

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e Materiais

Dissertação de Mestrado

**“Síntese e Caracterização de Nanocompósitos
PVA/Nanotubos de Carbono para
Potencial Aplicação Biomédica”**

Autora: Joyce Cristina da Cruz Santos

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

FEVEREIRO/2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e Materiais

Joyce Cristina da Cruz Santos

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS
PVA/NANOTUBOS DE CARBONO PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO BIOMÉDICA”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2011

AGRADECIMENTOS

À Deus pela presença constante, por me conceder toda força e capacidade para realizar este trabalho.

À minha família pelo apoio incondicional diante de minhas escolhas, por me oferecer um lar onde eu poderia me recolher nos momentos difíceis. Em especial, à minha mãe que com o seu exemplo diário, sempre torna tudo tão mais fácil. E ao meu pai por sempre incetivar e tornar possível os meus estudos.

Ao Carlos Henrique pelo apoio, incentivo, amor e dedicação.

Aos meus amigos Larissa e Tadeu pelas palavras amigas, pelas leituras e conversas.

Ao meu orientador, Herman Sander Mansur, por tornar possível a condução deste trabalho.

Aos Colegas de Laboratório: Marco, Hermes, Vanessa, André Braga, André Zocrato, Mário, Fábio pelo convívio e colaboração. Em especial, à Alexandra Mansur pelos ensinamentos durante a condução deste trabalho.

Ao Professor Rodrigo Lambert Oréfice por disponibilizar o equipamento para realização dos ensaios mecânicos.

À Maria Sylvia Dantas pelos ensaios de Espectroscopia Raman.

À Andréa Bicalho pela realização dos ensaios DRX e à Patrícia Azevedo pela realização dos ensaios MEV.

À Professora Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli pela execução dos ensaios biológicos.

Ao Departamento de Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, aos professores e em especial aos funcionários Maria Aparecida Pacheco e Nelson Azevedo.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Lista de figuras	viii
	Lista de tabelas	xv
	Lista de notações	xvi
	Resumo	xviii
	Abstract	xix
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivos específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	Nanotubos de carbono	5
3.1.1	Estrutura, propriedades e aplicações	6
3.1.2	Síntese	9
3.1.3	Funcionalização	10
3.1.4	Caracterização de Nanotubos de Carbono	15
3.1.5	Nanotubos de Carbono e Biomateriais	17
3.2	Poli(álcool vinílico) – PVA	20
3.3	Nanocompósitos	21
3.3.1	Aspectos Gerais	21
3.3.2	Nanocompósitos polímero/CNT	23
3.3.3	Aplicações como Biomateriais	26
3.4	Avaliação da biocompatibilidade de materiais para aplicações biomédicas	30
3.4.1	Redução do MTT	30
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
4.1	Etapas de desenvolvimento do trabalho	32
4.2	Matérias-primas	33

4.2.1	Caracterização das matérias-primas	33
4.3	Funcionalização dos nanotubos de carbono	34
4.3.1	Rota de Funcionalização HNO ₃ (F1)	34
4.3.2	Rota de Funcionalização HNO ₃ /H ₂ SO ₄ (F2)	34
4.3.3	Caracterização	34
4.3.3.1	Dispersão dos nanotubos de carbono em água	34
4.3.3.2	Espectroscopia UV-Vis	35
4.3.3.3	Espectroscopia Raman	35
4.3.3.4	Espectroscopia de Infravermelho	35
4.3.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	36
4.3.3.6	Difração de Raios X	36
4.4	Síntese dos nanocompósitos PVA/MWNT	36
4.4.1	Síntese de nanocompósitos - Rota 1	36
4.4.2	Síntese de nanocompósitos - Rota 2	39
4.4.3	Caracterização dos nanocompósitos	40
4.4.3.1	Avaliação qualitativa	40
4.4.3.2	Ensaio de Intumescimento	41
4.4.3.3	Ensaio de Tração	42
4.4.3.4	Viabilidade de células VERO <i>in vitro</i> por MTT dos nanocompósitos	43
4.5	Bioconjugação dos Nanotubos de Carbono com a enzima Glicose Oxidase	44
4.5.1	Síntese dos MWNT-CONHGOx	44
4.5.2	Análise da atividade da enzima GOx	45
4.5.3	Síntese dos nanocompósitos PVA/MWNT-CONHGOx	47
4.5.4	Análise Qualitativa do Sistema PVA/MWNT-CONHGOx quanto à Potencial Inibição de Crescimento Bacteriano	47
4.5.5	Caracterização	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Caracterização das matérias-primas	49

5.1.1	PVA e MWNT	49
5.1.1.1	Espectroscopia de Infravermelho	49
5.1.1.2	Espectroscopia Raman	51
5.1.1.3	Difração de Raios X	53
5.1.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura	55
5.1.1.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão	56
5.2	Caracterização dos Nanotubos Funcionalizados	57
5.2.1	Dispersão dos nanotubos de carbono em água	57
5.2.2	Espectroscopia UV-Vis	59
5.2.3	Espectroscopia Raman	60
5.2.4	Espectroscopia de Infravermelho	64
5.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	66
5.2.6	Difração de Raios X	67
5.3	Caracterização dos filmes nanocompósitos	68
5.3.1	Caracterização nanocompósitos sintetizados pela Rota 1	68
5.3.1.1	Avaliação qualitativa	68
5.3.1.2	Ensaio de Intumescimento	69
5.3.1.3	Ensaio de Tração	73
5.3.1.4	Viabilidade de células VERO <i>in vitro</i> por MTT dos nanocompósitos	82
5.3.2	Caracterização nanocompósitos sintetizados pela Rota 2	84
5.3.2.1	Avaliação qualitativa	84
5.3.2.2	Ensaio de Intumescimento	85
5.3.2.3	Ensaio de Tração	86
5.4	Bioconjugação dos nanotubos de carbono com a enzima Glicose Oxidase	93
5.4.1	Síntese e Caracterização dos MWNT-CONHGOx e dos nanocompósitos PVA/MWNT-CONHGOx	93
5.4.2	Análise da atividade da enzima GOx	103
5.4.3	Análise Qualitativa do Sistema PVA/MWNT-CONHGOx quanto à	116

	Potencial Inibição de Crescimento Bacteriano	
6	CONCLUSÕES	119
7	TRABALHOS FUTUROS	120
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
	BIBLIOGRAFIA	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	Representação de um nanotubo com parede simples (a) e de um nanotubo com paredes múltiplas (b)	6
FIGURA 3.2	Representação esquemática das diferentes simetrias de SWNT	7
FIGURA 3.3	Funcionalização química dos MWNT com o grupo carboxílico	12
FIGURA 3.4	Modelos interações de proteínas com nanotubos de carbono	13
FIGURA 3.5	Ilustração esquemática das etapas de formação de ligação amida entre os CNTs e moléculas biológicas	15
FIGURA 3.6	Espectro Raman típico para uma amostra de SWNT. Em (a) estão mostradas as bandas relacionadas aos modos de respiração radial e em (b) as bandas G e D	16
FIGURA 3.7	Síntese do PVA através da hidrólise do poli(acetato de vinila)	20
FIGURA 3.8	Principais métodos de síntese de nanocompósitos poliméricos utilizando CNTs (a) mistura em solução e (b) polimerização <i>in situ</i>	25
FIGURA 3.9	Redução do sal de MTT a formazan pelo complexo enzimático desidrogenase	31
FIGURA 4.1	Fluxograma representando as etapas de desenvolvimento do trabalho	32
FIGURA 4.2	Fluxograma representando a rota 1 de síntese dos nanocompósitos	37
FIGURA 4.3	Fluxograma representando a rota 2 de síntese dos nanocompósitos	39
FIGURA 4.4	Amostra de nanocompósito sob ensaio de tração	42
FIGURA 4.5	Fluxograma representando a síntese dos MWNT-CONHGO _x	45
FIGURA 5.1	Espectro FTIR obtido para o filme de PVA	50
FIGURA 5.2	Espectro FTIR obtido para MWNT	51
FIGURA 5.3	Espectro Raman para o PVA	52
FIGURA 5.4	Espectro Raman para os MWNT	53
FIGURA 5.5	Difratograma obtido para o filme de PVA	54

FIGURA 5.6	Difratograma obtido para o MWNT	54
FIGURA 5.7	Imagens do filme PVA obtidas por MEV sob diversas ampliações	55
FIGURA 5.8	Imagem obtida por MEV para MWNT	56
FIGURA 5.9	Imagem obtida por TEM para a amostra de nanotubos de carbono com paredes múltiplas	56
FIGURA 5.10	Dispersões aquosas dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas não funcionalizados (a), (d), (g), funcionalizados por F1, HNO ₃ (b), (e), (h) e funcionalizados por F2 HNO ₃ / H ₂ SO ₄ (c), (f), (i), logo após a retirada dos frascos do ultra-som; após 0,5h e após 168h (sete dias) da retirada dos frascos.	58
FIGURA 5.11	Espectros UV-Vis obtidos para os nanotubos sem modificação química (a), para os nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados por F2 HNO ₃ /H ₂ SO ₄ (b) e nanotubos funcionalizados por F1 HNO ₃ (c)	60
FIGURA 5.12	Espectro Raman para os nanotubos de carbono com paredes múltiplas funcionalizados por F1	61
FIGURA 5.13	Espectro Raman para os nanotubos de carbono com paredes múltiplas funcionalizados por F2	62
FIGURA 5.14	Espectros Raman para MWNT (a) e MWNT-COOH funcionalizados por F1 (b) e F2 (c)	63
FIGURA 5.15	Espectros FTIR dos MWNT (a), F2 funcionalizados por HNO ₃ / H ₂ SO ₄ (b) e MWNT-COOH funcionalizados por F1 (c).	65
FIGURA 5.16	Imagens obtidas por MEV para MWNT (a), MWNT-COOH funcionalizados por F1 (b) e MWNT-COOH funcionalizados por F2 (c).	66
FIGURA 5.17	Difratogramas obtidos para as amostras de MWNT-COOH F1 (a) e MWNT (b).	67
FIGURA 5.18	Fotografias mostrando as aparências dos filmes de nanocompósitos 5%PMWNT/R1, 5%PMWNT-F/R1 - com menor	69

- concentração de PVA (a) e 10%PMWNT/R1, 10%PMWNT-F/R1, 28%PMWNT/R1, 28%PMWNT-F1/R1 e 28%PMWNT-F2/R1 - maior concentração de PVA (b)
- FIGURA 5.19** Curvas representando o grau de intumescimento em relação ao tempo para os nanocompósitos 28%PMWNT/R1 (a) e 28%PMWNT-F1/R1 (b) **71**
- FIGURA 5.20** Intumescimento em PBS pelos nanocompósitos 28%PMWNT/R1 e 28%PMWNT-F1/R1 **72**
- FIGURA 5.21** Mecanismo de intumescimento da rede de PVA com a incorporação dos nanotubos de carbono **73**
- FIGURA 5.22** Curvas tensão versus deformação para os nanocompósitos 28%PMWNT/R1 (a), 28%PMWNT-F1/R1 (b), 28%PMWNT-F2/R1 (c) e para o filme de PVA 28% (d). **74**
- FIGURA 5.23** Variação do módulo de elasticidade dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **76**
- FIGURA 5.24** Variação do limite de resistência à tração (LRT) dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **77**
- FIGURA 5.25** Variação do limite de escoamento dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **78**
- FIGURA 5.26** Variação da tenacidade dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **79**
- FIGURA 5.27** Variação da deformação específica dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **80**
- FIGURA 5.28** Representação da possível interação dos nanotubos de **81**

- carbono com a matriz de PVA
- FIGURA 5.29** Viabilidade de células VERO dos filmes de PVA e dos nanocompósitos produzidos pela rota 1 **83**
- FIGURA 5.30** Viabilidade de células VERO em relação ao controle celular dos filmes de PVA e dos nanocompósitos produzidos pela rota 1 **84**
- FIGURA 5.31** Fotografias representando os filmes nanocompósitos em (a) 5%PMWNT/R2, 5%PMWNT-F/R2, 10%PMWNT/R2 e 10%PMWNT-F/R2, em (b) 28%PMWNT/R2 e 28%PMWNT-F1/R2 preparados a partir da rota 2 **85**
- FIGURA 5.32** Curvas tensão versus deformação para os nanocompósitos 28%PMWNT-F1/R2 (a), 28%PMWNT-R2 (b) e para o filme de PVA 28% (c) **87**
- FIGURA 5.33** Variação do módulo de elasticidade dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **88**
- FIGURA 5.34** Variação do limite de resistência à tração dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **89**
- FIGURA 5.35** Variação do limite de escoamento dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **90**
- FIGURA 5.36** Variação da tenacidade dos nanocompósitos em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **91**
- FIGURA 5.37** Variação da deformação específica dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro **92**
- FIGURA 5.38** (i) espectros UV-Vis para a solução PBS (a) e para os nanotubos de carbono carboxilados - MWNT-COOH (b), (ii) a ampliação do espectro na faixa de comprimento de onda de 250-350nm **94**

- FIGURA 5.39** Esquema representando as etapas de funcionalização dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e a bioconjugação dos MWNT-COOH com a enzima Glicose Oxidase, GOx **95**
- FIGURA 5.40** Esquema representando a formação de ligação covalente amida entre os nanotubos carboxilados e a enzima GOx pela reação com EDC/sulfo-NHS. **96**
- FIGURA 5.41** Espectro UV-Vis obtido para a solução de EDC/sulfo-NHS **97**
- FIGURA 5.42** Sítio ativo da enzima Glicose Oxidase. **98**
- FIGURA 5.43** (i) Espectro UV-Vis obtido para a enzima GOx em solução PBS, (ii) espectro ampliado na faixa de comprimento de onda de 200-300nm **99**
- FIGURA 5.44** Espectros UV-Vis para a mistura MWNT-COOH/EDC/sulfo-NHS/GOx (a) e para os MWNT-CONHGOx após 120min de reação (b) **100**
- FIGURA 5.45** Espectros UV-Vis para os MWNT-COOH + GOx após a adição da enzima GOx e após 120min de repouso **101**
- FIGURA 5.46** Espectros UV-Vis para os MWNT-COOH + GOx (a) e para os MWNT-CONHGOx (b) **103**
- FIGURA 5.47** Etapas do ciclo catalítico da enzima GOx. **104**
- FIGURA 5.48** (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-CONHGOx nos tempos de $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio **106**
- FIGURA 5.49** (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-COOH+GOx nos tempos de $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da **108**

- cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio
- FIGURA 5.50** (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-CONHGOx após processo de remoção de GOx nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio **109**
- FIGURA 5.51** (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-COOH+GOx, após processo de remoção de GOx, nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio **110**
- FIGURA 5.52** Histograma mostrando a evolução da reação de oxidação do TMB para as amostras MWNT-COOH+GOx e MWNT-CONHGOx nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação **111**
- FIGURA 5.53** Curvas representando a evolução de formação do produto com 650nm com o tempo para os sistemas MWNT-CONHGOx (a) e MWNT-COOH+GOx s/EDC/sulfo-NHS (b) **112**
- FIGURA 5.54** (a) espectros UV-Vis obtidos para a amostra MWNT-COOH nos tempos de 0 (t_0) e 20 minutos (t_3) de reação com os reagentes TMB/HRP e D-Glicose. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração da suspensão analisada após 20 minutos de ensaio **113**
- FIGURA 5.55** Espectros UV-Vis obtidos para água nos tempos 0 (t_0) e 20 minutos (t_3) de reação com os reagentes TMB/HRP e D-Glicose **114**
- FIGURA 5.56** (a) espectros UV-Vis obtidos para amostra do nanocompósito PVA/MWNT-CONHGOx nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; **115**

$t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação com os reagentes TMB/HRP e D-Glicose. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração da suspensão após 40 minutos de ensaio

- FIGURA 5.57** Representação do sistema nanocompósito biohíbrido baseado na reação de oxidação da glicose mediada pela enzima GOx immobilizada covalentemente nas funcionalidades carboxílicas dos nanotubos **116**
- FIGURA 5.58** Espectros UV-Vis obtidos para amostra do nanocompósito PVA/MWNT-CONHGOx após 7 dias de cultura bacteriana nos tempos de 0 (t_0), 5 (t_1) e 10 minutos (t_2) de reação com os reagentes GOx/TMB/HRP durante o teste de atividade da enzima GOx **117**
- FIGURA 5.59** Espectros UV-Vis obtidos para amostra do nanocompósito PVA/MWNT-CONHGOx após 7 dias de cultura bacteriana nos tempos de 0 (t_0), 5 (t_1) e 10 minutos (t_2) de reação com os reagentes GOx/TMB/HRP durante o teste de atividade da enzima GOx **118**

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Propriedades típicas dos CNTs	8
TABELA 3.2	Principais métodos e características de produção de nanotubos de carbono	10
TABELA 4.1	Identificação e concentração dos nanocompósitos sintetizados pela rota 1	37
TABELA 4.2	Identificação e concentração dos nanocompósitos sintetizados pela rota 2	39
TABELA 4.3	Reagentes utilizados para o preparo de um litro de solução PBS	40
TABELA 4.4	Amostras utilizadas nos testes de atividade da enzima GOx	47
TABELA 5.1	Números de onda e grupos característicos associados para o PVA	51
TABELA 5.2	Resumo da análise por espectroscopia Raman para as amostras MWNT e MWNT-COOH	64

LISTA DE NOTAÇÕES

AFM	Microscopia de força atômica
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATR	Reflexão total atenuada
CNT	Nanotubos de Carbono
CVD	Deposição Química de Vapor
DI	Água Deionizada
DRX	Difração de Raios X
E	Módulo de Elasticidade
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
F1	Funcionalização por HNO ₃
F2	Funcionalização por HNO ₃ /H ₂ SO ₄
FBS	Soro fetal bovino
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GOx	Glicose Oxidase
GH	Grau de Hidrólise
GI	Grau de Intumescimento
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
I _D	Intensidade da banda D
I _G	Intensidade da banda G
LRT	Limite de resistência à tração
MEM	<i>Minimum Eagle Medium</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MWNT	Nanotubos de Carbono com Paredes Múltiplas
MWNT-COOH	Nanotubos de Carbono com Paredes Múltiplas Carboxilados por
MWNT-COOH F1	Nanotubos de Carbono com Paredes Múltiplas Carboxilados pela funcionalização F1
MWNT-COOH F2	Nanotubos de Carbono com Paredes Múltiplas Carboxilados pela

	funcionalização F2
MWNT-CONHGOx	Nanotubos de Carbono com Paredes Múltiplas Conjugados com Glicose Oxidase
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
pH	Potencial hidrogeniônico
PBS	Tampão de fosfato salino
PMWNT	Nanocompósito de PVA/MWNT sem funcionalização
PMWNT-F1	Nanocompósito de PVA/MWNT funcionalizado por F1
PMWNT-F2	Nanocompósito de PVA/MWNT funcionalizado por F2
PVA	Poli(álcool vinílico)
PVAc	Poli(acetato de vinila)
R1	Rota 1 de síntese dos nanocompósitos
R2	Rota 1 de síntese dos nanocompósitos
RBM	Modo de respiração radial
SDS	Sódio dodecil sulfato
Sulfo-NHS	<i>N</i> -Hidroxisulfosuccinimida
SWNT	Nanotubos de Carbono com Parede Simples
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
u.a.	Unidade arbitrária
UV-Vis	Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta-visível

RESUMO

Nos últimos anos, nanocompósitos formados a partir de materiais poliméricos e nanotubos de carbono (CNTs) têm sido extensivamente estudados devido às suas interessantes propriedades mecânicas e possíveis utilizações nas mais diversas aplicações. Neste trabalho, filmes de nanocompósitos de poli(álcool vinílico) (PVA) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) foram sintetizados através de duas rotas distintas, caracterizados quanto à morfologia e propriedades físicas e mecânicas. Os nanotubos foram modificados quimicamente e foi investigado o efeito da funcionalização química nos MWNT para a síntese e formação dos filmes nanoestruturados. Foi ainda estudada a relação entre as rotas de síntese dos nanocompósitos e suas propriedades. Os resultados de intumescimento, resistência mecânica e tenacidade indicaram que através da inserção de pequenas quantidades de nanotubos de carbono podem ser obtidas mudanças consideráveis nas propriedades dos nanocompósitos em relação ao polímero puro. Foi investigada a bioconjugação dos CNTs com a enzima Glicose Oxidase utilizando a rota química de ativação das carboxilas dos nanotubos funcionalizados com carbodiimidas. A partir disso, observou-se a viabilidade da síntese de nanocompósitos biofuncionais. Os resultados de ensaio biológico (MTT) indicaram que os nanocompósitos são promissores para serem utilizados em aplicações biomédicas.

ABSTRACT

In recent years, nanocomposites formed from polymeric materials and carbon nanotubes (CNTs) have been extensively studied due to their interesting mechanical properties and possible uses in various applications. In this work, nanocomposite films of poly (vinyl alcohol) (PVA) and multi-walled carbon nanotubes (MWNT) were synthesized by two different routes. They are characterized regarding to morphology, physical and mechanical properties. The nanotubes were chemically modified and the effect of MWNT chemical functionalization in the synthesis and the formation of nanostructured films was investigated. It was also considered the relationship between the routes of synthesis of nanocomposites and their properties. The results of swelling, mechanical strength and toughness have shown by the insertion of small amounts of carbon nanotubes has caused considerable changes in the properties of the nanocomposites compared to pure polymer. We investigated the biofunctionalization of CNTs with the enzyme glucose oxidase using the chemical route of activation of the carboxyl groups of functionalized nanotubes with carbodiimides. We observed the feasibility of the synthesis of biofunctional nanocomposites. The results of biological assay (MTT) indicated that the nanocomposites are promising for use in biomedical applications.

1 – INTRODUÇÃO

A data de referência para o nascimento da nanociência e da nanotecnologia é a de 29 de dezembro 1959, quando o físico Richard Feynman proferiu na Reunião Anual da *American Physical Society* a palestra “*There’s plenty of room at the bottom*” (“Há mais espaço lá embaixo”). Feynman anunciava ser possível condensar na cabeça de um alfinete as páginas dos 24 volumes da Enciclopédia Britânica como metáfora para afirmar que muitas descobertas se fariam com a fabricação de materiais em escala atômica e molecular. O futuro previsto por Feynman tornou-se realidade. Hoje, não há apenas entusiasmo científico, mas enorme interesse político e vultosos investimentos econômicos no desenvolvimento de nanotecnologias (SCHUCH *et al.*, 2007; ZARBIN, 2007).

Atualmente, o interesse em materiais nanoestruturados cresce de forma extraordinária devido à sua potencialidade em diversas áreas científicas e tecnológicas, como catálise, desenvolvimento de sensores biológicos, materiais optoeletrônicos, liberação controlada de fármacos e engenharia de tecidos. A nanociência e nanotecnologia envolvem processos, materiais e produtos na escala que varia entre 1 e 100 nanômetros e têm beneficiado diversos segmentos, tais como, alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar, agrícola e de segurança nacional (PASCHOALINO *et al.*, 2010). Materiais e dispositivos produzidos em escala nanométrica apresentam propriedades físico-químicas exóticas devido ao aparecimento de efeitos quânticos, redução de tamanho, grande área interfacial e rapidez de operação, abrindo uma oportunidade enorme à criatividade humana em vários segmentos da ciência e tecnologia (SILVA, 2007).

Devido à sua estrutura unidimensional, fascinantes propriedades mecânicas e condutividade térmica e elétrica, os nanotubos de carbono (CNTs) têm atraído a atenção de físicos, químicos e cientistas de materiais, sendo a medicina e a biologia áreas emergentes para sua aplicação (BEKYAROVA *et al.*, 2005). CNTs são extremamente resistentes a tensões mecânicas, possuem elevada área superficial e são altamente estáveis quimicamente. Esses fatores os tornam interessantes materiais para uso em sensores químicos e biológicos e em

nanocompósitos. Tais propriedades dos CNTs os tornam materiais fundamentais no desenvolvimento da nanotecnologia. A mistura dos CNTs com outros materiais (como polímeros) pode gerar nanocompósitos com novas propriedades elétricas, mecânicas e térmicas.

Dentre os vários materiais poliméricos existentes o poli(álcool vinílico) (PVA) tem sido frequentemente explorado como material de implante em aplicações biomédicas para sistemas de liberação de drogas, membranas utilizadas em diálise, cobertura para feridas, pele artificial, dispositivos cardiovasculares e reparos cirúrgicos, aproveitando de sua excelente flexibilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade (COSTA JR, 2008). A síntese de nanocompósitos poliméricos a base de CNTs e PVA torna-se bastante importante, pois se utiliza da combinação das propriedades destes materiais formando um material único.

Este trabalho descreve a síntese e a caracterização de nanocompósitos de PVA e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT) produzidos pela técnica de mistura em solução seguida de evaporação de solvente. Os MWNT foram funcionalizados quimicamente e o efeito da funcionalização para a formação do nanocompósito foi avaliado. Foram caracterizados a estrutura, a morfologia e o intumescimento dos filmes sintetizados e discutido um possível mecanismo de interação entre os seus constituintes. Ainda foi estudada a bioconjugação dos MWNT com a enzima glicose oxidase e a preparação de nanocompósitos biohíbridos.

2 – OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo a síntese e caracterização de nanocompósitos a base de poli(álcool vinílico) (PVA) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT), para potencial aplicação como biomaterial.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente o PVA e o nanotubo de carbono utilizados como precursores através de técnicas de espectroscopia.
- Funcionalizar quimicamente os nanotubos de carbono com grupos carboxílicos, através de duas rotas distintas e caracterizar a funcionalização através de espectroscopia de infravermelho (FTIR), espectroscopia UV-Vis e espectroscopia Raman.
- Sintetizar nanocompósitos a partir de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e PVA utilizando duas rotas de síntese.
- Caracterizar os nanocompósitos sintetizados através das técnicas de FTIR, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia Raman, bem como, avaliar as propriedades mecânicas dos filmes.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos materiais obtidos verificando a viabilidade celular utilizando ensaio colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).
- Avaliar a grau de intumescimento dos filmes de nanocompósitos obtidos através de ensaios de absorção de fluido em solução tampão fosfato salino (PBS).
- Estudar a conjugação dos nanotubos de carbono carboxilados com a enzima glicose oxidase.

- Sintetizar e caracterizar por UV-Vis nanocompósitos biofuncionais a partir dos nanotubos conjugados com glicose oxidase.
- Avaliar utilizando ensaios bioquímicos e espectroscopia UV-Vis a atividade da enzima glicose oxidase conjugada nos nanotubos de carbono.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - NANOTUBOS DE CARBONO

Entre os materiais criados pelo homem e utilizados na nanotecnologia estão os nanotubos de carbono. Em 1991, Sumio Iijima demonstrou a existência de novas estruturas moleculares que são definidas como formas metaestáveis de carbono resultantes do enrolamento de um plano de átomos de carbono em hibridização sp^2 sob a forma de um cilindro com diâmetro da ordem de nanômetros e comprimentos da ordem de 3-10 μ m (IJIMA, 1991; SILVA, 2007). Esses materiais possuem como resultado da forte ligação covalente entre os átomos de carbono, excelentes propriedades mecânicas, altas condutividades elétricas e térmicas. Consequentemente, o número de potenciais aplicações comerciais dos CNTs é enorme, proporcionando um aumento em suas taxas de produção anual. A Bayer[®] prevê taxas de produção de 3000ton/ano até o ano de 2012 (SMITH *et al.*, 2009).

Os CNTs podem ser divididos em duas categorias: nanotubos com parede única ou simples (SWNT, do inglês *single-wall nanotubes*), que são formados pelo enrolamento de uma camada de grafeno, e nanotubos com paredes múltiplas (MWNT, do inglês *multi-wall nanotubes*), que são formados por múltiplas camadas de grafeno enroladas em forma cilíndrica (CAPAZ & CHACHAM, 2003). O espaçamento entre as camadas é levemente superior à distância interplanar do grafite. Os cilindros de carbono podem ser encontrados com pontas fechadas ou abertas (FERREIRA 2003b). Na figura 3.1 estão mostrados esquematicamente os dois tipos de nanotubos de carbono.

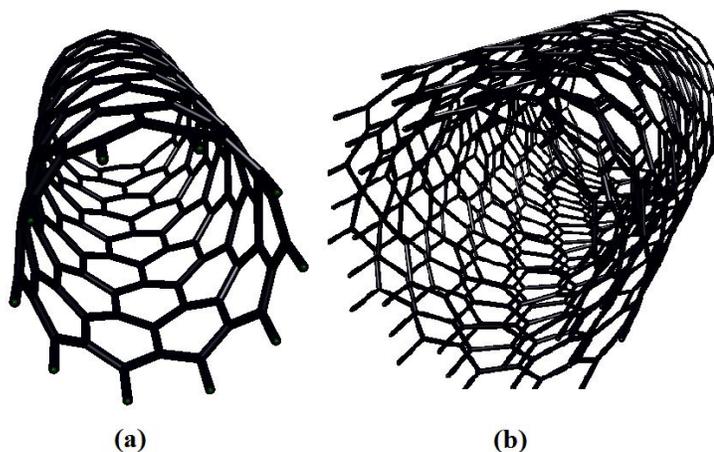


Figura 3.1 Representação de um nanotubo de carbono com parede simples (a) e de um nanotubo de carbono com paredes múltiplas (b). Imagens geradas com o auxílio do programa Nanotube Modeler[®], 2005 obtido de JCrystalSoft (Livermore, California).

3.1.1 – Estrutura, propriedades e aplicações

Os SWNT possuem propriedades eletrônicas excepcionais. A maneira com que a folha de grafeno é enrolada produzindo nanotubos com parede simples pode formar materiais com diferentes simetrias (*armchair*, *chiral* e *zig-zag*), figura 3.2, com comportamento metálico e semicondutor (FERREIRA, 2006). Os nanotubos do tipo *armchair* possuem comportamento metálico e nanotubos dos tipos *chiral* e *zig-zag* podem ser metálicos ou semicondutores. As propriedades elétricas dos MWNT sem defeitos assemelham-se às propriedades dos SWNT, devido ao fraco acoplamento entre os cilindros de carbono concêntricos. Além disso, por se tratarem de estruturas quase unidimensionais, o transporte eletrônico nos CNTs metálicos (tanto MWNT quanto SWNT) ocorre de forma balística, isto é, sem espalhamento, possibilitando a condução de corrente através de grandes extensões de nanotubo sem que ocorra o aquecimento dos mesmos (HERBST *et al.*, 2004). No caso de nanotubos de paredes múltiplas é mais difícil prever suas propriedades eletrônicas, pois o enrolamento das folhas de grafeno pode variar ao longo das diferentes camadas e, além disso, a alta complexidade da estrutura aumenta a possibilidade da presença de defeitos.

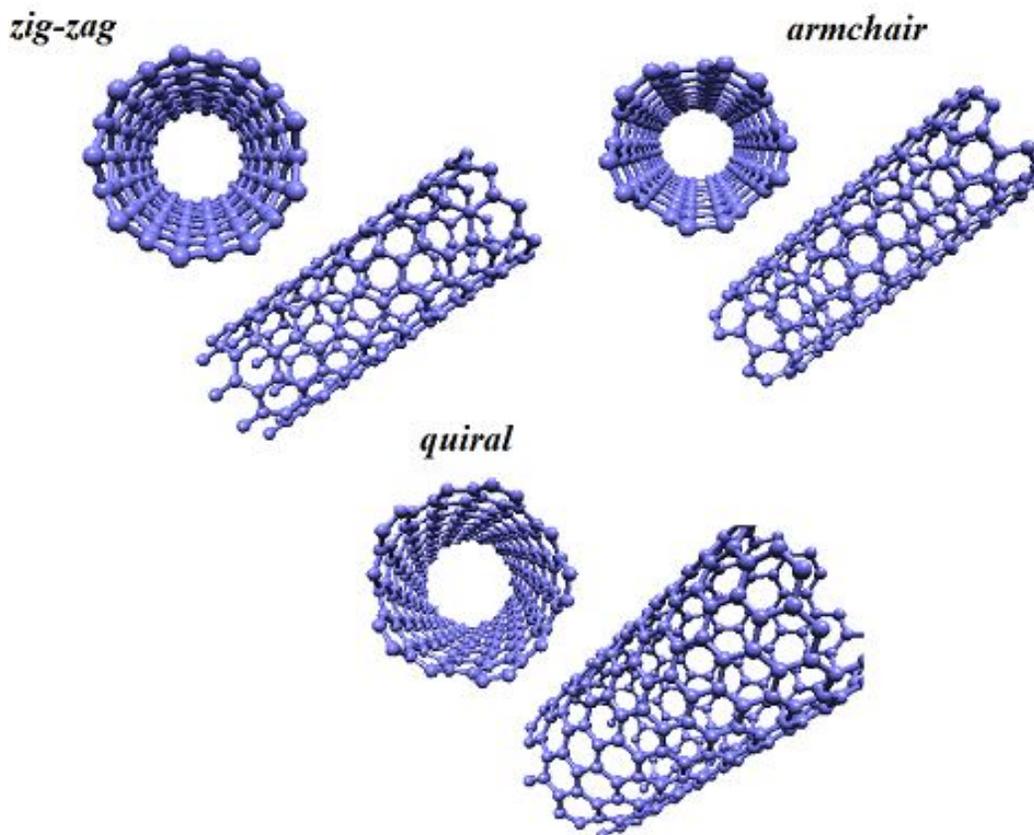


Figura 3.2 Representação esquemática das diferentes simetrias de SWNT.

Além das suas propriedades eletrônicas, os CNTs possuem propriedades mecânicas igualmente especiais. As fortes ligações sp^2 formadas entre os átomos de carbono fazem com que os nanotubos sejam, teoricamente, um dos materiais com maiores dureza e resistência mecânica conhecidos atualmente (ZARBIN, 2007). Os CNTs são materiais extremamente resistentes, possuem módulo de elasticidade da ordem de 1TPa, resistência máxima à tração de 63GPa, além da habilidade de absorverem alto grau de deformação e retornarem à sua forma original. Para nanotubos livres de defeitos estruturais, a resistência pode chegar até 300GPa, ou seja, entre 10 e 100 vezes maior por uma fração de peso do que o aço (FERNANDES, 2008; TREACY *et al.* 1996). Além disso, são materiais altamente flexíveis e dificilmente se rompem ou sofrem danos estruturais quando dobrados ou

submetidos à alta pressão. Na tabela 3.1, estão mostradas algumas propriedades dos SWNT e MWNT.

Tabela 3.1 Propriedades típicas dos CNTs (SAHOO *et al.*, 2010)

Propriedade	SWNT	MWNT
Resistência à Tração (GPa)	50-500	10-60
Módulo de Elasticidade (TPa)	~1	0,3-1
Deformação na fratura (%)	5,8	-
Densidade (g/cm ³)	1,3-1,5	1,8-2,0
Condutividade elétrica (S/m)	~10 ⁶	
Estabilidade Térmica (°C)	>700 (no ar)	
Diâmetro típico (nm)	1	~20
Área Superficial (m ² /g)	10-20	

Os CNTs têm sido utilizados para auxiliar na remoção de vários tipos de poluentes orgânicos como dioxina, compostos orgânicos voláteis como xileno e matéria orgânica natural de soluções aquosas. A grande capacidade de adsorção dos CNTs é devida à sua estrutura porosa, à possibilidade de funcionalização química com uma variedade de grupos funcionais em sua superfície e de sua grande área superficial (LU *et al.*, 2008).

O conjunto fantástico de propriedades dos CNTs, decorrentes fundamentalmente de sua escala de tamanho, faz com que tais materiais sejam utilizados nas mais diversas aplicações, dentre as quais podemos citar algumas: como sensores de gases e sensores biológicos; em pontas para microscopia de força atômica (AFM); em compósitos com polímeros, cerâmicas e metais (visando materiais com alta resistência mecânica); em dispositivos eletrônicos; em dispositivos para armazenar hidrogênio; em novos dispositivos biomédicos, etc. (ZARBIN, 2007).

3.1.2 – Síntese

Dentre os principais métodos de síntese de nanotubos de carbono estão (SILVA, 2007; OLIVEIRA, 2009; CAPAZ e CHACHAM, 2003).

- i) Descarga de Arco: neste processo são produzidas descargas elétricas entre dois eletrodos de grafite dopados com catalisadores metálicos (Fe, Ni, Co, Mo, etc.) sob atmosfera inerte de hélio ou argônio. As correntes de alta intensidade aquecem os eletrodos a temperaturas superiores a 3000°C vaporizando o grafite, que se condensa sob a forma de uma fuligem que contém os nanotubos de carbono, fulerenos e carbono amorfo.
- ii) Ablação por *laser*: nesta técnica um *laser* é utilizado para vaporizar um alvo de grafite dentro de um forno a 1200° C na presença de um fluxo de gás inerte. A vaporização produz espécies de carbono que são arrastadas pelo gás inerte da zona de alta temperatura e depositadas em um coletor cônico de cobre resfriado por água.
- iii) Deposição Química de Vapor (CVD): consiste na decomposição térmica ou pirólise de hidrocarbonetos leves (metano, acetileno, etileno) como precursores de carbono utilizando um catalisador metálico (Fe, Ni, Co, Mo, etc.) sob pressão atmosférica. Este método é mais viável do que os demais, pois as temperaturas utilizadas são inferiores (entre 600 e 1000°C), a pureza do produto final é maior, permitindo a produção de nanotubos em larga escala.

Na tabela 3.2 estão apresentadas as características principais observadas para os três principais métodos de síntese de nanotubos de carbono.

Tabela 3.2 Principais métodos e características de produção de nanotubos de carbono. Adaptação de LOBO (2008)

Método	Características Principais
Descarga de Arco	Tipo de Nanotubo: SWNT e MWNT Fonte de Carbono: vaporização de dois eletrodos de carbono Temperatura: ~3000°C Catalisador: anodo dopado com metais (Fe, Mo, Y, Co, Ni) Parâmetros de vácuo: 5×10^3 a 70×10^3 Pa Atmosfera inerte: He ou Ar
Ablação por <i>laser</i>	Tipo de Nanotubo: SWNT e MWNT Fonte de Carbono: vaporização de um alvo de grafite Temperatura: ~3000°C Catalisador: Fe, Mo, Y, Co, Ni Parâmetros de vácuo: 70×10^3 Pa Atmosfera inerte: He ou Ar
Deposição Química de Vapor (CVD)	Tipo de Nanotubo: SWNT e MWNT Fonte de Carbono: hidrocarboneto (xileno, metano, etileno, cânfora, tolueno, etc.) Temperatura: 600-1000°C Catalisador: Fe, Mo, Y, Co, Ni, compostos organometálicos Parâmetros de vácuo: pressão atmosférica Atmosfera inerte: Ar, H ₂ , N ₂

3.1.3 - Funcionalização

Devido às interações de van der Waals formadas entre as superfícies hidrofóbicas de grafeno, os nanotubos minimizam sua energia livre superficial formando agregados e são inertes quimicamente (TOMÁNEK *et al.*, 2008, SMITH *et al.*, 2009). Esta inércia química

dificulta da processabilidade dos CNTs e impede a utilização potencial dos mesmos. A funcionalização dos nanotubos através de métodos químicos tem sido vista como uma forma de proporcionar a interação dos CNTs com outras substâncias e materiais, como polímeros, possibilitando o uso destes compostos de carbono em compósitos, sensores, além da interação com solventes orgânicos. A funcionalização de CNT através de suas paredes, pontas ou por encapsulamento (os tubos de pontas abertas possuem capilaridade) tem sido vista como uma forma de explorar o potencial destes materiais em aplicações químicas e biológicas (FILHO e FAGAN, 2007). A modificação química e solubilização de nanotubos de carbono representam uma área emergente na pesquisa de materiais a base de CNTs. Vários grupos de pesquisa têm relatado reações de funcionalização de nanotubos de carbono de parede simples (SWNT) e múltiplas (MWNT) (SUN *et al.*, 2002). Essas reações podem ser divididas em duas categorias: ligações covalentes e não covalentes.

A funcionalização a partir de ligações covalentes ocorre pelo ataque direto de grupos funcionais na superfície grafítica, como a utilização da ligação nanotubo/ácido carboxílico. MICKELSON e colaboradores (1998) foram os primeiros a estudar a funcionalização dos CNTs e publicaram sobre a fluorinação de nanotubos de carbono utilizando o gás flúor como oxidante. Os CNTs funcionalizados foram solvatados em nanotubos individuais utilizando alcoóis como solventes (MICKELSON *et al.*, 1999).

Um outro tipo de funcionalização covalente forma ligações carboxílicas nos nanotubos a partir de defeitos intrínsecos ou induzidos. Este último refere-se à criação de carbonos sp^3 terminais, nas pontas dos nanotubos, que serão convertidos em ácidos carboxílicos após oxidação (SUN *et al.*, 2002). Os grupos carboxílicos criados podem ser utilizados para o ataque de outros grupos funcionais, bem como cadeias alquílicas aos nanotubos utilizando ligações amida. Uma variedade de compostos poliméricos e oligoméricos tem sido utilizados na funcionalização de nanotubos para a solubilização e dispersão destes em solventes orgânicos e/ou água (CHEN *et al.*, 1998).

Após tratamento com agentes oxidantes (HNO_3 , H_2SO_4 , H_2O_2 , $KMnO_4$, etc.), como mostrado na figura 3.3, os nanotubos virgens podem ser efetivamente purificados e

modificados com grupos funcionais oxigenados (hidroxilas e carboxilas), o que promove o aumento da reatividade química da rede grafítica. A presença destes grupos facilita a esfoliação dos nanotubos, aumenta a solubilidade em meio polar, aumenta a possibilidade de funcionalização com outros grupos funcionais e aumenta a adesão interfacial dos CNTs com matrizes poliméricas na formação de nanocompósitos. Em contrapartida, pode afetar as propriedades dos nanotubos, diminuindo o comprimento dos tubos (DATSYUK *et al.*, 2008).

Devido à presença de íons metálicos provenientes do catalisador, ao se pensar em aplicações biomédicas dos nanotubos de carbono, os mesmos podem formar dispositivos citotóxicos. Por isso, a sua purificação é requerida em aplicações biomédicas (HARRISSON e ATALA, 2007). Existem várias maneiras de se purificar os CNTs, uma das maneiras mais importantes e mais utilizadas é através do refluxo dos nanotubos com ácidos oxidantes como o ácido nítrico removendo o catalisador metálico e os depósitos de carbono amorfo no interior e exterior do nanotubo.

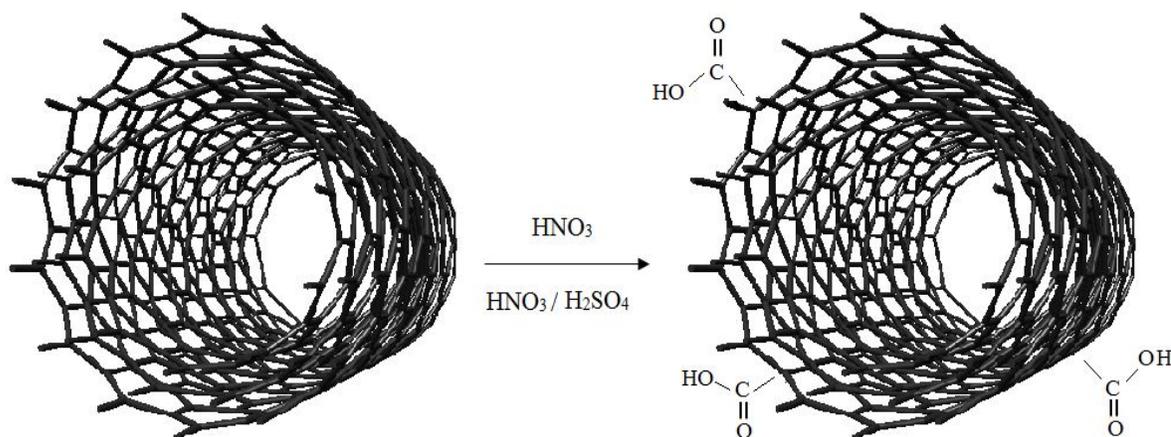


Figura 3.3 Funcionalização química dos MWNT com o grupo carboxílico.

A funcionalização não covalente de nanotubos de carbono é baseada nas forças de van der Waals. Este tipo de modificação é capaz de alterar a natureza da superfície dos nanotubos tornando-os mais compatíveis com outros materiais, como matrizes poliméricas. A

vantagem da funcionalização não covalente é que a estrutura sp^2 intrínseca dos nanotubos não é alterada, não provocando mudanças nas propriedades dos mesmos (BANERJEE *et al.*, 2005). A desvantagem é que as forças entre as moléculas de interesse e os nanotubos podem ser fracas, resultando na baixa interação e baixa dispersão dos nanotubos (GOYANES *et al.*, 2007). Como exemplo de funcionalização não covalente de CNTs, tem-se a interação de polímeros como poli(vinil pirrolidona) e poli(estireno) pela associação destes com os sítios dos nanotubos via interação π (π) impedindo a interação nanotubo-nanotubo, formando agregados de nanotubos envolvidos com os polímeros.

A modificação direta de nanotubos de carbono com proteínas (incluindo enzimas e anticorpos) é uma área de pesquisa muito estudada. Muitas proteínas podem adsorver-se espontaneamente na superfície do nanotubo ou serem imobilizadas covalentemente via reações de funcionalização (figura 3.4).

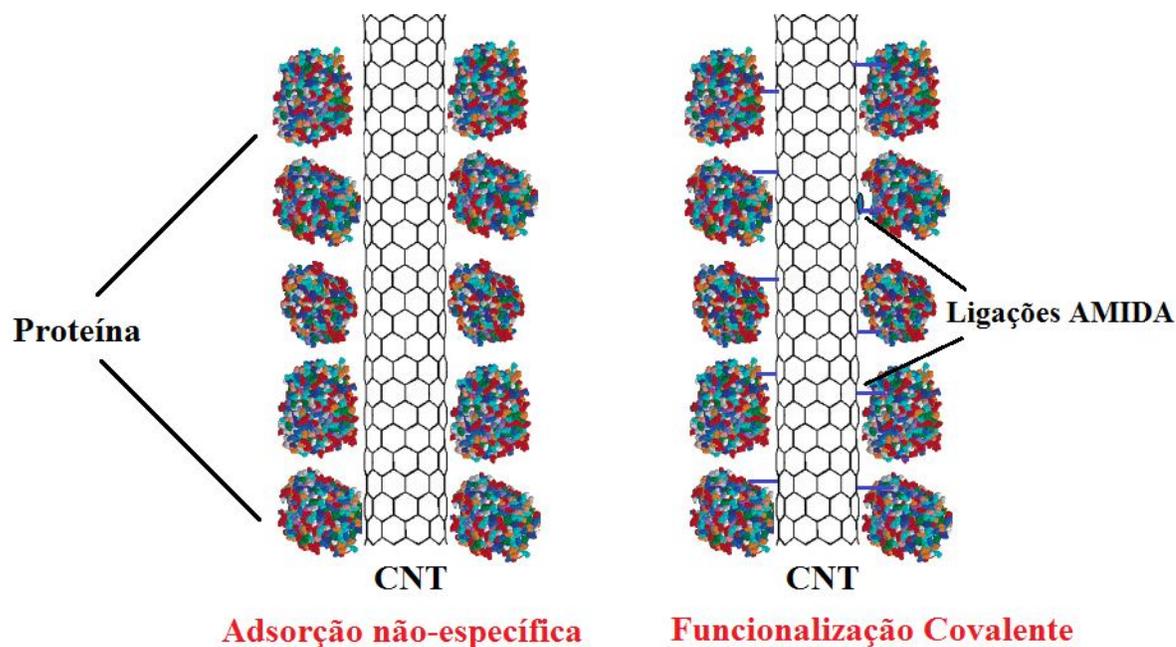
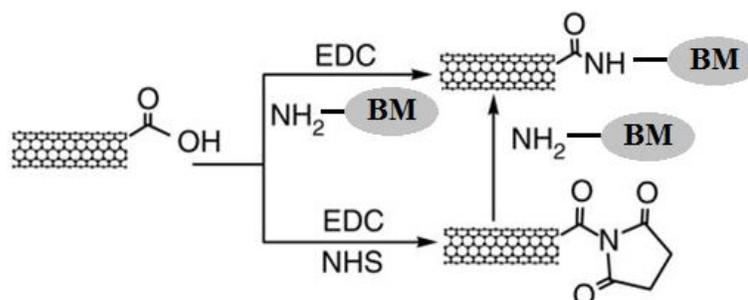


Figura 3.4 Modelos interações de proteínas com nanotubos de carbono.

A grande superfície hidrofóbica dos CNTs (elétrons π) os tornam parceiros ideais para interações não covalentes com diversas moléculas e macro(bio)moléculas. Essas interações

podem acontecer dentro ou fora dos nanotubos (YANG *et al.*, 2007). A adsorção não específica de proteínas é atribuída principalmente às interações hidrofóbicas, porém o mecanismo de adsorção pode ser bem mais complicado e dependente de outros fatores, como interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. As interações de alguns peptídeos com nanotubos podem servir de modelo para as interações entre os CNTs e as proteínas. Foi observado que histidina e triptofano contribuem significativamente para as interações dos peptídeos com a superfície dos nanotubos (LIN *et al.*, 2004b), o anel aromático presente nestes resíduos de aminoácidos interagem com os CNTs via interações de van der Waals.

O fenômeno de adsorção não específica de proteínas em CNTs representa um modelo de baixa reprodutibilidade e controle. A conjugação de proteínas pode ser alcançada de uma maneira mais previsível via formação de ligações covalentes amidas nos nanotubos funcionalizados com grupos carboxílicos. A amidação é baseada em reações de ativação com carbodiimidas (figura 3.5), também chamadas de reagentes de acoplamento (LIN *et al.*, 2004b, BEKYAROVA *et al.*, 2005). O reagente *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) promove a ativação das carboxilas presentes nos nanotubos funcionalizados formando um intermediário altamente ativo (o-acylureia), que sofre hidrólise rapidamente para formar o ácido carboxílico novamente. Entretanto, na presença do reagente *N*-Hidroxisuccinimida (NHS) um intermediário mais solúvel em água é formado (succinimil). Este intermediário reage prontamente via substituição nucleofílica com as aminas primárias presentes nas biomoléculas (enzimas, proteínas ou anticorpos), (RAVINDRAN *et al.*, 2003).



BM- Biomolécula (enzima, proteína, anticorpo)
 NHS - *N*-hidroxissuccinimida
 EDC- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

Figura 3.5 Ilustração esquemática das etapas de formação de ligação amida entre os CNTs e moléculas biológicas.

3.1.4 – Caracterização de Nanotubos de Carbono

A caracterização de CNTs com o propósito de se obter informações sobre grau de pureza, ordenamento, distribuição de diâmetro é essencial. Uma das técnicas mais utilizadas para caracterizar nanotubos de carbono é a espectroscopia de espalhamento Raman (LOBO *et al.*, 2005; CAPAZ e CHACHAM, 2003; HERBST *et al.*, 2004; SILVA, 2007). O nome da técnica homenageia o físico indiano Chandrasekhara Raman que descobriu em 1928 o fenômeno em que a mesma se baseia. Nesta técnica um feixe de luz *laser* incide sobre a amostra que provoca o espalhamento da luz. A diferença de energia entre os fótons incidentes e os que são espalhados pelos átomos da amostra fornece informações sobre a estrutura atômica dos nanotubos (CAPAZ e CHACHAM, 2003).

Através da espectroscopia Raman, pode-se diferenciar nanotubos de grafite e materiais amorfos, além de nanotubos de parede simples de nanotubos de paredes múltiplas. As bandas relacionadas aos CNTs perfeitos são visualizadas em regiões bem definidas do espectro Raman. Os modos vibracionais dos SWNT, também chamados de respiração radial (*radial breathing modes*, RBM) são observados em baixos números de onda (100-300 cm^{-1}). Já os modos vibracionais chamados de tangenciais, são responsáveis pela banda

G associada aos nanotubos perfeitos ($\sim 1575\text{cm}^{-1}$). A banda D é atribuída a estruturas desordenadas, como nanotubos defeituosos e carbono amorfo ($\sim 1350\text{cm}^{-1}$). Além disso, a razão entre as intensidades das bandas D e G (I_D/I_G) fornecem informações sobre o grau de desordem e defeitos estruturais (carbono sp^3) em uma amostra de nanotubo. Uma maior razão I_D/I_G indica a maior presença de defeitos estruturais nos CNTs (SILVA, 2007). Na figura 3.6 está representado um espectro Raman típico para uma amostra de nanotubos de carbono de parede simples.

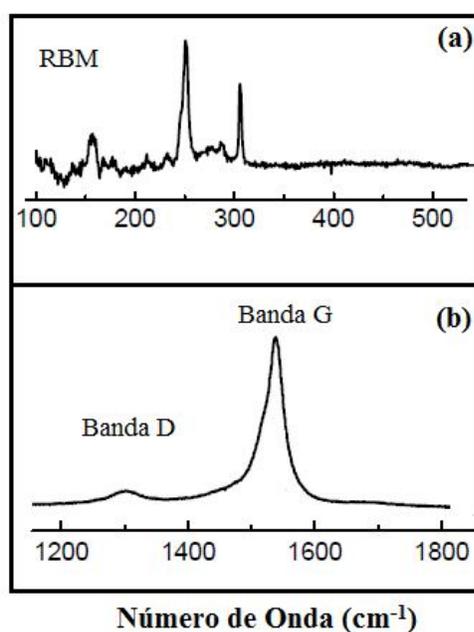


Figura 3.6 Espectro Raman típico para uma amostra de SWNT. Em (a) estão mostradas as bandas relacionadas aos modos de respiração radial e em (b) as bandas G e D. Adaptado de SILVA (2007).

Com a análise da morfologia dos nanotubos utilizando a microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV) podem ser avaliados densidade, comprimento e diâmetros externos dos tubos. A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é essencial para o estudo da morfologia dos CNTs (análise das estruturas internas e número de

camadas), bem como da presença de partículas metálicas ou outros materiais adsorvidos e incorporados aos nanotubos (SILVA, 2007).

A espectroscopia de infravermelho (FTIR) é uma técnica muito utilizada para caracterizar amostras de nanotubos tratadas quimicamente, onde são inseridos grupos funcionais nos CNTs. Além disso, os nanotubos apresentam os modos ativos em infravermelho A_{2u} (850cm^{-1}) e E_{1u} (1575cm^{-1}) (LOBO, 2008).

Medidas diretas de dureza e resistência mecânica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas isolados podem ser realizadas através de microscopia de força atômica (AFM), (THOSTENSON *et al.*, 2001).

3.1.5 - Nanotubos de Carbono e Biomateriais

Os nanotubos de carbono são considerados potenciais materiais biomédicos devido à sua flexibilidade estrutural e propensão à funcionalização química (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008a). Apesar disso, pesquisas indicam que os CNTs podem causar efeitos adversos devido à sua pequena dimensão. O comprimento microscópico e peso dos CNTs permitem a sua fácil distribuição no ambiente do corpo humano. No entanto, controvérsias envolvem a interpretação atribuída à toxicidade dos CNTs. A literatura indica que a toxicidade dos CNTs está relacionada com as suas propriedades, tais como estrutura (SWNT *versus* MWNT), relação comprimento/diâmetro, área superficial, grau de agregação, extensão da oxidação, topologia da superfície, grupo funcional ligado e método de síntese (que pode deixar resíduos de catalisador e produzir impurezas). Toxicidade de nanotubos de carbono também está relacionada com concentração e a dose a que as células ou organismos estão expostos (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008b).

De uma maneira geral a funcionalização dos nanotubos de carbono produz CNTs mais biocompatíveis com sistemas fisiológicos e, conseqüentemente, reduz sua toxicidade em comparação com os nanotubos de carbono não funcionalizados (SAYES *et al.*, 2006). Os

efeitos prejudiciais de uma possível liberação de nanopartículas no corpo humano devem ser investigadas no futuro.

Nanotubos de carbono possuem capacidade de serem utilizados em imagem celular, sensores químicos e biológicos, agentes carreadores de fármacos e como matriz para suporte no crescimento de tecidos biológicos e células (HARRISON e ATALA, 2007).

As aplicações dos nanotubos de carbono como excipientes de medicamentos são de interesse, dada a sua capacidade de interagir com macromoléculas tais como proteínas e DNA. As características marcantes de um sistema eficiente de distribuição de drogas incluem a capacidade para desempenhar liberação controlada e direcionada de medicamentos, o que os nanotubos de carbono têm exibido. Três métodos de interação entre CNT e os componentes farmacêuticos ativos são observados na liberação da droga. O primeiro método de interação ocorre através de um absorvente poroso onde os componentes ativos estão presos dentro dos nanotubos ou entre os nanotubos. A segunda ocorre através da fixação funcional do composto (através de ligações covalentes ou de van der Waals) nas paredes externas dos CNTs. A terceira abordagem envolve o encapsulamento dos compostos dentro dos CNTs os quais funcionam como nanotúneis (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008b).

Nanotubos de carbono representam também potenciais materiais biocompatíveis que podem ter dupla função: como uma matriz de suporte e como condutor para a entrega de sinais elétricos onde neurônios possam crescer em um feixe ou rede neural, resultando na formação do híbrido CNT/neurônio. Estas capacidades permitem que os nanotubos de carbono formem suportes (*scaffolds*) para orientar o crescimento neuronal. O crescimento dos neurônios em nanotubos de carbono sugere que estes são biocompatíveis (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008b).

O elevado nível de viabilidade celular obtido com células fibroblásticas e osteoblásticas em contato com MWNT, apontaram uma biocompatibilidade celular dos nanotubos, fato

importante para futuras aplicações médicas de nanotubos, em particular como substratos para reparação de tecidos biológicos (AOKI *et al.*, 2005; CHŁOPEK *et al.*, 2006).

Materiais nanocompósitos feitos de poli(propilenofumarato) (PPF) e nanotubos de carbono de paredes simples foram estudados para utilização potencial como *scaffold*. Os SWNT reforçaram significativamente o polímero PPF. Esses e outros achados sugerem que os CNTs em nanocompósitos são uma ótima alternativa de aplicação como *scaffold* para engenharia de tecido ósseo (SHI *et al.*, 2007).

Os CNTs por possuírem baixa densidade e elevada resistência mecânica quando comparados com o osso e com outros materiais utilizados em implantes ósseos (como aço e titânio), podem oferecer melhores propriedades mecânicas a um tecido ósseo danificado. Além disso, a fabricação de materiais compósitos ou híbridos com os CNTs é interessante ao se pensar nas excelentes flexibilidade e elasticidade (SAHITHI *et al.*, 2010). ZANELLO *et al.* (2006), estudou a biocompatibilidade dos CNTs e seu potencial na regeneração óssea, demonstrando que o uso de nanotubos na regeneração óssea é promissor.

Os nanotubos podem funcionar como *scaffold*. Células ósseas de ratos foram cultivadas em SWNT e MWNT modificados com grupos químicos eletricamente carregados e a biocompatibilidade deste sistema foi avaliada pela multiplicação de osteoblastos (células formadoras de osso), morfologia celular e formação de cristais de hidroxiapatita (GOULD, 2006). *Scaffolds* tridimensionais e porosos foram preparados contendo a maior fração de MWNT (89%) e a menor fração de quitosana, sendo observada a biocompatibilidade do material para adesão e proliferação de células osteobásticas (ABARRATEGI *et al.*, 2008).

Os CNTs podem atuar em biosensores, na detecção de eventos ou moléculas biológicas, devido à sua estrutura eletrônica e condutância balística. Biosensores a base de SWNT contendo glicose oxidase adsorvida fisicamente, foram preparados para detectar níveis de glicose sanguínea (BEKYAROVA *et al.*, 2005).

Apesar das potenciais aplicações dos CNTs em biomateriais descritas, a citotoxicidade dos mesmos ainda é uma questão controversa. A toxicidade de nanotubos através de inalação é totalmente diferente daquela de CNTs implantados no corpo humano, além disso, cada tipo de nanotubo pode ativar uma resposta de maneira diferente pelo organismo. A avaliação da toxicidade os CNTs é uma área de pesquisa em expansão e deve ser realizada cuidadosamente para evitar interpretações incorretas (SAITO *et al.*, 2008).

3.2 - POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) – PVA

O PVA é uma resina sintética, solúvel em água, obtida pela primeira vez em 1924, por Herman e Haehnel, pela hidrólise do poli(acetato de vinila) (PVAc), forma de obtenção utilizada comercialmente até hoje (ARANHA e LUCAS, 2001). A figura 3.7, mostra a reação de saponificação ou hidrólise para a obtenção do PVA pela polimerização do PVAc. Os grupos acetato do PVAc são substituídos por hidroxilas formando o copolímero PVA (poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila)) (MANSUR, 2007).

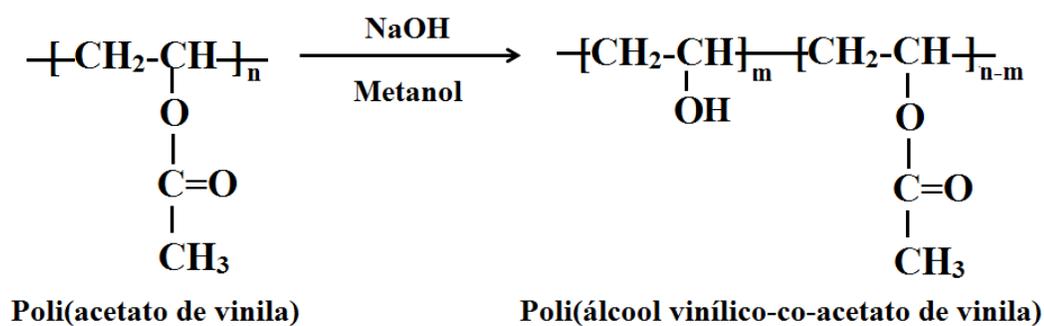


Figura 3.7 Síntese do PVA através da hidrólise do poli(acetato de vinila).

As propriedades básicas do PVA dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise (GH) (relação entre o percentual de hidroxilas no polímero final e o número inicial de grupos acetato). Um aumento do GH implica em redução da solubilidade em água, associada à estabilização energética promovida pelas ligações de hidrogênio intra e intercadeias poliméricas, no aumento da viscosidade e da resistência à tração (COSTA JR, 2008). Por suas excelentes propriedades, o PVA tem sido utilizado em um grande número

de aplicações industriais. Este polímero funciona como excelente adesivo possui boa resistência a solventes, óleos e graxas e sua resistência a passagem de oxigênio é superior a de qualquer polímero conhecido.

É um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas. O PVA tem sido usado em processamento de papel e fibras e como estabilizante de emulsão, além de ser importante como matéria-prima para filmes. Estudos de obtenção de PVA vêm sendo desenvolvidos buscando o controle da cristalinidade e introdução de grupos funcionais, para melhorar ou conferir propriedades específicas.

O PVA tem sido amplamente utilizado em fibras, adesivos, emulsificantes, em aplicações na indústria têxtil e de papel, na obtenção de membranas anfifílicas para imobilização de enzimas, dentre outras. Mais recentemente, o PVA tem sido utilizado como carreador de medicamento, devido às suas propriedades de degradabilidade e não toxidez (ARANHA e LUCAS, 2001). Além disso, o PVA tem sido proposto como material para sistemas de liberação controlada de fármacos e está sendo empregado em uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo cartilagem artificial, implantes de córnea, substitutos de pele ou *scaffolds* para a engenharia de tecidos sendo, geralmente, considerado biocompatível (GUERRINI *et al.*, 2006).

A natureza polar do PVA facilita a formação de ligações de hidrogênio com as hidroxilas e carboxilas dos nanotubos de carbono funcionalizados, proporcionando a síntese de materiais compósitos com presença de adesão interfacial.

3.3 - NANOCOMPÓSITOS

3.3.1 - Aspectos Gerais

Na natureza existem materiais híbridos, sintetizados através de processos químicos em meio aquoso, sob condições de pressão e temperatura ambientes, com mecanismos de “automontagem” envolvendo interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou forças de

van der Waals. Tais materiais que ocorrem na natureza apresentam arquitetura molecular e sinergia perfeitas entre os seus componentes. Um exemplo típico é o nacre (revestimento das pérolas) que consiste em lamelas nanométricas de aragonita (CaCO_3) dispersas numa mistura de proteínas e polissacarídeos (ESTEVEES *et al.*, 2004). Talvez seguindo a inspiração biológica os pesquisadores começaram a estudar uma forma de sintetizar materiais com características excepcionais, tentando aproximar-se do nível de controle da estrutura e propriedades dos compósitos naturais, numa tentativa de obter materiais avançados. A tendência atual na área dos compósitos é a preparação de materiais em que a interação entre os componentes ocorra em escala nanométrica ou molecular, os chamados nanocompósitos.

Os nanocompósitos são materiais híbridos em que pelo menos um dos componentes tem dimensões nanométricas (ESTEVEES *et al.*, 2004). Como acontece nos compósitos tradicionais, um dos componentes funciona como matriz, na qual as partículas do segundo material se encontram dispersas. Os componentes de um nanocompósito podem ser de natureza inorgânica/inorgânica, inorgânica/orgânica ou ainda orgânica/orgânica. No presente trabalho serão enfatizados os nanocompósitos de interface orgânica/inorgânica. A incorporação de cargas inorgânicas em polímeros origina materiais com maior resistência mecânica, maior estabilidade térmica ou com propriedades ópticas, magnéticas ou elétricas superiores. As cargas tendo dimensões nanométricas (1-500nm) apresentam uma área superficial elevada, o que favorece sua dispersão na matriz polimérica e por isso uma melhoria das propriedades físicas do compósito que dependem da homogeneidade do material. Na literatura estão descritas algumas aplicações dos nanocompósitos tais como, catálise, optoeletrônica, dispositivos magnéticos, tintas e revestimentos, dentre outras.

Entre as cargas mais utilizadas em nanocompósitos de matriz polimérica, encontram-se os carbonatos, os sulfatos, os alumínio silicatos e os óxidos metálicos (Al_2O_3 , Fe_2O_3 , ZnO). As argilas e os silicatos lamelares, como por exemplo, as montmorilonitas, são outro tipo de cargas que têm sido muito investigadas. As nanopartículas de materiais semicondutores, tais como CdS , ZnS , ou CdSe , têm também sido muito usadas devido às suas propriedades

ópticas. Devido às suas excelentes propriedades mecânicas, os nanotubos de carbono tem sido usados como agentes de reforço ideais para nanocompósitos poliméricos de alto desempenho. AJAYAN *et al.* (1994) relatou o primeiro nanocompósito polimérico utilizando CNTs como reforço e deste então o número de artigos e patentes referentes aos compósitos contendo nanotubos de carbono está aumentando a cada ano. Várias matrizes poliméricas são usadas para os nanocompósitos, incluindo termoplásticas, resinas termofixas, polímeros cristalinos líquidos, polímeros solúveis em água, polímeros conjugados, entre outros. As propriedades dos nanocompósitos poliméricos que podem ser melhoradas com a utilização dos CNTs incluem: a resistência a tração, módulo de elasticidade, a dureza, a temperatura de transição vítrea, condutividade térmica, condutividade elétrica, resistência ao solvente, propriedades óticas, etc., (COLEMAN *et al.*, 2006; SPITALSKY *et al.*, 2010; SAHOO *et al.*, 2010).

Os maiores problemas na preparação de nanocompósitos reforçados com CNT estão na dispersão eficiente dos nanotubos na matriz polimérica, na avaliação da dispersão, bem como no alinhamento e no controle dos CNTs na matriz. Existem vários métodos para a dispersão de nanotubos na matriz polimérica, como a mistura em solução, a polimerização *in situ*, funcionalização química dos nanotubos de carbono, etc.

3.3.2 - Nanocompósitos polímero/CNT

O maior obstáculo das pesquisas na área de nanocompósitos poliméricos a base de CNTs é a limitada compatibilidade entre os nanotubos e maioria das matrizes poliméricas. A funcionalização e solubilização de CNTs usando espécies orgânicas oligoméricas e poliméricas tem sido utilizada para produzir dispersões de nanotubos em matrizes poliméricas mais homogêneas (MONIRUZZAMAN e WINEY, 2006).

Existem quatro requisitos principais para a eficácia do nanocompósito. Tratam-se da razão aspecto, dispersão homogênea, alinhamento e transferência de tensão interfacial de carga da matriz para o reforço. A dispersão é provavelmente a questão mais relevante. Nanotubos devem ser dispersos uniformemente como nanotubos individualmente revestidos com

polímero. Isto é imperativo a fim de conseguir a transferência de carga eficiente do nanotubo para a rede polimérica. Isso também resulta em uma distribuição de tensão mais uniforme e minimiza a presença de centros de concentração de tensões (COLEMAN *et al.*, 2006). Nanotubos de carbono têm sido considerados como potenciais candidatos para atuarem como agentes de reforço em polímeros devido às suas excelentes propriedades físicas e mecânicas e diâmetros em escalas nanométricas (SO *et al.*, 2007, PAIVA *et al.*, 2004, THOSTENSON *et al.*, 2001; MONIRUZZAMAN e WINEY, 2006).

Entretanto, para a produção de nanocompósitos explorando as propriedades dos CNTs é fundamental que ocorra a dispersão homogênea e a adesão interfacial dos nanotubos com a matriz polimérica (MI *et al.*, 2007). As atrações de van der Waals entre os nanotubos fazem com eles formem aglomerados, resultando na insolubilidade dos CNTs na maioria dos solventes orgânicos e aquosos e na sua baixa dispersão em polímeros. Além disso, a adesão interfacial entre os nanotubos e a matriz polimérica deve ser alcançada para que ocorra a transferência de carga entre os mesmos.

Um ponto que chama a atenção é o desenvolvimento de técnicas que possibilitem um “ancoramento” efetivo dos nanotubos à matriz polimérica. Nesse sentido, as modificações químicas dos nanotubos representam uma alternativa promissora e têm sido utilizadas com sucesso para aumentar a dispersão dos nanotubos na matriz polimérica, podendo ser feitas através da inserção de grupos funcionais como carboxilas ou hidroxilas, através da oxidação dos CNT (PENG *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2002). Outras maneiras propostas para a dispersão homogênea dos CNT em matrizes poliméricas incluem: a suspensão direta de CNT na solução do polímero via ultra-sonificação (mistura em solução), a polimerização *in situ* na presença dos nanotubos e adição de surfactantes em compósitos polímero-CNT (SUN *et al.*, 2002), figura 3.8.

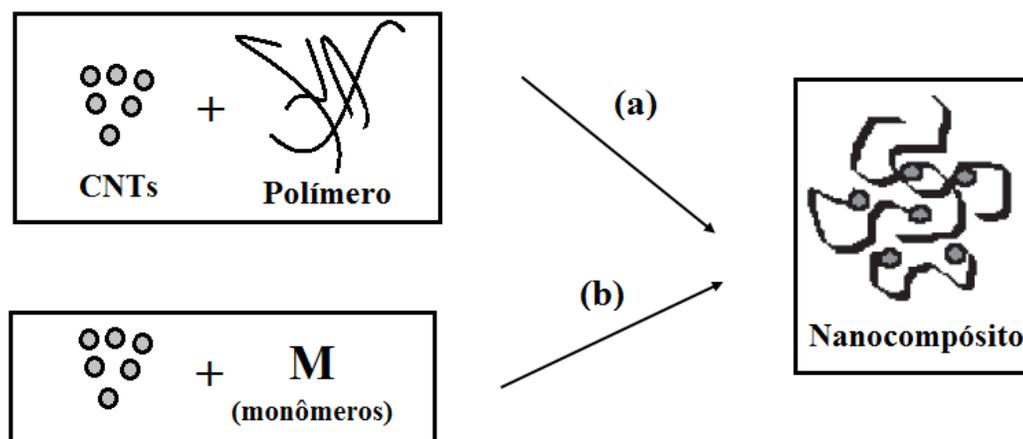


Figura 3.8 Principais métodos de síntese de nanocompósitos poliméricos utilizando CNTs (a) mistura em solução e (b) polimerização *in situ*. Adaptada de ESTEVES *et al.*, 2004.

No método mais comum, a mistura em solução, a matriz polimérica deve ser solúvel em algum solvente. Os nanotubos de carbono são adicionados em uma solução do polímero. O compósito CNT/polímero é formado por precipitação ou por evaporação do solvente. Sabe-se que é muito complicada a dispersão dos nanotubos em um solvente através de uma simples agitação. Um processo de ultra-sonificação é mais eficaz na formação de uma dispersão mais homogênea. Além disso, a funcionalização dos CNTs também pode ser realizada no intuito de promover sua melhor dispersão (COLEMAN *et al.*, 2006; SAHOO). A mistura em solução pode ser resumida nas seguintes etapas: dispersão de nanotubos em um solvente ou solução polimérica através de agitação enérgica, mistura de nanotubos e polímeros em solução através de agitação e evaporação controlada de solvente formando um filme compósito.

Na polimerização *in situ*, os CNTs estão dispersos com o monômero, seguido de polimerização. Neste método, uma porcentagem mais elevada de nanotubos de carbono pode ser facilmente dispersa, e por consequência, formar uma forte interação com a matriz polimérica. Este método é útil para a preparação de compósitos contendo polímeros que não podem ser processados em solução ou que são insolúveis e termicamente instáveis. A

principal vantagem deste método é que ele permite a enxertia de macromoléculas nas paredes dos CNTs (SUN *et al.*, 2002).

Alguns estudos têm mostrado que o PVA, é um bom candidato para formar compósitos com os CNT devido às excelentes propriedades desse polímero que contribuem para a formação de filmes (BARTHOLOME *et al.*, 2008; TONG *et al.*, 2006; PAIVA *et al.*, 2004). Esse polímero semicristalino possui excelentes propriedades na para formação de filmes, alta resistência à tração e flexibilidade. As hidroxilas presentes nas cadeias de PVA podem promover ligações fortes com CNTs oxidados que contém carboxilas e hidroxilas em sua superfície. Além disso, o filme de PVA possui excelente transparência, consistência macia quando na forma de membrana, além de apresentar excelente resistência química e ser biocompatível (COSTA JR, 2008).

3.3.3 - Aplicações como Biomateriais

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar focada no desenvolvimento e aplicação do conhecimento em química, física, engenharia, biologia, vida e ciências clínicas para a solução de problemas críticos de saúde, como perda de tecidos e falência de órgãos. Envolve a compreensão fundamental da relação função/estrutura de tecidos normais e patológicos para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função do tecido doente. Para engenharia de tecidos vivos *in vitro*, células são cultivadas em substratos bioativos degradáveis (*scaffolds*) que fornecem os sinais físicos e químicos para orientar diferenciação e organização celular em estruturas tridimensionais. Uma das questões mais críticas em engenharia de tecidos é a produção de *scaffolds* com propriedades físicas, mecânicas e biológicas adequadas para a obtenção dos tecidos desejados. *Scaffolds* atuam como substratos para o crescimento celular, proliferação e suporte para a formação de novos tecidos, desta forma tecnologias de fabricação de biomateriais desempenham um papel chave na engenharia de tecidos (ARMENTANO *et al.*, 2010).

Os materiais utilizados para aplicações em engenharia de tecidos devem ser concebidos para estimular a resposta celular específica, a nível molecular. Eles devem permitir interações específicas com as células e assim promover a proliferação e diferenciação celular, produção e organização da matriz extracelular. A seleção de biomateriais constitui um ponto chave para o sucesso da prática da engenharia de tecidos. Os requisitos fundamentais dos biomateriais utilizados na regeneração do tecido são a presença de superfícies biocompatíveis e propriedades mecânicas favoráveis. Materiais poliméricos como um único componente dificilmente satisfazem essas exigências. Na verdade, embora diversos materiais poliméricos estejam disponíveis e tenham sido investigados para engenharia de tecidos, nenhum polímero biodegradável pode cumprir todos os requisitos para *scaffolds* biomédicos. Portanto, a elaboração e preparação de sistemas poliméricos multicomponentes representam uma estratégia viável a fim de desenvolver biomateriais multifuncionais inovadores.

As subunidades básicas funcionais de células e tecidos são definidos em nanoescala, portanto, a compreensão e aplicação da nanobiologia e nanotecnologia representa uma nova fronteira de investigação em engenharia de tecidos. A nanotecnologia permite o desenvolvimento de novos sistemas que imitem a estrutura complexa e hierárquica do tecido nativo. Portanto, a confluência de nanotecnologia e biologia pode solucionar vários problemas biomédicos, e revolucionar o campo da saúde e medicina. Muitos componentes biológicos, tais como o DNA, envolvem dimensões nano, por isso, daí o interesse em utilizar nanomateriais para engenharia de tecidos. Já existem vários artigos científicos sobre o impacto dos nanomateriais na engenharia de tecidos. Por exemplo, nanopartículas de óxido de ferro super-paramagnéticas e pontos quânticos têm sido utilizados para controlar a biodistribuição das células. Nanomateriais a base de carbono, em especial, têm o potencial para usos múltiplos em engenharia de tecido (HARISON e ATALA, 2007).

Geralmente, nanocompósitos poliméricos são o resultado da combinação de matrizes poliméricas e material inorgânico/orgânico em escala nanométrica. A interação entre as nanoestruturas e a matriz polimérica é a base para o reforço mecânico e propriedades

funcionais dos nanocompósitos em relação aos compósitos convencionais. Materiais nanocompósitos mostram frequentemente uma excelente equilíbrio entre tenacidade e resistência mecânica e geralmente apresentam características superiores em relação aos seus componentes individuais. O osso natural é um material compósito formado pela matriz orgânica de colágeno e inorgânica de hidroxiapatita. Desse ponto de vista, os materiais compósitos são excelentes opções como *scaffolds* para a engenharia de tecido ósseo. Na verdade, as oportunidades existentes para os nanocompósitos poliméricos na área biomédica surgem a partir da multiplicidade de aplicações e na vasta necessidade de funcionalidades (MISRA *et al.*, 2007).

Biocompósitos nanoestruturados a base de colágeno e nanotubos de carbono foram preparados para potencial aplicação como *scaffold* na regeneração de tecido ósseo (SILVA *et al.*, 2009). O material preparado induziu a mineralização *in vitro* de cristais de hidroxiapatita, apresentou biofuncionalidade e biocompatibilidade *in vivo* como também biodegradabilidade.

Compósitos condutores e tridimensionais a base de MWNT, poli(hidroxibutirato) e Bioglass[®] foram preparados por MISRA *et al.* (2007) para aplicações em engenharia de tecido ósseo. Tal aplicação foi evidenciada pela formação de uma camada de hidroxiapatita em meio SBF. Os biomateriais biofuncionais preparados apresentaram bioatividade, integridade mecânica e estrutural bem como condutividade elétrica para aplicações como *scaffolds* porosos.

O tecido epitelial é considerado um material complexo e pode ser descrito como um material com propriedades elásticas, viscosas e plásticas (BISPO, 2009). As propriedades mecânicas da pele são determinadas principalmente pela camada epitelial denominada de derme. Os principais componentes da pele são colágeno, elastina e matriz extracelular sendo 72%, 4%, 20% os suas composições respectivas no tecido (HARRIS, 2009).

Na pele, a matriz extracelular é constituída por um tecido que circunda células que é substância fundamental (gel): sulfato de condroitina, querato-sulfato, ácido hialurônico.

Estas substâncias são hidrofílicas, portanto, absorvem um elevado conteúdo de água. São responsáveis pela arquitetura estrutural da pele e conferem propriedades viscosas à mesma. O colágeno resiste à tensão de deformação e é responsável pela força e rigidez do tecido. As fibras de colágeno são constituídas de cristais de tropocolágeno, que formam os blocos de microfibrilas de colágeno. Cada nível adicional de composição de fibras é arranjado de forma organizada em termos de relação e dimensão. As fibras elásticas são formadas por uma proteína chamada elastina e proporcionam extensibilidade. Os tecidos com maior quantidade de fibras elásticas possuem maior flexibilidade (HARRIS, 2009). Dessa forma, a pele é considerada uma mistura de biopolímeros e outras substâncias (BISPO, 2009). Os biomateriais classificados como substitutos temporários de pele são materiais eficazes no tratamento de queimaduras superficiais recentes e também na cobertura da pele enquanto aguarda-se o enxerto definitivo. Podem ser trocados em intervalos regulares ou mantidos até a cicatrização ou enxerto, caso a aderência seja boa ou não haja infecção.

As propriedades dos materiais substitutos de pele devem ser: aderência, permeabilidade para vapor de água, elasticidade, durabilidade, baixa antigenicidade e toxicidade, capacidade hemostática e ação antimicrobiana. Além disso, os substitutos atuais possuem valores típicos de tensão de tração na faixa de 2,5–16MPa. Eles podem ser classificados em substitutos biológicos que constituem os aloenxertos (homoenxertos) e xenoenxertos (heteroenxertos); substitutos sintéticos que podem ser constituídos por membranas de polímero de silicone, membranas de cloreto de polivinila, metacrilato de metila, membrana de polipropileno com poliuretano, dentre outros. (FERREIRA, 2003).

As propriedades de filmes de nanocompósitos a base de polímero e nanotubos de carbono podem ser moduladas de modo a assemelhem-se às propriedades mecânicas da pele natural, podendo ser utilizados como substitutos de pele. Os CNTs possuem o efeito de aumentar a resistência mecânica do material e o PVA confere maior flexibilidade aos filmes. Além disso, a presença de um componente biofuncional como a proteína Glicose Oxidase pode prover melhor biocompatibilidade e ainda fornecer uma barreira bactericida.

3.4 - AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são utilizados para medir respostas celulares após interações com biomateriais, visando detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. Existem três tipos de testes de citotoxicidade: o teste por eluição, o teste por contato direto e o teste por difusão em ágar (LOBO, 2008). Neste trabalho foi utilizado o teste por contato direto, no qual uma determinada quantidade do nanocompósito foi colocada diretamente sobre uma monocamada de cultura de células recoberta por meio de cultura. Esse teste detecta se há liberação de substâncias tóxicas pelo material e morte das células ou redução da taxa de crescimento celular.

3.4.1 - Redução do MTT

Uma técnica muito utilizada para avaliação da viabilidade celular por contato direto é a redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio ou sal de tetrazólio (MTT) por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, figura 3.9 (ORÉFICE *et al.*, 2006; WÖRLE-KNIRSCH *et al.*, 2006). O complexo enzimático transforma o sal de tetrazólio solúvel em água e de coloração amarela, em produtos finais de metabolização chamados de cristais de formazan (azul escuro) insolúveis em água que podem ser mensurados quantitativamente em espectrofotômetro a 595nm. Quanto maior a quantidade de formazan formada maior o número de células viáveis presentes na cultura. Somente as células vivas possuem a capacidade de reduzir o MTT indicando atividade mitocondrial e consequente viabilidade celular (CARVALHO, 2010).

Alguns estudos analisaram o efeito dos CNTs em meios celulares medindo a viabilidade/proliferação pelo ensaio MTT verificando que os nanotubos de carbono com parede simples e com paredes múltiplas, SWNT e MWNT, são capazes de converterem o MTT a formazan (BELYANSKAYA *et al.*, 2007).

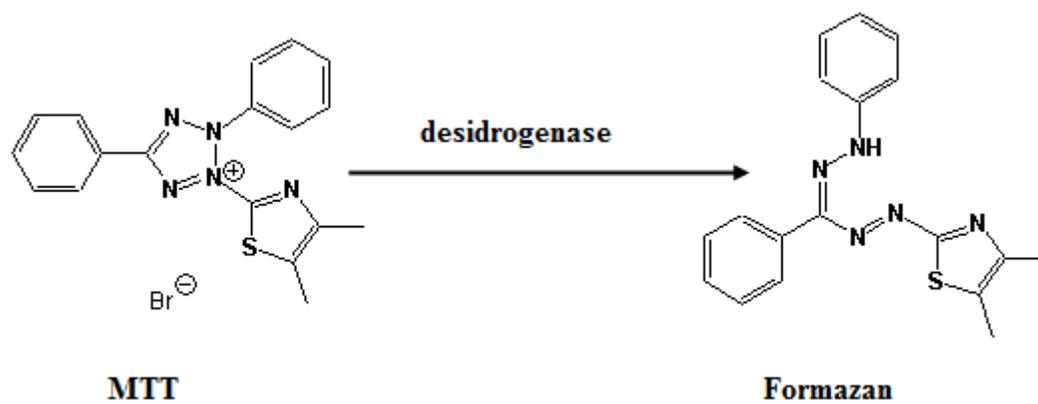


Figura 3.9 Redução do sal de MTT a formazan pelo complexo enzimático desidrogenase.

4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 - ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Na figura 4.1 estão mostradas as principais etapas de desenvolvimento deste trabalho.

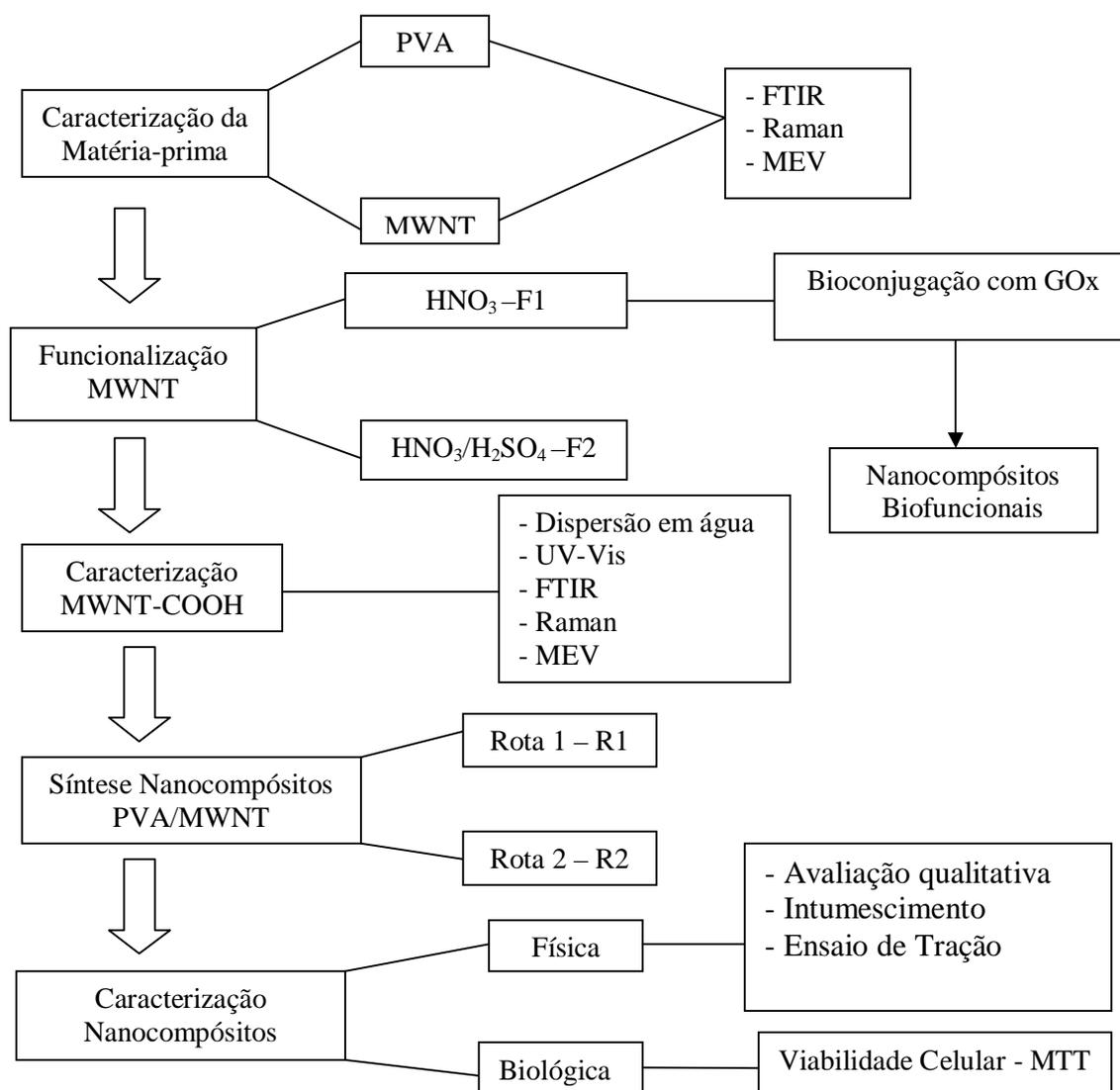


Figura 4.1 Fluxograma representando as etapas de desenvolvimento do trabalho.

4.2 - MATÉRIAS-PRIMAS

Poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila) (PVA), obtido pela Sigma-Aldrich de massa molar 9.000 a 10.000g/mol (80% hidrolizado).

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas sintetizados por CVD com 95% de pureza (comprimento 5-15 μ m e diâmetro 10-30nm) obtidos pela SES Research. Ácido nítrico (HNO₃) Synth e Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) Synth.

Água deionizada (DI) foi utilizada em todas as soluções com resistividade mínima de (18,0M Ω .cm) a 25°C.

4.2.1 - Caracterização das matérias-primas

As matérias primas, PVA e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT), foram caracterizadas através das técnicas de análise Espectroscópica na região do Infravermelho (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), Espectroscopia Raman e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Os espectros de FTIR foram obtidos pela técnica de reflexão total atenuada (ATR) na faixa de número de onda de 4000 a 650cm⁻¹ durante 4 varreduras (Spectrum One, Perkin-Elmer, USA).

Os espectros Raman foram obtidos à temperatura ambiente pelo espectrômetro Raman CCD de 1024x256 pixels, usando laser He-Ne com comprimento de onda de 632nm e potência de 20mW.

Os difratogramas dos filmes de PVA e dos MWNTs foram obtidos na região 3° < 2 θ < 90° com passo de 0,06° (PW 1710, Philips, CuK α , λ = 1,54056 Å).

A morfologia dos filmes de PVA e dos nanotubos de carbono com paredes múltiplas (MWNT) foi avaliada através da MEV (JSM 6360LV, JEOL/Noran). As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 15kV.

A morfologia dos nanotubos de carbono com paredes múltiplas foi avaliada através de TEM (Tecnai G2–Spirit - FEI – 2006). As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 120kV.

4.3 - Funcionalização dos Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono com paredes múltiplas foram funcionalizados (carboxilados) através de duas rotas distintas.

4.3.1 - Rota de Funcionalização HNO₃ (F1)

No experimento, 1g de MWNT foi adicionado a 50mL de solução de HNO₃ 14mol.L⁻¹ e deixado em um sistema de refluxo sob temperatura de 120°C por 15 horas (SILVA, 2007). Os nanotubos funcionalizados foram filtrados à vácuo utilizando filtro de fibra de vidro Millipore, lavados abundantemente com água deionizada até a obtenção de um pH próximo a 7 e secos por 48 horas em estufa a 60°C.

4.3.2 - Rota de Funcionalização HNO₃/H₂SO₄ (F2)

No experimento, 1g de MWNT foi adicionado a 50mL de mistura 1:3 v/v de HNO₃/H₂SO₄ e deixado sob aquecimento em temperatura de 100°C por 15 horas. Os nanotubos funcionalizados foram filtrados a vácuo utilizando filtro de fibra de vidro Millipore, lavados abundantemente com água deionizada até a obtenção de um pH próximo a 7 e secos por 48 horas em estufa a 60°C.

4.3.3 - Caracterização

4.3.3.1 - Dispersão dos nanotubos de carbono em água

Para verificar o efeito das funcionalizações químicas através de dispersão em água deionizada dos nanotubos funcionalizados pelas rotas distintas, foi realizado o procedimento de adição de 0,015g de MWNT ou 0,015g de MWNT-COOH (nanotubos de carbono com paredes múltiplas funcionalizados por carboxilação) em diferentes tubos plásticos contendo 40mL de água deionizada. As amostras foram deixadas por meia hora sob ultra-sonificação e, após esse processo, registradas três diferentes fotografias: a primeira logo após a retirada da amostras do ultra-som, a segunda após as amostras ficarem por 0,5h em repouso e a terceira após as amostras ficarem por 168h (sete dias) em repouso.

4.3.3.2 - Espectroscopia UV-Vis

Espectros UV-Vis dos MWNT e MWNT-COOH foram obtidos em um Espectrômetro Perkin Elmer Lambda EZ210. O espectro foi coletado a uma taxa de varredura de $200\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ e região espectral de 190-900nm. Para a análise, utilizou-se uma cubeta de quartzo contendo as dispersões aquosas de MWNT e de MWNT-COOH (funcionalizados pelas rotas HNO_3 (F1) e $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (F2)). As dispersões aquosas de concentração $0,02\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ foram preparadas em três balões volumétricos pela dispersão durante 1h no ultra-som das quantidades de MWNT-COOH funcionalizados pelas rotas F1 e F2.

4.3.3.3 - Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi usada para verificar a qualidade dos nanotubos de carbono utilizados e o efeito da funcionalização química (carboxilação) para os nanotubos de carbono com paredes múltiplas (MWNT). Uma parcela da amostra de nanotubos foi colocada sobre uma lâmina de vidro de forma que a superfície possuísse seções planas, para isso, foi utilizada outra lâmina para prensar a amostra. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente pelo espectrômetro Raman CCD de 1024×256 pixels, usando laser He-Ne com comprimento de onda de 632nm e potência de 20mW.

4.3.3.4 - Espectroscopia de Infravermelho

Para verificação da modificação química realizada nos nanotubos de carbono funcionalizados procederam-se análises de infravermelho (FTIR).

Os espectros de FTIR foram obtidos pelo modo ATR (reflexão total atenuada) na faixa de número de onda de 4000 a 650 cm^{-1} durante quatro varreduras (Spectrum One, Perkin-Elmer, USA). Os espectros de FTIR foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos presentes nas amostras.

4.3.3.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas antes e após funcionalização pelas rotas F1 e F2 foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM 6360LV, JEOL/Noran). As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 15kV.

4.3.3.6 – Difração de Raios X

A técnica de difração de raios X (DRX) foi realizada para verificar o efeito do procedimento de funcionalização química sobre a cristalinidade dos nanotubos de carbono. O difratograma foi obtido na região $3^\circ < 2\theta < 90^\circ$ com passo de $0,06^\circ$ (PW 1710, Philips, $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$).

4.4 - SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS PVA/MWNT

4.4.1 - Síntese de nanocompósitos - Rota 1

Os nanocompósitos foram sintetizados pela dispersão dos nanotubos em água deionizada por ultra-sonificação na concentração de 0,2%p/v. A essa dispersão foram adicionados o PVA à temperatura ambiente (concentrações do polímero na solução 5%p/v, 10%p/v e 28%p/v). O sistema foi deixado em banho maria a 70°C por três horas para dissolução completa do PVA. Os nanocompósitos resultantes foram obtidos na forma de filmes através de evaporação do solvente (*casting*) por 24 horas a temperatura ambiente e por 48 horas em

estufa a 40°C. As etapas de síntese dos nanocompósitos pela rota 1 estão apresentadas na figura 4.2.

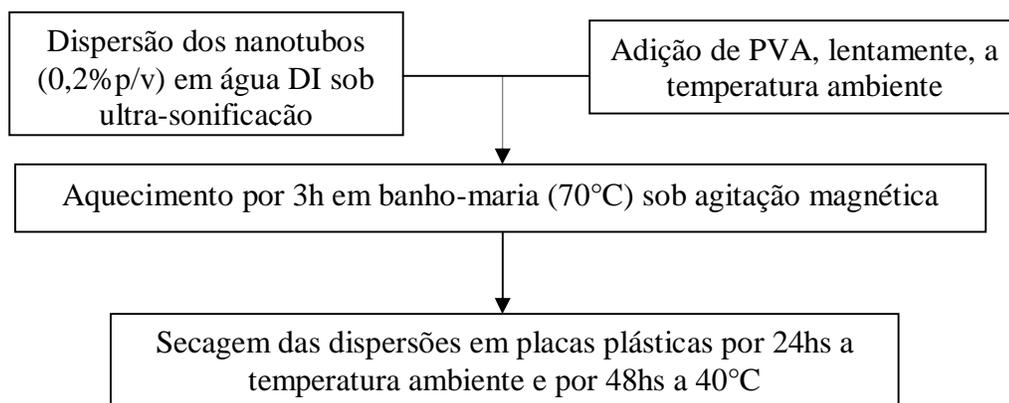


Figura 4.2 Fluxograma representando a rota 1 de síntese dos nanocompósitos.

Produziram-se nanocompósitos contendo PVA e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT-COOH) funcionalizados pelas rotas de F1 (HNO₃) e F2 (HNO₃/H₂SO₄) e nanocompósitos contendo PVA e MWNT sem funcionalização (nanotubos utilizados da maneira que foram obtidos comercialmente). Como referências foram preparados filmes contendo apenas PVA.

Foram sintetizados dez diferentes filmes conforme apresentado na tabela 4.1, sendo três tipos de filmes poliméricos contendo apenas PVA em três concentrações distintas (5%p/v, 10%p/v e 28%p/v) e seis tipos de nanocompósitos contendo a concentração constante de MWNT e MWNT-COOH (funcionalizado por F1) de 0,2%p/v nas três diferentes concentrações de PVA. Além disso, sintetizou-se um tipo de nanocompósito contendo nanotubos a 0,2%p/v funcionalizados por F2 na concentração de 28%p/v de PVA. A razão entre as concentrações percentuais p/v (R_n) entre o PVA e os nanotubos foi calculada segundo a equação 4.1.

$$R_n = \frac{[\text{PVA}]}{[\text{MWNT}]} \quad \text{Equação (4.1)}$$

Onde: [PVA] a concentração de PVA %p/v na suspensão aquosa do nanocompósito e [MWNT] a concentração de nanotubo %p/v na suspensão aquosa do nanocompósito.

A razão entre as concentrações percentuais p/v (R'_n) entre os nanotubos e o PVA (MWNT/PVA) foi calculada segundo a equação 4.2.

$$R'_n = \frac{[\text{MWNT}]}{[\text{PVA}]} \quad \text{Equação (4.2)}$$

Tabela 4.1 Identificação e concentração dos nanocompósitos sintetizados pela rota 1

	Amostra	Concentração de PVA na solução (%p/v)	Concentração de CNT na solução (%p/v)	Razão (R_n) PVA/MWNT	Razão (R'_n) MWNT/PVA
Referência	PVA 5%	5	0	∞	0
	PVA 10%	10	0	∞	0
	PVA 28%	28	0	∞	0
Rota 1	5%PMWNT/R1	5	0,2	25	4×10^{-2}
	5%PMWNT-F1/R1	5	0,2	25	4×10^{-2}
	10%PMWNT/R1	10	0,2	50	2×10^{-2}
	10%PMWNT-F1/R1	10	0,2	50	2×10^{-2}
	28%PMWNT/R1	28	0,2	140	7×10^{-3}
	28%PMWNT-F1/R1	28	0,2	140	7×10^{-3}
	28%PMWNT-F2/R1	28	0,2	140	7×10^{-3}

4.4.2 - Síntese de nanocompósitos - Rota 2

Na rota 2 a quantidade de água deionizada foi dividida em duas partes iguais. Em uma delas os nanotubos foram dispersos durante 0,5h sob ultra-sonificação. Com a outra parcela de água, foi preparada a suspensão aquosa do PVA em banho-maria a 70°C e sob agitação magnética. Ambas as dispersões foram misturadas por gotejamento, à temperatura ambiente sob ultra-sonificação, com obtenção de soluções com concentrações de 0,2%p/v em nanotubos, para concentrações de 5%p/v, 10%p/v e 28%p/v em PVA. Os filmes de nanocompósitos foram obtidos através de evaporação do solvente por 24 horas a temperatura ambiente e por 48 horas em estufa a 40°C. As etapas de síntese dos nanocompósitos pela rota 2 estão apresentadas na figura 4.3.

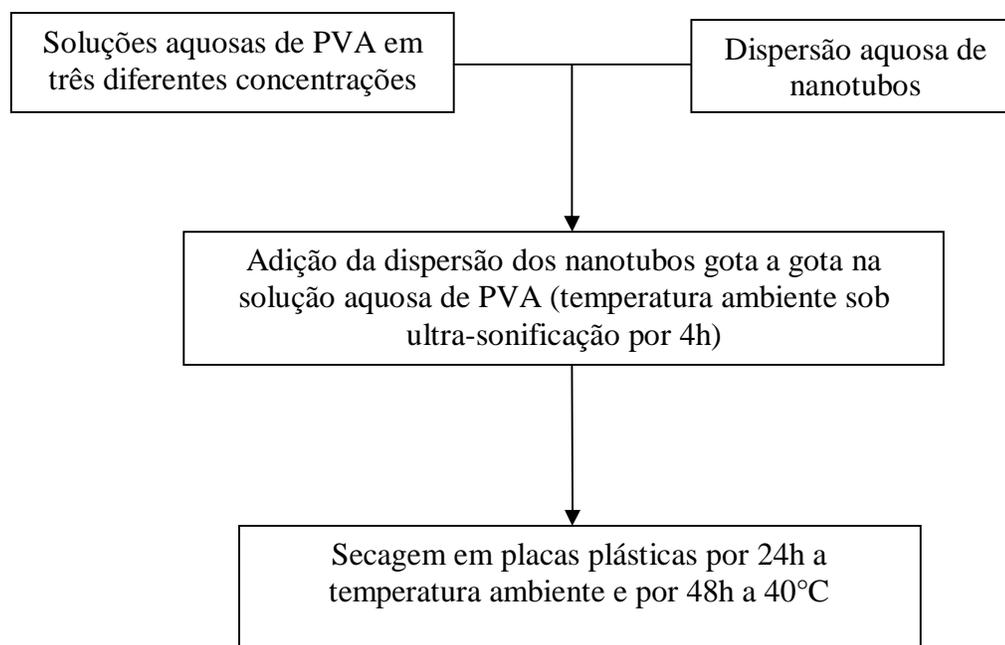


Figura 4.3 Fluxograma representando a rota 2 de síntese dos nanocompósitos.

Na tabela 4.2 são apresentadas as composições das nove amostras de nanocompósitos obtidas pela rota 2. Dessas, três são filmes poliméricos (referências), contendo apenas PVA, em três concentrações distintas e as outras seis são nanocompósitos contendo a

concentração constante de nanotubos de carbono funcionalizados ou não funcionalizados de 0,2% p/v nas três diferentes concentrações de PVA utilizados.

A razão entre as concentrações percentuais p/v (R_n) entre o PVA e os nanotubos foi calculada segundo a Eq. 4.1.

A razão entre as concentrações percentuais p/v (R'_n) entre o os nanotubos e o PVA (MWNT/PVA) foi calculada segundo a Eq. 4.2.

Tabela 4.2 Identificação e concentração dos nanocompósitos sintetizados pela rota 2

	Amostra	Concentração de PVA na solução (%p/v)	Concentração de CNT na solução (%p/v)	Razão (R_n) PVA/MWNT	Razão (R'_n) MWNT/PVA
Referência	PVA 5%	5	0	∞	0
	PVA 10%	10	0	∞	0
	PVA 28%	28	0	∞	0
Rota 2	5%PMWNT/R2	5	0,2	25	4×10^{-2}
	5%PMWNT-F1/R2	5	0,2	25	4×10^{-2}
	10%PMWNT/R2	10	0,2	50	2×10^{-2}
	10%PMWNT-F1/R2	10	0,2	50	2×10^{-2}
	28%PMWNT/R2	28	0,2	140	7×10^{-3}
	28%PMWNT-F1/R2	28	0,2	140	7×10^{-3}

4.4.3 - Caracterização dos nanocompósitos

4.4.3.1 - Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa e dimensional foi executada através de observações visuais levando-se em conta a miscibilidade e segregação de fase nos nanocompósitos preparados pelas rotas R1 e R2, além disso foi realizada medição da espessura dos filmes obtidos utilizando micrômetro Mitutoyo ($\pm 10\mu\text{m}$) em temperatura ambiente e em triplicata.

4.4.3.2 - Ensaio de Intumescimento

O grau de intumescimento dos filmes de nanocompósitos foi obtido com utilização de solução tampão fosfato salino (PBS - Tampão de fosfato salino). O PBS foi preparado conforme COSTA JR (2008) à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) dissolvendo-se os reagentes nas proporções mostradas na tabela 4.3 em água deionizada sob agitação magnética constante e o pH corrigido para o valor de $(7,40\pm 0,05)$ com solução HCl $1,0\text{mol.L}^{-1}$.

Tabela 4.3 Reagentes utilizados para o preparo de um litro de solução PBS (COSTA JR, 2008)

Reagente	Massa (g)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na_2HPO_4	1,44
KH_2PO_4	0,24

Para a determinação do grau de intumescimento (GI) as amostras (filmes bidimensionais) foram cortadas em triplicata nas dimensões de $10\times 10\text{mm}$, deixadas por 24h em estufa a 40°C para retirada de umidade e pesadas. Após a pesagem, as amostras foram colocadas em recipientes contendo solução PBS. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente em banho-maria. Após cumpridos os intervalos de tempo pré-estabelecidos (0,5h, 1h, 2h, 4h, 24h, 96h) as amostras foram retiradas do recipiente e pesadas. A fim de retirar o excesso de

fluido, as amostras foram colocadas rapidamente (< 20s) sobre papel filtro e então pesadas em balança analítica (ROSINA *et al.*, 2004). O GI foi obtido conforme a equação 4.3.

$$GI = \frac{M_I - M_S}{M_S} \times 100 \quad \text{Equação (4.3)}$$

Onde: M_I é a massa intumescida e M_S a massa da amostra seca. Cada experimento foi realizado em triplicata e o valor médio foi usado para validar os resultados.

4.4.3.3- Ensaio de Tração

O ensaio de tração foi realizado para avaliar o comportamento mecânico, através de: limite de resistência à tração (LRT), módulo de elasticidade (E), limite de escoamento (σ_e) e tenacidade (T) dos filmes obtidos. O ensaio foi executado em equipamento EMIC DL 3000, utilizando uma célula de carga de 50N, velocidade de ensaio de 5mm/min e corpos de prova na forma de tiras de 50mm de comprimento e 15mm largura. Foram obtidos valores médios de cinco amostras conforme ASTM D882/02. As amostras selecionadas foram previamente inspecionadas e quaisquer descontinuidades, tais como, bolha de ar e furos com dimensão superior a 5% da espessura foram rejeitadas. Na figura 4.4 está mostrada a imagem de uma amostra de nanocompósito sob ensaio de tração.



Figura 4.4 Amostra de nanocompósito sob ensaio de tração.

4.4.3.4 - Viabilidade de células VERO *in vitro* por MTT dos nanocompósitos

As amostras de filmes de nanocompósitos com 200 μ m de espessura foram cortadas em quatro replicatas na forma de discos de 5mm de diâmetro com auxílio de um perfurador de papel. As amostras cortadas foram colocadas em placa de cultura de células de poliestireno de 96 poços e submetidas ao processo de esterilização pela exposição a vapor saturado de óxido de etileno. Após a esterilização foram adicionados em cada poço 250 μ L de meio mínimo de Eagle (MEM) e a placa foi mantida sob incubação à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas.

Células VERO (ATCC CCL-81 - cultura de células epiteliais a partir de rim de macacos verdes africanos) foram semeadas na concentração de 5×10^5 células/mL nos poços da placas de poliestireno contendo as amostras e em poços sem amostras usados como referência (controle). A solução MEM complementada com 2mmol.L⁻¹ de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (FBS) foi então adicionada nos poços. Esse sistema foi incubado à 37°C com 5% de CO₂ por quatro horas. Após quatro horas de cultivo, os sobrenadantes dos poços foram retirados e repostos com 100 μ L/poço de Meio Mínimo de Eagle complementada com L-glutamina e 10% de SFB. Em seguida foram adicionados 30 μ L/poço da solução de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), Sigma Aldrich, na concentração de 5mg/mL. Após esse período, as placas foram observadas em microscópio óptico para visualização dos cristais de formazan. A placa foi então reincubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 4h, ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação com o MTT, foram adicionados 35 μ L/poço da solução de sódio dodecil sulfato (SDS) com solução de 10%v/v de HCl. A placa foi levemente homogeneizada com a mão e reincubada por 14-16h em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, ao abrigo da luz. Em seguida os cristais intracitoplasmáticos foram solubilizados por pipetagem (50 vezes), cuidadosamente, sem fazer espuma. Os sobrenadantes foram transferidos para nova placa (100 μ L de cada poço) e se procedeu a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 595nm no aparelho Asys Hitech GmbH, modelo Expert Plus Microplate Reader. Como parâmetro de comparação para os ensaios de citotoxicidade foi adotado como controle

negativo o meio celular com adição de Triton X-100 na concentração de 0,1%v/v, sem adição de nenhuma parcela dos nanocompósitos e como controle positivo o meio celular.

4.5. BIOCONJUGAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO COM A ENZIMA GLICOSE OXIDASE

4.5.1 – Síntese dos MWNT-CONHGOx

Foi preparada uma dispersão de 0,25g de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados pela rota F1/HNO₃ (MWNT-COOH) em 8,5mL de solução tampão PBS pH 7,40, com o auxílio de ultra-sonificação por uma hora.

Enquanto a dispersão dos nanotubos estava sob ultra-sonificação, foi preparada a solução de 25mg de EDC (*N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida hidrocloreto, Sigma-Aldrich) e 28,3mg de sulfo-NHS (*N*-Hidroxisulfosuccinimida sal sódico, Sigma-Aldrich) (razão molar EDC:sulfo-NHS de 1:1) em 0,5mL de solução tampão PBS. Os reagentes foram homogeneizados utilizando o vortex por cerca de um minuto.

Foi preparada a solução da enzima Glicose Oxidase Tipo VII de *Aspergillus Níger* - GOx (Sigma-Aldrich) de concentração 5mg/mL através da mistura em vortex de 5mg da enzima em 1mL de solução PBS.

A solução EDC/sulfo-NHS (0,5mL) recém preparada foi misturada com a dispersão de MWNT-COOH através de ultra-sonificação por 15 minutos. Após a ultra-sonificação foi adicionada ao sistema 1mL da solução da enzima GOx (5mg/mL). A mistura final foi deixada por 2h sob agitação magnética lenta e a temperatura ambiente (tempo de conjugação), figura 4.5. Após o término do período de conjugação, os nanotubos biofuncionalizados foram filtrados utilizando um sistema de filtração à vácuo e lavados abundantemente com água deionizada (até obtenção de 500mL de filtrado) para remoção dos reagentes remanescentes. Os nanotubos biofuncionalizados (MWNT-CONHGOx) foram guardados em suspensão aquosa (concentração 5g.L⁻¹) e acondicionados na geladeira.

Como referência, foi realizado um experimento em paralelo no qual a dispersão dos nanotubos funcionalizados (MWNT-COOH) em solução PBS foi misturada à solução da enzima glicose oxidase (nas mesmas concentrações relatadas no procedimento experimental anterior) sem a adição dos reagentes de acoplamento EDC/sulfo-NHS. Tal sistema foi denominado de MWNT-COOH+ GOx.

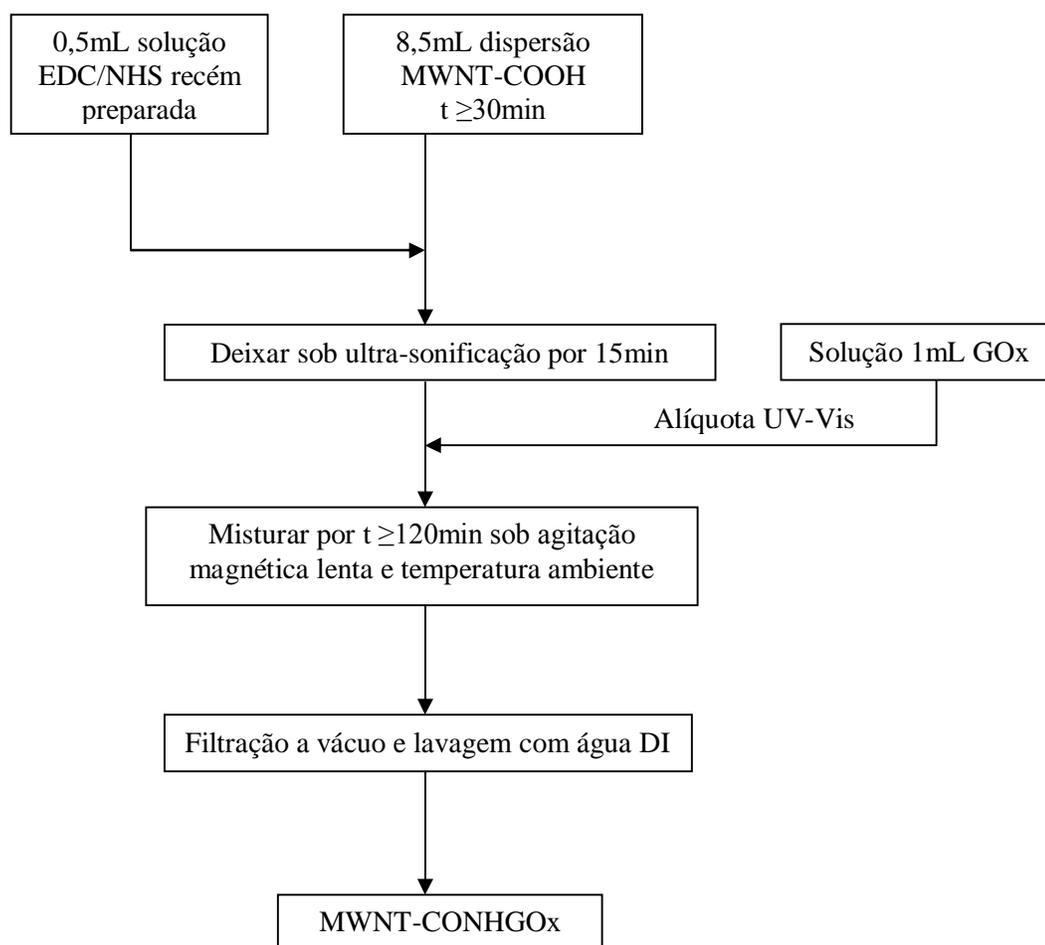


Figura 4.5 Fluxograma representando a síntese dos MWNT-CONHGOx.

4.5.2 – Análise da atividade da enzima GOx

Para a avaliação da atividade da enzima Glicose Oxidase conjugada nos nanotubos, foi utilizado o indicador de oxidação/redução TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina, Sigma-

Aldrich) e a enzima peroxidase HRP (*horse radish peroxidase*, Sigma-Aldrich), na presença de D-Glicose (Sigma-Aldrich).

Foram pipetados 1,2mL de uma suspensão aquosa de MWNT-CONHGOx de concentração $0,03\text{g.L}^{-1}$ e adicionados em uma cubeta de quartzo, onde foram adicionados sucessivamente $600\mu\text{L}$ de solução tampão PBS, $12\mu\text{L}$ de solução da enzima HRP em PBS (1g.L^{-1}), $300\mu\text{L}$ de solução aquosa de TMB (1g.L^{-1}) e $900\mu\text{L}$ de solução de D-Glicose em PBS (9g.L^{-1}). Após a adição de todos os reagentes, a atividade da enzima GOx foi avaliada pela formação do produto de coloração azul produzido pela oxidação do TMB.

Para confirmação da atividade de GOx, as amostras foram separadas de acordo com a descrição apresentada na tabela 4.4. A amostra Referência 1 foi constituída pelos nanotubos funcionalizados (MWNT-COOH). A amostra chamada de Referência 2 foi constituída também pelos nanotubos funcionalizados, porém misturados com a enzima GOx sem a presença dos reagentes de conjugação EDC/sulfo-NHS (MWNT-COOH+GOx). A Referência 3 foi somente água. A amostra MWNT-CONHGOx foi preparada com nanotubos bioconjugados covalentemente com GOx. Essas amostras foram escolhidas para comparação entre os seus resultados dos testes de atividade de GOx e confirmação da presença da enzima bioconjugada covalentemente nos nanotubos.

Tabela 4.4 Amostras utilizadas nos testes de atividade da enzima GOx

Amostra	Descrição
MWNT-COOH	Referência 1
MWNT-COOH + GOx	Referência 2
Água	Referência 3
MWNT-CONHGOx	Atividade da GOx

4.5.3 – Síntese dos nanocompósitos PVA/MWNT-CONHGOx

Os filmes de nanocompósitos foram preparados utilizando-se os nanotubos biofuncionalizados com GOx (MWNT-CONHGOx) obtidos de acordo com o item 4.5.2. Os nanocompósitos foram sintetizados através da dispersão dos nanotubos em água deionizada durante trinta minutos sob ultra-sonificação na concentração de 0,2%p/v, o PVA na concentração de 28%p/v foi disperso nesta suspensão em banho-maria e sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 4h. A suspensão do nanocompósito foi vertida em placas plásticas e deixada por quatro dias no dessecador para obtenção dos filmes.

4.5.4 – Análise Qualitativa do Sistema PVA/MWNT-CONHGOx quanto à Potencial Inibição de Crescimento Bacteriano

Para verificar qualitativamente a possibilidade de inibição do crescimento bacteriano pelos nanocompósitos contendo a enzima GOx (PVA/MWNT-CONHGOx) foi realizado um procedimento piloto adicionando-se uma amostra de 50×50mm do filme de nanocompósito contendo os nanotubos bioconjugados em uma placa de petri de poli(estireno) estéril. A essa placa foram adicionados 10mL de solução de D-Glicose em PBS 6,0mol.L⁻¹ e 1mL de solução aquosa da bactéria *Streptococcus mutans*. A placa foi deixada por 7 dias sob agitação mecânica branda em mesa agitadora (QUIMIS). Como referência foi realizado o experimento nas mesmas condições para a amostra de filme de nanocompósito não bioconjugado com GOx, 28%PMWNT-F1/R1.

As amostras foram submetidas ao teste de atividade da enzima GOx. Foram pipetados 1,2mL de uma suspensão aquosa de MWNT-CONHGOx de concentração 0,03g.L⁻¹ e adicionados em uma cubeta de quartzo, onde foram adicionados sucessivamente 1,2mL de água deionizada, 582µL de solução tampão PBS, 18µL de solução da enzima GOx (1mg/mL), 12µL de solução da enzima HRP em PBS (1mg/mL), 300µL de solução aquosa de TMB (1mg/mL) e 900µL da cultura bacteriana dos nanocompósitos. A solução de cultura bacteriana foi considerada como a solução fornecedora de glicose que será oxidada pela enzima GOx.

4.5.5 – Caracterização

A evolução da reação de oxidação do TMB durante o teste de atividade da enzima Glicose Oxidase foi acompanhada durante 40min ($t_0=0\text{min}$, $t_1=5\text{min}$, $t_2=10\text{min}$, $t_3=20\text{min}$, $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$) por UV-Vis Espectrômetro Perkin Elmer Lambda EZ210 a uma taxa de varredura de $200\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ e região espectral de 500-800nm. A verificação da atividade da enzima GOx e o consumo da glicose nos filmes nanocompósitos após cultura bacteriana foi realizada pela evolução da reação de oxidação do TMB e acompanhada durante quinze minutos por UV-Vis Espectrômetro Perkin Elmer Lambda EZ210 a uma taxa de varredura de $200\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ e região espectral de 500-800nm.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

5.1.1 - PVA e MWNT

5.1.1.1 - Espectroscopia de Infravermelho

No caso dos filmes do PVA, a análise FTIR foi realizada para verificar a presença dos picos relativos aos principais grupamentos químicos presentes em sua cadeia polimérica, dentre os principais grupos estão a hidroxila e o acetato.

A banda observada entre $3355\text{-}3209\text{cm}^{-1}$ (figura 5.1), no espectro FTIR do filme de PVA, refere-se à vibrações do tipo estiramento das hidroxilas (O-H) provenientes de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. A banda observada entre $2950\text{-}2890\text{cm}^{-1}$ é referente ao estiramento das ligações C-H dos grupos alquila e os picos próximos à 1720cm^{-1} referem-se aos estiramentos das ligações C=O e C-O dos grupos acetatos do PVA (MANSUR *et al.*, 2007).

A tabela 5.1 apresenta as principais bandas de FTIR e grupos químicos usualmente associados ao copolímero PVA.

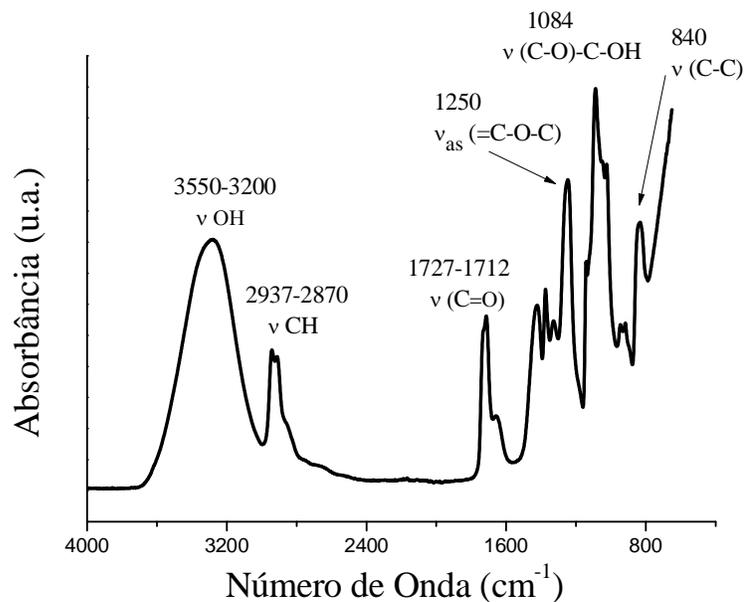


Figura 5.1 Espectro FTIR obtido para o filme de PVA.

Tabela 5.1 Números de onda e grupos característicos associados para o PVA (COSTA JR, 20087; MANSUR *et al.*, 2007)

Amostra	Bandas (cm ⁻¹)	Grupos Químicos Associados	Amostra	Bandas (cm ⁻¹)	Grupos Químicos Associados
PVA e PVAc	3550 – 3200	ν (OH) OH...OH	PVA	1329	δ (OH) – C-OH
PVA e PVAc	2937 – 2870	ν (CH)	PVA	1254	ν (=CO-C)
PVAc	1727 – 1712	ν (C=O)	PVA	1084	ν (C-O)-C-OH
PVA e PVAc	1650 – 1630	δ (OH) OH...OH	PVA e PVAc	922	δ (CH) – CH ₂
PVA	1461 – 1417	δ (CH) – CH ₂	PVA	842	ν (C-C)
PVA	1366	δ CH – R-CH ₃			

Na figura 5.2 está mostrado o espectro FTIR, na região de 1000 a 4000 cm^{-1} para a amostra de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Não foram observadas bandas importantes para a caracterização dos MWNT. Uma banda pouco intensa foi observada em 1590 cm^{-1} e refere-se ao modo vibracional dos MWNTs (WU *et al.*, 2005).

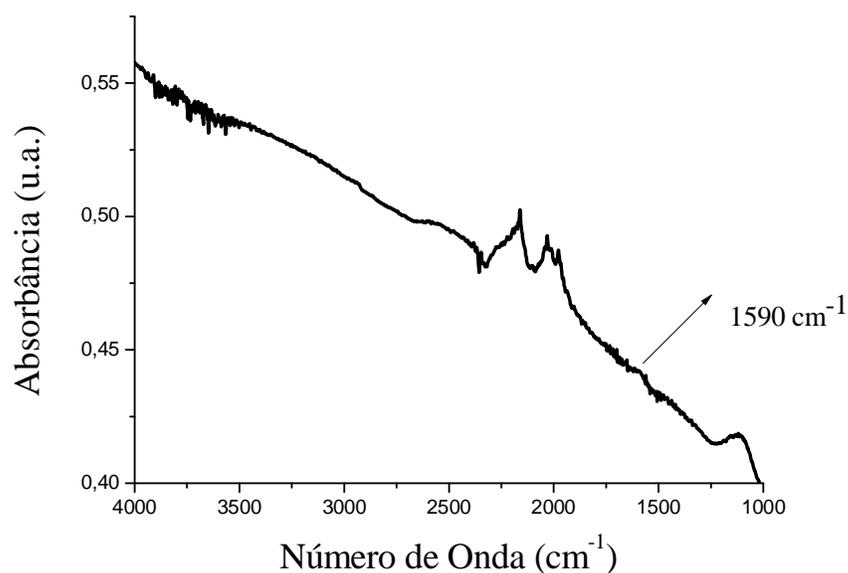


Figura 5.2 Espectro FTIR obtido para MWNT.

5.1.1.2. Espectroscopia Raman

A figura 5.3 mostra o espectro Raman para o filme de PVA. No espectro, a banda centrada em 2922 cm^{-1} , referente à vibração do tipo estiramento das hidroxilas presentes na cadeia do PVA, apresenta-se em maior intensidade quando comparada com os demais picos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

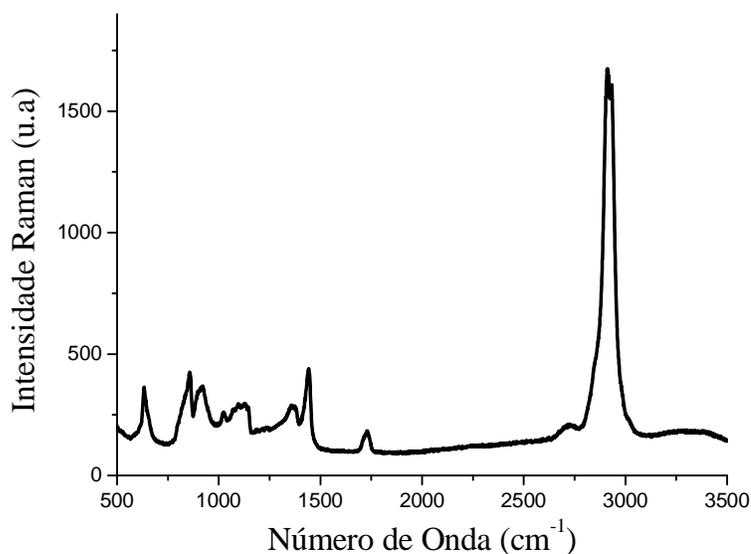


Figura 5.3 Espectro Raman para o PVA.

A partir da análise do espectro Raman obtido para a amostra de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, figura 5.4, pode-se concluir que a amostra não possuía nanotubos de parede simples, pois não foram observadas bandas relacionadas ao modo de vibração radial na região de 100 a 400cm⁻¹. No mesmo espectro estão presentes a banda D (1326cm⁻¹) relacionada às estruturas desordenadas próprias de nanotubos defeituosos e carbono não cristalino, a banda G (1580cm⁻¹) relacionada aos nanotubos perfeitos e a banda G' (2660cm⁻¹) referente ao segundo harmônico da banda D (LOBO, 2008).

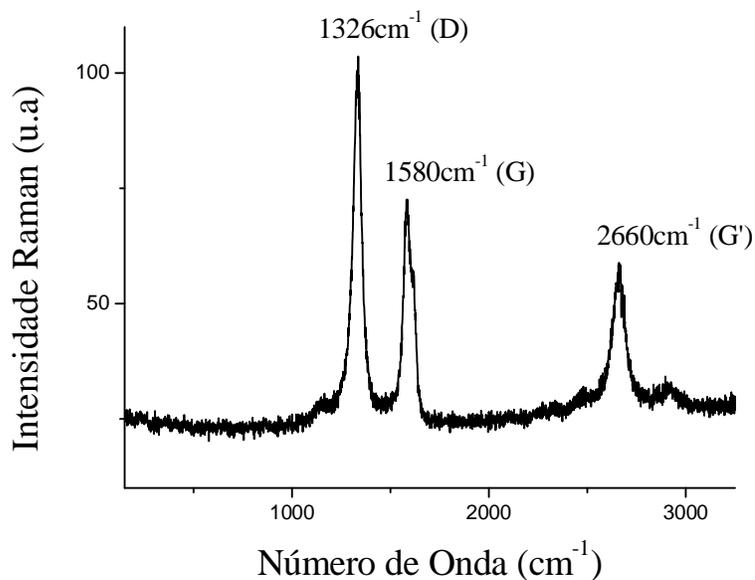


Figura 5.4 Espectro Raman para os MWNT.

5.1.1.3. Difração de Raios X

O difratograma obtido para o filme de PVA está representado na figura 5.5. As reflexões observadas são compatíveis com a célula unitária monoclinica proposta por BUNN (1948) com parâmetros de rede $a = 7,81 \text{ \AA}$, $b = 2,52 \text{ \AA}$, $c = 5,51 \text{ \AA}$ e $\beta = 91,7^\circ$. Para a célula unitária monoclinica, ao nível molecular, os cristalitos de PVA podem ser descritos como uma estrutura em camadas, na qual uma dupla camada de moléculas se mantém unidas através de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas, enquanto forças mais fracas de van der Waals ocorrem entre as outras duas duplas camadas (MANSUR, 2007).

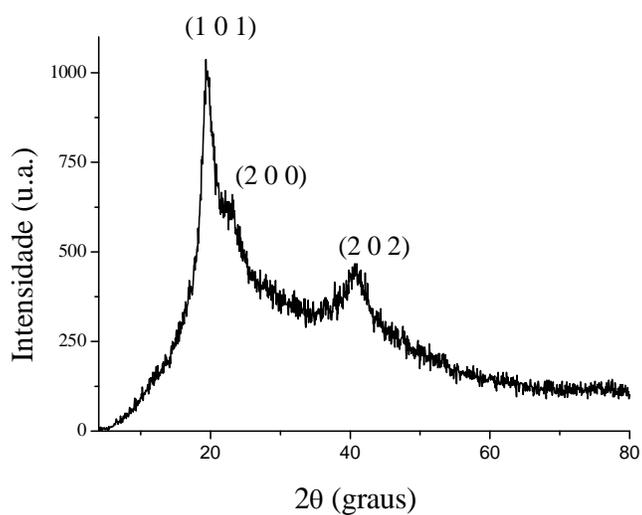


Figura 5.5 Difratoograma obtido para o filme de PVA.

Para os nanotubos de carbono de paredes múltiplas os picos de difração foram observados em $2\theta=26,1^\circ$ e $2\theta=42,8^\circ$ (figura 5.6) e correspondem à estrutura grafítica e resíduos de partículas catalíticas encapsuladas nas paredes dos nanotubos, respectivamente (WU *et al.*, 2005).

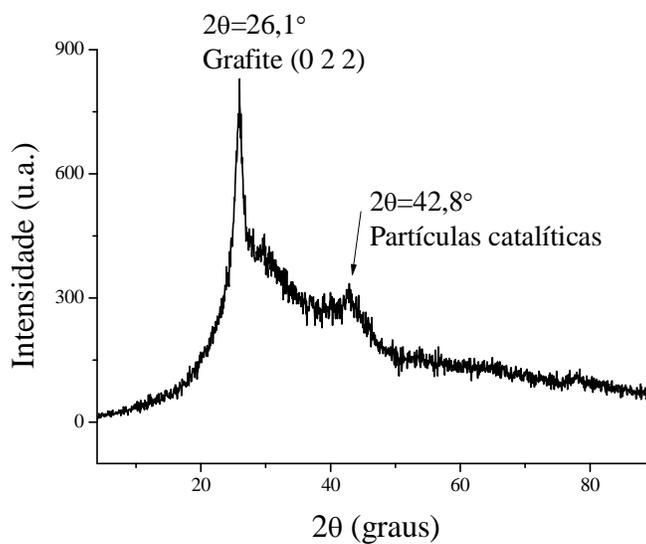


Figura 5.6 Difratoograma obtido para o MWNT.

5.1.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas por MEV sob diversas ampliações para o filme de PVA, figura 5.7, mostram a uniformidade na textura da amostra e que não há presença de poros na mesma.

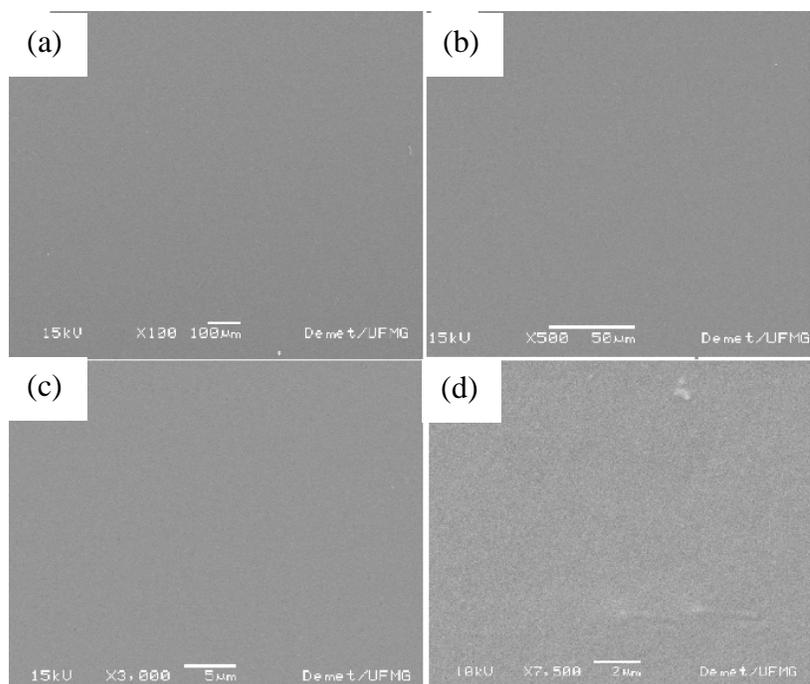


Figura 5.7 Imagens do filme PVA obtidas por MEV sob diversas ampliações (a) 100X, (b) 500X, (c) 3.000X e (d) 7.500X.

As características morfológicas dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas visualizadas por MEV mostram que tais materiais apresentam-se emaranhados e aparentemente sem impurezas, como partículas catalíticas (figura 5.8). Pode-se observar ainda a estrutura filamentosa com espessura em escala nanométrica e comprimento muito maior que a espessura.

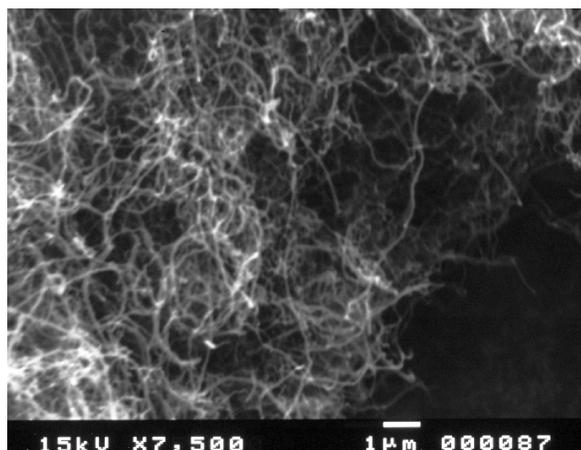


Figura 5.8 Imagem obtida por MEV para MWNT.

5.1.1.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A imagem obtida por TEM para amostra de MWNT, apresentada na figura 5.9, mostra a estrutura do nanotubo confirmando a ausência de impurezas remanescentes do catalisador.

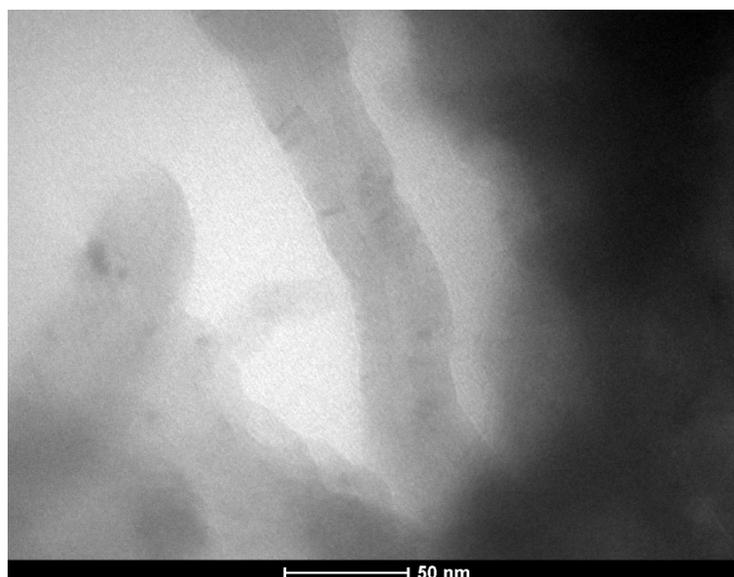


Figura 5.9. Imagem obtida por TEM para a amostra de nanotubos de carbono com paredes múltiplas.

5.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS FUNCIONALIZADOS

5.2.1 - Dispersão dos nanotubos de carbono em água

O ultra-som é utilizado na dispersão dos nanotubos em um solvente, pois promove a separação dos agregados de tubos unidos por interações de van der Waals. Ao se analisar as fotografias apresentadas na figura 5.10, percebem-se que tanto os CNTs funcionalizados com carboxilas (MWNT-COOH) quanto os CNTs não funcionalizados (MWNT) são dispersos em água pela ultra-sonificação, fato evidenciado pela cor escura da suspensão. Porém, logo após a retirada dos frascos contendo as suspensões do ultra-som, observa-se a sedimentação dos nanotubos não funcionalizados. Essa sedimentação fica mais evidenciada com o aumento do tempo de repouso do frasco contendo os nanotubos não funcionalizados. Nos frascos contendo os CNTs funcionalizados por F1 e F2, de fato houve a dispersão dos nanotubos a qual permaneceu estável mesmo após sete dias de repouso. Com isso pode-se concluir que ocorreu alguma modificação química nos nanotubos de carbono relacionada com a formação de grupos carboxílicos em sítios defeituosos (paredes ou pontas) dos CNTs promovida pela oxidação dos nanotubos.

A dispersão dos nanotubos pode ser chamada de uma dispersão coloidal – *estado intermediário entre uma solução e uma suspensão, no qual as partículas de soluto são suficientemente grandes para espalhar a luz visível, mas bastante pequenas para não sedimentarem* – (KOTZ E TREICHEL, 2002). A dispersão dos nanotubos funcionalizados em água forma um colóide hidrofílico, no qual os mesmos são atraídos fortemente pelas moléculas de água. Os grupos polares (-OH e -COOH) presentes na superfície dos nanotubos oxidados formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água estabilizando o colóide e, por consequência, reduzindo a sedimentação dos CNTs.

Após a oxidação, os nanotubos dispersam espontaneamente em água e permanecem estáveis por muitos meses com uma quantidade mínima de material agregado precipitando com o passar do tempo. A precipitação pode ser acelerada pela adição de compostos iônicos, particularmente os ácidos. Como relatado na literatura, a oxidação química dos

nanotubos induz a formação de uma superfície carregada negativamente, principalmente devido à ionização dos grupos ácidos superficiais (carboxilatos). A repulsão eletrostática promove um aumento da estabilidade da dispersão coloidal (SHAFFER *et al.*, 1998).



Figura 5.10 Dispersões aquosas dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas não funcionalizados (a), (d), (g), funcionalizados por F1, HNO_3 (b), (e), (h) e funcionalizados por F2 $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (c), (f), (i), logo após a retirada dos frascos do ultra-som; após 0,5h e após 168h (sete dias) da retirada dos frascos.

5.2.2 - Espectroscopia UV-Vis

A figura 5.11 mostra a influência do tratamento ácido para o espectro UV-Vis dos nanotubos de carbono. O espectro obtido para MWNT, figura 5.10 (a), não revela nenhum pico de absorção entre 200-900nm. Porém, para a dispersão aquosa contendo os nanotubos funcionalizados (MWNT-COOH), por F2 e F1, apresentados na figura 5.11 (b) e (c), respectivamente, há a formação de um pico de absorção em aproximadamente 258 nm. Esse mesmo pico já foi observado por JIANG *et al.* (2003) para nanotubos de carbono de paredes múltiplas purificados com tratamento ácido, revelando que a funcionalização química com grupos carboxílicos dos MWNTs foi realizada com êxito.

Os elétrons pi (π) presentes no orbital molecular dos átomos de carbono dos MWNT participam da formação da nova ligação com as carboxilas. O pico de absorção a 260nm observado através do UV-Vis, figura 5.11 (b) e (c), para os MWNT carboxilados indicam a transição $n \rightarrow \pi^*$ de um par de elétrons não-ligantes da ligação $-C=O$ dos grupos carboxílicos ($-COOH$) inseridos nas superfícies dos nanotubos (YADAV *et al.*, 2009).

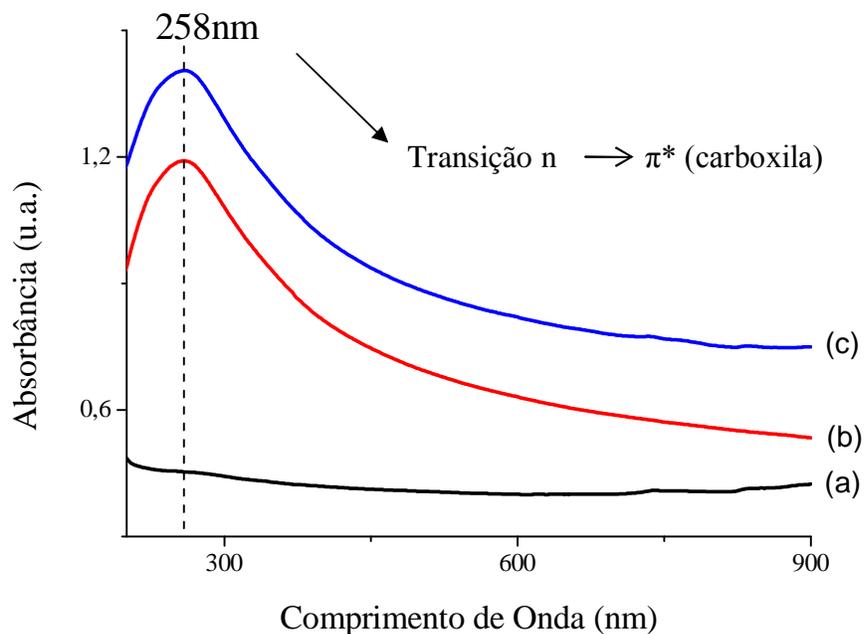


Figura 5.11 Espectros UV-Vis obtidos para os nanotubos (a) sem modificação química, (b) para os nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados por F2 HNO₃/H₂SO₄ e (c) nanotubos funcionalizados por F1 HNO₃.

5.2.3 - Espectroscopia Raman

Nas figuras 5.12 e 5.13 estão mostrados os espectros Raman obtidos para as amostras de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com carboxilas (MWNT-COOH) por F1 e F2, respectivamente. Em ambos os espectros estão observadas as bandas características dos materiais carbonosos, bandas D, G e G'.

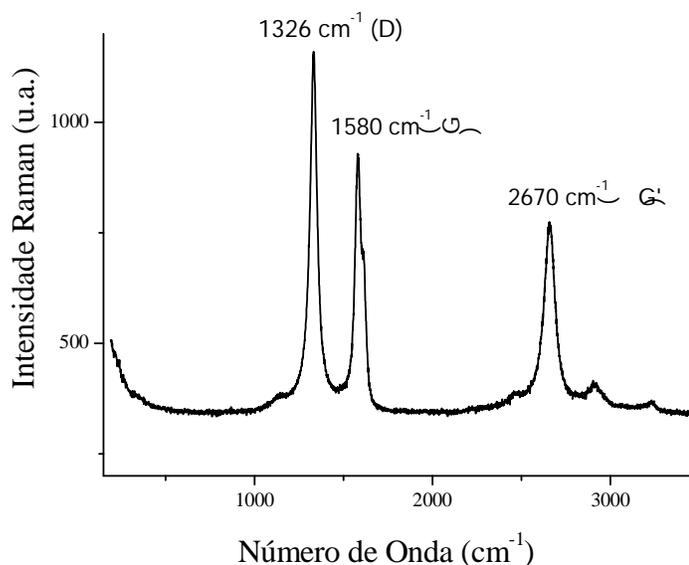


Figura 5.12 Espectro Raman para os nanotubos de carbono com paredes múltiplas funcionalizados por F1.

HERBST *et al.* (2004) relata que dentre as técnicas espectroscópicas empregadas na caracterização de fulerenos e CNTs, a espectroscopia Raman é uma das mais valiosas tornando-se uma técnica amplamente utilizada para caracterização de materiais carbonosos, identificando os tipos de ligações e fornecendo informações sobre o grau de desordem da rede cristalina. No caso dos CNTs, ela possibilita a diferenciação entre nanotubos, grafite e carbono amorfo.

Um espectro típico de uma amostra de nanotubos de carbono possui, em geral, duas bandas bem características: a banda G, centrada em cerca de 1580-1590 cm^{-1} , associada aos modos de vibração tangencial do grafite, e a banda D, centrada em aproximadamente 1350 cm^{-1} , associada a defeitos e/ou desordem (LOBO *et al.*, 2005). A banda D é característica de carbono desordenado, sendo que sua largura e intensidade são fatores que variam com o grau de desordem do material. Assim, a análise da forma, posição e intensidade relativa destas bandas permitem a identificação da presença de nanotubos de paredes simples e/ou de paredes múltiplas, bem como, do grau de pureza e/ou defeitos na amostra.

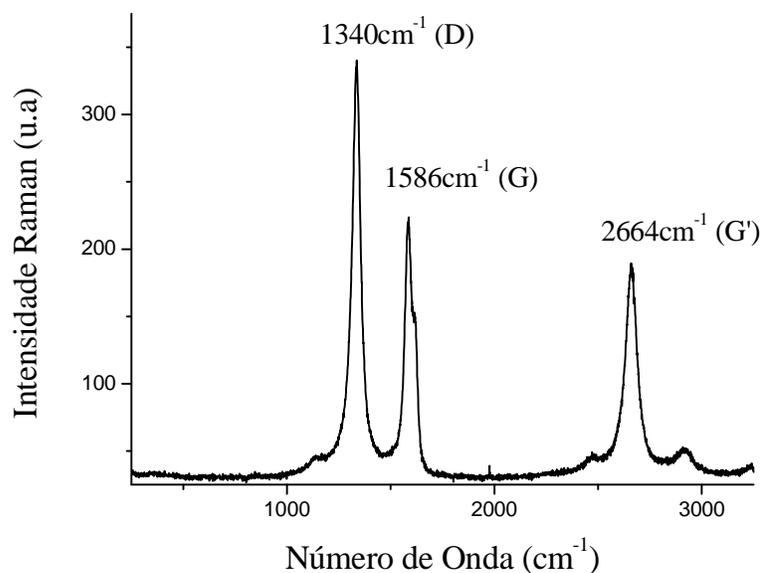


Figura 5.13 Espectro Raman para os nanotubos de carbono com paredes múltiplas funcionalizados por F2.

O grau de desordem na estrutura dos nanotubos de carbono pode ser estimado através da razão entre as intensidades relativas das bandas D e G (I_D/I_G), PAIVA *et al.*, (2004). Quanto menor o valor da razão I_D/I_G maior o grau de grafitização, ou seja, menor será a concentração de defeitos estruturais nos tubos (carbonos sp^3). E quanto maior o valor I_D/I_G maior será a extensão da funcionalização química. Na figura 5.14 estão mostrados os espectros para os nanotubos de carbono de paredes múltiplas não funcionalizados, funcionalizados por F1 e funcionalizados por F2. Através desses espectros foram calculadas as razões I_D/I_G e verificada a ocorrência de modificação química bem como a sua extensão para cada rota de funcionalização.

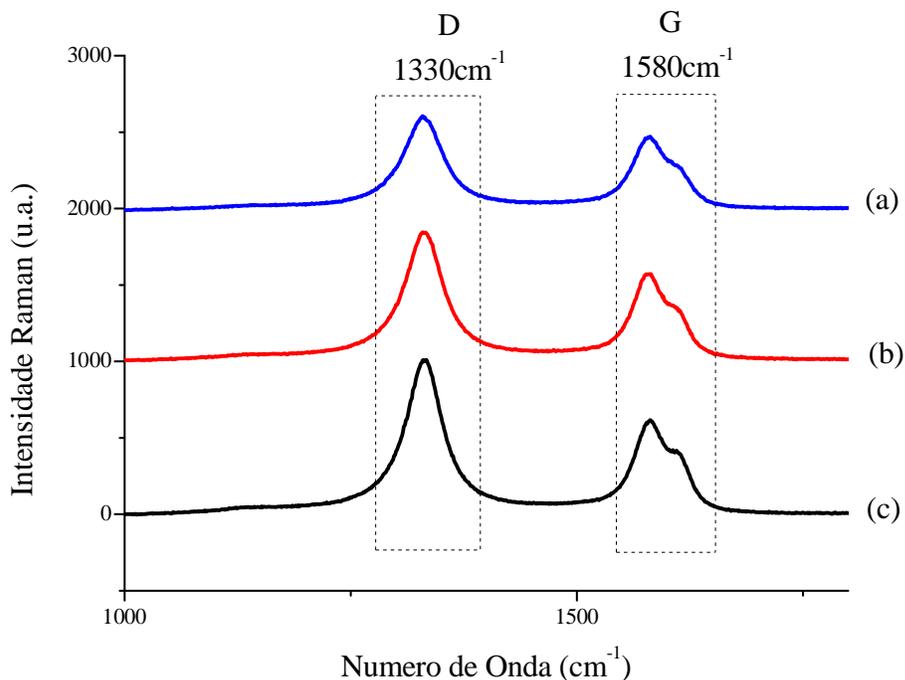


Figura 5.14. Espectros Raman para (a) MWNT, (b) MWNT-COOH funcionalizados por F1 e (c) por F2.

Para os nanotubos de carbono sem funcionalização a razão I_D/I_G foi igual a 1,25. Para os nanotubos de carbono funcionalizados por F1 a razão I_D/I_G foi igual a 1,44 e funcionalizados por F2 a razão I_D/I_G foi igual a 1,57. A avaliação das intensidades relativas das bandas D e G sugere a presença de defeitos nos nanotubos de carbono induzidos pela funcionalização química e que a rota de funcionalização F2 provavelmente promoveu uma maior desordem e modificação química nos nanotubos em comparação com F1. Na tabela 5.2, estão sumarizadas as principais informações obtidas pela técnica espectroscópica Raman.

Tabela 5.2 Resumo da análise por espectroscopia Raman para as amostras MWNT e MWNT-COOH

Amostra	Banda	Estrutura	Número de onda (cm ⁻¹)	Razão I _D /I _G
MWNT	D	Nanotubo perfeito	1326	1,25
	G	Carbono amorfo, desordem	1580	
	G'	2º hamônico da banda D	2660	
MWNTCOOH-F1	D	Nanotubo perfeito	1326	1,44
	G	Carbono amorfo, desordem	1580	
	G'	2º hamônico da banda D	2670	
MWNTCOOH-F2	D	Nanotubo perfeito	1340	1,57
	G	Carbono amorfo, desordem	1586	
	G'	2º hamônico da banda D	2664	

5.2.4 - Espectroscopia de Infravermelho

Na caracterização dos CNTs a espectroscopia de infravermelho é muito utilizada para determinar impurezas remanescentes da síntese dos nanotubos ou moléculas aderidas na superfície dos mesmos. Os principais modos ativos dos nanotubos de carbono na espectroscopia de infravermelho são A_{2u} e E_{1u}. Para os MWNTs esses modos foram observados por KASTNER *et al.* (1994) em cerca de 868 e 1575cm⁻¹, respectivamente.

Nos espectros obtidos para os nanotubos funcionalizados por F1 e F2, figura 5.15 (b) e (c), respectivamente, puderam ser observadas as bandas em torno de 1570cm⁻¹ referentes ao modo de vibração E_{1u}. Foram observadas ainda as bandas em 1745cm⁻¹ relacionadas às vibrações do tipo estiramento dos grupos carboxílicos formados nos nanotubos após a

funcionalização. No espectro apresentado na figura 5.15 (a), MWNT, não foi observada a banda referente às carboxilas, mostrando que as rotas de funcionalização F1 e F2 podem ser utilizadas na produção de nanotubos modificados com carboxilas.

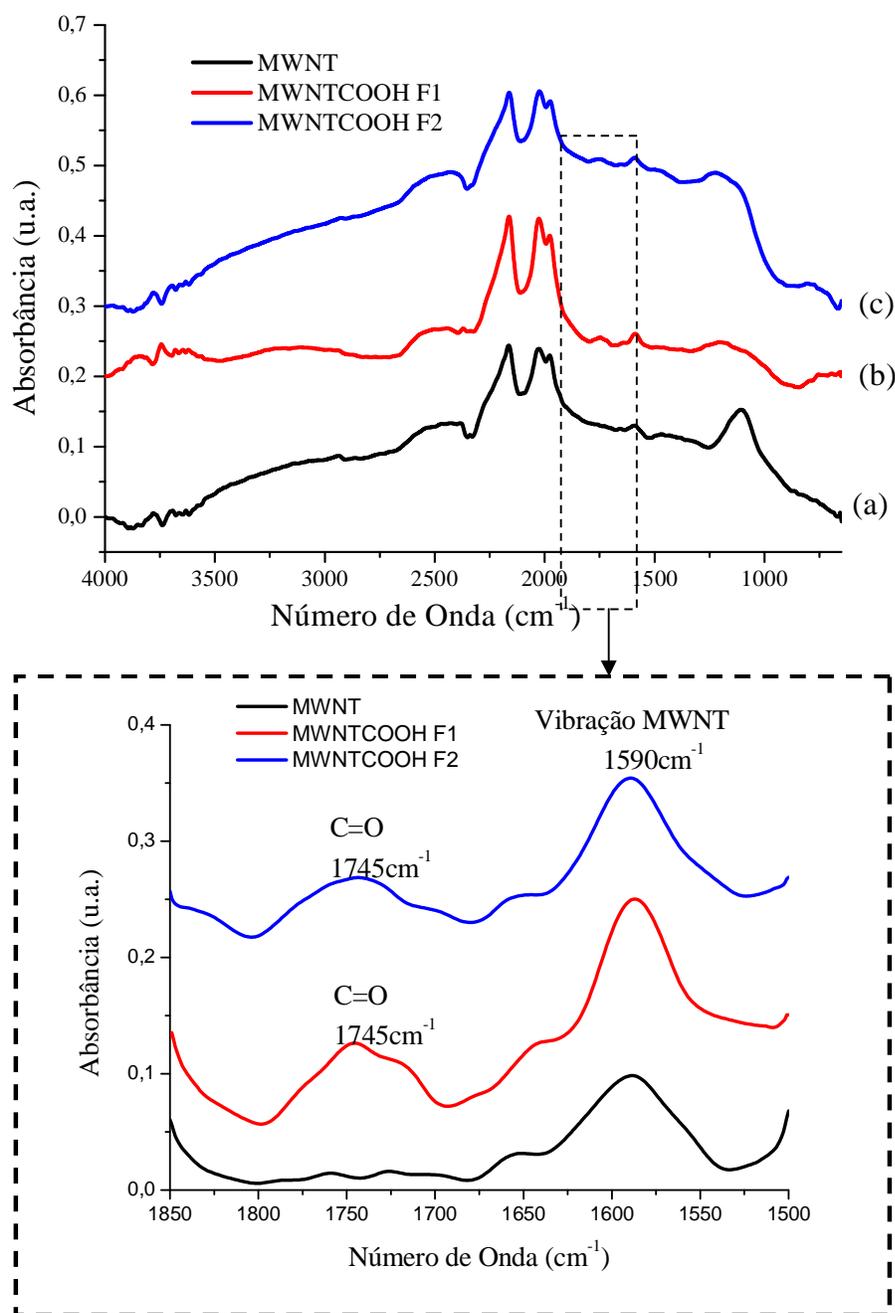


Figura 5.15 Espectros FTIR dos (a) MWNT, (b) funcionalizados por F1 e (c) MWNT-COOH funcionalizados por F2. Abaixo o espectro ampliado e 1850-1500cm⁻¹.

5.2.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura

Algumas mudanças nas características morfológicas antes e após a funcionalização química dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, visualizadas por MEV são claramente notadas. Na figura 5.16 (a) podem ser visualizados os MWNTs não funcionalizados. Neste caso é possível visualizar que os nanotubos encontram-se menos aglomerados e emaranhados. Ao visualizar os MWNT-COOH obtidos por F1 (HNO_3) e F2 ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), Fig. 5.16 (b) e (c), respectivamente, percebem-se que os feixes de nanotubos encontram-se mais emaranhados, esfoliados e de difícil separação visual. A funcionalização química pode ter alterado a estrutura regular dos CNTs, provocando a quebra das paredes dos nanotubos em diferentes sítios (GOYANES *et al.*, 2007).

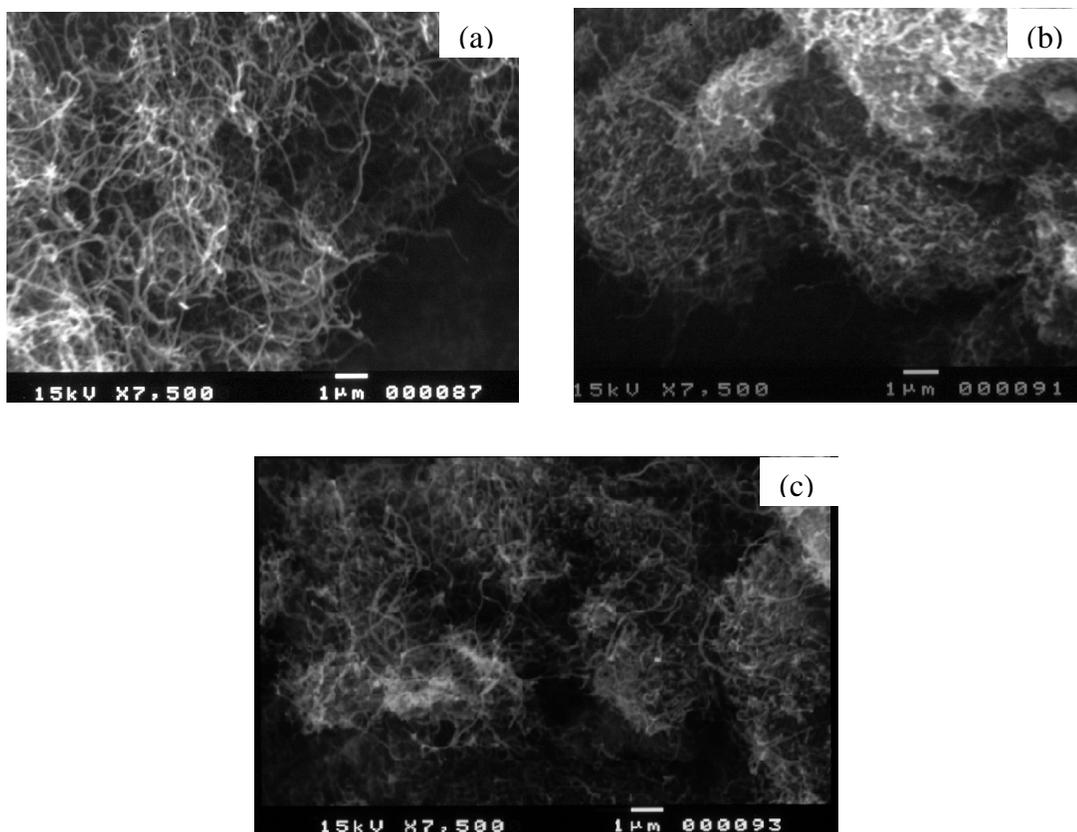


Figura 5.16 Imagens obtidas por MEV para MWNT (a), MWNT-COOH funcionalizados por F1 (b) e MWNT-COOH funcionalizados por F2 (c).

5.2.6 – Difração de Raios X

O difratograma obtido para os nanotubos de carbono funcionalizados por F1, Fig. 5.17 (a), preserva os picos observados para os nanotubos não funcionalizados, porém o pico referente à estrutura gráfica ($2\theta=26,1^\circ$) é alargado e de maior intensidade em relação à amostra de MWNT não funcionalizado (figura 5.17 (b)). Tal alargamento e aumento de intensidade podem estar relacionados com o efeito do procedimento de funcionalização química que deve promover a desorganização da estrutura dos nanotubos.

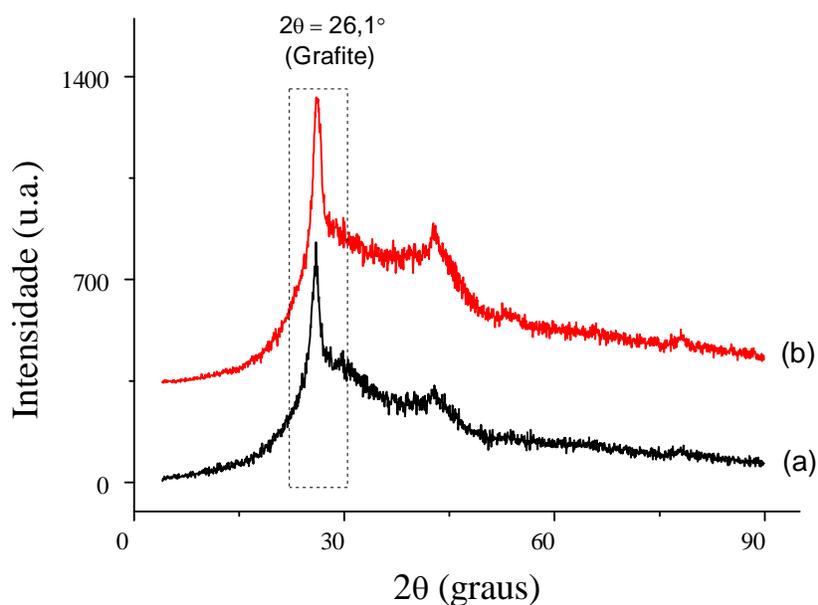


Figura 5.17 Difratogramas obtidos para as amostras de MWNT-COOH F1 (a) e MWNT (b).

5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NANOCOMPÓSITOS

5.3.1 - Caracterização nanocompósitos sintetizados pela Rota 1

5.3.1.1 - Avaliação qualitativa

Os filmes de PVA e dos nanocompósitos apresentaram-se com espessura média de ($200 \pm 50\mu\text{m}$), mas ajustando-se o volume de solução no molde podem-se obter espessuras finais variadas.

A análise visual dos filmes de PVA (referência) mostrou que eles apresentaram transparência e uniformidade.

Os aspectos dos filmes de nanocompósitos 5%PMWNT/R1 e 5%PMWNT-F/R1 são semelhantes. Na figura 5.18 (a) é mostrada a aparência desses filmes, na qual foram observadas nanotubos aglomerados e dispersos grosseiramente pela matriz polimérica. Pela análise visual das amostras, percebe-se que quanto menor a concentração de PVA na solução precursora do filme nanocompósito maior é a aglomeração dos nanotubos. Como nesses filmes há elevado teor de água, a evaporação demora a ocorrer, o que proporciona uma menor interação dos nanotubos com o polímero e uma maior aglomeração dos mesmos. Os CNTs interagem entre si via interações de van der Waals sedimentando no meio aquoso, formando feixes aglomerados estáveis que não são dispersos durante a rota de síntese e acabam não interagindo com o PVA.

A análise visual também indica a semelhança entre as amostras de filmes dos nanocompósitos 10%PMWNT/R1, 10%PMWNT-F/R1, 28%PMWNT/R1, 28%PMWNT-F1/R1 e 28%PMWNT-F2/R1. Percebeu-se a dispersão homogênea dos MWNTs na matriz de PVA, figura 5.18 (b). Isso pode ser explicado pela maior interação dos nanotubos com o PVA, uma vez que este se encontra em maior concentração. Além disso, a presença da funcionalização química nos nanotubos pode induzir a uma maior interação, via ligações de hidrogênio entre os mesmos e o polímero.

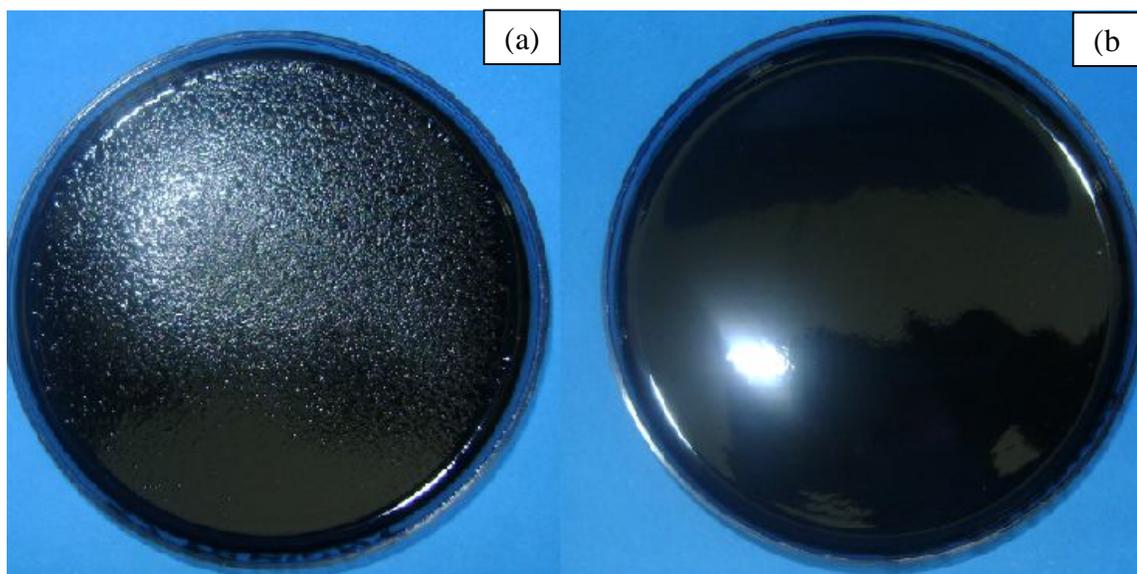


Figura 5.18 Fotografias mostrando as aparências dos filmes de nanocompósitos 5%PMWNT/R1, 5%PMWNT-F/R1 - com menor concentração de PVA (a) e 10%PMWNT/R1, 10%PMWNT-F/R1, 28%PMWNT/R1, 28%PMWNT-F1/R1 e 28%PMWNT-F2/R1 - maior concentração de PVA (b).

5.2.1.2 - Ensaio de Intumescimento

Os experimentos de intumescimento conduzidos nos filmes de PVA apresentaram uma elevada taxa de dissolução que foi completa em aproximadamente 15 minutos, não sendo possível analisar a absorção de água desses materiais. Esse fato já era esperado, pois o PVA com grau de hidrólise 80% utilizado no preparo dos filmes é altamente hidrofílico e solúvel em água (COSTA JR, 2008). O PVA em contato com a água faz com que as interações de hidrogênio PVA-PVA sejam substituídas por interações PVA-água-PVA, acompanhado de um aumento de volume.

Considerando que o PVA utilizado no presente trabalho apresenta grau de hidrólise relativamente baixo (80%) e massa molar (9.000 a 10.000g/mol) ocorre a dissolução em água na temperatura ambiente (20-25°C) uma vez que em filmes contendo PVA com estas

características o intumescimento é seguido da solvatação das cadeias de PVA pela água até a completa dissolução dos mesmos, que ocorre em poucos minutos (MANSUR, 2007).

Os ensaios de intumescimento com os filmes sintetizados a partir de soluções com baixa concentração de PVA (5%PMWNT/R1, 5%PMWNT-F/R1, 10%PMWNT/R1 e 10%PMWNT-F1/R1) revelaram que a presença dos nanotubos nesses materiais não afetou a taxa de dissolução do filme de PVA puro. Isso porque a dissolução dos nanocompósitos em solução PBS foi completa em 15 minutos de experimento. A baixa dispersão dos nanotubos pela matriz polimérica formando regiões aglomeradas de CNTs pode ter promovido sua baixa adesão interfacial com a matriz de PVA. A fraca interação do PVA com os nanotubos proporcionou a disponibilidade das cadeias poliméricas hidrofílicas para a interação com a água, solvatação, até a completa dissolução do filme.

Os experimentos de intumescimento com os filmes nanocompósitos com maior concentração de PVA (28%PMWNT/R1 e 28%P80MWNT-F1/R1) revelaram resultados interessantes. Tais amostras apresentaram manutenção da forma em período superior a 96 horas de experimento. Este fato pode ser atribuído à interação dos nanotubos de carbono com o polímero, estabilizando a rede emaranhada do PVA, tornando-a mais rígida e menos flexível, reduzindo a disponibilidade dos grupos hidrofílicos (hidroxilas) e deixando a dissolução desfavorável. Ao exame visual, os filmes apresentaram apreciável aumento de volume.

O comportamento de intumescimento para as duas diferentes amostras de nanocompósitos foi próximo possuindo um valor máximo de cerca de 90% para o 28%PMWNT/R1 e cerca de 100% para o 28%PMWNT-F1/R1, em três horas e meia de experimento. Nas figuras 5.19 e 5.20 são apresentadas as curvas de intumescimento e o histograma de intumescimento para os diferentes nanocompósitos, respectivamente.

O filme de nanocompósito 28%PMWNT-F2/R1 apresentou uma rápida dissolução, bem próxima à obtida para o filme de PVA puro, em cerca de 15 minutos. Isso pode estar associado ao fato de que a funcionalização química dos nanotubos pela rota F2 seja tão

extensiva a ponto de promover a formação de muitos grupos polares em sua superfície e/ou até mesmo a quebra dos mesmos, formando tubos mais curtos. Tais fatores em conjunto podem ter diminuído a barreira física representada pelos nanotubos de carbono na matriz de PVA. Quando em contato com a água, as interações PVA-nanotubo-PVA foram rompidas e formadas as interações de hidrogênio PVA-água-PVA com solvatação das cadeias poliméricas até a completa dissolução dos filmes.

De acordo com COSTA JR., 2008, o intumescimento do PVA é cerca de 500%. Então, pode-se concluir que a presença dos nanotubos de carbono na rede do PVA reduz drasticamente o intumescimento, devido à formação de uma rede polimérica mais densa e com menor capacidade de expansão. Ainda o aumento da rigidez da cadeia polimérica provocado pela barreira física dos nanotubos e a interação nanotubo-PVA, via ligações de hidrogênio para os MWNT funcionalizados tornam a matriz polimérica mais densa e menos susceptível ao ataque pela água.

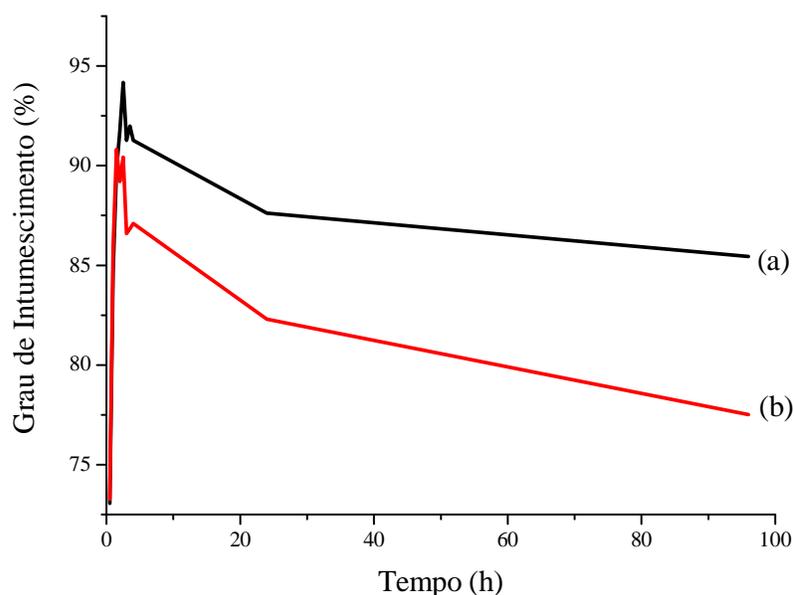


Figura 5.19 Curvas representando o grau de intumescimento em relação ao tempo para os nanocompósitos 28%PMWNT/R1 (a) 28%PMWNT-F1/R1 (b).

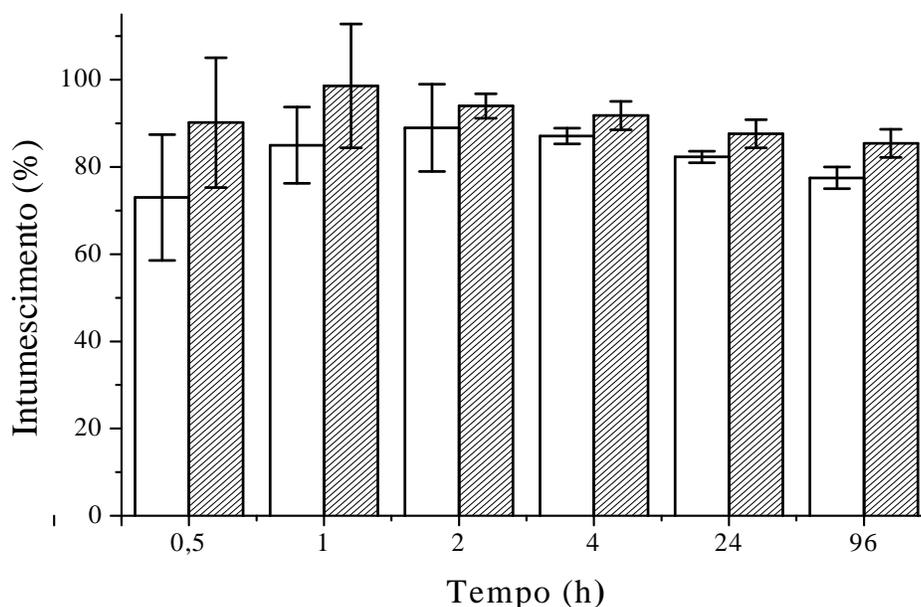


Figura 5.20 Intumescimento em PBS pelos nanocompósitos 28%PMWNT/R1 (branco) e 28%PMWNT-F1/R1 (tracejado).

A figura 5.21 mostra a representação de um possível mecanismo de modificação física da rede do PVA com a incorporação dos MWNTs para os nanocompósitos preparados a partir da solução de PVA 28%p/v. Antes da adição dos nanotubos de carbono, as cadeias do PVA consistem de um emaranhado físico, formando uma rede. Com a incorporação dos CNTs na matriz polimérica, há uma redução da mobilidade do emaranhado e, conseqüentemente, da mobilidade dos grupos hidrofílicos do PVA, promovendo uma maior fixação, maior rigidez da cadeia polimérica e menor intumescimento em comparação com o polímero puro. Os nanotubos de carbono representam um impedimento físico para os grupos hidrofílicos do PVA e estes por sua vez, tornam-se menos disponíveis para interagirem com a água.

Verificou-se que o comportamento de intumescimento é influenciado ainda, pela presença dos grupos carboxílicos presentes nos nanotubos funcionalizados. A funcionalização química promove a formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do PVA e as

carboxilas dos nanotubos, diminuindo a disponibilidade dos grupos polares do polímero para interação com a água.

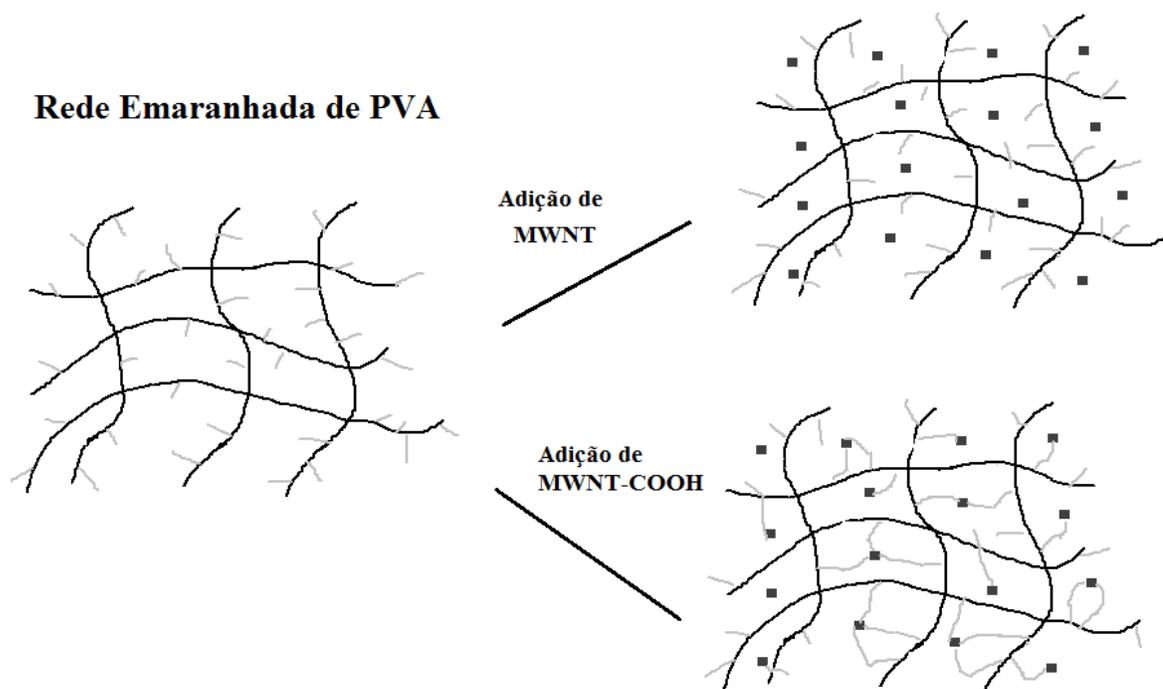


Figura 5.21 Mecanismo de intumescimento da rede de PVA com a incorporação dos nanotubos de carbono, na qual os traços cinza representam os grupos hidrofílicos do PVA e os quadrados pretos os nanotubos de carbono.

5.3.1.3 - Ensaio de Tração

Os resultados dos experimentos de intumescimento revelaram que os nanocompósitos preparados a partir de soluções precursoras de PVA de baixas concentrações (5%PMWNT/R1, 5%PMWNT-F1/R1, 10%PMWNT/R1 e 10%PMWNT-F1/R1) dissolveram-se rapidamente e apresentaram diferença entre a taxa de solução do PVA puro. Assim, é importante apontar que alguns parâmetros de processamento como, por exemplo, o grau de hidrólise do PVA, o pH da solução, o perfil de secagem do solvente, o uso de plasticizante e o procedimento de mistura podem em conjunto influenciar todas as propriedades mecânicas dos filmes nanocompósitos. Portanto, optou-se por realizar ensaios

de tração apenas nas amostras de nanocompósitos 28%PMWNT/R1, 28%PMWNT-F1/R1 e 28%PMWNT-F2/R1.

A figura 5.22 apresenta os gráficos típicos obtidos por ensaio de tração para os nanocompósitos 28%PMWNT/R1 (a), 28%PMWNT-F1/R1 (b) e 28%PMWNT-F2/R1 (c) sintetizados pela rota 1 e para o filme de PVA 28% (d). O módulo de elasticidade foi estimado a partir inclinação da parte linear do gráfico e a deformação específica corresponde à razão da variação de comprimento pelo comprimento inicial em porcentagem. A tenacidade corresponde à área sobre a curva até a ruptura do corpo de prova. Observa-se que ocorre a diminuição da deformação específica e o aumento do módulo de elasticidade dos nanocompósitos em relação ao filme de PVA 28%.

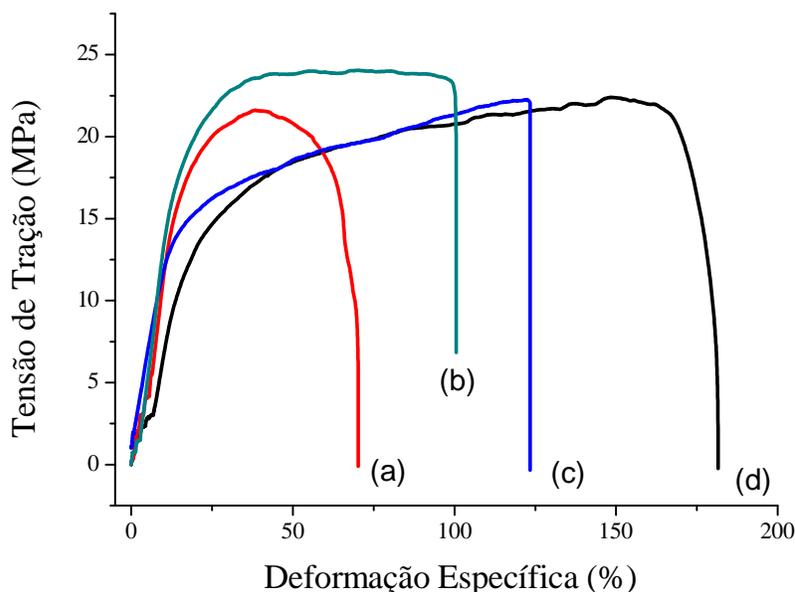


Figura 5.22. Curvas tensão versus deformação para os nanocompósitos 28%PMWNT/R1 (a), 28%PMWNT-F1/R1 (b), 28%PMWNT-F2/R1 (c) e para o filme de PVA 28% (d).

A figura 5.23 mostra a variação do módulo de elasticidade para cada nanocompósito e para o filme de PVA. Em geral, os valores de módulos de elasticidade obtidos para os

nanocompósitos foram superiores ao módulo obtido para o filme do polímero puro. A presença dos nanotubos de carbono eleva a rigidez da matriz polimérica. A cristalização da matriz polimérica é induzida pela presença dos nanotubos de carbono e este fato induz à melhoria das propriedades mecânicas dos nanocompósitos em comparação com o polímero puro (BARTHOLOME *et al.*, 2008). Além disso, a presença dos grupos hidroxílicos e carboxílicos nas superfícies dos CNTs funcionalizados promovem a formação de interações fortes com os grupos hidroxílicos presentes nas cadeias do PVA.

Para os nanocompósitos 28%PMWNT/R1 e 28%PMWNT-F1/R1 o módulo de elasticidade é cerca de 33% e 48% maior, respectivamente, em comparação com o filme de PVA 28%. Como já era esperado, a presença dos nanotubos de carbono eleva a rigidez e, por consequência, dificulta a deformação da matriz polimérica (CADEK *et al.*, 2002; SO *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2004). Provavelmente, a adição dos MWNT funcionalizados em comparação com a adição de MWNT produziu nanocompósitos com módulos de elasticidades superiores devido à maior interação interfacial dos nanotubos carboxilados com a matriz polimérica via ligações de hidrogênio. PAIVA e colaboradores (2004) obteve módulos de elasticidade para filmes de PVA contendo 5% de SWNT funcionalizados 55% maiores em relação ao filme de PVA puro. Considerando-se que no presente trabalho foram utilizadas quantidades bem menores de MWNT foram obtidos resultados superiores aos apresentados na literatura.

O nanocompósito 28%PMWNT-F2/R1, apresentou um módulo inferior aos outros nanocompósitos preparados a partir da solução de PVA 28%p/v possivelmente porque a funcionalização dos nanotubos foi tão extensiva a ponto de danificar os mesmos, produzindo CNTs esfoliados e mais curtos, reduzindo potencial de reforço dos mesmos.

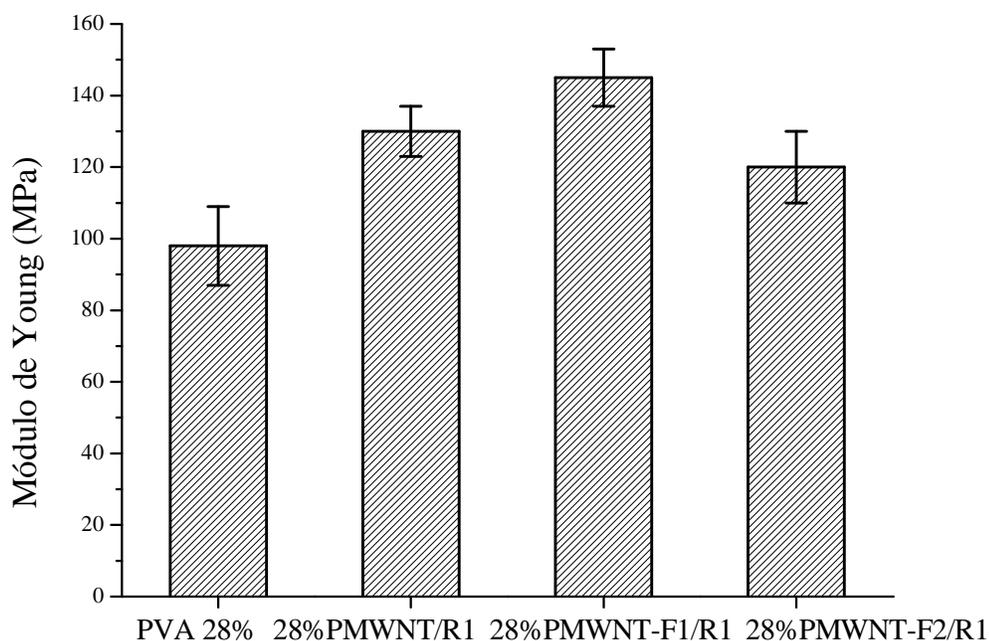


Figura 5.23. Variação do módulo de elasticidade dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro

Pela análise das figuras 5.24 e 5.25, percebe-se que a presença dos nanotubos provoca um aumento do limite de resistência à tração (máxima tensão na qual o material pode ser submetido antes de se romper) e do limite de escoamento dos nanocompósitos em comparação com o filme de PVA. Percebeu-se que a presença dos nanotubos faz com que o material sustente uma tensão maior antes de se romper. A presença dos nanotubos funcionalizados eleva a resistência à tração dos nanocompósitos devido às interações de hidrogênio entre o PVA e os MWNT-COOH, estas fortes interações aumentam a dispersão dos CNTs pela matriz polimérica e bem como a adesão interfacial, melhorando o desempenho mecânico dos nanocompósitos. Tal fato já foi evidenciado por SO *et al.*, 2007, para nanocompósitos preparados a partir de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e poliimida. As funcionalidades carboxílicas presentes nos nanotubos promoveram a

formação de ligações de hidrogênio com os oxigênios presentes nas cadeias da poliimida. Essas interações proveram um aumento das propriedades mecânicas, módulo e resistência à tração, dos filmes nanocompósitos em comparação com o filme de poliimida.

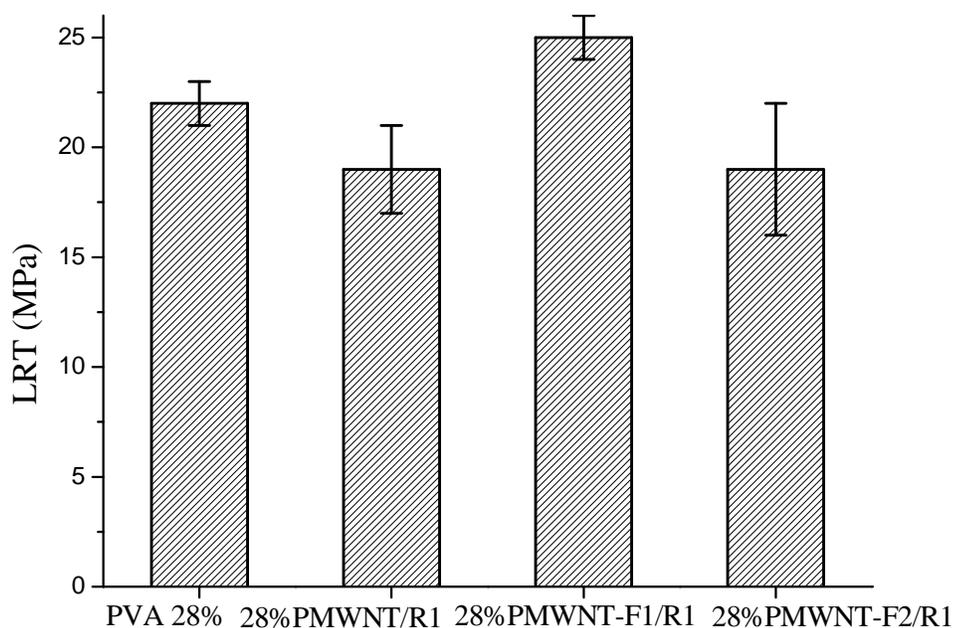


Figura 5.24 Variação do limite de resistência à tração (LRT) dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

A presença dos nanotubos de carbono não funcionalizados (MWNT) promove a formação de domínios contendo CNTs aglomerados que não entram em contato com o PVA, e por conseqüência, não estão ligados com estes nem mesmo através de interações fracas do tipo van der Waals. Tal fato pode ter gerado a queda nas propriedades mecânicas do nanocompósito 28%PMWNT/R1. As regiões de agregados de CNTs podem não sustentar as tensões induzidas durante o ensaio de tração e provocar a falha do nanocompósito.

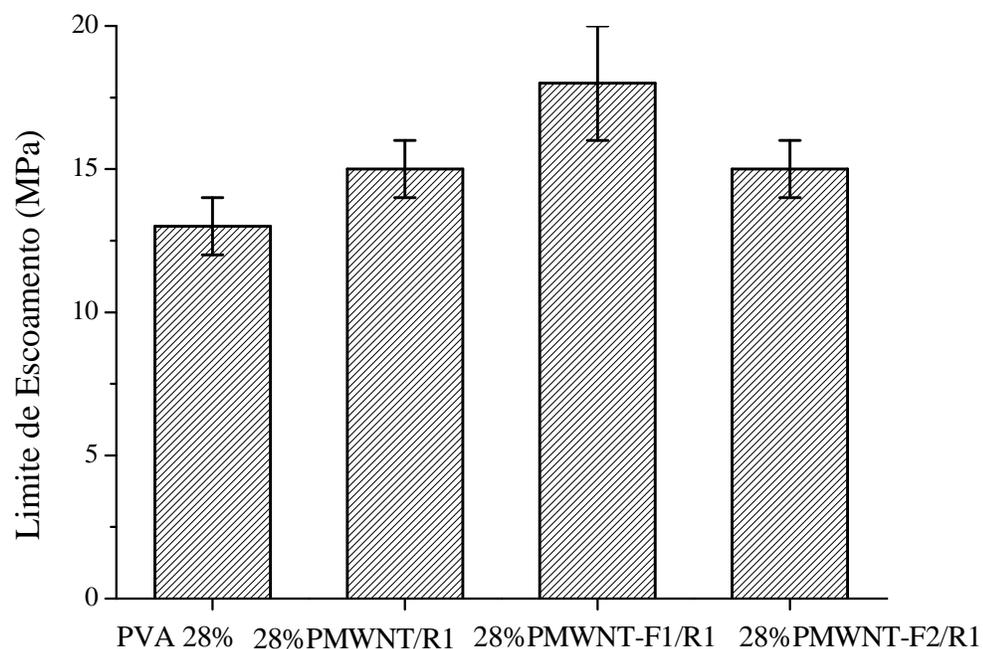


Figura 5.25 Variação do limite de escoamento dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

A adição dos nanotubos provocou a queda da tenacidade (quantidade de energia absorvida até a fratura), figura 5.26, para os nanocompósitos 28%PMWNT/R1, 28%PMWNT-F1/R1 e 28%PMWNT-F2/R1 em comparação com o filme de PVA 28%. A presença dos CNTs eleva a rigidez e a fragilidade do material polimérico.

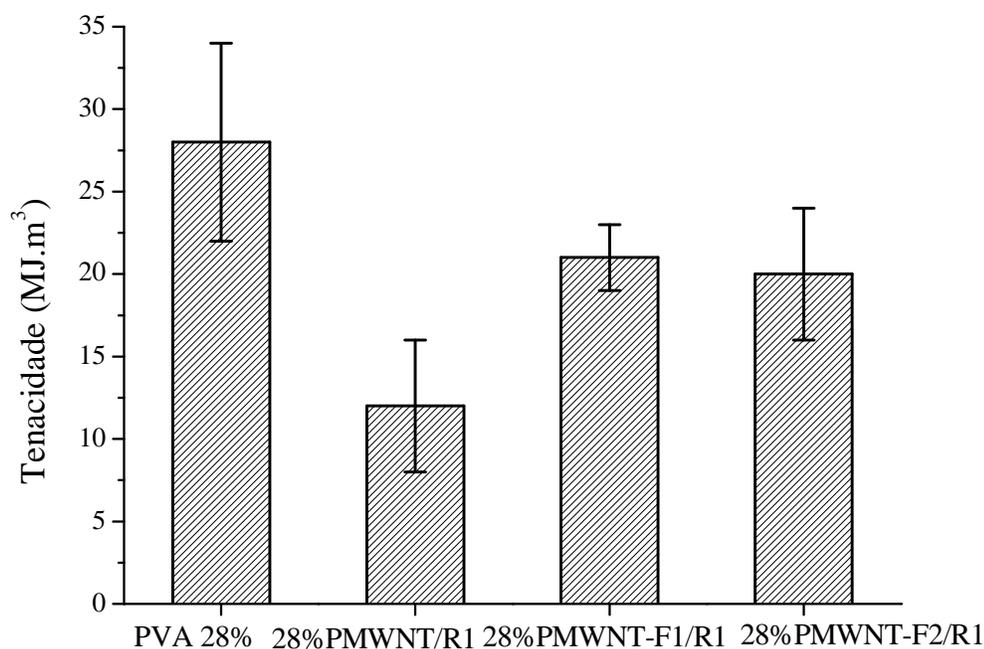


Figura 5.26 Variação da tenacidade dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

A presença dos nanotubos de carbono, de um modo geral, diminui a deformação específica, figura 5.27, dos nanocompósitos em comparação com o filme de PVA devido à maior fragilização da matriz polimérica induzida pela presença dos CNTs. A presença dos nanotubos atua como uma barreira física que dificulta a mobilidade da matriz polimérica, tornando-a mais rígida e menos propensa a sofrer deformação. Os CNTs atuam como reforço para deformações pequenas, relacionado às interações em escala nanométrica. Entretanto, em deformações maiores os nanotubos de carbono atuam como defeitos.

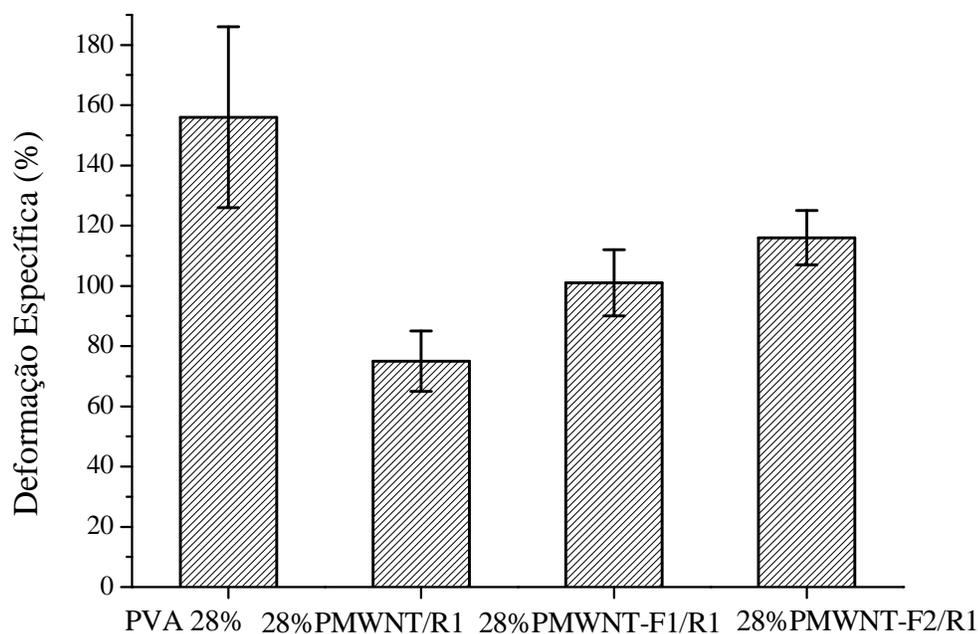


Figura 5.27 Variação da deformação específica dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 1, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

Resultados de propriedades mecânicas de filmes de PVA/CNT obtidos na literatura indicam que a presença dos nanotubos provoca o aumento no módulo de elasticidade e no limite de resistência à tração para os nanocompósitos em relação ao polímero puro, e ainda, a diminuição da tenacidade (CHEN *et al.*, 2005; PAIVA *et al.*, 2004). Porém, a comparação dos resultados da literatura com os resultados obtidos no presente trabalho é dificultada devido à grande discrepância entre as quantidades de nanotubos utilizadas em cada pesquisa. Nos artigos, os pesquisadores utilizam de cinco a quarenta e cinco vezes a quantidade de nanotubos utilizada no presente trabalho. Além disso, diferenças entre as rotas de síntese, propriedades do PVA (massa molar e grau de hidrólise) e dos nanotubos de carbono (comprimento, diâmetro, pureza, tipo, etc) podem produzir diversos tipos de

materiais com propriedades distintas entre si, dificultando ainda mais comparações entre resultados.

Os resultados do ensaio de tração indicam a existência de alguma diferença entre a interação interfacial do PVA com os nanotubos funcionalizados em comparação com a interação do PVA com os nanotubos não funcionalizados. A funcionalização química, com a formação de grupos carboxílicos nas superfícies dos nanotubos, exerce um papel importante no mecanismo de transferência de tensão da matriz polimérica para os CNTs. Os grupos carboxílicos podem formar ligações de hidrogênio com as hidroxilas do PVA, elevando a transferência de tensão (LACHMAN *et al.*, 2009).

Na figura 5.28, está representado um esquema sugerindo a interação dos MWNT com o PVA. Inicialmente os dois materiais apresentam-se isolados entre si, com o processo de mistura via agitação magnética, sugere-se que duas interações acontecem: a primeira é a interação fraca entre as moléculas de PVA em parte ou com toda a sua superfície dos nanotubos de carbono funcionalizados e a segunda a simples mistura destes elementos.

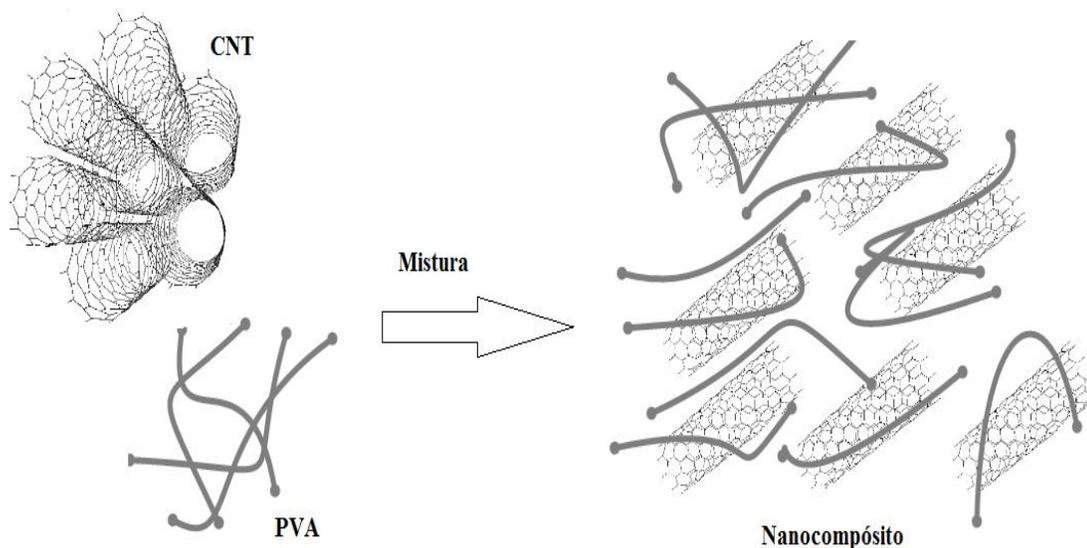


Figura 5.28 Representação da possível arranjo de interação dos nanotubos de carbono com a matriz de PVA.

De acordo com LAVALL *et al.*, (2010), quando ocorre a interação não-covalente, entre o polímero e os CNT, o polímero preferencialmente se enrola ao redor do nanotubo (*wrapping*). No entanto, o polímero não precisa estar necessariamente enrolado ao redor dos tubos em uma conformação regular ou simétrica, mas pode simplesmente recobrir os mesmos impedindo a reagregação. Então, uma hipótese de interação sugerida para os nanocompósitos, produzidos no presente trabalho, seria a ocorrência de interações não-covalentes entre o PVA e os MWNT, mais fortes no caso do nanotubo funcionalizado devido às ligações de hidrogênio formadas entre as hidroxilas do PVA e às possíveis carboxilas dos MWNT-COOH, com o recobrimento dos nanotubos pela matriz polimérica.

5.3.1.4 - Viabilidade de células VERO *in vitro* por MTT dos nanocompósitos

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de redução do MTT. Este teste permite que seja mensurado o metabolismo celular perante a adição do MTT, uma vez que células viáveis absorvem o tetrazólio de metiltiazol e o metabolizam na mitocôndria utilizando enzimas ativas, onde se acumulam sob a forma de cristais de tetrazólio ou formazana; sendo assim quanto maior o valor da leitura no espectrofotômetro, maior é a taxa metabólica, sendo possível diferenciar células mais viáveis das menos viáveis.

Como os resultados do ensaio de intumescimento mostraram que os nanocompósitos preparados a partir de soluções menos concentradas de PVA apresentaram dissolução completa em 15 minutos, optou-se por realizar o ensaio MTT nas amostras 28%PMWNT/R1, 28%PMWNT-F1/R1.

A capacidade dos filmes de PVA/Nanotubos de carbono (funcionalizados ou não) em oferecerem suporte para adesão e proliferação celular mostrou que estas amostras exibiram comparável biocompatibilidade (figura 5.29). Além disso, é possível observar na figura 5.30 que o valor de viabilidade para os nanocompósitos variou de aproximadamente 89% a 125% (comparado aos valores de absorbância obtidos para as células VERO controle celular, que foi considerado como 100% de viabilidade), podendo-se inferir que os nanocompósitos produzidos são promissores para serem testadas em ensaios *in vivo* e

futuramente utilizados como biomateriais, uma vez que apresentaram um indicativo de biocompatibilidade.

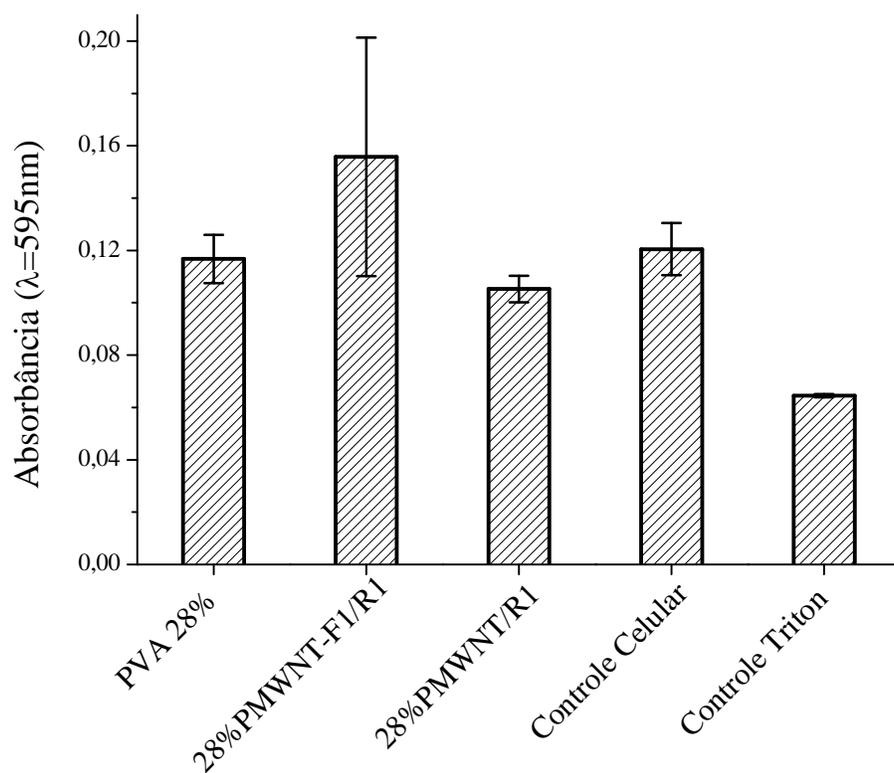


Figura 5.29 Viabilidade de células VERO dos filmes de PVA e dos nanocompósitos produzidos pela rota 1.

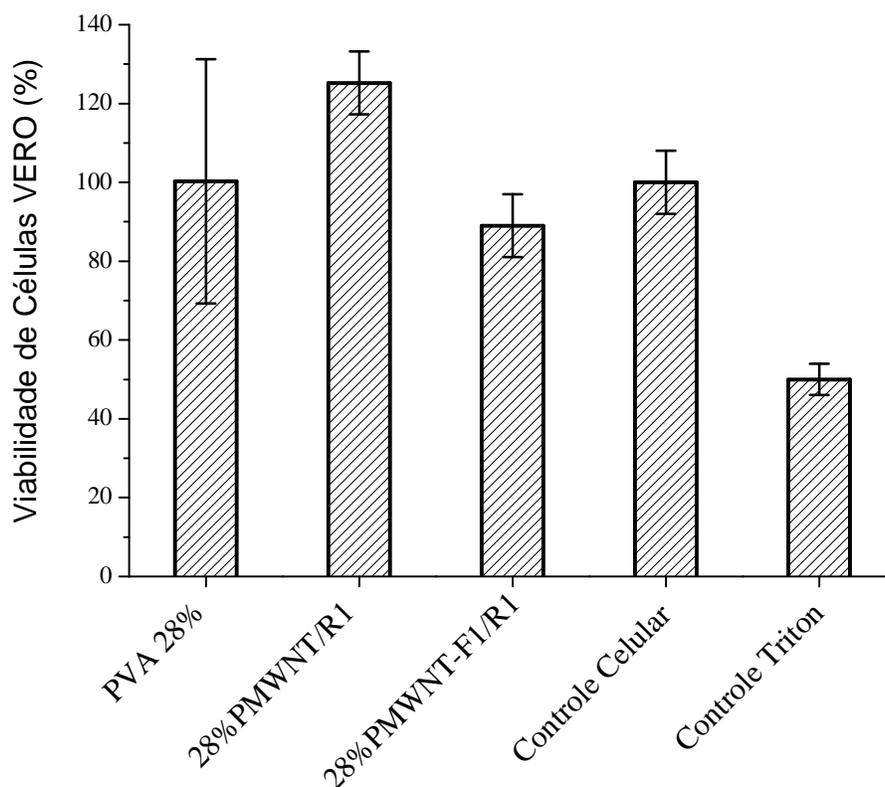


Figura 5.30 Viabilidade de células VERO em relação ao controle celular dos filmes de PVA e dos nanocompósitos produzidos pela rota 1.

5.3.2 - Caracterização nanocompósitos sintetizados pela Rota 2

5.3.2.1 - Avaliação qualitativa

A avaliação visual da aparência dos filmes nanocompósitos sintetizados pela rota 2 revelou que os filmes 28%PMWNT/R2 e 28%PMWNT-F1/R2, figura 5.31 (b), apresentaram uma distribuição homogênea dos nanotubos pela matriz polimérica e uma aparente diminuição da flexibilidade de filme em comparação com o polímero puro.

Já para os filmes 10%PMWNT/R2, 10%PMWNT-F/R2, 5%PMWNT/R2 e 5%PMWNT-F/R2, figura 5.31 (a), observou-se a baixa dispersão dos nanotubos pela matriz polimérica com a formação de aglomerados. Visualmente não puderam ser observadas diferenças entre

os filmes funcionalizados e não funcionalizados. O processo de formação dos filmes e a dispersão dos nanotubos pela matriz polimérica estão relacionados com a concentração do polímero na solução precursora. Quanto menor essa concentração e, conseqüentemente, maior a quantidade de água, a secagem do filme é mais lenta promovendo a aglomeração dos nanotubos (via interações de van der Waals).

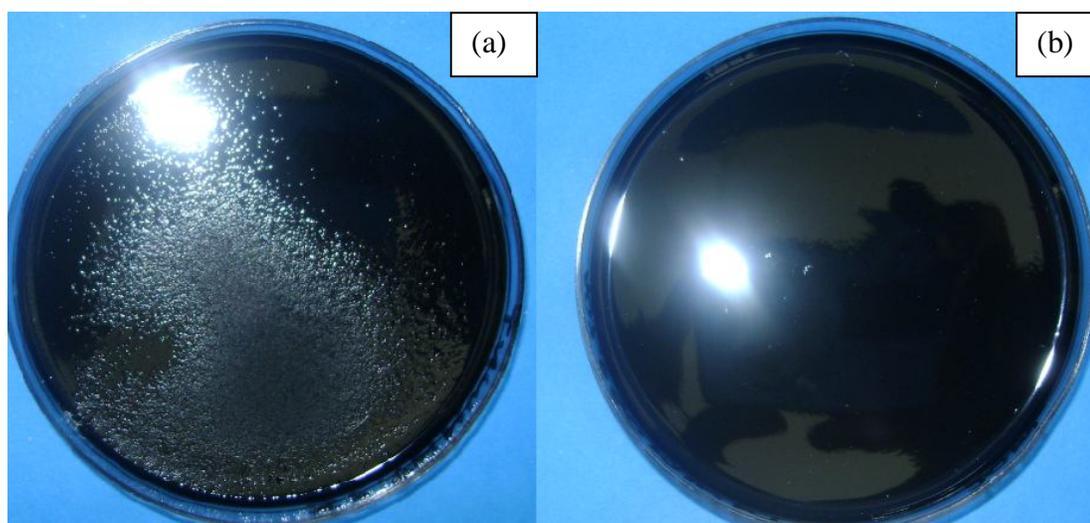


Figura 5.31 Fotografias representando os filmes nanocompósitos em (a) 5%PMWNT/R2, 5%PMWNT-F/R2, 10%PMWNT/R2 e 10%PMWNT-F/R2 em (b) 28%PMWNT/R2 e 28%PMWNT-F1/R2 preparados a partir da rota 2.

5.3.2.2 - Ensaio de Intumescimento

Os ensaios de intumescimento conduzidos nos nanocompósitos 28%PMWNT/R2, 28%PMWNT-F1/R2, 10%PMWNT/R2, 10%PMWNT-F1/R2, 5%PMWNT/R2 e 5%PMWNT-F1/R2 sintetizados pela rota 2 mostraram uma rápida taxa de dissolução de tais materiais (cerca de 15 minutos). Com esse fato, fica evidenciado que a rota de síntese exerce grande influência sob as propriedades físico-químicas dos nanocompósitos. Os nanocompósitos, 28%PMWNT/R1, 28%PMWNT-F1/R1, sintetizados pela rota 1 não se dissolveram mesmo após 96 horas de experimento evidenciando que os nanotubos interagiram com o PVA atuando como um “bloqueio” para a interação do polímero com a

água e conseqüente dissolução do filme. Porém, ao se analisarem os resultados de intumescimento para os nanocompósitos 28%PMWNT/R2 e 28%PMWNT-F1/R2, preparados pela rota 2 concluiu-se que os nanotubos podem não ter interagido com o PVA em uma extensão que garanta a integridade do filme por um tempo maior em contato com solução aquosa.

A rota 2 de síntese dos nanocompósitos envolve a adição dos nanotubos já dispersos em água na suspensão aquosa de PVA. Os nanotubos já dispersos em água podem não estar interagindo com o polímero promovendo uma fraca adesão nanotubo-PVA no nanocompósitos.

5.3.2.3 - Ensaio de Tração

A figura 5.32 apresenta gráficos com os resultados do ensaio mecânico de tração com as curvas dos nanocompósitos 28%PMWNT-R2, 28%PMWNT-F1/R2 sintetizados pela rota 2 e para o filme de PVA 28%. Pode-se observar que a presença dos nanotubos promove a redução na deformação específica da matriz polimérica e que os filmes apresentaram um regime elástico sob baixas deformações. Além disso, a rota 2 de síntese dos nanocompósito promoveu a formação de materiais menos resistentes mecanicamente do que os materiais preparados pela rota 1. Os nanocompósitos preparados pela rota 2, apresentaram uma distribuição dos nanotubos menos homogênea do que os materiais preparados pela rota 1. Isso promove uma maior concentração de regiões contendo CNTs aglomerados e sem contato com a matriz polimérica gerando maiores defeitos e maiores regiões de intensificação de tensões.

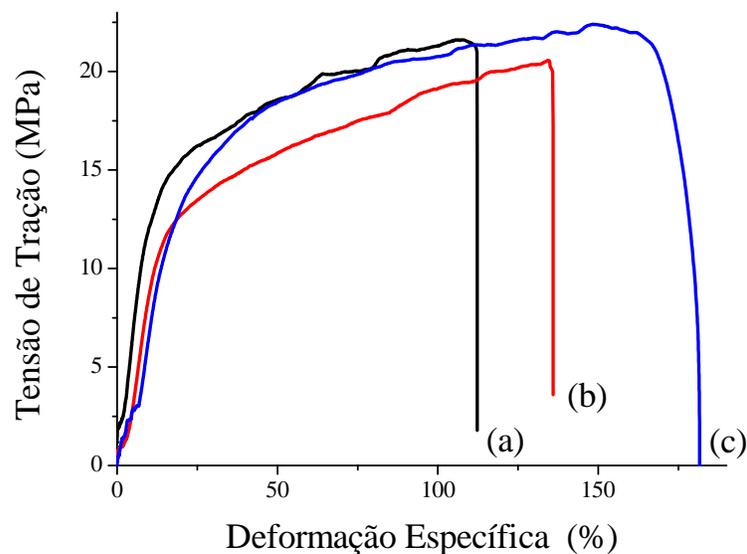


Figura 5.32 Curvas tensão versus deformação para os nanocompósitos 28%PMWNT-F1/R2 (a), 28%PMWNT-R2 (b) e para o filme de PVA 28% (c).

A figura 5.33 mostra a variação do módulo de elasticidade para cada nanocompósito sintetizado pela rota 2 em comparação com o filme de PVA puro. A adição dos nanotubos eleva o módulo de elasticidade dos nanocompósitos em relação ao filme de PVA, os CNTs promovem a elevação da rigidez ou resistência à deformação elástica da matriz polimérica. Mesmo contendo regiões de aglomerados, os nanotubos promoveram a formação de uma barreira física na matriz polimérica, elevando a rigidez da mesma. Para o nanocompósito 28%PMWNT-F1/R2 o módulo de Young obtido foi maior do que para os demais, indicando que a presença de interações de hidrogênio entre as carboxilas dos nanotubos funcionalizados e a cadeia do PVA promove a interação interfacial entre os mesmos.

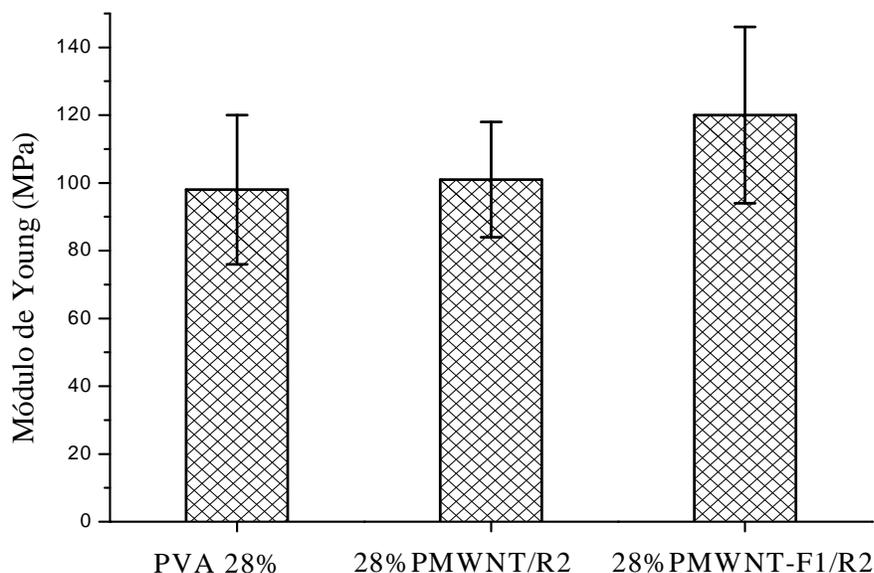


Figura 5.33 Variação do módulo de elasticidade dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

As figura 5.34 e 5.35 mostram a variação do limite de resistência à tração (LRT) e limite de escoamento, respectivamente, para cada nanocompósito sintetizado pela rota 2 em comparação com o filme de PVA puro. Os resultados revelaram que apenas para o nanocompósito 28%PMWNT-F1/R2 ocorreu o aumento do LRT em comparação com o filme de PVA puro. Devido à presença de agregados de CNTs, o potencial de reforço dos mesmos no nanocompósito 28%PMWNT-/R2 foi reduzido. No entanto, para o nanocompósito contendo nanotubos funcionalizados as interações de hidrogênio entre o polímero e os CNTs, promoveram a formação de um material mais rígido e com maior adesão interfacial capaz de resistir a uma maior força de tração.

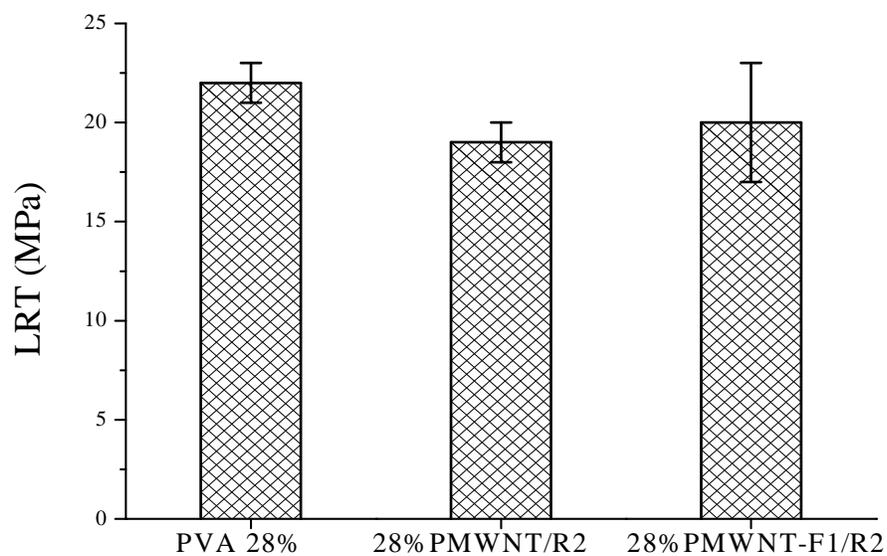


Figura 5.34 Variação do limite de resistência à tração dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

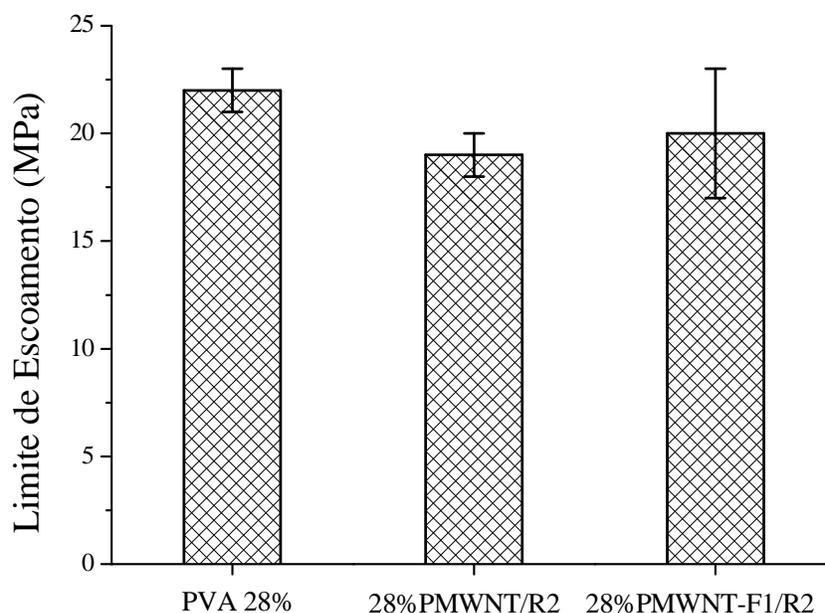


Figura 5.35 Variação do limite de escoamento dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

A figura 5.36 mostra a variação da tenacidade para cada nanocompósito sintetizado pela rota 2 em comparação com o filme de PVA puro. A tenacidade da matriz polimérica é diminuída com a inserção dos nanotubos de carbono devido à formação de uma estrutura mais rígida.

A figura 5.37 mostra a variação da deformação específica para cada nanocompósito sintetizado pela rota 2 em comparação com o filme de PVA puro. Observa-se a diminuição da deformação específica dos nanocompósitos com a adição dos CNTs em relação ao filme polimérico. Tal fato pode ser explicado devido ao aumento da cristalinidade da matriz de PVA como resultado da interação polímero/nanotubo (CHEN *et al.*, 2005). A presença de uma camada de polímero ao redor dos feixes de CNTs aumenta a transferência de tensões da matriz para o nanotubo e diminui a mobilidade da cadeia polimérica, tornando-a mais rígida e menos deformável.

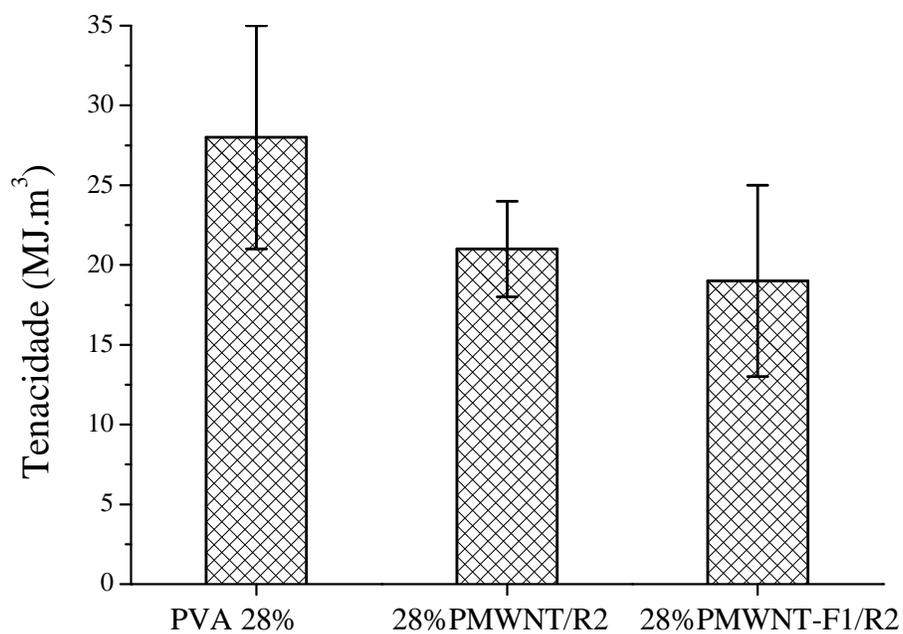


Figura 5.36 Variação da tenacidade dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

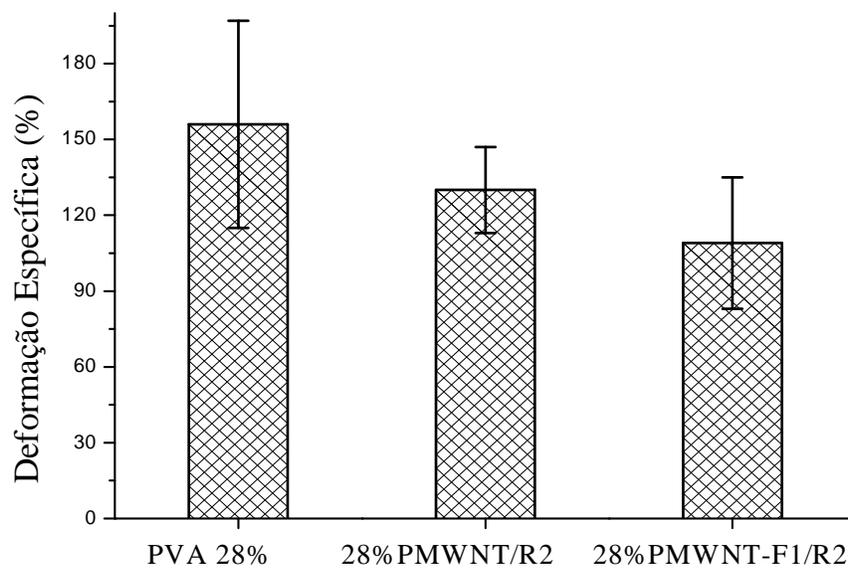


Figura 5.37 Variação da deformação específica dos nanocompósitos, sintetizados pela rota 2, em relação à funcionalização química e em comparação com o polímero puro.

5.4 - BIOCONJUGAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO COM A ENZIMA GLICOSE OXIDASE

5.4.1 – Síntese e caracterização dos MWNT-CONHGOx e dos nanocompósitos PVA/MWNT-CONHGOx

Os nanotubos de carbono funcionalizados com carboxilas (MWNT-COOH) não se dispersaram bem na solução de PBS devido à presença dos compostos iônicos na mesma que dificultam a interação das carboxilas com a água, promovendo a precipitação dos nanotubos. Na figura 5.38 estão mostradas as curvas UV-Vis obtidas para a dispersão dos MWNT-COOH em PBS e, como referência, a curva obtida para a solução tampão PBS.

Os elétrons π (π) presentes no orbital molecular dos átomos de carbono dos MWNT participam da formação da nova ligação com as carboxilas. Pôde ser observado no UV-Vis, figura 5.38, um pico de absorção a 260nm para os MWNT carboxilados indicando a transição $n \rightarrow \pi^*$ de um par de elétrons não-ligantes da ligação $-C=O$ do grupo carboxílico ($-COOH$), YADAV *et al.*, 2009.

Os MWNT mostram um pico característico a 190nm, transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos elétrons π deslocalizados presentes na estrutura dos nanotubos. Nas curvas mostradas na figura 5.38, percebe-se a presença de um pico de absorção em 190nm também para a solução PBS que pode estar relacionado à absorção do íon fosfato presente na solução PBS. Dessa forma, a região em 190nm para soluções de nanotubos de carbono em PBS não serão esclarecedoras para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos CNTs devido à superposição com elementos presentes no PBS.

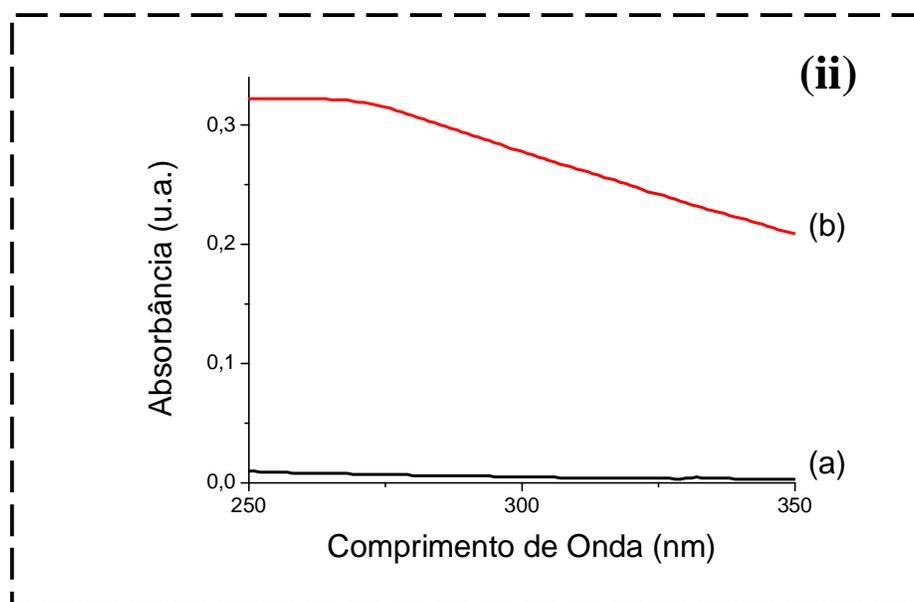
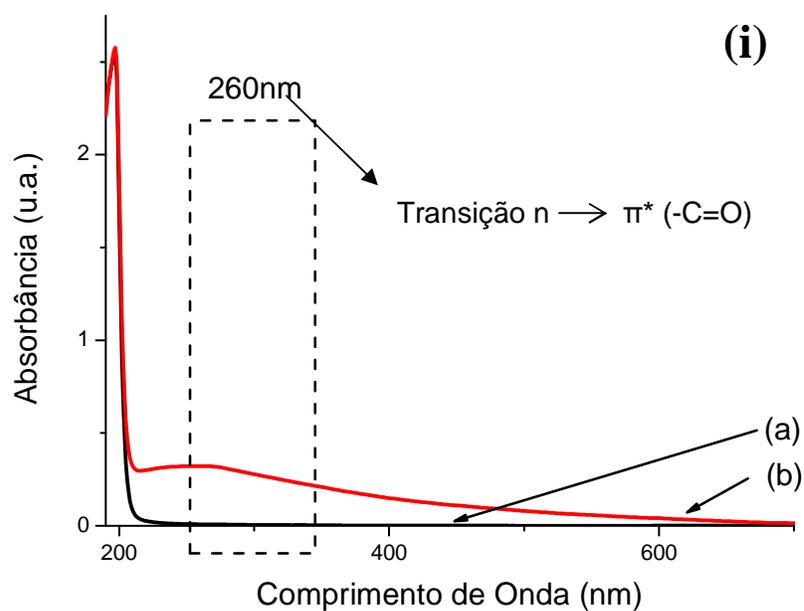


Figura 5.38 (i) espectros UV-Vis para a solução PBS (a) e para os nanotubos de carbono carboxilados - MWNT-COOH (b), (ii) a ampliação do espectro na faixa de comprimento de onda de 250- 350nm.

A formação de ligação covalente entre nanotubos de carbono e biomoléculas, por exemplo, enzima GOx, requer a presença de grupos funcionais nos CNTs. Os grupos carboxílicos representam uma excelente opção de grupo funcional porque eles podem reagir com uma variedade de grupos químicos e serem formados facilmente nas superfícies e/ou pontas dos nanotubos, via tratamentos oxidantes, como o refluxo em ácido nítrico. Dessa forma, no presente trabalho, foram utilizados MWNT-COOH para proporcionar o acoplamento entre os grupos carboxílicos e a enzima GOx, utilizando os reagentes de conjugação EDC e sulfo-NHS, figura 5.39.

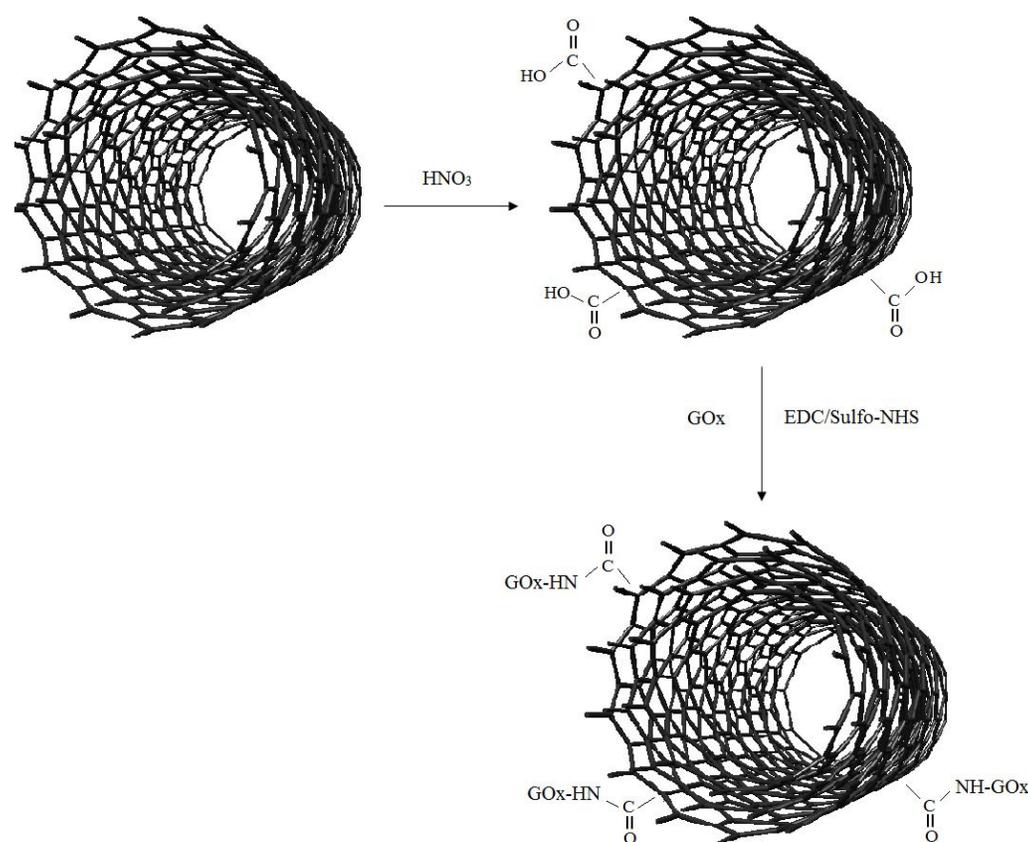


Figura 5.39 Esquema representando as etapas de funcionalização dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas e a bioconjugação dos MWNT-COOH com a enzima Glicose Oxidase, GOx.

O reagente EDC promove a ativação dos grupos carboxílicos presentes nos nanotubos formando um intermediário altamente reativo (chamado de o-aciluréia) que sofre hidrólise rapidamente para formar o ácido carboxílico. Entretanto, na presença do reagente sulfo-NHS, um intermediário mais solúvel em água é formado (sulfo-succinimida). Esse intermediário reage prontamente via substituição nucleofílica com as amins primárias presentes nas moléculas da enzima GOx formando ligações amidas (LIN, et al., 2004; RAVINDRAN *et al.*, 2003), figura 5.40.

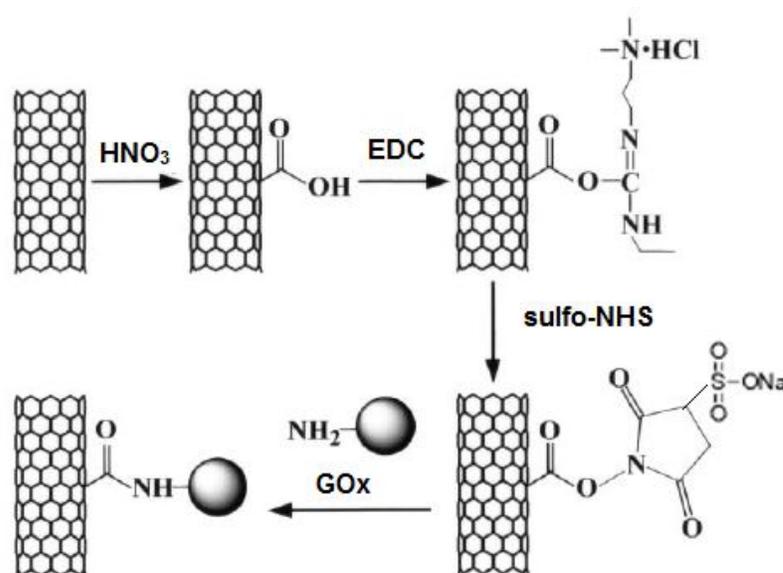


Figura 5.40 Esquema representando a formação de ligação covalente amida entre os nanotubos carboxilados e a enzima GOx pela reação com EDC/sulfo-NHS. (Adaptado de JIANG *et al.*, 2003)

Na figura 5.41 está mostrado o espectro UV-Vis para a solução em PBS dos reagentes EDC e sulfo-NHS.

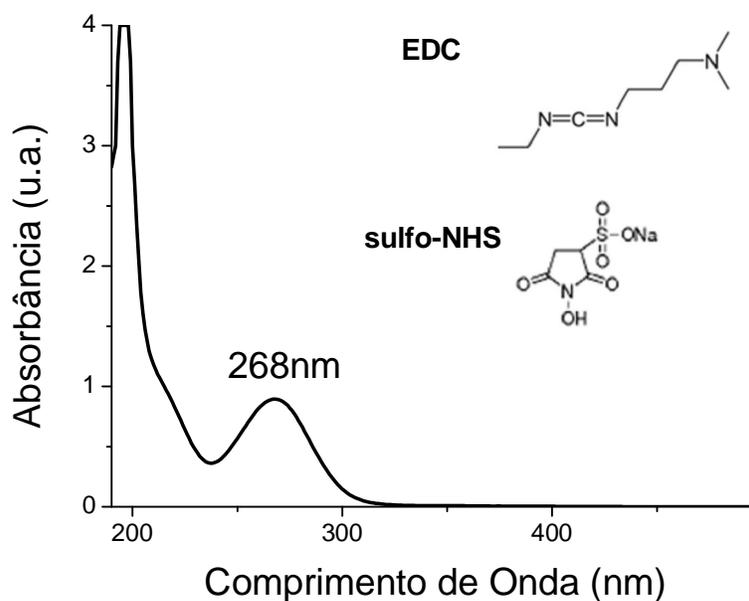


Figura 5.41 Espectro UV-Vis obtido para a solução de EDC/sulfo-NHS.

A Glicose Oxidase é uma enzima oxidorreductase que catalisa a reação de transferência de elétrons da glicose (substrato) para o oxigênio molecular formando peróxido de hidrogênio. Essa reação de catálise depende do grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) que sofre reação de óxido-redução. A figura 5.42 mostra uma representação esquemática da glicose oxidase. A cavidade catalítica da enzima GOx inclui os resíduos de Asp 584 (asparagina), Tyr 515 (tirosina), His 559 (histidina) e His 516 que podem estar envolvidos em reações catalíticas ou ligações com o substrato (CHEN, *et al.*; RABA e MOTTOLA, 1995).

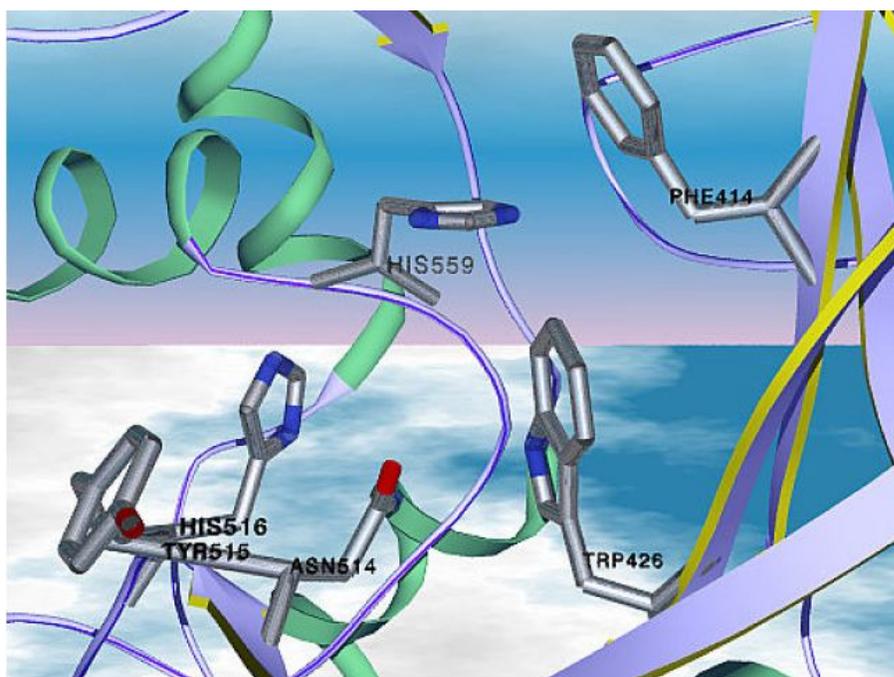


Figura 5.42 Sítio ativo da enzima Glicose Oxidase. Fonte: CHEN, T., RAMOS, J. ENZYME KINETICS [APPLICATION OF UV-VIS SPECTROMETRY]

Na figura 5.43 está mostrado o espectro obtido por UV-Vis para a enzima Glicose Oxidase, no qual são observados dois picos de absorção referentes à cadeia proteica, um em cerca de 220nm e outro em 278nm. O pico de absorção em 220nm refere-se à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ relativa aos elétrons da ligação peptídica. O pico de absorção em 278nm refere-se à transição $n \rightarrow \pi^*$ associada aos grupos amida dos resíduos de aminoácidos (triptofano, histidina, tirosina e fenilalanina) da enzima GOx, ZAIA *et al.*, 1998.

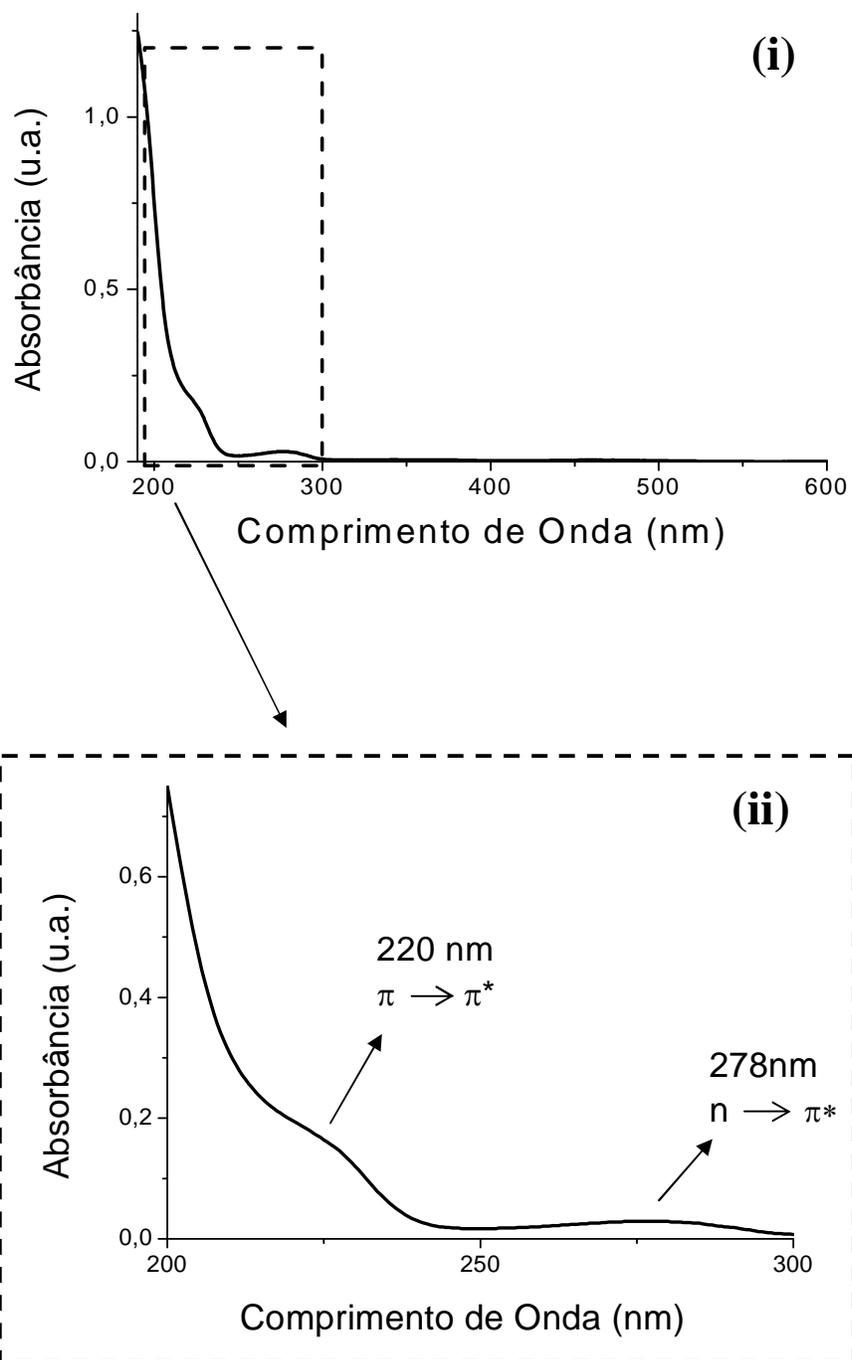


Figura 5.43 (i) Espectro UV-Vis obtido para a enzima GOx em solução PBS, (ii) espectro ampliado na faixa de comprimento de onda de 200-300nm.

Na figura 5.44, estão mostrados os espectros UV-Vis obtidos para as dispersões em PBS para as amostras de MWNT-CONHGOx logo após a adição dos reagentes de conjugação EDC e sulfo-NHS (a) e após 120min de reação de conjugação (b) com o objetivo de mostrar a diferença entre as bandas de absorção formadas e associadas ao grupo amida.

Pode-se observar o aumento da banda de absorção em 265nm, característica das transições $n \rightarrow \pi^*$ associadas às ligações amida formadas entre os nanotubos carboxilados e as cadeias polipeptídicas da enzima glicose oxidase (GOx). Tal resultado indica que a enzima foi conjugada à estrutura dos nanotubos e que manteve sua conformação nativa mesmo após a lavagem e filtração dos nanotubos funcionalizados (MWNT-CONHGOx). Ou seja, foram formadas ligações amida entre os resíduos amina presentes na enzima GOx e os grupos carboxílicos dos MWNT-COOH.

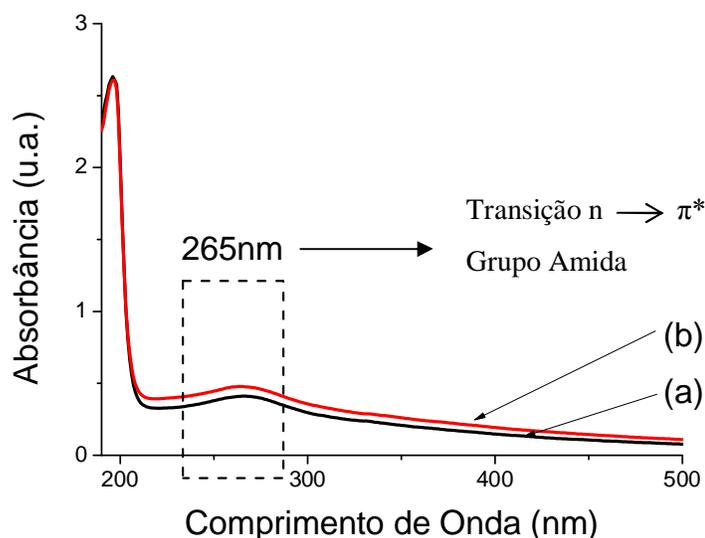


Figura 5.44 Espectros UV-Vis para a mistura MWNT-COOH/EDC/sulfo-NHS/GOx (a) e para os MWNT-CONHGOx após 120min de reação (b).

Para confirmação da necessidade da presença dos reagentes de conjugação EDC e sulfo-NHS para ativação dos grupos carboxílicos presentes nos nanotubos e da reação química dos mesmos com a enzima GOx, foram realizados testes adicionando-se a enzima GOx na

dispersão dos nanotubos na ausência de EDC e sulfo-NHS. Na figura 5.45 estão mostrados os espectros UV-Vis para o sistema mencionado após a adição da enzima (a) e após 120 minutos de repouso da mistura dos MWNT-COOH com GOx (MWNT-COOH + GOx) (b). Nos espectros percebe-se a presença do pico de absorção em 270nm referente à enzima GOx.

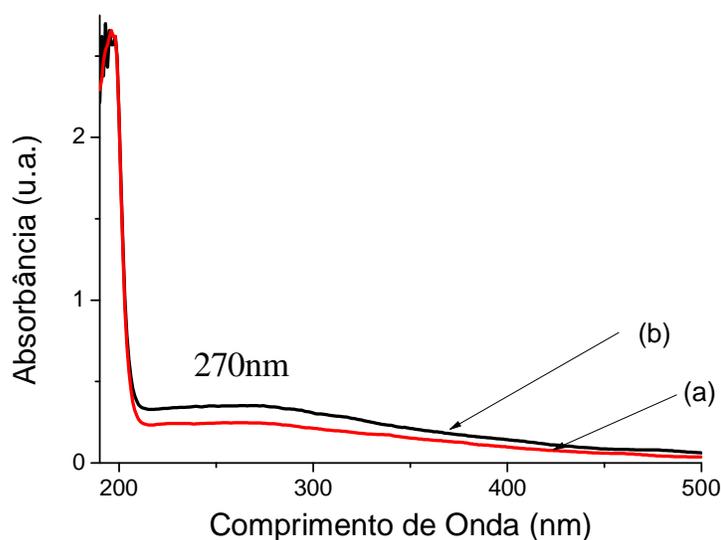


Figura 5.45 Espectros UV-Vis para os MWNT-COOH + GOx após a adição da enzima GOx (a) e após 120min de repouso (b).

A presença da enzima GOx nos nanotubos foi observada nos dois experimentos realizados, isto é, com e sem a adição dos reagentes de conjugação EDC/sulfo-NHS, produzindo as amostras MWNT-CONHGOX e MWNT-COOH+GOx, respectivamente. Para a confirmação da formação da ligação covalente entre os nanotubos carboxilados e a enzima GOx foi realizado um experimento de remoção da enzima não-ligada covalentemente.

Os nanotubos possuem uma elevada área superficial que pode promover a adsorção física (via interações de van der Waals) de moléculas da enzima GOx. Por isso foi observado o pico de absorção desta enzima no sistema (MWNT-COOH+GOx) que não continha os

reagentes de conjugação. Um método de precipitação de proteínas pelo aumento da força iônica da solução, denominado “*salting out*” (MELANDER e HORVÁTH, 1977), foi utilizado nas amostras MWNT-CONHGOx e MWNT-COOH+GOx para tentar remover as enzimas adsorvidas nas superfícies dos nanotubos e mostrar as diferenças entre estes dois sistemas investigados. As duas amostras foram deixadas por 24 horas incubadas em solução de cloreto de potássio, KCl, de concentração 3mol.L^{-1} , a temperatura de 37°C . Então, os dois sistemas foram lavados com solução tampão PBS (pH 7,40) a 37°C durante um processo de filtração a vácuo, removidos dos papéis de filtro e incubados em solução PBS a 37°C por 4h com a substituição da solução a cada 2h.

Na figura 5.46, estão mostrados os espectros UV-Vis obtidos para as dispersões dos nanotubos biofuncionalizados (MWNT-CONHGOx) e para os nanotubos misturados com a enzima GOx (MWNT-COOH + GOx) após o procedimento experimental buscando a remoção da enzima adsorvida fisicamente. Percebe-se que mesmo após a incubação com solução salina, observa-se o pico da enzima GOx nas amostras. Os nanotubos de carbono apresentam alta área superficial e uma nuvem de elétrons desemparelhados que podem interagir com outras moléculas, sendo assim a enzima GOx interagiu com os nanotubos via forças de van der Waals e o processo de remoção da enzima adsorvida não foi suficiente para remover todas as moléculas. A amostra MWNT-CONHGOx em que a enzima ficou ligada covalentemente com os nanotubos (após ativação das carboxilas pelos reagentes EDC e sulfo-NHS) apresentou um pico de absorção maior do que a amostra MWNT-COOH + GOx, comprovando a formação da ligação covalente entre a enzima e os nanotubos para a amostra MWNT-CONHGOx.

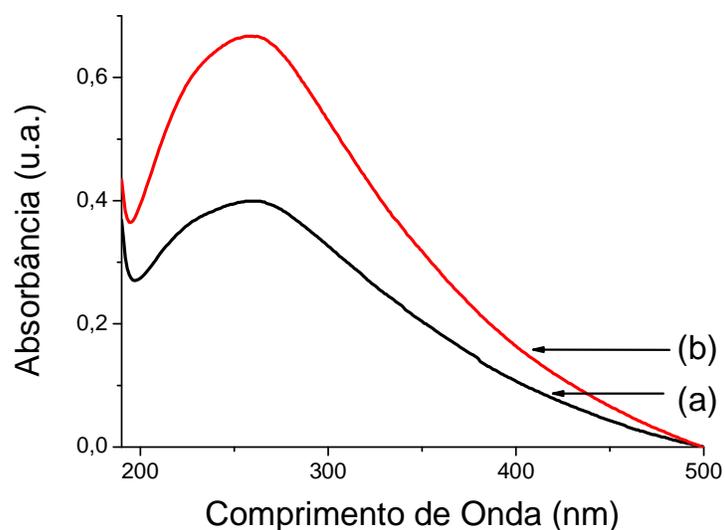


Figura 5.46 Espectros UV-Vis para os MWNT-COOH + GOx (a) e para os MWNT-CONHGOx (b).

5.4.2 – Análise da atividade da enzima GOx

Para verificar se houve a funcionalização química dos nanotubos com a enzima GOx, formando as estruturas MWNT-CONHGOx, foram adicionados os reagentes TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina), HRP (*horse radisch peroxidase*) e β -D-Glicose sobre a dispersão dos MWNT-CONHGOx em PBS.

A β -D-Glicose é um substrato oxidado a ácido glicônico na presença da enzima GOx formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme o representado pela equação (5.1).



Na figura 5.47 estão mostradas as etapas do ciclo catalítico da enzima glicose oxidase. Ele pode ser dividido em duas meias reações de redução e oxidação. Na meia reação de redução a enzima GOx catalisa a oxidação de β -D-Glicose a gliconolactona, esta por sua vez, hidrolisa-se espontaneamente a ácido glicônico. Na reação de redução, a flavina FAD da enzima GOx é reduzida a $FADH_2$. Na semi-reação de oxidação, a flavina reduzida ($FADH_2$) é reoxidada a FAD pelo oxigênio molecular e ocorre a formação de peróxido de hidrogênio.

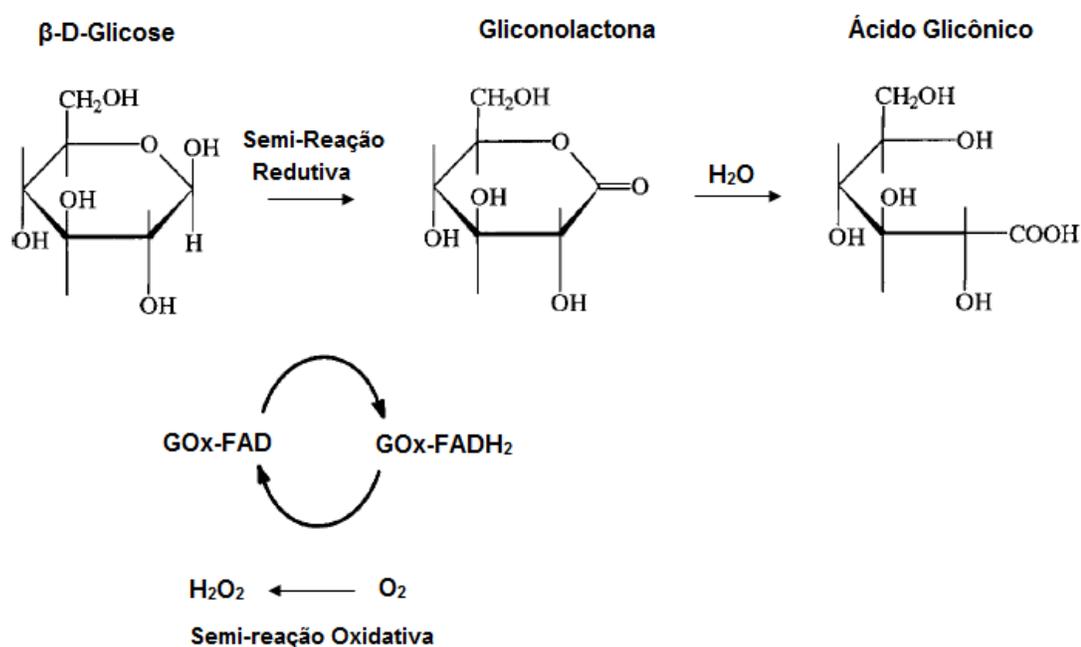


Figura 5.47 Etapas do ciclo catalítico da enzima GOx. Adaptada de WITT *et al.*, 2000.

O peróxido de hidrogênio formado pela reação redox catalisada pela GOx é consumido durante a reação de oxidação do substrato cromógeno TMB formando o TMB_{ox} (TMB oxidado), um produto azul, na presença da enzima HRP (horse radisch peroxidase), equação (5.2). A TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) é uma amina aromática que se oxida formando a TMB_{ox}, de coloração azul na presença de enzimas peroxidases como a HRP. A cor resultante pode ser lida por espectrometria UV-Vis a um comprimento de onda de 650nm. Então, pela formação do TMB_{ox}, que apresenta um pico de absorbância em

650nm, acompanhada pela mudança da coloração da solução para azul, pode-se caracterizar a presença da enzima Glicose Oxidase em um meio (JOSEPHY *et al.*, 1982).



Na figura 5.48, estão mostradas as curvas UV-Vis referentes à formação do produto TMB_{ox}, de coloração azul, para períodos de tempo entre 5 e 40 minutosda após a adição dos reagentes sobre a suspensão dos MWNT-CONHGOx em PBS. Percebe-se claramente a formação do pico de absorção em 650nm, com o aumento da absorbância observado à medida que o tempo de reação aumenta, indicando que houve a imobilização da enzima Glicose Oxidase nos nanotubos carboxilados e que as enzimas mantiveram sua atividade.

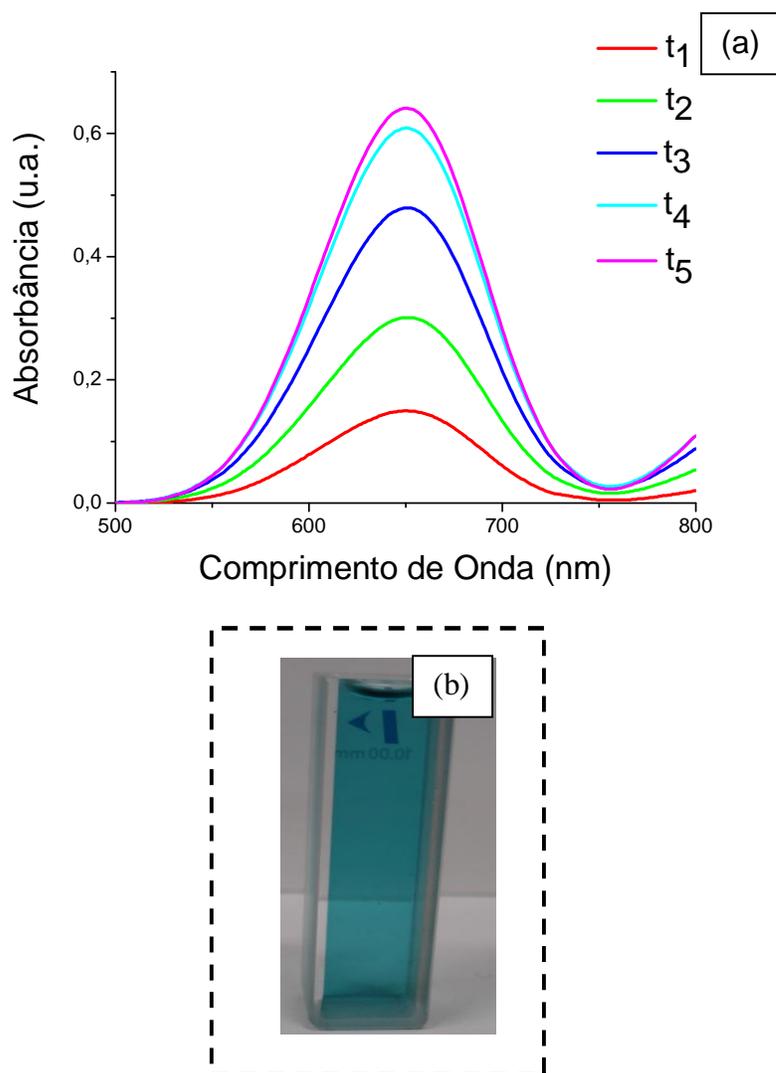


Figura 5.48 (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-CONHGOx nos tempos de $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio.

Para efeitos de comparação, foi realizado o teste de atividade da enzima GOx para a amostra MWNT-COOH+GOx, cujo espectro está apresentado na figura 5.49, mostrando que também houve a formação do TMB oxidado devido à presença de uma grande concentração de moléculas da enzima GOx adsorvida na superfície dos nanotubos. Como já foi relatado, na ausência dos reagentes de conjugação EDC/sulfo-NHS a enzima não se liga

via ligação covalente com as carboxilas dos nanotubos. No caso dos MWNT-COOH+GOx pode ocorrer adsorção física da enzimas sobre os nanotubos via interações de van der Waals. Observa-se o pico em 650nm com absorbância maior do que o mesmo pico observado para o sistema MWNT-CONHGOx, porque as enzimas ligadas covalentemente estão presas (imobilizadas) nas superfícies dos nanotubos e menos disponíveis para a reação de oxido-redução. No entanto, as enzimas adsorvidas fisicamente na superfície dos nanotubos, sistema MWNT-COOH+GOx, estão mais disponíveis a reagir e por isso observa-se um pico de absorção maior devido à maior concentração de TMB oxidado formado.

Após o processo de remoção da enzima GOx adsorvida fisicamente na superfície dos nanotubos foram realizados novamente os testes de atividade da enzima GOx presente nas amostras MWNT-CONHGOx e MWNT-COOH+GOx. Para o sistema MWNT-CONHGOx, os espectros, apresentados na figura 5.50, mostram a formação do produto TMB oxidado ao longo do tempo com absorbâncias superiores aquelas observadas para o sistema MWNT-COOH+GOx, cujo espectro está mostrado na figura 5.51. O processo de remoção da GOx que estava adsorvida fisicamente nos nanotubos utilizando solução saturada de KCl, foi realizado com sucesso uma vez que a intensidade das absorbâncias obtidas para a reação do sistema MWNT-COOH+GOx com TMB foi inferior a observada para o mesmo sistema antes do procedimento de remoção. A absorbância observada para o sistema MWNT-CONHGOx foi cerca de 4 vezes maior do que a observada para MWNT-COOH+GOx, confirmando a presença da enzima GOx ligada covalentemente nos nanotubos de carbono.

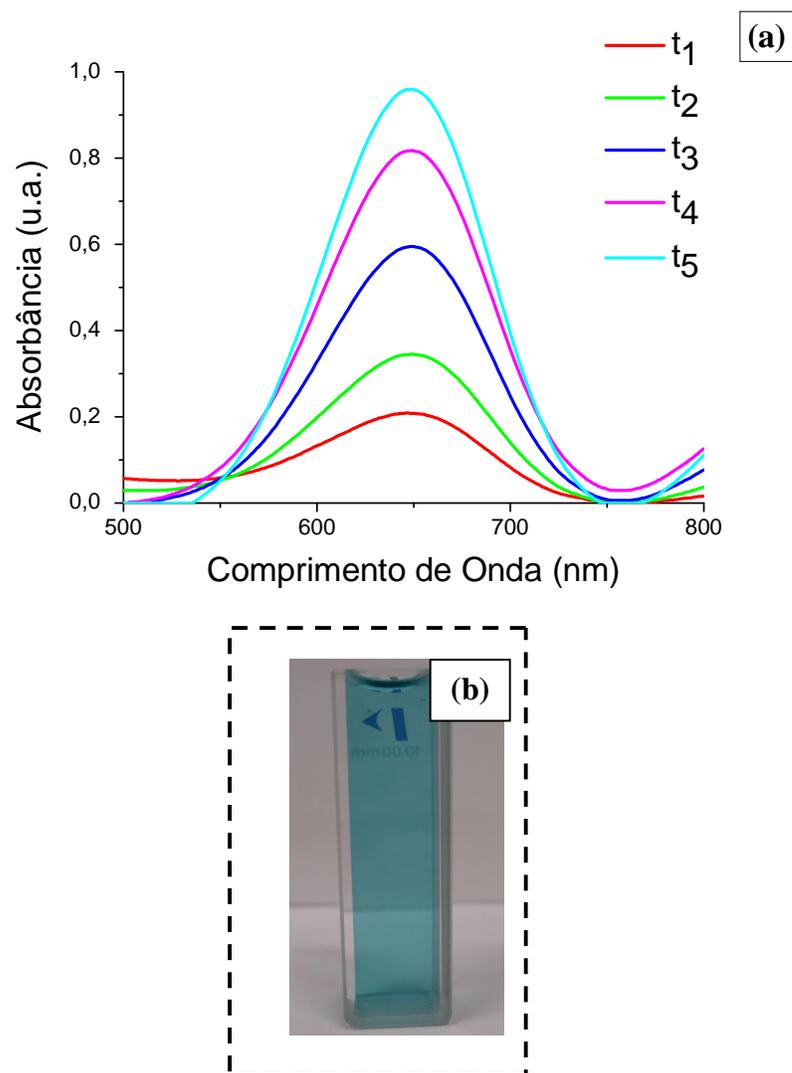


Figura 5.49 (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-COOH+GOx nos tempos de $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio.

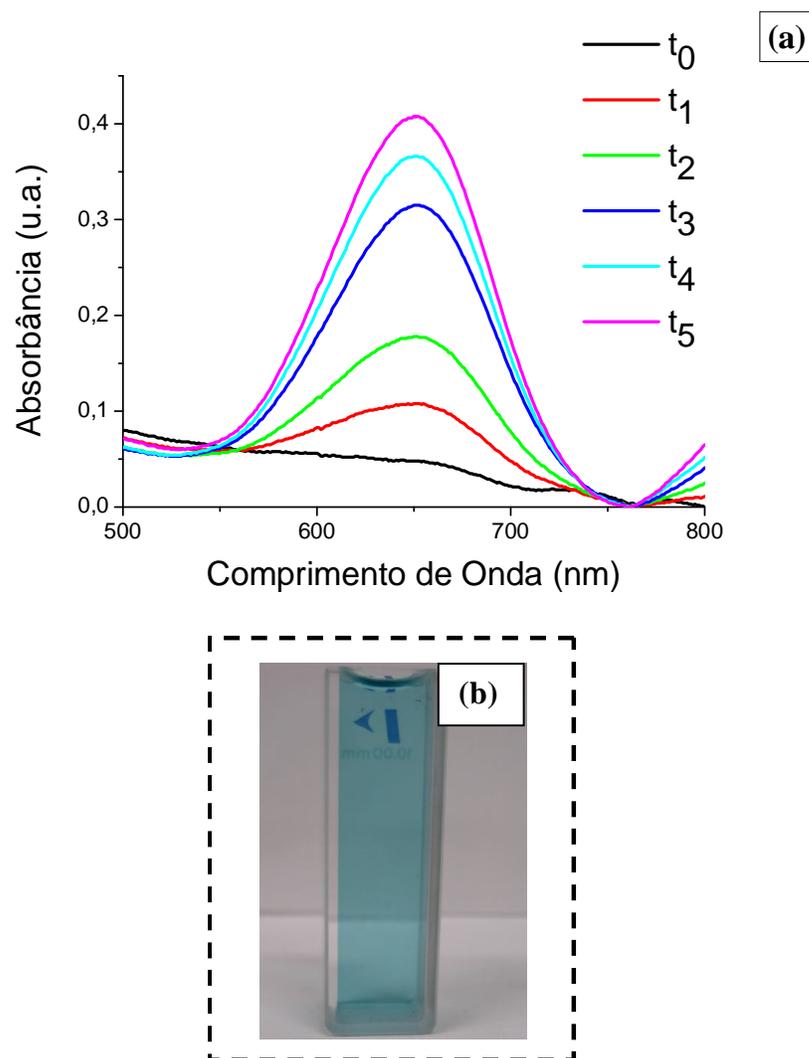


Figura 5.50 (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-CONHGOx após processo de remoção de GOx nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio.

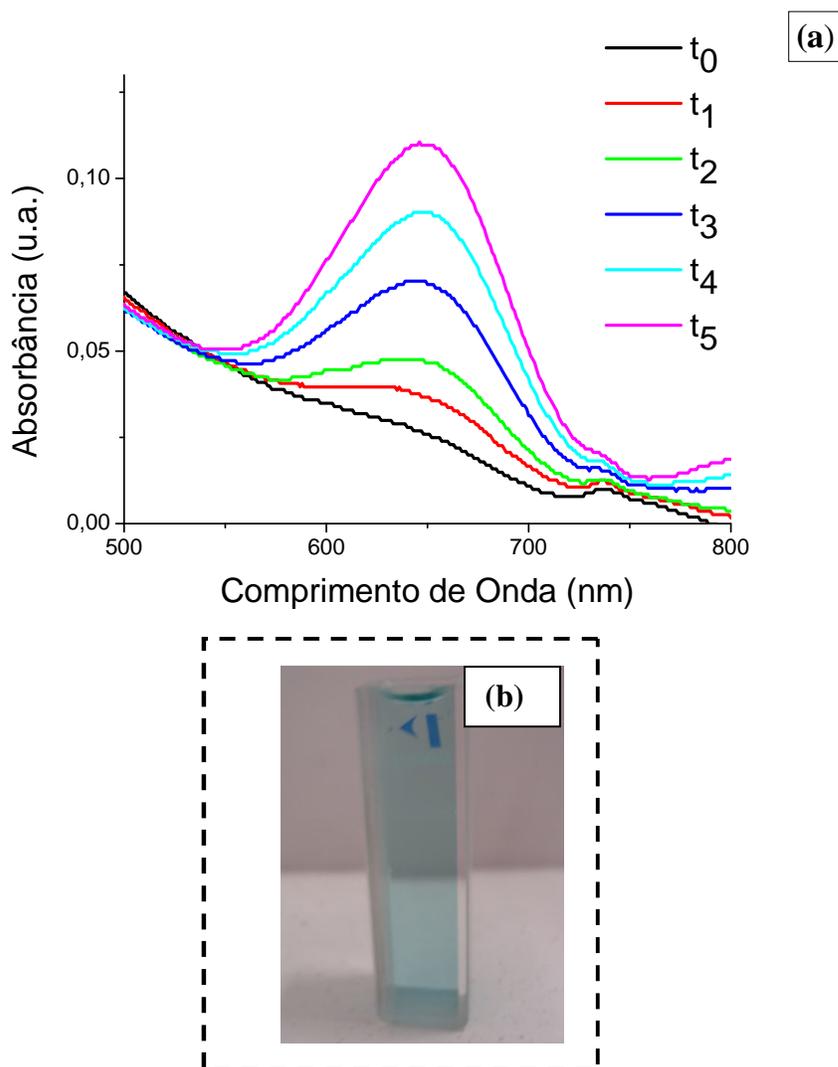


Figura 5.51 (a) espectro UV-Vis obtido para o produto formado pela oxidação do TMB na presença de peróxido de hidrogênio para a amostra MWNT-COOH+GOx, após processo de remoção de GOx, nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração azul formada após 40 minutos de ensaio.

Na figura 5.52 estão mostrados os histogramas revelando a evolução da reação de oxidação do TMB para as amostras de MWNT-COOH+GOx e MWNT-CONHGOx após o processo de remoção da enzima GOx adsorvida fisicamente. Percebe-se claramente a pequena taxa de formação do produto TMB oxidado para a amostra MWNT-COOH+GOx, revelando

uma maior concentração de Glicose Oxidase presente nos nanotubos bioconjugados MWNT-CONHGO_x.

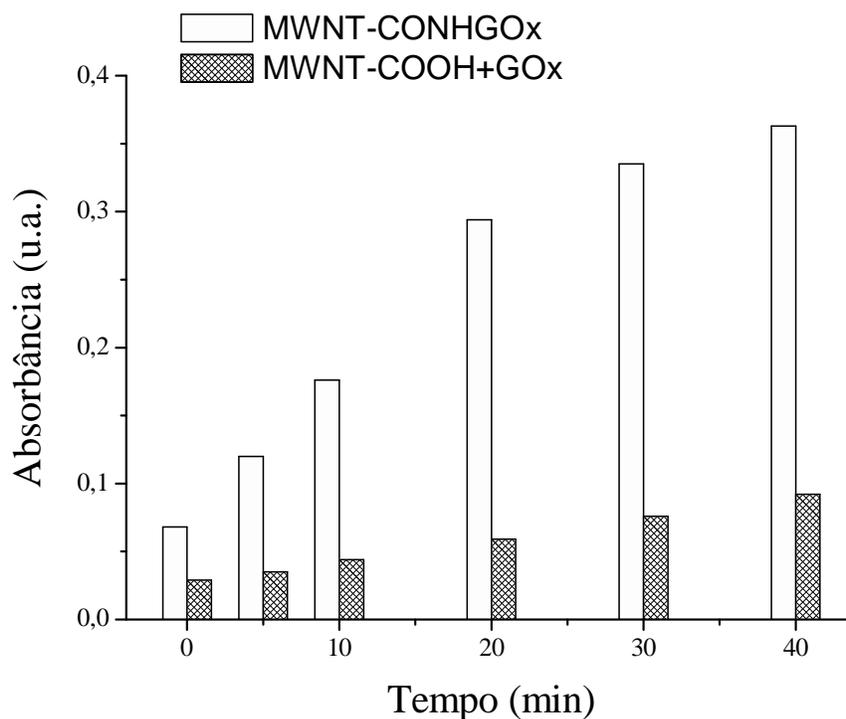


Figura 5.52 Histograma mostrando a evolução da reação de oxidação do TMB para as amostras MWNT-COOH+GO_x e MWNT-CONHGO_x nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação. Após remoção da enzima adsorvida fisicamente.

Na figura 5.53 estão mostradas as curvas representando a evolução da atividade da enzima GO_x presente nos sistemas MWNT-CONHGO_x e MWNT-COOH+GO_x com o decorrer do tempo. Pode-se perceber que quando a enzima está adsorvida fisicamente nos nanotubos, a sua atividade é inferior a das enzimas ligadas covalentemente nos nanotubos, evidenciando a maior concentração de GO_x presente no sistema MWNT-CONHGO_x.

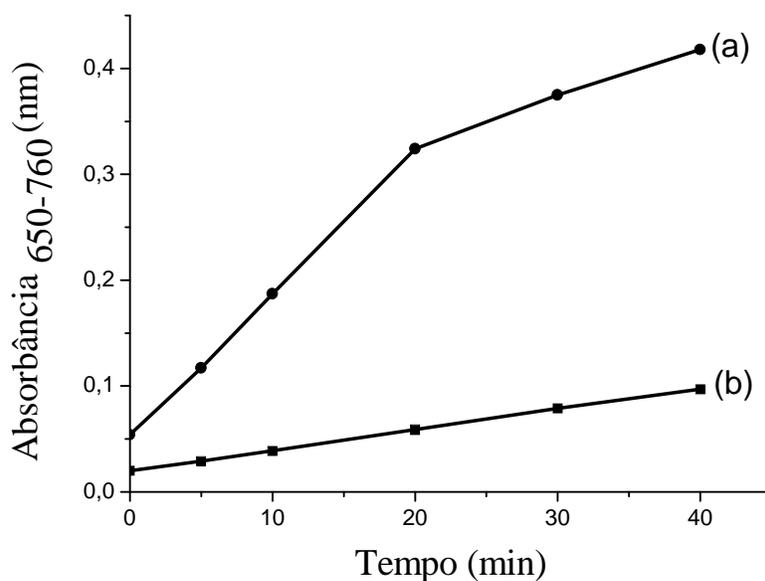


Figura 5.53 Curvas representando a evolução de formação do produto TMB oxidado em 650nm com o tempo para os sistemas MWNT-CONHGOx (a) e MWNT-COOH+GOx (b).

Nas figuras 5.54 e 5.55 estão mostrados os espectros UV-Vis obtidos para as amostras MWNT-COOH e água, respectivamente, durante o processo de oxidação do TMB. Em ambas as amostras não foi observada a formação do pico de absorção em 650nm referente ao TMB oxidado. Isso mostra que quando a enzima GOx não está presente no meio, não há formação de peróxido de hidrogênio que reage oxidando o TMB.

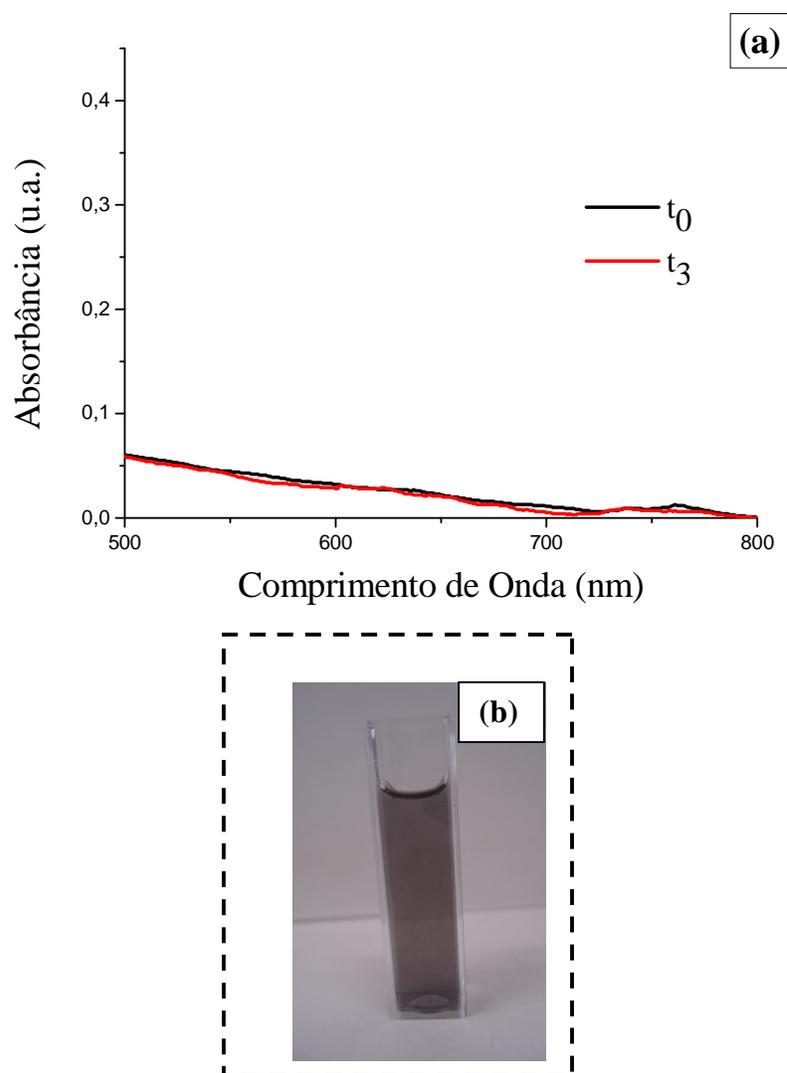


Figura 5.54 (a) espectros UV-Vis obtidos para a amostra MWNT-COOH nos tempos de 0 (t_0) e 20 minutos (t_3) de reação com os reagentes TMB/HRP e D-Glicose. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração da suspensão analisada após 20 minutos de ensaio.

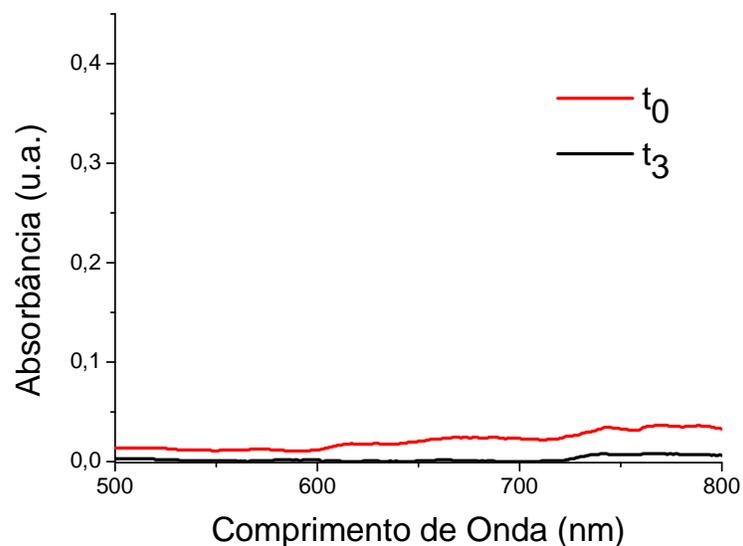


Figura 5.55 Espectros UV-Vis obtidos para água nos tempos 0 (t_0) e 20 minutos (t_3) de reação com os reagentes TMB/HRP e D-Glicose.

A atividade da enzima GOx presente nos filmes de nanocompósitos formados a partir do PVA e nanotubos de carbono bioconjugados com GOx (MWNT-CONHGOX) foi testada e o espectro está apresentado na figura 5.56. Os resultados revelaram a formação do pico de absorção do TMB oxidado em 650nm (produto azul), mostrando que foi possível sintetizar um nanocompósito contendo nanotubos bioconjugados com a enzima GOx.

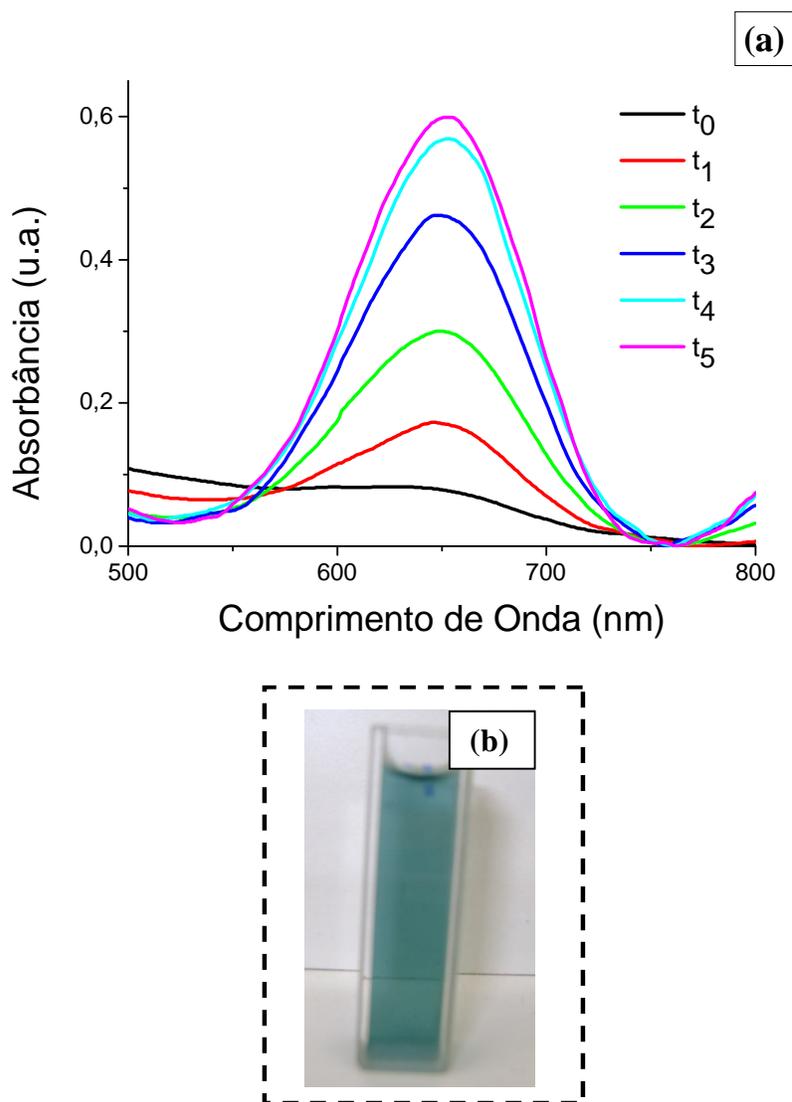


Figura 5.56 (a) espectros UV-Vis obtidos para amostra do nanocompósito PVA/MWNT-CONHGOx nos tempos de t_0 , $t_1=5\text{min}$; $t_2=10\text{min}$; $t_3=20\text{min}$; $t_4=30\text{min}$ e $t_5=40\text{min}$ de reação com os reagentes TMB/HRP e D-Glicose. (b) fotografia da cubeta mostrando a coloração da suspensão após 40 minutos de ensaio.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido considerado como anti-séptico oxidativo instável. Sua ação antimicrobiana se dá pela formação de radicais livres hidroxil que atacam a membrana citoplasmática, o DNA e outros componentes essenciais de vários microorganismos (MATOS *et al.*, 2009).

A síntese de nanocompósitos biohíbridos é interessante, pois estes materiais bioconjugados com a enzima Glicose Oxidase podem funcionar como barreira antimicrobiana produzindo o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 . Esta proposta é apresentada na figura 5.57.

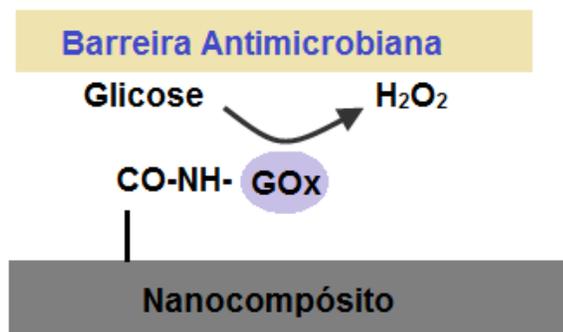


Figura 5.57 Representação do sistema nanocompósito biohíbrido baseado na reação de oxidação da glicose mediada pela enzima GOx immobilizada covalentemente nas funcionalidades carboxílicas dos nanotubos.

A modificação de CNTs com espécies biológicas e bioativas é relevante para o preparo de materiais biofuncionais, pois tais modificações tornam possível a avaliação da biocompatibilidade e de outros aspectos práticos das potenciais aplicações biológicas dos CNTs. Uma das aplicações biológicas sugerida para o nanocompósito contendo nanotubos bioconjugados com GOx, desenvolvido no presente trabalho, é a utilização como bandagem (“*wound healing*”), com ação bactericida, em tecido epitelial para o tratamento de queimaduras.

5.4.3 – Análise Qualitativa do Sistema PVA/MWNT-CONHGOx quanto à Potencial Inibição de Crescimento Bacteriano

A figura 5.58 mostra a evolução da reação de oxidação do TMB para amostras de nanocompósito contendo a enzima GOx após 7 dias em meio de cultura bacteriana. Na figura 5.59 estão mostrados os espectros UV-Vis obtidos para a amostra de nanocompósito 28%PMWNT-F1/R1 (sem GOx) após 7 dias em meio de cultura bacteriana. Pela análise e comparação entre as curvas obtidas para as duas amostras percebe-se a menor produção de

TMB oxidado para a amostra de nanocompósito contendo a enzima GOx. A presença de glicose e da enzima GOx em um meio inibe o crescimento bacteriano pois consome o oxigênio molecular e libera peróxido de hidrogênio (AZEREDO *et al.*, 2000). A presença da enzima GOx no material nanocompósito promoveu a oxidação da glicose presente no meio de cultura formando ácido glicônico e H_2O_2 , este, por sua vez, decompõe-se espontaneamente formando água e oxigênio molecular. Então, quando são adicionados o TMB/HRP e a enzima GOx sob o meio de cultura do nanocompósito contendo GOx, a oxidação do TMB ocorre em uma taxa menor devido à menor concentração de glicose no meio (menor concentração de H_2O_2 formada para oxidar o TMB).

Já para a amostra de nanocompósito sem GOx (28%PMWNT-F1/R1) não há o consumo da glicose presente no meio de cultura e, por consequência, há uma maior concentração de peróxido formada para oxidar o TMB. Tal fato explica a rápida formação e saturação do produto TMB oxidado (pico de absorção em 650nm), o que é mostrado na figura 5.59.

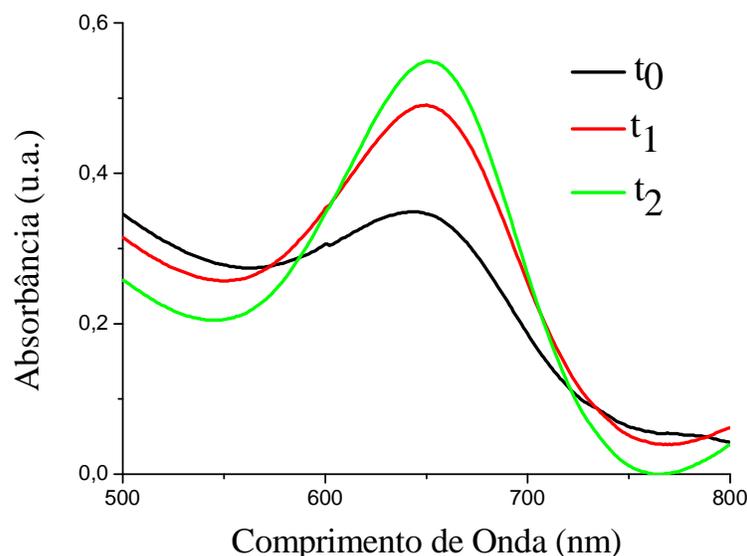


Figura 5.58 Espectros UV-Vis obtidos para a amostra do nanocompósito PVA/MWNT-CONHGOx após 7 dias de cultura bacteriana nos tempos de 0 (t_0), 5 (t_1) e 10 minutos (t_2) de reação com os reagentes GOx/TMB/HRP durante o teste de atividade da enzima GOx.

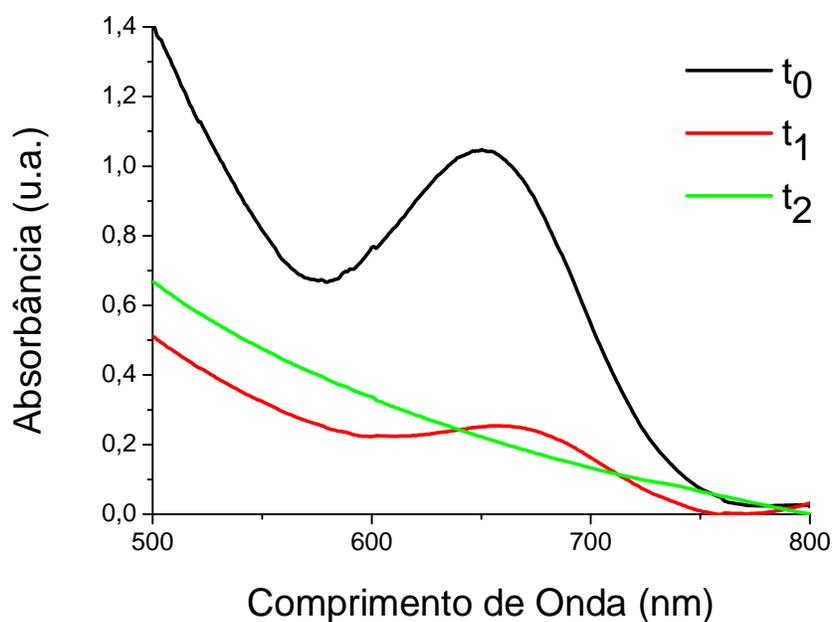


Figura 5.59 Espectros UV-Vis obtidos para amostra do nanocompósito 28%PMWNT-F1/R1 após 7 dias de cultura bacteriana nos tempos de 0 (t_0), 5 (t_1) e 10 minutos (t_2) de reação com os reagentes GOx/TMB/HRP durante o teste de atividade da enzima GOx.

Os resultados obtidos mostraram que o teste qualitativo de inibição de crescimento bacteriano sobre o nanocompósito PVA/MWNT-CONHGOx representa um bom modelo para caracterizar e confirmar que a bioconjugação de nanotubos de carbono com Glicose Oxidase é uma rota interessante para o preparo de biomateriais.

6 - CONCLUSÃO

Filmes nanocompósitos de PVA/nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram sintetizados através do método simples de mistura em solução e evaporação de solvente. As propriedades mecânicas e de intumescimento dos nanocompósitos foram melhoradas em comparação com o polímero puro.

Os filmes foram caracterizados por MEV, Raman e Ensaio de Tração com o objetivo de entender a morfologia, a funcionalização química e o efeito da presença dos nanotubos frente às propriedades mecânicas dos materiais produzidos. Os resultados mostraram evidências da funcionalização química dos nanotubos, que através da adição de baixas quantidades de CNTs percebem-se grandes modificações nas propriedades dos nanocompósitos em comparação com os filmes de PVA puros.

A presença dos nanotubos aumentou o módulo de elasticidade e diminuiu a tenacidade dos filmes nanocompósitos em relação aos filmes de PVA, devido à formação de uma rede polimérica mais rígida indicando que houve a adesão interfacial dos nanotubos na matriz de PVA.

Os resultados dos testes de citotoxicidade indicaram viabilidade celular sugerindo que os nanocompósitos podem ser biocompatíveis.

Os nanotubos de carbono foram biofuncionalizados com sucesso com a enzima GOx e preparados nanocompósitos biohíbridos e biofuncionais.

Em resumo, os nanocompósitos baseados em PVA/nanotubos de carbono de paredes múltiplas oferecem uma ampla faixa de escolhas para potencialmente serem utilizados em aplicações biomédicas, tais como, biomaterial, veículo de liberação controlada de drogas e em engenharia de tecido epitelial e de tecido ósseo.

7 – TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a degradação dos filmes de nanocompósitos.

Avaliar o comportamento dos nanocompósitos com a incorporação de fármaco e a aplicação desse sistema como agente de liberação controlada.

Analisar comparativamente as características físicas, mecânicas e biológicas das membranas quando do uso de diferentes tipos de PVA (massa molar e grau de hidrólise).

Avaliar o efeito da reticulação química dos filmes de nanocompósitos utilizando agentes reticulantes tais como, glutaraldeído e organosilanos, no sentido de modificar as propriedades físicas, químicas e mecânicas nos filmes de nanocompósitos.

Alterar a metodologia de síntese dos nanocompósitos buscando a obtenção de materiais porosos e tridimensionais para aplicação como *scaffold*.

Considerando as possibilidades de aplicações biomédicas do sistema estudado, torna-se interessante a avaliação *in vivo* dos nanocompósitos no que diz respeito a biocompatibilidade e citotoxicidade, resposta inflamatória e degradabilidade durante a regeneração tecidual.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARRATEGI, A., GUTIÉRREZ, M. C., MORENO-VICENTE, C., HORTIGÜELA, M. J., RAMOS, V., LÓPEZ-LACOMBA, J. L., FERRER, M. L., MONTE, F. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes, *Biomaterials*, v. 29, p. 94-102, 2008.
- AJAYAN, P. M., STEPHAN, O., COLLIEX, C., TRAUTH D. Aligned carbon nanotube arrays formed by cutting a polymer resin-nanotube composite, *Science*, v. 265, p. 1212-1214, 1994.
- AOKI, N., YOKOYAMA, A., NODASAKA, Y., AKASAKA, T., UO, M., SATO, Y., TOHJI, K., WATARI, F. Cell Culture on Carbon Nanotube Scaffold, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 1, n. 4, p. 402-405, 2005.
- ARANHA, I. B., LUCAS, E. F. Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, n. 4, p. 174-181, 2001.
- ARMENTANO, I., DOTTORI, M., FORTUNATI, E., MATTIOLI, S., KENNY, J. M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, p. 2126-2146, 2010.
- AZEREDO, H. M., FARIA, J. A. F., AZEREDO, M. C. Embalagens ativas para alimentos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 20, n.3, 2000.
- BANERJEE, S., HEMRAJ-BENNY, T., WONG, S. S. Covalent surface chemistry of single-walled carbon nanotubes, *Advanced Materials*, v. 17, n. 1, p.17-29, 2005.
- BARTHOLOME, C., DERRÈ, A., ROUBEAU, O., ZAKRI, C., POULIN, P. Electromechanical properties of nanotube-PVA composite actuator biomorphs, *Nanotechnology*, v. 19, p.1-6, 2008.

- BEKYAROVA, E., NI, Y., MALARKEY, E. B., MONTANA, V., MCWILLIAMS, J. L., HADDON, R. C., PARPURA, V. Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 1, n. 1, p. 3-17, 2005.
- BELYANSKAYA, L., MANSER, P., SPOHN, P., BRUININK, A., WICK, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction, *Carbon*, v. 45, p. 2643-2648, 2007.
- BISPO, V. M. *Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2009. 206p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).
- CADEK, M., COLEMAN, J. N., BARRON, V. Morphological and mechanical properties of carbon-nanotube-reinforced semicrystalline and amorphous polymer composites, *Applied Physics Letters*, v. 81, n. 27, p. 5123-5125, 2002.
- CAPAZ, R. B., CHACHAM, H. Nanotubos e a nova era do carbono. *Ciência Hoje*, v. 33, n. 198, p. 20-27, 2003.
- CARVALHO, S. M. *Análise do Comportamento de Cementoblastos de Ratos em Contato com o Produto Iônico da Dissolução de Vidros Bioativos*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2010. 93p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).
- CHEN, J., HAMON, M. A., HU, H., CHEN, Y., RAO, A. M., EKLUND, P. C., HADDON, R.C. Solution properties of single-walled carbon nanotubes, *Science*, v. 282, p. 95-98, 1998.
- CHEN, T., RAMOS, J. ENZYME KINETICS [APPLICATION OF UV-VIS SPECTROMETRY], *Enzyme Kinetics*.

- CHEN, W., TAO, X., XUE, P., CHENG, X. Enhanced mechanical properties and morphological characterizations of poly(vinyl alcohol)-carbon nanotube composite films, *Applied Surface Science*, v. 252, p. 1404-1409, 2005.
- CHŁOPEK, J., CZAJKOWSKA, B., SZARANIEC, B., FRACKOWIAK, E., SZOSTAK, K., BÉGUIN, F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility, *Carbon*, v. 44, p. 1106-1111, 2006.
- COLEMAN, J. N., KHAN U., BLAU WE. J., GUN'KO, Y. K. Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube-polymer composites, *Carbon*, v. 44 p.1624-1652, 2006.
- COSTA JR, E. S. *Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2008. 151p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).
- COSTA JR, E. S., MANSUR, H. S. 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.
- DATSYUK, V., KALYVA, M., PAPAGELIS, K., PARTHENIOS, J., TASIS, D., SIOKOU, A., KALLITSIS, I., GALIOTIS, C. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes, *Carbon*, v. 46, p. 833-840, 2008.
- ESTEVES, A. C. C., BARROS-TIMMONS, A., TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: Estratégias de síntese de materiais híbridos, *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.
- FERNANDES, F. M. *Síntese de nanotubos de carbono orientados e aplicação na produção de pontas de AFM*. São Paulo: Instituto de Física, USP, 2008, 81p. (Dissertação, Mestrado em Ciências).

- FERREIRA E., LUCAS, R., ROSSI, L. A., ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura, *Rev Esc Enferm USP*, v. 37, n. 1, p. 44-51, 2003a.
- FERREIRA, O. P. *Nanotubos de Carbono: Preparação de Caracterização*. Campinas: Instituto de Química da Unicamp, 2003b, 38p. (Monografia, Exame da Qualificação de Doutorado em Química).
- FILHO, A. G. S., FAGAN, S. B. Funcionalização de Nanotubos de Carbono. *Química Nova*, v. 30, n. 7, p. 1695-1703, 2007.
- FOLDVARI, M., BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v.4, p. 173–182, 2008a.
- FOLDVARI, M., BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v.4, p. 183-200, 2008b.
- GALHARDO, K. S. Construção de Biosensores Baseados em Biomoléculas e Líquidos Iônicos. São Paulo: Instituto de Química, USP, 2010. 81p. (Dissertação, Mestrado em Química).
- GUERRINI, M. L., BRANCIFORTI, M. C., BRETAS, R. E. S., OLIVEIRA, M. P. Eletrofiação do poli (álcool vinílico) via solução aquosa, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 16, n. 4, p. 286-293, 2006.
- GOULD, P. Carbon nanotubes help bones grow, *Materials Today*, v. 9, p. 19, 2006.
- GOYANES, S., RUBIOLO, G. R., SALAZAR, A., JIMENO, A., CORCUERA, M., A., MONDRAGON, I. Carboxylation treatment of multiwalled carbon nanotubes monitored by infrared and ultraviolet spectroscopies and scanning probe microscopy. *Diamond & Related Materials*, v.16, p. 412-417, 2007.

- GUTIERRES, M., LOPES, M. A., HUSSAIN, N. S., CABRAL, A. T., ALMEIDA, L., SANTOS, J. D. Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual. *Arquivos de Medicina*, v.19, p. 153-162, 2006.
- HARRIS, M. I. *Pele, Estrutura, Propriedades e Envelhecimento*. Editora SENAC. São Paulo, 2009.
- HARRISON, B. S., ATALA, A. Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials*, v. 28, p. 344-353, 2007.
- HERBST, M. H., MACÊDO, M. I. F, ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004.
- HWANG, G. L., HWANG, K. C. Carbon nanotube reinforced ceramics. *Journal of Materials Chemistry*, v. 11, p. 1722-1725, 2001.
- IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v. 354, p. 56-58, 1991.
- JIANG, K., SCHADLER, L. S., SIEGEL, R.W, ZHANG, X., ZHANG, H., TERRONES, M. Protein immobilization on carbon nanotubes via two-step process of diimide-activated amidation, *Journal of Materials Chemistry*, v. 14, p. 37-39, 2004.
- JIANG, L., GAO, L., SUN, J. Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 260, p. 89-94, 2003.
- KOTZ, J. C., TREICHEL, P. *Química e Reações Químicas*. 4. ed. v. 1. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. 2002. 538p.
- LACHMAN, N., BARTHOLOME, C., MIAUDET, P., MAUGEY, M., POULIN, P., WAGNER, H. D. Raman response of Carbon nanotube/PVA fibers under strain, *The Journal of Physical Chemistry Letters C*, v. 113, p. 4751-4754, 2009.

- LAVALL, R. L., SALES, J. A., BORGES, R. S., CALADO, H. D. R., MACHADO, J. C., WINDMÖLER, D., SILVA, G. G., LACERDA, R. G., LADEIRA, L. O. Nanocompósitos de poliuretana termoplástica e nanotubos de carbono de paredes múltiplas para dissipação eletrostática, *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 1-8, 2010.
- LIN, Y., LU, F., TU, Y., REN, Z. Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrode ensembles, *NANO LETTERS*, v. 4, n. 2, p.191-195, 2004a.
- LIN, Y., TAYLOR, S., LI, H., FERNANDO, K. A., QU, L., WANG, W., GU, L., ZHOU, B., SUN, Y-P. Advances toward bioapplications of carbon nanotubes, *Journal of Materials Chemistry*, v. 14, p. 527-541, 2004b.
- LIN, Y., ZHOU, B., FERNANDO, K. A., LIU, P., ALLARD, L. F., SUN, Y-P. Polymeric Carbon Nanocomposite from Carbon Nanotube Funcionalized with Matrix Polymer, *Macromolecules*, v. 36, p. 7199-7204, 2003.
- LOBO, A. O. *Biocompatibilidade de Superfícies Recobertas por Nanotubos de Carbono*. São José dos Campos: Física e Química de Materiais Aeroespaciais, ITA, 2008. 175p. (Dissertação, Mestrado em Física e Química de Materiais Aeroespaciais).
- LOBO, A. O., MARTIN, A. A., ANTUNES, E. F., TRAVA-AIROLDI, V. J., CORAT, E. J. Caracterização de Materiais Carbonosos por Espectroscopia Raman, *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, v. 24, n. 2, p. 98-103, 2005.
- LU, C., SU, F., HU, S. Surface modification of carbon nanotubes for enhancing BTEX adsorption from aqueous solutions, *Applied Surface Chemistry*, v. 254, p. 7035-7041, 2008.
- MANSUR, A. A. P. Mecanismos Físico-Químicos de Aderência na Interface Argamassa Modificada com Polímeros/Cerâmica de Revestimento. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2007. 355p. (Tese, Doutorado em Ciências dos Materiais).

- MATOS, B. M., OLIVEIRA, L. D., JORGE, A. O. C., BALDUCCI, I., KOGA-ITO, C., Y. Comparação da atividade antimicrobiana de soluções de peróxido de hidrogênio e malva sobre *candida albicans*. *Cienc. Odontol. Bras*, v. 12, p. 24-28, 2009.
- MELANDER, W., HORVÁTH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 183, p. 200-215, 1977.
- MICHELSON, E. T.; HUFFMAN, C. B.; RINZLER, A. G.; SMALLEY, R. E.; HAUGE, R. H.; MARGRAVE, J. L. Fluorination of single-wall carbon nanotubes, *Chem. Phys. Lett*, v. 296, p. 188-194, 1998.
- MICKELSON, E. T., CHIANG, I. W., ZIMMERMAN, J. L., BOUL, P. J., LOZANO, J., LIU, J., SMALLEY, R. E., HAUGE, R. H., MARGRAVE, J. L. Solvation of Fluorinated Single-Wall Carbon Nanotubes in Alcohol Solvents, *Journal of Physical Chemistry B*, v. 103, p. 4318-4322, 1999.
- MISRA, S. K., WATTS, P. C. P., VALLAPPIL, S. P., SILVA, S. R. P., ROY, I., BOCCACCINI, A. R. Poly(3-hidroxybutyrate)/Bioglass® composite films containing carbon nanotubes, *Nanotechnology*, v. 18, p. 1-7, 2007.
- MONIRUZZAMAN, M., WINEY, K. I. Polymer Nanocomposites Containing Carbon Nanotubes, *Macromolecules*, v. 39, p. 5194-5205, 2006.
- OLIVEIRA, A. A. R., CIMINELLI V., DANTAS, M. S. S., MANSUR, H. S., PEREIRA, M. M. Acid character control of bioactive glass/polyvinyl alcohol hybrid foams produced by sol-gel, *Journal Sol-gel Sci. Technol.*, v. 47, p. 335-346, 2008.
- OLIVEIRA, B. L. Síntese de nanotubos de carbono (NTC) por deposição química de vapor empregando Fe/CaCO₃ e Fe/NTC como catalisador. Rio de Janeiro: Engenharia Química UFRJ, 2009. 117p. (Dissertação, Mestrado em Ciências dos Materiais).

- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. *Biomaterias Fundamentos & Aplicações*. 1 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538p.
- PAIVA, M. C., ZHOU, B., FERNANDO, K. A. S., LIN, Y., KENNEDY, J. M., SUN, Y-P. Mechanical and morphological characterization of polymer-carbon nanocomposites from functionalized carbon nanotubes, *Carbon*, v. 42, p. 2849-2854, 2004.
- PASCHOALINO, M. P., MARCONE, G. P. S., JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.
- RABA, J., MOTTOLA, H. A. Glucose Oxidase as an Analytical Reagent, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 25, p. 1-42, 1995.
- RAVINDRAN, A., CHAUDHARY, S., COLBURN, B., OZKAN, M., OZKAN, C. Covalent Coupling of Quantum Dots to Multiwalled Carbon Nanotubes for Electronic Device Applications, *Nano Letters*, v. 3, n. 4, p. 447-453, 2003.
- ROSINA, C. R., BARONI, S., CAVALCANTI, O. A. Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade de filmes isolados de polimetacrilato contendo polissacarídeo da raiz de Lótus (*Nelumbo nucifera*), *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 3, p. 426-431, 2004.
- SAHITHI, K., SWETHA, M., RAMASAMY, K., SRINIVASAN, N. Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 281-283, 2010.
- SAHOO, N. G., RANA, S., CHO, J. W., LI L, CHAN, S. H. Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes, *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 837-867, 2010.
- SAITO, N., USUI, Y., AOKI, K., NARITA, N., SHIMIZU, M., OGIWARA, N., NAKAMURA, K., ISHIGAKI, N., KATO, H., TARURA, S., ENDO, M. Carbon

- Nanotubes for Biomaterials in Contact with Bone, *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 523-527, 2008.
- SAYES, C. M., LIANG, F., HUDSON, J. L., MENDEZ, J., GUO, W., BEACH, J. M., MOORE, V. C., DOYLE, C. D. Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology Letters*, v. 161, p.135-42, 2006.
- SHAFFER, M. S. P., FAN, X., WINDLE, A. H. Dispersion and packing of carbon nanotubes, *Carbon*, v. 36, n. 11, p. 1603-1612, 1998.
- SHI, X., HUDSON, J. L., SPICER, P. P., TOUR, J. M., KRISHNAMOORTI, R., MIKOS, A. G. Injectable Nanocomposites of Single-Walled Carbon Nanotube and Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering, *Biomacromolecules*, v. 7, p. 2237-2242, 2006.
- SCHUCH, F. F., BEVILAQUA, R. C. A., FAGAN, S. B. Propriedades eletrônicas e estruturais de nanotubos de carbono e aplicação como carreadores de fármacos, *Disc. Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas*, v. 8, n. 1, p. 95-105, 2007.
- SILVA, E. E. *Síntese e Aplicação de Nanotubos de Carbono em Biotecnologia*. Belo Horizonte: Departamento de Física da UFMG, 2007. 198p. (Tese, Doutorado em Física).
- SILVA, E. E. COLLETA, H. H. M., FERLAUTO, A. S., MOREIRA, R. L., RESENDE, R. R., OLIVEIRA, S., KITTEN, G. T., LACERDA, R. G., LACEIRA, L. O. Nanostructured 3-D collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds, *Nano Research*, v. 2, p. 462- 473, 2009.
- SMITH, B., WEPASNICK, K., SCHROTE, K. E., BERTELE, A. R., BALL, W., O'MELIA, C., FAIRBROTHER, H. Colloidal properties of aqueous suspensions of acid-treated, multi-walled carbon nanotubes, *Environmental Science & Technology*, v. 43, n. 3, p. 819-825, 2009.

- SO, H. H., CHO, J. W., SAHOO, N. G. Effect of carbon nanotubes on mechanical and electrical properties of polyimide/carbon nanotubes nanocomposites, *European Polymer Journal*, v. 43, p. 3750-3756, 2007.
- SPITALSKY, Z., TASIS, D., PAPAGELIS, K., GALIOTIS, C. Carbon nanotube-polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties, *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 357-401, 2010.
- SUN, Y-P., FU, K., LIN, Y., HUANG, W. Functionalized carbon nanotubes: Properties and applications, *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 12, p. 1096-1104, 2002.
- THOSTENSON, E. K., REN, Z., CHOU, T-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review, *Composites Science and Technology*, v. 61, p. 1899-1912, 2001.
- TOMÁNEK, D., JORIO, A., DRESSELHAUS, M. S., DRESSELHAUS, G. Introduction to the important and exciting aspects of carbon-nanotube science and technology. In: Jorio, A., Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G. *Carbon Nanotubes*; advanced topics in the synthesis, structure, properties and applications. New York: Springer, 2008. Topics in applied physics ;111, 1-12.
- WITT, S., WOHLFAHRT, G., SCHOMBURG, D., HECHT, H-J., KALISZ, H. M. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose, *Journal of Biochemistry*, v. 347, p. 553-559, 2000.
- WÖRLE-KNIRSCH, J. M., PULSKAMP, K., KRUG, H. F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters*, v. 6, n. 6, p.1261-1268, 2006.

- YADAV, P., AJORE, R., BHARADWAJ, L. M. Cross-linker mediated biofunctionalization of single wall carbon nanotubes with glucose oxidase, *Journal of Nanotechnology Online*, v. 5, p. 2-14, 2009.
- YANG, W., THORDARSON, P, GOODING, J. J., RINGER, S. P., BRAET, F. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology*, v. 18, p. 1-12, 2007.
- ZANELLO, L. P., ZHAO, B, HU, H., HADDON, R. C. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Letters*, v. 6, n. 3, p. 562-567, 2006.
- ZARBIN, A. J. G., Química de (nano)materiais. *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

BIBLIOGRAFIA

- COSTA, H. S., ROCHA, M. F., ANDRADE, G. I., BARBOSA-STANCIOLI, E. F., PEREIRA, M. M., ORÉFICE, R., VASCONCELOS, W. L., MANSUR, H. S. Sol-gel derived composite from bioactive glass-poli(álcool vinílico), *Journal of Materials Science*, v.43, p. 494-502, 2008.
- COSTA, H. S., STANCIOLI, E. F. B., PEREIRA, M. M., ORÉFICE, R. L., MANSUR, H. S. Synthesis, neutralization and blocking procedures of organic/inorganic hybrid scaffolds for bone tissue engineering applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.20, p. 529-535, 2009.
- GAVALAS, V. G., ANDREWS, R., BHATTACHARYYA, D., BACHAS, L. G. Carbon Nanotube Sol-Gel Composite Materials, *Nano Letters*, v. 1, n. 12, p. 719-721, 2001.
- GRIFFTH, L. G., NAUGHTON, G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, v. 295, p. 1009-1014, 2002.
- HOHLI, P., MARTIN, C. R. Smart Nanotubes for Biotechnology, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 6, p. 35-47, 2005.
- MARTIN, C. R., HOHLI, P. The Emerging Field of Nanotube Biotechnology. *Nature*, v. 2, p. 29-37, 2003.
- MWENIFUMBO, S., SHAFFER, M. S., STEVENS, M. M. Exploring cellular behaviour with multi-walled carbon nanotube constructs. *Journal of Materials Chemistry*, v. 17, p. 1894-1902, 2007.
- NANOTUBE MODELER, JCrystalSoft, 2010. Download em: <<http://jcrystal.com/products/wincnt/>> acessado em novembro de 2010.

- REZWAN, K., CHEN, Q. Z., BLAKER, J. J., BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 27, p. 3413-3431, 2006.
- SINHA, N., T.-W, J. Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, v. 4, n. 2, p. 180-195, 2005.
- SHI, X., SITHARAMAN, B., PHAM, Q. P., LIANG, F., WU, K., BILLUPS, W. E., WILSON, L. J., MIKOS, A. G. Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 28, p. 4078-4090, 2007.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5 ed. São Paulo: Bookman, 2002. 836p.
- THOMPSON, B. C., MOULTON, S. E., GILMORE, K. J., HIGGINS, M. J., WHITTEN, P. G., WALLACE, G. G. Carbon nanotube biogels, *Carbon*, v. 47, p. 1282-1291, 2009.
- WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement, *Biomaterials*, v. 24, p. 2133-2151, 2003.
- WHITE, A. A., BEST, S. M., KINLOCH, I. Hydroxyapatite-Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications: A Review, *International Journal of Applied Ceramic Technology*, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2007.