enzima uréase, em meio tamponado de fosfato - PBS, pelas membranas de quitosana e quitosana/silicato com razão mássica de 5/1, os valores de variação de absorbância indicaram que o aumento de temperatura de 25 °C para 41 °C não influenciou em uma maior adsorção enzimática e que a incorporação da bentonita purificada a quitosana se mostrou tão eficaz quanto à incorporação da montmorilonita para promover uma maior adsorção da uréase às membranas de quitosana. Isto indica que a bentonita poderá ser empregada na preparação de membranas a base de quitosana para aplicação como suporte enzimático na construção de biossensores potenciométricos para determinação de uréia.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN/SILICATE MEMBRANES FOR APPLICATION AS ENZYMATIC SUPPORT IN UREA BIOSENSOR

ABSTRACT

In this study the bentonite Argel 35, supplied for Bentonit União Nordeste, was purified seeking elimination of organic matter and used in the preparation of chitosan/purified bentonite membrane with mass ratios of 1/1, 5/1 and 10/1. For comparison chitosan/montmorillonite (Cloisite[®] Na⁺) membranes were prepared with the same mass ratios, the montmorillonite supplied for Southem Clay Products. The membrane of chitosan/purified bentonite and chitosan/montmorillonite were prepared by the solution intercalation process and characterized by infrared spectroscopy, x-ray diffraction, scanning electron microscopy, tensile properties, thermal analysis (thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry), contact angle measurements and the adsorption behavior of enzyme urease in the membranes was studied by means of spectrophotometry at 280 nm. The results indicate that the morphology, thermal stability, hydrophilicity and tensile properties such as tensile strength, elastic modulus and elongation at break are affected by the type of silicate and chitosan/silicate ratio. Bionanocomposites chitosan/silicate with mass ratio of 1/1, 5/1 and 10/1 indicate the formation of an ordered intercalated, disordered intercalated and exfoliated structures, respectively and the degree of the hidrophilicity and thermal stability decreasing in this order. Regarding the mechanical properties, the values of the tensile strength and of the elastic modulus of the chitosan/silicate membranes were more pronounced than the chitosan membranes and the elongation decreased. The evaluation of the adsorption of the enzyme urease at the chitosan/silicate membranes with mass ratio of 5/1 showed favored in pH 7.2 phosphate buffer solution at 25 °C. Since the nanocomposites prepared with purified bentonite showed similar behavior to that prepared with montmorillonite Cloisite[®], this may be employed in urea biosensor in the preparation of chitosan/silicate membranes for application as support for immobilization of urease by adsorption.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Biossensores	5
3.2. Biossensor de Uréia	14
3.3. Enzimas	16
3.3.1. Classificação e Nomenclatura das Enzima	17
3.3.2. Mecanismo de Catálise	20
3.3.3. Aspectos Termodinâmicos da Catálise	21
3.3.4. Cinética Enzimática: Abordagem de Michaelis-Menten	23
3.3.5. Fatores que Influenciam a Ação Enzimática	28
3.3.6. Imobilização de Enzimas	30
3.4. Quitosana	33
3.5. Silicatos em Camadas	36
3.5.1. Montmorilonita	36
3.5.2. Bentonita	38
3.6. Nanocompósitos Poliméricos	41
3.6.1. Bionanocompósito Quitosana/Silicato em Camadas	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Materiais	49
4.2. Métodos	51
4.2.1. Preparação dos suportes Enzimáticos	52
4.2.1.1. <i>Preparação da Membrana de Quitosana</i>	52
4.2.1.2. <i>Preparação da Membrana de Quitosana/Silicatos em camadas</i>	52
4.2.2. Preparação do Suporte Condutor	53
4.2.3. Preparação da Matriz Polimérica não Condutora	54

4.3. Imobilização da Enzima Urease	55
4.4. Caracterização	56
4.4.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)	56
4.4.2. Difratomia de Raios X (DRX)	57
4.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
4.4.4. Análise Mecânica (Ensaio de Tração)	58
4.4.5. Análise Termogravimétrica (TG)	58
4.4.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	58
4.4.7. Medida do Ângulo de Contato	59
4.4.8. Espectrofotometria	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1. Caracterização dos suportes enzimáticos	61
5.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho	63
5.1.2. Difratomia de Raios X	70
5.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura	77
5.1.4. Análise Mecânica	80
5.1.5. Análise Termogravimétrica	85
5.1.6. Calorimetria Exploratória Diferencial	90
5.1.7. Medida do Ângulo de Contato	92
5.2. Avaliação da Adsorção da Enzima Urease pelas Membranas de Quitosana e Quitosana/Silicato	94
5.3. Montagem do Biossensor	99
6. CONCLUSÕES	101
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXOS	
Anexo I	111
Anexo II	113
Anexo III	117

1. INTRODUÇÃO

A demanda crescente para diagnósticos clínicos relativos às doenças que acometem o rim e o fígado necessita da evolução de novos métodos para estimação mais rápida e precisa de uréia em amostras de urina e sangue (Kaushik et al., 2009). Testes para estimar a quantidade de uréia no sangue, uréia sérica, podem ser usados como indicador da função renal e da ocorrência de uremia (doença que acompanha a insuficiência renal), pois a diminuição da concentração de uréia (nível normal em soro é de 8 a 20 mg/dL) causa fracasso hepático entre outras síndromes e o aumento gera insuficiência renal (aguda ou crônica), obstrução da área urinária, desidratação e sangramento gastrointestinal. Os métodos convencionais para estimar o nível de uréia incluem: cromatografia a gás, calorimetria e flúorimetria (Dhawan et al., 2009). Nas rotinas dos laboratórios clínicos o método enzimático-colorimétrico é o mais utilizado baseado na hidrólise da uréia pela uréase e utilização de sistemas fotométricos para medidas de absorvância do complexo azul, Indofenol, formado em meio alcalino. No entanto, esses métodos requerem etapas de pré-tratamento das amostras, além de serem inadequados para monitoramento *in situ*. Portanto, os biossensores eletroquímicos têm sido considerados uma alternativa atraente devido a sua simplicidade e alta sensibilidade (Kaushik et al., 2009).

Biossensores são dispositivos analíticos que incorporam materiais biológicos tais como enzimas, ácidos nucléicos, microorganismos, anticorpos, os quais na maioria dos casos são específicos para um analito e associados a transdutores físico-químicos que convertem o sinal bioquímico em um sinal mensurável (Dhawan et al., 2009). Os biossensores para detecção de uréia são geralmente baseados na imobilização da enzima uréase, presente na maioria dos sistemas biológicos. Vários grupos de pesquisa tanto nacionais como internacionais, têm intensificado nas últimas décadas pesquisas no sentido de desenvolver e caracterizar novos materiais para que possam desempenhar a função de suporte enzimático e ao mesmo tempo atuar como mediadores para o transporte de elétrons na interface. Levantamentos bibliográficos realizados

no ISI Web of Science até dezembro/2011 indicam que estudos realizados por Krajewska et al.,(1990) reportaram o uso de quitosana reticulada com glutaraldeído como suporte para imobilização da uréase. Magalhães et al., (1998) avaliaram suportes do biopolímero quitosana na construção de biossensores para determinações de uréia em amostras de soro sanguíneo. De acordo com Hirano, (1998) outros silicatos como Saponita e Laponita também têm sido empregadas, mas não existe nenhum registro sobre o uso de bentonita para esta aplicação. Darder et al., (2005) desenvolveram nanocompósitos de quitosana/montmorilonita e quitosana/hectorita para aplicação na construção de biossensores potenciométricos para determinação de íons específicos como NO_3^- e F^- . De acordo com estudos realizados por Kaushik et al., (2009) matrizes do bionanocompósito quitosana/óxido de ferro foram desenvolvidas e avaliadas em sensores para determinação de uréia.

Os estudos sobre as aplicações de nanocompósitos quitosana/montmorilonita no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para determinação potenciométrica de espécies aniônicas citam que a afinidade entre a quitosana e a montmorilonita é a responsável pela alta estabilidade do biopolímero e, conseqüentemente, dos sensores desenvolvidos (Darder et al., 2005). Citam também que a intercalação de quitosana no silicato pode aumentar a biocompatibilidade, a resistência mecânica e mesmo a adesão da membrana aos eletrodos. Além do mais, o uso de membranas de quitosana/silicato para imobilização de biomoléculas, preparadas pelo método de adsorção, constitui um método barato, rápido e fácil para elaboração de eletrodos de enzima pela simples mistura da suspensão coloidal de quitosana/silicato com uma quantidade bem definida de proteínas, seguida pela sua deposição na superfície do eletrodo. Além disso, o glutaraldeído, agente de reticulação, que contém espécies químicas complexas de natureza citotóxica documentada e pode causar, até certo ponto, a desnaturação da enzima imobilizada, pode ser evitado (Shi et al., 2008). Entretanto, conforme reportado

na literatura a resposta/eficiência (o desempenho) de um biossensor depende de fatores como: escolha adequada do suporte para imobilização enzimática, método de imobilização (adsorção, ligação covalente, microencapsulação) e o

sistema de transdução utilizado. Portanto, a proposta deste estudo é desenvolver suportes de membranas quitosana/silicatos em camadas (montmorilonita e bentonita), com razões mássicas quitosana/silicato de 1/1, 5/1 e 10/1, que utiliza da sinergia do componente orgânico (quitosana) e inorgânico (silicato) a fim de obter melhores propriedades mecânicas e favorecer interações eletrostáticas suporte/enzima, em substituição ao uso de agentes reticulantes como o glutaraldeído. Objetiva-se também imobilizar nas membranas de quitosana e quitosana/silicato a enzima uréase, pelo método de adsorção, em diferentes valores de pH e temperatura, e caracterizar a adsorção da enzima uréase nas membranas, por espectrofotometria, para avaliar a influência do tipo e do teor de silicato em camadas na adsorção da uréase pelas membranas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é o desenvolvimento e a caracterização de membranas quitosana/silicatos em camadas visando seu uso como suporte para imobilização da enzima uréase em biossensor potenciométrico para determinação de uréia.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver membranas de quitosana (Q), quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) pelo método de intercalação por solução, usando razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1;
- Avaliar o efeito do tipo e do teor de silicato na morfologia, tensão superficial, propriedade mecânica e térmica das membranas;
- Imobilizar a enzima uréase pela técnica de adsorção nas membranas de quitosana e quitosana/silicato e avaliar a adsorção da enzima (uréase) nas membranas por espectrofotometria;
- Construir um eletrodo seletivo ao íon amônio (eletrodo de trabalho);
- Montar o biossensor.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Biossensores

Em 1962 o professor Leland C. Clark Júnior publicou um artigo que ilustrava uma experiência na qual a glicose oxidase era atraída para um eletrodo de oxigênio que usava uma membrana de diálise, resultando em um biossensor de glicose. Este dispositivo se tornou a base do desenvolvimento dos biossensores e o professor Leland C. Clark Jr. o pai do conceito de biossensor (Dhawan et al., 2009).

Um biossensor é uma ferramenta analítica composta de um elemento de reconhecimento biológico sensível chamado bioreceptor intimamente ligado a um sistema transdutor (Oliveira, 2008). A Figura 3.1 apresenta um esquema de um biossensor com a representação dos componentes que constituem o dispositivo.

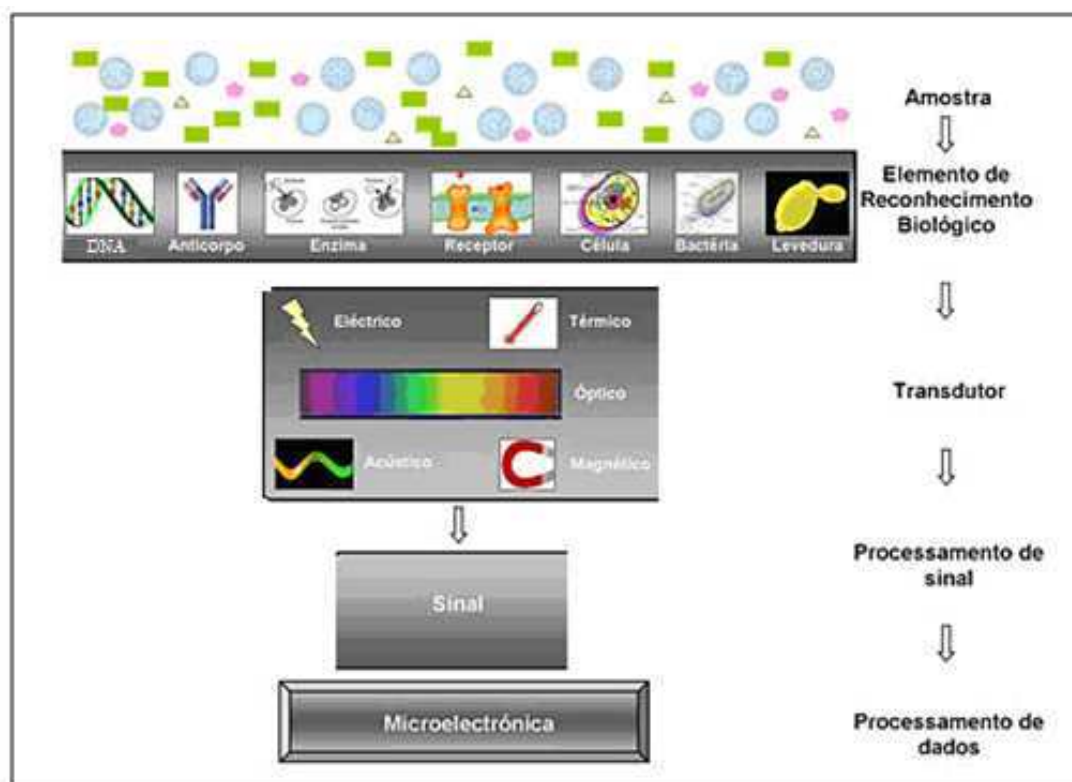


Figura 3.1 – Esquema representativo de um biossensor.
Fonte: Oliveira, 2008.

O bioreceptor deve ser capaz de reconhecer especificamente uma substância alvo (substrato) presente em um meio complexo (amostra), graças a seu sítio ativo particularmente seletivo (Oliveira, 2008). A interação específica entre o sítio ativo do bioreceptor e o substrato presente na amostra gera um sinal primário que o transdutor se encarrega de transformar em um sinal físico mensurável, geralmente de domínio elétrico. Por fim, o sinal elétrico obtido é amplificado e processado.

Dependendo do tipo de interação os biossensores podem ser classificados em sensores biocatalíticos e sensores de bioafinidade.

- Sensores biocatalíticos

Os Sensores biocatalíticos utilizam biocatalisadores, elementos de reconhecimento (bioreceptores) do tipo biocatalítico, constituídos por enzimas ou sistemas multi-enzimáticos isolados, organismos celulares, células completas de tecidos animais ou vegetais (Ortiz et al., 2007). Estes elementos de reconhecimento podem acoplar-se a distintos tipos de transdutores como eletroquímicos, ópticos e termométricos. A Figura 3.2 apresenta um esquema representativo de um sensor biocatalítico que mostra a difusão do substrato A, presente na solução, para a camada enzimática e a difusão do produto P, obtido via reação enzimática, para o transdutor.

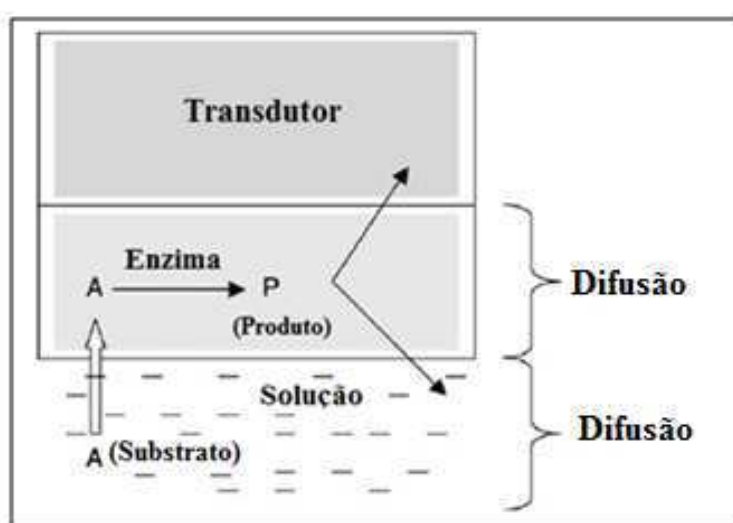


Figura 3.2 – Esquema representativo de um sensor biocatalítico.
Fonte: Adhikari, 2004.

- Sensores de bioafinidade

A interação entre o substrato de interesse e o elemento de reconhecimento (receptor), sem que exista transformação catalítica é a base para o entendimento dos sensores de bioafinidade (Ortiz et al., 2007). Para medir a interação, onde não existe consumo de substratos nem a geração de produtos, se podem utilizar um marcador no receptor. O inconveniente deste tipo de sistema é que requer alguns passos posteriores como limpeza e separação do excesso de moléculas marcadas e a adição de substratos. Existem distintos tipos de receptores de bioafinidade tais como anticorpos, lectinas, células completas, ácidos nucléicos, polímeros de impressão molecular ou PIMs (“Molecularly Imprinted Polymers”), aptâmeros (seqüência de oligonucleotídeos, DNA ou RNA, de cadeia simples sintetizada artificialmente capazes de reconhecer diversas moléculas com afinidade e especificidade elevadas) e PNAs (moléculas sintéticas que mimetizam o DNA e o RNA).

O princípio de funcionamento de um biossensor baseia-se na detecção de um composto de interesse específico para análise, a partir de um sinal proporcional à concentração da espécie a ser detectada ao interagir com o bioreceptor. O resultado dessa união produz uma variação das propriedades físico-químicas como pH, composição, concentração, transferência de elétrons, de calor, mudança de potencial, de massa, variação das propriedades óticas, etc. Estas propriedades são detectadas pelo transdutor que transforma o sinal químico em um sinal elétrico indicando a presença do substrato correlacionando sua presença na amostra (Ortiz et al., 2007). Dependendo do bioreceptor e da sua reação com o substrato, diferentes transdutores podem ser utilizados para sua confecção, como mostra a Tabela 3.1 (Malhotra et al., 2006).

Tabela 3.1- Classificação dos biossensores a partir do transdutor utilizado.

Tipos de Transdutores	Descrição
Ópticos	O sinal formado é devido às interações entre o substrato e a energia radiante
Eletroquímicos	O sinal formado é devido a uma interação eletroquímica entre o substrato e o eletrodo
Térmicos	Dispositivos capazes de medir a diferença de temperatura

Dentre os transdutores mais utilizados encontram-se os eletroquímicos. Os biossensores com transdutores eletroquímicos são baseados nos princípios tradicionais da eletroanalítica. Portanto, são células eletroquímicas constituídas de dois ou mais eletrodos em contato com um eletrólito líquido ou sólido e podem ser classificados de acordo com o modo de operação em sensores potenciométricos e sensores voltamétricos. Quando uma célula eletroquímica é utilizada como sensor, a escolha do parâmetro de medida é baseada na sensibilidade, seletividade e exatidão proporcionadas com relação às espécies a serem determinadas. Sendo assim, o conhecimento dos princípios e limitações de cada modo operacional é essencial no planejamento e desenvolvimento de um sensor. Os sensores voltamétricos se caracterizam por possuir maior sensibilidade e exatidão. Em contrapartida, os sensores potenciométricos necessitam de uma logística (projeto de construção e instrumentação eletrônica) mais simples para a operação. Além de apresentar maiores faixas lineares de trabalho e excelente seletividade. Neste contexto, observa-se um grande número de trabalhos na literatura que empregam os sensores potenciométricos como preferidos (Menezes, 2006).

O grupo mais representativo de biossensores potenciométricos é o dos eletrodos seletivos a íons (ESI). A superfície deste eletrodo geralmente incorpora uma matriz polimérica não condutora com propriedades íon seletiva e

íons permeáveis que minimiza a interferência de outros íons e proporciona seletividade para o íon desejado. A matriz polimérica não condutora consta essencialmente de três componentes: material eletroativo ou ionóforo (elemento de reconhecimento), solvente mediador ou plastificante e uma matriz polimérica.

O termo ionóforo é usado para descrever ligantes que seletivamente associam-se a íons. Tipicamente, são moléculas macrocíclicas com um íon ligado numa cavidade de dimensões bem definidas. A seletividade está baseada na relação entre as dimensões do íon com sítios ligantes. Éteres coroa constituem a classe mais conhecida de ionóforo, porém outros tipos de moléculas, de ocorrência sintética ou natural, agem como ionóforo, tais como metil-monesin para íons sódio, bis-(benzil-15-éter coroa-5)-heptano para íons potássio e a própria nonactina para íons amônio, Figura 3.3 (Júnior et al., 1996; Menezes, 2006). Moody & Thomas, (1988) verificaram que o antibiótico macrotetrólito nonactina (ionóforo neutro) apresenta grande seletividade frente ao íon de interesse (NH_4^+) podendo ser usado em determinações potenciométricas.

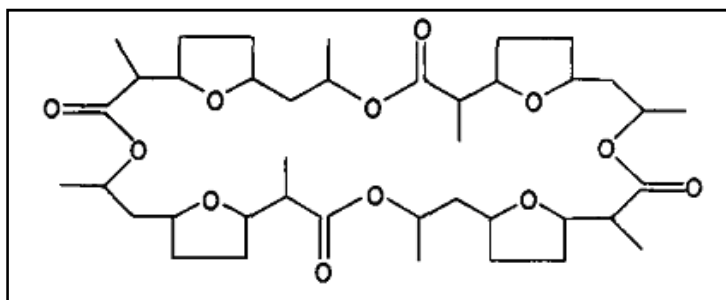


Figura 3.3 – Estrutura do ionóforo nonactina.
Fonte: Júnior et al., 1996.

Ionóforos têm tido grande impacto no desenvolvimento de eletrodos de matrizes poliméricas não condutoras, baseados na diferença de potencial associada à interação entre o íon de interesse com o sítio ativo do ligante. Em adição à grande seletividade, ionóforos neutros usados em eletrodos íon-seletivos não estão sujeitos à protonação e, assim, têm constantes de equilíbrio

para o íon ligante que não são afetadas pelo pH, como é o caso da nonactina. Desta forma, é possível determinar os íons amônio, sem um pré-tratamento da amostra contendo o substrato, numa determinada faixa de valores de pH sem que o ionóforo perca suas características e evitando possíveis interferências (Júnior et al., 1996). Dentre as características mais importantes o material eletroativo deve ser suficientemente estável e ter uma elevada solubilidade no solvente mediador, mas uma baixa solubilidade em água.

As características para um bom solvente mediador incluem: baixa solubilidade em água, baixa pressão de vapor, elevada viscosidade, estabilidade com relação à luz e ser favorável para a seletividade do íon desejado. Sendo o bis-2-(etilhexil)-adipato, Figura 3.4, considerado um solvente favorável ao íon amônio. Quanto ao material polimérico, este deve ser: solúvel em um solvente volátil, altamente hidrofóbico, não conter grupos eletroativos e temperatura de transição vítrea maior que a temperatura ambiente. O material polimérico mais utilizado é o poli (cloreto de vinila) (PVC). Para obtenção de uma membrana de PVC com boas características, a proporção ótima de solvente/PVC deve ser 70/30 em peso, aproximadamente (Cáceres, 2001).

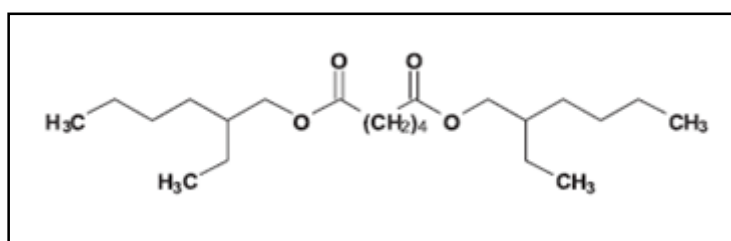


Figura 3.4 – Estrutura do solvente bis-2-(etilhexil)-adipato.
Fonte: Souza et al., 2009.

O princípio básico de uma medida potenciométrica é o desenvolvimento de potenciais sobre um eletrodo pelo acúmulo de cargas, aumentando a densidade de carga na superfície de um eletrodo. Esse processo ocorre pela medida do potencial da célula eletroquímica na ausência de uma corrente apreciável. O potencial desenvolvido é descrito pela atividade (concentração)

iônica da espécie analítica numa amostra de acordo com a equação proposta por Nernst, Equação 3.1 (Araújo, 2009; Júnior, 1995).

$$E = E^0 + \frac{RT}{Z_x F} \ln(a_x) \quad (3.1)$$

Onde:

E^0 – é o potencial padrão da célula

R – Constante dos gases;

T – Temperatura absoluta;

Z_x – Carga iônica;

F – Constante de Faraday;

a_x - A atividade do íon X que se deseja determinar, isto é, concentração do íon que se deseja determinar.

O sinal da equação é positivo quando x é um cátion e negativo quando x é um ânion.

A magnitude do potencial desenvolvido é medida em decorrência da diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho ou íon-seletivo, sensível à espécie iônica de interesse, e um eletrodo de referência (Ag/AgCl) que fornece um potencial elétrico constante para uma medida de diferença de potencial, sendo proporcional ao logaritmo da atividade do íon ou da concentração da espécie analítica de interesse (Araújo, 2009). Portanto, a resposta é considerada como nernstiana sempre que o potencial do eletrodo for proporcional ao logaritmo da atividade do íon de interesse.

Nos métodos potenciométricos diretos a espécie a ser determinada é quase sempre o íon primário (íon para o qual o eletrodo foi construído). O interferente é definido como qualquer espécie, que não o íon primário, para o qual o eletrodo responde. Assim, é definido um coeficiente de seletividade potenciométrico, K^{POT}_{AB} , como uma medida da seletividade de um eletrodo para o íon A na presença do interferente B. Portanto, quanto menor o valor de K^{POT}_{AB} , mais seletivo será o eletrodo para o íon A na presença do íon B (Júnior, 1995).

Um gráfico ou curva de calibração é aceito como a representação de uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho ou íon-seletivo e o eletrodo de referência (com valores positivos no topo do eixo da ordenada) pelo logaritmo da atividade ou concentração do íon primário na célula de medida (com o aumento da atividade ou concentração à direita do eixo da abscissa), Figura 3.5 (Júnior, 1995).

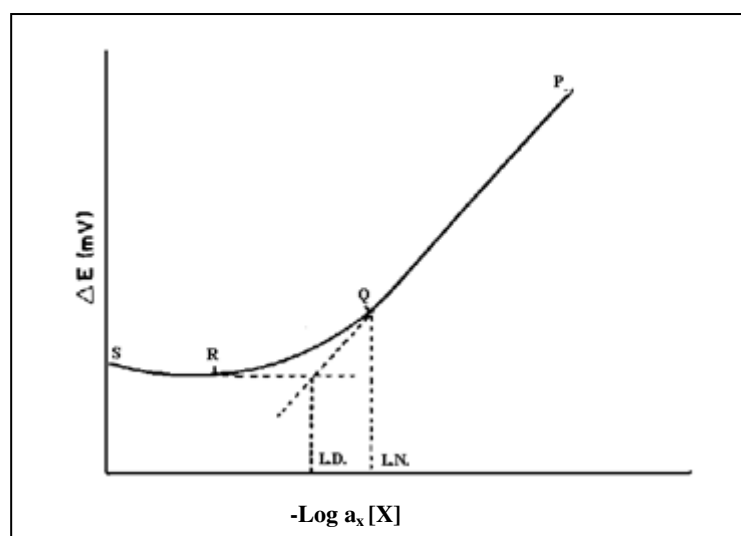


Figura 3.5 – Representação de uma curva de calibração.
Fonte: Júnior, 1995.

Onde:

PQ – Porção nernstiana da curva;

QR – Presença de interferente (s) e íon primário;

RS – Presença de interferente (s).

São definidos assim, o limite de detecção (L.D.) como sendo a menor quantidade do analito, íon primário, detectada pelo eletrodo de trabalho e o limite nernstiano (L.N.) como a parte da curva que apresenta resposta linear, nernstiana, para uma dada faixa de atividade ou concentração do analito.

As características mais importantes de um biossensor potenciométrico são: sensibilidade, estabilidade e tempo de resposta (Oliveira, 2008).

A sensibilidade do biossensor depende diretamente da sensibilidade da membrana seletiva utilizada.

A estabilidade pode ser afetada pelo (a):

- Tipo de imobilização enzimática – Eletrodos com enzimas imobilizadas por métodos químicos (imobilização por adsorção, imobilização por ligação covalente e imobilização por ligação covalente cruzada) apresentam-se mais estáveis e com vida útil maior devido às ligações mais efetivas entre a enzima e o suporte (membrana enzimática), diminuindo a lixiviação da camada enzimática.
- Quantidade e pureza da enzima – A estabilidade aumenta com a espessura da camada enzimática, porém, há um aumento no tempo de resposta.
- Condições experimentais – As condições operacionais tais como: pH, temperatura, solução tampão e concentração do substrato devem ser otimizadas para a determinação analítica.

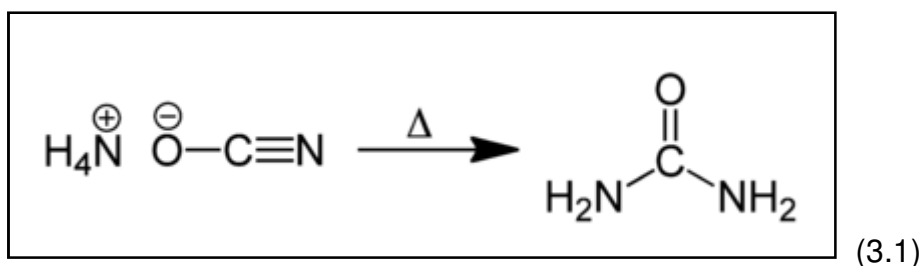
O tempo de resposta do biossensor, definido como o tempo em que o eletrodo leva, quando ocorre uma mudança instantânea na atividade do substrato, para variar em 1,0 mV a partir do potencial final de equilíbrio. Envolve a difusão do substrato através da membrana enzimática e a difusão do(s) produto(s) formado(s) até a superfície da membrana seletiva. Os principais fatores que influenciam no tempo de resposta são:

- Velocidade de agitação – A velocidade de difusão do substrato é alterada pela agitação da solução afetando a resposta do eletrodo, o valor da diferença de potencial, a velocidade de transferência do substrato para o eletrodo. Uma maior velocidade na agitação da solução, desde que o fluxo seja laminar, fornece potenciais mais reprodutíveis com menor tempo de resposta.
- Concentração da enzima – Um aumento na quantidade de enzima pode levar a um aumento no tempo de resposta do sensor. Isto se dá devido ao aumento na espessura da membrana, dificultando a difusão do

substrato na mesma. Portanto, a utilização de enzimas com alta atividade, permite a obtenção de membranas mais finas.

3.2. Biossensor de Uréia

A uréia é um importante produto natural que constitui a etapa final do metabolismo das substâncias nitrogenadas no organismo de mamíferos sendo formado principalmente no fígado, filtrado pelos rins e eliminado na urina, caracteriza-se por ser um composto orgânico tóxico cuja fórmula química é $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Portanto, a uréia desempenha um papel importante na função renal, além de auxiliar a ação dos nefrônios (estruturas microscópicas capazes de eliminar resíduos do metabolismo do sangue), mantêm o equilíbrio hidroeletrólítico ácido-básico do corpo humano, controla a quantidade de líquidos no organismo e regula a pressão arterial. Foi descoberta por Rouelle em 1773 e sua síntese realizada por Wohler em 1828 via cianato de amônio, Reação 3.1.



Testes para estimar a quantidade de uréia no sangue, uréia sérica, podem ser usados como indicador da função renal e da ocorrência de uremia (doença que acompanha a insuficiência renal), pois a diminuição da concentração de uréia (nível normal em soro é de 8 a 20 mg/dL) causa fracasso hepático entre outras síndromes e o aumento gera insuficiência renal (aguda ou crônica), obstrução da área urinária, desidratação e sangramento

gastrintestinal. Os métodos convencionais para estimar o nível de uréia incluem: cromatografia a gás, calorimetria e flúorimetria. No entanto, estes métodos requerem etapas de pré-tratamento das amostras além de serem inadequados para monitoramento *in situ*. Neste contexto, os biossensores eletroquímicos têm sido considerados uma alternativa atraente devido sua simplicidade e alta sensibilidade (Kaushik et al., 2009; Dhawan et al., 2009).

A Figura 3.6 apresenta um esquema representativo de um biossensor sensível à uréia.

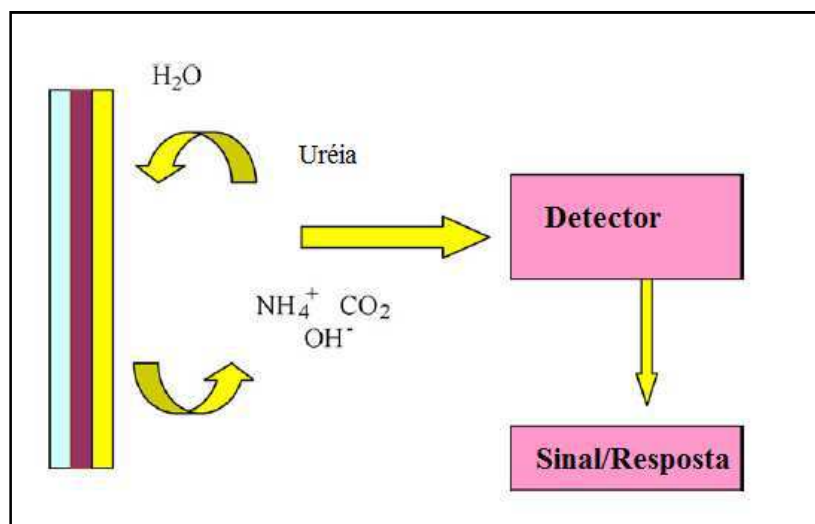


Figura 3.6 - Esquema representativo de um biossensor sensível a uréia.
Fonte: Dhawan et al., 2009.

O primeiro biossensor potenciométrico para determinação de uréia foi desenvolvido por Guilbault & Montalvo no ano de 1969 e consistia de uréase fisicamente imobilizada em gel de poliacrilamida na superfície de um eletrodo de vidro, seletivo ao íon amônio. Este eletrodo era estável por três semanas a uma temperatura de 25°C (Dhawan et al., 2009; Oliveira, 2008).

Krajewska et al., (1990) reportaram o uso de quitosana reticulada com glutaraldeído como suporte para imobilização da uréase.

Deng et. al., (1991) utilizaram feijão de soja como fonte natural de uréase na determinação de uréia em um estudo comparativo entre 5 espécies diferentes de feijões, utilizando eletrodos sensores à gás carbônico e amônia.

Magalhães et al., (1998) avaliaram membranas do biopolímero quitosana como suporte de imobilização da enzima uréase em biossensores potenciométricos para determinações de uréia em amostras de soro sanguíneo.

Silva et al., (1994) mediram a uréia em amostras sorológicas usando um eletrodo sensível a gás amônia e imobilizado pelo extrato enzimático da leguminosa Canavalia marítima com o glutaraldeído na superfície do eletrodo e obtiveram respostas quando a concentração variou entre 0,25 a 9,25 mM.

Srivasvata et. al., (2001) utilizando sementes de *pigeompea* para extração da enzima uréase e estas fixadas em grânulos de gelatina através do método de imobilização por reticulação com glutaraldeído, observaram que a uréase extraída mostrou uma melhor resposta em pH 7,3 a 6,5. Os grânulos obtidos foram usados para a preparação de um novo biossensor de uréia com um tempo de resposta de menos de 2 minutos e menos que 14 amostras de uréia puderam ser medidas dentro de uma hora. Os grânulos foram usados para analisar a quantidade de uréia em amostras clínicas dos laboratórios de patologia.

Kaushik et al., (2009) desenvolveram matrizes do bionanocompósito quitosana/óxido de ferro para imobilização das enzimas uréase e glutamato dehidrogenase e avaliaram em sensores para determinação de uréia apresentando sensibilidade a concentrações na faixa de 5 a 100 mg/dL.

3.3. Enzimas

Enzimas são formadas por aminoácidos ligados uns aos outros através da ligação peptídica, estabelecida entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino do aminoácido subsequente formando uma longa cadeia, Figura 3.7. Portanto, as enzimas são proteínas com atividade catalítica, catalisadores biológicos, podendo aumentar a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} vezes mais do que uma reação não catalisada. Os catalisadores não enzimáticos, em contraste, tipicamente aumentam a velocidade das reações por fatores entre 10^2 e 10^4 . A singularidade das enzimas decorre do elevado

grau de especificidade ao substrato sendo capazes de distinguir estereoisômeros de um dado composto (Campbell, 2000).

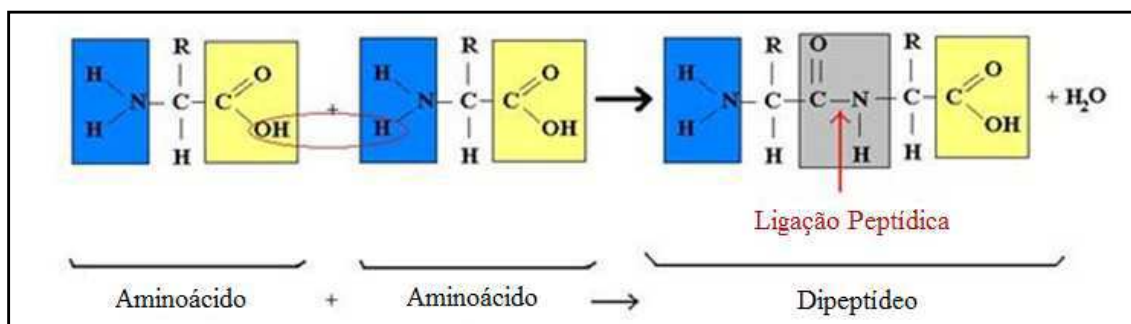


Figura 3.7- Esquema da formação da ligação peptídica.

Fonte: Campbell, 2000.

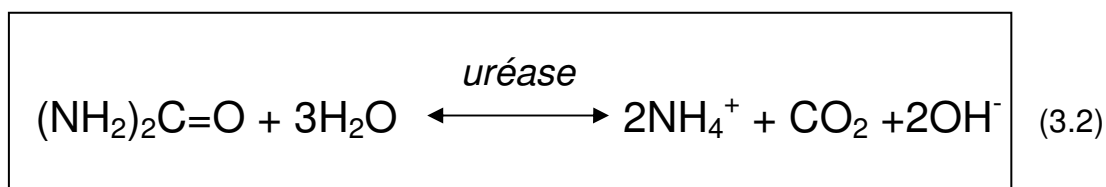
Características das enzimas:

- São produtos naturais biológicos;
- Apresentam um alto grau de especificidade;
- Reações seguras;
- Possuem mecanismo de regeneração, desempenhando a mesma função consecutivamente, sem serem consumidas no processo;
- São altamente eficientes, acelerando a velocidade das reações de 10^8 a 10^{11} vezes;
- Reduzem a energia de ativação necessária para a reação catalisada;
- Não são tóxicas.

3.3.1. Classificação e Nomenclatura das Enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) desenvolveu um sistema de nomenclatura na qual as enzimas são divididas em seis classes principais, Tabela 3.2, cada uma delas comportando subclasses conforme o tipo de reação catalisada. A enzima uréase pertence à classe Hidrolase por ser uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia em íons amônia,

dióxido de carbono e íons hidroxílicos, Reação 3.2. É uma enzima com sítios multi ativos compostos com estequiometria de 3:3 (α : β), 3 α hélices e 3 folhas β pregueada, com uma estrutura simétrica de 2 dobras (Kaushik et al., 2009).



Em 1926, James Summer mostrou que a uréase era uma proteína e que poderia ser encontrada em bactérias, leveduras e várias plantas superiores (Champe et al., 2006). De acordo com a IUBMB a uréase recebe o nome de uréia amidohidrolase e tem a seguinte classificação EC 3.5.1.5, onde:

EC – Classificação enzimática

3. – Classe das Hidrolases

5. – Subclasse das Hidrolases que quebram ligações C-N

1. – Subclasse das Hidrolases que quebram ligações C-N em amida linear

5. – Número de ordem da enzima.

Tabela 3.2 – Principais classes das enzimas conforme reportado por Champe et al., (2006).

Nº	Classe da enzima	Tipo de reação catalisada	Atuação
1	Oxidoredutases	Reação de oxidação-redução ou transferência de elétrons	CH – OH C = O CH – NH ₂ CH – NH– NADH, NADPH
2	Transferases	Transferem grupos funcionais entre moléculas	Grupos com um carbono Grupos aldeído ou acetona Grupo acil Grupos glicosil Grupos fosfato Grupos contendo enxofre
3	Hidrolases	Reações de hidrólise	Ésteres Ligações glicosídicas Ligações peptídicas Outras ligações C – N Anidridos ácidos
4	Liasas	Catalisam a quebra de ligações covalente e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico	= C = C = = C = O = C = N–
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros	Racemases
6	Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre às custas de energia	C – O C – S C – N C – C

3.3.2. Mecanismo de Catálise

As enzimas apresentam elevada especificidade relativamente às reações que catalisam e aos substratos com os quais interagem. Esta especificidade deve-se, entre outros fatores, a forma complementar (enzima/substrato), a carga, as características hidrofóbicas/hidrofílicas, etc. Existem dois diferentes modelos que procuram justificar a elevada especificidade das enzimas: o modelo chave-fechadura, de interesse principalmente histórico, uma vez que não leva em conta a flexibilidade conformacional das proteínas, diz que enzima e substrato são geometricamente complementares, encaixando de forma precisa um no outro. E o modelo de encaixe induzido, a ligação do substrato induz uma mudança conformacional na enzima, o que resulta em um encaixe complementar ao substrato, uma vez que ele está ligado, Figura 3.8 (Champe et al., 2006).

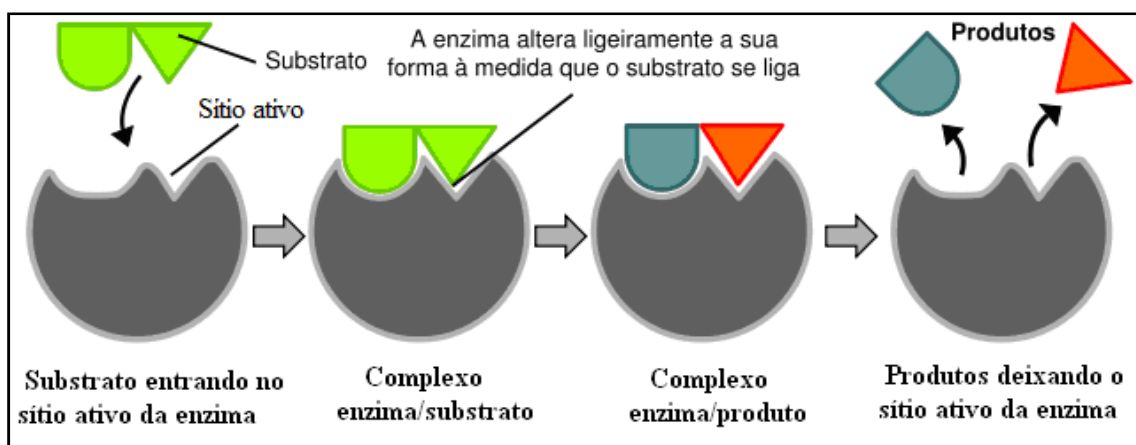


Figura 3.8 – Atividade enzimática através do modelo de encaixe induzido.
Fonte: Campbell, 2000.

Numa reação enzimática, a enzima liga-se ao substrato, em geral por interações não-covalentes, através de uma pequena porção da enzima conhecida como sítio ativo, frequentemente situada em uma fenda ou bolso da superfície da proteína e que consiste de certos aminoácidos essenciais para a atividade enzimática, formando um complexo ativado. A formação do complexo leva, por sua vez, à formação das espécies do estado de transição e a um rearranjo das ligações. No estado de transição, o substrato está ligado próximo

aos átomos com os quais irá reagir. Além disso, o substrato é direcionado para a orientação correta em relação a tais átomos. Ambos os efeitos, a proximidade e a orientação, aceleram a reação. Enquanto algumas ligações são quebradas e novas ligações são formadas, o substrato é transformado em produto. O produto é, então, liberado da enzima, e a mesma pode catalisar a reação de mais substratos para formar mais produtos (Campbell, 2000).

3.3.3. Aspectos Termodinâmicos da Catálise

Em todas as reações existe uma barreira energética entre os substratos (S) e os produtos (P). Numa reação, a diferença entre a energia dos substratos e a dos produtos fornece a variação de energia expressa pela variação da energia livre de Gibbs (ΔG). Para descrever a variação de energia livre ao longo da reação, definiram-se condições padrões: Temperatura de 298 K; Pressão parcial de cada gás de 1 atm ou 101,3 kPa; Concentração de cada soluto de 1 molL⁻¹. Portanto, a variação de energia livre favorece a:

- Um processo espontâneo, $\Delta G < 0$, quando a reação libera energia;
- Um processo não espontâneo, $\Delta G > 0$, quando a reação absorve energia.
- Um estado de equilíbrio, $\Delta G = 0$, onde: $\Delta H = T\Delta S$.

As enzimas, como todos os catalisadores, aumentam a velocidade das reações e não alteram a constante de equilíbrio ou a variação de energia livre de Gibbs. Para que uma reação ocorra às moléculas necessitam receber energia igual ou superior à energia de ativação que consiste na diferença entre a energia livre inicial dos reagentes e a energia livre no estado de transição ou ainda a quantidade de energia que é requerida para iniciar a reação. Portanto, as enzimas atuam baixando a energia de ativação da reação e conseqüentemente aumentando a velocidade das reações, sem afetar o

equilíbrio da reação. A redução da energia de ativação é favorecida pela interação enzima/substrato, formação de complexos, feita através de ligações hidrogeniônicas, ligações hidrofóbicas e interações iônicas que liberam uma pequena porção de energia que se reflete num acréscimo de estabilidade. A energia total libertada pela formação dos complexos é denominada de energia de ligação (*binding energy*) e confere poder catalítico à enzima por baixar a energia de ativação. Esta energia é necessária no rearranjo das ligações existentes, no alinhamento de grupos reativos e em outras transformações necessárias para que a reação se processe (Campbell, 2000).

A Figura 3.9, apresenta uma representação gráfica do curso energético de uma reação comparando o perfil de energia de ativação para uma reação catalisada e não-catalisada. A coordenada x mostra a extensão da reação que está ocorrendo e a coordenada y indica a energia livre da reação. A energia de ativação para uma reação não-catalisada é maior do que a de uma reação catalisada, por isso é que a sua velocidade é menor do que a reação catalisada.

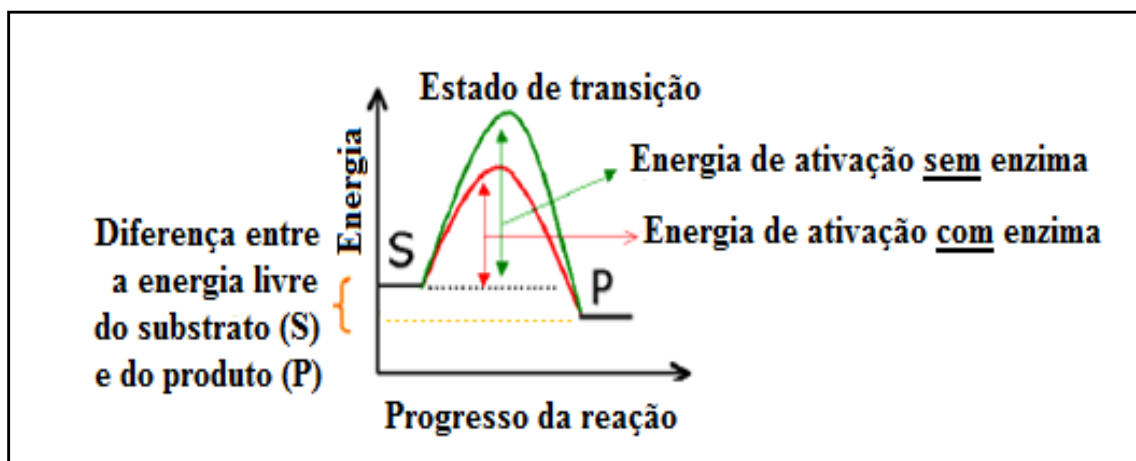
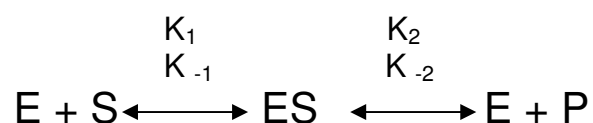


Figura 3.9 - Representação gráfica do curso energético de uma reação.

Fonte: Campbell, 2000.

3.3.4. Cinética Enzimática: Abordagem de Michaelis-Menten

A teoria inicial sobre cinética enzimática foi desenvolvida por Michaelis-Menten, em que segundo seu modelo, toda enzima (E), combina-se com o substrato (S) a fim de formar um complexo enzima/substrato (ES), no qual esse complexo resulta de uma interação entre o sítio ativo da enzima e a molécula do substrato intermediário. Neste caso a molécula se rompe para formar o(s) produto(s), (P), segundo as reações, consideradas reversíveis, a seguir:



Onde

k_1 - Constante de velocidade da reação que origina o complexo enzima/substrato (ES);

k_{-1} - Constante de velocidade da dissociação do complexo para regenerar a enzima (E) e o substrato (S);

k_2 - Constante de velocidade da reação do complexo que origina o produto (P) e a enzima (E);

k_{-2} - Constante de velocidade de reação para regenerar o complexo enzima/substrato (ES).

A velocidade de reação diminui com tempo t , ou seja, a velocidade de consumo de substrato ou formação de produto diminui em função do tempo devido à diminuição da concentração do substrato no decorrer da reação. A velocidade de formação do complexo enzima/substrato pode seguir dois caminhos: dissociar-se em enzima e substrato ou originar o produto e liberar a enzima. A velocidade de desaparecimento do complexo (ES) é a soma das velocidades das duas reações, Equação 3.2.

$$\text{Velocidade de desaparecimento} = - d [ES] / dt = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (3.2)$$

Onde: o sinal negativo no termo $- d [ES] / dt$ significa que a concentração do complexo diminui à medida que o complexo é desfeito.

As enzimas são capazes de processar o substrato de maneira muito eficiente e um estado estacionário é alcançado rapidamente, no qual a velocidade de formação do complexo enzima/substrato é igual à velocidade de seu desdobraimento. Há pouco complexo presente e ele se recicla de modo rápido, mas sua concentração permanece a mesma com o tempo. De acordo com a teoria do estado estacionário, a velocidade de formação do complexo enzima/substrato iguala-se à de seu desdobraimento, Equação 3.3.

$$\begin{aligned}d[ES] / dt &= - d[ES] / dt \\k_1 [E] [S] &= k_{-1} [ES] + k_2 [ES]\end{aligned}\quad (3.3)$$

Para calcular a concentração do complexo ES, é necessário saber a concentração das espécies envolvidas na reação. A concentração inicial do substrato é uma condição experimental conhecida e não muda significativamente durante as etapas iniciais da reação. A concentração de substrato é muito maior do que a concentração de enzima. A concentração total de enzima, $[E]_T$, também é conhecida, porém uma grande proporção pode estar envolvida na formação do complexo (ES). Portanto, a concentração de enzima livre, $[E]$, é a diferença entre a concentração total de enzima e a concentração das enzimas envolvidas na formação do complexo, Equação 3.4.

$$[E] = [E]_T - [ES] \quad (3.4)$$

Substituindo o termo da enzima livre, Equação 3.4, na Equação 3.3, tem-se:

$$\begin{aligned}k_1 ([E]_T - [ES]) [S] &= k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \\([E]_T - [ES]) [S] / [ES] &= k_{-1} + k_2 / k_1 = K_M \\([E]_T - [ES]) [S] / [ES] &= K_M\end{aligned}\quad (3.5)$$

A constante K_M é definida como a constante de Michaelis-Menten e indica a concentração de substrato quando a reação ocorre com a metade da velocidade máxima, a qual pode ser considerada o inverso da medida da afinidade da enzima pelo substrato. Logo, quanto menor o K_M maior será a afinidade substrato/enzima. Deduzindo o valor de $[ES]$ da Equação 3.5 é obtida a Equação 3.6.

$$\begin{aligned}([E]_T [S]) - ([ES] [S]) &= K_M [ES] \\(K_M [ES]) + ([ES] [S]) &= ([E]_T [S]) \\[ES] (K_M + [S]) &= ([E]_T [S]) \\[ES] &= [E]_T [S] / K_M + [S]\end{aligned}\tag{3.6}$$

Nas etapas iniciais da reação, há pouco produto presente, então a reação reversa para regenerar o complexo enzima/substrato (ES), pode ser desprezada. E a velocidade inicial das reações enzimáticas dependerá da velocidade de quebra do complexo que origina o produto (P) e a enzima (E). No modelo de Michaelis-Menten a velocidade inicial (V_0) de formação do produto depende somente da velocidade de quebra do complexo (ES).

$$V_0 = k_2 [ES] \Rightarrow [ES] = V_0 / k_2\tag{3.7}$$

Substituindo o valor de $[ES] = V_0 / k_2$ na Equação 3.6 é obtida a Equação 3.8.

$$V_0 = k_2 [E]_T [S] / K_M + [S]\tag{3.8}$$

Se a concentração de substrato for tão alta que a enzima está completamente saturada com o substrato ($[ES] = [E]_T$), a reação ocorrerá em uma maior velocidade possível ($V_{m\acute{a}x}$) e substituindo $[ES]$ por $[E]_T$ na Equação 3.7, tem-se a Equação 3.9.

$$V_0 = V_{m\acute{a}x} = k_2 [E]_T\tag{3.9}$$

Portanto, substituindo o valor $V_{\text{máx}}$ na Equação 3.8 é obtida a Equação 3.10, equação de Michaelis-Menten, que relaciona a velocidade inicial e máxima de uma reação enzimática.

$$V_0 = V_{\text{máx}} [S] / K_M + [S] \quad (3.10)$$

Em condições experimentais ajustadas de maneira que $[S] = K_M$, tem-se:

$$V = V_{\text{máx}} [S] / [S] + [S] \Rightarrow V = V_{\text{Máx}} / 2$$

Portanto, quando a velocidade da reação é metade de seu valor máximo, a concentração de substrato $[S]$ é igual à constante de Michaelis (K_M). Este fato é a base para a determinação gráfica da constante (K_M), Figura 3.10.

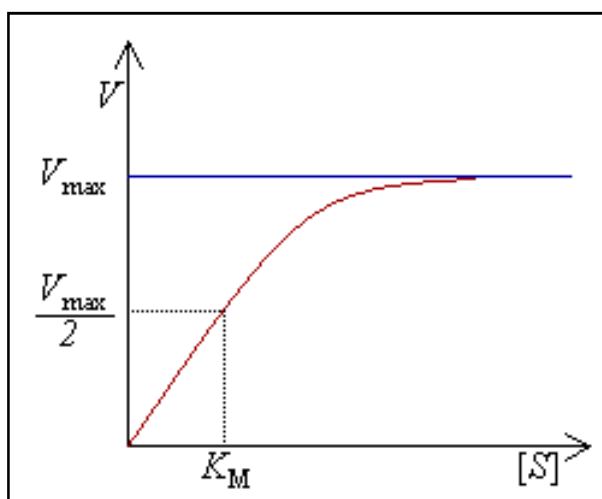


Figura 3.10 – Determinação gráfica da $V_{\text{máx}}$ e de K_M , a partir da curva obtida com a variação da velocidade da reação (V) em função do substrato [S].
Fonte: Campbell, 2000.

Como a curva que descreve a velocidade de uma reação enzimática é uma hipérbole é difícil determinar experimentalmente um ponto único a partir do qual a velocidade é máxima. O que torna difícil a determinação da velocidade máxima $V_{\text{máx}}$ e da constante de Michaelis (K_M). Portanto, é necessário transformar a equação da hipérbole em uma equação de reta, tomando os recíprocos em ambos os membros da Equação 3.10.

$$1/V = (K_M + [S]) / (V_{\text{máx}} [S]) \Rightarrow 1/V = (K_M / V_{\text{máx}} [S]) + ([S] / V_{\text{máx}} [S]) \Rightarrow$$
$$1/V = (K_M / V_{\text{máx}} * 1/[S]) + (1/ V_{\text{máx}}) \quad (3.11)$$

A equação 3.11 de Michaelis-Menten linearizada pelo método Lineweaver-Burk apresenta a forma de uma reta $y = mx + b$, em que $1/V$ representa a coordenada y , $K_M/V_{\text{máx}}$ a inclinação da reta m , $1/[S]$ a coordenada x e $1/ V_{\text{máx}}$ o intercepto b . A Figura 3.11 apresenta essas informações graficamente através do gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk.

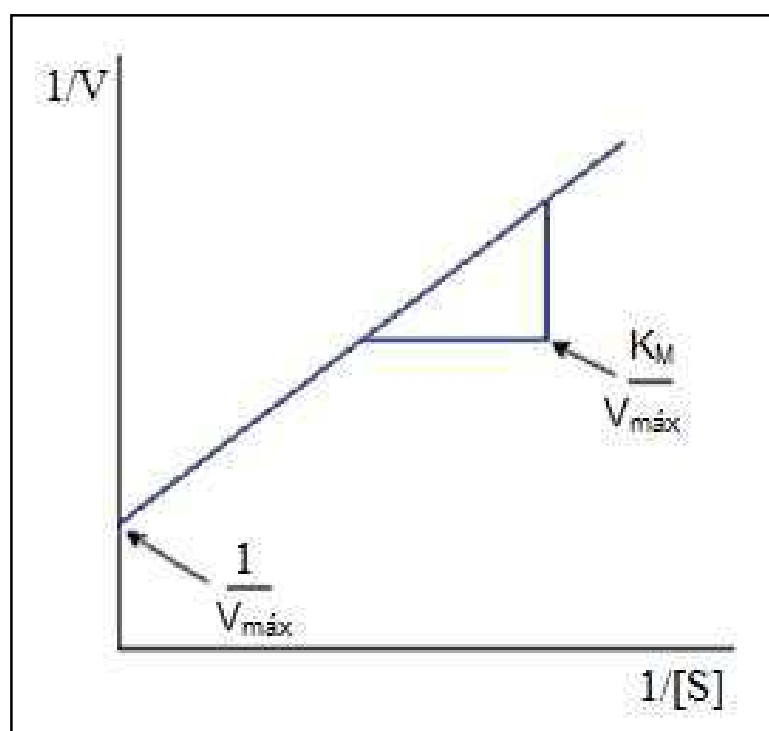


Figura 3.11 - Linearização de Lineweaver-Burk.
Fonte: Campbell, 2000.

3.3.5. Fatores que Influenciam a Ação Enzimática

- Concentração do substrato

A velocidade de uma reação (V) é o número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo. Geralmente, a velocidade é expressa como μmol de produto formado por minuto. A velocidade de uma reação catalisada por enzima aumenta conforme a concentração do substrato, até uma velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) ser atingida, Figura 3.9. A obtenção de um platô na velocidade da reação em altas concentrações de substrato reflete a saturação pelo substrato de todos os sítios de ligação disponíveis nas moléculas enzimáticas presentes na reação (Champe et al., 2006).

- Temperatura

A velocidade da reação aumenta até atingir um pico de velocidade na temperatura ótima. Esse aumento é devido ao aumento do número de moléculas com energia suficiente para atravessar a barreira de energia e formar os produtos da reação. No entanto, uma elevação de temperatura acima da temperatura ótima resulta na redução da velocidade da reação, como resultado da desnaturação da enzima, induzida pela temperatura, Figura 3.12 (Champe et al., 2006).

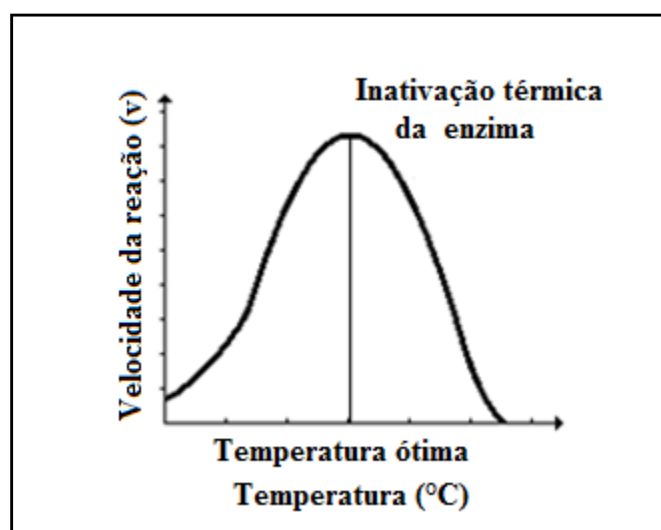


Figura 3.12 – Efeito da temperatura sobre uma reação catalisada por enzima. Fonte: Campbell, 2000.

- pH

Efeito do pH sobre a ionização do sítio ativo – A concentração de H^+ afeta a velocidade da reação de várias maneiras. Primeiro, o processo catalítico geralmente requer que a enzima e o substrato tenham determinados grupos químicos em um estado ionizado ou não-ionizado, de modo a interagirem. Por exemplo, a atividade catalítica pode requerer que o grupo amino da enzima esteja protonado ($-NH_3^+$). No entanto, em pH alcalino, não ocorre a protonação do grupo amino e, desse modo, a velocidade da reação diminui.

Efeito do pH sobre a desnaturação da enzima – Valores extremos de pH também podem levar à desnaturação da enzima, pois a estrutura da molécula protéica cataliticamente ativa depende do caráter iônico das cadeias laterais dos aminoácidos.

O pH ótimo varia de acordo com a enzima – o pH no qual a atividade máxima da enzima é atingida difere para cada enzima e, geralmente, reflete a $[H^+]$ na qual a enzima está ativa no organismo (Champe et al.,2006).

- Inibidores

Um inibidor, conforme o nome indica, é uma substância que interfere na ação de uma enzima, tornando mais lenta a velocidade da reação. Existem duas formas pelas quais os inibidores podem afetar uma reação enzimática. Um inibidor reversível pode ligar-se a enzima e subsequentemente ser liberado, deixando-a em sua condição original. Um inibidor irreversível reage com a enzima produzindo uma proteína que deixa de ser enzimaticamente ativa, de forma que a enzima original não pode ser regenerada.

Duas classes principais de inibidores reversíveis podem ser distintas com base nos sítios da enzima onde eles se ligam. Uma classe consiste de compostos com estrutura muito similar a do substrato. Nesse caso, o inibidor pode ligar-se ao sítio ativo e bloquear o acesso do substrato. Esse mecanismo de ação é chamado de inibição competitiva, porque o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. A outra classe importante de inibidores reversíveis inclui qualquer inibidor que se ligue a enzima em um local diferente do sítio ativo; como resultado da ligação ocorre uma mudança na estrutura da

enzima especialmente em torno do sítio ativo. O substrato pode ligar-se a enzima, porém, a enzima não pode mais catalisar a reação de maneira tão eficiente, como catalisaria na ausência do inibidor. Esse mecanismo de ação é denominado de inibição não competitiva (Campbell, 2000).

3.3.6. Imobilização de Enzimas

As enzimas exibem várias características que fazem seu uso vantajoso quando comparado a catalisadores químicos convencionais. Elas apresentam um alto nível de eficiência catalítica, frequentemente superior aos catalisadores químicos, e um alto grau de especificidade que permite discriminar não apenas entre reações, mas também entre substratos, partes semelhantes de moléculas (regiospecificidade) e entre isômeros ópticos (estereoespecificidade). Operam a condições moderadas de temperatura, pressão e pH com taxas de reação na ordem das realizadas por catalisadores químicos nas mais extremas condições (Krajewska, 2004).

Além das vantagens inquestionáveis, existem várias limitações com o uso de enzimas, tais como: alto custo de isolamento e purificação, instabilidade da estrutura uma vez que estão isoladas dos seus ambientes naturais, efeito de desnaturação associados ao uso em condições operacionais fora das condições ótimas de uso e a presença de substâncias que podem atuar como inibidores. Muitos métodos têm sido propostos para superar essas limitações, sendo a imobilização de enzimas o mais próspero. A imobilização de enzimas imita o modo natural de ocorrência das enzimas em células vivas, onde geralmente as enzimas são fixadas em membranas celulares e consiste em fixar a enzima em ou entre suportes sólidos. Como resultado da imobilização são obtidos sistemas heterogêneos que estabilizam a estrutura das enzimas e conseqüentemente suas atividades. Entre as vantagens associadas ao uso de enzimas imobilizadas, constam: utilização contínua da enzima; favorecimento da reutilização da enzima; possibilidade do uso econômico da enzima em maior concentração; estabilidade e resistência à desnaturação (Bullock, 1995).

As enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos os quais podem ser amplamente classificados como físicos, formação de interações fracas entre o suporte e a enzima, e químicos, formação de ligações covalentes entre o suporte e a enzima. A imobilização física inclui os métodos: adsorção em matriz insolúvel em água, inclusão ou *gel entrapment*, microencapsulação em membrana sólida, microencapsulação em membrana líquida e a formação de filmes enzimáticos de *Langmuir-Blodgett*. A imobilização química inclui os métodos: ligação covalente em matriz insolúvel em água, ligações cruzadas utilizando agentes multifuncionais de baixa massa molar como o glutaraldeído e ligação co-cruzada com outras substâncias neutras, por exemplo as proteínas (Tischer et al., 1999). A Figura 3.13 apresenta um esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimática: (A) adsorção, (B) encapsulação, (C) ligação covalente e (D) ligação covalente cruzada.

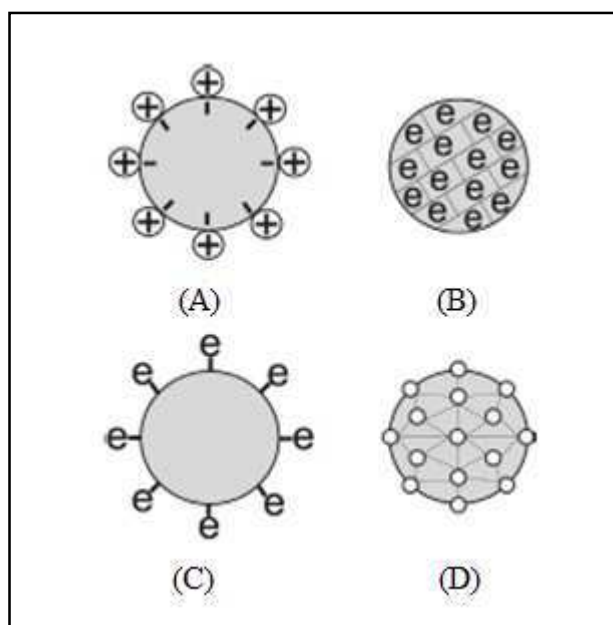


Figura 3.13 – Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimática: (A) adsorção, (B) encapsulação, (C) ligação covalente e (D) ligação covalente cruzada.

Fonte: Marques et al., 2008.

Todos os métodos de imobilização de enzimas apresentam vantagens e desvantagens. O método de adsorção é simples, barato e efetivo, mas frequentemente reversível. Os métodos por ligação covalente e por ligações cruzadas são efetivos e duradores, mas também caros, diminuem a atividade enzimática e aumentam a constante de Michaelis (K_M), devido às mudanças estruturais introduzidas. Já nos métodos de imobilização por microencapsulação problemas de migração são inerentes (Krajewska, 2004). Portanto, não existe um método e um suporte ideal para todos os tipos de enzimas e suas aplicações. Isto se deve às variadas características químicas e de composição das enzimas, as diferentes propriedades dos substratos e dos produtos e os diferentes usos para o qual o produto pode ser aplicado.

As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pelas propriedades da enzima e do material de suporte. A interação entre os dois conduz a propriedades físico-químicas e cinéticas específicas para a enzima imobilizada, portanto a escolha criteriosa de um suporte pode aumentar significativamente o desempenho do sistema. Embora seja de conhecimento que não existe um suporte ideal para todas as enzimas e suas aplicações, algumas características desejáveis devem ser comuns a qualquer material considerado suporte para imobilização de enzimas. Estas incluem: alta afinidade a proteínas, disponibilidade de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e para modificações químicas, estabilidade mecânica e rigidez, hidrofobicidade e facilidade de preparação em configurações geométricas diferentes que proporcione ao sistema permeabilidade e área de superfície satisfatória para a escolha do método de imobilização. Compreensivelmente para aplicações farmacêuticas, alimentícias, médicas e agrícolas características como não toxicidade e biocompatibilidade são requeridas. Quanto à consciência ambiental, os materiais devem ser biodegradáveis e economicamente viáveis (Krajewska, 2004).

Dos muitos materiais (orgânicos, inorgânicos, naturais e sintéticos) que têm sido considerados e avaliados para aplicação como suporte de imobilização de enzimas, a quitina e a quitosana são de interesse por apresentarem a maioria das características citadas anteriormente. Estudos

reportados na literatura têm avaliado a utilização de silicatos em camadas (vermiculita, saponita e laponita) como suporte para imobilização de uréase (Hirano, 1998).

3.4. Quitosana

A descoberta da quitosana data do século 19, quando em 1859 Rouget avaliou formas de desacetilação do polímero natural quitina, composto por unidades N-acetil-D-glicosamina ligadas através de (1,4)- β -ligações glicosídica, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos sendo classificada como o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, ficando atrás apenas da celulose. Este material foi nomeado como quitosana em 1894 por Hoppe-Seyler e sua estrutura química finalmente resolvida em 1950.

A quitosana é um polissacarídeo amino, biodegradável, atóxico e derivado do processo de desacetilação da quitina que envolve a hidrólise dos grupos acetilados a partir de uma solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio a altas temperaturas, 90°C a 120°C, por um período de 4 a 5 hora (Dash et al., 2011; Assis & Silva, 2003). Durante o curso da desacetilação alcalina, as ligações N-acetil-D-glicosamina presentes no C-2 (carbono dois) do anel glicopiranosídico do polímero natural quitina são rompidas, formando ligações D-glicosamina que contém um grupo amino livre. Desta forma, a quitosana não pode ser considerada uma molécula uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de desacetilação acima de 50%, comumente de 70 a 90%, podem ser considerados como quitosana (Craveiro et al., 1999). Portanto, a quitosana é um copolímero constituído por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, ligadas através de (1,4)- β -ligações glicosídicas, mas com predominância das unidades D-glicosamina (Laranjeira et al., 2009). A Figura 3.14, representa a estrutura química da quitosana. Neste contexto, um rígido controle das condições reacionais é essencial em escala industrial para que se

obtenha um polímero com massa molar e com grau de desacetilação na faixa desejada.

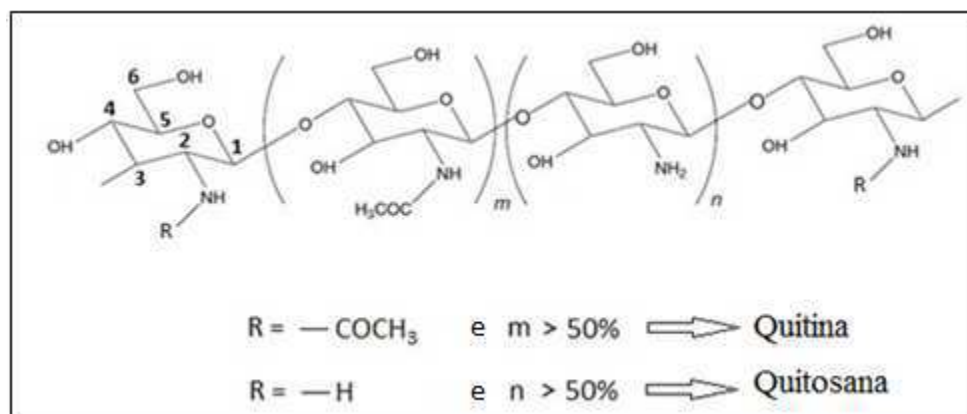


Figura 3.14 – Estrutura química da quitosana.
Fonte: Silva et al., 2011.

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia tem sido muito investigada, e muitos polimorfismos são mencionados na literatura. Cristais de quitosana são obtidos usando-se a desacetilação completa da quitina de baixa massa molar. Na difração de raios X da quitosana é observada uma célula unitária ortorrômbica com parâmetros $a=0,807$ nm, $b=0,844$ nm, $c=1,034$ nm e $\beta = 90^\circ$ (Demarquete, 2001).

O grau de desacetilação afeta propriedades químicas e físicas da quitosana, tais como solubilidade, cristalinidade, viscosidade, biodegradabilidade e conseqüentemente suas aplicações (Dash et al., 2011; Rinaudo, 2006). O aumento do grau de desacetilação assegura a presença de grupos amino livres, os quais em meio ácido, com valores de pH menor que 6, podem ser facilmente protonados (NH_3^+) gerando uma carga positiva por unidade D-glicosamina e tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água (Krajewska, 2004; Chivrac et al., 2009; Lavorgna et al., 2010). Por outro lado, o aumento do pH para valores maiores que seis favorece a desprotonação dos grupos amino e o polímero perde a carga tornando-se insolúvel. A quitosana é facilmente solúvel em soluções ácidas diluídas, $pH < 6$,

devido a quaternização do grupo amino que tem um valor de pKa igual a 6,3 tornando a quitosana um polieletrólito catiônico ou seja, com uma alta densidade de carga (Dash et al., 2011). O que justifica sua apreciável interação com biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e ácidos graxos como também com silicatos em camadas, montmorilonitas e bentonitas sódicas, por apresentarem cargas negativas em suas superfícies. A Figura 3.15 apresenta um esquema ilustrativo da solubilidade da quitosana.

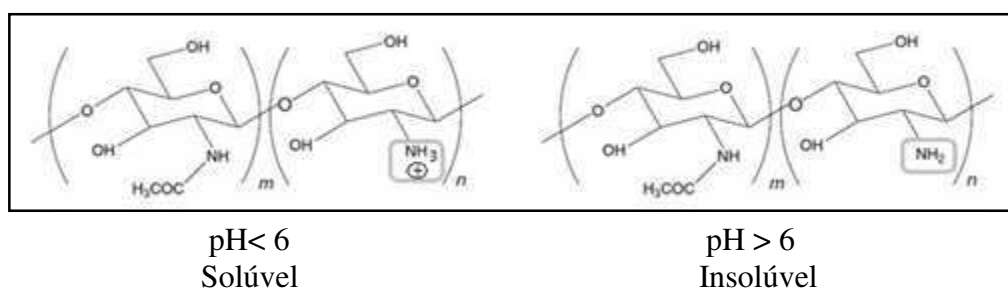


Figura 3.15 – Esquema ilustrativo da solubilidade da quitosana. Em pH < 6 os grupos amino da quitosana são protonados conferindo a quitosana um comportamento policatiónico. Em pH > 6 os grupos amino da quitosana são desprotonados e reativos. Fonte: Silva et al., 2011.

Na última década vários produtos com alto valor agregado a base de quitosana têm sido desenvolvidos para diversas áreas no tratamento de água e esgoto (remoção de metais pesados, membranas para o processo de purificação), na indústria alimentícia (anticolesterol, material para embalagem), na agricultura (sistemas para liberação controlada de substâncias agroquímicas), na indústria de papel (tratamento de superfície, papel fotográfico) e na indústria de cosméticos (cremes para o corpo, loção para banho) (No et al., 2000). Como os materiais a base de quitosana apresentam propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e apreciável afinidade com proteínas, esses têm sido utilizados como carreador em sistemas para liberação controlada de fármacos, membranas de hemodiálise, pele artificial, suturas cirúrgicas e tecidos de engenharia. Na área de biotecnologia eles encontram aplicações como matrizes cromatográficas e

como suportes para imobilização de enzimas para aplicação em biossensores (Felt et al., 2000; Krajewska, 2004; Dallan, 2005).

Embora vários produtos a base de quitosana tenham sido desenvolvidos, as propriedades mecânicas, térmicas, de barreira a gás e a atividade bacteriostática de filmes de quitosana precisam ser melhoradas. Então, modificações químicas, blendas e copolímeros graftizados ou enxertados tem sido consideradas alternativas atraentes para propiciar a quitosana melhorias em suas propriedades. Neste contexto, a síntese de nanocompósitos com uma nanofase inorgânica dispersa, silicato em camada, foi proposta como uma alternativa para modificar algumas das propriedades da quitosana, incluindo propriedades mecânicas e térmicas (Wang et al., 2005; Wu & Wu, 2006), solubilidade e adsorção em meio ácido (Pongjanyakul et al., 2005), atividade antimicrobiana (Wang et al., 2006; Han et al., 2010) e bioadesão (Pongjanyakul & Suksri, 2009).

3.5. Silicatos em Camadas

3.5.1. Montmorilonita

As montmorilonitas são formadas por argilominerais trifórmicos 2:1 (Figura 3.16), ou seja, tem uma estrutura que consiste de duas folhas tetraédricas envolvendo uma folha central octaédrica, unidas entre si por oxigênios comuns às folhas para formar uma camada. As camadas são empilhadas e unidas entre si por fracas forças eletrostáticas e de Van der Waals, com um espaçamento regular entre elas, chamado espaço intercamada (interlamelar) ou galeria, podendo ser facilmente cisalhadas. Cada camada tem uma espessura em torno de 0,96 nm e uma dimensão lateral da ordem de centenas de nanômetros (Utracki, 2004). A soma da espessura de uma única camada (0,96 nm) e da galeria representa a unidade de repetição do material multicamada chamado espaçamento basal (distância interplanar basal) (d_{001}). O espaçamento basal, conforme determinado por medidas de difratometria de

raios X, pode ser de 1,0 e 1,4 nm para a montmorilonita nas formas anidra e hidratada, respectivamente.

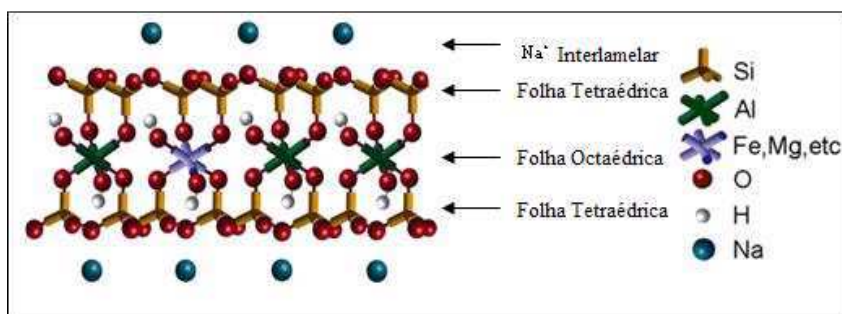


Figura 3.16 – Representação esquemática da estrutura da montmorilonita.
Fonte: Paul et al., 2008.

Substituições isomórficas principalmente nas folhas octaédricas, onde Al^{3+} pode ser substituído por Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} ou Li^+ e em percentagem moderada, cerca de 15%, nas posições tetraédricas do Si^{4+} por Al^{3+} geram cargas negativas, e as camadas ficam eletricamente desequilibradas com uma deficiência de aproximadamente 0,66 cargas positivas por célula unitária. Esta deficiência é equilibrada principalmente por cátions hidratados denominados cátions trocáveis (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} .) que são fixados reversivelmente nos espaços entre as camadas (espaços interlamelares) (80 %) e nas superfícies laterais das camadas (20 %) mantendo assim o equilíbrio elétrico (Qinet et al., 2003; Awad et al., 2004). Os cátions trocáveis não pertencem à estrutura do cristal e estão fracamente ligados à superfície do mesmo, sendo facilmente trocados por outros cátions (Peng et al., 2005; Salman et al., 2007; Utracki, 2004). A facilidade de troca de cátions depende principalmente da sua valência; concentração; dimensões e hidratação (Souza Santos, 1989).

A montmorilonita (MMT) possui área superficial específica de 750 a 800 m^2/g , sendo o valor teórico de 834 m^2/g . A capacidade de troca de cátions (CTC) varia de 80 a 120 meq/100g e pode ser resultado do desequilíbrio de cargas provenientes das substituições isomórficas no próprio retículo cristalino, das ligações químicas quebradas nas arestas das partículas e da substituição

de hidrogênio por hidroxilas, ou seja, é uma medida da carga total das camadas. Esta propriedade (CTC) é altamente dependente da natureza das substituições isomórficas nas camadas tetraédricas e octaédricas e, portanto, da natureza do solo onde a argila foi formada. Isto explica porque montmorilonitas de diferentes origens apresentam diferentes valores de CTC (Kornmann et al., 2001).

Em dispersão aquosa ou em meio úmido as montmorilonitas possuem a capacidade de trocar os cátions de sódio, através de reações troca catiônica, sem que isto promova modificação na estrutura cristalina. Além de adsorverem cátions inorgânicos e água, as montmorilonitas podem captar moléculas orgânicas em posições interlamelares. Essas moléculas podem ser derivadas de aminas, proteínas, ácidos entre outros. Elas substituem os cátions trocáveis formando monocamadas ou bicamadas (Souza Santos, 1992).

3.5.2. Bentonita

Os nomes bentonita, esmectita e montmorilonita são freqüentemente usados como sinônimos, no entanto, industrialmente esses termos representam minerais diferentes com diferentes graus de pureza.

Os depósitos de argilas bentoníticas da Paraíba estão entre os maiores e mais importantes jazimentos deste mineral do Brasil. Suas ocorrências estão situadas no Município de Boa Vista e seus depósitos encontram-se nas minas Lages, Bravo, Juá e Canudos. As bentonitas de Boa Vista ficaram conhecidas pela sua capacidade de inchar na presença de água, desenvolvendo géis tixotrópicos após tratamento com Na_2CO_3 , bem como pela sua variedade de cores (Araújo, 2008).

O termo “bentonita” foi aplicado pela primeira vez em 1898 a uma argila plástica coloidal encontrada no Fort Benton em Wyoming (EUA). São rochas sedimentares constituídas de uma grande proporção de argilominerais como montmorilonita (geralmente > 80%), beidelita, saponita, nontronita e hectorita, podendo também conter outros argilominerais e impurezas tais como sílica,

caulinita, quartzo, feldspato, apatita, calcita, dolomita, carbonato de sódio, matéria orgânica, entre outras. Sua cor varia de branco a amarelo, de verde oliva a marrom ou azul, dependendo da presença de cátions coloridos, sejam eles estruturais e ou trocáveis, tais como Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} . A presença de impurezas como matéria orgânica e minerais associados, também podem colorir as bentonitas (Utracki, 2004; Coelho et al., 2007). A Figura 3.17 apresenta fotos ilustrativas de argilas bentoníticas com coloração variada.



Figura 3.17 – Argilas bentoníticas.
Fonte: Araújo, 2008.

A matéria orgânica encontrada nas argilas ocorre na forma de linhito, ceras e derivados do ácido húmico e refere-se à soma total de todo carbono orgânico contido nas substâncias húmicas e não-húmicas (Salman et al., 2007). As substâncias não-húmicas incluem substâncias com características químicas reconhecidas, tais como: carboidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos gordurosos, ceras e outras substâncias orgânicas de baixa massa molar. As substâncias húmicas não exibem características químicas e físicas específicas, mas estão associadas aos compostos orgânicos bem definidos e são mais resistentes à degradação biológica e química. A forte adsorção de substâncias húmicas (ácido húmico) ocorre nos sítios Al e uma fraca adsorção ocorre nos sítios Si da argila (Peng et al., 2005).

A determinação da matéria orgânica pode ser feita por três processos: combustão a seco, oxidação com peróxido de hidrogênio e oxidação com solução ácida de dicromato de potássio. Quando presente em algumas argilas,

a matéria orgânica promove um caráter plástico devido ao fato dos ácidos húmicos agirem como colóide protetor hidrofílico das partículas de argilominerais dificultando a troca de cátions dos argilominerais o que influencia na capacidade de troca catiônica, CTC, das argilas (Souza Santos, 1989). Portanto, a purificação capaz de remover seletivamente a matéria orgânica das bentonitas, sem variar sua estrutura cristalina, antes da incorporação no polímero é fundamental.

A capacidade de troca de cátions, CTC, é uma das principais propriedades das bentonitas, variando na faixa de 80 a 150 meq/100 g. Esta propriedade é altamente dependente da natureza das substituições isomórficas nas folhas tetraédricas e octaédricas do argilomineral montmorilonita (Souza Santos, 1989; Utracki, 2004).

Segundo Díaz et al. (1992), as bentonitas classificam-se segundo a presença dos cátions trocáveis em:

- Homocatiônica: quando há predominância de um tipo de cátion trocável como sódio ou cálcio (Wyoming, EUA e Mississipi, EUA);
- Policatiônica: quando há predominância de cátions trocáveis como sódio, cálcio e potássio (é o caso da maioria das ocorrências, a exemplo de Boa Vista, PB, Brasil).

De acordo com o cátion trocável fixado às camadas do argilomineral esmectítico, moléculas de água podem penetrar indefinidamente entre elas, até separá-las completamente, $d_{001} > 4,0$ nm, permitindo a algumas bentonitas a capacidade de aumentar de volume quando imersas em água. Assim, de acordo com o tipo de cátion trocável essas argilas podem ser divididas em:

- Bentonitas que incham: quando o cátion trocável predominante é o sódio. O sódio hidrata-se causando contínua absorção de água, aumentando o espaçamento basal em até vinte vezes o volume da argila seca quando imersa em água. Nestas condições, o Na^+ é susceptível de ser trocado reversivelmente por outros cátions;
- Bentonitas que não incham: quando o cátion predominante é o cálcio, o magnésio ou não há predominância de um tipo de cátion trocável. Neste tipo de argila o aumento na distância basal pela inserção de moléculas de água não é

suficiente para acarretar um aumento considerável no volume da bentonita quando imersa em água (Díaz, 1999).

3.6. Nanocompósitos Poliméricos

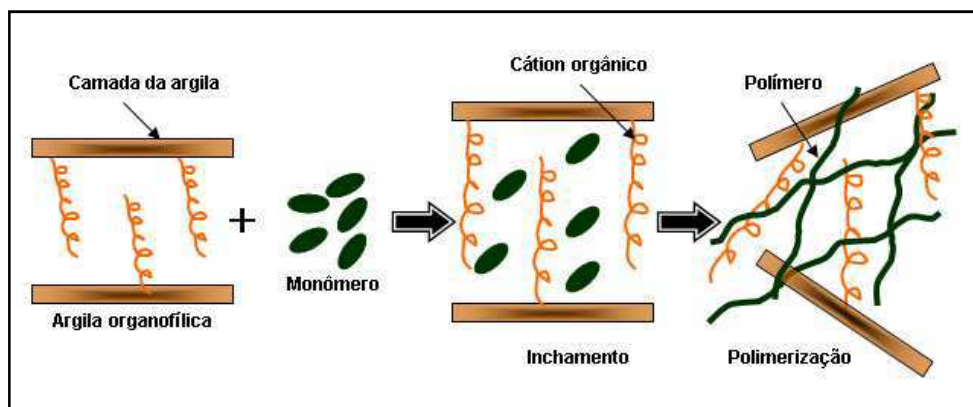
Os primeiros nanocompósitos polímero/argila foram reportados na literatura em aproximadamente 1961 quando Blumstein demonstrou a polimerização de monômeros vinílicos intercalados entre as lamelas da montmorilonita (Ganguli et al., 2003).

Nanocompósitos são materiais compósitos onde um dos constituintes apresenta dimensão na extensão entre 1 e 200 nm (Liu et al., 2003). Nanocompósitos poliméricos constituem uma classe de materiais poliméricos constituídos por uma matriz polimérica e uma nanofase inorgânica (1 - 5% em massa) dispersa e interagindo com a matriz em escala nanométrica o que favorece a melhorias nas propriedades mecânicas, térmicas, estabilidade dimensional e de barreira do polímero (Morgan & Harris, 2003; Ray & Okamoto, 2003).

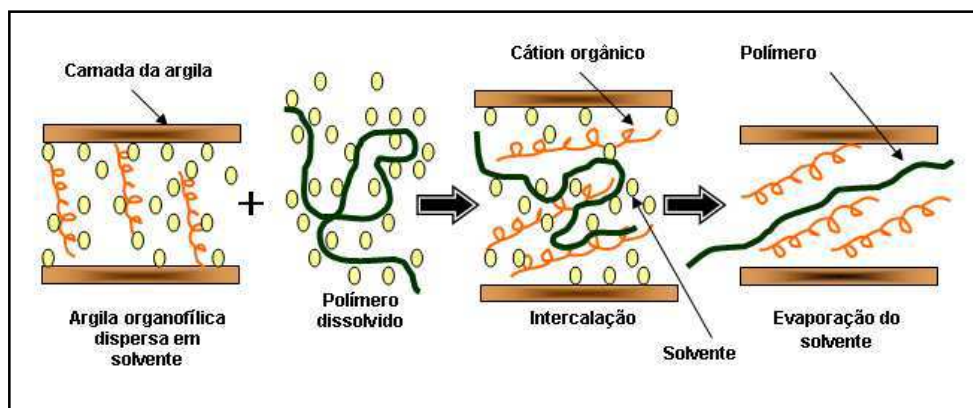
A argila mais empregada na área de nanocompósitos polímero/silicato em camada é a montmorilonita. Uma vez que, com a utilização dos silicatos em camadas a interação entre polímero/argila pode aumentar consideravelmente devido à elevada razão de aspecto dos mesmos e características únicas de intercalação/esfoliação são conseguidas. Isto maximiza a interação entre os componentes, ampliando o número de superfícies e interfaces argila/matriz (Cho & Paul, 2001). A montmorilonita sendo um sólido hidrofílico dispersa bem em polímeros polares ou em água, não interagindo com polímeros hidrofóbicos apolares como poliolefinas, sendo necessário um tratamento orgânico, organofilização, para que suas superfícies se tornem hidrofóbicas (Araújo, 2008).

Os nanocompósitos polímero/argila podem ser preparados pelos métodos: polimerização *in situ*, intercalação a partir de uma solução e intercalação por fusão (Li et al., 2003). O esquema da preparação de

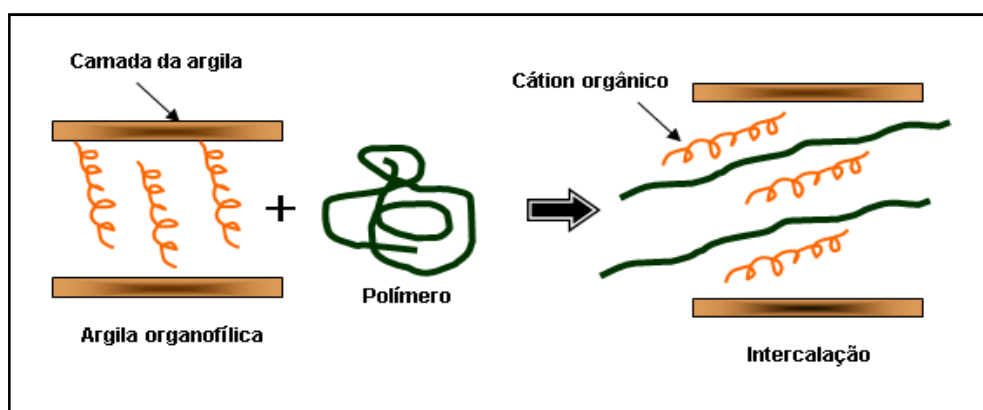
nanocompósitos pelo método de polimerização *in situ* e intercalação por solução e fusão estão apresentados na Figura 3.18.



Polimerização *in situ*



Intercalação por solução



Intercalação por fusão

Figura 3.18 - Esquema da preparação de nanocompósitos pelo método de polimerização *in situ* e intercalação por solução e fusão, respectivamente. Fonte: Araújo, 2008.

- A polimerização *in situ* foi o primeiro método utilizado para preparar nanocompósitos polímero/argila e atualmente é o processo convencional de preparação de nanocompósitos com matriz termofixa. A argila organofílica é dispersa e expandida no monômero para em seguida a reação de polimerização ter início com a adição do agente de cura (Messersmith & Giannelis, 1995).

- A intercalação por solução emprega solvente ou mistura de solventes. Inicialmente a argila organofílica ou natural é dispersa e expandida no solvente, em seguida uma solução do polímero é adicionada à dispersão permitindo a intercalação deste na argila. O solvente é então eliminado por evaporação. Este é um bom método de preparação de nanocompósitos para polímeros solúveis em água ou em soluções ácidas diluídas. O poli (álcool vinílico) (PVA) (Strawhecker & Manias, 2000), o poli(óxido de etileno), (PEO) (Hyun et al., 2001), a gelatina (Xu et al., 2005) e a quitosana (Darder et al., 2005) são alguns polímeros usados na preparação de nanocompósitos por este método.

- Na intercalação por fusão o polímero é misturado com a argila organofílica e em seguida processado em temperaturas suficientemente elevadas para fundir ou amolecer o material e permitir a intercalação das moléculas entre as lamelas da argila. Vários polímeros tais como poli (óxido etileno), poliestireno e uma série de polímeros derivados de estireno, copolímeros de estireno - butadieno, poliamida 6 e copolímero dibloco de polietileno – poli (etileno glicol) têm sido intercalados por fusão entre as camadas de silicatos modificados organicamente (Araújo, 2008).

Dependendo da natureza dos componentes utilizados, do método de preparação e da intensidade da interação interfacial entre a matriz polimérica e as partículas da argila, diferentes morfologias polímero/argila podem ser obtidas. Sendo estas classificadas como intercalada, floculada e esfoliada, Figura 3.19.

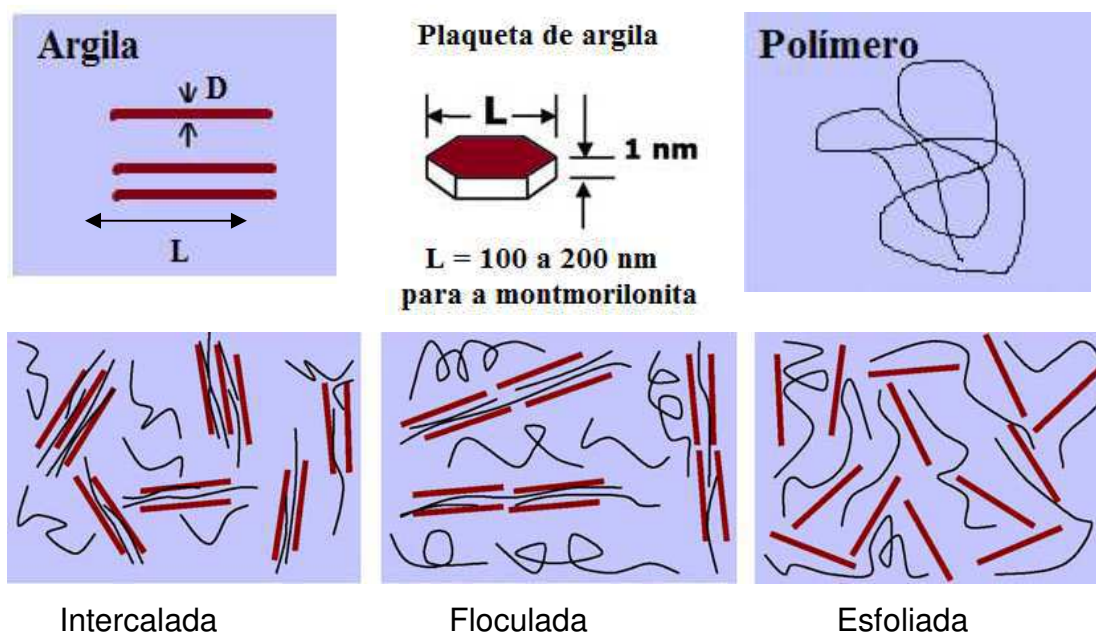


Figura 3.19 – Morfologias polímero/argila: intercalada, floculada e esfoliada.
Fonte: Adaptado de Ray & Okamoto, 2003.

- Nanocompósito intercalado: ocorre a inserção de poucas moléculas da matriz polimérica entre as camadas do argilomineral. Neste caso, há um aumento da distância interlamelar basal sem destruir o empilhamento natural da argila, mantido por forças de Van der Waals (Ray & Okamoto, 2003).

- Nanocompósito floculado: conceitualmente, este tipo de nanocompósito assemelha-se ao nanocompósito intercalado. Todavia, as partículas dos silicatos em camadas são floculadas devido a interações aresta-aresta formando aglomerados de partículas intercaladas por moléculas de polímero (Ray & Okamoto, 2003).

- Nanocompósito esfoliado ou delaminado: neste caso, a quantidade de cadeias intercaladas no espaço interlamelar é suficiente para aumentar o espaçamento entre as lamelas a ponto de anular o efeito das forças atrativas entre estas. As camadas passam a se comportar como entidades isoladas umas das outras e são homoganeamente dispersas na matriz polimérica apresentando-se separadas por dezenas de nanômetros e o sistema não apresenta mais nenhum ordenamento (Ray & Okamoto, 2003).

Neste contexto, a melhoria nas propriedades óticas (transparência e opacidade), térmicas, mecânicas, permeabilidade de moléculas de baixa massa molar e resistência a solventes dos polímeros tem sido relacionada com a dispersão; o grau de delaminação; o fator de forma da argila; a densidade de carga lamelar e as interações interfaciais polímero/argila (Kornmann, 1999).

Os nanocompósitos poliméricos apresentam boa transparência devido às dimensões nanométricas das lamelas de argila, evitando o espalhamento da luz (Kornmann, 1999).

Quanto às propriedades térmicas, a principal razão para a melhoria desta propriedade é a forte interação interfacial entre a matriz e os silicatos em camadas (Ray & Okamoto, 2003). Uma maior estabilidade térmica está relacionada com a diminuição da difusão das moléculas de oxigênio para o interior do nanocompósito. Isto porque as argilas atuam como barreira isolante para o transporte de massa dos produtos voláteis gerados durante a decomposição. Assim, sem o oxigênio que é um dos principais agentes na degradação do polímero, o nanocompósito torna-se mais resistente à degradação oxidativa (Ray & Okamoto, 2003).

As propriedades mecânicas dos nanocompósitos são afetadas pelo grau de esfoliação que depende tanto das condições de preparação dos nanocompósitos quanto da argila. O sucesso na obtenção de uma estrutura esfoliada requer uma dispersão homogênea do silicato na matriz polimérica e a presença de fortes interações entre as lamelas do silicato e as macromoléculas do polímero. A esfoliação dos silicatos em camadas é fortemente favorecida quando o polímero contém grupos funcionais como grupos amida ou imida. Isto porque os silicatos em camadas têm grupos hidroxílicos polares que são compatíveis com polímeros contendo grupos funcionais polares (Sánchez-Solís et al., 2004). O caráter de reforço que o silicato exerce ao ser incorporado ao polímero em um nanocompósito deve-se, além das propriedades do silicato, as restrições da mobilidade das cadeias poliméricas em contato com as lamelas do silicato.

A permeabilidade de moléculas de baixa massa molar em um material polimérico é governada por diversos fatores entre os quais se incluem rigidez da cadeia, empacotamento molecular, forças moleculares, temperatura de

transição vítrea, mobilidade molecular e polaridade. A cristalinidade exerce forte influência nas propriedades de transporte uma vez que os cristalitos se comparados com a fase amorfa são impermeáveis. Conseqüentemente, aumentam a tortuosidade do caminho a ser percorrido pela molécula que difunde para o interior do material, ou seja, aumenta o livre caminho médio do processo difusivo. Cargas com elevada razão de aspecto como os silicatos em camadas, exercem efeito similar ao da cristalinidade, pois também são impermeáveis e o penetrante precisará desviar do obstáculo tornando a difusão um processo mais lento (Araújo, 2008).

3.6.1. Bionanocompósito Quitosana/Silicato em Camadas

Uma alternativa atraente para propiciar melhoria nas propriedades mecânicas, térmicas e de barreira de biopolímeros como a quitosana é a incorporação de uma nanofase inorgânica, fase dispersa, em matrizes biopoliméricas obtendo bionanocompósitos poliméricos (Liu et al., 2008).

Devido à natureza hidrofílica e poliaciônica do biopolímero quitosana, em meio ácido, este apresenta boa miscibilidade com os silicatos em camadas, montmorilonita sódica e bentonita sódica, podendo ser intercalada entre as lamelas do argilomineral, montmorilonita, por meio de troca catiônica. Por outro lado, grupos funcionais amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) e hidroxílicos ($-\text{OH}$), presentes na quitosana, podem formar ligações de pontes de hidrogênio com os grupos hidroxílicos terminais presentes na montmorilonita, acarretando fortes interações entre a quitosana e a montmorilonita gerando uma estrutura com ligações cruzadas que afetam fortemente as propriedades macroscópicas do bionanocompósito, Figura 3.20 (Darder et al., 2003; Darder et al., 2005).

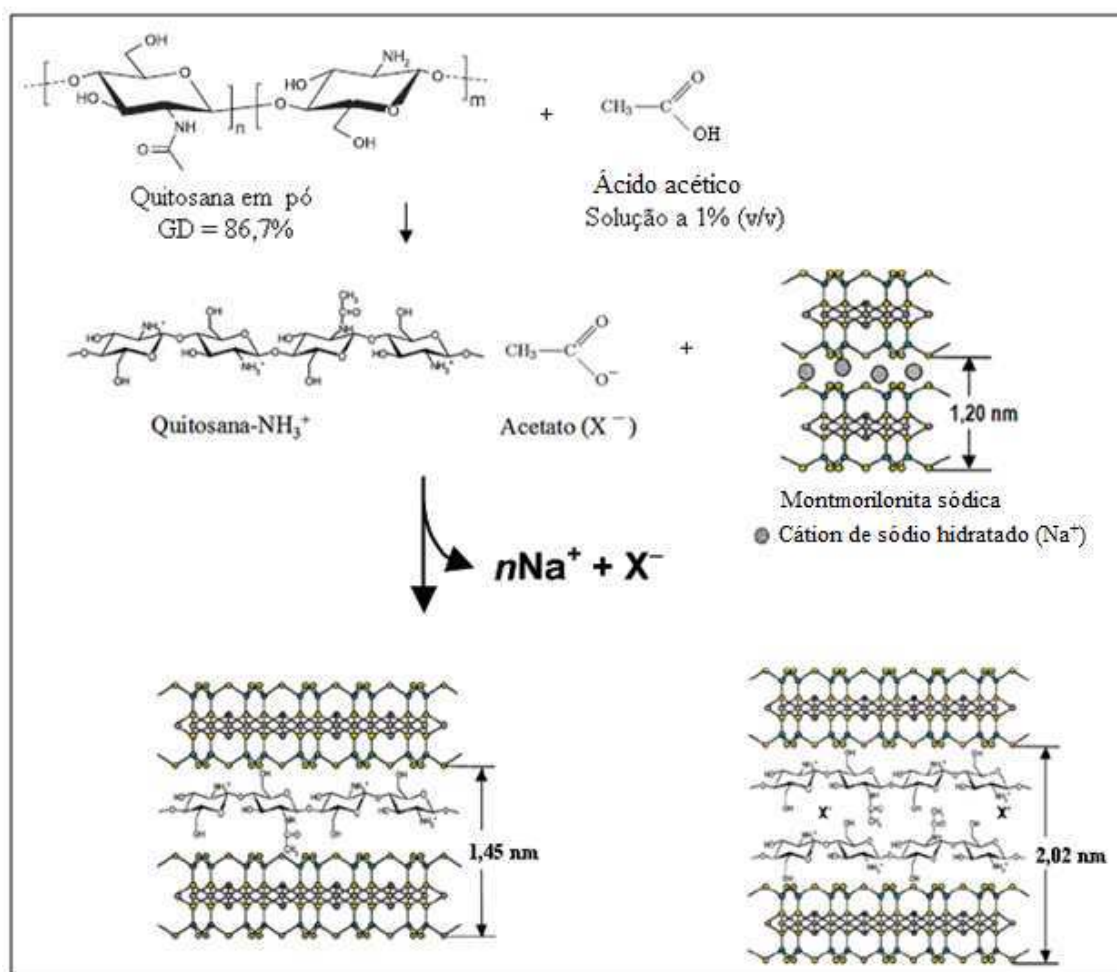


Figura 3.20 - Intercalação da quitosana em montmorilonita.
Fonte: Darder et al., 2003.

Acredita-se que estas fortes interações são responsáveis pela formação de estruturas floculadas em bionanocompósitos quitosana/montmorilonita preparados pelo método de intercalação por solução. Entretanto, análises de microscopia eletrônica de varredura e de difratometria de raios X mostraram que para pequenas quantidades de montmorilonita, 2,5% em peso, os bionanocompósitos quitosana/montmorilonita obtidos pelo método de intercalação por solução apresentaram estrutura intercalada e esfoliada. E que para quantidades de montmorilonita de 5% e 10% em massa os bionanocompósitos apresentaram morfologia intercalada com ocasionais floculações (Wang et al., 2005).

Estudos realizados por Tan et al., (2007) mostraram que a partir da análise de difratometria de raios X e de acordo com os valores obtidos para a

distância interplanar basal (d_{001}), dois tipos de bionanocompósitos quitosana/montmorilonita podem ser descritos: bionanocompósitos com uma monocamada de quitosana no espaço interlamelar e bionanocompósitos com bicamada de quitosana no espaço interlamelar. A intercalação da monocamada de quitosana em montmorilonita deve-se principalmente ao processo de troca catiônica e ao bionanocompósito ser obtido a partir de pequena quantidade de quitosana. A intercalação da bicamada de quitosana em montmorilonita resulta em bionanocompósitos com alta quantidade de quitosana. Esta intercalação é favorecida pela interação eletrostática dos grupos ($-\text{NH}_3^+$) da segunda camada com os íons acetato da solução de quitosana tornando-se acessíveis os sítios para troca aniônica. O valor da distância interplanar basal (d_{001}) para o bionanocompósito que apresenta bicamada de quitosana é em torno de 2,02 nm.

Embora estudos sobre preparação e caracterização de sistemas quitosana/silicato em camadas tenham sido reportados nos últimos anos visando seu uso em biossensores, não foram reportados estudos sobre o uso destes sistemas como suporte enzimático na construção de biossensores para determinação de uréia. Além disso, o uso de bentonitas na preparação de suportes para imobilização da enzima uréase não foi publicado previamente, sendo está à contribuição deste estudo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados, os procedimentos experimentais para preparação do eletrodo de trabalho constituído por: suporte condutor, matriz polimérica não condutora, suporte enzimático (membrana de quitosana, membrana quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada e membrana quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺, assim como as diversas técnicas empregadas para a caracterização dos suportes enzimáticos. Consta também a descrição do procedimento para imobilização, pelo método de adsorção, da enzima uréase nos suportes.

4.1. Materiais

A quitosana (Q), fornecida na forma de pó pela Polymar, Fortaleza/CE, com grau de desacetilação de 86,7% e densidade de 0,2 g/cm³ foi utilizada como matriz polimérica na preparação das membranas de quitosana e quitosana/silicato.

A montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ - CL, fornecida pela Southern Clay Products, Texas/EUA, sob a forma de pó, foi usada como carga na preparação das membranas a base de quitosana. Esta argila apresenta uma capacidade de troca de cátions (CTC) de 90 meq/100g de argila, umidade de 4 a 9%, densidade de 2,86 g/cm³ e diâmetro de partícula de 13 µm (http://www.scprod.com/product_bulletins).

A bentonita sódica Argel 35 (AN), com capacidade de troca de cátions (CTC) de 92 meq/100g (Leite et al., 2009), fornecida pela Bentonit União Nordeste (BUN), Paraíba/Brasil, foi purificada no Laboratório de Nanocompósitos Poliméricos da Universidade Federal de Campina Grande e nomeada Bentonita sódica Argel 35 purificada (AP). Esta argila foi usada como carga na obtenção das membranas a base de quitosana.

O ácido acético glacial P.A 99,9%, foi usado como solvente para a quitosana e o hidróxido de sódio, na forma de pastilhas, foi utilizado para

ajustar o pH da solução de quitosana bem como para assegurar a completa neutralização das membranas de quitosana e de quitosana/silicato. Estes reagentes foram fornecidos pela Vetec e usados como recebidos.

O tetra-hidrofurano (THF) P.A 99,9%, fornecido pela Carlo Erba, foi usado como solvente do poli (cloreto de vinila) – PVC na preparação da membrana seletiva.

O ionóforo neutro nonactina (antibiótico macrotetrólito) com funcionalidade de 95%, ligante que seletivamente associa-se ao íon amônio, e o solvente plastificante, bis-2-(etilhexil)-adipato P.A 99,0%, utilizados na preparação da membrana do sensor base foram fornecidos pela Fluka Selectophore[®].

A grafite, fornecida pela Merck sob a forma de pó, com granulometria inferior a 50 µm, foi utilizada na preparação do suporte condutor.

A enzima Uréase tipo IX – U 4002, fonte *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) – feijão de porco foi fornecida pela Sigma-Aldrich/EUA.

O tampão fosfato (PBS) fornecido pela Sigma-Aldrich/EUA, foi utilizado como meio para adsorção da enzima uréase pelos suportes enzimáticos.

4.2. Métodos

O eletrodo de trabalho é constituído de um cilindro (tubo) de PVC e na sua extremidade há uma placa de cobre acoplada sob um suporte condutor e ligada ao transdutor potenciométrico por um fio de cobre soldado na própria placa de cobre. Sobre o suporte condutor há uma matriz polimérica não condutora seguida pelo suporte enzimático que é fixado no eletrodo por um anel de silicone ($\phi = 10$ mm). No suporte enzimático (membrana de quitosana e membrana de quitosana/silicato em camadas) é imobilizada a enzima uréase pela técnica de adsorção. A representação esquemática do eletrodo seletivo ao íon amônio (eletrodo de trabalho) está apresentada na Figura 4.1. Neste item está descrita a metodologia de preparação das partes que constituem o eletrodo de trabalho (suporte enzimático, matriz polimérica não condutora e o suporte condutor).

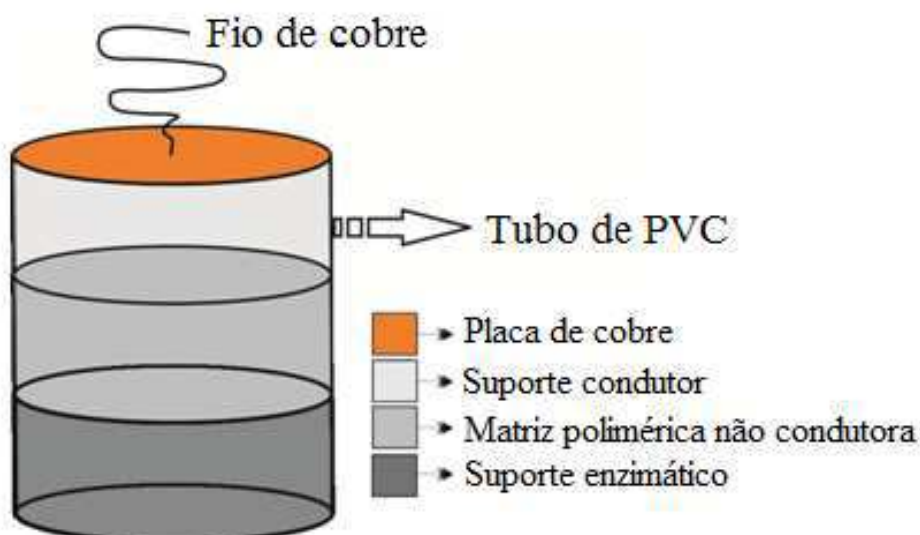


Figura 4.1 – Representação esquemática do eletrodo de trabalho.

4.2.1. Preparação dos suportes Enzimáticos

4.2.1.1. Preparação da Membrana de Quitosana

A metodologia empregada na preparação das membranas de quitosana foi adaptada de estudos realizados por Magalhães et al., (1998). Em resumo, a solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1 g de quitosana em 100 mL de uma solução a 1% (v/v) de ácido acético sob agitação magnética a 45 °C por 2 h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo, duas vezes, para remover o material insolúvel. O filtrado foi vertido em placas de Petri e acondicionado em estufa a 50 °C por 20 h para a evaporação do solvente e formação da membrana. Após a secagem, as membranas foram cobertas com uma solução de hidróxido de sódio a 1 molar por meia hora a fim de assegurar sua completa neutralização. Em seguida, foram lavadas, com água destilada, até pH neutro e secas à temperatura ambiente. As membranas de quitosana foram codificadas como Q.

4.2.1.2. Preparação da Membrana de Quitosana/Silicatos em Camadas

As membranas de quitosana (Q)/bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) e quitosana (Q)/montmorilonita sódica comercial (CL), generalizadas como membranas quitosana/silicatos em camadas foram preparadas seguindo o método de Darder et al. (2005), conforme descrito abaixo.

Obtida a solução de quitosana (utilizando a metodologia descrita no item 4.2.4.1) o pH da mesma foi ajustado para 4.9 com adição de uma solução de hidróxido de sódio 1 molar sob agitação magnética. O ajuste do pH ácido é necessário para promover grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na estrutura da quitosana. Dado que a acidez do grupo amina primário (pK_a) é 6,3, um valor

final de pH igual a 5 na mistura quitosana/silicato em camadas protonará 95% dos grupos amino (Darder et al., 2003).

Nesta etapa foram preparadas dispersões de silicato em camadas/água destilada na concentração de 1% sob agitação mecânica a $53 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 min. Em seguida, a solução de quitosana foi adicionada às dispersões do silicato usando razões mássicas de quitosana/silicatos equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 e mantidas sob agitação mecânica a 1200 rpm na temperatura de $53 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 h. As dispersões quitosana/silicato em camadas foram vertidas em placas Petri e acondicionadas em estufa a 50°C , por aproximadamente 20 h, para a formação das membranas. Obtidas as membranas, as mesmas foram cobertas com uma solução de hidróxido de sódio a 1 molar por meia hora para assegurar a neutralização dos resíduos de ácido. Em seguida, foram lavadas, com água destilada, até pH neutro e secas a temperatura ambiente.

As membranas de quitosana (Q)/bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) e quitosana (Q)/montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (CL) usando razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1, foram codificados como Q₁/AP₁, Q₅/AP₁, Q₁₀/AP₁, Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁, respectivamente.

A purificação da bentonita sódica Argel 35 (AN), visando remover a matéria orgânica e facilitar a troca catiônica da argila (AN) foi realizada seguindo a metodologia utilizada por Camargo et al., (1996); Araújo, (2008) e Leite et al., (2009). A descrição resumida do procedimento está apresentada no Anexo II.

4.2.2. Preparação da Matriz Polimérica não Condutora

A matriz polimérica não condutora foi obtida a partir de uma mistura sensora e de uma solução de poli(cloreto de vinila) (PVC) a uma concentração de 5%. A mistura sensora foi preparada adicionando ao ionóforo para amônio, nonactin, o solvente plastificante, bis-2-(etilhexil)-adipato, numa proporção mássica de 3% de ionóforo para 97% do solvente. A solução polimérica a uma concentração de 5% foi preparada pela dissolução do PVC em tetra-

hidrofurano (THF), sob agitação magnética a temperatura ambiente. Em seguida, a solução polimérica foi adicionada à mistura sensora numa proporção de 30% da solução polimérica para 70% da mistura sensora e aplicada gota a gota diretamente sobre o suporte condutor do eletrodo em intervalos de 15 min para evaporação do solvente e para evitar a formação de bolhas, Figura 4.2, resultando numa película de aproximadamente 2 mm de espessura. Após a secagem por 24 h, a matriz polimérica não condutora foi condicionada numa solução de cloreto de amônio a 0,1 molar para evitar ressecamento e perda de atividade, frente ao íon de interesse (Menezes, 2006). O cálculo da quantidade dos reagentes utilizados na preparação da matriz polimérica não condutora está apresentado no Anexo I.



Figura 4.2 – Deposição da gota para evaporação do solvente.
Fonte: Menezes, 2006.

4.2.3. Preparação do Suporte Condutor

O suporte condutor do eletrodo de trabalho foi preparado a partir da mistura manual de 1,2 g do componente A da resina epóxi araldite[®] com 2,4 g da grafite (50 μm). Em seguida, foi incorporada 1,2 g do componente B (catalisador) da resina epóxi araldite[®] e mantida a mistura manual. Depois esta mistura foi introduzida no corpo do eletrodo e seca a temperatura ambiente por 72 h. Em seguida, foi medida a resistividade de aproximadamente 160 Ω com

um multímetro digital da marca Brasfort na escala de resistência de 2000Ω com precisão de 1Ω e variação de $1,0\% \pm 2D$. A Figura 4.3 apresenta o suporte condutor, no eletrodo de trabalho, e os componentes A, B e a grafite utilizados na preparação do suporte condutor.



Figura 4.3 – Foto do eletrodo de trabalho com o suporte condutor e dos componentes (A, B e grafite) utilizados na preparação do suporte condutor.

4.3. Imobilização da Enzima Uréase

A imobilização da enzima uréase pelo método de adsorção foi realizada de acordo com a metodologia empregada por Magalhães et al., (1998). As membranas de quitosana (Q), quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas quitosana/silicato equivalentes a 5/1 e 10/1 foram cortadas, em duplicata, na forma de $\frac{1}{4}$ de círculo com raio de 1,65 cm, mergulhadas em uma solução a 1% (v/v) de ácido acético com pH igual a 4, lavadas com água destilada e deixadas por toda a noite a 5 °C, em contato com 4 mL de uma solução de uréase a 0,002% (m/v) contendo 100 mg da enzima por 50 mL de uma solução tamponada de fosfato com pH igual a 5,6. Para obtenção de 500 mL da solução tampão de fosfato pH igual a 5,6 a 0,05 Molar foi utilizada 3 g de fosfato de sódio monobásico anidro e 4,9 g de citrato de sódio tribásico anidro.

Visando avaliar a influência do pH e da temperatura na adsorção da enzima uréase pelos suportes foram cortadas, em duplicata, na forma de $\frac{1}{4}$ de círculo com raio de 1,65 cm, amostras das membranas de quitosana (Q), quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razão mássica quitosana/silicato equivalentes a 5/1 e colocadas por toda a noite em contato com 4 mL das soluções a 0,001% (m/v) de uréase/água destilada (pH = 5,5) e uréase/tampão de fosfato - PBS (pH = 7,2) nas seguintes temperaturas 25 °C e 41 °C. Passado este período e atingida à temperatura ambiente de 25 °C, uma alíquota de 1mL das soluções foi retirada e as medidas espectrofotométricas realizadas. Os testes de imobilização da enzima uréase nos suportes foram realizados no laboratório de filmes finos poliméricos do instituto de química da Universidade de São Paulo.

4.4. Caracterização

4.4.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

As análises por IV da bentonita sódica Argel 35 (AN), bentonita sódica Argel 35 purificada (AP), montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (CL) e das membranas de quitosana, quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 foram realizadas à temperatura ambiente em um espectrômetro Spectrum 400 Perkin Elmer com varredura de 4000 a 650 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

4.4.2. Difratomia de Raios X (DRX)

As análises de difratometria de raios X foram conduzidas à temperatura ambiente em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre (0,15418 nm), corrente 30mA e tensão de 40kV. A bentonita sódica Argel 35 (AN), bentonita sódica Argel 35 purificada (AP), montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (CL) e as membranas de quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 foram examinadas em um intervalo de 2θ entre 1,5 e 30,0 graus a uma velocidade de 1 °/min e o espaçamento interplanar basal (d_{001}) foi determinado com base na lei de Bragg, Equação 4.1 (Utracki, 2004).

$$d_{001} = \frac{8,8264}{2\theta} \quad (4.1)$$

Onde:

d_{001} - é a reflexão basal do plano (001) do argilomineral na argila em (nm);

θ - é o ângulo do pico referente à reflexão basal (001) da montmorilonita em (graus).

4.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise microestrutural da área transversal da membrana de quitosana (Q) e da área superficial das membranas de quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SSY-550 e as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro utilizando um metalizador Sanyu electron modelo Quick Coater SC-701.

4.4.4. Análise Mecânica (Ensaio de Tração)

As membranas de quitosana (Q), quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1, foram submetidas a testes mecânicos de tração de acordo com as normas da ASTM D 882. Os testes de tração foram conduzidos, à temperatura ambiente, em uma máquina EMIC DL1000 usando uma velocidade de 5 mm/min. Os resultados reportados correspondem à média de seis determinações.

4.4.5. Análise Termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas das amostras de bentonita sódica Argel 35 purificada (AP), montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (CL) e das membranas de quitosana (Q), quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 foram conduzidas em um aparelho Shimadzu TGA 50 utilizando aproximadamente 5 mg de amostra e cadinho de platina. As amostras foram aquecidas a partir de 30 °C até 900 °C a uma taxa de 10 °C/min, sob atmosfera de ar com fluxo de 50 mL/min.

4.4.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises por DSC das membranas de quitosana (Q), quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 foram conduzidas em aparelho Universal V4.74 TA Instruments, modelo Q20 V24.7 Build 119-DSC utilizando aproximadamente 3,5 mg da amostra e cadinho de alumínio selado. As amostras foram aquecidas

de 25 °C a 350 °C a uma taxa de 5 °C/min sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

4.4.7. Medida do Ângulo de Contato

A tensão superficial foi avaliada pela medida do ângulo de contato, em replica, com o intuito de determinar a hidrofiliabilidade das membranas. O sistema utilizado para as medidas de ângulo de contato do líquido, água destilada, com a superfície sólida das membranas de quitosana e de quitosana/silicato é composto por uma câmera fotográfica digital, posicionada à frente de uma plataforma, onde foram dispostas as membranas para avaliação do ângulo de contato das gotas formadas pela aplicação da água destilada através de uma seringa suspensa 2,5 cm acima da membrana. A frente do suporte onde foi colocada a membrana foi posicionada uma lâmpada de filamento único, funcionando como um “flash” para garantir a nitidez da imagem e esta foi remetida a um microcomputador e analisada pelo programa denominado Angle Calculator que fez a determinação do ângulo na interface água destilada/membrana em unidade de tensão interfacial.

4.4.8. Espectrofotometria

As proteínas apresentam um espectro de absorção na região do Ultravioleta – UV em um comprimento de onda em torno de 280 nm devido aos aminoácidos aromáticos presentes em suas estruturas químicas (Noble & Bailey, 2009). Portanto, a avaliação quantitativa indireta da adsorção da enzima uréase pelas membranas de quitosana (Q), quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q/AP) e quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (Q/CL) com razões mássicas quitosana/silicato equivalentes a 5/1 e 10/1 foi realizada através de medidas de absorbância a 280 nm das soluções com pH igual a 5,6; 5,5; 7,2 e 9,0 em um espectrofotômetro Beckmann Coulter modelo

DU-600, na temperatura de 25 °C, utilizando cubeta de quartzo e a variação da absorvância (Δ_{Abs}) determinada a partir da Equação 4.2.

$$\Delta_{Abs} = \text{Abs. sistema solvente/uréase} - \text{Abs. sobrenadante} \quad (4.2)$$

Para determinar a absorvância do sobrenadante foi empregada a Equação 4.3.

$$\text{Abs. sobrenadante} = \text{Abs. sistema membrana/solvente} - \text{Abs. Sistema membrana/solvente/uréase} \quad (4.3)$$

Os solventes utilizados foram solução de tampão fosfato (pH = 5,6), água destilada (pH = 5,5), solução de tampão fosfato - PBS (pH = 7,2) e solução de hidróxido de sódio (pH = 9,0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, estão apresentados e discutidos os resultados experimentais referentes às caracterizações dos suportes enzimáticos, preparados pelo método de intercalação por solução, como também a avaliação da adsorção da enzima uréase pelos suportes e a apresentação da montagem do biossensor para determinação de uréia

5.1. Caracterização dos suportes enzimáticos

Os suportes para imobilização da uréase foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, difratometria de raios X, microscopia eletrônica de varredura, propriedades mecânicas, propriedades térmicas e medidas de ângulo de contato, além da avaliação de adsorção da enzima uréase pelos suportes por espectrofotometria. Os suportes foram denominados de membrana de quitosana (Q), membranas de quitosana/montmorilonita sódica comercial Cloisite® Na⁺ (Q₁/CL₁; Q₅/CL₁; Q₁₀/CL₁) e membranas de quitosana/bentonita sódica Argel 35 purificada (Q₁/AP₁; Q₅/AP₁; Q₁₀/AP₁). As Figuras 5.1 e 5.2 mostram as fotos das membranas obtidas. De forma geral, o aumento da quantidade de silicato (CL e AP) incorporada a quitosana resultou na obtenção de membranas mais opacas e rígidas.



Membrana Q



Membrana Q₁/CL₁



Membrana Q₅/CL₁



Membrana Q₁₀/CL₁

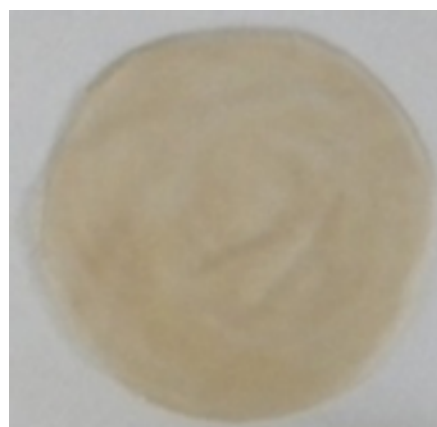
Figura 5.1– Fotos das membranas de quitosana (Q) e das membranas de quitosana/montmorilonita, com razões mássicas de quitosana/montmorilonita equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 (Q₁/CL₁; Q₅/CL₁; Q₁₀/CL₁), respectivamente.



Membrana Q_1/AP_1



Membrana Q_5/AP_1



Membrana Q_{10}/AP_1

Figura 5.2– Fotos das membranas de quitosana/bentonita purificada, com razões mássicas de quitosana/bentonita purificada equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 (Q_1/AP_1 ; Q_5/AP_1 ; Q_{10}/AP_1), respectivamente.

5.1.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho

A Figura 5.3 mostra os espectros de absorção na região do infravermelho da montmorilonita (CL), da bentonita purificada (AP), da membrana de quitosana (Q), das membranas de quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada, com razões mássicas de quitosana/silicato equivalentes a 1/1, 5/1 e 10/1 (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 , Q_{10}/CL_1 , Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 , Q_{10}/AP_1), respectivamente.

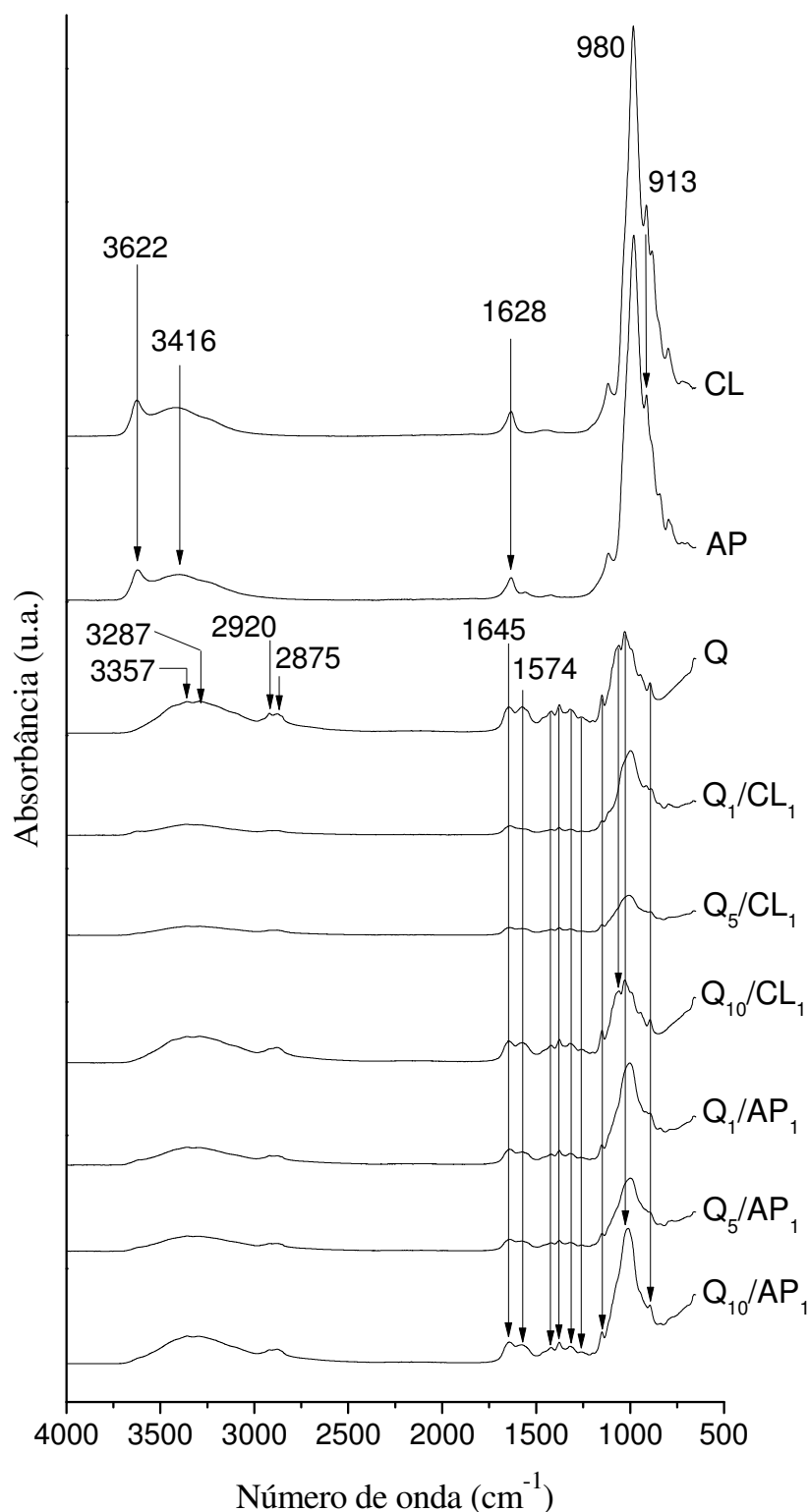


Figura 5.3– Espectro na região do infravermelho da montmorilonita (CL); da bentonita purificada (AP); da membrana de quitosana (Q); das membranas de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 , Q_{10}/CL_1) e de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 , Q_{10}/AP_1).

Os espectros da montmorilonita sódica comercial Cloisite[®] Na⁺ (CL) e da bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) apresentados na Figura 5.3, mostram bandas de absorção em: 3622 cm⁻¹[ν_{OH}] atribuída às vibrações de estiramento do grupo estrutural hidroxílico Al-OH e Si-OH próprio do silicato, sendo típica de esmectitas com grande quantidade de alumínio na camada octaédrica; em 3416 cm⁻¹[ν_{OH}] e 1628 cm⁻¹[δ_{HOH}] atribuídas, respectivamente, às vibrações de estiramento axial e as vibrações angulares de água adsorvida na superfície do silicato; em 980 cm⁻¹[$\nu_{\text{Si-O}}$] atribuída às vibrações de estiramento axial do grupo Si-O-Si; 913 cm⁻¹[$\delta_{\text{Al-Al-OH}}$] atribuída às vibrações angulares da hidroxila do grupo Al₂OH; e em 882 cm⁻¹[$\delta_{\text{Al-Fe-OH}}$] e 841 cm⁻¹[$\delta_{\text{Al-Mg-OH}}$] atribuídas as vibrações angulares de Al-Fe-OH e Al-Mg-OH, respectivamente (Bora et al., 2000; Madejová, 2003; Awad et al., 2004; Leite et al., 2009; Xu et al., 2009).

As principais bandas de absorção da membrana de quitosana (Q), Figura 5.3, são devido ao estiramento axial do grupo O-H na faixa de 3750 cm⁻¹ a 3000 cm⁻¹ sobrepostas à banda de estiramento N-H; em 2920 cm⁻¹ e 2875 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento axial assimétrico e simétrico da ligação C-H dos grupos -CH₂ e -CH₃, respectivamente. Vibrações angulares dos grupos metileno e metil também são visíveis em 1376 cm⁻¹ e 1421 cm⁻¹, respectivamente (Mano et al., 2003). A absorção em 1645cm⁻¹ associada à deformação axial da ligação carbonila C=O da amida secundária e em 1574 cm⁻¹ [$\delta_{\text{NH}_3^+}$] referente às vibrações angulares do grupo amina protonado (Marchessault et al., 2006); a absorção na faixa de 1160 cm⁻¹ a 1000 cm⁻¹ é atribuída as vibrações do grupo C-O (Xu et al., 2005). A banda em 1149 cm⁻¹ é relativa as vibrações assimétricas do grupo C-O das pontes de oxigênio resultantes da desacetilação da quitosana. As bandas na faixa de 1080 cm⁻¹ a 1025 cm⁻¹ são atribuídas as vibrações do grupo C-O no anel COH, COC e CH₂OH. Em 892 cm⁻¹ corresponde as vibrações da estrutura sacarídea da quitosana (Darder et al., 2003; Paluszkiwicz et al., 2011; Yuan et al., 2010). Todas estas bandas são visualizadas melhor no espectro ampliado da membrana de quitosana mostrado na Figura 5.4.

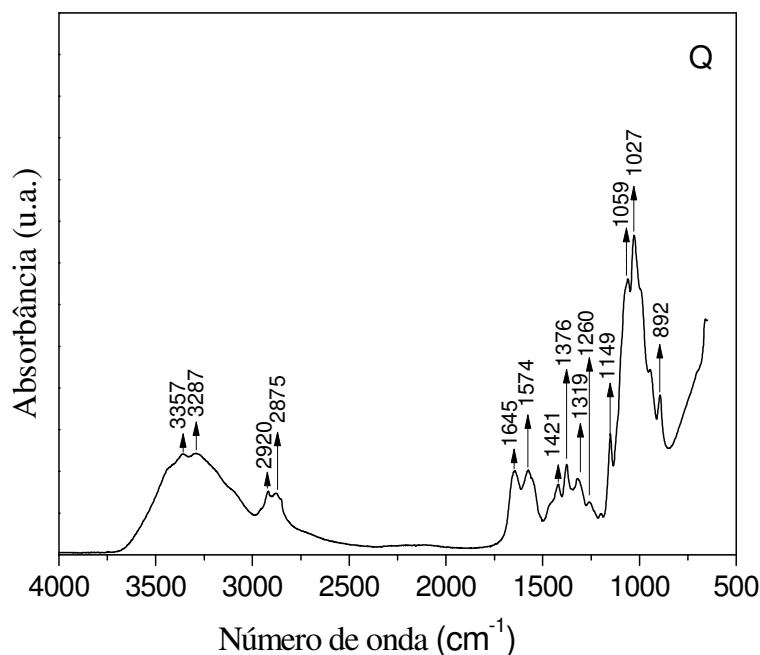


Figura 5.4– Espectro na região do infravermelho da membrana de quitosana (Q).

Espectroscopia na região do infravermelho também foi empregada para avaliar a interação entre o biopolímero quitosana e os silicatos (CL e AP), uma vez que um deslocamento na banda de vibração angular do grupo amina protonada (δ_{NH_3}) pode ser esperado quando os grupos $-NH_3^+$ da quitosana interagem eletrostaticamente com os sítios aniônicos dos silicatos. Na verdade, um deslocamento da banda δ_{NH_3} para números de ondas mais baixos é observado em todas as membranas de quitosana/silicato (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 , Q_{10}/CL_1 e Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 , Q_{10}/AP_1) conforme mostrado na Figura 5.5 (espectros da Figura 5.3 na faixa de 1800 cm^{-1} a 1400 cm^{-1}) e Tabela 5.1. Contudo, esse deslocamento é maior para as membranas com razão mássica quitosana/silicato de 1/1 e 5/1 (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1) e menor para as membranas com razão mássica de 10/1 (Q_{10}/CL_1 e Q_{10}/AP_1). Este fato pode estar relacionado à forte e a fraca interação eletrostática entre os grupos $-NH_3^+$ da quitosana e os sítios aniônicos do silicato das membranas, conforme sugerido pelo esquema apresentado na Figura 5.6. Além disso, a intensidade da banda δ_{NH_3} é maior para as membranas contendo maior razão mássica

quitosana/silicato (Q_{10}/CL_1 e Q_{10}/AP_1) (Figura 5.5). A banda em 1645 cm^{-1} apresentada na Figura 5.5 está associada à deformação axial $C=O$ da amida primária (ν_{CO}) da quitosana e nas membranas quitosana/silicato esta banda é sobreposta à banda de vibração angular δ_{HOH} em 1628 cm^{-1} mostrada anteriormente na Figura 5.3 (Darder et al., 2003; Darder et al., 2005; Tan et al., 2007; Wang & Wang, 2007; Han et al., 2010; Paluszkiwicz et al., 2011).

Os espectros das membranas quitosana/silicato (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 , Q_{10}/CL_1 , Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 , Q_{10}/AP_1), Figura 5.3, apresentam bandas na faixa de 3323 a 3359 cm^{-1} , 1640 a 1645 cm^{-1} e 997 a 1030 cm^{-1} que correspondem às bandas de vibração do silicato sobrepostas às bandas de absorção da quitosana. E bandas na faixa de 2878 a 2890 cm^{-1} , 1418 cm^{-1} , 1376 cm^{-1} , 1313 a 1319 cm^{-1} e 1149 cm^{-1} atribuídas à absorção de quitosana. E evidenciam as bandas correspondentes a quitosana nas membranas que apresentam razão mássica quitosana/silicato de 10/1 (Q_{10}/CL_1 e Q_{10}/AP_1). Comparando os espectros das membranas de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 , Q_{10}/CL_1) com os das membranas de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 , Q_{10}/AP_1) observa-se que as membranas preparadas com a bentonita purificada (AP) apresentam comportamento similar aos das preparadas com montmorilonita (CL). Isto sugere que a interação da argila Argel 35 (AP), proveniente de indústria local e purificada com tecnologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Mineração e Geologia da UFCG, com o biopolímero quitosana foi semelhante ao da montmorilonita Cloisite[®] Na⁺ (CL).

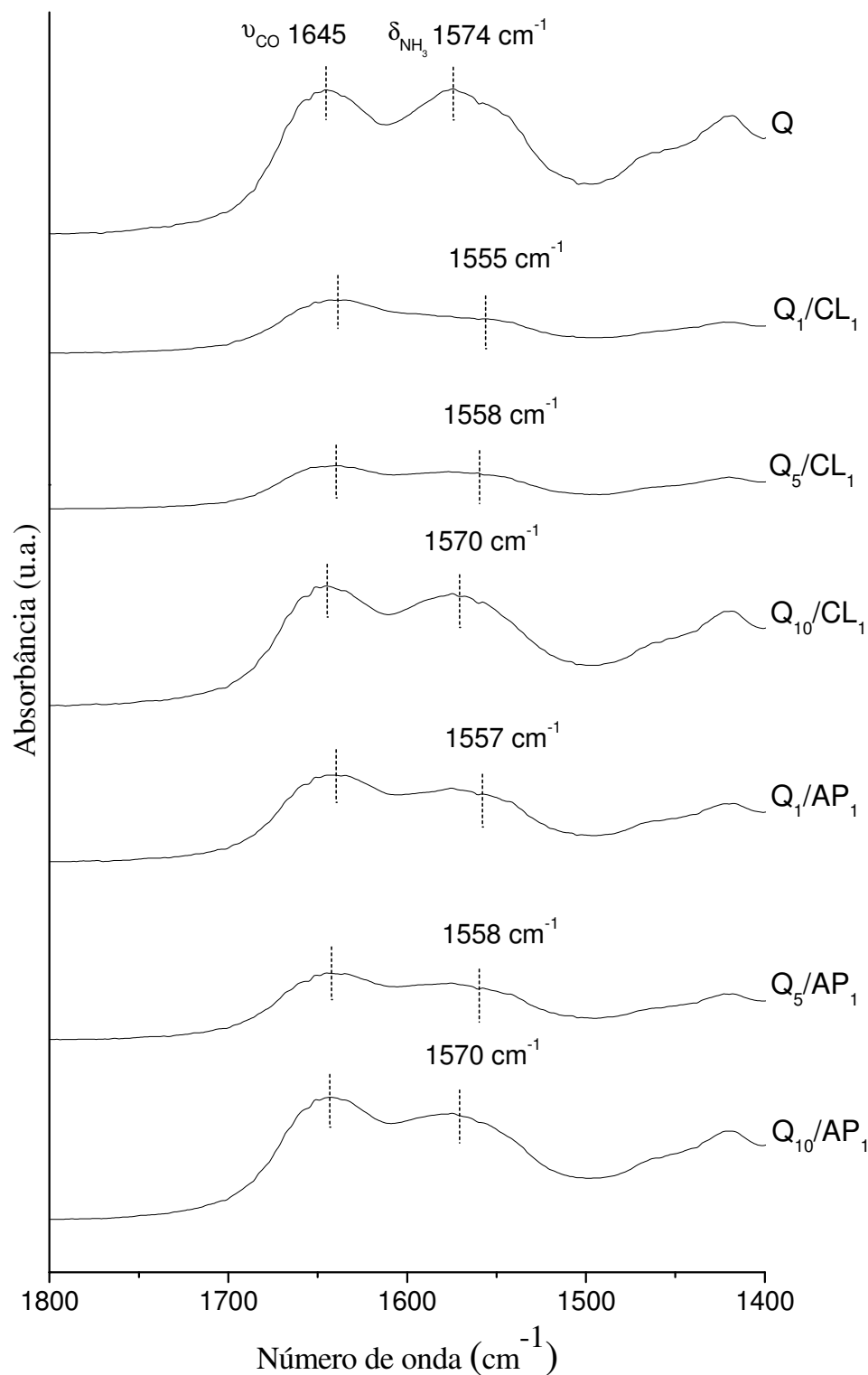


Figura 5.5 – Espectro na faixa de 1800 cm⁻¹ a 1400 cm⁻¹ da membrana de quitosana (Q); das membranas de quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁, Q₁₀/CL₁) e das membranas de quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁, Q₁₀/AP₁).

Tabela 5.1 – Valores dos números de onda das bandas de vibração correspondentes a deformação axial C=O da amida primária (ν_{CO}) e a deformação angular do grupo amina protonada ($-\text{NH}_3^+$) das membranas (Q, Q/AP, Q/CL).

Amostra	ν_{CO} (cm^{-1})	δ_{NH_3} (cm^{-1})
Membrana (Q)	1645	1574
Membrana (Q ₁ /CL ₁)	1638	1555
Membrana (Q ₅ /CL ₁)	1640	1558
Membrana (Q ₁₀ /CL ₁)	1645	1570
Membrana (Q ₁ /AP ₁)	1640	1557
Membrana (Q ₅ /AP ₁)	1641	1558
Membrana (Q ₁₀ /AP ₁)	1643	1570

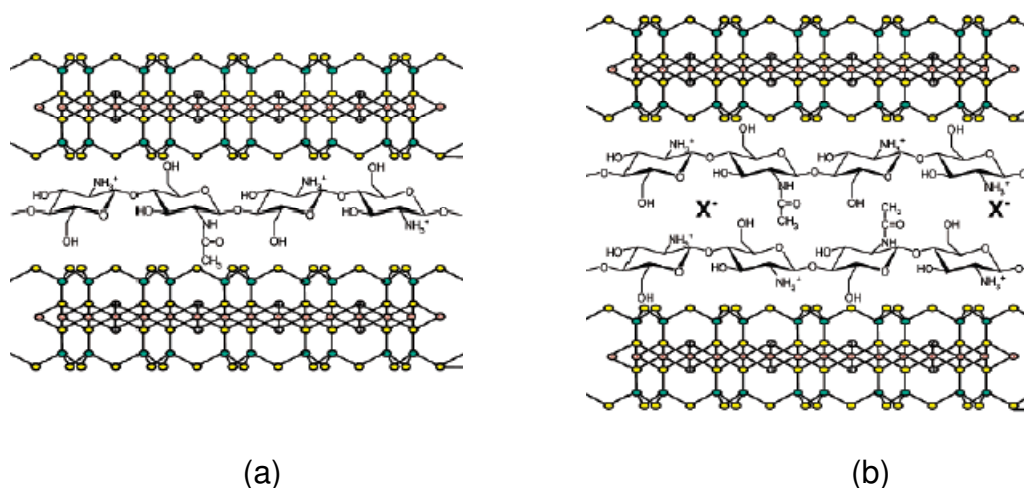


Figura 5.6.- Representação esquemática da forte (a) e da fraca (b) interação eletrostática entre os grupos $-\text{NH}_3^+$ da quitosana e as camadas aniônicas da argila. Fonte: Darder et al., 2003.

5.1.2. Difratomia de Raios X

Para confirmar a efetiva intercalação da quitosana nos silicatos em camadas, as membranas de quitosana (Q), os silicatos em camadas (CL e AP) e as membranas de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 ; Q_5/CL_1 ; Q_{10}/CL_1) e de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 ; Q_5/AP_1 ; Q_{10}/AP_1), foram caracterizadas por difratometria de raios X.

Os difratogramas da montmorilonita (CL) e das membranas de quitosana/montmorilonita, com a proporção quitosana/montmorilonita de 1/1, em triplicata ($Q_1/CL_{1,1}$, $Q_1/CL_{1,2}$ e $Q_1/CL_{1,3}$), estão apresentados na Figura 5.7. O difratograma da montmorilonita (CL) mostra um pico de reflexão (001) referente à montmorilonita com 2θ igual a $5,92^\circ$, correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de 1,49 nm. Os difratogramas das membranas $Q_1/CL_{1,1}$, $Q_1/CL_{1,2}$ e $Q_1/CL_{1,3}$ mostram o pico de reflexão (001) referente à montmorilonita em valores de 2θ de $3,77^\circ$, $3,13^\circ$ e $2,80^\circ$, correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de 2,34 nm; 2,82 nm e 3,15 nm, respectivamente. Isto indica que para a proporção quitosana/montmorilonita correspondente a 1/1, bionanocompósitos predominantemente intercalados ordenados foram obtidos e que possivelmente bicamadas de quitosana estão posicionadas entre as camadas do silicato. Tan et al. (2007) considera que valores de distância interplanar basal (d_{001}) em torno de 2,02 nm indica que bicamadas de quitosana foram posicionadas entre as camadas da montmorilonita. Esta intercalação é favorecida pela interação eletrostática dos grupos ($-NH_3^+$) da segunda camada com os íons acetato da solução de quitosana tornando-se acessível os sítios para troca aniônica.

Os difratogramas da bentonita purificada (AP) e das membranas de quitosana/bentonita purificada, com a proporção quitosana/bentonita purificada de 1/1, em triplicata ($Q_1/AP_{1,1}$, $Q_1/AP_{1,2}$ e $Q_1/AP_{1,3}$), também estão apresentados na Figura 5.7. O difratograma da bentonita purificada (AP) evidencia um pico de reflexão (001) referente à montmorilonita com 2θ igual a $6,05^\circ$ correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de 1,46 nm. Os difratogramas das membranas $Q_1/AP_{1,1}$ e $Q_1/AP_{1,3}$ mostram o pico de reflexão

(001) referente à montmorilonita em 2θ igual a $3,97^\circ$ e $3,94^\circ$, correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de 2,22 nm e 2,24 nm, respectivamente.

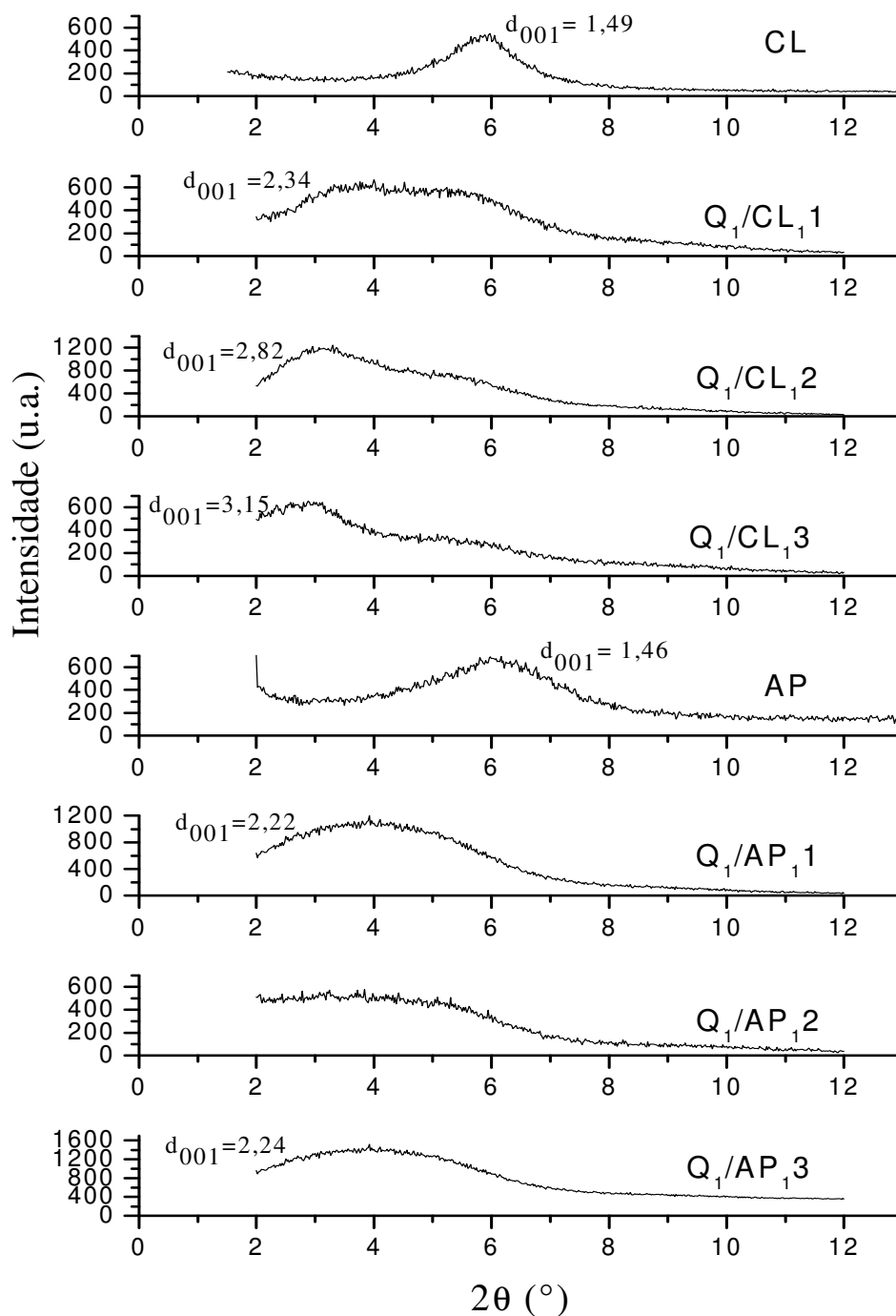


Figura 5.7– Difractogramas dos silicatos (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e das membranas (Q_1/CL_1 , Q_1/CL_2 , Q_1/CL_3 , Q_1/AP_1 , Q_1/AP_2 , Q_1/AP_3).

A membrana Q₁/AP₁₂ mostra que o pico de reflexão (001) referente à montmorilonita é deslocado para valores de 2θ em torno de 3°. No entanto, como o pico não está definido não é possível calcular a distância interplanar basal (d₀₀₁) neste caso. Com base nestes resultados fica evidenciado que bionanocompósitos predominantemente intercalados ordenados foram obtidos quando membranas de quitosana/bentonita purificada na proporção de 1/1 foram preparadas e que possivelmente bicamadas de quitosana estão posicionadas entre as camadas do silicato.

Os difratogramas da montmorilonita (CL) e das membranas de quitosana/montmorilonita, com a proporção quitosana/montmorilonita de 5/1, em triplicata (Q₅/CL₁₁, Q₅/CL₁₂ e Q₅/CL₁₃), estão apresentados na Figura 5.8. As membranas Q₅/CL₁₁ e Q₅/CL₁₂ mostram pico de reflexão (001) referente à montmorilonita em valores de 2θ em torno de 2° e um pico em 10° referente a quitosana, como mostra a Figura 5.7. No entanto, como o pico em torno de 2° não está definido não é possível calcular a distância interplanar basal (d₀₀₁). A membrana Q₅/CL₁₃ mostra pico de reflexão (001) referente à montmorilonita em valor de 2θ de 3,87°, correspondendo a uma distância interplanar basal (d₀₀₁) de 2,28 nm indicando que possivelmente bicamadas de quitosana estão posicionadas entre as camadas do silicato. Estes dados sugerem que para a proporção de quitosana/montmorilonita correspondente a 5/1, bionanocompósitos predominantemente intercalados desordenados foram obtidos.

Na Figura 5.8, também estão apresentados os difratogramas da bentonita purificada (AP) e das membranas de quitosana/bentonita purificada, com a proporção quitosana/bentonita purificada de 5/1 em triplicata (Q₅/AP₁₁, Q₅/AP₁₂ e Q₅/AP₁₃). Os difratogramas das membranas Q₅/AP₁₁ e Q₅/AP₁₃ mostram que o pico de reflexão (001) referente à montmorilonita foi deslocado para valores de 2θ a baixos ângulos, porém como o pico não está definido não é possível calcular a distância interplanar basal (d₀₀₁). O difratograma da membrana Q₅/AP₁₂ mostra o pico de reflexão (001) referente à montmorilonita em 2θ igual a 4,7°, correspondendo a uma distância interplanar basal (d₀₀₁) de 1,89 nm e um pico em 10° referente a quitosana, sugerindo que bionanocompósitos com

estrutura predominantemente intercalada desordenada foram obtidos quando membranas de quitosana/bentonita na proporção de 5/1 foram preparadas.

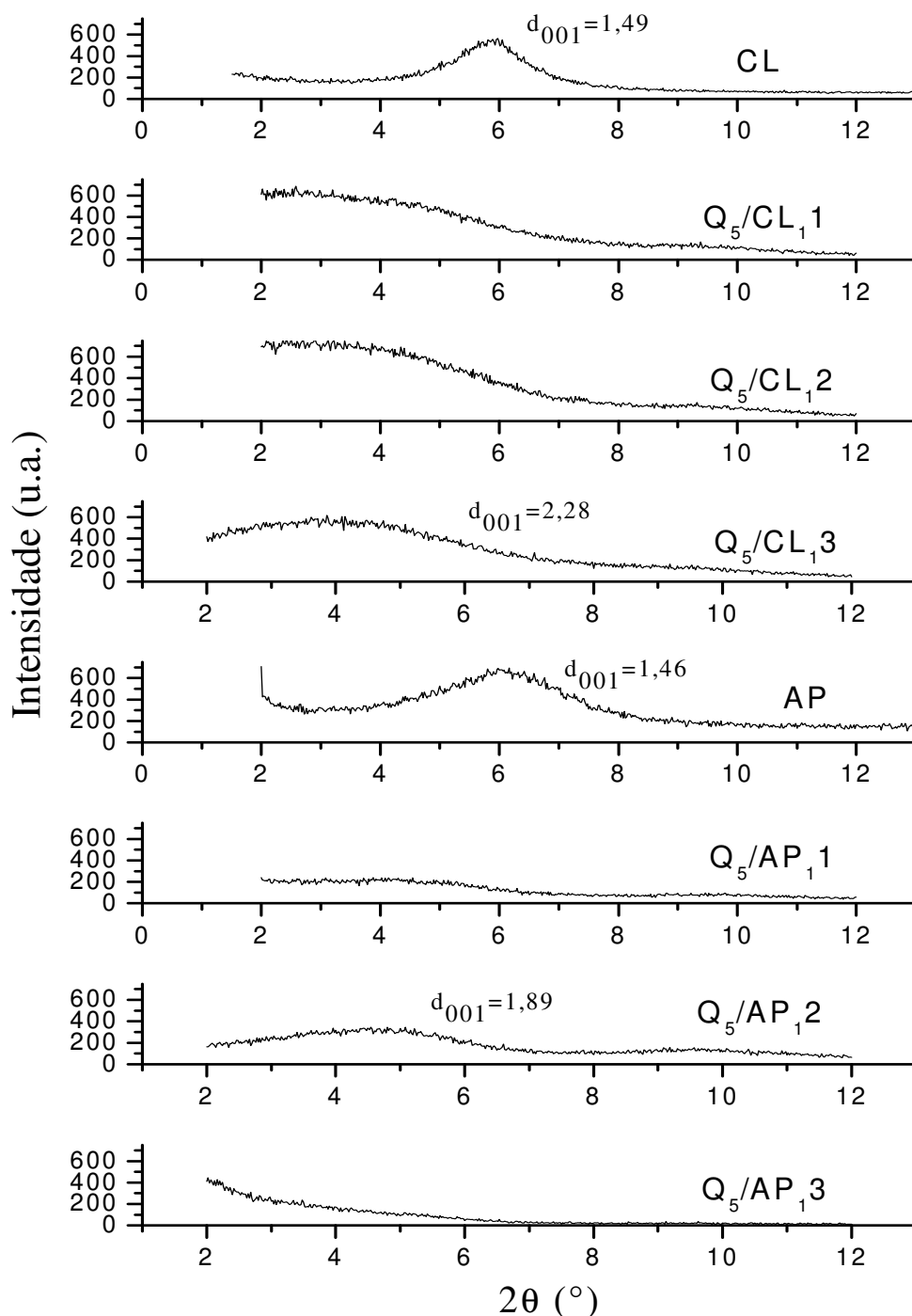


Figura 5.8– Difratoogramas dos silicatos (montmorilonita - CL e bentonita purificada AP) e das membranas (Q₅/CL₁, Q₅/CL₂, Q₅/CL₃, Q₅/AP₁, Q₅/AP₂ e Q₅/AP₃).

Os difratogramas da montmorilonita (CL) e das membranas de quitosana/montmorilonita, com a proporção quitosana/montmorilonita de 10/1, em triplicata (Q_{10}/CL_{11} , Q_{10}/CL_{12} e Q_{10}/CL_{13}), estão apresentados na Figura 5.9. As membranas Q_{10}/CL_{11} e Q_{10}/CL_{12} mostram picos de reflexão (001) referentes à montmorilonita em 2θ em torno de 2° e um pico em 10° referente a quitosana. No entanto, como o pico em torno de 2° não está definido não é possível calcular a distância interplanar basal (d_{001}). A membrana Q_{10}/CL_{13} mostra o pico de reflexão (001) referente à montmorilonita em valor de 2θ igual a $3,44^\circ$, correspondendo a uma distância interplanar basal (d_{001}) de 2,56 nm, indicando que, possivelmente, bicamadas de quitosana estão posicionadas entre as camadas do silicato. Portanto, estes dados sugerem que bionanocompósitos com estrutura intercalada desordenada tendendo a esfoliada foram obtidos quando a proporção quitosana/montmorilonita foi de 10/1.

Os difratogramas da bentonita purificada (AP) e das membranas de quitosana/bentonita purificada, com a proporção quitosana/bentonita purificada de 10/1, em triplicata (Q_{10}/AP_{11} , Q_{10}/AP_{12} e Q_{10}/AP_{13}), estão apresentados na Figura 5.9. Os difratogramas das membranas Q_{10}/AP_{11} , Q_{10}/AP_{12} e Q_{10}/AP_{13} mostram o pico de reflexão (001) referente à montmorilonita deslocado para valores de 2θ a baixos ângulos, porém como o pico não está definido não é possível calcular a distância interplanar basal (d_{001}) e um pico em 10° referente a quitosana. Isto indica que bionanocompósitos com estrutura predominantemente intercalada desordenada tendendo a esfoliada foram obtidos quando membranas de quitosana/bentonita com proporção de quitosana/bentonita correspondente a 10/1 foram preparados.

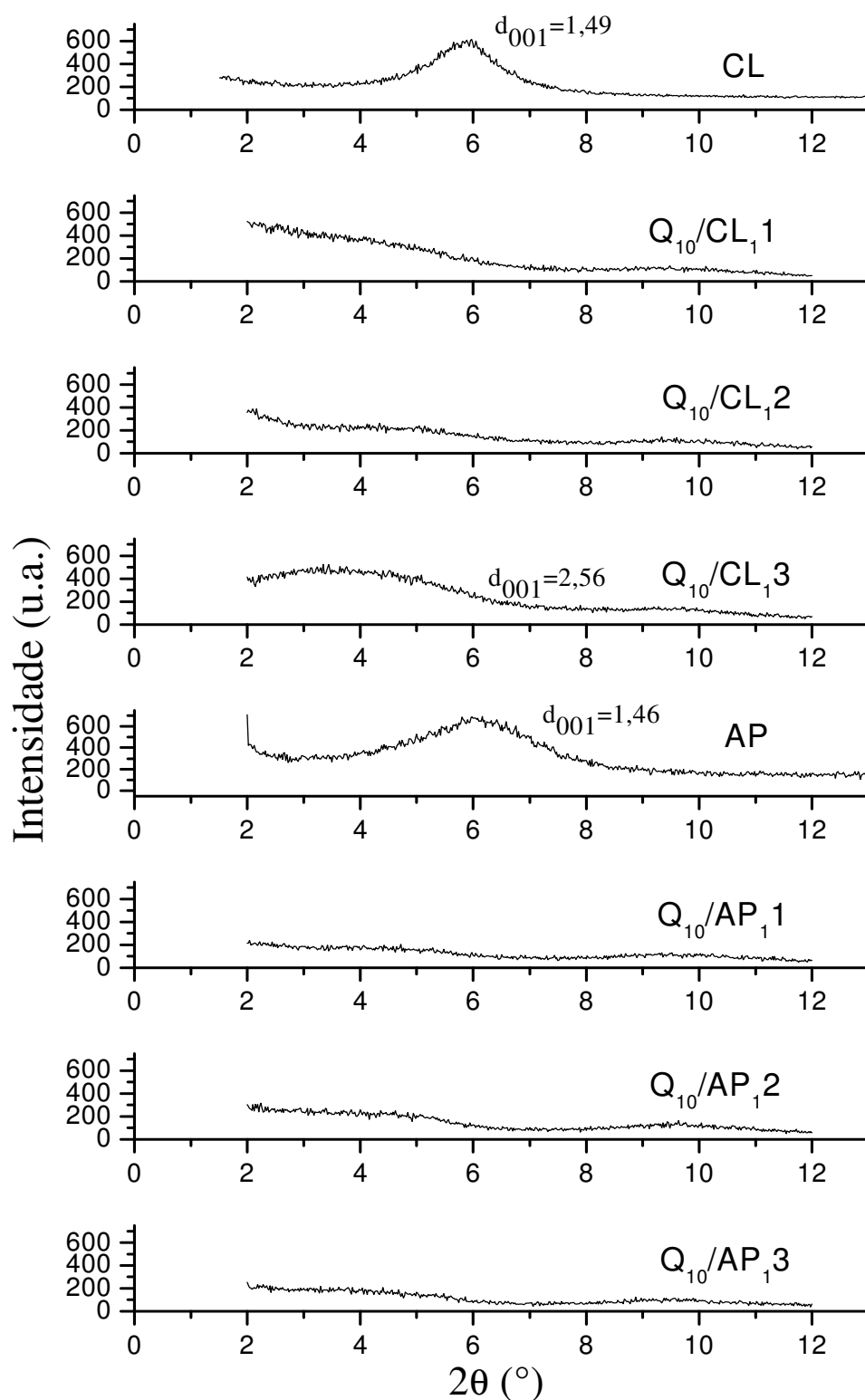


Figura 5.9– Difractogramas dos silicatos (montmorilonita - CL e bentonita purificada - AP) e das membranas (Q_{10}/CL_1 , Q_{10}/CL_2 , Q_{10}/CL_3 , Q_{10}/AP_1 , Q_{10}/AP_2 e Q_{10}/AP_3).

Em resumo, os dados de difratometria de raios X das membranas de quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada, com proporções de quitosana/silicato de 1/1, 5/1 e 10/1, mostram que bionanocompósitos foram obtidos quando as membranas foram preparadas com os dois tipos de silicatos (montmorilonita e bentonita purificada) e nas três proporções de quitosana/silicato estudadas. A morfologia dos bionanocompósitos foi afetada pela proporção de quitosana/silicato. Possivelmente, bionanocompósitos com estrutura intercalada ordenada, intercalada desordenada e intercalada desordenada tendendo a esfoliada foram obtidos quando as membranas de quitosana/silicato foram preparadas nas proporções de 1/1, 5/1 e 10/1, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os dados de espectroscopia no infravermelho, mostrados na Figura 5.5, onde se observa que os valores do número de onda da banda de vibração angular do grupo amina protonada (δ_{NH_3}) aumentam para os bionanocompósitos quitosana/silicato preparadas na proporção de 1/1, 5/1 e 10/1, respectivamente, indicando que a intensidade das interações entre os grupos NH_3^+ da quitosana e os sítios aniônicos dos silicatos diminuíram nesta ordem, em função da quantidade de cadeias de quitosana intercalada entre as camadas de silicato aumentar nesta ordem. Os valores das distâncias interplanares basais e as morfologias apresentadas pelos bionanocompósitos preparados com quitosana/bentonita purificada (AP) foram semelhantes as dos bionanocompósitos preparados com quitosana/montmorilonita Cloisite[®] Na⁺ (CL) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Distância interplanar basal (d_{001}) e morfologia dos silicatos (CL e AP) e das membranas Q/CL e Q/AP, nas proporções de 1/1, 5/1 e 10/1.

Amostra	P.R.B ¹ . (001) (grau)	d_{001} ² (nm)	Morfologia
Montmorilonita CL	5,92	1,49	-
Bentonita AP	6,05	1,46	-
Membrana Q ₁ /CL ₁ 1	3,77	2,34	I.O.
Membrana Q ₁ /CL ₁ 2	3,13	2,82	I.O.
Membrana Q ₁ /CL ₁ 3	2,80	3,15	I.O.
Membrana Q ₅ /CL ₁ 1	>2	-	I.D.
Membrana Q ₅ /CL ₁ 2	>2	-	I.D.
Membrana Q ₅ /CL ₁ 3	3,87	2,28	I.D.
Membrana Q ₁₀ /CL ₁ 1	>2	-	I.D./E.
Membrana Q ₁₀ /CL ₁ 2	>2	-	I.D./E.
Membrana Q ₁₀ /CL ₁ 3	3,44	2,56	I.D./E.
Membrana Q ₁ /AP ₁ 1	3,97	2,22	I.O.
Membrana Q ₁ /AP ₁ 2	>2	-	I.O.
Membrana Q ₁ /AP ₁ 3	3,94	2,24	I.O.
Membrana Q ₅ /AP ₁ 1	>2	-	I.D.
Membrana Q ₅ /AP ₁ 2	4,70	1,89	I.D.
Membrana Q ₅ /AP ₁ 3	>2	-	I.D.
Membrana Q ₁₀ /AP ₁ 1	>2	-	I.D./E.
Membrana Q ₁₀ /AP ₁ 2	>2	-	I.D./E.
Membrana Q ₁₀ /AP ₁ 3	>2	-	I.D./E.

¹P.R.B. = pico de reflexão basal; ² d_{001} = distância interplanar basal; I.O. = intercalado ordenado; I.D. = intercalado desordenado; I.D./E. = intercalado desordenado/esfoliado.

5.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 5.10 mostra a micrografia da área transversal da membrana de quitosana (Q). A morfologia da seção transversal da membrana de quitosana (Q) evidencia uma superfície plana, bem definida, com uma espessura de

21,2 μm e ausente de vazios. No entanto, é possível visualizar marcas, indicadas por setas, provavelmente deixadas na etapa de preparação da amostra (corte da membrana, feito com tesoura a temperatura ambiente).

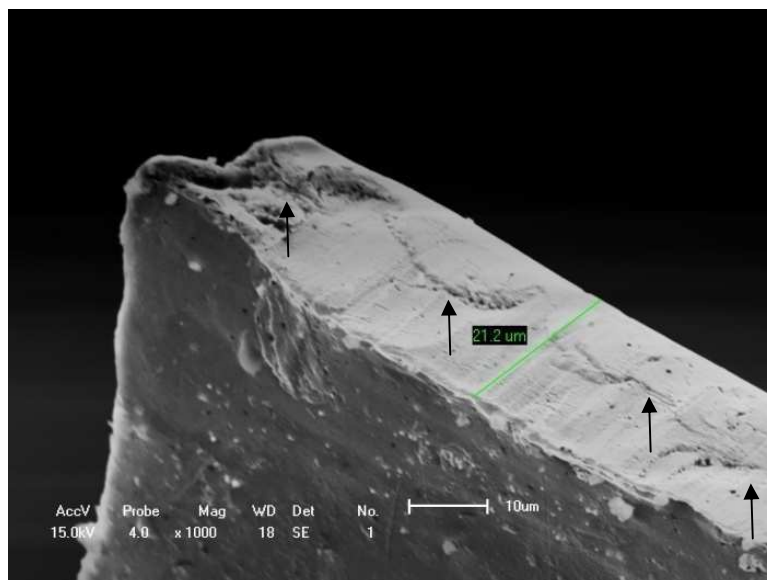
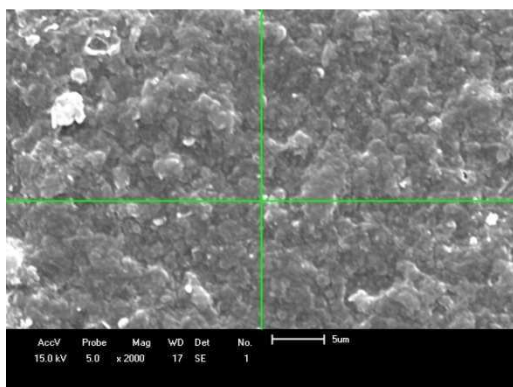
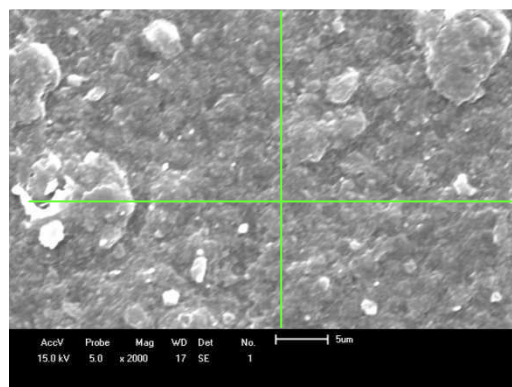


Figura 5.10 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da área transversal da membrana de quitosana (Q).

As micrografias da área superficial das membranas de quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada analisadas por DRX e codificadas como Q_1/CL_{11} , Q_5/CL_{11} , Q_{10}/CL_{11} , Q_1/AP_{11} , Q_5/AP_{11} , Q_{10}/AP_{11} , estão apresentadas nas Figuras 5.11 a 5.13. As micrografias das membranas de quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada com razão mássica equivalente a 1/1 (Q_1/CL_{11} e Q_1/AP_{11}), Figuras 5.11 (a) e (b), evidenciam a presença de duas fases e heterogeneidade na dispersão dos silicatos incorporados à matriz de quitosana resultando em aglomerados, sendo estes menores e melhor distribuídos na matriz polimérica para o caso onde o silicato montmorilonita foi empregado. De acordo com estudo realizado por Wang et al., (2005), a formação de aglomerados em bionanocompósitos quitosana/montmorilonita é resultado das interações aresta-aresta (*edge-edge*) dos grupos hidroxílicos presentes nas camadas octaédricas da montmorilonita.

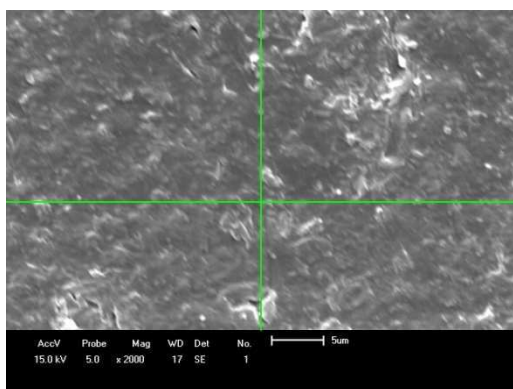


(a)

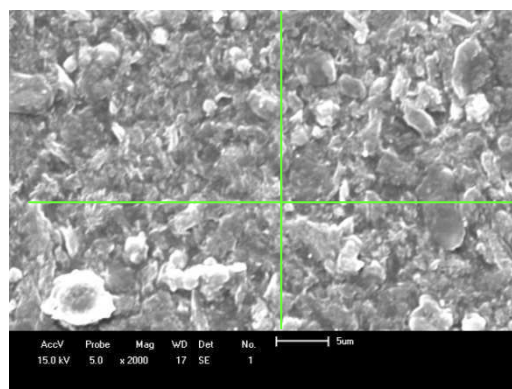


(b)

Figura 5.11 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da área superficial das membranas: (a) Q₁/CL₁.1 e (b) Q₁/AP₁.1.

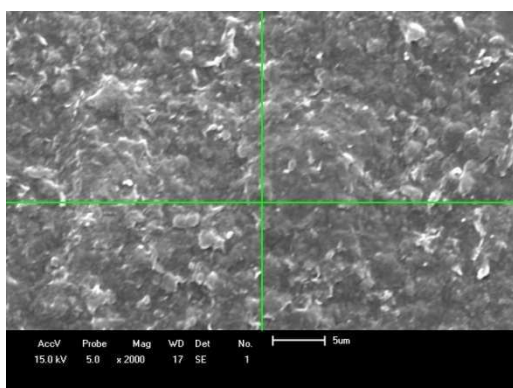


(a)

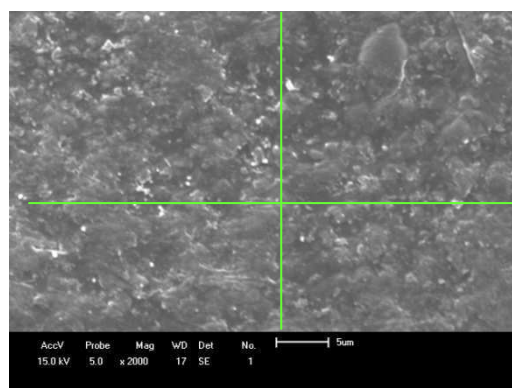


(b)

Figura 5.12 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da área superficial das membranas: (a) Q₅/CL₁.1 e (b) Q₅/AP₁.1.



(a)



(b)

Figura 5.13 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da área superficial das membranas: (a) Q₁₀/CL₁.1 e (b) Q₁₀/AP₁.1.

Quanto às micrografias das membranas com razões mássicas quitosana/silicato equivalentes a 5/1 (Q_5/CL_1 , Q_5/AP_1), Figuras 5.12 (a) e (b), e 10/1 (Q_{10}/CL_1 , Q_{10}/AP_1), Figuras 5.13 (a) e (b), verifica-se a presença de aglomerados com pequenos tamanhos e bem distribuídos na matriz polimérica, principalmente para as membranas Q_{10}/CL_1 e Q_{10}/AP_1 , Figura 5.13 (a) e (b), sugerindo que neste caso as interações aresta-aresta (*edge-edge*) dos grupos hidroxílicos presentes nas camadas octaédricas da montmorilonita foram menores, resultando na melhor dispersão e distribuição dos silicatos (CL e AP) na matriz de quitosana.

Estes resultados estão de acordo com os dados de DRX que evidenciam a formação de bionanocompósitos com estruturas intercaladas ordenadas, intercaladas desordenadas e intercaladas desordenadas tendendo a esfoliada nos casos onde razões de quitosana/silicato empregadas foram de 1/1, 5/1 e 10/1, respectivamente.

5.1.4. Análise Mecânica

Os resultados de resistência à tração, módulo de elasticidade e alongamento na ruptura das membranas de quitosana (Q) e das membranas de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1) e quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1) estão apresentadas nas Figuras 5.14 a 5.16 e Tabela 5.3.

De acordo com a Figura 5.14 e Tabela 5.3, a resistência à tração apresentada pela membrana de quitosana (Q) foi de 44,5 MPa e pelas membranas de quitosana/montmorilonita com razão mássica de 1/1, 5/1 e 10/1 (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1) foi de 84,9 MPa; 79,1 MPa e 68,5 MPa, respectivamente. Isto indica que a incorporação do silicato montmorilonita a matriz de quitosana resultou no aumento da resistência à tração sendo, portanto, eficaz na obtenção de membranas de quitosana mais resistentes. Indica também que o aumento da razão mássica quitosana/montmorilonita (Q_{10}/CL_1) favoreceu a diminuição da resistência à tração da membrana de

quitosana. Este resultado corrobora com os resultados de infravermelho sendo provavelmente atribuído às fracas interações entre os grupos funcionais amina protonados ($-\text{NH}_3^+$) presentes na quitosana e os sítios aniônicos da montmorilonita quando do aumento da razão mássica quitosana/montmorilonita, conforme descrito por Darder et al. (2003) em estudo semelhante. A Figura 5.14 e Tabela 5.3 também mostram que a resistência à tração apresentada pelas membranas de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e $\text{Q}_{10}/\text{AP}_1$) foi de 49,6 MPa; 62,1 MPa e 40,4 MPa, respectivamente. Isto indica que a membrana quitosana/bentonita purificada com menor razão mássica quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1) apresenta um valor de resistência à tração, na faixa do erro experimental, equivalente ao valor obtido pela membrana de quitosana. Este fato é atribuído a presença dos aglomerados formados pelas interações aresta-aresta dos grupos hidroxílicos presentes nas camadas octaédricas da montmorilonita, como mostra a Figura 5.11b, que atuam como pontos concentradores de tensão o que leva a diminuição da resistência à tração. A membrana quitosana/bentonita purificada com razão quitosana/bentonita purificada equivalente a 5/1 (Q_5/AP_1) apresentou o maior valor de resistência à tração. Este resultado está de acordo com os resultados de infravermelho uma vez que o deslocamento na banda de vibração angular do grupo amina protonado (δ_{NH_3}) foi próximo ao obtido pela membrana de menor razão mássica quitosana/bentonita (Q_1/AP_1) o que indica fortes interações entre os grupos $-\text{NH}_3^+$ da quitosana e os sítios aniônicos dos silicatos. Além disso, os resultados de DRX indicaram a formação de bionanocompósitos com estrutura predominantemente intercalada desordenada, com distância interplanar basal igual a 1,89 nm, sugerindo monocamadas de quitosana intercaladas nas folhas do silicato, que resulta em fortes interações quitosana/silicato devido as maiores interações de pontes de hidrogênio ou ligações iônicas entre quitosana e silicato. Somada a isto, houve neste caso uma melhor dispersão e distribuição do silicato na matriz do biopolímero, conforme dados de MEV, quando comparada com a membrana quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1).

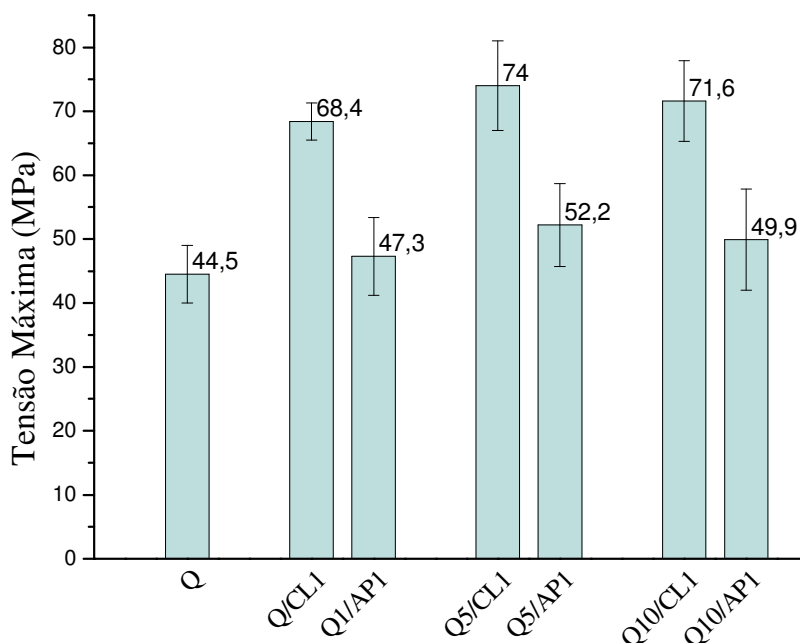


Figura 5.14 – Resistência à tração das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁).

A membrana quitosana/bentonita purificada com maior razão mássica (Q₁₀/AP₁) apresentou menor valor de resistência à tração, este resultado é provavelmente atribuído as fracas interações de pontes de hidrogênio ou ligações iônicas entre quitosana e silicato como mostrado pelos resultados de infravermelho que indicou menor deslocamento na banda de vibração angular do grupo amina protonada (δ_{NH_3}) e pelos resultados de DRX que indicou a formação de bionanocompósitos com estrutura predominantemente intercalada desordenada tendendo a esfoliada.

De acordo com a Figura 5.15 e a Tabela 5.3, a diminuição da razão mássica quitosana/silicato, isto é o aumento do teor dos silicatos (CL e AP) incorporado a matriz de quitosana favoreceu ao aumento do módulo de elasticidade, uma medida indireta da rigidez das membranas. O valor do módulo de elasticidade é de 1,5 GPa para a membrana de quitosana e de 5,2 GPa, 4,4 GPa e 3,5 GPa para as membranas de quitosana/montmorilonita

(Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1) e de 4,1 GPa, 3,1 GPa e 2,4 GPa para de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1), respectivamente. Portanto, as membranas quitosana/silicato com menor razão mássica (Q_1/CL_1 e Q_1/AP_1) apresentaram um aumento de 3,5 e de 2,7 vezes, respectivamente, no módulo de elasticidade quando comparado com o obtido pela membrana de quitosana (Q). E as membranas quitosana/silicato com maior razão mássica (Q_{10}/CL_1 e Q_{10}/AP_1) apresentaram um aumento de 2,3 e de 1,6 vezes, respectivamente, no módulo de elasticidade quando comparado com o obtido pela membrana de quitosana (Q). Isto indica que a incorporação do silicato montmorilonita (CL) favoreceu a valores de módulos mais elevados do que a incorporação da bentonita purificada (AP), Figura 5.15. Este aumento do módulo de elasticidade das membranas quitosana/montmorilonita em relação aos obtidos pelas membranas quitosana/bentonita purificada deve ser, provavelmente, atribuído as fortes interações entre os grupos $-NH_3^+$ da quitosana e os sítios aniônicos da montmorilonita que favorecem ao aumento do módulo de elasticidade e restringem a mobilidade das cadeias poliméricas acarretando na diminuição do alongamento na ruptura das membranas quitosana/montmorilonita quando comparado com os valores obtidos pelas membranas quitosana/bentonita purificada, como mostra a Figura 5.16 e a Tabela 5.3.

O valor do alongamento na ruptura é de 5,9% para a membrana de quitosana e de 3,3%, 4,6% e 4,6% para a membrana de quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1) e de 2,4%, 6,8% e 5,9% para de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1), respectivamente. Portanto, a membrana quitosana/montmorilonita com menor razão mássica (Q_1/CL_1) apresentou um valor de alongamento, na faixa do erro experimental, equivalente ao valor obtido pela membrana de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1). No entanto, as membranas quitosana/montmorilonita com maiores razões mássicas (Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1) apresentaram uma diminuição de 32,4% e 22% quando comparado com os valores obtidos pelas membranas quitosana/bentonita purificada (Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1), respectivamente.

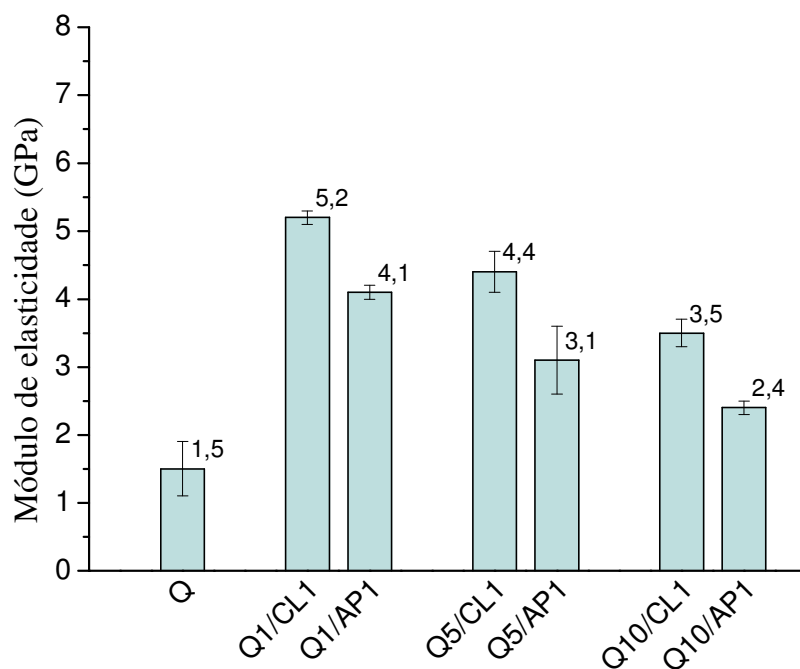


Figura 5.15 – Módulo de elasticidade das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁).

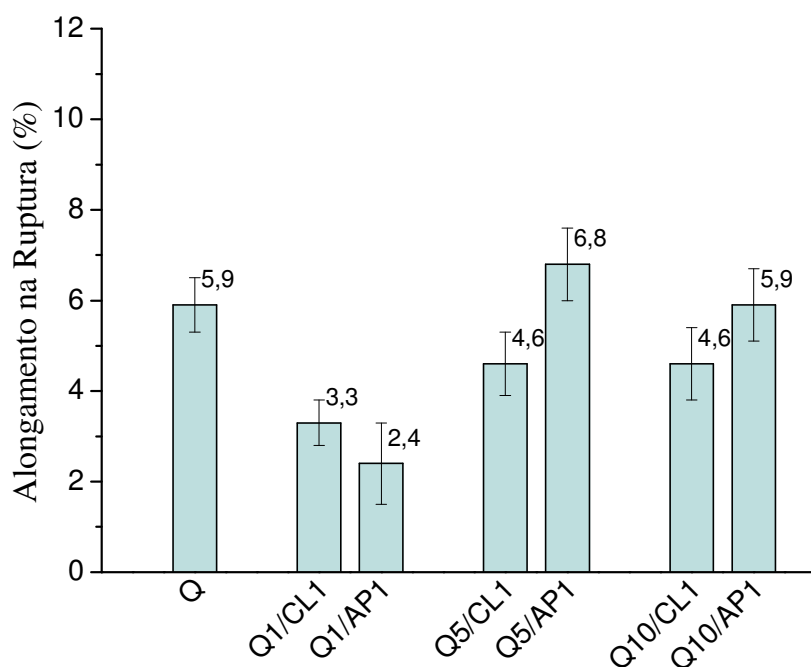


Figura 5.16 – Alongamento das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁).

Tabela 5.3 - Resultados de resistência à tração, módulo de elasticidade e alongamento na ruptura das membranas de quitosana (Q) e das membranas quitosana/silicato (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁, Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁).

Membrana	Resistência a tração (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Alongamento na ruptura (%)
Membrana Q	45 ± 4	1,5 ± 0,4	5,9 ± 0,6
Membrana Q ₁ /CL ₁	85 ± 4	5,2 ± 0,1	3,3 ± 0,5
Membrana Q ₅ /CL ₁	79 ± 1	4,4 ± 0,3	4,6 ± 0,7
Membrana Q ₁₀ /CL ₁	69 ± 1	3,5 ± 0,2	4,6 ± 0,8
Membrana Q ₁ /AP ₁	50 ± 5	4,1 ± 0,1	2,4 ± 0,9
Membrana Q ₅ /AP ₁	62 ± 5	3,1 ± 0,5	6,8 ± 0,8
Membrana Q ₁₀ /AP ₁	40 ± 2	2,4 ± 0,1	5,9 ± 0,8

5.1.5. Análise Termogravimétrica

As curvas de TG e DTG, sob fluxo de ar, da montmorilonita (CL), da bentonita purificada (AP), da membrana de quitosana (Q), das membranas quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e das membranas quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁), estão apresentadas nas Figuras 5.17 e 5.18, respectivamente. As etapas de decomposição com suas temperaturas e suas respectivas perdas de massa estão sumarizadas na Tabela 5.4.

As curvas termogravimétricas dos silicatos (CL e AP) mostram que ambos os silicatos estudados são extremamente estáveis termicamente e apresentam mais de 90% de resíduo sólido. A curva de TG da membrana de quitosana (Q) apresenta três perdas de massa; a primeira ocorre a uma temperatura máxima de 71 °C, associada à volatilização da água livre e apresenta uma perda de massa em torno de 8%; a segunda ocorre a uma temperatura máxima de

304 °C atribuída à degradação e desacetilação da quitosana com perda de massa em torno de 41% e a terceira e última etapa apresenta temperatura de decomposição máxima a 523 °C associada à degradação oxidativa dos resíduos carbonáceos formados durante a segunda etapa com perda de massa em torno de 46,37%. Portanto a perda de massa total da membrana de quitosana foi de 96,15%, valor este próximo do encontrado por Wang et al., (2005) e Han et al., (2011) em estudos semelhantes.

As membranas de quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada com menor razão mássica (Q_1/CL_1 e Q_1/AP_1) exibiram degradação oxidativa com três etapas de decomposição e com as seguintes perdas de massa: 9,27%; 21,55% e 15% (Q_1/CL_1) e 7,90%; 19,78% e 24,23% (Q_1/AP_1). Portanto, as membranas quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada apresentaram uma perda de massa total de 45,82% e de 51,91%, respectivamente. Sendo observada uma variação de 6% a mais na perda de massa da membrana de quitosana/bentonita purificada quando comparada com a perda de massa obtida pela membrana de quitosana/montmorilonita.

As curvas de TG das membranas de quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada com razões quitosana/silicato equivalentes a 5/1 (Q_5/CL_1 e Q_5/AP_1) também exibiram três etapas de decomposição com as seguintes perdas de massa: 11,26%; 34,41% e 36,07% (Q_5/CL_1) e 9,77%; 33,30% e 37,81% (Q_5/AP_1). Portanto, a membrana quitosana/montmorilonita (Q_5/CL_1) e a membrana quitosana/bentonita purificada (Q_5/AP_1) apresentaram uma perda de massa total de 81,78% e de 80,88%, respectivamente.

As membranas quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita com maior razão mássica (Q_{10}/CL_1 e Q_{10}/AP_1) apresentaram as seguintes perdas de massa: 4,0%; 44,61% e 46,30% (Q_{10}/CL_1) e 9,06%, 36,37% e 40,95% (Q_{10}/AP_1) com perda de massa total de 94,91% e 86,38%, respectivamente. Sendo observada uma variação de 9% a mais na perda de massa da membrana quitosana/montmorilonita quando comparada com a perda de massa obtida pela membrana de quitosana/bentonita purificada.

As curvas de TG mostram também que para uma perda de massa de 30% os valores da temperatura de decomposição ($T_{30\%}$) foram de 308 °C para a membrana de quitosana, de 435 °C, 311 °C e 316 °C para as membranas

quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1) e de 470 °C, 315 °C e 322 °C para as membranas de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1), respectivamente. Portanto, todas as membranas de quitosana/silicato apresentaram uma temperatura de decomposição em 30% de perda de massa maior do que a temperatura apresentada pela membrana de quitosana (Q). Isto indica que ambos os silicatos incorporados (montmorilonita e bentonita) favoreceram ao aumento da estabilidade térmica da membrana de quitosana e que as membranas quitosana/silicato com menor razão mássica (Q_1/CL_1 e Q_1/AP_1) apresentaram os maiores aumentos na temperatura de decomposição (de 127 °C e 162 °C), respectivamente. Mostra também que para as membranas com menor razão mássica quitosana/silicato, a incorporação da bentonita purificada a quitosana favoreceu ao aumento de 14 °C quando comparada a membrana quitosana.

De acordo com Han et al., (2011) o aumento do teor de montmorilonita incorporado a quitosana favorece ao aumento da estabilidade térmica da quitosana como efeito das fortes interações eletrostáticas da quitosana com a montmorilonita como reportado na análise por infravermelho. Além deste fato, Wang et al., (2005) considera que a montmorilonita atua como uma barreira de aquecimento promovendo, após a decomposição térmica, a formação de resíduos carbonáceos na superfície da matriz polimérica que favorecem a redução da taxa de decomposição.

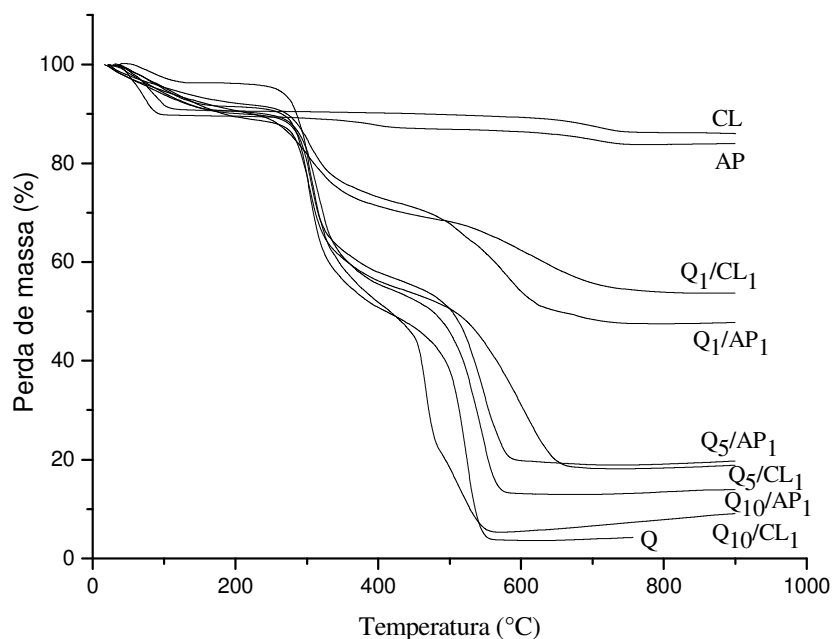


Figura 5.17 - Curvas de TG, sob fluxo de ar, das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁).

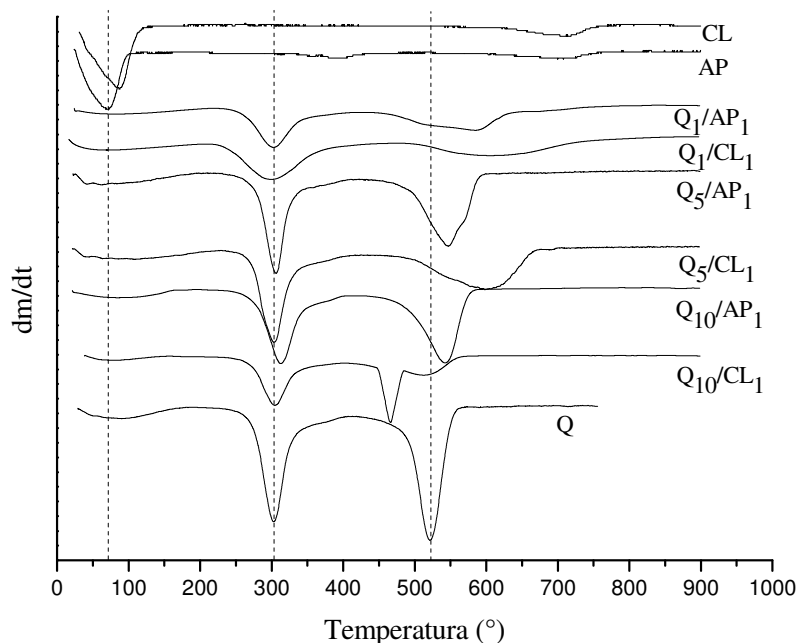


Figura 5.18 - Curvas de DTG, sob fluxo de ar, das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁).

Tabela 5.4 - Etapas de decomposição.

Amostra	Desidratação				Degradação da quitosana				Degradação dos resíduos carbonáceos			
	T ₀ (°C)	T _{máx} (°C)	T _F (°C)	Δm (%)	T ₀ (°C)	T _{máx} (°C)	T _F (°C)	Δm (%)	T ₀ (°C)	T _{máx} (°C)	T _F (°C)	Δm (%)
Q	44	71	138	8,30	283	304	326	41,48	494	523	541	46,37
Q₁/CL₁	34	71	137	9,27	254	302	353	21,55	516	609	716	15,00
Q₅/CL₁	40	111	175	11,26	282	305	329	34,41	515	600	648	36,07
Q₁₀/CL₁	54	80	102	4,0	279	305	331	44,61	449	514	495	46,30
Q₁/AP₁	34	84	155	7,90	273	304	336	19,78	485	587	641	24,23
Q₅/AP₁	32	88	143	9,77	286	307	328	33,30	502	548	577	37,81
Q₁₀/AP₁	41	87	140	9,06	287	315	341	36,37	496	544	567	40,95

5.1.6. Calorimetria Exploratória Diferencial

A Figura 5.19 mostra as curvas de DSC das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 ; Q_5/CL_1 ; Q_{10}/CL_1) e quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 ; Q_5/AP_1 ; Q_{10}/AP_1). Em todas as curvas, dois eventos térmicos são observados. De acordo com estudos realizados por Guinesi et al., (2006) o primeiro evento, caracterizado por um pico endotérmico, é relacionado a presença de água associada aos grupos hidrofílicos presentes na estrutura da quitosana, dado que este polissacarídeo apresenta grande afinidade com a água. O segundo evento, caracterizado por um pico exotérmico, relacionado à decomposição das unidades amina presentes na estrutura da quitosana. Os valores da temperatura máxima ($T_{m\acute{a}x}$) dos dois eventos térmicos e a variação de entalpia (ΔH) do segundo evento térmico estão sumarizados na Tabela 5.5. O Anexo III mostra como foram determinados estes valores usando o aplicativo TA Instruments.

De acordo com a Tabela 5.5 as temperaturas máximas de ambos os eventos térmicos foram semelhantes para a membrana de quitosana e as membranas de quitosana/silicato (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 , Q_{10}/CL_1 , Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1). No entanto, os valores de ΔH , relacionado a decomposição das unidades amina, foram de 198 J/g para a membrana de quitosana, de 54 J/g, 141 J/g e 155 J/g para as membranas quitosana/montmorilonita (Q_1/CL_1 , Q_5/CL_1 e Q_{10}/CL_1) e de 62 J/g, 164 J/g e 181 J/g para as membranas de quitosana/bentonita purificada (Q_1/AP_1 , Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1), respectivamente. Isto sugere que a incorporação de ambos os silicatos (CL e AP) nas razões mássicas quitosana/silicato de 1/1, 5/1 e 10/1 favoreceram a diminuição da variação de entalpia de decomposição e que quanto menor a razão mássica quitosana/silicato menor a variação de entalpia.

As membranas com menor razão mássica quitosana/silicato (Q_1/CL_1 e Q_1/AP_1) apresentaram uma redução na variação de entalpia de 27% e 31%, respectivamente, quando comparada com o valor de variação de entalpia obtida pela membrana de quitosana. Esta redução da variação de entalpia das membranas quitosana/silicato com menor razão quitosana/silicato em relação às membranas de quitosana deve ser, provavelmente, atribuída as fortes

interações entre os grupos $-NH_3^+$ da quitosana e os sítios aniônicos da montmorilonita que favorecem a uma maior estabilidade térmica das membranas proporcionando um menor fluxo de energia e menores valores de calor absorvido pelo sistema durante o processo de decomposição das unidades amina presentes na estrutura da quitosana.

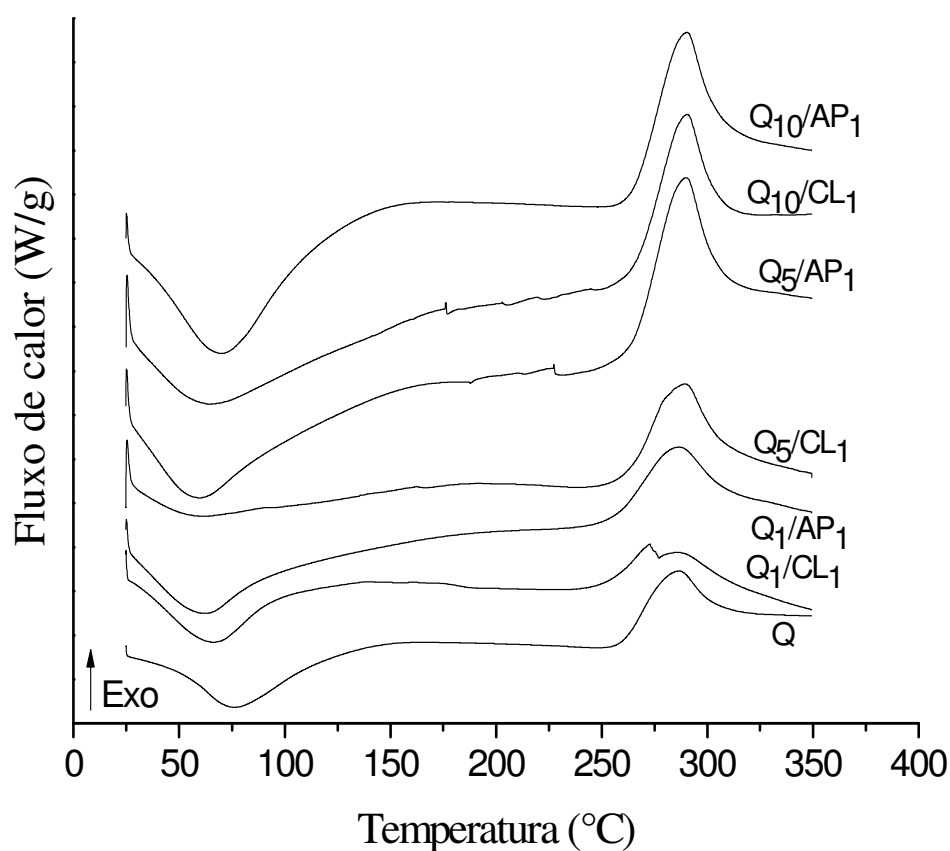


Figura 5.19 - Curvas de DSC, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min), das membranas de quitosana (Q), quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁, Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁, Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁).

Tabela 5.5 – Valores de temperatura máxima dos eventos e da variação de entalpia do segundo evento.

Amostra	1º Evento		2º Evento	
	*T _{máx} (°C)	T _{máx} (°C)	T _{máx} (°C)	* ΔH (J/g)
Membrana Q	77	286		198
Membrana Q ₁ /CL ₁	66	273		54
Membrana Q ₅ /CL ₁	55	289		141
Membrana Q ₁₀ /CL ₁	64	290		155
Membrana Q ₁ /AP ₁	62	286		62
Membrana Q ₅ /AP ₁	61	289		164
Membrana Q ₁₀ /AP ₁	72	290		181

* T_{máx} = Temperatura máxima, ΔH = Variação de entalpia.

5.1.7. Medida do ângulo de Contato

De acordo com a literatura a hidrofiliçidade é uma das características desejáveis a qualquer material considerado como suporte para imobilização de enzimas. Portanto, a membrana de quitosana (Q) e as membranas de quitosana/montmorilonita (Q₁/CL₁; Q₅/CL₁; Q₁₀/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₁/AP₁; Q₅/AP₁; Q₁₀/AP₁) foram caracterizadas por medida do ângulo de contato na interface entre o fluido (água destilada) e o sólido (membrana). A medida do ângulo de contato é uma medida do grau de hidrofiliçidade da superfície de membranas e geralmente usadas para estimar a resistência a molhabilidade de membranas em água (Phan et al., 2009).

Como resposta a uma tensão energeticamente desfavorável, ângulo de contato θ igual a 180°, os sistemas tendem a minimizar as áreas das interfaces formando gotas esféricas dado que esta é a geometria com menor razão área de superfície/volume. Entretanto, todas as membranas caracterizadas apresentaram ângulo de contato menor que 90°, Tabela 5.6, indicando sistemas predominantemente molhantes, isto é, a água tendeu a espalhar-se

sobre a superfície das membranas. Portanto, o resultado de medida do ângulo de contato da membrana de quitosana apresentou um valor de $48 \pm 2^\circ$, na faixa do erro experimental, equivalente ao valor de $46 \pm 0.2^\circ$ obtido por Rhim et al., (2006). As membranas de quitosana/silicato (Q_1/CL_1 ; Q_5/CL_1 ; Q_{10}/CL_1 ; Q_1/AP_1 ; Q_5/AP_1 e Q_{10}/AP_1) apresentaram medida de ângulo de contato de $34 \pm 1^\circ$, $40 \pm 2^\circ$, $48 \pm 2^\circ$, $37 \pm 2^\circ$, $39 \pm 3^\circ$ e $51 \pm 1^\circ$, respectivamente, indicando que quanto menor a razão quitosana/silicato menores os valores dos ângulos de contato. Portanto, a incorporação dos silicatos (CL e AP) a matriz de quitosana favorece a molhabilidade das superfícies das membranas, devido, possivelmente, às fortes interações entre as moléculas polares da água e os grupos polares presentes no silicato em camadas. De acordo com Rhim et al., (2006) a diminuição do ângulo de contato com o aumento da concentração de montmorilonita em filmes do bionanocompósitos quitosana/montmorilonita é principalmente devido à natureza hidrofílica da montmorilonita sódica. Neste estudo foi possível indicar também que as membranas quitosana/bentonita purificada apresentaram medidas de ângulo de contato na faixa do erro experimental quando comparado com os valores obtidos para as membranas quitosana/montmorilonita. As medidas do ângulo de contato das membranas quitosana/silicato com razões mássicas de 1/1, 5/1 e 10/1 estão sumarizadas na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Ângulos de contato.

Amostra	Medida do ângulo de contato
Membrana Q	$48 \pm 2^\circ$
Membrana Q_1/CL_1	$34 \pm 1^\circ$
Membrana Q_5/CL_1	$40 \pm 2^\circ$
Membrana Q_{10}/CL_1	$48 \pm 2^\circ$
Membrana Q_1/AP_1	$37 \pm 2^\circ$
Membrana Q_5/AP_1	$39 \pm 3^\circ$
Membrana Q_{10}/AP_1	$51 \pm 1^\circ$

5.2. Avaliação da Adsorção da Enzima Uréase nas Membranas de Quitosana e Quitosana/Silicato

Os valores de variação de absorvância (Δ_{Abs}), sumarizados na Tabela 5.7, correspondem as soluções em que as amostras das membranas de quitosana, quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada com razão mássica de 5/1 e 10/1 seguiram a metodologia de adsorção empregada por Magalhães et al.,(1998) que consistiu em mergulhar as membranas em uma solução a 1% (v/v) de ácido acético com pH igual a 4, depois lavar com água destilada e deixar por toda a noite a 5 °C em contato com a solução de uréase a 0,002% (m/v) preparada em meio tamponado de fosfato com pH igual a 5,6.

Tabela 5.7– Valores de absorvância medidas a temperatura ambiente das soluções a 0,002% (m/v) em pH igual a 5,6 que foram submetida a condição de 5 °C por toda a noite.

Amostra	* Δ_{Abs} (u.a.) pH = 5,6
Membrana Q	- 0,07 ± 0,03
Membrana Q ₅ /CL ₁	- 0,04 ± 0,06
Membrana Q ₅ /AP ₁	- 0,07 ± 0,06
Membrana Q ₁₀ /CL ₁	- 0,1 ± 0,1
Membrana Q ₁₀ /AP ₁	- 0,1 ± 0,1

* Δ_{Abs} = Variação de absorvância.

Os valores de variação de absorvância foram de - 0,07 ± 0,03 para a solução em contato com a membrana de quitosana (Q), de -0,04 ± 0,06 e -0,1 ± 0,1 para as soluções em contato com as membranas quitosana/montmorilonita (Q₅/CL₁ e Q₁₀/CL₁) e de -0,07 ± 0,06 e -0,1 ± 0,1 para as soluções em contato com as membranas de quitosana/bentonita purificada (Q₅/AP₁ e Q₁₀/AP₁), respectivamente. Portanto, foi observado que todos os valores de variação de absorvância ficaram dentro da faixa do erro experimental e que tanto as

membranas de quitosana quanto as membranas de quitosana/silicato não apresentaram adsorção da enzima uréase e sim dissolução, portanto, a incorporação dos silicatos, montmorilonita e bentonita purificada, a quitosana não influenciou na dissolução das membranas. Esta provavelmente favorecida pela lavagem das membranas na solução de ácido acético com pH igual a 4.

Visando avaliar a influência do pH e da temperatura na adsorção da enzima uréase pelas membranas, foram selecionadas as membranas de quitosana e quitosana/silicato com razão mássica de 5/1 por apresentar a melhor relação morfologia, propriedades mecânica e térmica dentre as razões mássicas avaliadas nesta pesquisa. As amostras das membranas selecionadas foram colocadas por toda a noite em contato com soluções a 0,001% (m/v) de uréase/água destilada (pH = 5,5), uréase/solução de tampão de fosfato - PBS (pH = 7,2) e uréase/solução de hidróxido de sódio (pH = 9,0) a 41°C e os valores de variação de absorvância das soluções, medidas a temperatura ambiente, estão sumarizados na Tabela 5.8.

Os valores de variação de absorvância das soluções a 0,001% (m/v) de uréase em pH igual a 5,5 que foram submetidas a condição de 41 °C por toda a noite, foram de $-0,064 \pm 0,006$ para a solução em contato com a membrana de quitosana (Q) e de $0,04 \pm 0,05$ e $0,067 \pm 0,004$ para as soluções em contato com as membranas quitosana/montmorilonita (Q₅/CL₁) e quitosana/bentonita purificada (Q₅/AP₁), respectivamente. Estes valores de variação de absorvância indicam que para o pH de 5,5 a 41 °C não houve adsorção da enzima uréase pela membrana de quitosana e sim dissolução. De acordo com Lavorgna et al., (2010) a presença de grupos amino livres na estrutura química da quitosana, em pH menor do que 6, podem ser facilmente protonados (NH₃⁺) gerando uma carga positiva por unidade D-glicosamina e tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel em água. Em contra partida a incorporação de ambos os silicatos, montmorilonita e bentonita purificada, a quitosana favoreceram ligações químicas, por pontes de hidrogênio, entre os grupos amino protonados e os sítios aniônicos dos silicatos que impediram a dissolução das membranas e favoreceram a adsorção da enzima uréase.

Quanto as soluções com 0,001% (m/v) de uréase em pH igual a 7,2 e submetidas a temperatura 41°C, os valores de variação de absorvância, Tabela

5.8, foram de $0,094 \pm 0,008$ para a solução em contato com a membrana de quitosana e de $0,07 \pm 0,01$ e $0,051 \pm 0,009$ para a solução em contato com as membranas quitosana/montmorilonita (Q_5/CL_1) e quitosana/bentonita purificada (Q_5/AP_1), respectivamente. Isto indica que ambas as membranas de quitosana e quitosana/silicato adsorveram a enzima uréase. Comportamento semelhante foi observado pelas soluções com 0,001% (m/v) de uréase submetidas à mesma condição de pH, 7,2, mas a temperatura de 25°C, Tabela 5.9. Isto indica que o aumento de temperatura não influenciou em uma maior adsorção enzimática e que a incorporação da bentonita purificada a quitosana se mostrou tão eficaz quanto à incorporação da montmorilonita para promover uma maior adsorção da uréase as membranas de quitosana. De acordo com Kaushik et al., (2009), as moléculas de uréase se apresentam na forma aniônica em pH neutro e neste caso como o pH da solução estava acima do ponto isoelétrico (pI) da enzima uréase, que apresenta um valor de 5,0 a 5,2, isto facilitou as interações eletrostáticas da uréase com a quitosana e o silicato como mostra a representação esquemática na Figura 5.20. O ponto isoelétrico (pI) é o valor do pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína.

Os valores de variação de absorvância das soluções a 0,001% (m/v) de uréase em pH igual a 9,0 que foram submetidas a condição de 41 °C por toda a noite, foram de $0,112 \pm 0,03$ para a solução em contato com a membrana de quitosana (Q) e de $0,143 \pm 0,02$ e $0,122 \pm 0,04$ para as soluções em contato com as membranas quitosana/montmorilonita (Q_5/CL_1) e quitosana/bentonita purificada (Q_5/AP_1), respectivamente. Estes valores de variação de absorvância indicam que em pH alcalino a 41 °C praticamente não houve adsorção da enzima uréase pelas membranas de quitosana e quitosana/silicato. De acordo com Cheng et al., (2005), o ponto isoelétrico da quitosana ocorre em pH igual a 8,7 e de acordo com G. Lagaly, (2006) o ponto isoelétrico da montmorilonita ocorre em pH igual a 6,1. Portanto, em pH alcalino tanto a enzima uréase, quanto a quitosana e os silicatos se apresentam na forma aniônica o que gerou repulsão eletrostática da uréase com a quitosana e o silicato e não favoreceu a adsorção da enzima uréase pelas membranas.

Tabela 5.8– Valores de variação de absorvância das soluções a 0,001% (m/v) de uréase em pH igual a 5,5; 7,2 e 9,0 que foram submetidas a condição de 41 °C por toda a noite.

Amostras	* Δ_{Abs} (u.a.)	Δ_{Abs} (u.a.)	Δ_{Abs} (u.a.)
	pH = 5,5	pH = 7,2	pH = 9,0
Membrana Q	- 0,064 \pm 0,006	0,094 \pm 0,008	0,112 \pm 0,03
Membrana Q ₅ /CL ₁	0,04 \pm 0,05	0,07 \pm 0,01	0,143 \pm 0,02
Membrana Q ₅ /AP ₁	0,067 \pm 0,004	0,051 \pm 0,009	0,122 \pm 0,04

* Δ_{Abs} = Variação de absorvância.

Tabela 5.9– Valores de variação de absorvância das soluções a 0,001% (m/v) de uréase em pH igual a 7,2 que foram submetidas a condição de 25 °C por toda a noite.

Amostras	* Δ_{Abs} (u.a.)
	pH = 7,2
Membrana Q	0,090 \pm 0,007
Membrana Q ₅ /CL ₁	0,063 \pm 0,002
Membrana Q ₅ /AP ₁	0,05 \pm 0,01

* Δ_{Abs} = Variação de absorvância.

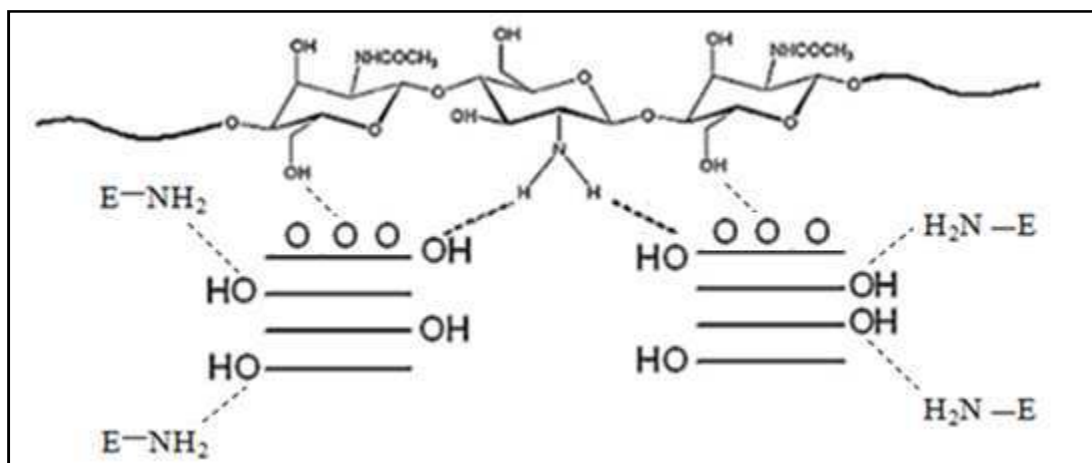


Figura 5.20 - Representação esquemática das interações entre a quitosana, o silicato e a uréase.

Fonte: Adaptado de Lavorgna et al., 2010.

5.3. Montagem do Biossensor

O biossensor é composto por uma cuba eletrolítica; por um eletrodo de referência de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) da marca Metrohm e modelo AG 9101, que fornece um potencial elétrico constante para uma medida de diferença de potencial; por um eletrodo de trabalho, sensível à espécie iônica de interesse (íon amônio) e por um eletrodo auxiliar de platina, da marca Metrohm, para ajudar na polarização. A necessidade de se usar um eletrodo de referência além do eletrodo de trabalho se deve à impossibilidade de medir diretamente o potencial de um eletrodo isolado. A foto do biossensor está apresentada na Figura 5.21.

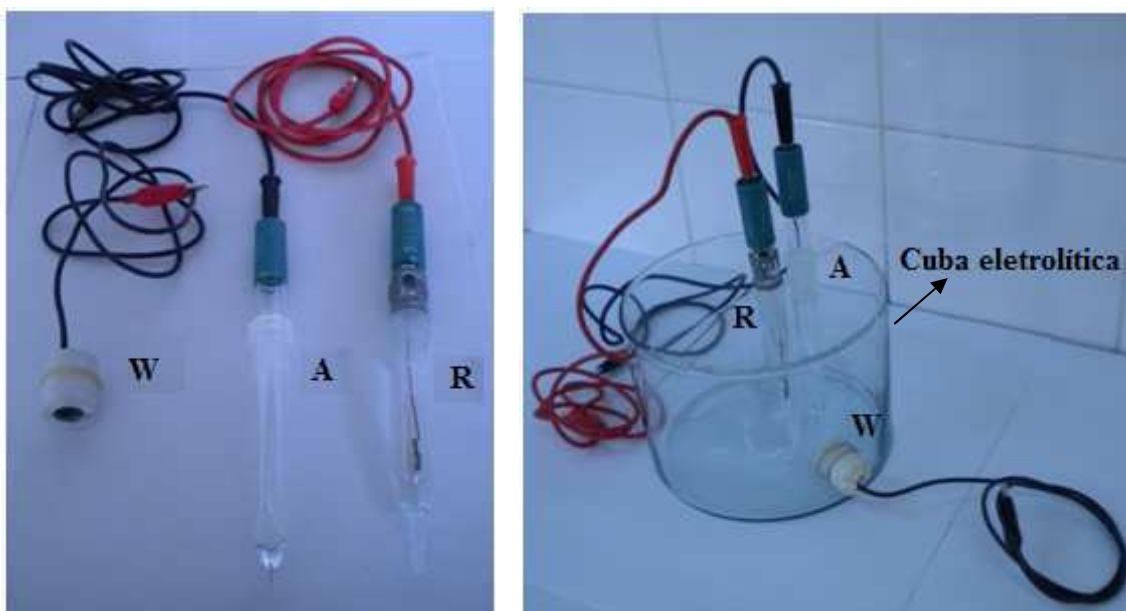
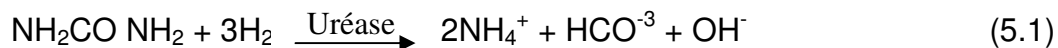


Figura 5.21– Foto do biossensor formado por: cuba eletrolítica, eletrodo de trabalho (W), eletrodo auxiliar (A) e eletrodo de referência - Ag/AgCl (R).

O mecanismo de atuação do biossensor está apresentado na Figura 5.22. A uréia será dissolvida em tampão Tris(hidroximetil) aminometano a 0,1 molar visando obter uma solução de uréia a 0,1 molar. A uréia, substrato, será difundida primeiramente no suporte enzimático, membrana de quitosana/uréase ou na membrana de quitosana/silicatos/uréase, sofrendo hidrólise e resultando em íons bicarbonato, íons amônio e íons hidroxílicos. A

reação enzimática da uréia com uréase é apresentada na Equação 5.1 (Dhawan et al., 2009).



Os íons amônio, gerados no meio reacional, difundem-se até a matriz polimérica não condutora e interagem com o ionóforo, nonactina, estabelecendo uma diferença de potencial na superfície da membrana, associada à interação entre o íon amônio com o sítio ativo do ionóforo, que é proporcional a concentração inicial de uréia.

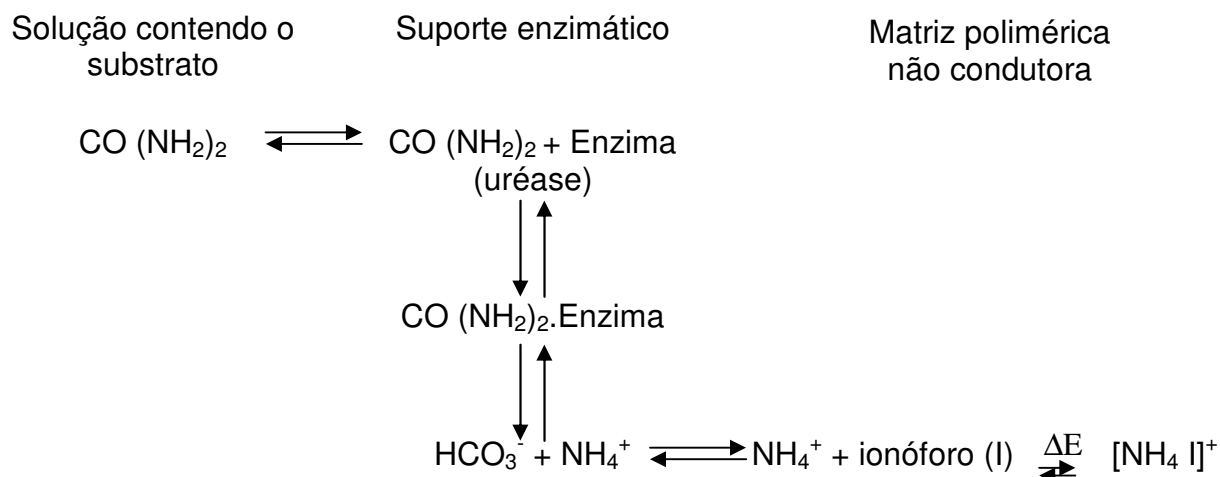


Figura 5.22 – Mecanismo de atuação do biossensor.
 Fonte: Júnior, 1995

6. CONCLUSÕES

Membranas de quitosana, quitosana/bentonita e quitosana/montmorilonita foram preparadas pelo método de intercalação por solução e de acordo com os resultados de espectroscopia no infravermelho, difratometria de raios X, microscopia eletrônica de varredura, propriedades mecânicas, termogravimetria e avaliação de ângulo de contato fica evidenciado que o tipo de silicato e a razão mássica quitosana/silicato afeta a morfologia, as propriedades mecânicas, térmicas e a hidrofiliabilidade das membranas quitosana/silicato. Bionanocompósitos quitosana/silicato com razões mássicas de 1/1, 5/1 e 10/1 apresentaram morfologias intercalada ordenada, intercalada desordenada e intercalada desordenada tendendo a esfoliada, respectivamente e com grau de hidrofiliabilidade e estabilidade térmica diminuindo nesta ordem. Com relação às propriedades mecânicas, os valores da resistência à tração e do módulo de elasticidade das membranas quitosana/silicato foram superiores aos das membranas de quitosana e o alongamento um tanto inferior. As membranas preparadas com bentonita Argel 35 purificada apresentaram comportamento semelhante ao das membranas preparadas com a montmorilonita comercial Cloisite sódica. Quanto à avaliação quantitativa indireta da adsorção da enzima uréase, em meio tamponado de fosfato - PBS, pelas membranas de quitosana e quitosana/silicato com razão mássica de 5/1, os valores de variação de absorbância indicaram que o aumento de temperatura não influenciou em uma maior adsorção enzimática e que a incorporação da bentonita purificada a quitosana se mostrou tão eficaz quanto à incorporação da montmorilonita para promover uma maior adsorção da uréase às membranas de quitosana. Isto indica que a bentonita purificada poderá ser empregada na preparação de membranas a base de quitosana para aplicação como suporte enzimático na construção de biossensores potenciométricos para determinação de uréia.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ❖ Quantificar o teor de enzima adsorvido em meio tamponado de fosfato – PBS (pH=7,2) a 41 °C e 25 °C pelas membranas de quitosana, quitosana/montmorilonita e quitosana/bentonita purificada com razão mássica quitosana/silicato de 1/1, 5/1 e 10/1.
- ❖ Realizar as medidas potenciométricas utilizando o biossensor montado e avaliar se o sinergismo dos componentes orgânico e inorgânico utilizados na preparação dos suportes favorece ao aumento da estabilidade do biossensor propiciando uma vida útil maior.
- ❖ Avaliar quanto a morfologia, propriedades mecânicas e térmicas de membranas a base de quitosana obtidas pelo método de intercalação por solução com outros tipos e teores de silicato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari, B.; Majumdar, S. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**. v. 29, p. 699–766, 2004.

Araújo, C. L. **Desenvolvimento de sensor potenciométrico baseado em eletrodos de carbono grafite para determinação de ácido cítrico em bebidas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Araújo, S. S., **Nanocompósitos pp/argila influência do tipo e do teor de silicato em camadas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

Assis, O. B. G.; Silva, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.13, p.223-228, 2003.

Awad, W. H.; Gilman, J. W.; Nyden, M.; Harris, R. H.; Sutto, T. E.; Callahan, J.; Trulove, P. C.; Delong, H. C.; Fox, D. M. Thermal degradation studies of alkyl-imidazolium salts and their application in nanocompósitos. **Thermochimica Acta**. v.409, p.3-11, 2004.

Berti, C.; Fiorini, M.; Sisti, L. Synthesis of poly(butylene terephthalate) nanocomposites using anionic clays. **European Polymer Journal**. v. 45, p. 70-78, 2009.

Bora, M.; Ganguli, J. N.; Dutta, D. K. Thermal and spectroscopic studies on the decomposition of [Ni{di(2-aminoethyl)amine}2]- and [Ni(2,2':6'',2''-terpyridine)2]-Montmorillonite intercalated composites. **Thermochimica Acta**. v.346, p.169-175, 2000.

Bullock, C. Immobilised enzymes. **Science Progress**.v.78, p.119-134, 1995.

Cáceres, E. J. B. **Construcció i Avaluació D'Analitzadors per a La Monitorització Mediambiental**. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Campbell, M. K. **Bioquímica**. 3ed. Porto Alegre: Artemed, 2000. p.158-198.

Champe,P.C.; Harvey, R. A.; Ferrier, D.R. **Bioquímica Ilustrada**. 3 ed. Porto Alegre: Artemed, 2006.

Cheng, W. P.; Chi, F. H.; Yu, R. F.; Lee, Y. C. Using chitosan as a coagulant in recovery of organic matters from the mash and lauter wastewater of brewery. **Journal of Polymers and the Environment**. v.13, p.383-388, 2005.

Chivrac, F.; Pollet, E.; Avérous, L. Progress in nano biocomposites based on polysaccharides and nanoclays. **Materials Science and Engineering R**. v.67, p.1–17, 2009.

Cho, J. W. & Paul, D. R. Nylon 6 nanocomposites by melt compounding. **Polymer**. v.42, p.1083-1094, 2001.

Coelho, A. C. V.; Souza, P. S.; Souza, H. S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas – Uma revisão. **Química Nova**. v. 30, p.1282-1294, 2007.

Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberlay, S. E. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**, Third Edition, Printed in the United States of America, Academic Press, 1990.

Dallan, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Darder, M.; Colilla, M.; Ruiz-hitzky, E. Biopolymer-Clay Nanocomposites Based on Chitosan Intercalated in Montmorillonite. **Chemical Materials**. v.15, p.3774–3780, 2003.

Darder, M.; Colilla, M.; Ruiz-Hitzky, E. Chitosan clay nanocomposites: application as Electrochemical sensors. **Applied Clay Science**. v.28, p.199–208, 2005.

Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R.M.; Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**. v. 36, p.981–1014, 2011.

Demarquete, N. R. **Estrutura e Propriedade de Polímeros**. CEFET – RS, 2001.

Dhawan, G.; Sumana, G. M; Malhotra, B. D. Recent developments in urea biosensors. **Biochemical Engineering Journal**. v. 44, p.42-52,2009.

Díaz, V. F. R. Obtenção de argilas organofílicas partindo-se de argila esmectítica e do sal quaternário de amônio ARQUAD 2HT-75. In: 43º CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA, 1999, Florianópolis-SC. **Anais...** Florianópolis: Associação Brasileira de Cerâmica – ABC, Brasil, 1999. p.43201-43213.

Díaz, V. F. R.; Souza, P. S.; Souza, H. S. A importância das argilas industriais brasileiras. **Química Industrial**. v.42, p.33-37, 1992.

Disponível em: <http://www.scprod.com/product_bulletins>. Acesso:15 Abr. 2008.

E. S. Costa; H. S. Mansur. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**. v.31, p.1460–1466, 2008.

Felt, O.; Carrel, A.; Baehni, P.; Buri, P.; Gurny, R. Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**. v.16, p.261–270, 2000.

Focher, B.; Beltrame, P. L.; Naggi, A.; Torri, G. Alkaline *N*-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. **Carbohydrate Polymer**.v.12, p.405, 1990.

G. Lagaly. Colloid Clay Science. In: **Developments in Clay Science: Handbook of Clay Science**. Institut für Anorganische Chemie, Universität Kiel, D-24118 Kiel. Alemanha. Elsevier Ltd, 2006, P.141- 246.

Ganguli, S.; Dean, D.; Jordan, K.; Price, G.; Vaia, R. Mechanical properties of intercalated cyanate ester-layered silicate nanocompósitos. **Polymer**. v.44, p.1315-1319, 2003.

Han, Y.; Lee, S.; Choi, K. H. Preparation and characterization of chitosan–clay nanocompósitos with antimicrobial activity. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. v.71, p.464–467, 2010.

Han, Y.; Lee, S.; Choi, K. Preparation and characterization of chitosan–clay nanocompósitos with antimicrobial activity. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. v.7, p.464–467, 2010.

Hirano, S. Production and application of chitin and chitosan in Japan, in: G.Skja-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford (Eds.), Chitin and Chitosan, Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications, Elsevier, Amsterdam, 1988, p. 37.

Hyun, Y. H.; Lim, S. T.; Choi, H. J.; Jhon, M. S. Rheology of Poly(ethylene oxide)/Organoclay Nanocomposites. **Macromolecules**. v.34, p.8084-8093, 2001.

Júnior, L. R. **Construção e avaliação de biossensores potenciométricos para determinação de uréia com eletrodo íon-seletivo a amônio, usando Canavalia Brasiliensis como fonte enzimática**. 1995. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Campinas, Campinas.

Júnior, L. R.; Neto, G. O.; Lima, J. L. F. C.; Montenegro, M. C. B. S. M. **Química Nova**. v.19, p.549-553, 1996.

Kaushik, A.; Solanki, P. R.; Ansari, A.; Sumana, G.; Ahmad, S.; malhotra, B. D. Iron oxide-chitosan nanobiocomposite for urea sensor. **Sensor and Actuators B: Chemical**. v.138, p.572-580, 2009.

Kornmann, X. **Synthesis and characterization of thermoset-clay nanocomposites. Introduction**. Publicação interna, Lulea Tekniska Universite, 1999.

Krajewska, B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**. v.35, p.126-134, 2004.

Laranjeira, M. C. M.; Fávere, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**. v.32, 2009.

Lavorgna, M.; Piscitelli, F.; Mangiacapra, P.; Buonocore, G. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**. v.82, p.291–298, 2010.

Leite, I. F.; Soares, A. P. S.; Carvalho, L.H.; Raposo, C. M. O.; Malta, O. M. L.; Silva, S. M. S. Characterization of pristine and purified organobentonites. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.97, 2009.

Li, J.; Revol, J. F.; Marchessault, R. H. **Journal Application Polymer Science**.v.65, p.373, 1997.

Li, J.; Zhou, C.; Gang, W. Study on non isothermal crystallization of maleic anhydride grafted polypropylene/montmorillonite nanocomposite. **Polymer Testing**. v.22, p.217-223, 2003.

Liu, K.; Liu, T.; Chen, S.; Dean-Mo, L. Drug release behavior of chitosan–montmorillonite nanocomposite hydrogels following electrostimulation. **Acta Biomaterialia**. v.4, p.1038–1045, 2008.

Madejová, J. FTIR techniques in clay mineral studies, **Vibrational Spectroscopy**. v.31, p.1-10, 2003.

Madejová, J.; Janek, M.; Komadel, P.; Herbert, H. J.; Moog, H. C. FTIR analyses of water in MX-80 bentonite compacted from high salinary salt solution

Magalhães, J. M. C. S.; Machado A. S. C. Urea potentiometric biosensor based on uréase immobilized on chitosan membranes. **Talanta**. v.47, p.183-191, 1998.

Malhotra, B. D.; Chaubey, A.; Singh, S. Metal oxide–chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor. **Analytica Chimica Acta**. p.1-16, 2006.

Marques, P. R. B. O.; Hideko, Y. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**. v.31, p.1791-1799, 2008.

Mendioroz, S.; Pajares, J. A.; Benito, J.; Pesquera, C.; Gonzáles, F.; Blanco, C. Texture evolution of montmorillonite under progressive acid treatment: change from H3 para H2 type of hysteresis. **Langmuir**. v.35, p.676-681, 1987.

Menezes, E. A. **Determinação *in situ* de fósforo, nitrato e amônio em solo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

Messersmith, P.B. & Giannelis, E.P. Synthesis and barrier properties of poly (ϵ -caprolactone) - layered silicate nanocompósitos. **Journal Applied of Polymer. Science Part A**. v.33, p.1047-1057, 1995.

Morgan, A. B.; Harris, J. D. Effects of organoclay soxhlet extraction on mechanical properties, flammability properties and organoclay dispersion of polypropylene nanocompósitos. **Polymer**. v.44, p. 2313-2320, 2003.

Mousty, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes—new trends. **Applied Clay Science**. v.27, p.159-77, 2004.

No, H. K.; Lee, K. S.; Meyers, S. P. Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products. **Journal Food Science**. v.65, p.1134–1137, 2000.

Noble J. E. & Bailey M. J. A. Quantitation of Protein. In: **Methods in Enzymology**. 2009. p.74-91. ISSN 0076-6879.

Oliveira, K. C. S. de **Desenvolvimento de um biossensor potenciométrico, à base de soja, para a determinação de uréia**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Ortiz, L. P. C.; Pabello, V. M. L.; Pietrini, R. V. Estado da arte y perspectivas del uso de biossensores ambientales en México. **Revista Internacional de Contaminação Ambiental**. v.27, p.35-45, 2007

Paluszkiewicz, C.; Stodolak, E.; Hasik, M.; Blazewicz, M. FT-IR study of montmorillonite–chitosan nanocomposite materials. **Spectrochimica Acta Part A**. v.79, p.784– 788, 2011.

Paul, D. R.; Robeson, L. M. **Polymer nanotechnology: Nanocomposites Polymer**. v. 49, p.3187–3204, 2008.

Peng, X.; Luan, Z.; Chen, F.; Tian, B.; Jia, Z., Adsorption of humic acid onto pillared bentonite. **Desalination**. v.174, p.135-143, 2005.

Phan, T. D.; Debeaufort, F.; Voilley, A.; Luu, D. Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava and arabinoxylan blends. **Journal of Food Engineering**. v.90, p.548–558, 2009.

Pongjanyakul, T.; Pripem, A.; Puttipipatkachorn, S. Investigation of novelalginate-magnesium aluminum silicate microcomposite films for modified-releasetablets. **Journal Control. Release**. v.107, p.343–356, 2005.

Pongjanyakul, T.; Suksri, H. Alginate –magnesium aluminum silicate films for buccal delivery of nicotine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.74, p.103–113, 2009.

Qin, H.; Zhao, C.; Zhang, S.; Chen, G.; Yang, M. Photo-oxidative degradation of polyethylene/montmorillonite nanocompósito. **Polymer Degradation and Stability**. v.81, p.497-500, 2003.

Ray, S. S. & Okamoto, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**. v.28, p.1539-1641, 2003.

Rhim, J. W.; Hong, S. I.; Park, H. M.; Ng, P. K. W. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, p.5814–5822, 2006.

Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**. v.31, p.603-632, 2006.

Salman, M.; El-eswed, B.; Khalili, F. Adsorption of humic on bentonite. **Applied Clay Science**. v.31, p.51-56, 2007.

Sánchez-Solís, A.; Romero-Ibarra, I.; Estrada, M. R.; Celderas, F.; Manero, O. Mechanical and rheological studies on polyethylene terephthalate-montmorillonite nanocompósitos. **Polymer Engineering and Science**. v.44, p.1094-1102, 2004.

Shi, Q.; Li, Q.; Shan, D.; Fan, Q.; Xue, H. Biopolymer-clay nanoparticles composite system (Chitosan-laponite) for electrochemical sensing based on glucose oxidase. **Materials Science and Engineering**. v.28, p.1372–1375, 2008.

Silva, S. M. L. Braga, C. R. C., Fook, M.V. L., Raposo, C. M. O., Carvalho, L. H. and Canedo, E. L. Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites. In: Theophanides, T. (Ed). **Infrared Spectroscopy/Book 1**. National Technical University of Athens, Chemical Engineering Department, Radiation Chemistry & Biospectroscopy, Greece, ISBN 979-953-307-362-9, 2012.

Souza Santos, P. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. Vol. 1, 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1989.

Souza Santos, P. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. Vol. 2, 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1992

Strawhecker, K. E. & Manias, E. Structure and properties of poly(vinyl alcohol)/Na⁺ montmorillonite nanocompósitos. **Chemistry of Material**. v.12, p. 2943-2949, 2000.

Tan, W.; Zhang, Y.; Szeto, Y.; Liao, L. A novel method to prepare chitosan/montmorillonite nanocompósitos in the presence of hydroxyl-aluminum oligomeric cations. **Composites Science and Technology**. 2007.

Tischer, W.; Wedekind, F. Immobilized enzymes: methods and applications. **TopiQ in Current Chemistry**.v.200, p.95-126, 1999.

Utracki, L. A. **Clay-Containing Polymeric Nanocomposites**. 1st Edition. Rapra Technology Limited. United Kingdom, 2004. p.73-96.

Wang, C. S.; Su, P. G. Adsorption characteristics of Congo Red onto the chitosan/montmorillonite nanocompósito. **Sensor and Actuators B: Chemical**. v.124, p.303-308, 2007.

Wang, S. F.; Shen, L.; Tong, Y. J.; Chen, L.; Phang, I. Y.; Lim, P. Q. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**. v.90, p.123-131, 2005.

Wang, X.; Du, Y.; Yang, J.; Wang, X.; Shi, X.; Hu Y. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan/layered silicate nanocompósitos. **Polymer**. v.47, p.6738-6744, 2006.

Wu, T. M.; Wu, C. Y. Biodegradable poly (lactic acid)/chitosan-modified montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer Degradation and Stability**. v.91, p.2198–2204, 2006.

Xi, Y.; Ding, Z.; He, H.; Frost, R. L. Infrared spectroscopy of organoclays synthesized with the surfactant octadecyl trimethyl ammonium bromide. **Spectrochimica Acta Part A**. v.61, p.515-525, 2005.

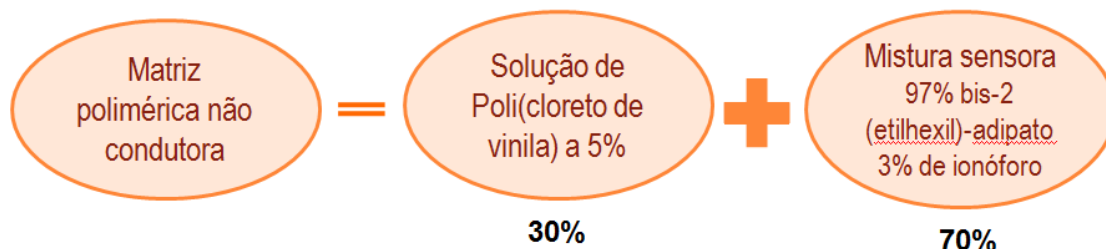
Xu, S. W.; Zheng, J. P.; Tong, L.; Yao, K. D. Interaction of Functional Groups of Gelatin and Montmorillonite in Nanocomposite. **Journal of Applied Polymer Science**. v.101, p.1556-1561, 2006.

Xu, X.; Ding, Y.; Qian, Z.; Wang, F.; Wen, B.; Zhou, H.; Zhang, S.; Yang, M. Degradation of poly(ethylene terephthalate)/clay nanocomposites during melt extrusion: Effect of clay catalysis and chain extension. **Polymer Degradation and Stability**. v.94, p.113-123, 2009.

Anexos

Anexo I

Preparação da matriz polimérica não condutora



50mgdo ionóforo nonactina foi o valor de partida para a determinação das massas dos outros componentes. No entanto, como o ionóforo utilizado neste estudo apresenta funcionalidade de 95%, então foi utilizada experimentalmente as 50 mg, mas levou-se em consideração apenas as 47,5 mg de nonactina, pois 2,5 mg era impureza.

A mistura sensora é constituída por 97% de Bis-2 (etilhexil)-adipato e 3% de ionóforo.

$$\begin{array}{l} 47,5 \text{ mg} \quad 3\% \Rightarrow X = 1.536 \text{ mg de Bis-2 (etilhexil)-adipato} \\ X \text{ mg} \quad 97\% \end{array}$$

No entanto, como a pureza analítica do reagente Bis-2 (etilhexil)-adipato é de 99%. A massa utilizada experimentalmente de Bis-2 (etilhexil)-adipato foi de 1551 mg que corresponde a 1536 mg de Bis-2 (etilhexil)-adipato e 15,36 mg de impureza. Porém, como o bis-2(etilhexil)-adipato é líquido, determinou-se o volume correspondente a partir da equação da densidade para uma massa de 1,55 g.

$$D=m/v \Rightarrow 0,926 \text{ g/mL} = 1,551 \text{ g} / V \Rightarrow V = 1,67 \text{ mL}$$

Portanto, para estabelecer a relação 97% de Bis-2 (etilhexil)-adipato e 3% de ionóforo, a mistura sensora apresentou um total de 1.551 mg de bis-2(etilhexil)-adipato + 50 mg de nonactina.

Como a mistura sensora representa 70% e o poli (cloreto de vinila) 30% da composição final da matriz polimérica não condutora, então:

$$\begin{array}{l} 1.601 \text{ mg} \\ \text{PVC mg} \end{array} \quad \begin{array}{l} 70\% \\ 30\% \end{array} \Rightarrow \text{PVC} = 686,14 \text{ mg de PVC ou } 0,68614 \text{ g}$$

Como a solução de PVC é a uma concentração de 5%, foi determinado pela equação de concentração comum o volume do solvente THF a ser utilizado.

$$C = m/v \Rightarrow 0,05 = 0,68614 \text{ g}/v \Rightarrow v = 13,723 \text{ mL}$$

Anexo II

Purificação da bentonita sódica Argel 35

A purificação da bentonita sódica Argel 35 (AN), visando remover a matéria orgânica e facilitar a troca catiônica da argila (AN) foi realizada seguindo a metodologia utilizada por Camargo et al., (1996); Araújo, (2008) e Leite et al., (2009).

Dispersões da bentonita natural (AN), em solução tampão acética, pH aproximadamente 5, foram mantidas sob agitação constante. Em seguida, peróxido de hidrogênio 30 % foi adicionado às dispersões que permaneceram em repouso por 24 h a temperatura ambiente. Decorrido esse período, as dispersões foram aquecidas a aproximadamente 50 °C e mantidas nesta temperatura por aproximadamente 72 h. Terminada a reação as amostras foram lavadas com água destilada, centrifugadas a 2400 rpm, secas em estufa a 60 °C por aproximadamente 48 h e passadas em peneira ABNT de nº 325. A bentonita sódica Argel 35 purificada foi codificada como AP.

A eficiência do procedimento de purificação, na remoção da matéria orgânica da bentonita sódica Argel 35 (AN), foi avaliada por espectroscopia na região do infravermelho (IV) e difratometria de raios x (DRX). Os espectros de IV da bentonita sódica Argel 35 (AN) e da bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) estão mostrados na Figura 1.

O espectro da bentonita sódica Argel 35 (AN) e da bentonita sódica Argel 35 purificada (AP), Figura 1, mostram bandas em: 3830 cm^{-1} e 3619 cm^{-1} , atribuída às vibrações de estiramento do grupo estrutural hidroxílico Al-OH próprias dos silicatos; em 3631 cm^{-1} e 3395 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento axial da água adsorvida na superfície dos silicatos; em 1723 cm^{-1} e 1632 cm^{-1} associadas às vibrações angulares de água adsorvida. E em 1071 e 979 referentes às vibrações de estiramento axial do grupo Si-O-Si (Sammonet al, 2000; Hongping et al., 2004; Xue et al., 2007). Observa-se também no espectro da bentonita sódica Argel 35 (AN) a presença de bandas de absorção em torno de 3108 cm^{-1} e de 3027 cm^{-1} , atribuídas à matéria orgânica (Colthup&

Daly, 1990). A pouca intensidade destas bandas sugere que a quantidade de matéria orgânica presente na bentonita sódica Argel 35 (AN) é pequena. Quanto ao espectro da bentonita sódica Argel 35 purificada (AP) observa-se a ausência das bandas atribuídas à matéria orgânica, indicando que o procedimento de purificação foi capaz de remover efetivamente os contaminantes orgânicos da bentonita sódica Argel 35 (AN).

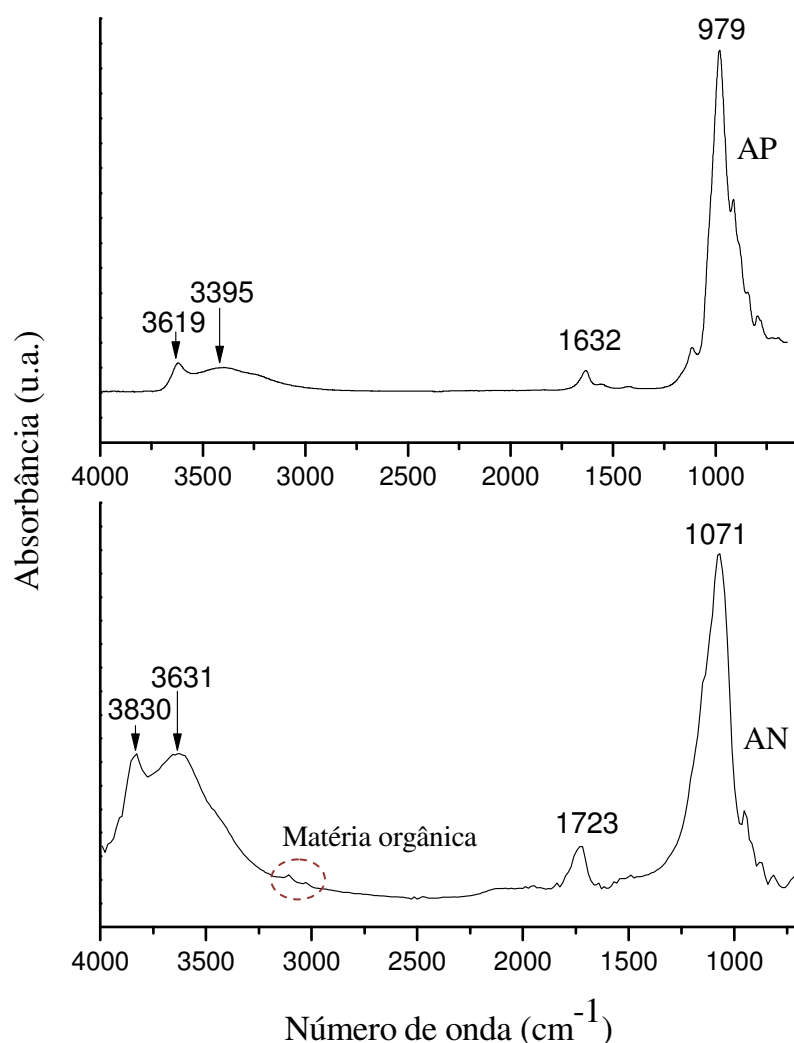


Figura 1 – Espectro na região do infravermelho da bentonita sódica Argel 35 (AN) e da bentonita sódica Argel 35 purificada (AP).

Os difratogramas da bentonita sódica Argel 35 (AN) e bentonita sódica Argel 35 purificada (AP), Figura 2, evidenciam que a montmorilonita (MMT) é o principal constituinte e que a caulinita (CLT) e o quartzo (QTZ) estão presentes na bentonita (AN) como minerais acessórios. Entretanto, o pico de caulinita é ausente na bentonita (AP), indicando que a purificação da bentonita resultou não só na remoção de matéria orgânica, mas também na remoção de caulinita. Os difratogramas evidenciam também que a estrutura da bentonita foi discretamente modificada pelo procedimento de purificação adotado, corroborando os dados de infravermelho e com estudos realizados por Yermiyahu et al., (2005); Araújo, (2008) e Leite et al., (2009). A distância interplanar basal foi praticamente à mesma para os silicatos AN e AP, 1,26 nm ($2\theta = 6,99^\circ$) e 1,46 nm ($2\theta = 6,05^\circ$), respectivamente.

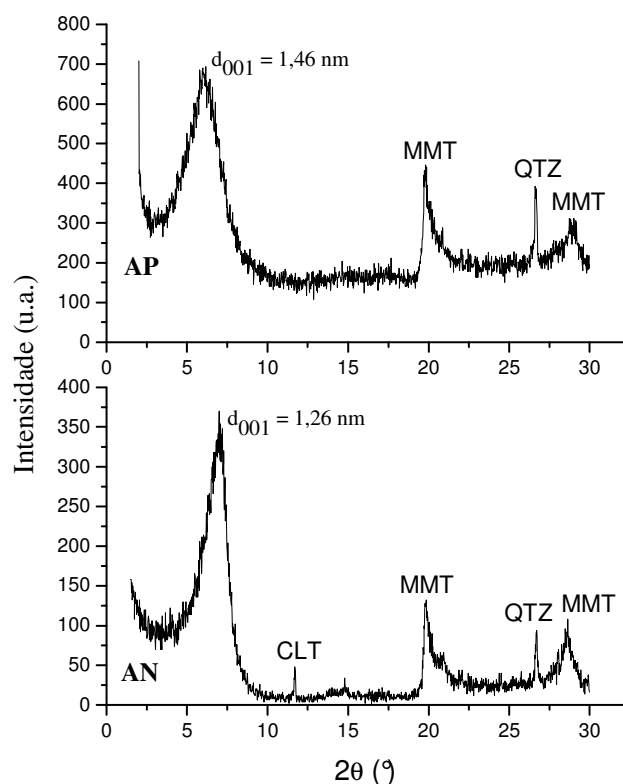


Figura 2 – Difratogramas da bentonita sódica Argel 35 (AN) e da bentonita sódica Argel 35 purificada (AP).

A identificação dos constituintes dos silicatos AN e AP mostrados nos difratogramas da Figura 2, de acordo com Souza Santos (1989), estão reportados na Tabela 1.

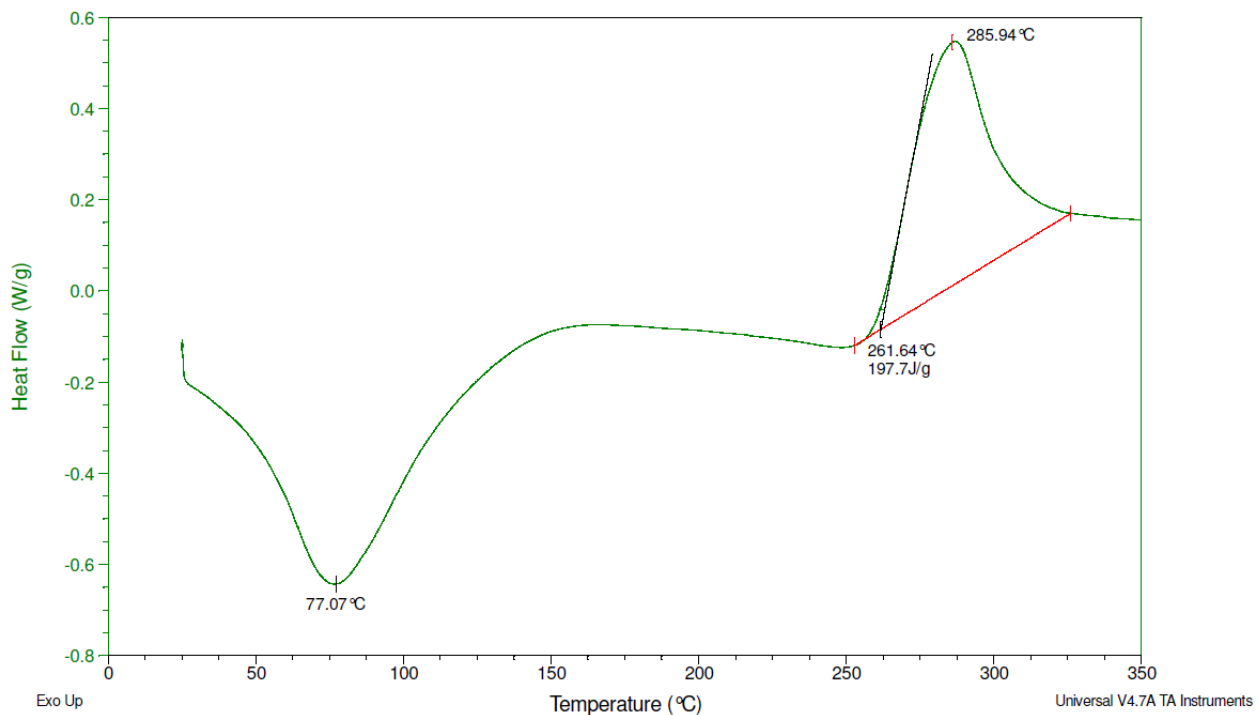
Tabela 1 – Valores de 2θ com seus respectivos minerais presentes nos silicatos (AN) e (AP).

AN		AP	
2θ	Mineral	2θ	Mineral
6,99	* MMT	6,05	MMT
11,75	*CLT	---	---
19,86	MMT	19,84	MMT
26,60	*QTZ	26,72	QTZ
28,59	MMT	28,97	MMT

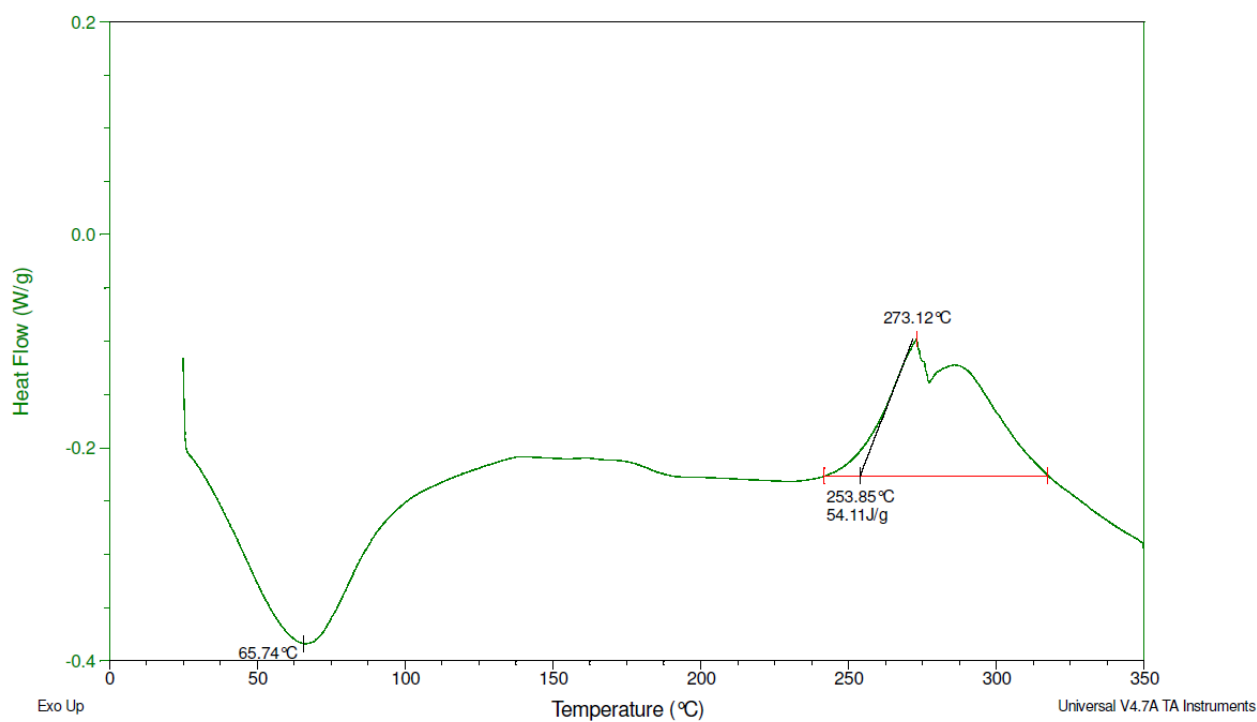
* MMT = montmorilonita, CLT = caulinita e QTZ = quartzo

Anexo III

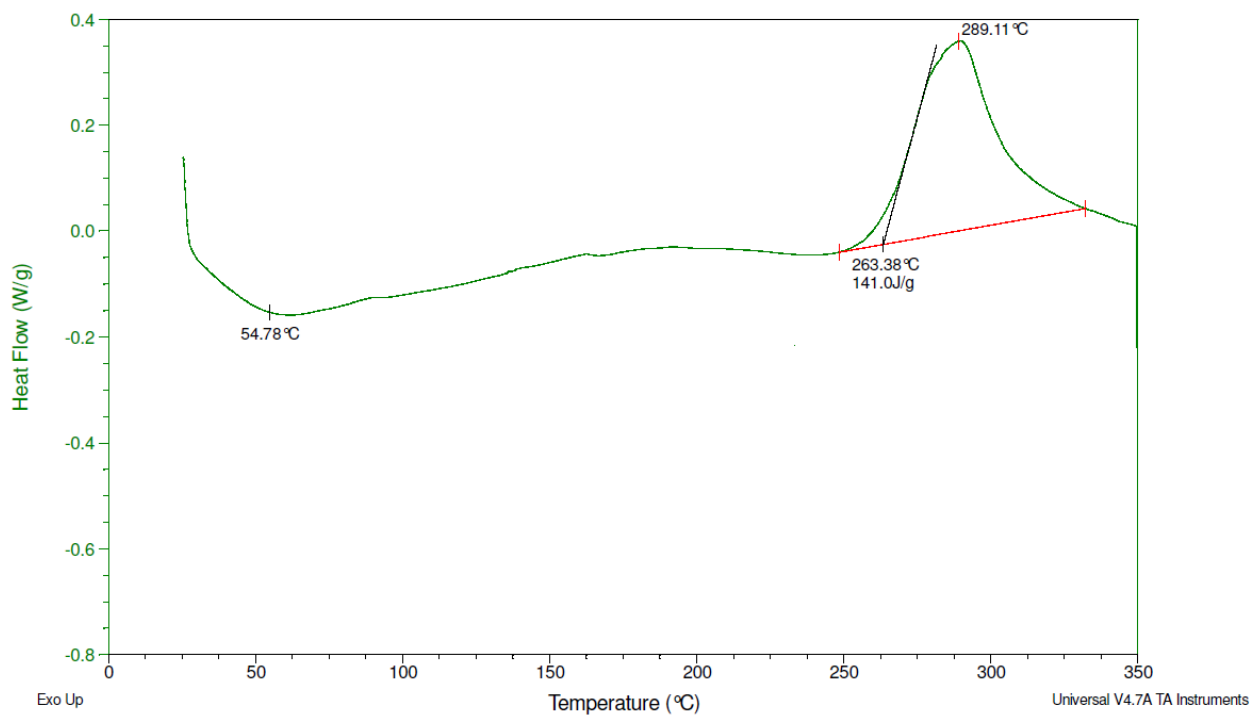
Membrana Q



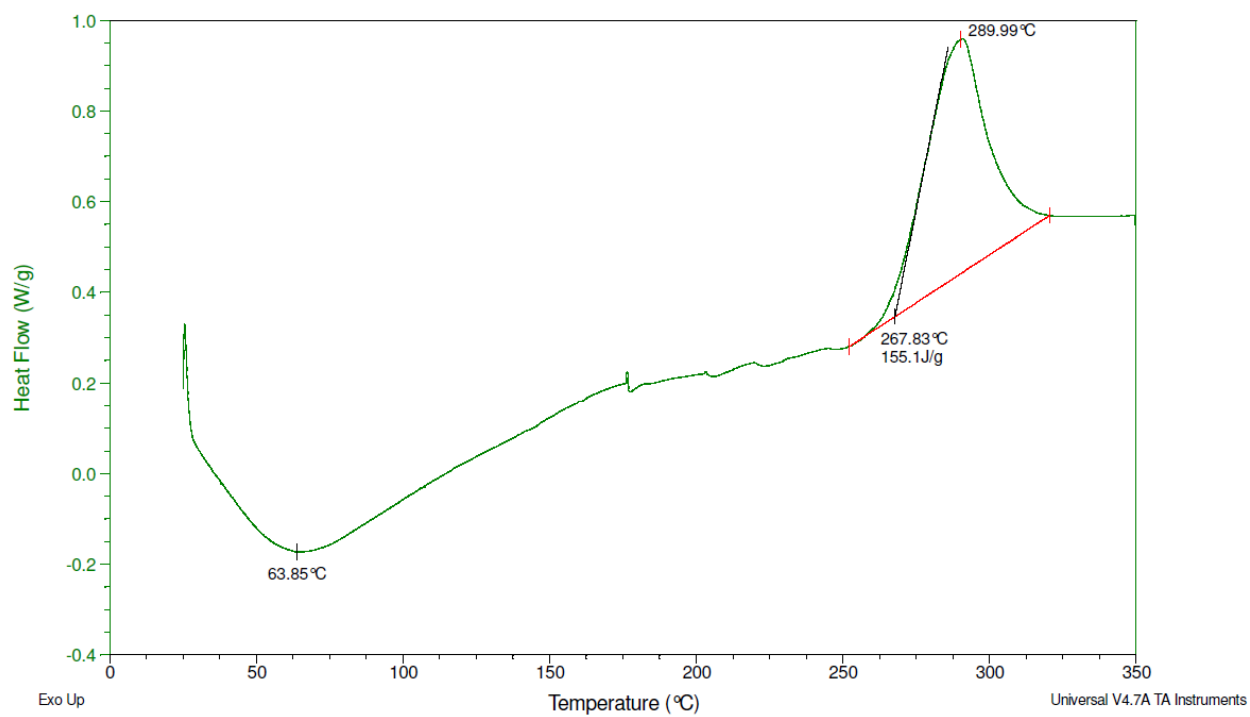
Membrana Q₁/CL₁



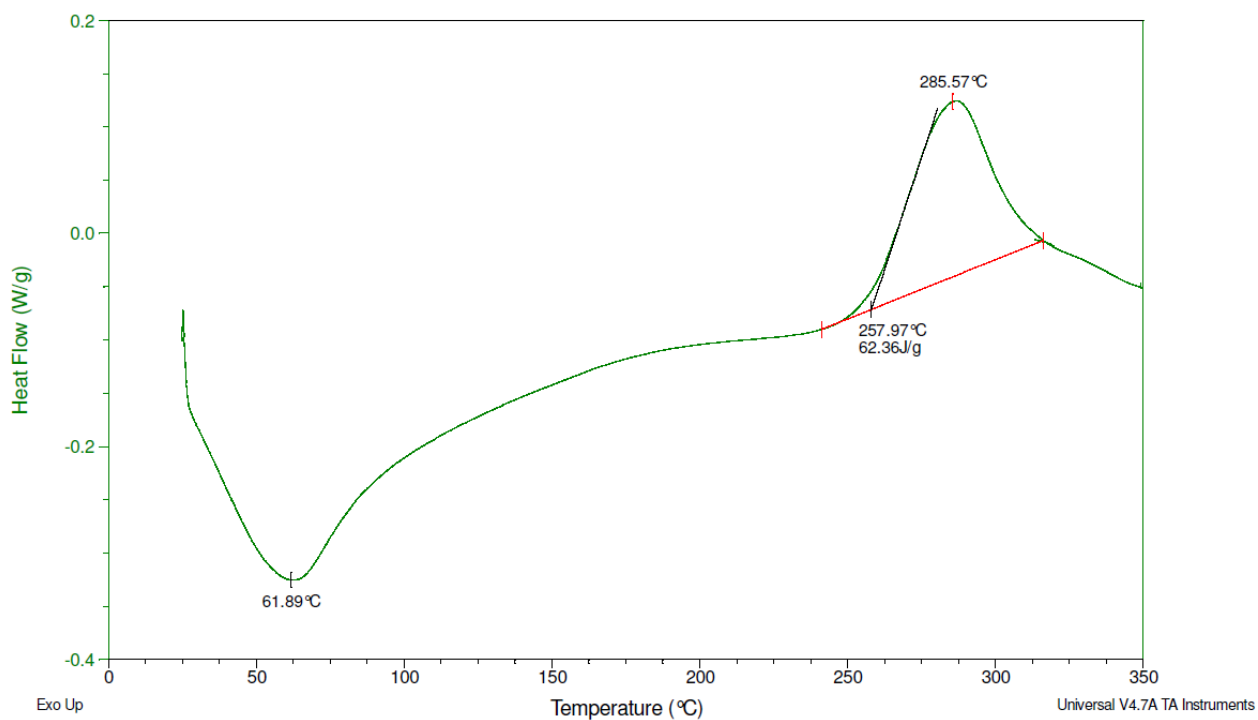
Membrana Q₅/CL₁



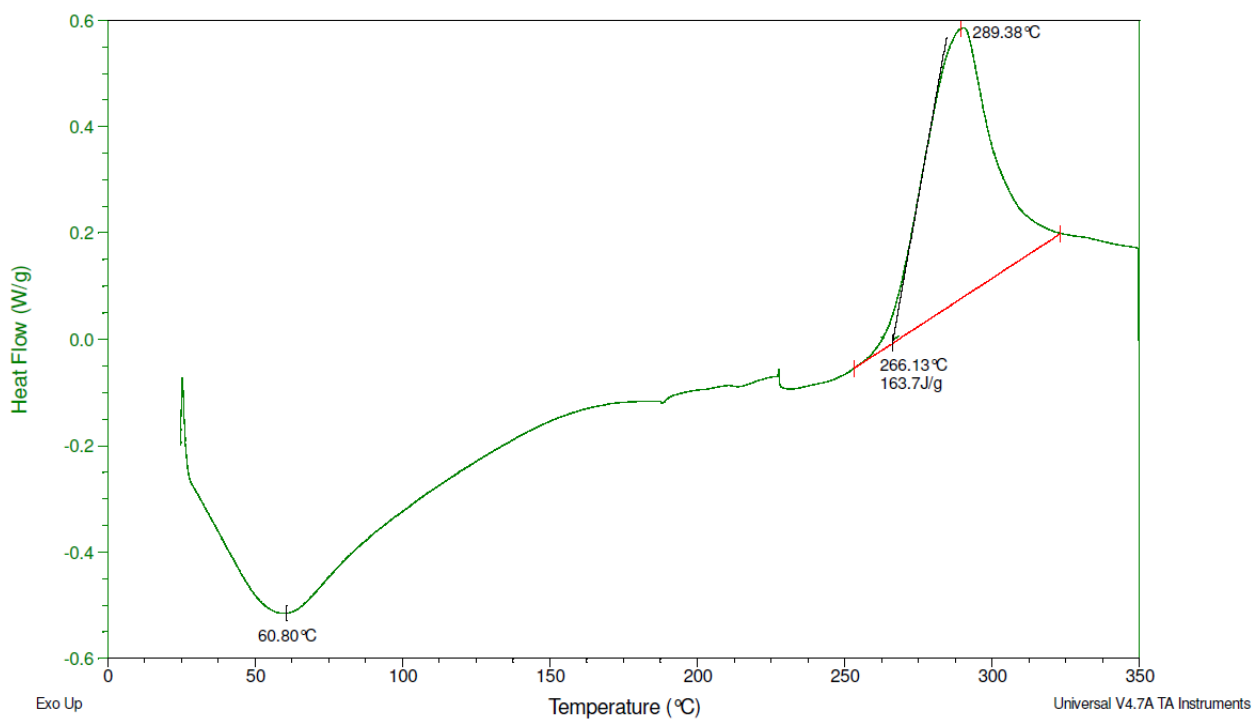
Membrana Q₁₀/CL₁



Membrana Q₁/AP₁



Membrana Q₅/AP₁



Membrana Q₁₀/AP₁

