



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (UFC)  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

**RICARDO PIRES DOS SANTOS**

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS E MICROSCOPIA DE  
FORÇA ATÔMICA EM MATERIAIS BIOLÓGICOS**

**FORTALEZA**

**2007**

**RICARDO PIRES DOS SANTOS**

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS E MICROSCOPIA DE FORÇA  
ATÔMICA EM MATERIAIS BIOLÓGICOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física, na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Física.

**Orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire**

FORTALEZA

2007

## **RICARDO PIRES DOS SANTOS**

### **APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS E MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MATERIAIS BIOLÓGICOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire

Aprovada em 11/ 04/ 2007

#### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Valder Nogueira Freire (Orientador)  
Departamento de Física  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada  
Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. José Alzamir da Costa  
Departamento de Física  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Martins  
Instituto de Química e Geociências (IQG)  
Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

---

Prof. Dr. Luis Orlando Ladeira  
Departamento de Física  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**RICARDO PIRES DOS SANTOS**

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS E MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA  
EM MATERIAIS BIOLÓGICOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire

Aprovada em 11/ 04/ 2007

**BANCA EXAMINADORA EXTENDIDA**

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira  
Faculdade de Medicina/Sobral  
Universidade Federal do Ceará - UFC

## DEDICATÓRIA

À minha esposa. Existem pessoas que marcam definitivamente nossas almas. A minha esposa, Cíntia, ou minha “Florzinha” como costume chamar, é uma delas. Na verdade foi a única pessoa que provocou tantas mudanças maravilhosas em tão pouco tempo. Como uma criança recém nascida, fui acolhido em seus braços ternos, após um parto difícil, cuidado e alimentado até me tornar um homem saudável. Estar ao lado de meu amor é querer sempre ser uma pessoa melhor. É o alicerce de minha vida, ou como naquela música: “procurei mas encontrei você e agora o que eu faço...não suporto mais esta longa espera...porque...você é meu amorzinho, você é meu amorzão...você é o tijolinho que faltava na minha construção”. Tudo em relação a ela se resume em uma única frase: “Eu te amo”.

Ao meu pai Paulo e minha mãe Maria. Retidão, honestidade, compaixão e coragem são as principais virtudes passadas por eles. Quero honrá-los em cada ato nesta vida, pois como diz meu pai, “... um homem é julgado pelas suas atitudes”. Sem a educação e o amor que me deram, certamente não teria terminando esta tese.

À Germaninha, cuja perda fez-me pensar na fragilidade da vida humana. Não sou religioso, mas se anjos existem, tenho certeza que ela está entre eles agora.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio e pela aprovação dos projetos “Preparação, caracterização e aplicação tecnológica de carbono poroso preparado a partir dos resíduos da casca de arroz“ e “Rede de Nanobioestruturas“, fundamentais no desenvolvimento de minhas atividades de pesquisa.

Ao Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, pela infra-estrutura necessária à realização de minha pós-graduação.

Ao Instituto de Química e Geociências (IQG) da Universidade Federal de Pelotas; Laboratório de Morfologia e Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar da Universidade do Vale do Itajaí (SC); Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba; Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco; Núcleo de Tecnologia do Estado do Ceará (NUTEC); Laboratórios de Caracterização de Materiais (LACAM), Análises Térmicas Ivo Giolito, Raios-X, Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), Microscopia Atômica (LMA) e Ciência e Tecnologia de Materiais (LCTM) da Universidade Federal do Ceará, pela realização de experimentos, disponibilidade de equipamentos e todo o apoio técnico a execução desta tese.

Ao Prof. Dr. Valder Nogueira Freire, meu orientador, pela sua paciência, orientação e constante apoio durante todas as minhas atividades de pós-graduação e pesquisa. Forneceu todas as condições acadêmicas e pessoais para que esta tese fosse concluída. Posso dizer que minha vida profissional se divide em duas partes: antes e depois do Prof. Valder.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, que considero meu co-orientador e no qual tenho grande admiração.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Martins pelos seus conselhos sempre importantes e por ter me dado o privilégio de sua parceria e orientação no estudo de resíduos.

Ao Prof. Dr. José Alzimir da Costa pela cuidadosa revisão deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Maria do Anjos Carneiro Leão pelo constante apoio em minhas atividades de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Teldo Anderson da Silva Pereira pelo seu companheirismo e estímulo em todos os momentos de minha pós-graduação.

---

Ao Prof. Dr. José Marcos Sasaki pela disponibilidade da realização de medidas de difração de raios-X em seu laboratório. Sem isto e o apoio de seus alunos de graduação, mestrado e doutorado, parte desta tese não poderia ter sido realizada.

Aos Profs. Drs Rinaldo P. Santos, Mario L. Pessatti, Tânia L. P. Pessatti, Carlos A. A. Gadelha, José L. L. Filho, Cibele B. M. Carvalho, Edson H. Teixeira, pelas valiosas sugestões ao trabalho.

Aos meus professores de graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela minha formação no Bacharelado em Física. Em especial, aos Profs. Drs Mario N. Baibichi, João E. Schmidt e Paulo P. Neto que construíram para os alicerces da minha formação como físico experimental, indispensável na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge E. A. Mariath e membros do Laboratório de Morfologia Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por terem sido respectivamente meu pai e meus irmãos no universo da pesquisa acadêmica, durante meu período de graduação.

Aos pós-graduandos Alexander A. X. Santiago, Tainá M. Oliveira, Gustavo A. Bezerra, José B. Cajazeiras, Teodora T. P. Arruda, Victor A. Carneiro, Lara Q. V. Braga, Alexandre V. P. Albertini, Francisco F. M. Junior, Luciana M. Rebelo e Erivelton F. Costa, pela parceria e pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Aos estudantes de iniciação científica Thiago, Marcelo e Lavor pelo auxílio indispensável em todas as etapas dos trabalhos desenvolvidos na tese.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios acima citados, pela sua boa vontade e disponibilidade de tempo para realização e orientação na realização dos experimentos envolvidos com meu trabalho.

À minha esposa, pelo seu constante apoio em todos os momentos de minha vida. Sem isto, nada faria sentido.

Aos meus pais, pois sem eles eu não estaria neste mundo e nem teria a estrutura para construir a vida maravilhosa que tenho hoje.

“Todas as grandes coisas do mundo começam nas pequenas. Uma jornada de mil milhas começa com o pedaço de chão debaixo do pé”.

Lao-tsé



## RESUMO

Este trabalho descreve algumas das pesquisas multidisciplinares realizadas pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), envolvendo o aproveitamento de resíduos e a utilização da microscopia de força atômica (AFM) na caracterização de estruturas biológicas. Três resíduos foram estudados: o bagaço do caju, as cinzas de carvão mineral e as conchas de mexilhão *Perna perna*. No primeiro, foi feita a caracterização das cinzas originadas da queima do pedúnculo do caju, destacando os compostos gerados neste processo:  $\text{KHCO}_3$  e  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Ambos são importantes na indústria farmacêutica e na produção de adubos fosfatados. No segundo, foi demonstrado o uso das cerâmicas produzidas a partir das cinzas volantes de carvão mineral originadas da termelétrica Presidente Médici (RS), como substratos para a imobilização da invertase responsável pela produção de açúcar invertido. Esta aplicação tem uso direto na produção de bebidas, medicamentos e cosméticos. Finalmente no terceiro, foram estudadas as alterações na composição, topografia da superfície e dureza das conchas de mexilhão *Perna perna* tratadas termicamente. O nácar (ou superfície perolada) de mexilhões tem sido usado como biomaterial na regeneração óssea, tendo que sofrer processos de esterelização (normalmente térmicos). Por isso, a importância do estabelecimento de regiões de estabilidade mecânica, estrutural e composicional durante estes processos.

No uso do microscópio de força atômica para estudar estruturas biológicas, destacou-se a importância desta técnica na caracterização do desenvolvimento de biofilmes de *Enterococcus faecalis*, frequentemente encontrada em casos clínicos; e a análise nanoestrutural da esporopolinina de grãos de pólen de *Ilex Paraguarinsis* St. Hill. A esporopolinina é um dos biopolímeros mais resistente que existe, sendo do interesse crescente dos cientistas e engenheiros de materiais.

Palavras-chave: biofilmes, cinzas voláteis de carvão mineral, compostos fosfatados, *Enterococcus faecalis*, esporopolinina, *Ilex Paraguarinsis*, mexilhão *Perna perna*, microscopia de força atômica, pedúnculo do caju, resíduos.

## ABSTRACT

This work describes some of the multidisciplinary researches accomplished in the Department of Physics of the Universidade Federal do Ceará (UFC), involving the use of residues involving the use of residues and atomic force microscopy (AFM) in the characterization of biological structures. Three residues were studied: cashew bagace, coal fly ashes, and *Perna perna* mussel shells. In the first, it was characterized the ashes of the burned cashew's peduncle. The composition analysis resulted in the  $\text{KHCO}_3$  and  $\text{K}_2\text{SO}_4$  crystal phases, both important in the pharmaceutical industry and in the production of phosphate fertilizers. In the second, it was used coal fly ashes ceramics from President Médici power plant as substrate for invertase immobilization. The invertase is responsible for the inverted sugar production. This application has direct use in the production of drinks, medications, and cosmetics. Finally in the third, it was studied the alterations in the composition, topography, and microhardness of the thermally treated *Perna perna* mussel shells. The mussel nacre (or madrepearl surface) has been used as biomaterial in the bony regeneration where are necessary sterilization processes (usually thermal). Like this, the importance of the establishment of mechanical, structural, and compositional stability regions during these processes.

In the use of the atomic force microscope for study biological structures, it was given prominence the importance of this technique in the characterization of development *Enterococcus faecalis* biofilms. This biofilms are frequently found in clinical cases. In addition the nanostructural characterization of the sporopollenin of *Ilex Paraguariensis* St. Hill pollen grains was performed. Sporopollenin is one of the toughest known materials which is degraded by oxidation but it is resistant to reduction.

Keywords: Atomic force microscope, biofilms, cashew's peduncle, coal fly ashes, *Enterococcus faecalis*, *Ilex Paraguariensis*, *Perna perna* mussel shells, residues, sporopollenin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Microscópio eletrônico de varredura equipado com dispositivo para análise de energia dispersiva de raios-X (a); Resultado típico de uma análise por EDX (b), mostrando o espectro EDX de uma liga de níquel de alta temperatura composta por níquel, cromo, ferro (Fe), manganês (Mn), titânio (Ti), molibdênio (Mo), silício (Si) e alumínio (Al). O eixo horizontal representa a energia liberada pelos elétrons e o eixo vertical, a intensidade. ....	38
Figura 2.2. Difratorômetro de raios-X (a); Difratoograma de uma argila (b), mostrando suas fases cristalinas: Caulinita (C), Quartzo (Q) e Ilita (I) (Albers et al., 2002). ....	40
Figura 2.3. Termobalança TGA-50 (a); Curva típica de uma análise termogravimétrica dinâmica (b), mostrando três eventos térmicos associados à perda de massa. ....	41
Figura 2.4. Curva típica de uma análise térmica diferencial em um material polímero. ....	42
Figura 2.5. Analisador térmico diferencial DSC-50 (a); Curva típica de uma calorimetria exploratória diferencial, mostrando um pico endotérmico e outro exotérmico (b). ....	43
Figura 2.6. Esquema de um microscópio ótico composto. ....	45
Figura 2.7. Microscópio metalográfico Eclipse LV100D da Nikon (a); Esquema do sistema ótico de um microscópio metalográfico (b). ....	47
Figura 2.8. Exemplo de um moderno microscópio de eletrônico de varredura (SEM). ....	48
Figura 2.9. Esquema de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura (SEM). ....	49
Figura 2.10. Processo de geração de elétrons retro-espalhados. ....	50
Figura 2.11. Imagem por SEM de uma liga de cobre e de alumínio formada usando elétrons retro-espalhados. A área clara é formada principalmente de cobre e a área escura é de alumínio. ....	50
Figura 2.12. Processo de geração de elétrons secundários. ....	50
Figura 2.13. Imagem por SEM de uma superfície fraturada de um pedaço de metal, formada a partir de elétrons secundários. ....	51
Figura 2.14. Exemplo de um moderno microscópio eletrônico de transmissão (TEM). ....	51
Figura 2.15. Esquema de funcionamento de um microscópio eletrônico de transmissão (TEM). ....	52
Figura 2.16. Imagens de TEM: nanoporo (a) e mitocôndria (b). ....	53
Figura 2.17. Componentes básicos de um SPM. ....	54
Figura 2.18. Componentes básicos de um STM. ....	56
Figura 2.19. Imagem de 50 x 50 nm de uma superfície de Cu(111) a temperatura de 4 K. São visíveis três camadas monoatômicas e numerosos defeitos pontuais. Oscilações espaciais (ondas eletrônicas) com periodicidade de aproximadamente 1.5 nm são evidentes (Crommie, 1993). ....	56
Figura 2.20. Representação tridimensional da interação da sonda com a amostra em um AFM (Antônio Siber, 2003). ....	57

Figura 2.21. Componentes básicos de um AFM. ....	58
Figura 2.22. Detalhe da haste (seta) e sonda (asterisco) de $\text{Si}_3\text{N}_4$ fabricadas comercialmente para AFM (Weisenhorn, 1991). ....	58
Figura 2.23. Imagens de AFM da superfície de diferentes materiais: planos cristalinos de um cristal do aminoácido L-Alanina, no modo de contato (a); Biofilme de salmonela, no modo intermitente (b) Nanocristais de aragonita de uma concha de mexilhão, no modo intermitente (c); Cristais de um filme de $\text{SnO}_2$ , no modo de contato (d). As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Atômica, da Universidade Federal do Ceará, pelo autor da presente tese. ....	60
Figura 2.24. Gráfico de distância entre ponta e superfície versus a força de interação com amostra e a relação com modos de operação e a curva de força/distância no AFM.....	60
Figura 2.25. Moderno microscópio de varredura por sonda (Laboratório de Microscopia Atômica do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará). ....	61
Figura 2.26 Espectrômetro FT-IR da Perkin Elmer .....	64
Figura 2.27 Espectro de FT-IR do fenilacetileno .....	64
Figura 2.28. Forma de impressão do ensaio Vickers: vista lateral (a) e vista superior (b).....	65
Figura 2.29. Microdurômetro Shimadzu modelo HMV-2. ....	66
Figura 3.1. Histograma típico de uma distribuição de frequência.....	78
Figura 3.2. Representação gráfica da distribuição normal.....	81
Figura 3.3. Fração aproximada da área sob a curva de distribuição normal entre os limites $\pm 1s$ , $\pm 2s$ e $\pm 3s$ .....	81
Figura 3.4. Área da curva normal padronizada entre a média e um valor de $z$ . ....	82
Figura 3.5. Opções de estatística descritiva no Origin. ....	90
Figura 3.6. Opções do teste de inferência $t$ -Student. ....	91
Figura 3.7. Opções do teste de inferência ANOVA. ....	91
Figura 5.1. O cajueiro. Em (a), árvore e em (b), detalhes da frutificação. ....	107
Figura 5.2. Ilustração da <i>Anacardium occidentale L.</i> .....	107
Figura 5.3. Amostras de caju ( <i>Anacardium occidentale L.</i> ) de pedúnculo vermelho, onde estão indicados o fruto (castanha) e o pseudofruto (pedúnculo). Barra = 2cm.....	108
Figura 5.4: Pedúnculo do caju, após a extração do suco (bagaço). Barra = 2cm.....	109
Figura 5.5. Esquema de preparação das cinzas do pedúnculo do caju. ....	112
Figura 5.6. Pó do pedúnculo de caju, antes (a) e depois (b) da queima. Pode-se observar a alteração na coloração e o elevado poder de agregação das cinzas. Barra = 4.5mm. ....	114
Figura 5.7. EDX das cinzas do pedúnculo do caju, mostrando seus principais elementos químicos: C, O, Mg, Na, P, S e K.....	115
Figura 5.8. Difratoograma de raios-X do pó do pedúnculo de caju e suas cinzas, mostrando a alteração na cristalinidade após a queima e a formação das principais fases cristalinas: $\text{KHCO}_3$ , $\text{K}_2\text{SO}_4$ e $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	116

Figura 5.9. Curvas de TGA e DSC mostrando as transformações térmicas das cinzas, entre 23,8 e 600°C. Os pontos a, b e c indicam eventos térmicos. A taxa de aquecimento foi de 10°C/min. ....	117
Figura 5.10. Seqüência de imagens feitas por microscopia ótica mostrando o pó do pedúnculo de caju e suas cinzas, em diferentes ampliações. (a) O pó do pedúnculo em um aumento de 50x, evidenciando partes do pedúnculo seco; (b), (c) as cinzas do pedúnculo em um aumento de 50x e 100x, respectivamente, mostrando cristais de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KHCO <sub>3</sub> (claros) e K-estruvita (rosa); (d) Detalhes de cristais de K-estruvita, em um aumento de 200x. Bar = 250µm (a) e (b); 125µm (c) e 62,5µm (d). ....	119
Figura 6.1. Ação catalítica das enzimas. ....	125
Figura 6.2. Imobilização de enzimas em suporte sólido ou poroso. Em (a), imobilização por adsorção física (força de van der Waals); em (b), por adsorção química (ligações covalentes). ....	128
Figura 6.3. Imobilização de enzimas em matriz e membrana. Em (a), imobilização por confinamento em matriz; em (b), por confinamento em membrana. ....	128
Figura 6.4. Ação do $\gamma$ -aminopropyltrioxysilane na imobilização de enzimas. ....	130
Figura 6.5. Ação do Glutaraldeído na imobilização de enzimas. ....	131
Figura 6.6. Reação mediada por suporte imobilizado por enzimas. ....	131
Figura 6.7. Reação que origina uma molécula de sacarose a partir da frutose e da glicose. .	133
Figura 6.8. Pedra de carvão mineral (a) e suas cinzas volantes (b), após a queima em usina termelétrica. ....	135
Figura 6.9. Suporte cerâmico utilizado para a imobilização (tipo 1). Os suportes apresentam 10mm de diâmetro e espessura variando entre 0,25 a 0,5mm. ....	139
Figura 6.10. Processo de silanização e imobilização da cerâmica e imobilização da invertase. ....	140
Figura 6.11. Ação da enzima invertase solúvel de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	141
Figura 6.12. Atividade na inversão da sacarose (sacarose 600g/l) da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 1, 2 e 3, utilizando tampão citrato de sódio (0,1M) a pH 5,0 a 4°C. As cerâmicas tipo 1 são as com menor pressão de compactação. ....	142
Figura 6.13. Efeito do re-uso sobre a atividade da invertase imobilizada em cerâmicas tipo 3, para uma concentração de 40% de sacarose. ....	144
Figura 6.14. Efeito do reuso sobre a atividade da invertase imobilizada em cerâmicas tipo 3, para uma concentração de 60% de sacarose. ....	144
Figura 6.15. Efeito do re-uso sobre a atividade da invertase imobilizada em cerâmicas tipo 1, para uma concentração de 80% de sacarose. ....	145
Figura 6.16. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmicas de cinzas UTPM com 20% de SiO <sub>2</sub> (tipo 4). ....	146
Figura 6.17. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 40% de SiO <sub>2</sub> (tipo 5). ....	146
Figura 6.18. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 60 % de SiO <sub>2</sub> (tipo 6). ....	147

Figura 6.19. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 80 % de SiO <sub>2</sub> (tipo 7). .....	147
Figura 6.20. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 100 % de SiO <sub>2</sub> (tipo 8). .....	148
Figura 6.21. Efeito da atividade da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 4 – 10 (20 - 100% de SiO <sub>2</sub> ) com 0,1 mg/ml de invertase.....	149
Figura 6.22. Efeito da atividade da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 4 – 8 (20 - 100 % de SiO <sub>2</sub> ) com 0,8 mg/ml de invertase.....	149
Figura 6.23. Efeito da atividade da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 4 – 8 (20 - 100% de SiO <sub>2</sub> ) com 1,6 mg/ml de invertase.....	150
Figura 6.24. Efeito da atividade da invertase imobilizada na cerâmica 4 (20% de SiO <sub>2</sub> ) com 5,68mg/ml de invertase, após 4 usos. ....	150
Figura.6.25. Relação da atividade da invertase imobilizada com diferentes conteúdos de enzima. ....	151
Figura 7.1. <i>Tonicella lineata</i> , um Quíton.....	160
Figura 7.2. <i>Dentalium sp</i> , um Escafópode. ....	160
Figura 7.3. Caracol de jardim, um Gastrópode. ....	161
Figura 7.4. Polvo ( <i>Octopus vulgaris</i> ), um Cefalópode.....	161
Figura 7.5. Marisco com as conchas abertas, um Bivalve. ....	162
Figura 7.6. Vista interna da concha de um bivalve. ....	163
Figura 7.7. Vista externa da concha de um bivalve.....	163
Figura 7.8. Representação esquemática da estrutura típica da concha de um bivalve. Em (a), vista tridimensional; e em (b), o corte transversal (vista de perfil). Os elementos do esquema não estão em proporção.....	164
Figura 7.9. Conchas de mexilhão <i>Perna perna</i> . ....	167
Figura 7.10. Experimentos com AFM. Análise da superfície do nácar de conchas <i>in natura</i> e tratadas termicamente (a) e análise do corte transversal do nácar e da camada prismática (b). Os elementos mostrados na figura não estão em proporção. ....	171
Figura 7.11. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão <i>Perna perna in natura</i> , indicando a presença de aragonita (A) e calcita (C). ....	173
Figura 7.12. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão <i>Perna perna</i> tratada a temperatura de 350°C, indicando a presença de aragonita (A) e calcita (C). ....	173
Figura 7.13. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão <i>Perna perna</i> tratada a temperatura de 450°C, indicando somente a presença de calcita (C).....	174
Figura 7.14. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão <i>Perna perna</i> tratada a temperatura de 600°C, indicando somente a presença de calcita (C).....	174
Figura 7.15. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão <i>Perna perna</i> tratada a temperatura de 700°C, indicando a presença de calcita (C) e hidróxido de cálcio (HC).....	175
Figura 7.16. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão <i>Perna perna</i> tratada a temperatura de 800°C, indicando somente a presença de hidróxido de cálcio (HC). ....	176



Figura 7.17. Espectro FT-IR do pó da concha de mexilhão <i>Perna perna in natura</i> e tratado em diferentes temperaturas.....	177
Figura 7.18. Gráfico de microdureza média em função da temperatura de tratamento. Os retângulos pontilhados representam a ausência de diferenças significativas entre os valores médios de microdureza. ....	181
Figura 7.19. Microscopia ótica de campo claro da superfície da seção transversal da concha do mexilhão <i>in natura</i> . Nela estão indicados o periostracum e os lados externo e interno da concha (Aumento de 20x). Barra = 1 mm. ....	182
Figura 7.20. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar, <i>in natura</i> (a) e tratada a 400°C. Aumento de 200x.....	182
Figura 7.21. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 450°C. Estruturas cristalinas em forma de agulhas (algumas assinaladas por setas) podem ser observadas imersas no nácar. A dimensão de uma destas agulhas está indicada. Aumento de 200x.....	183
Figura 7.22. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 500°C. Observa-se o início da projeção de agulhas para fora da superfície do nácar. Aumento de 200x. ....	183
Figura 7.23. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 550°C. É possível observar a projeção de agulhas para fora da superfície, na lateral da concha (setas). Aumento de 100x.....	184
Figura 7.24. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 600°C, mostrando detalhes das agulhas. Aumento de 1000x. ....	184
Figure 7.25. Imagens de AFM sobre a matriz orgânica da superfície do nácar <i>in natura</i> , mostrando as placas de aragonita (a), e detalhes da camada de proteínas/polissacarídeos (b) com estruturas globulares de 120 nm (setas). Varreduras de 5 x 5 µm (a) e 1 x 1 µm (b).....	185
Figure 7.26. Seqüência de imagens de AFM mostrando a superfície orgânica do nácar aquecida em diferentes temperaturas: (a) 350, (b) 400, (c) 450 e (d) 600°C. Intumescimento da camada orgânica, desaparecimento dos contornos das placas de aragonita e formação de grãos (setas) são observados sobre a superfície. A estrutura cristalina de calcita em forma de agulhas (asterisco) também é observada em 600°C (d). Varredura de 5 x 5 µm. ....	186
Figure 7.27. Imagens de AFM mostrando detalhes do nácar da superfície aquecida a 600°C. Em (a), observamos grãos (setas) com 200 nm sobre placas (asteriscos); e em (b), agulhas. Varredura de 1 x 1 µm.....	187
Figure 7.28. Imagem de AFM da seção transversal do nácar de conchas <i>in natura</i> , mostrando a estrutura de placas de aragonita (destacada por meio de retângulos brancos desenhados sobre a imagem). Varredura de 45 x 45 µm. ....	188
Figure 7.29. Ampliação da imagem da Figura 7.28, mostrando maiores detalhes da estrutura de placas de aragonita (destacada por meio de retângulos brancos desenhados sobre a imagem). Varredura de 20 x 20 µm. ....	188
Figura 8.1. Aprisionamento em meio poroso.....	199
Figura 8.2. Anexação de células em agar.....	199
Figura 8.3. Crescimento de monocamadas confluentes de células. ....	200

Figura 8.4. Célula em meio líquido. ....	200
Figura 8.5. Célula seca em ar. ....	201
Figura 8.6. Estudo de tecidos em AFM. Tecido (a); Tecido fixado (b); Corte do tecido fixado (c) e Corte analisado com AFM (d). ....	201
Figura 9.1. Algumas formas típicas de bactérias. ....	214
Figura 9.2. Arranjos mais comuns das bactérias: diplococo (a), estreptococos (b), tétrede (c), sarcinas (d) e estafilococos (e). ....	215
Figura. 9.3. Estrutura típica de uma célula bacteriana. ....	215
Figura 9.4. Parede celular de uma bactéria Gram-positiva. ....	217
Figura 9.5. Parede celular de uma bactéria Gram-negativa. ....	217
Figura 9.6. Esquema de formação de um biofilme sobre um substrato sólido. ....	220
Figura 9.7. Membrana de nitrocelulose. ....	223
Figura 9.8. Esquema de medição da superfície da membrana de nitrocelulose por AFM. Os elementos não estão em escala. ....	224
Figura 9.9. Imagens de AFM sobre amostras de MN com varreduras de 30 x 30 $\mu\text{m}$ (a) e 10 x 10 $\mu\text{m}$ (b). O gráfico de seção (c) mostra um corte transversal de 30 $\mu\text{m}$ da membrana. Escala de altura: 1408 nm (a), 1324 nm (b) e 1500 nm (c). ....	226
Figura 9.10. Imagens de AFM sobre amostras de MN-ICC com varreduras de 30 x 30 $\mu\text{m}$ (a) e 10 x 10 $\mu\text{m}$ (b). A setas em (b) indicam algumas estruturas globulares oriundas do meio de cultura. No gráfico de seção (c) pode ser observada a alteração na topografia da membrana devido à presença da ICC. Escala de altura: 1687 nm (a), 1457 nm (b) e 1500 nm. ....	227
Figura 9.11. Imagens de AFM sobre amostras de M24, com varreduras de 30 x 30 $\mu\text{m}$ (a) e 10 x 10 $\mu\text{m}$ (b). Os asteriscos em (b) indicam algumas células bacterianas enquanto que as setas, septos transversais. No gráfico de seção (c) pode ser observada a alteração na topografia da membrana devido à presença de células bacterianas. Escala de altura: 837,7 nm (a), 510,9 nm (b) e 1500 nm (c). ....	228
Figura 9.12. Imagens de AFM sobre amostras de M36, com varreduras de 30 x 30 $\mu\text{m}$ (a) e 10 x 10 $\mu\text{m}$ (b). Um círculo em (a) indica a presença de uma microcolônia. No gráfico de seção (c), pode ser observada uma clara redução da rugosidade da superfície. Escala de altura: 900,2 nm (a), 461,9 nm (b) e 1500 nm. ....	229
Figura 9.13. Imagens de AFM sobre amostras de M72, com varreduras de 30 x 30 $\mu\text{m}$ (a) e 10 x 10 $\mu\text{m}$ (b). As setas, sinais de soma e asteriscos (b) indicam, respectivamente, a presença de canais, espaços intersticiais e bactérias. O gráfico de seção (c), indica o perfil desta superfície. Escala de altura: 2585 nm (a), 1416 nm (b) e 1500 nm. ....	230
Figura 9.14. Imagens de AFM sobre amostras de M192, com varreduras de 30 x 30 $\mu\text{m}$ (a) e 10 x 10 $\mu\text{m}$ (b). Um círculo em (a) indica a presença de uma das “ilhas” de microcolônias presentes na superfície e as setas, a presença da rede polimérica. O perfil da superfície é mostrado no gráfico de seção (c). Escala de altura: 2268 nm (a), 1234,3 nm (b) e 1500 nm. ....	231
Figura 9.15. Imagens de AFM sobre amostras de M360, com varreduras de 30 x 30 $\mu\text{m}$ (a) e 10 x 10 $\mu\text{m}$ (b). As setas em (b) indicam algumas espículas presentes na superfície. No gráfico de seção (c), pode ser observada um aumento significativo da	



irregularidade da superfície. Escala de altura: 5159,6 nm (a), 2732,8 nm (b) e 1500 nm.....	232
Figura 9.16. Imagens de AFM sobre MN-ICC (a) e M24 (b), M36 (c), M72 (d), M192 (e), e M360 (f). As medidas foram realizadas com varredura de 15 x 15 $\mu\text{m}$ . Diferenças topográficas com a idade do biofilme são facilmente observadas. Escala de altura: 3,300 (a), 0,981 (b), 0,950 (c), 2,103 (d), 2,190 (e), e 3,469 $\mu\text{m}$ (f).....	233
Figura 9.17. Imagens de AFM e gráficos de seção sobre MNI-ICC de 24 (a, c) e 36 horas (b, d) realizadas em uma varredura de of 5 x 5 $\mu\text{m}$ . É possível identificar a presença de EPS devido a formação de um filme sobre a superfície bacteriana (obscurimento da imagem das células) e redução da diferença entre picos e depressões no gráfico de seção de 36 horas. Escala de altura: 600 nm. ....	234
Figura 9.18. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade $R_a$ da superfície da membrana MN. ....	235
Figura 9.19. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade $R_a$ da superfície da membrana MN-ICC. ....	235
Figura 9.20. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade $R_a$ da superfície da membrana M24. ....	236
Figura 9.21. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade $R_a$ da superfície da membrana M36. ....	236
Figura 9.22. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade $R_a$ da superfície da membrana M72. ....	237
Figura 9.23. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade $R_a$ da superfície da membrana M192. ....	237
Figura 9.24. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade $R_a$ da superfície da membrana M360. ....	238
Figura 9.25. Valor médio de $R_a$ ( $\pm e$ ) da superfície de amostras da membrana MN-ICC e M24-M360. As medidas de rugosidade distinguiram as diferentes alterações na topografia da superfície da membrana de nitrocelulose: Adesão de glóbulos de ICC (a); adesão de bactérias (b); formação de EPS (c); rede de EPS (d); crescimento bacteriano sobre a rede de EPS (e), crescimento do biofilme (f). ....	240
Figura 9.26. Imagens de AFM com realce de contornos sobre M24 (a), M36 (b) e M192 (c) realizadas em uma varredura de of 5 x 5 $\mu\text{m}$ . As alterações da rugosidade da parede celular bacteriana devido a presença de EPS são evidentes. Podem-se observar detalhes da estrutura polimérica. Escala de altura: 500 nm. ....	241
Figura 10.1. As partes de uma flor completa ( <a href="http://www.herbario.com.br">www.herbario.com.br</a> ).....	248
Figura 10.2. As partes de um estame ( <a href="http://www.herbario.com.br">www.herbario.com.br</a> ).....	249
Figura 10.3. As partes de um carpelo ( <a href="http://www.herbario.com.br">www.herbario.com.br</a> ).....	249
Figura 10.4. Diferentes tipos de grãos de pólen ( <a href="http://www.pt.Wikipedia.org">www.pt.Wikipedia.org</a> ). ....	250
Figura 10.5. Seção de um grão de pólen, mostrando seus constituintes.....	251
Figura 10.6. Árvore e detalhes das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> (Lorenzi, 1980). ....	251
Figura 10.7. Ilustração de <i>Ilex paraguariensis</i> , mostrando detalhes da flor e do fruto ( <a href="http://www.illustratedgardem.org">www.illustratedgardem.org</a> ).....	252

Figura 10.8. Imagens de microscopia ótica de grãos de pólen de <i>Ilex paraguariensis</i> , nas vistas polar (a) e equatorial (b). Barra = 10 $\mu\text{m}$ (Alvez, 1999). .....	253
Figura 10.9. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de grão de pólen de <i>Ilex paraguariensis</i> (Santos e Mariath, 1999). .....	253
Figura 10.10. Representação esquemática do experimento de microscopia de força atômica com polens. Os elementos do desenho não estão em proporção. ....	255
Figura 10.11. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de grãos de pólen de <i>Ilex paraguariensis</i> previamente tratados com $\text{KMnO}_4$ por 24 h. Muitas clavas (setas) podem ser observadas na exina, exceto na região das aberturas (asterisco) (a); Detalhes da clava na superfície da exina, mostrando sua irregularidade após tratamento químico (b). ....	257
Figura 10.13. Imagem de AFM de seções semifinas de grãos de polens não tratado, em varredura de 70 x 70 $\mu\text{m}$ . Nela está indicando a clava, a parede e a fovina retraída. ....	258
Figura 10.14. Imagem de AFM da seção semifina de um único grão de pólen, em varredura de 30 x 30 $\mu\text{m}$ . ....	259
Figura 10.15. Imagem de AFM de seções semifina de um único grão de pólen, em varredura de 15 x 15 $\mu\text{m}$ . Podemos observar algumas camadas formadoras da exina, sobre a parede. ....	259
Figura 10.16. Detalhe da clava de uma seção semifina de um único grão de pólen, em varredura de 1 x 1 $\mu\text{m}$ . A superfície não revela nenhum detalhamento da nanoestrutura da exina. ....	260
Figura 10.17. Imagem de AFM de seções semifinas de grãos de pólen tratados com $\text{KMnO}_4$ , na varredura de 70 x 70 $\mu\text{m}$ . ....	261
Figura 10.18. Imagem de AFM da seção semifina de um único grão de pólen tratado com $\text{KMnO}_4$ , na varredura de 30 x 30 $\mu\text{m}$ . ....	261
Figura 10.19. Imagem de AFM da seção semifina de um único grão de pólen tratado com $\text{KMnO}_4$ , na varredura de 15 x 15 $\mu\text{m}$ . ....	262
Figura 10.20. Imagem de AFM da clava de uma seção semifina de um único grão de pólen tratado com $\text{KMnO}_4$ , na varredura de 1 x 1 $\mu\text{m}$ . Estruturas paralelas, semelhante a helicóides, são visíveis sobre a superfície (setas). A região retangular é ampliada na Figura 10.21. ....	262
Figura 10.21. Imagem de AFM da clava de uma seção semifina de um único grão de pólen tratado com $\text{KMnO}_4$ , na varredura de 600 x 600 nm. Observa-se com mais detalhes as estruturas helicoidais (setas). A região retangular é ampliada por “zoom” de software na Figura 10.22. ....	263
Figura 10.22. Detalhe de uma estrutura helicoidal em uma clava da seção semifina de um grão de pólen com “zoom” por software de 125 x 125 nm. ....	263
Figura 10.23. Modelo para a nanoestrutura da esporopolinina de <i>Ilex paraguariensis</i> : representação pictográfica (a) e modelo físico (b). Dois parâmetros característicos da estrutura (a e b), aparecem indicados na Figura. ....	264
Figura 10.24. Gráficos de seção para a medida de $a$ de uma estrutura helicoidal feito sobre o “zoom” de 125 x 125 nm de uma imagem com varredura de 600 x 600 nm. ....	265

---

Figura 10.25. Gráficos de seção para a medida de $b$ de uma estrutura helicoidal feito sobre o “zoom” de 125 x 125 nm de uma imagem com varredura de 600 x 600 nm. ....	265
Figura 10.26. Histograma de frequência para os valores de $a$ para a amostra de pólen 1. ....	266
Figura 10.27. Histograma de frequência para os valores de $a$ para a amostra de pólen 2. ....	266
Figura 10.28. Histograma de frequência para os valores de $a$ para a amostra de pólen 3. ....	267
Figura 10.29. Histograma de frequência para os valores de $a$ para a amostra de pólen 4. ....	267
Figura 10.30. Histograma de frequência para os valores de $a$ para a amostra de pólen 5. ....	268
Figura 10.31. Histograma de frequência para os valores de $b$ para a amostra de pólen 1. ....	268
Figura 10.32. Histograma de frequência para os valores de $b$ para a amostra de pólen 2. ....	269
Figura 10.33. Histograma de frequência para os valores de $b$ para a amostra de pólen 3. ....	269
Figura 10.34. Histograma de frequência para os valores de $b$ para a amostra de pólen 4. ....	270
Figura 10.35. Histograma de frequência para os valores de $b$ para a amostra de pólen 5. ....	270
Figura D.1. Prensa Sky para compactação uniaxial (a) e estufa Ícamo para secagem e esterilização de materiais (b) .....	300
Figura D.2. Forno tubular para queima em atmosfera controlada (a) e detalhe interno do forno tubular mostrando o tubo de alumina (b) .....	300
Figura D.3. Muflas para tratamento térmico em atmosfera de ar. (a) e Forno de microondas adaptado para tratamento em atmosfera de ar (b).....	301
Figura D.4. Forno tubular, microondas adaptado e os elementos da linha de gases (a). Em (b), detalhe da tubulação das duas linhas da instalação de gases. ....	301
Figura D.5. Medidor de área superficial e porosidade AUTOSORB-1-MP (a) e balança analítica Bioprecisa (b) para a medição da massa de materiais. ....	302
Figura D.6. Espectrômetro UV-VIS-IR TIDAS para análise de sólidos e soluções (a) e microscópio óptico metalográfico LV 100D para o estudo de superfícies (b).....	302
Figura D.7. Microcomputadores para a análise de dados e controle de equipamentos. ....	303
Figura E.1. O MultiMode SPM do LMA. MP = mesa pneumática; M = microscópio; LC = sistema lupa mais câmera de vídeo; TV = monitor de TV; V = vídeo de imagem; C = controlador Nanoscope IIIa; F = fonte de iluminação episcópica para a lupa. ....	305
Figura E.2. O Microscópio. Ca = cabeçote; Es = scanner; Ba = base .....	306
Figura E.3. Detalhe do cabeçote.....	306
Figura E.4. Um dos porta sondas de AFM do SPM .....	307
Figura E.5. Caixa com sondas para AFM no modo intermitente .....	307
Figura E.6. As partes de uma sonda de AFM.....	308

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Principais métodos experimentais e as propriedades físico-químicas envolvidas.....	37
Tabela 4.1: Índices de reciclagem (%) de alguns materiais no Brasil. Fonte: Cempre/PBR, 1999.....	101
Tabela 4.2 Vantagens e desvantagens da reciclagem dos resíduos sólidos. ....	101
Tabela 5.1. Principais componentes do pedúnculo fresco do caju. ....	108
Tabela 6.1. Identificação dos suportes cerâmicos, conforme a pressão de compactação e composição da massa pré-cerâmica. ....	138
Tabela 7.1. Resultados das medidas de microdureza (em HV) e sua estatística descritiva. $S$ = média amostral, $\sigma$ = desvio padrão e $e$ = erro de estimação ( $t = 2,262$ , para $\alpha = 0,05$ ). ....	178
Tabela 7.2. Tabela simplificada dos resultados do teste ANOVA com comparações múltiplas (procedimento Tukey) para as medidas de microdureza nas conchas de mexilhão <i>in natura</i> e tratadas termicamente ( $\alpha = 0,05$ ).....	179
Tabela 9.1. O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) de $R_a$ para a superfície da membrana de nitrocelulose MN, MN-ICC e MNI-ICC em 24-360 horas. Varredura de 30 x 30 $\mu\text{m}$ e escala de altura de 2000 nm. ....	238
Tabela 9.2. Tabela simplificada dos resultados do teste ANOVA. ....	239
Tabela 10.1. O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) de $a$ para estruturas helicoidais presentes na superfície de grãos de polén tratados quimicamente com $\text{KMnO}_4$ . Nível de significância ( $\alpha$ ) = 0,05 e ( $t = 2,045$ ).....	268
Tabela 10.2. O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) de $b$ para estruturas helicoidais presentes na superfície de grãos de polens tratados quimicamente com $\text{KMnO}_4$ . Nível de significância ( $\alpha$ ) = 0,05 e ( $t = 2,045$ ).....	271

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>SEÇÃO I - FUNDAMENTOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2. MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>36</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)..	38
2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD) .....	39
2.4 ANÁLISES TÉRMICAS .....	41
2.5 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS .....	44
2.5.1 MICROSCOPIA ÓTICA .....	44
2.5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	48
2.5.3 MICROSCOPIA DE VARREDURA POR SONDA (SPM) ....	53
2.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) .....	62
2.7 DUREZA.....	64
2.8 ETAPAS GERAIS DE PROCESSOS ANALÍTICOS .....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
<b>3. TRATAMENTO DE DADOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>73</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	73

3.2 CONFIABILIDADE.....	74
3.3 PRINCÍPIOS DE ESTATÍSTICA.....	75
3.3.1 RESUMO DE DADOS ESTATÍSTICOS .....	76
3.3.2 DISTRIBUIÇÕES DE PROBABILIDADE .....	78
3.3.3 DISTRIBUIÇÃO NORMAL .....	80
3.3.4 AMOSTRAGEM.....	82
3.3.5 DISTRIBUIÇÕES AMOSTRAIS .....	83
3.3.6 TEOREMA DO LIMITE CENTRAL .....	84
3.3.7 ESTIMAÇÃO.....	84
3.3.8 TESTES DE SIGNIFICÂNCIA .....	86
3.3.9 TESTE DE NORMALIDADE .....	88
3.4 REJEIÇÃO DE RESULTADOS .....	89
3.5 ROTEIRO PARA O TRATAMENTO DE DADOS ANALÍTICOS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92
<b>SEÇÃO II - PROVEITAMENTO DE RESÍDUOS .....</b>	<b>93</b>
<b>4. LIXO – O QUE FAZER COM ELE? .....</b>	<b>94</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	94
4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS .....	95
4.3 RESÍDUOS E MEIO AMBIENTE .....	97
4.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LIXO .....	99
4.5 RECICLAGEM .....	99
4.6 EXPERIÊNCIAS COM RECICLAGEM .....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
<b>5. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CINZAS DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DE CAJU .....</b>	<b>106</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	106
5.1.1 O CAJUEIRO.....	106

---

5.1.2 O CAJU.....	107
5.1.2 O BAGAÇO DO CAJU .....	109
5.1.3 INCINERAÇÃO.....	109
5.1.4 OBJETIVOS.....	111
<b>5.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>112</b>
5.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	112
5.2.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA .....	112
5.2.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR EDX .....	113
5.2.4 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD .....	113
5.2.5 ANÁLISES TÉRMICAS POR TGA E DSC .....	113
5.2.6 PRESENÇA DE BICARBONATOS .....	114
5.2.7 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO .....	114
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>114</b>
5.3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E VARIAÇÃO DE MASSA.....	114
5.3.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR EDX .....	115
5.3.3 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD E PRESENÇA DE BICARBONATOS.....	115
5.3.4 ANÁLISES TÉRMICAS POR TGA E DSC .....	117
5.3.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO .....	118
<b>5.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
<b>COLABORADORES .....</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>122</b>
<b>6. IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EM CERÂMICAS DE CINZAS VOLANTES DE CARVÃO MINERAL .....</b>	<b>125</b>
6.1 INTRODUÇÃO.....	125
6.1.1 ENZIMAS .....	125
6.1.2 ENZIMAS E BIOTECNOLOGIA .....	126
6.1.3 IMOBILIZAÇÃO .....	127
6.1.4 AÇÚCAR INVERTIDO .....	132
6.1.5 IMOBILIZAÇÃO DA INVERTASE.....	134
6.1.6 CINZAS DE CARVÃO MINERAL .....	134
6.1.7 OBJETIVOS.....	137
<b>6.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>137</b>

6.2.1 MATERIAIS .....	137
6.2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	138
6.2.3 SILANIZAÇÃO DAS CERÂMICAS E IMOBILIZAÇÃO DA INVERTASE .....	139
6.2.4 ENSAIO ENZIMÁTICO .....	139
6.2.5 HIDRÓLISE DA SACAROSE .....	140
<b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>141</b>
6.3.1 CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA SACAROSE COM A INVERTASE SOLÚVEL (5,39MG/ML).....	141
6.3.2 CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA SACAROSE COM A INVERTASE IMOBILIZADA EM CERÂMICA TIPO 1, 2, E 3 ..	142
6.3.3 DETERMINAÇÃO DO MELHOR SISTEMA INVERTASE IMOBILIZADA APÓS O RE-USO.....	143
6.3.4 RE-USO DAS CERÂMICAS TIPO 3 SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE .....	143
6.3.5 EFEITO DA ATIVIDADE DA INVERTASE IMOBILIZADA EM CERÂMICAS COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE ÓXIDO DE SILÍCIO .....	145
6.3.6 EFEITO DA ATIVIDADE DA INVERTASE IMOBILIZADA NAS CERÂMICAS TIPO 4 - 8 COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE ENZIMA.....	148
6.3.7 RELAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE IMOBILIZADA NAS CERAMICAS TIPO 1 (127,32 MPA) COM DIFERENTES CONTEUDOS DE ENZIMA .....	151
<b>6.4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>152</b>
<b>COLABORADORES .....</b>	<b>153</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>154</b>
<b>7. CARACTERIZAÇÃO DE CONCHAS DE MEXILHÃO <i>PERNA PERNA</i> TRATADAS TERMICAMENTE .....</b>	<b>159</b>
<b>7.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>159</b>
7.1.1 MOLUSCOS .....	159
7.1.2 A CONCHA DOS BIVALVES.....	162
7.1.3 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DAS CONCHAS .....	165
7.1.4 COMPORTAMENTO TÉRMICO DA CONCHA .....	166
7.1.5 MEXILHÕES.....	166
7.1.6 OBJETIVOS.....	167
<b>7.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>168</b>
7.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	168



---

7.2.2 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD .....	168
7.2.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) .....	169
7.2.4 MEDIDAS DE MICRODUREZA .....	169
7.2.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO .....	170
7.2.6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	170
7.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	172
<b>7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>172</b>
7.3.1 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD .....	172
7.3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) .....	176
7.3.3 MEDIDAS DE MICRODUREZA .....	178
7.3.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO .....	181
7.3.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	185
<b>7.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>189</b>
<b>COLABORADORES .....</b>	<b>190</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>192</b>
<b>SEÇÃO III - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MATERIAIS</b>	
<b>BIOLÓGICOS .....</b>	<b>196</b>
<b>8. AFM EM CÉLULAS, TECIDOS E BIOMATERIAIS .....</b>	<b>197</b>
8.1 INTRODUÇÃO.....	197
8.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	198
8.3 AFM EM CÉLULAS.....	202
8.4 AFM EM MONOCAMADAS E BIOFILMES BACTERIANOS.....	205
8.5 AFM EM TECIDOS.....	206
8.6 AFM EM BIOMATERIAIS.....	206
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>208</b>

<b>9. ESTUDO TOPOGRÁFICO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> POR AFM.....</b>	<b>213</b>
9.1 INTRODUÇÃO.....	213
9.1.1 CÉLULAS PROCARIÓTICAS E EUCARIÓTICAS .....	213
9.1.2 BACTÉRIAS.....	213
9.1.3 ENTEROCOCOS .....	218
9.1.4 BIOFILMES.....	219
9.1.5 CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES.....	220
9.1.6 OBJETIVOS.....	222
9.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	222
9.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	222
9.2.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	223
9.2.3 GRÁFICO DE SEÇÃO.....	224
9.2.4 REALCE DE CONTORNOS.....	224
9.2.5 ANÁLISE DE RUGOSIDADE.....	225
9.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	225
9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	225
9.3.1 IMAGENS DE AFM E GRÁFICOS DE SEÇÃO .....	225
9.3.2 ANÁLISE DE RUGOSIDADE.....	234
9.3.3 REALCE DE CONTORNOS.....	241
9.4 CONCLUSÕES.....	242
COLABORADORES .....	242
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	244
<b>10.NANOESTRUTURA DA ESPOROPOLININA DE GRÃOS DE POLÉN DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ST. HIL .....</b>	<b>247</b>
10.1 INTRODUÇÃO.....	247
10.1.1 ESPERMATÓFITAS.....	247
10.1.2 A FLOR.....	247
10.1.3 O PÓLEN .....	250
10.1.4 <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ST. HIL. ....	251
10.1.5 A ESPOROPOLENINA .....	254
10.1.6 OBJETIVOS.....	254
10.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	254

10.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	254
10.2.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	255
10.2.3 GRÁFICO DE SEÇÃO.....	256
10.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) .....	256
10.2.5 MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO .....	256
10.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	256
<b>10.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>257</b>
10.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) .....	257
10.3.2 MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO .....	257
10.3.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA .....	258
10.3.4 GRÁFICOS DE SEÇÃO.....	264
<b>10.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>271</b>
<b>COLABORADORES .....</b>	<b>272</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>273</b>
<b>11. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>275</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>280</b>
<b>A. ARTIGOS PUBLICADOS .....</b>	<b>281</b>
A.1 SPOROPOLLENIN NANOSTRUCTURE OF ILEX PARAGUARIENSIS A.ST.HIL POLLEN GRAINS (2005) .....	281
A.2 EVALUATION OF RED BLOOD CELLS OF HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS WITH MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME (2005).....	282
A.3 PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE CASHEW (ANACARDIUM OCCIDENTALE L.) PEDUNCLE BAGASSE ASHES (2007) .....	283
A.4 AFM AND HYDRODYNAMIC ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE SELF-ASSEMBLED 1,4-DITHIANE ON GOLD SURFACE (2007).....	285

---

<b>B. ARTIGOS SUBMETIDOS .....</b>	<b>287</b>
B.1 TOPOGRAPHICAL ALTERATIONS AND ANTIMICROBIAL EFFECT OF LIPPIA SIDOIDES ESSENCIAL OIL AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS BIOFILMS (2006) .....	<b>287</b>
B.2 AGING OF ENTEROCOCCUS FAECALIS BIOFILMS: OBSERVATION OF TOPOGRAPHICAL CHANGES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY (2007).....	<b>289</b>
B.3 DEFORMATION INDUCED MARTENSITE IN AN AISI 301LN STAINLESS STEEL: CHARACTERIZATION AND INFLUENCE ON PITTING CORROSION RESISTANCE (2007) .....	<b>291</b>
B.4 OPTICAL ABSORPTION AN ELECTRONIC BAND STRUCTURE FIRST-PRINCIPLES CALCULATIONS OF $\alpha$ -GLYCINE CRYSTALS (2007).....	<b>292</b>
B.5 DETERMINATION OF THE FRACTAL DIMENSION OF LEAF VASCULAR SYSTEM SPECIES OF GENUS RELBUNIMUM (ENDL.) HOOK. F. (RUBIACEAE) (2007) .....	<b>294</b>
<b>C. RTIGOS À SUBMETER.....</b>	<b>295</b>
C.1 IMMOBILIZATION OF INVERTASE INTO SINTERIZED COAL FLY ASHES FOR HYDROLYSIS OF SUCROSE: STABILITY, PROPERTIES AND APPLICATION IN BIOREACTORS (2007).....	<b>295</b>
C.2 X-RAY DIFFRACTION, FOURIER TRANSFORM INFRARED, MICROHARDNESS, AND ATOMIC FORCE MICROSCOCOPY ANALYSES OF THE OF THE PERNA PERNA MUSSEL SHELLS THERMALLY TREATED (2007) .....	<b>297</b>
<b>D. LABORATÓRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAS (LCTM) .....</b>	<b>299</b>
<b>E. O MICROSCÓPIO DE VARREDURA POR SONDA DO LMA .....</b>	<b>304</b>

---

---

## INTRODUÇÃO

---

---

Quando comecei a minha pós-graduação em Física da Matéria Condensada no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), em 2001, com o Prof. Dr. Valder Nogueira Freire, não imaginava a quantidade de temas que o Grupo de Semicondutores, no qual ingressei, estaria envolvido. Meu mestrado começou com um trabalho teórico, na área de Física Estatística, a simulação da quebra da rigidez dielétrica de dispositivos MOS (do inglês, “Metal Oxide Semiconductor”) por meio da percolação em sistemas tridimensionais. Este trabalho resultou na publicação: “A multi-defect initialization-based percolation model: a successful scheme to explain dielectric breakdown in MOS devices. *Physica E* 17 (2003) 645-647”. Juntamente com a continuidade deste trabalho, através de modelos com redes de Voronoy, ingressamos na área experimental (parte importante de minha formação na graduação), que inicialmente ficou concentrada na preparação e caracterização de cerâmicas de AlN. Devido à ausência de um forno com atmosfera controlada no Departamento de Física, indispensável à produção das referidas cerâmicas e a um contato com os profs. Jorge L. Martins do Instituto de Química e Geociências (IQG) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e Benildo Souza Cavada, do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), da Universidade Federal do Ceará (UFC), optamos por alterar o tópico de pesquisa. Iniciamos a preparação e caracterização de cerâmicas das cinzas volantes de carvão mineral, um resíduo originado da geração de energia elétrica pela Usina Termelétrica Presidente Médici, Candiota (RS). Este tema culminou na defesa de minha dissertação de Mestrado, no início de 2003. Foi a primeira vez que o grupo de semicondutores produziu um trabalho totalmente experimental. O curioso desta dissertação, é que foi produzida sem a infra-estrutura necessária para tal, pois o Grupo de Semicondutores desenvolvia apenas trabalhos teóricos. Então, como o trabalho foi realizado? A resposta foi interação. Obtivemos apoio tanto na parte de infraestrutura como de conhecimento técnico do Núcleo de Tecnologia do Ceará (NUTEC); dos Laboratórios de Ótica Não-Linear e Ciência de Materiais; BioMol-Lab e Raios-X do Departamento de Física da UFC; do Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Química da UFC; da UFPEL e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da Universidade Federal

de Pernambuco (UFPE). Fornos, estufas, difratômetro, microscópio eletrônico de varredura, analisadores térmicos (DTA/TGA/DSC), balança analítica, reagentes e vidrarias são alguns dos recursos colocados a nossa disposição pelas parcerias feitas. O resultado não poderia ter sido outro: uma dissertação experimental produzida por um grupo teórico. Este fato acabou por direcionar toda a nossa pesquisa futura (e minha vida também...).

Entretanto, isto seria apenas a ponta do iceberg. Os resultados promissores obtidos com as cinzas de carvão mineral, que levaram a confecção de três patentes, abriram os horizontes para o estudo de outros resíduos. Para tal, por intermédio do Prof. Valder e das recentes interações feitas, ampliamos ainda mais as parcerias com laboratórios e departamentos dentro e fora de nossa universidade. Também surgiu uma nova necessidade: a montarmos um laboratório para preparação e caracterização de materiais. Para tal, projetos necessitariam serem escritos visando à aquisição de recursos.

Como resultado de um projeto em conjunto, meu orientador e os professores José Alzamir da Costa, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e Eronides F. da Silva Jr., da UFPE implementaram o Laboratório de Microscopia Atômica (LMA) no Departamento de Física da UFC (Anexo E). Nele, sob a chefia do Prof. Dr. José Alexander King Freire, foi instalado um microscópio de varredura por sonda (SPM). Através do uso da microscopia de força atômica (AFM) diversas pesquisas se iniciaram:

- Caracterização de polímeros com o Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE;
- Estudo da nano estrutura de grãos de pólen com o BioMol-Lab, IQG e o Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);
- Análise de formação de martensita em aços com o Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM) do Departamento de Engenharia e Ciência de Materiais da UFC;
- Estudo da superfície de ouro modificada por filmes finos de 1,4-dithiane com o Laboratório de Eletroquímica do Departamento de Química da UFC;
- Caracterização topográfica de biofilmes bacterianos com o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC, BioMol-Lab e Faculdade de Medicina/Sobral da UFC;
- Estudo de conchas de mexilhão com o Centro de Ciências Tecnológicas da Terra da Universidade do Vale do Itajaí (Santa Catarina), BioMol-Lab, IQG e Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPA);

- Caracterização de resíduos de caju com o BioMol-Lab, IQG, Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPA) e Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal (UFRGS);
- Análise topográfica de lectinas e cristais e aminoácidos com o BioMol-Lab;
- Análise topográfica de polissacarídeos sulfatados com o BioMol-Lab e Departamento de Engenharia de Pesca da UFC; dentre outros.

Estas pesquisas, muitas ainda em andamento, tiveram como resultado a confecção de patentes, a publicação/submissão de diversos artigos e ainda, apresentações em congressos nacionais e internacionais.

Com a aprovação dos projetos “Caracterização e aplicações tecnológicas de carvão poroso a partir de cascas de arroz”, “Preparação e caracterização de cerâmicas de AlN” e a criação da Rede de Nanobioestruturas, foi possível disponibilizar recursos suficientes para começar a montar a infra-estrutura necessária a preparação e caracterização de materiais.

Estruturar e equipar um laboratório não são atividades fáceis. Envolve contatos com fornecedores, levantamento de cotações, confecção de projetos de equipamentos/infra-estrutura e uma série de tarefas que consomem tempo e esforço para que os erros sejam minimizados, dentro de um orçamento apertado e de uso restrito como o fornecido por órgãos públicos. Aos poucos, conseguimos. Montamos o Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais (LCTM-UFC), dividido em dois laboratórios: um de preparação de amostras e outra de caracterização de materiais (Anexo D).

Com uma infra-estrutura mínima montada, diversos tópicos de pesquisa experimental surgiram, somando-se aqueles envolvidos com o AFM. Também houve a necessidade de treinamento em diferentes técnicas experimentais, tanto de preparação como de caracterização de materiais. Surgiu assim um dilema com relação a minha tese: escolher um tema restrito a determinada área de pesquisa explorando-o ao máximo, dentro do tempo disponível (o que normalmente é praticado nos trabalhos de pós-graduação); ou desenvolver vários temas envolvendo diferentes técnicas e áreas de conhecimento (prática não usual da pós-graduação). A necessidade de execução dos projetos aprovados, operacionalização do laboratório recém criado e treinamento em diferentes técnicas de preparação e caracterização de materiais (inorgânicos e orgânicos), aliado à desejos pessoais de orientado/orientador, levaram-me a escolher o último caminho. Confesso que esta escolha pareceu, a princípio, “exótica” e mostrou-se, muitas vezes, até tortuosa. Entretanto, jamais aprendi tantas coisas e interagi com tantas pessoas, em tão pouco tempo. E assim nasceu esta tese. É o resultado dos

---

esforços conjuntos de diversos pesquisadores e grupos de trabalho. Apresenta algumas das atividades de pesquisa que realizei, sob a orientação do Prof. Dr. Valder Nogueira Freire, em meu período de doutorado em Física da Matéria Condensada no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

Na Seção 1, introdutória, são abordados conceitos essenciais que envolvem os métodos analíticos. Julguei importante incluir uma seção exclusivamente sobre este tema, já que é tão utilizado no presente trabalho e fundamental em qualquer pesquisa científica. Além disto, torna mais compreensível os temas abordados nesta tese, principalmente aos estudantes de graduação que estão iniciando atividades de pesquisa. O Capítulo 2 trata dos principais métodos analíticos utilizados em análise quantitativa. XRD, EDX, análises térmicas e microscopia estão entre os temas abordados; enquanto que o Capítulo 3 apresenta os principais tópicos envolvendo tratamento de dados, tais como confiabilidade e métodos estatísticos. Optei pelo idioma inglês na abreviatura dos principais métodos analíticos, tanto nesta seção como nas posteriores, já que é prática consagrada no meio científico. Entretanto, coloquei sua tradução na língua pátria.

Na Seção 2 são abordados temas envolvendo o aproveitamento de resíduos. No Capítulo 4 é feita uma breve introdução ao tema. Três resíduos foram estudados neste trabalho: o bagaço do pedúnculo de caju do Estado do Ceará; as cinzas volantes de carvão mineral do Estado do Rio Grande do Sul e as conchas de mexilhão do Estado de Santa Catarina.

A cultura do caju é uma das principais atividades agropecuárias do nordeste Brasileiro. Seus produtos mais conhecidos são a castanha, o suco e o líquido contido no mesocarpo da castanha, o LCC. A maior parte do pedúnculo produzido (pseudofruto) é desperdiçada, sendo seu uso concentrado na extração do suco. O Capítulo 5 apresenta os resultados obtidos com a preparação e caracterização das cinzas originadas da queima de um dos principais resíduos gerados pela extração de suco: o bagaço do pedúnculo de caju.

No Capítulo 6 é explorado o potencial da utilização das cerâmicas feitas com as cinzas volantes da Usina Termelétrica Presidente Médici, Candiota (RS) como suportes para a imobilização de enzimas, em particular, a invertase. A invertase é usada no processo de fabricação de açúcar invertido, resultado da decomposição da sacarose em frutose e glicose.

No Capítulo 7, foi investigado por medidas de XRD, FT-IR, microdureza, microscopia ótica e AFM o comportamento das conchas de mexilhão *Perna perna*, quando submetidas a um tratamento térmico. O estudo do comportamento térmico e mecânico da superfície perolada (conhecida como nácar) é importante, pois este material tem aplicações



em implantes e na regeneração óssea, onde processos de esterilização são necessários.

Na Seção 3 é apresentado o resultado de algumas das pesquisas feitas utilizando a microscopia de força atômica (AFM) na caracterização de materiais biológicos. Decidi abrir uma seção sobre este tema já que os materiais envolvidos não faziam parte da categoria de resíduos, sendo os resultados obtidos associados à área da biologia estrutural. O Capítulo 8, introdutório, é destinado mostrar o AFM como técnica poderosa para análise de materiais biológicos. Biofilmes e grãos de pólen foram os materiais escolhidos nesta tese.

No Capítulo 9, foi investigada por microscopia de força atômica, a alteração topográfica nas superfícies de biofilmes de *Enterococcus faecalis* após 24, 36, 72, 192, 360 horas de crescimento. Imagens de altura, gráficos de seção e análise de rugosidade foram realizadas sobre biofilmes crescidos em membranas estéreis de nitrocelulose. O estudo de biofilmes é importante na moderna medicina devido a sua influência no tratamento de doenças infecciosas com antibióticos.

No Capítulo 10 foi usado o AFM para estudar a nanoestrutura da exina de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* (a popularmente denominada erva-mate). Pesquisas utilizando-se AFM têm demonstrado que determinados parâmetros estruturais da estrutura da esporopolinina (biopolímero formador da exina) são característicos da espécie. Convém ressaltar que a esporopolinina é considerada um dos biopolímeros mais resistentes, tendo chamado a atenção de cientistas e engenheiros de materiais.

Por fim, no Capítulo 11, são feitas as conclusões gerais e perspectivas dos temas apresentados nesta tese.

Nos ANEXOS A-C, estão cópias parciais (título, autores, resumo, periódico) dos artigos publicados, submetidos e à submeter; associados não apenas ao presente trabalho, mas a pesquisas diversas que realizei durante meu doutorado. Este procedimento foi realizado segundo recomendação de meu orientador, como um registro de minha produção científica no doutorado. O Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais (LCTM-UFC) é apresentado no Anexo D. Meu orientador e eu achamos importante este registro, pois a montagem do LCTM-UFC sob a supervisão do Prof. Valder, fez parte de uma das minhas atividades como estudante de doutorado aqui no Departamento de Física. Também julguei importante apresentar algumas características do microscópio de varredura por sonda (SPM) existente em nosso departamento, já que seu uso esteve diretamente envolvido em dois temas abordados na seção III. Deste assunto trata o Anexo E.

Por ser uma tese realizada em um departamento de Física, envolvendo materiais na sua maioria de origem biológica, achei prudente fazer uma descrição mais detalhada do

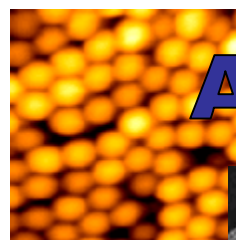
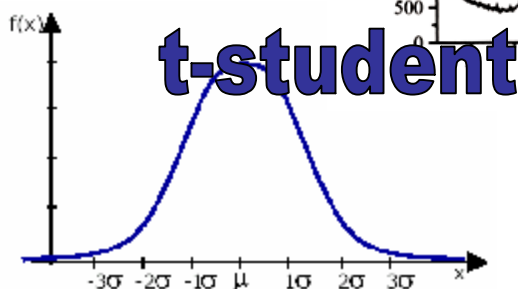
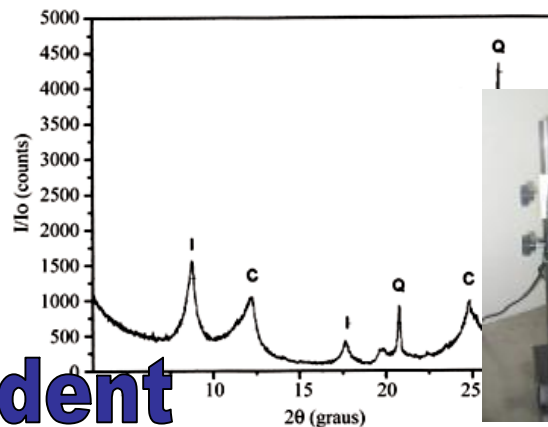
---

contexto no qual estes materiais se inserem. Por exemplo, para falar da nanoestrutura da exina de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* (Capítulo 10), comecei com conceitos como espermatófitas (que significa plantas com semente), flor, grãos de pólen, exina, etc. até chegar a estrutura alvo do estudo. Acredito que este procedimento tornou o texto mais rico, possibilitando uma melhor compreensão ao leitor, que na sua maioria deve estar associado a área da Física. Também mostra parte do trabalho que tive quando da realização desta tese. Afinal, não tenho o costume de estudar algo sem pelo menos saber o que seja este algo (mesmo que de uma maneira mais genérica). Este procedimento foi realizado em diversos capítulos deste trabalho.

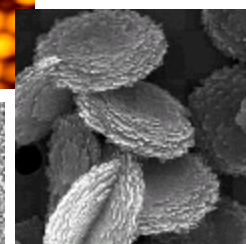
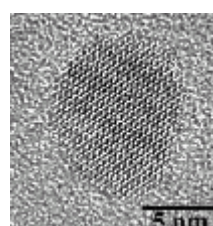
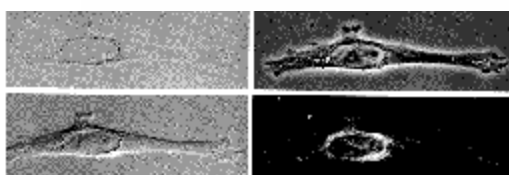
Nenhum trabalho é perfeito. É claro que falhas ocorreram. Entretanto, como uma frase dita por um produtor de uvas no filme “Um bom ano”, de Ridley Scott, “...aprendemos com nossos erros e não com os acertos. Então, errar é bom. O problema é quando isto se torna um hábito...”. Desta forma, espero que esta tese, dentro de suas limitações, consiga expressar pelo menos em parte, as pesquisas que foram realizadas por mim, sobre a orientação do Prof. Valder Nogueira Freire, no período de meu doutorado no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

# SEÇÃO I

## FUNDAMENTOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS



**ANOVA**



$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X_m)^2}{n - 1}$$

O conhecimento de métodos analíticos e o correto tratamento dos dados gerados por estes são fundamentais em qualquer pesquisa científica

---

---

## MÉTODOS ANALÍTICOS

---

---

### 2.1 INTRODUÇÃO

Pesquisadores da área da física, química, biologia e engenharia dispõem de um impressionante conjunto de poderosas e elegantes ferramentas para reunir informações qualitativas e quantitativas sobre a composição e estrutura da matéria. Estas ferramentas são reunidas no que denominamos métodos analíticos. Um método analítico qualitativo fornece informações sobre a identidade das espécies atômicas ou moleculares da matéria; um método quantitativo, em contraste, fornece informações numéricas, tais como as quantidades relativas de um ou mais destes componentes. Normalmente estes métodos são utilizados em conjunto, para completa caracterização de um material a ser analisado (Blaedel, 1970; Skoog, 2002).

Os métodos analíticos são normalmente classificados, por razões históricas, como clássicos e instrumentais. Os métodos clássicos (ou de via úmida) são aqueles realizados por separação dos componentes focos da análise (os analitos), em uma amostra, por meio de técnicas de precipitação, extração ou destilação. Os componentes separados são submetidos à ação de certos reagentes resultando em produtos reconhecíveis por suas cores, solubilidade, pontos de ebulição e fusão, seus odores ou atividades óticas (análise qualitativa). Para uma análise quantitativa, a massa do analito e dos compostos originados deste é determinada por meio de gravimetria ou por procedimentos titulométricos, onde é medido o volume ou a massa de um reagente padrão para reagir completamente com o analito. Os métodos instrumentais são aqueles que utilizam fenômenos distintos dos clássicos para explorar a composição e estrutura de materiais. Propriedades associadas aos fenômenos de emissão, absorção, espalhamento, refração e difração da radiação; bem como medidas do potencial elétrico, carga e resistência elétrica, massa, relação massa/carga, velocidade da reação, características térmicas e de radiatividade, interação da luz visível, elétrons e de sondas com a superfície são utilizadas para a análise quantitativa. A cada uma destas propriedades está associado um método instrumental (Tab. 2.1), que fazem uso normalmente de equipamentos sofisticados. Também são utilizadas técnicas eficientes de cromatografia e de eletroforese, em substituição a destilação, extração e precipitação na separação de componentes de misturas

complexas, utilizadas nos métodos clássicos. Os métodos analíticos instrumentais vêm dominando os laboratórios, como técnica padrão para o estudo da composição e estrutura de materiais (Baccan et al., 1979; Skoog, 2002; Harris, 2005).

Tabela 2.1. Principais métodos experimentais e as propriedades físico-químicas envolvidas.

<b>Método instrumental</b>	<b>Propriedade</b>
Espectroscopia de emissão (raios-X, UV, VIS); fluorescência, fosforescência e luminescência	Emissão de radiação
Espectroscopia e fotometria (raios-X, UV, VIS, IV); espectroscopia fotoacústica; ressonância magnética nuclear e de spin eletrônico	Absorção da radiação
Turbidimetria; nefelometria; espectroscopia Raman	Espalhamento da radiação
Refratometria; interferometria	Refração da radiação
Métodos de difração de raios-X e elétrons	Difração da radiação
Polarimetria; dispersão óptica rotatória; dicroísmo circular	Rotação da radiação
Potenciometria; cronopotenciometria	Potencial elétrico
Coulometria	Carga elétrica
Amperometria; polarometria	Corrente elétrica
Condutimetria	Resistência elétrica
Massa	Gravimetria (balança e microbalança de cristal de quartzo)
Espetroscopia de massa	Relação massa/carga
Métodos cinéticos	Velocidade da reação
Gravimetria e titulometria térmica; calorimetria diferencial exploratória; análise térmica diferencial e métodos de condutimetria térmica	Características térmicas
Métodos de ativação e diluição de isótopos	Radiatividade
Microscopia ótica	Interação da luz visível com a matéria
Microscopia eletrônica	Interação de elétrons com a matéria
Microscopia de tunelamento	Tunelamento de elétrons de uma superfície
Microscopia de força atômica	Interação de uma sonda com a superfície (forças de atração, adesão, de van der Waals)
Dureza/microdureza	Propriedades mecânicas da superfície

## 2.2 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)

A análise por energia dispersiva de raios-X (em inglês, “Energy Dispersive X-ray” ou EDX, como é mais conhecida) é uma técnica essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um material, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detector instalado na câmara de vácuo de um microscópio eletrônico de varredura mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar que material está sendo observado. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos ( $< 5 \mu\text{m}$ ), permitindo uma análise quase que pontual. O uso em conjunto do EDX com o microscópio eletrônico de varredura (Fig. 2.1a) é de grande importância na caracterização estrutural de superfícies. Enquanto este microscópio proporciona imagens da superfície, o EDX permite sua imediata identificação. O resultado mais freqüente de uma análise por EDX é o espectro de energia liberada pelos elétrons e sua respectiva intensidade (Fig. 2.1b). Além da identificação mineral, a técnica ainda permite o mapeamento da distribuição de elementos químicos, gerando mapas composicionais de elementos desejados em um material (Richardson e Bradshaw, 1981; Butler e Hale, 1981; Skoog, 2002).

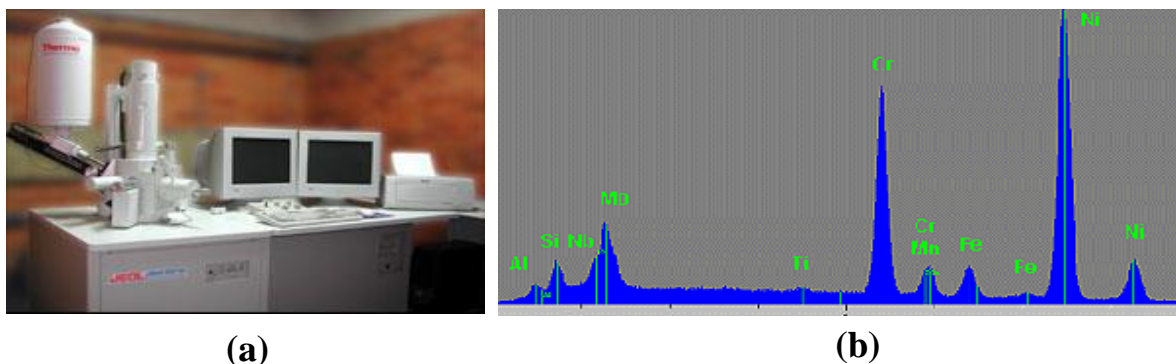


Figura 2.1. Microscópio eletrônico de varredura equipado com dispositivo para análise de energia dispersiva de raios-X (a); Resultado típico de uma análise por EDX (b), mostrando o espectro EDX de uma liga de níquel de alta temperatura composta por níquel (Ni), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), titânio (Ti), molibdênio (Mo), silício (Si) e alumínio (Al). O eixo horizontal representa a energia liberada pelos elétrons e o eixo vertical, a intensidade.

### 2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD)

A difração de raios-X (em inglês, “X-Ray Diffraction” ou XRD, como é mais conhecida), é realizada através de um equipamento chamado difratômetro (Fig. 2.2a) é uma técnica que nos permite obter informações sobre as estruturas cristalinas presentes numa amostra, através do uso de um tipo de radiação eletromagnética: os raios-X. Os raios-X têm comprimento de onda da ordem do diâmetro atômico ( $10^{-10}$  m) ou do espaçamento entre os átomos/íons em sólidos. Quando os raios-X são direcionados para um sólido com uma estrutura cristalina, suas ondas são espalhadas pelo ambiente ordenado do cristal, ocorrendo a interferência entre os raios espalhados (tanto construtiva como destrutiva) porque as distâncias entre os centros espalhadores são da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda da radiação. O resultado é a difração. (Azaroff, 1968; Skoog, 2002).

Desde a sua descoberta em 1912, por Von Laue, a difração de raios-X tem sido uma importante fonte de informação para a ciência e a indústria. A maior parte do que é conhecido sobre o espaçamento e arranjo dos átomos em materiais cristalinos foi determinada diretamente por estudos de difração. Além disso, esses estudos levaram ao entendimento das propriedades físicas dos metais, materiais poliméricos e de outros sólidos. A difração de raios-X é, atualmente, o método de maior importância na elucidação de estruturas cristalinas complexas. A difração de raios-X também fornece um meio conveniente e prático para a identificação qualitativa e quantitativa de compostos cristalinos. O método de difração de raios-X, usando uma amostra policristalina (método do pó), é capaz de fornecer informação qualitativa e quantitativa sobre os compostos presentes na amostra sólida. Os métodos de difração de raios-X de pó estão baseados no fato de que o padrão de difração (chamado de difratograma) (Fig. 2.2b) é único para cada substância cristalina. Assim, se é encontrada uma concordância exata entre o padrão produzido pela amostra desconhecida e o de uma amostra conhecida, então a identidade química da amostra desconhecida pode ser atribuída. A identificação de uma espécie a partir de seu difratograma de pó está baseada na posição das linhas em termos do ângulo entre a onda incidente e a onda espalhada ( $2\theta$ ) e suas intensidades relativas. O ângulo  $2\theta$  é função do espaçamento de um conjunto particular de planos. Estas linhas formam-se picos com intensidades e distâncias entre si que variam de substância para substância. Diferentes materiais (ou fases) possuem diferentes arranjos espaciais de átomos ou íons, e a interação com a radiação incidente resultam numa "assinatura" muito própria. Pela medida da intensidade das linhas de difração e sua comparação com difratogramas de padrões



feitos com quantidades conhecidas, torna-se possível a análise quantitativa de misturas cristalinas (Jacobs, 1997, Cullity, 1998; Skoog, 2002,).

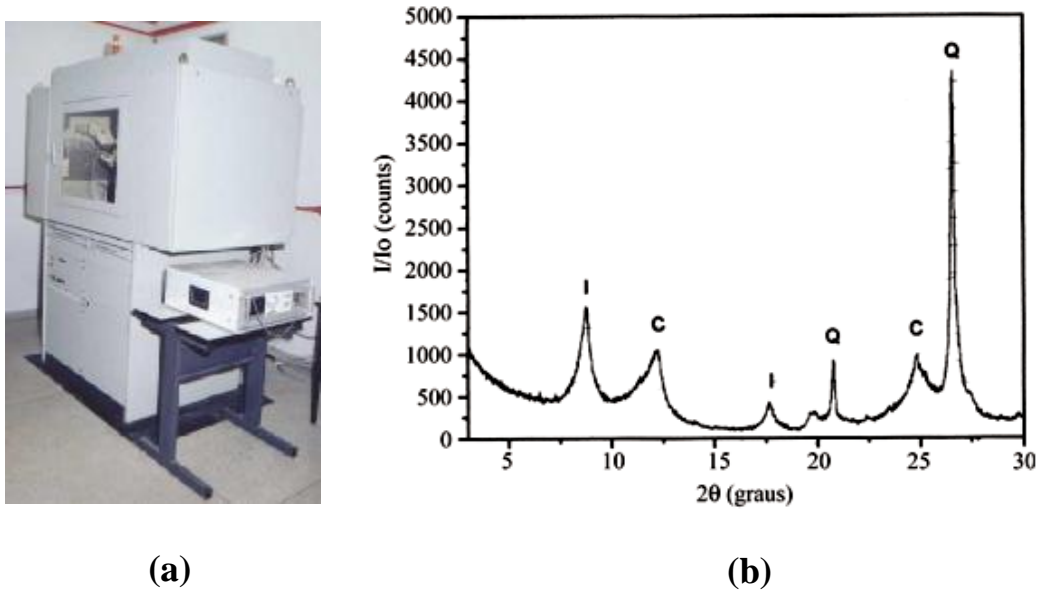


Figura 2.2. Difratorômetro de raios-X (a); Difratorograma de uma argila (b), mostrando suas fases cristalinas: Caolinita (C), Quartzo (Q) e Ilita (I) (Albers et al., 2002).

Atualmente, a comparação com padrões de difração, para identificação das fases cristalinas de um composto (análise qualitativa) é feita por intermédio de softwares especialmente desenvolvidos para tal fim. Estes softwares são compostos por um extenso banco de dados cristalográfico (padrões de difração) e utilizam os arquivos de dados gerados pelo próprio difratômetro. Como exemplo, temos o X'Pert HighScore da Philips. Já para a análise quantitativa, o procedimento mais usado é a simulação do perfil difratométrico a partir das estruturas das fases componentes de uma amostra através do método Rietveld. Este método é baseado na construção de um padrão de difração calculado, de acordo com o modelo estrutural. O padrão calculado é obtido pela introdução direta dos dados cristalográficos, como: simetria do grupo espacial, posições atômicas, posições de ocupação e parâmetros de rede. O padrão calculado ao se ajustar ao padrão observado fornece dados dos parâmetros estruturais do material e parâmetros do perfil de difração. O termo refinamento no método de Rietveld refere-se ao processo de ajuste do modelo de parâmetros utilizados no cálculo de um padrão de difração, que seja o mais próximo do observado. O refinamento é conduzido pela minimização da soma das diferenças entre as intensidades calculadas e observadas (método dos mínimos quadrados), a cada passo angular do padrão de difração. O método de Rietveld permite o refinamento de estruturas cristalinas complexas, sendo aplicado



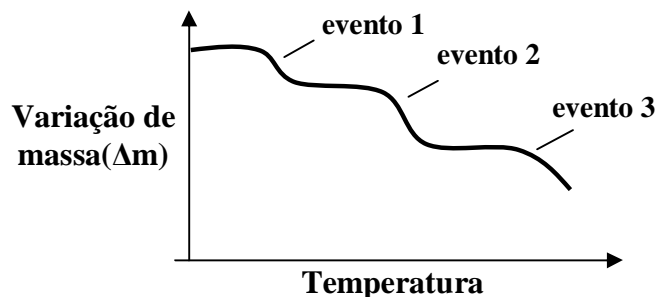
ao fornecimento de dados quantitativos (percentual de cada fase na amostra) com precisão reconhecida (Bish e Howard, 1988; Lutterotil, 1990; Young, 1994; Young, 1995; Fancio, 1999). Os principais softwares utilizados para o refinamento de difratogramas de pó são o DBWS e o Rietica, ambos de livre distribuição.

## 2.4 ANÁLISES TÉRMICAS

A termogravimetria ou análise termogravimétrica (em inglês, “Thermogravimetric analysis” ou TGA, como é mais conhecida) baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. Em outras palavras, pode ser definida como um processo contínuo que mede a variação de massa (perda ou ganho) de uma substância ou material como uma função da temperatura e/ou tempo. Os equipamentos responsáveis por esta análise são chamados de termobalanças (Fig. 2.3a). Existem três tipos básicos de técnicas termogravimétricas: termogravimetria isotérmica, que permite medir a variação da amostra a ser analisada como uma função do tempo à temperatura constante; termogravimetria semi-isotérmica, onde a amostra é aquecida a uma massa constante a cada série de aumento de temperatura; e termogravimetria dinâmica, onde a amostra é aquecida em um ambiente no qual a variação de temperatura está programada ou pré-determinada, preferencialmente em velocidade linear. A última é a mais usada (Fig. 2.3b). Às vezes é vantajoso poder acompanhar um termograma com sua primeira derivada. A isto chamamos de análise termogravimétrica derivada (em inglês, “Derived Thermogravimetric” ou DTG, como é mais conhecida). Várias termobalanças comerciais são munidas com circuitos eletrônicos para obter a derivada automaticamente (Wendlandt, 1986; Mothé e Azevedo, 2002).



(a)



(b)

Figura 2.3. Termobalança TGA-50 (a); Curva típica de uma análise termogravimétrica dinâmica (b), mostrando três eventos térmicos associados à perda de massa.

A análise térmica diferencial (em inglês, “Differential thermal analysis” ou DTA, como é mais conhecida) é uma técnica térmica em que se mede a diferença de temperatura entre a amostra e uma substância inerte (referência), quando ambas são submetidas ao aquecimento ou ao resfriamento. Mudanças da temperatura da amostra são ocasionadas pelas transições ou reações endotérmica ou exotérmica devido à mudança de fase, fusão, inversões da estrutura cristalina, sublimação, vaporização, reações de desidratação, reações de dissociação ou decomposição, oxidação, reações de redução e outras reações químicas. Um gráfico típico de DTA é mostrado na Figura 2.4 (Mackenzie, 1978; Mothé e Azevedo, 2002).

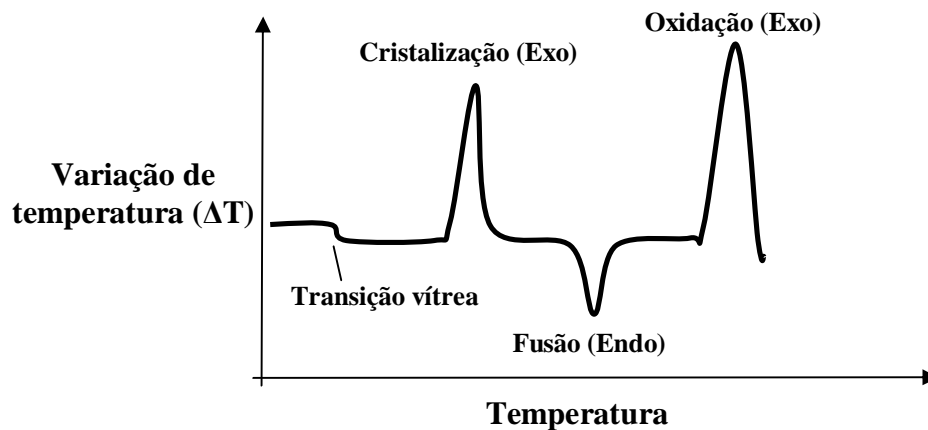


Figura 2.4. Curva típica de uma análise térmica diferencial em um material polímero.

Os picos da análise térmica diferencial resultam tanto de modificações físicas como de reações químicas induzidas por variações de temperatura da amostra. Os processos físicos endotérmicos incluem fusão, vaporização, absorção e dessorção. A adsorção e cristalização geralmente são exotérmicas. As reações químicas podem ser também exotérmicas ou endotérmicas. As reações endotérmicas incluem desidratação, redução em atmosfera gasosa e decomposição. As reações exotérmicas incluem oxidação no ar ou na presença de oxigênio, polimerização e reações catalíticas. As áreas sob os picos nos termogramas diferenciais dependem da massa da amostra, da entalpia do processo físico ou químico e de certos fatores geométricos da condutividade térmica. Normalmente o equipamento de DTA vem acoplado com o de TGA, formando um sistema TGA/DTA (Haines, 1995; Smothers e Chiang, 1974, Skoog, 2002).

A calorimetria exploratória diferencial (em inglês, “Differential Scanning Calorimetry” ou DSC, como é mais conhecida) pode ser definida como uma técnica que mede temperaturas e fluxos de calor associado com transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Tais medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas

sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos (absorção de calor), exotérmicos (liberação de calor) ou mudanças na capacidade calorífica. O DSC pode proporcionar informações específicas tais como: transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização, ponto de fusão, calor específico, oxidação, pureza, estabilidade térmica, ponto de ebulição, grau de velocidade de cura, cinética de reação e outros. Um equipamento de DSC e uma curva típica de análise são mostrados na Figura 2.5 (Hemminger e Hohme, 1984; Mothé e Azevedo, 2002).

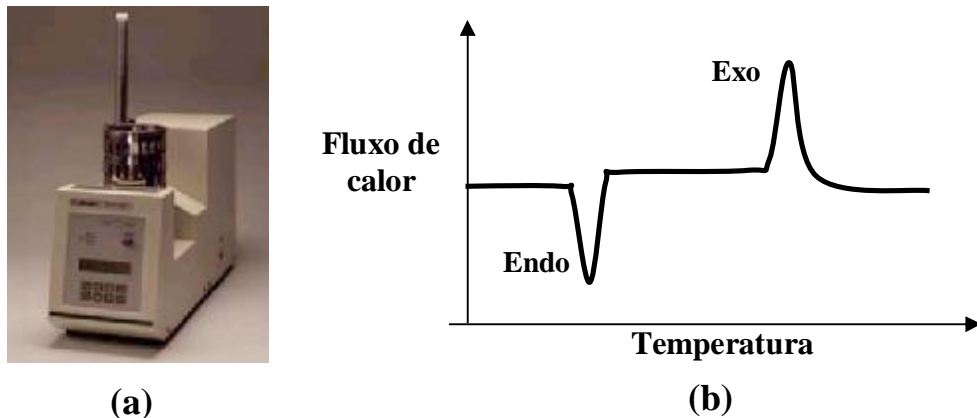


Figura 2.5. Analisador térmico diferencial DSC-50 (a); Curva típica de uma calorimetria exploratória diferencial, mostrando um pico endotérmico e outro exotérmico (b).

A diferença básica entre a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise térmica diferencial (DTA) é que a primeira é um método calorimétrico no qual são medidas diferenças de energia; no segundo, são medidas as diferenças de temperatura. As curvas térmicas para os dois métodos são similares (Speyer, 1994).

As análises térmicas são utilizadas para diversas aplicações. Entre as aplicações para a termogravimetria incluem: adsorção e curvas de dessorção; calcinação e sinterização de minerais; corrosão de metais em atmosfera variada; decomposição de materiais explosivos; decomposição térmica de pirólise de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos; degradação térmica oxidativa de substâncias poliméricas; desenvolvimento de procedimentos analíticos gravimétricos (peso constante); destilação e evaporação de líquidos; determinação de umidade, substâncias voláteis e conteúdo de cinzas; diagrama de fase e não estequiométrico envolvendo atmosfera; estudo de cinética de reação envolvendo espécies voláteis; estudo de desidratação e higroscopicidade; identificação de polímeros e intermediários; taxas de evaporação e sublimação; reações no estado sólido que desprendem voláteis; propriedades magnéticas, isto é, temperatura de cura, susceptibilidade magnética.

Para o DTA/DSC, temos as aplicações para os seguintes estudos: catálise; reações de dessolvatação; perigo de radiação; calor de reação; reações de decomposição; reações de desidratação; estabilidade térmica; estabilidade de oxidação; determinação de transição vítrea; calor de sublimação; determinação de pureza; diagrama de fase; reações sólido-gás; reações de estado sólido; cinética de reação; calor de transição; calor de adsorção; determinação do ponto de Curie; dentre outras (Ford e Timmins, 1989; Charles e Warrington, 1992; Hatakeyama e Quinn, 1994; Mothé e Azevedo, 2002).

## 2.5 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

O menor objeto que pode ser visualizado a olho nu (resolução) é de aproximadamente 0,2 mm (200  $\mu\text{m}$ ), a uma distância mínima de 25 cm (ponto próximo da vista). A distância separando dois objetos deve ser tal que permita que sejam distinguidos um do outro; se eles estão muito próximos ( $< 200 \mu\text{m}$ ), aparecem como uma única mancha. Os microscópios são instrumentos analíticos usados para aumentar a resolução e, conseqüentemente, estruturas abaixo de 200  $\mu\text{m}$  podem ser visualizadas. Existem basicamente três tipos de microscópios, classificados conforme a natureza do elemento de interação com o objeto a ser analisado: ótico (luz), eletrônico (elétrons) e de varredura por sonda (sonda) (Rose, 1973).

### 2.5.1 MICROSCOPIA ÓTICA

A microscopia ótica se refere ao uso de qualquer microscópio que utiliza a luz visível para tornar espécimes observáveis. O microscópio ótico usa lentes de vidro e luz visível para formar uma imagem aumentada de um objeto. O poder de resolução de um microscópio óptico pode ser definido tecnicamente como a menor distância entre dois pontos que permite sua separação e conseqüente distinção. Depende do comprimento de onda de luz e das propriedades da lente. O poder de resolução é definido como

$$R = \frac{0,61\lambda}{AN}$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz e  $AN$  é a abertura numérica da lente, sendo definida como:

$$AN = n \sin a$$

com  $n$  igual ao índice de refração médio entre a lente e a amostra e  $\alpha$  o ângulo entre o eixo da objetiva e o raio de luz mais oblíquo que atravessa a lente, sendo uma função das dimensões desta. Como o sistema ótico está imerso em ar, então  $n = 1$ . Os valores de  $AN$  das lentes diferem de acordo com o poder de aumento e com outras propriedades. O valor de  $AN$  é gravado nas laterais de cada lente objetiva (a lente mais próxima ao objeto) de um microscópio ótico. Os valores mais comuns para as lentes objetivas, encontradas com frequência em microscópios óticos modernos, são 0,25 para baixo poder de resolução, 0,65 para alto poder de resolução e 1,25 para lentes de imersão. Para um comprimento de onda típico da luz de 550 nm e para as dimensões das objetivas atualmente fabricadas, a resolução máxima de um microscópio ótico será da ordem de 0,22  $\mu\text{m}$ , que representa mil vezes a capacidade do olho humano. A qualidade da imagem microscópica é determinada pela ampliação, grau de difração, distorção devido a aberrações das lentes e contraste. Para melhorar a resolução, os microscopistas utilizam comprimentos de onda de radiação eletromagnética cada vez menores. A luz visível não é capaz de separar distâncias inferiores a 220 nm. A luz ultravioleta, de comprimento de onda de 100 a 400 nm, pode separar distâncias tão pequenas quanto 110 nm. Assim, o microscópio que usa luz ultravioleta ao invés de visível possui maior resolução, permitindo a observação de mais detalhes das estruturas analisadas (Black, 2002).

O microscópio ótico moderno não descende da lente única de Leeuwenhoek, mas sim, do microscópio composto de Hooke (um microscópio com mais de uma lente). As lentes únicas geram dois problemas: não podem focalizar o campo inteiro simultaneamente e acrescentam anéis coloridos ao redor dos objetos no campo. Ambos os problemas são hoje resolvidos através do uso de múltiplas lentes de correção colocadas próximo à lente de aumento principal. Utilizadas em objetivas e oculares de microscópios compostos modernos, as lentes corretivas proporcionam imagens praticamente isentas de correção (Pluta, 1988; Black, 2002).

O microscópio ótico composto é aquele que tem duas lentes, uma objetiva e a outra ocular, possibilitando dois estágios de amplificação (Fig. 3.7).

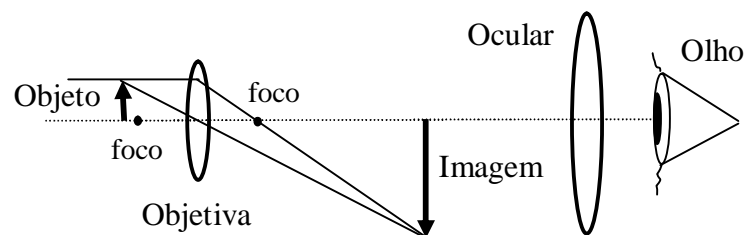


Figura 2.6. Esquema de um microscópio ótico composto.

Um microscópio composto com uma única ocular é chamado monocular; aquele com duas oculares, de binocular. A luz penetra o microscópio através de uma fonte de luz na base e, freqüentemente, passa através de um filtro azul, que filtra seus maiores comprimentos de onda, deixando passar os menores, melhorando a resolução. Então, ela passa por um condensador, que converge os raios luminosos para que possam passar através do objeto. O diafragma íris controla a quantidade de luz que passa através do objeto e que vai para a lente objetiva. Quanto maior o aumento, maior a quantidade de luz necessária para ver claramente o objeto. A lente objetiva aumenta a imagem antes que a mesma atravesse o tubo ou canhão para a lente ocular. A lente ocular aumenta mais ainda a imagem. Uma mesa mecânica permite o controle preciso do movimento da lâmina, que é especialmente útil em estudos mais detalhados de objetos. O aumento total de um microscópio composto é dado pelo produto do aumento da objetiva pela ocular, variando de 30 a 1000 vezes (Herman, 1990).

O condensador utilizado em um microscópio ótico comum faz com que a luz seja concentrada e transmitida diretamente através do objeto. Isto confere uma iluminação de campo claro. Contudo, em alguns casos, é melhor examinar objetos que exibem pouco contraste em um campo claro, sob outra iluminação. Neste caso, utiliza-se a iluminação de campo escuro. Um microscópio ótico adaptado para a iluminação de campo escuro possui um condensador que impede a luz de ser transmitida através do objeto. Em vez disto, leva a luz a refletir do objeto de modo oblíquo. Quando estes raios são coletados e focalizados em uma imagem, um objeto claro é visto em um fundo escuro (Black, 2002).

Um microscópio ótico de contraste de fase possui um condensador especial e lentes objetivas que acentuam pequenas diferenças no índice de refração de várias estruturas localizadas no objeto. A luz que passa através dos objetos de diferentes índices de refração é reduzida e difratada. As modificações na velocidade da luz são visualizadas como diferentes gradações de claridade (Zernike, 1942, Black, 2002).

O microscópio ótico Nomarski, do mesmo modo que o microscópio de contraste de fase, usa os diferentes índices de difração para visualizar detalhes no objeto. Contudo, o microscópio Nomarski (também chamado de contraste de interferência diferencial), proporciona resolução bastante superior ao microscópio padrão de contraste de fase. Ele possui uma profundidade de campo (a espessura do objeto que está em foco a qualquer momento) extremamente curta e pode proporcionar uma imagem próxima a tridimensional (Zernike, 1942, Black, 2002).

A microscopia ótica de fluorescência utiliza-se do fato que certas substâncias, quando sob a ação de irradiações de comprimento de onda curtos, começam a emitir radiação

própria, composta por ondas de comprimento mais longo, luminosas e visíveis, ou seja, fluorescem. Certas substâncias quando ativadas por luz ultravioleta, violeta ou azul, apresentarão fluorescência no azul, verde, amarelo ou vermelho, segundo sua natureza. A simplicidade e exatidão colocaram desde logo a microscopia de fluorescência no controle de alimentos, mineralogia e botânica. Nos primórdios desta microscopia, só era usada a chamada fluorescência “própria” ou primária. Entretanto, descobriu-se que se poderiam tratar substâncias ou mesmo tecidos animais e vegetais com diluições de certos corantes orgânicos e obter assim uma fluorescência secundária. O tratamento com fluorocromos abriu a modalidade de microscopia de fluorescência também em células e tecidos animais, na citologia, histologia, patologia, hematologia, bacteriologia, etc. Corantes fluorescentes existem vários, como por exemplo: amarelo de acridina, auromina, aurofosfina, sulfato de berberina, extrato de clorofila, fluoresceína, rodamina, tioflavina e tripaflavina (Bucherl, 1972).

O microscópio de polarização se diferencia de um microscópio comum por possuir um equipamento para a produção de luz linearmente polarizada. A utilização da luz polarizada tem produzido resultados bem interessantes; corpos isotrópicos são facilmente diferenciados de anisotrópicos ou birrefringentes (Bucherl, 1972).

O microscópio metalográfico (Fig. 2.7a) é um microscópio ótico composto que utiliza a luz refletida sobre o material a ser observado (Fig. 2.7b) para registrar imagens de amostras sólidas. Amostras opacas, como amostras metalográficas, são tipicamente observadas por estes microscópios (Jacobs e Kilduff, 1994).

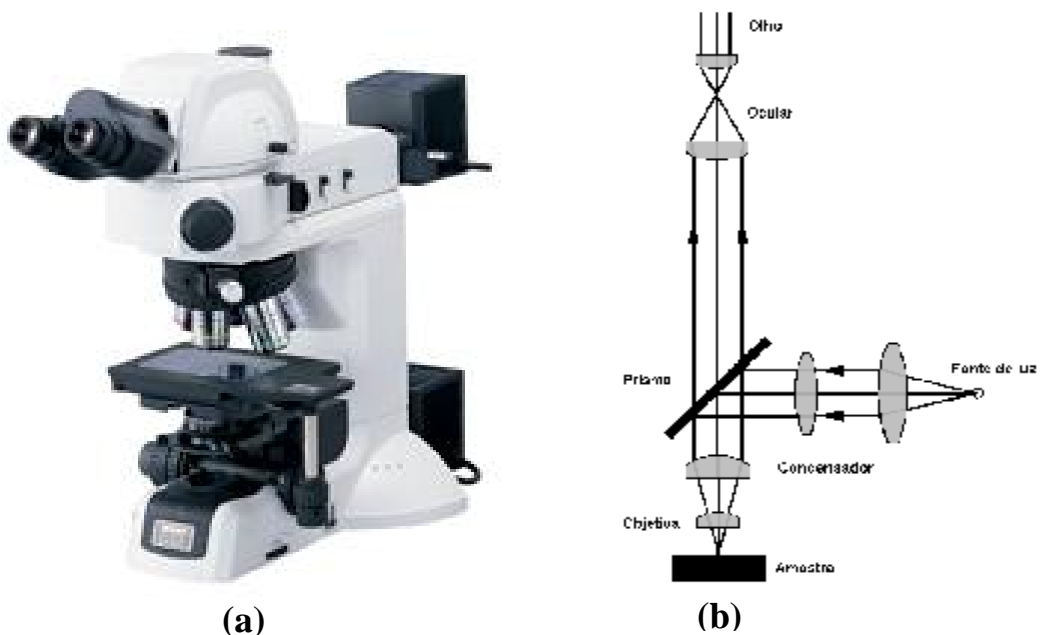


Figura 2.7. Microscópio metalográfico Eclipse LV100D da Nikon (a); Esquema do sistema ótico de um microscópio metalográfico (b).



### 2.5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Em vez de raios de luz, a microscopia eletrônica utiliza feixes de elétrons e, em vez de lentes de vidro, eletromagnetos são usados para focalizar o feixe. Os elétrons devem viajar através do vácuo, pois as colisões com as moléculas de ar dispersariam os elétrons e resultariam em uma imagem distorcida. Com o microscópio eletrônico, o poder de resolução é aumentado 1000 vezes em relação ao óptico. Nas melhores condições, a microscopia eletrônica prevê um poder de resolução próximo de 2 Å. As fotografias tiradas de qualquer microscópio são chamadas de micrografia; aquelas tiradas de microscópios eletrônicos, são chamadas de micrografias eletrônicas. Os dois tipos mais comuns de microscópios eletrônicos são o de varredura e o de transmissão (Black, 2002).

No microscópio eletrônico de varredura (em inglês, “Scanning Electron Microscope” ou SEM como é mais conhecido), os elétrons cujos sinais são registrados provêm da superfície do material observado. O SEM (Fig. 2.8) pode resolver objetos de até 20 nm, proporcionando ampliações de até 50.000X.



Figura 2.8. Exemplo de um moderno microscópio de eletrônico de varredura (SEM).

O feixe eletrônico bombardeia o material, rastreando-o. Em consequência disto o espécime emite elétrons secundários de baixa energia. Variações na superfície alteram o número de elétrons emitidos. Buracos e fissuras aparecem escuros. Protuberâncias e cristas aparecem brilhantes. Os elétrons refletidos pela superfície, juntamente com os secundários formam uma imagem da superfície da amostra. Um feixe de elétrons é produzido no topo do microscópio pelo aquecimento de um filamento metálico. O feixe de elétrons segue um caminho vertical pela coluna do microscópio. Faz seu caminho por lentes eletromagnéticas que focam e dirigem o feixe para abaixo, na amostra. Uma vez que o feixe choca-se com a



amostra, outros elétrons (retro-espalhados e secundários) são lançados da amostra. Detectores coletam os elétrons secundários e os retro-espalhados, convertendo-os em um sinal que é enviado a uma tela similar a uma tela de TV produzindo assim uma imagem (Fig.2.9). Elétrons retro-espalhados são elétrons do feixe incidente que emergem da amostra, devido a interação com as forças nucleares dos átomos da amostra (Fig.2.10). As imagens formadas pelos elétrons retro-espalhados mostram contraste nas regiões da amostra com composição química diferente, bem como nas irregularidades (Fig.2.11). Os elétrons secundários são aqueles arrancados da amostra, devido a interação do feixe incidente com os átomos da amostra (Fig.2.12). São responsáveis pelo efeito 3D na imagem (Fig.2.13). A maior parte da imagem clássica de SEM é formada pelos elétrons secundários (Reimer, 1998).

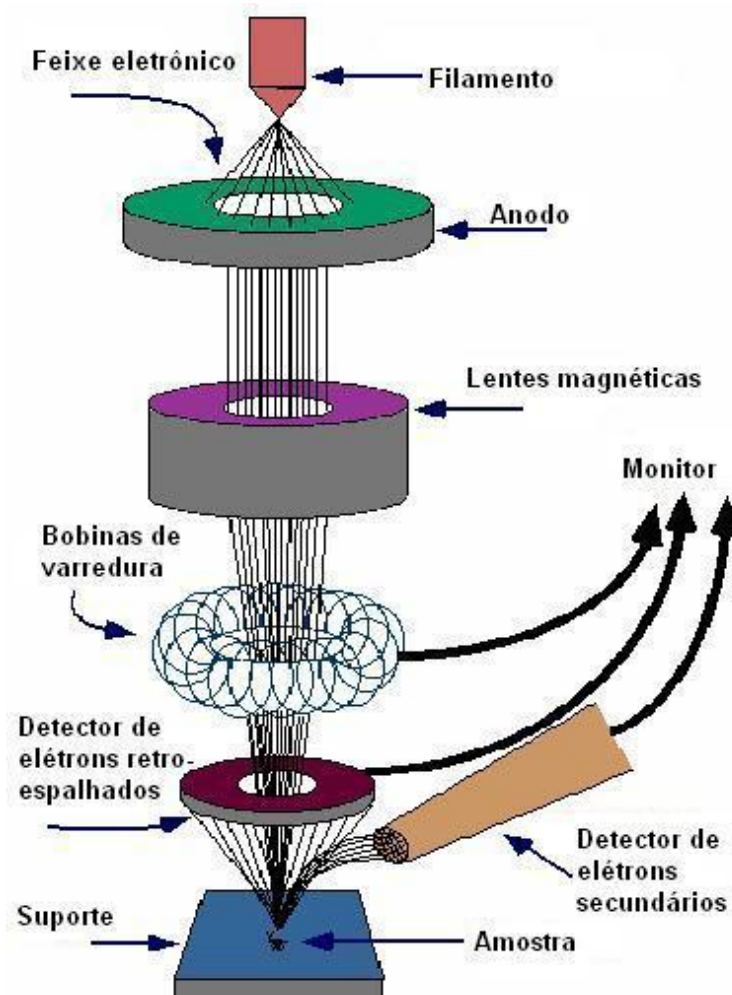


Figura 2.9. Esquema de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura (SEM).

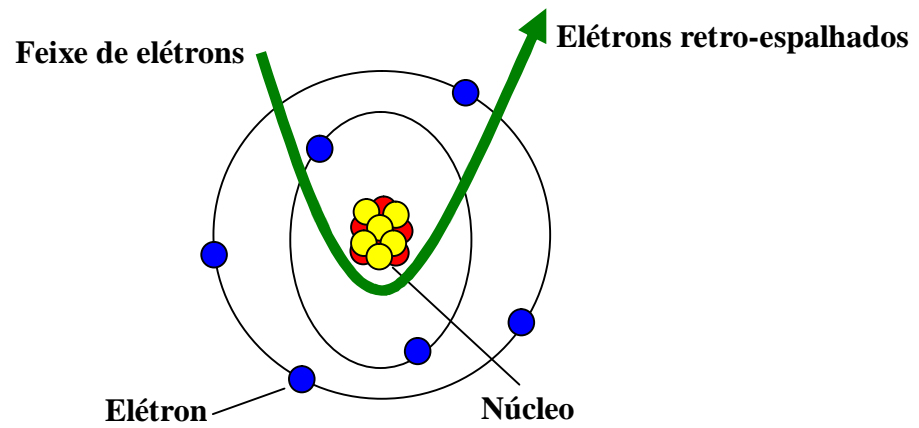


Figura 2.10. Processo de geração de elétrons retro-espalhados.



Figura 2.11. Imagem por SEM de uma liga de cobre e de alumínio formada usando elétrons retro-espalhados. A área clara é formada principalmente de cobre e a área escura é de alumínio.

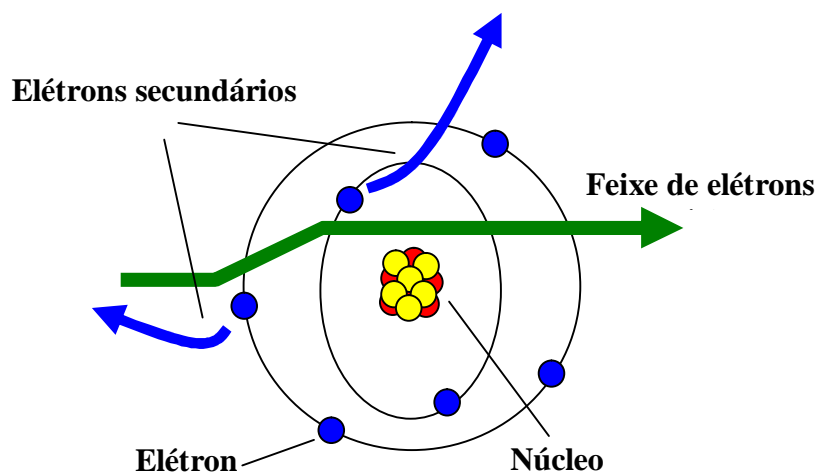


Figura 2.12. Processo de geração de elétrons secundários.

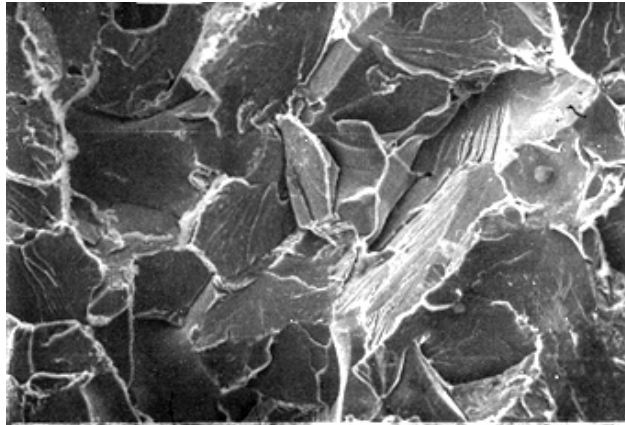


Figura 2.13. Imagem por SEM de uma superfície fraturada de um pedaço de metal, formada a partir de elétrons secundários.

Para a visualização no microscópio eletrônico de varredura, a amostra deve passar pelos seguintes processos (Cantor e Schimmel, 1980):

- 1) Desidratação - retirada de água;
- 2) Metalização - como o SEM usa elétrons para produzir a imagem, as amostras devem ser eletricamente condutoras. Materiais não condutores devem ser cobertos por uma fina camada condutora (ouro), processo este chamado metalização. Isto é feito através de um dispositivo chamado Sputter.
- 3) Vácuo - A amostra assim preparada é colocada em vácuo, no SEM, para que o feixe de elétrons possa mover-se sem interferência (com outras partículas).

O microscópio eletrônico de transmissão (em inglês, “Transmission Electron Microscope” ou TEM como é mais conhecido) proporciona melhor visualização da estrutura interna de objetos do que os outros microscópios (Fig. 2.14).

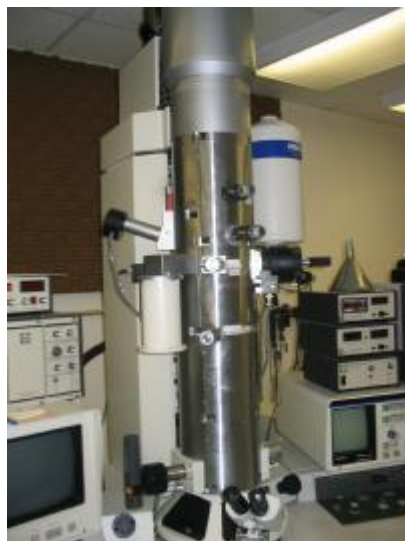


Figura 2.14. Exemplo de um moderno microscópio eletrônico de transmissão (TEM).

Devido ao comprimento de onda extremamente curto da iluminação (elétrons) no qual o TEM opera, ele pode resolver objetos de até 1 nm, ampliando-os até 500.000 vezes. A microscopia de transmissão utiliza os elétrons que atravessam uma amostra, para formar imagens (Fig. 2.15). Sendo assim, tais amostras (biológicas ou não) devem ser muito finas (em torno de 0,1  $\mu\text{m}$ ). Para ser examinada através da microscopia eletrônica de transmissão, a matéria viva precisa ser fixada, desidratada, impregnada com materiais duros e cortada com instrumentos especiais (micrótomo). Além disto, por serem transparentes aos elétrons, a maioria dos espécimes precisam ser impregnados com metais pesados, que se ligam diferencialmente a distintos componentes subcelulares. As áreas do material que permitem melhor transmissão dos elétrons aparecem brilhantes; as que absorvem ou defletem (regiões densas), são escuras, gerando imagens de TEM (Fig.2.16) (Reimer, 1993; Williams e Carter, 1996; Black, 2002).

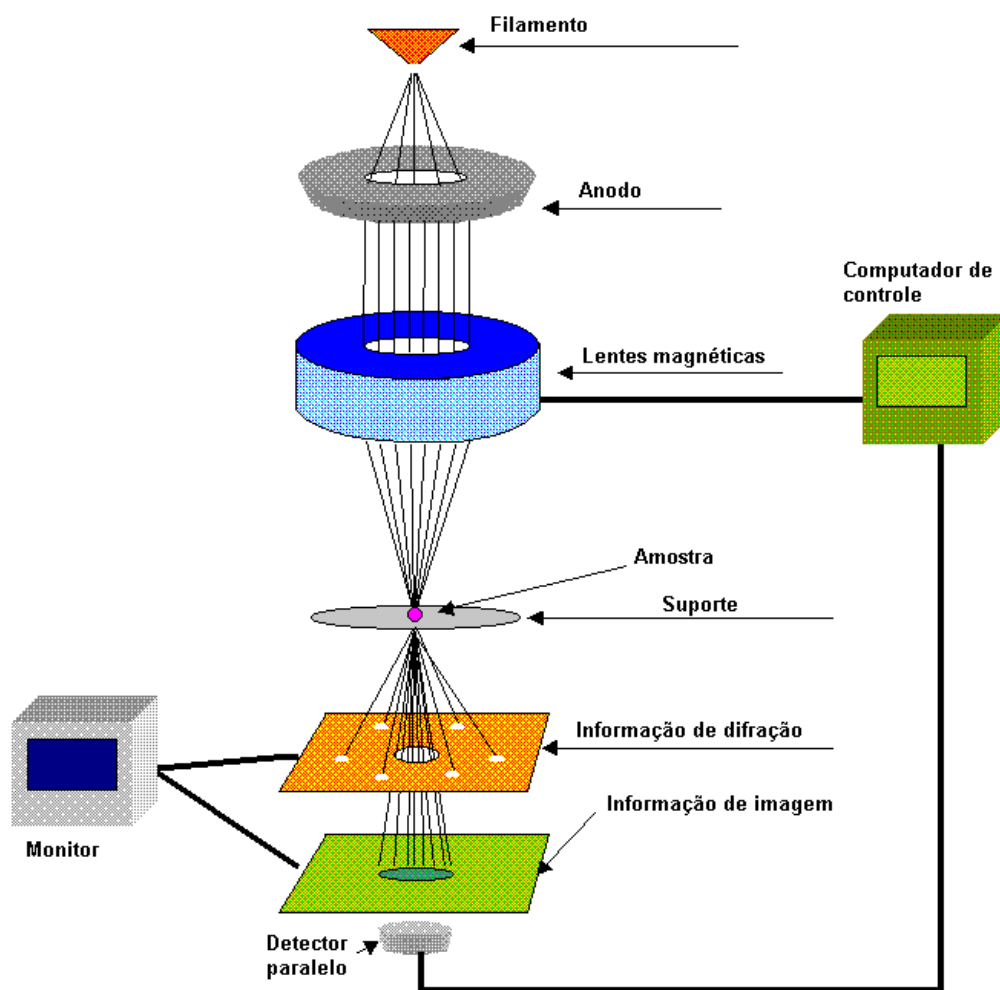


Figura 2.15. Esquema de funcionamento de um microscópio eletrônico de transmissão (TEM).

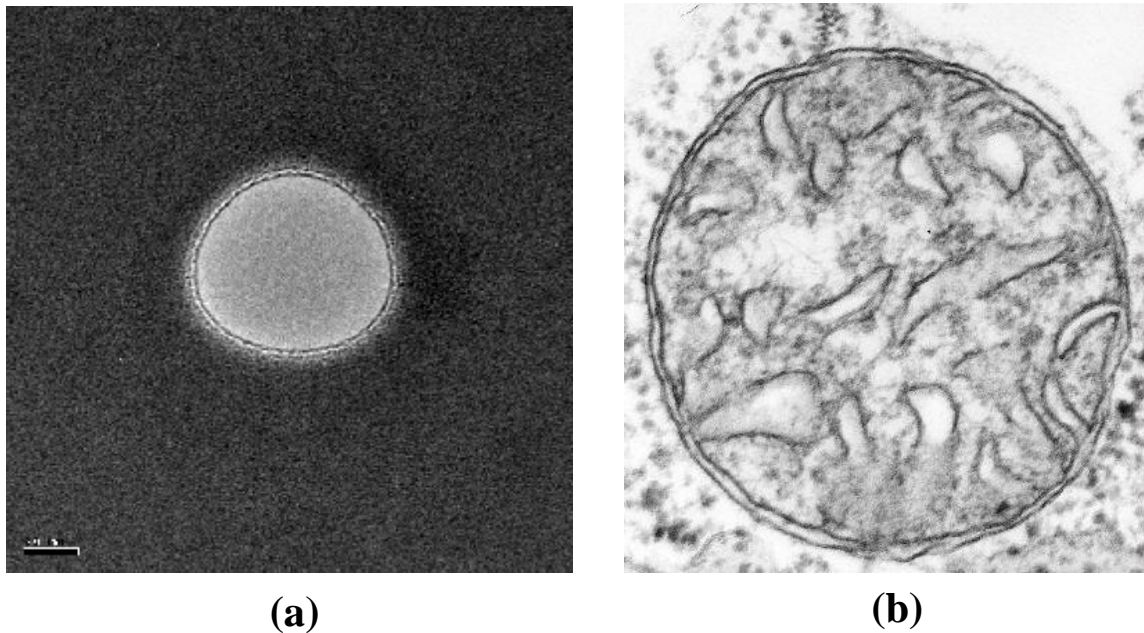


Figura 2.16. Imagens de TEM: nanoporo (a) e mitocôndria (b).

### 2.5.3 MICROSCOPIA DE VARREDURA POR SONDA (SPM)

Os microscópios de varredura por sonda mecânica (em inglês, “Scanning Probe Microscope” ou SPM, como são mais conhecidos) são uma família de microscópios utilizados para observar localmente diversas propriedades da superfície de uma amostra. Dessa família, os mais utilizados são o microscópio de força atômica (em inglês, “Atomic Force Microscope” ou AFM, como é mais conhecido) e o microscópio de tunelamento (em inglês, “Scanning Tunneling Microscope” ou STM, como é mais conhecido). O princípio básico de funcionamento dos SPM’s é a detecção da interação entre uma ponta de prova e a superfície de uma amostra. Com eles, podem-se caracterizar as superfícies estudadas com resolução que varia da escala micrométrica à atômica. A idéia dos SPM’s surgiu como consequência da observação do tunelamento de elétrons entre uma ponta de tungstênio (W), atômica e afilada, e a superfície de uma amostra de platina (Pt), feita por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer em 1981 no laboratório de pesquisas da IBM de Zúrich. Motivados por essa observação, Binnig e Rohrer, desenvolveram um equipamento com a capacidade de, simultaneamente, varrer a superfície de uma amostra sob uma ponta de prova condutora, atômica e afilada, e medir a corrente de tunelamento entre a ponta e a superfície. Surgiu assim, o microscópio de tunelamento (Binnig, 1982). Pelo desenvolvimento do STM, Binnig e Rohrer receberam em 1986 o Prêmio Nobel de Física e tornaram a vida de muitos pesquisadores mais interessantes,



trazendo-lhes uma visão fabulosa do mundo atômico (Binnig, 1987). A situação, sob certo aspecto, limitada do STM, onde somente superfícies condutoras e semicondutoras podem ser analisadas, levou G. Binnig, C. F. Quate e Ch. Gerber a desenvolver, em 1986, o microscópio de força atômica (Binnig, 1986). Durante a operação do AFM, monitora-se a força de interação entre a ponta de prova e a superfície da amostra. Essa força, de magnitude semelhante à das forças interatômicas em sólidos é da ordem de  $10^{-9}$  N. Com o AFM, amostras tanto condutoras quanto isolantes, podem ser estudadas. A Figura 2.17 apresenta um esquema geral da composição de um SPM (Wiesendanger, 1994; Nanoscope Command Reference Manual, 1997; Multimode TM SPM Instruction Manual, 1996, Lindsay, 2000).

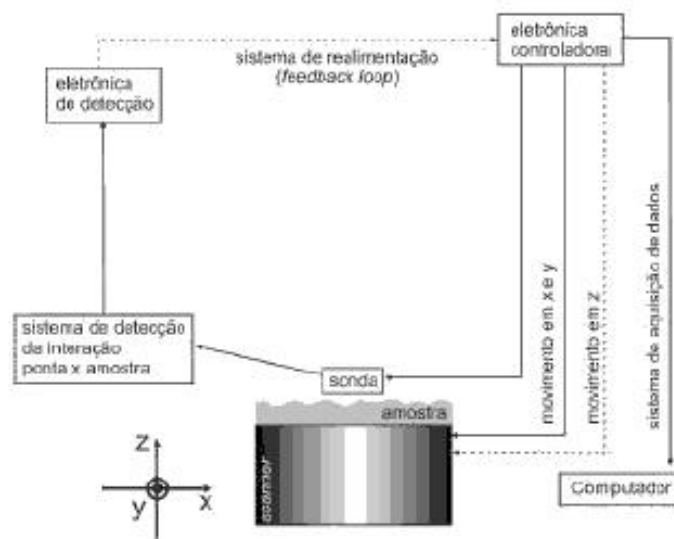


Figura 2.17. Componentes básicos de um SPM.

Desde a proposta do STM, foram desenvolvidos inúmeros SPM's. Entre 1981 a 1991, 20 tipos diferentes foram desenvolvidos. Assim, pelo menos 20 tipos diferentes de interações entre a ponta de prova e a superfície da amostra podem ser monitoradas. Essa versatilidade permite que os SPM's sejam utilizados nas mais diversas áreas do conhecimento, como por exemplo, ciência de materiais, biologia, física, química, metrologia etc. Um ponto adicional notável é que esses microscópios podem ser operados nos mais diversos meios ambientes: em vácuo, em atmosfera ambiente, em líquidos, como por exemplo, em análises biológicas, em estudos *in situ* de reações eletroquímicas, etc. Ao contrário dos microscópios eletrônicos, capazes de realizar somente medidas no plano da superfície da amostra, os SPM's são capazes, também, de realizar medidas na direção perpendicular ao plano da superfície (relevo da superfície). A resolução de imagens, adquiridas com SPM's, varia tipicamente de 0,1 a 10 nm no plano da superfície e pode ser

menor que 0,1 nm na direção perpendicular a esse plano. São várias as aplicações do SPM, dentre elas destacam-se (Colton, 1998):

- Investigação da estrutura de moléculas agregadas em superfícies, incluindo moléculas biológicas tais como DNA e proteínas;
- Exploração das propriedades superficiais de reações químicas *in situ* em superfícies, em líquidos, polímeros, e dentro de células vivas;
- Delineamento e medição das dimensões de domínios elétricos de dispositivos semicondutores, tais como junções p-n, portas MOS e regiões de depleção, monitorando capacitância ou força eletrostática;
- Arranjo de átomos em estruturas tridimensionais e fabricação de fios de nanocristais de silício;
- Medição da fricção interna e o módulo dinâmico de volumes nanométricos em função da temperatura para derivar uma nova compreensão de transições de fase em materiais multifásicos tais como blendas poliméricas e compósitos;
- Investigação de materiais funcionais de filmes finos orgânicos tais como heterojunções orgânicas utilizadas em células solares.

Um microscópio de tunelamento (STM) é capaz de resolver detalhes em superfícies de sólidos condutores em escala atômica. A superfície é varrida com um padrão de rastreamento por uma ponta metálica muito fina. A ponta é mantida afastada a uma distância constante  $d$  da superfície por toda a varredura. O movimento para cima e para baixo da ponta reflete a topografia da superfície. Para se manter a ponta a uma distância constante da amostra, a corrente de tunelamento entre a ponta e a amostra é monitorada e mantida constante. A corrente de tunelamento é gerada pela tensão  $V$  aplicada entre a ponta e a amostra. A corrente de tunelamento é uma corrente que passa através de um meio que não contém elétrons. Exemplos de tais meios incluem vácuo, um líquido não-polar ou mesmo uma solução aquosa de eletrólito. O mecanismo do fluxo de corrente por um meio isolante pode ser racionalizado pela mecânica quântica. As correntes de tunelamento tornam-se significativas quando dois condutores tem a forma de uma ponta aguda. No caso da ponta do microscópio de tunelamento, a magnitude da corrente de tunelamento  $I_t$  é dada aproximadamente por

$$I_t = Ve^{-Cd}$$

onde  $V$  é a tensão estática entre os condutores,  $C$  é uma constante característica da composição dos condutores e  $d$  é o espaçamento entre o átomo inferior da ponta e o átomo superior da amostra. Em um microscópio de tunelamento, a corrente de tunelamento é mantida constante por um mecanismo de realimentação que move a ponta para cima e para baixo de modo que  $d$  permaneça constante (Fig.2.18). O movimento da ponta é controlado por um transdutor piezelétrico. A corrente de tunelamento decresce exponencialmente com a separação entre a ponta e a amostra. Este decréscimo rápido na corrente com a distância faz com que a corrente de tunelamento seja significativa apenas para a separação ponta-amostra muito pequena e é responsável pela alta resolução conseguida na direção  $z$ . A Figura 2.19 mostra uma imagem gerada pelo STM (Bonnell, 1993; Tersoff, 1993; Skoog, 2002).

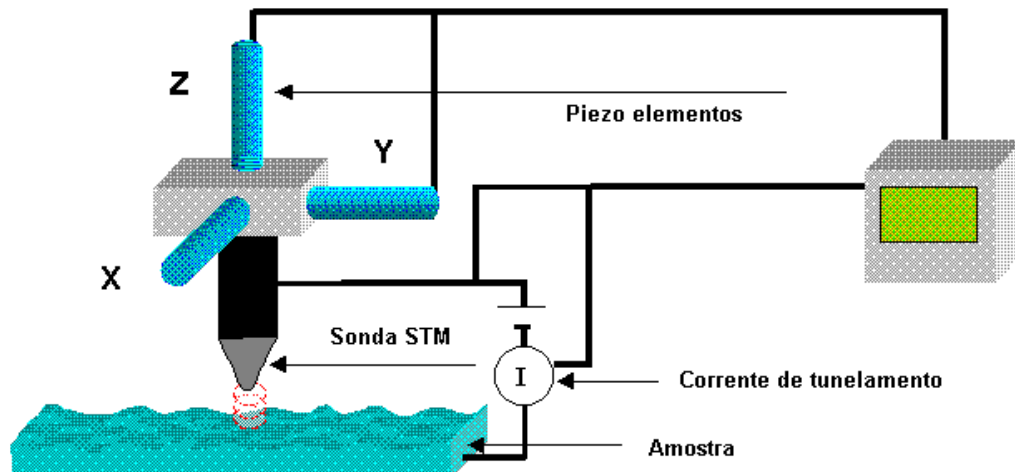


Figura 2.18. Componentes básicos de um STM.

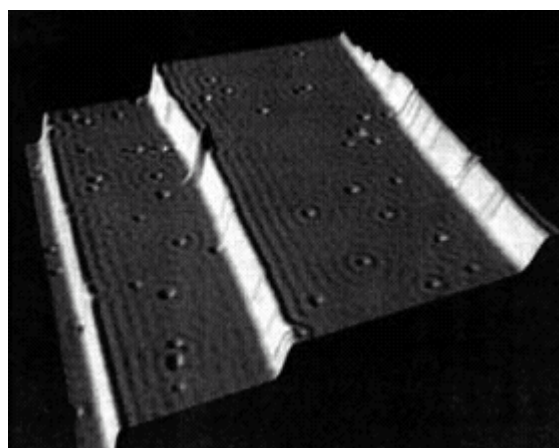


Figura 2.19. Imagem de 50 x 50 nm de uma superfície de Cu(111) a temperatura de 4 K. São visíveis três camadas monoatômicas e numerosos defeitos pontuais. Oscilações espaciais (ondas eletrônicas) com periodicidade de aproximadamente 1.5 nm são evidentes (Crommie, 1993).



O Microscópio de Força Atômico (AFM), um dos tipos de SPM, inventado em 1986, permite resolução de átomos individuais tanto em superfícies condutoras como em isolantes. Nesse método, uma alavanca flexível (haste) e sensível à força, munida de uma ponta (sonda) muito fina é deslocada com um padrão de rastreamento sobre a superfície da amostra. A força que age entre a alavanca e a superfície da amostra causa flexões diminutas da haste, que são detectadas por meios óticos (feixe de laser) (Fig.2.20) (Fukui, 1992; Skoog, 2002).

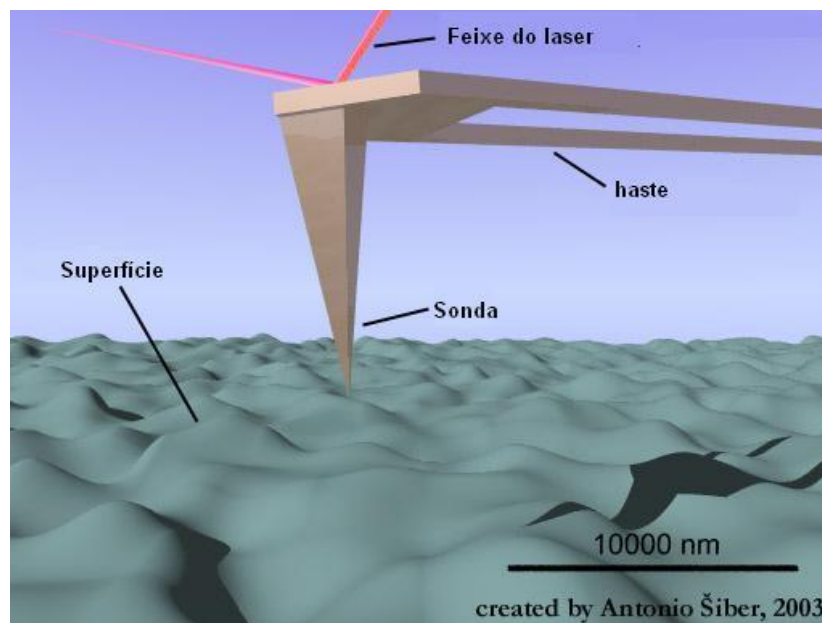


Figura 2.20. Representação tridimensional da interação da sonda com a amostra em um AFM (Antônio Šiber, 2003)

Como na microscopia de tunelamento, a movimentação da ponta, ou às vezes a amostra, é conseguida com um tubo piezelétrico. Durante uma varredura, a força na ponta é mantida constante pela movimentação para cima e para baixo da ponta, o que fornece a informação topográfica. Um feixe de laser é refletido de um ponto na haste para um fotodiodo segmentado que detecta o movimento da sonda. A saída do fotodiodo então controla a força aplicada à ponta, de modo que ela fica constante. Em outras palavras, o sistema de controle ótico é análogo ao controle de corrente de tunelamento no STM. O sistema de movimento é um dispositivo piezelétrico tubular que move as amostras nas direções x, y e z sob a ponta. O sinal do detector de feixe de laser é então realimentado ao transdutor piezelétrico da amostra, o que faz a amostra se mover para cima e para baixo para manter uma força constante entre a ponta e a amostra (Fig.2.21) (Binnig et al., 1986; Hansma, 1988; Baselt et al., 1993).

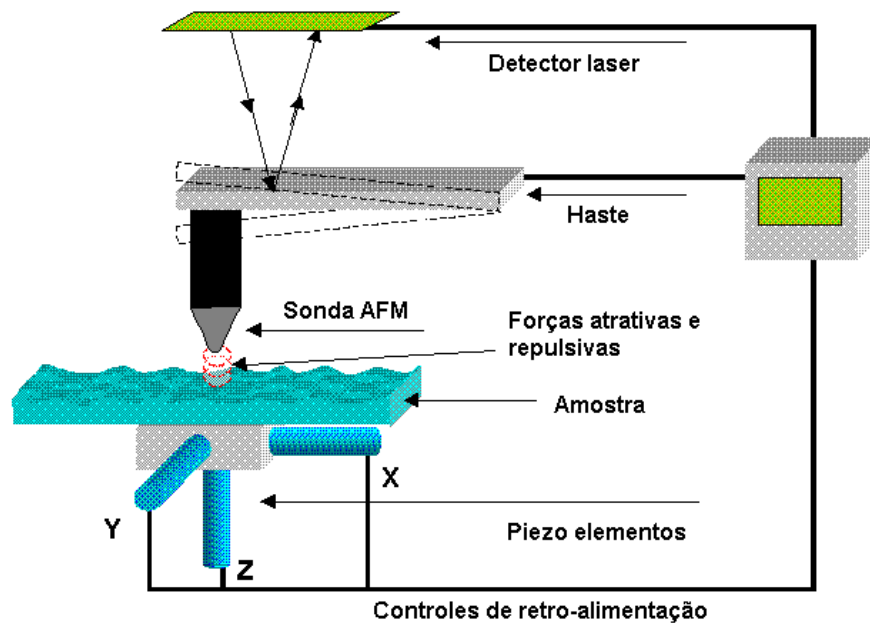


Figura 2.21. Componentes básicos de um AFM.

O desempenho de um microscópio de força atômica depende das características físicas da haste e da sonda ponta (sonda). O conjunto haste/sonda é produzido por corrosão de placas de silício (Si), óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) ou nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Tipicamente, as hastes têm poucas dezenas de micrometros de comprimento, menos de dez micrometros de largura e cerca de um micrometro de espessura. As pontas, com formatos de pirâmide ou cone têm uns poucos micrometros de altura e largura na base (Fig.2.22) (Albrecht, et al., 1990; Skoog, 2002).

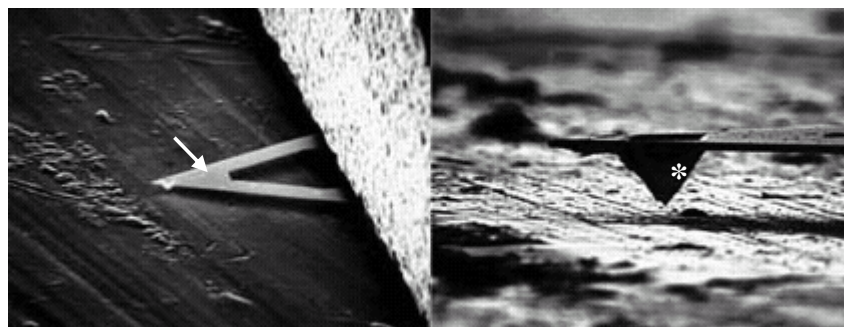


Figura 2.22. Detalhe da haste (seta) e sonda (asterisco) de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  fabricadas comercialmente para AFM (Weisenhorn, 1991).

Os modos de fazer as imagens, também chamados modos de varredura ou de operação, referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a sonda (ponteira) e a

amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. Estes modos de fazer imagens podem ser classificados em dois tipos: modo contato e modo não-contato, dependendo das forças líquidas que atuam entre a ponteira e a amostra. Quando o aparelho é operado na região atrativa, o método chama-se não-contato. Nesta região, a haste de AFM se enverga na direção da amostra. A operação na região repulsiva chama-se contato e a haste se dobra, afastando-se da amostra. No modo de não contato a haste é atraída pelas forças de capilaridade da camada de contaminação ou pelas forças de van der Waals (Eisenschitz, 1930), quando a amostra é limpa. No modo de contato, a deflexão do “cantilever” é na direção oposta à da amostra. Os efeitos de uma variedade de forças atuando entre ponta-amostra podem ser analisados, essas forças incluem as forças atrativas de van der Waals, forças magnéticas, e forças Coulombianas, de média para grandes distâncias, tipicamente  $\geq 100 \text{ \AA}$  (Esaki, 1999; Duarte, 2000).

Uma das desvantagens da varredura no modo de contato é que a sonda está em contato constante com a superfície da amostra e a força para baixo da ponta pode não ser pequeno o suficiente para evitar danos à superfície da amostra e distorção da imagem como consequência. Este é um problema importante para amostras macias, como biológica, polímeros e mesmo alguns materiais aparentemente duros, como placas de silício. O problema de dano da superfície pode ser evitado por um processo no qual a ponta entra em contato com a superfície por apenas um curto intervalo de tempo, periodicamente, e então é removida da superfície. Neste método de operação, chamado modo intermitente (em inglês, “Tapping mode”), a haste oscila em uma frequência de algumas centenas de quilohertz. A oscilação é obtida por uma força constante e a amplitude é monitorada continuamente. A haste é posicionada de modo que a sonda toque a superfície apenas na parte inferior de cada ciclo de operação. Esta técnica permite a obtenção de imagens de materiais que são inviáveis no modo de contato. A Figura 2.23 apresenta alguns exemplos de imagens feita no modo de contato e intermitente (Strausser, 1994).

Além de gerar imagens (análise topográfica), o AFM permite obter informações a partir da dependência com a distância das forças de interação medidas (análise não topográfica). O estudo da relação entre força e distância chama-se espectroscopia de força. Basicamente, determina-se a curva de força em função da distância em um local determinado sobre a superfície da amostra. A partir das curvas de deflexão da haste em função da aproximação da amostra, podem-se determinar as curvas de força em função da distância entre a ponta e a superfície da amostra, para cada ponto. Então, querendo estudar uma propriedade física em particular, extraída das curvas de forças locais, os dados podem ser

representados graficamente em função da localização na superfície, fornecendo assim um mapa resolvido espacialmente para tal propriedade. A Figura 2.24 mostra a relação entre a curva força/distância e os modos de operação de AFM (Hartmann, 1991; Tansock e Williams, 1992; Cross, et al., 1998; Gotsmann, 1999).

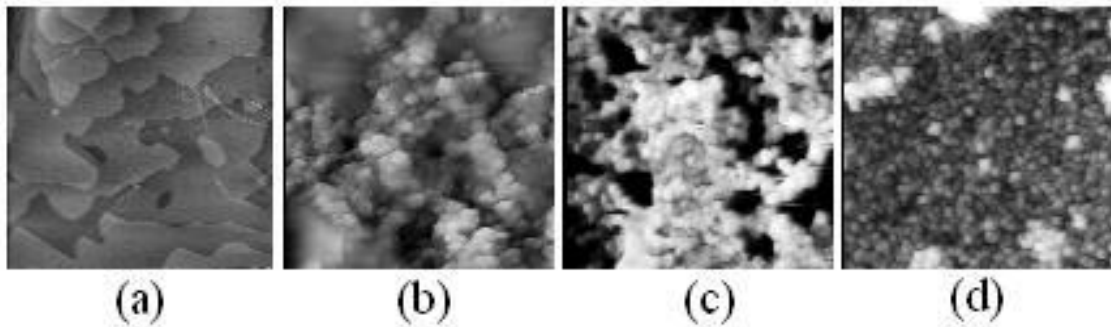


Figura 2.23. Imagens de AFM da superfície de diferentes materiais: planos cristalinos de um cristal do aminoácido L-Alanina, no modo de contato (a); Biofilme de salmonela, no modo intermitente (b) Nanocristais de aragonita de uma concha de mexilhão, no modo intermitente (c); Cristais de um filme de  $\text{SnO}_2$ , no modo de contato (d). As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Atômica, da Universidade Federal do Ceará, pelo autor da presente tese.

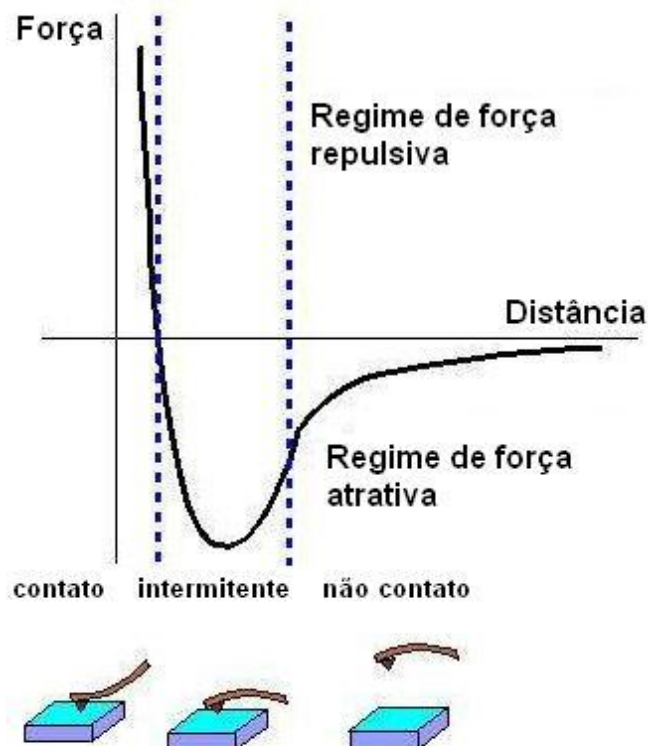


Figura 2.24. Gráfico de distância entre ponta e superfície versus a força de interação com amostra e a relação com modos de operação e a curva de força/distância no AFM.

Os microscópios de varredura por sonda (Fig.2.25) têm uso em uma série de áreas. No campo dos semicondutores, têm sido usados para caracterização de superfícies de silício e defeitos nessas superfícies, bem como na obtenção de imagens de domínios magnéticos em matérias magnéticas; na biotecnologia, para imagens de materiais como DNA, cromatina, interações proteína/enzima, membrana de vírus e bactérias, ação de antimicrobianos sobre a superfície de biofilmes, dentre outras. Permite o estudo da superfície de amostras biológicas em meio líquido (como água e solução tampão), reduzindo sensivelmente a influência da técnica de preparação de amostras na caracterização da superfície. Também possibilita a identificação da posição de grupos funcionais na superfície de substratos por meio da imobilização na sonda, de compostos com capacidade de interação com estes substratos (funcionalização da ponta) (Morris et al., 2001; Skoog, 2002).



Figura 2.25. Moderno microscópio de varredura por sonda (Laboratório de Microscopia Atômica do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará).

## 2.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica muito utilizada para a análise de compostos orgânicos. A região do infravermelho do espectro eletromagnético cobre a faixa logo após o visível ( $7,8 \times 10^{-7}$  m) até aproximadamente  $10^{-4}$  m, mas apenas a porção média de  $2,5 \times 10^{-6}$  m a  $2,5 \times 10^{-5}$  m é mais utilizada em química orgânica. Os comprimentos de onda dentro da região do infravermelho são geralmente dados em micrometros, e as frequências são dadas em números de onda preferencialmente em hertz. O número de onda é o recíproco do comprimento de onda em centímetros e, portanto, expresso em unidades de  $\text{cm}^{-1}$ . Assim, a região útil do infravermelho é a partir de 4000 até  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Por que uma molécula orgânica absorve em alguns comprimentos de onda de radiação infravermelho, mas outras não? Todas as moléculas têm uma certa quantidade de energia distribuída por toda a sua estrutura, provocando o estiramento e contrações das ligações, ou provocando a movimentação dos átomos para trás e para frente, entre outras vibrações moleculares. A quantidade de energia que uma molécula contém não é continuamente variável, mas ela é quantizada. Isto é, a molécula pode se estirar ou se deformar apenas a uma frequência específica, correspondendo a um nível de energia específico. Quando uma molécula é irradiada com radiação eletromagnética, a energia é absorvida se a frequência da radiação corresponde à frequência da vibração. O resultado dessa absorção de energia é um aumento da amplitude para a vibração. Com cada frequência absorvida pela molécula corresponde a um movimento molecular específico, podemos conhecer os tipos de movimentos que uma molécula possui pela medida de seu espectro na região do infravermelho. Pela interpretação desses movimentos, podem-se descobrir quais tipos de ligação (grupos funcionais) estão presentes na molécula (McMurray, 2005).

A interpretação completa de um espectro na região do infravermelho é difícil por que a maioria das moléculas são tão grandes que possuem dezenas de movimentos diferentes de estiramento e deformações angulares das ligações. Assim, um espectro da região do infravermelho contém dezenas de absorções. Em um certo sentido, essa complexidade é válida por que um espectro na região do infravermelho serve como uma impressão digital rara de um composto específico. Na verdade, a região complexa do espectro no infravermelho a partir de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  até próximo de  $400 \text{ cm}^{-1}$  é chamada região de impressão digital. Se dois



compostos possuem espectros no infravermelho idênticos, são quase certamente idênticos (McMurray, 2005).

Felizmente, não se necessita interpretar por completo um espectro na região do infravermelho para obter informações estruturais úteis. A maioria dos grupos funcionais possui bandas de absorção características no infravermelho, que não mudam de um composto para outro. A absorção C=O de uma cetona está quase sempre na faixa de 1680 a 1750  $\text{cm}^{-1}$ ; a absorção O-H de um álcool está quase sempre na faixa de 3400 a 3650  $\text{cm}^{-1}$ ; a absorção C=C de um alceno está quase sempre na faixa de 1640 a 1680  $\text{cm}^{-1}$ ; e assim por diante. Aprendendo onde as absorções dos grupos funcionais característicos ocorrem, é possível obter informação estrutural e composicional a partir do espectro no infravermelho (McMurray, 2005).

Três tipos de instrumentos para medidas de absorção infravermelha estão disponíveis por fornecedores comerciais: (1) espectrômetros dispersivos de rede, que são usados principalmente para trabalho qualitativo; (2) instrumentos multiplexados, empregando transformada de Fourier, que são apropriados tanto para medidas qualitativas como para quantitativas; e (3) fotômetros não-dispersivos que foram desenvolvidos para determinações quantitativas de uma variedade de espécies orgânicas na atmosfera por espectroscopia de absorção, emissão e reflectância (Skoog, 2002).

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (em inglês, “Fourier Transform Infrared” ou FT-IR, como é mais conhecida) foi desenvolvida inicialmente por astrônomos no início dos anos 50, para estudar os espectros infravermelhos de estrelas distantes; somente com o uso da técnica Fourier os sinais muito fracos dessas fontes podiam ser isolados do ruído ambiental. As primeiras aplicações químicas da FT-IF eram para as radiações de baixa energia do infravermelho distante; no final dos anos 60, já estavam disponíveis comercialmente instrumentos para estudos químicos tanto na região infravermelho distante (10 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) quanto na região infravermelho próximo e médio (Skoog, 2002).

Existem várias vantagens no uso de instrumentos para FT-IR (Fig. 2.26). A primeira é a eficiência de transporte, que é obtida porque os instrumentos com transformada de Fourier possuem poucos elementos ópticos e nenhuma fenda para atenuar a radiação. Como consequência, a potência da radiação que incide no detector é muito maior que em instrumentos dispersivos, e são observadas relações sinal-ruído muito melhores. A segunda vantagem é seu alto poder de resolução e reprodutibilidade do comprimento de onda, que torna possível a análise de espectros complexos nos quais o número de linhas estreitas e a

superposição espectral tornam difícil a interpretação dos espectros individuais. A terceira vantagem vem do fato de que todos os elementos da fonte atingem o detector simultaneamente. Essa característica possibilita a obtenção de dados para um espectro inteiro em um segundo ou menos (Skoog, 2002). A Figura 2.27 mostra um espectro típico produzido por uma análise por FT-IR.



Figura 2.26 Espectrômetro FT-IR da Perkin Elmer

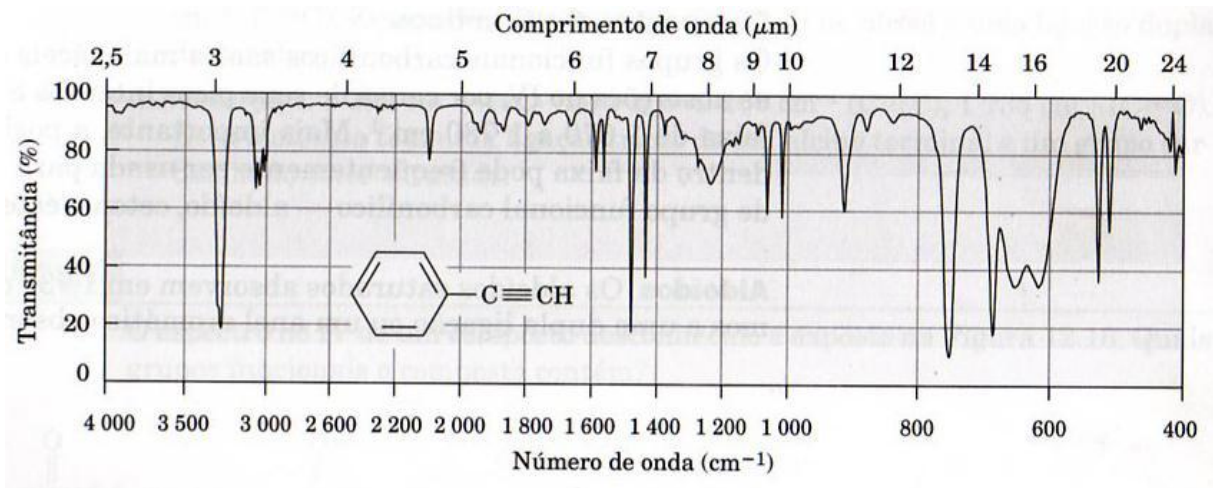


Figura 2.27 Espectro de FT-IR do fenilacetileno

## 2.7 DUREZA

Uma propriedade que pode ser importante considerar é a dureza, que é a medida da resistência de um material a uma deformação mecânica localizada (por exemplo, uma pequena impressão ou risco). Os primeiros ensaios de dureza eram baseados em minerais



naturais, com uma escala construída unicamente em função da habilidade de uma material em riscar um outro mais macio. Foi desenvolvido um sistema qualitativo, e um tanto arbitrário, de indexação da dureza conhecido por escala de Mohrs, que varia entre 1, na extremidade macia da escala, para o talco, até 10, para o diamante. Técnicas quantitativas para a determinação da dureza foram desenvolvidas ao longo dos anos, nas quais um pequeno penetrador é forçado contra a superfície de um material a ser testado, sob condições controladas de carga e taxa de aplicação. Faz-se a medida da profundidade ou do tamanho da profundidade da impressão resultante, a qual por sua vez é relacionada a um número índice de dureza; quanto mais macio o material, maior e mais profunda é a impressão e menor é o número índice de dureza. As durezas medidas são apenas relativas (ao invés de absolutas), e deve-se tomar cuidado ao se comparar valores determinados segundo técnicas diferentes. Os ensaios de dureza são realizados com mais freqüência do que qualquer outro ensaio mecânico por diversas razões: são simples e baratos; são não destrutivos; e outras propriedades mecânicas podem, com freqüência, ser estimadas a partir de dados obtidos para ensaios de dureza, tais como o limite de resistência a tração.

Existem diversas técnicas para a análise de dureza (também denominado ensaio), conforme o tipo de penetrador utilizado. As principais são: Brinell, cujo penetrador é uma esfera de 10 mm em aço ou carbeto de tungstênio; Vickers e Knoop, com penetrador piramidal de diamante e Rockwell/Rockwell superficial, com o penetrador sendo esferas de aço com 1/16, 1/8, 1/4 e 1/2 polegada de diâmetro. Os ensaios Knoop e Vickers são chamados de ensaios de microdureza, já que normalmente as cargas aplicadas são na ordem de mN e o penetrador (piramidal) é muito pequeno, de modo que a impressão resultante precisa ser observada sob um microscópio. No caso da microdureza Vickers, o índice de dureza (dado em *HV*) é determinado pela seguinte relação:

$$HV = 1,854 \frac{P}{d_1^2}$$

onde *P* é a carga aplicada (Kg) e *d*<sub>1</sub> é a medida da diagonal da forma da impressão, em mm (Fig.2.28). A Figura 2.29 mostra um moderno equipamento para medidas de microdureza.

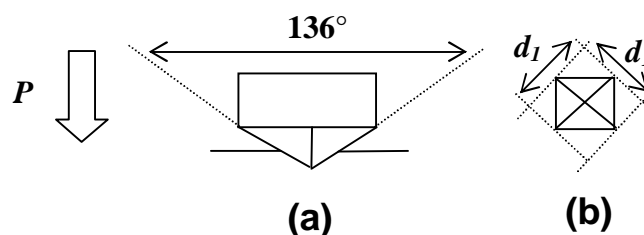


Figura 2.28. Forma de impressão do ensaio Vickers: vista lateral (a) e vista superior (b).



Figura 2.29. Microdurômetro Shimadzu modelo HMV-2.

## 2.8 ETAPAS GERAIS DE PROCESSOS ANALÍTICOS

Muitos problemas analíticos começam com perguntas que não são apropriadas para um experimento de laboratório. Por exemplo, “Esta água é própria para o consumo?”, “O teste de emissões em automóveis diminui a poluição do ar?” Ou ainda, “O que fazer com tanto lixo jogado fora?”. Todas estas perguntas passam pela utilização de métodos que permitam a caracterização dos materiais envolvidos. Um cientista traduz estas questões em termos de determinadas medições. Deve-se então escolher, ou mesmo desenvolver, um procedimento capaz de realizar estas medições (Harris, 2005).

Quando uma análise está completa, deve-se traduzir os resultados em termos que possam ser compreendidos por outras pessoas, preferencialmente o público em geral. Um aspecto muito importante de qualquer resultado está em suas limitações. Qual é a incerteza dos resultados apresentados? Se as amostras forem feitas de maneiras diferentes, os resultados serão os mesmos? Somente após a interpretação dos resultados e de suas limitações podem-se tirar conclusões e tomar decisões (Fresenius, 2000; Skoog, 2002; Harris, 2005).

As etapas gerais de um processo analítico podem ser resumidas como (Horwitz, 2000; Harris, 2005;):

**FORMULANDO A QUESTÃO:** Traduzir questões gerais em questões específicas acessíveis para serem respondidas por meio de métodos analíticos;

**SELECIONANDO OS PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS:** Pesquisar na literatura para encontrar procedimentos apropriados ou, se necessário, desenvolver novos procedimentos

para fazer as medições necessárias. Para selecionar o método analítico de forma inteligente, é essencial definir claramente a natureza do problema analítico. Tal definição requer respostas para as seguintes questões:

- 1) Que exatidão é necessária?
- 2) Qual é a quantidade de amostra disponível?
- 3) Qual é o intervalo de concentração do analito?
- 4) Que componentes da amostra causarão interferência?
- 5) Quais são as propriedades físicas e químicas da matriz da amostra?
- 6) Quantas amostras serão analisadas?

A resposta a questão 1 é de vital importância por que ela determina quanto tempo será necessário para realizar a análise. As questões 2 e 3 determinam quão sensível deve ser o método e a amplitude do intervalo de concentrações que deve ser usado. A resposta a questão 4 determina a seletividade requerida do método. As respostas à questão 5 são importantes porque alguns métodos analíticos são aplicáveis a soluções, outros a amostras gasosas enquanto outros a sólidos. O número de amostras a serem analisadas (questão 6) é também uma consideração importante do ponto de vista econômico. Além disso, se o número de amostras for grande, o método escolhido deverá requerer um tempo mínimo do operador por amostra. Por outro lado, se o que se pretende é analisar apenas umas poucas amostras, um método mais simples, mas que pode consumir mais tempo e que requeira pouco ou nenhum trabalho preliminar é frequentemente a escolha adequada.

**AMOSTRAGEM:** Amostragem é o processo segundo o qual o material representativo é selecionado para ser analisado. Se começarmos com uma amostra mal escolhida, ou se ocorrem modificações na amostra durante o intervalo de tempo entre a coleta e a análise, os resultados ficam sem significado.

**PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:** A preparação da amostra é o processo em que a amostra representativa é convertida em uma forma apropriada para o método analítico. Neste processo devem ser levadas em conta as possíveis impurezas presentes, bem como fatores ambientais como temperatura e umidade relativa, que podem afetar as características da amostra.

**ANÁLISE:** Utilizar a técnica analítica em várias porções idênticas. O objetivo das medidas repetidas é avaliar a incerteza na análise e se proteger contra um erro grosseiro na análise de uma única porção. A incerteza de uma medida é tão importante quanto a medida em si, pois

nos diz o quanto a medida é confiável. Se necessário, usam-se diferentes métodos analíticos, em amostras semelhantes, para ter certeza de que todos os métodos conduzem ao mesmo resultado e que a escolha de um método não influencia o resultado. Pode-se querer também preparar e analisar várias amostras brutas diferentes para verificar que variações surgem no procedimento de amostragem.

**RELATÓRIO E INTERPRETAÇÃO:** Produzir um relatório dos resultados que seja completo e claramente escrito, realçando quaisquer limitações especiais associadas a eles.

**CONCLUSÕES:** Uma vez escrito o relatório, o analista poderá ou não se envolver no que é feito com a informação. Quanto mais clara for a redação de um relatório, menor a probabilidade de que ele venha a se mal interpretado por aqueles que o usam. Boas conclusões só são tiradas de análises e interpretações bem feitas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fresenius, W. (1990). The Position of the Analyst as Expert: Yesterday and Today. *J. Anal. Chem.*, 368, 548.
- Horwitz, W. R. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th ed. Gaithersburg: AOAC International.
- Albrecht, T. R., Akamine, S., Carver, T. E. E Quate, C. F. (1990). Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope. *J. Vac. Sci. Technol. A*, 8, 3386-3396.
- ASTM international. (1989). *Advances in Characterization and Testing of Engineering Materials*. Special issue, *Advanced Materials and Processes*, November.
- Azaroff, L. F. (1968). *Elements of X-Ray Crystallography*. New York: McGraw-Hill.
- Baccan, N., Andrade, J. C., Godinho, O. E. S., Barone, J. S. (1979). *Química Analítica Quantitativa Elementar*. Campinas: Edgard Blucher.
- Baselt, D. R., Clark, S. M., Yongquist, M. G., Spence, C. F. e Baldeschwieler, J. D. (1993). Digital signal control of scanned probe microscopes. *Rev. Sci. Instrum.*, 64, 1874-1882.
- Binnig, G., Quate, C. F. e Gerber, Ch. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56 930.
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, Ch., Weibel, E. (1982). *Phys. Rev. Lett.*, 49, 57.
- Bish, L.D.;Howard, A.S. (1988). Quantitative Phase Analysis Using Rietveld Method. *J.Appl.Cryst.*, 21, 86-91.
- Black, J. G. (2002). *Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Blaedel, W. J. e Meloche, V. W. (1970). *Elementary quantitative analysis – theory and practice*. 2ªed. New York: Harper & Row publishers Inc.
- Bonnell, D. A. (1993). *Scanning Tunnelling Microscopy and Spectroscopy*. Weinheim: VCH.
- Bucherl, W. (1972). *Introdução às técnicas microscópicas: compêndio para pesquisadores, estudantes e madores*. 4ª ed. São Paulo: Polígono.
- Butler, E. P. e Hale, K. F. (1981). *Practical Methods in Electron Microscopy*. vol 9, New York: North-Holland.
- Cantor, C. R. e Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. San Francisco: Freeman.

- Charsley, E. L. e Warrington, S. B. (1992). *Thermal Analysis: Techniques and Applications*. UK: Royal Society of Chemistry.
- Colton, R. J. (1998). *Procedures in Scanning Probe Microscopies*. New York: Wiley.
- Crommie M F, Lutz C P and Eigler D M 1993 Imaging standing waves in a two-dimensional electron gas *Nature* 363 524
- Cross, G., Schirmeisen, A., Stalder, A., Grütter, P., Tschudy, M. e Dürig, U. (1998). Adhesion interaction between atomically defined tip and sample. *Phys. Rev. Lett.*, 80, 4685.
- Cullity, B. D. (1998). *Elements of X-Ray Diffraction*. 3rd. Massachusetts: Addison-Wesley.
- Fancio, E. (1999) Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Ford, J. L. e Timmins, P. (1989). *Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications*. England: Ellis Horwood.
- Gotsmann, B., Anczykowski, B., Seidel, C. e Fuchs, H (1999). Determination of tip-sample interaction forces from measured dynamic force spectroscopy curves. *Appl. Surf. Sci.*, 140, 314.
- Haines, P. J. (1995). *Thermal Methods of Analysis: Principles, applications and problems*. England: Blackie Academic.
- Hansma, P. K., Elings, V. B., Marti, O. e Bracker, C. E. (1988) Scanning tunnelling microscopy and atomic force microscopy: application to biology and technology. *Science*, 242, 209.
- Harris, D. C. (2005). *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC.
- Hartmann, U. (1991). Van der Waals interactions between sharp probes and flat sample surfaces *Phys. Rev. B*, 43, 2404.
- Hatakeyama, T. e Quinn, F. X. (1994). *Thermal Analysis: Fundamentals and Applications to Polymer Science*. England: John Wiley & Sons.
- Hemminger, W. e Hohme, G. (1984). *Calorimetry-Fundamentals and Practice*. Basel: Verlag-Chemie.
- Herman, B. e Jacobsen, K. (1990). *Optical Microscopy for Biology*. New York: Wiley
- Jacobs, J.A., Kilduff, T.F. (1997). *Engineering materials technology: structures, processing, properties & selection*. New Jersey: Prentice-Hall Inc.
- Lindsay, S.M. The scanning probe microscope in biology. In: Bonnell, D. (Ed.) (2000)., *Scanning Tunneling Microscopy and Related Techniques*. New York: Wiley
- Lutterotti, L.;Scardi, P. (1990). Simultaneous Structure and Size Strain Refinement by the Rietveld Method. *J.Appl.Cryst.*, 23, 246-252.

- Mackenzie, R. C. (1978). *Differential Thermal Analysis*. New York: Academic
- MacMurry, J. (2006). *Química Orgânica – Vol. 1*. São Paulo: Thomson.
- Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P. (2001). *Atomic Force Microscopy for Biologists*. UK: Imperial College Press.
- Mothé, C.G e Azevedo, A.D. (2002). *Análise térmica de materiais*. São Paulo: iEditora.
- Nanoscope Command Reference Manual, versão 4.22ce, Digital Instruments (1997).
- Pluta, M. (1988). *Advanced Light Microscopy, vol 1: Principles and Basic Properties*. Amsterdam: Elsevier.
- Reimer, L. (1993). *Transmission Electron Microscopy*. Berlin: Springer
- Reimer, L. (1998). *Scanning Electron Microscopy*. Berlin: Springer.
- Richardson, N. V. e Bradshaw A. M. (1981). *Electron Spectroscopy: Theory, Techniques and Applications*. vol 4. London: Academic.
- Rose, A. (1973). *Vision, Human and Electronic*. New York: Plenum.
- Skoog, D.A., Holler. F.J., Nieman, T.A. (2002). *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman.
- Smothers, W. J. e Chiang, Y. (1974). *Differential Thermal Analysis: Theory and Practice*. New York: Chemical Pub.
- Speyer, R. F. (1994). *Thermal Analysis of Materials*. New York: Marcel Dekker.
- Strausser, Y. E. and Heaton, M. G. (1994). *Amer. Lab.*, 4, 20.
- Tansock, J. e Williams, C. C. (1992). Force measurement with a piezo-electric cantilever in a scanning force microscope. *Ultramicroscopy*, 42-44, 1464-1469.
- Tersoff, J. (1993). *Theory of scanning tunneling, microscopy scanning tunnelling microscopy and Spectroscopy*. Weinheim: VCH.
- Weisenhorn, A. L. (1991). PhD Thesis University of California, Santa Barbara.
- Wendlandt, W. W. (1986). *Thermal Analysis*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Wiesendanger, R. (1994). *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Williams, D. B. e Carter, C. B. (1996). *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Material Science*. New York: Plenum.
- Young, R.A. (1994). *School of Physics: Using Rietveld Method*. Atlanta: Georgia Institute of Technology.
- Young, R.A. (1995). *The Rietveld Method*. New York: Oxford University Press Inc.
- Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects I. *Physica*, 9, 686.

Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects II. *Physica*, 9, 974.



---

---

## TRATAMENTO DE DADOS ANALÍTICOS

---

---

### 3.1 INTRODUÇÃO

Todos os métodos analíticos geram dados como resultados das medidas realizadas. Se estes dados representam ou não uma informação relevante dependerá de sua confiabilidade. Confiabilidade é a credibilidade apresentada pelos dados coletados. Conceitos como precisão, exatidão e erro são importantes na avaliação desta confiabilidade. A repetição de um método de medida várias vezes indica a reprodutibilidade da medida. Quando uma mesma grandeza é medida através de métodos diferentes e os resultados concordam entre si, então a exatidão dos resultados passa a ser digna de confiança. Isto significa que os resultados estão próximos do real. Em todas as medidas estão associados erros (uns mais óbvios do que outros). Não é possível medir o valor “real” do que quer que seja, sendo assim, o melhor que se pode fazer é aplicar a técnica que a experiência indica ser a mais confiável. O conhecimento dos tipos de erros possíveis em um experimento pode auxiliar na escolha da técnica analítica mais adequada.

Uma vez garantida a confiabilidade dos dados, precisamos organizá-los, descrevê-los, analisá-los e interpretá-los de forma a utilizá-los como parâmetros de caracterização e comparação. Para esta tarefa, dispomos de métodos estatísticos. Em termos gerais, a estatística é um ramo do conhecimento científico que consiste num conjunto de processos que tem por objeto estudar um determinado fenômeno a partir das informações extraídas de dados referentes ao mesmo. Há três principais ramos na estatística: a descritiva, que envolve a organização e a sumarização de dados; a teoria da probabilidade, que proporciona uma base racional para lidar com situações influenciadas por fatores relacionados com o acaso; e por último, a teoria da inferência, que envolve análise e interpretação de amostras, possibilitando uma comparação sobre possíveis diferenças. A característica importante da estatística é o uso de modelos. Estes são versões simplificadas (abstrações) de algum problema ou situações reais. A característica fundamental de um modelo é o fato de reduzir uma situação complexa a uma forma mais simples e compreensível, focalizando a atenção apenas em alguns detalhes de uma dada situação e ignorando (talvez temporariamente) outros aspectos ou diminuindo-lhes

a ênfase. Os modelos se representam sob muitas formas diferentes. Há modelos verbais (palavras e sentenças), modelos gráficos, modelos numéricos (números e equações) e modelos físicos (tridimensionais) (Stevenson, 1981; Skoog et al., 2002; Harris, 2005).

### 3.2 CONFIABILIDADE

Os termos mais utilizados na análise de confiabilidade dos dados analíticos são a: precisão e exatidão.

**PRECISÃO:** é a medida da reprodutibilidade de um resultado. Representa a concordância entre os valores numéricos de duas ou mais repetições das medidas, ou medidas que tenham sido feitas exatamente do mesmo modo. Os termos estatísticos valor médio, desvio padrão, variância e coeficiente de variação são normalmente associados à precisão. Se uma grandeza for medida várias vezes e os valores forem muito próximos, a medida é precisa. Se os valores variarem muito, a medida não é muito precisa;

**EXATIDÃO:** refere-se ao quanto o valor de uma medida se aproxima de seu valor “real”. Na verdade, o único tipo de medida completamente exato é o da contagem de objetos. Todas as outras contêm erros e são apenas aproximações da verdade. A exatidão é um termo relativo, pois depende muito da necessidade e da dificuldade de um problema analítico. A exatidão é expressa pelo erro absoluto ou pelo relativo. O erro absoluto ( $e_a$ ) da média é dado pela expressão

$$e_a = x_{\text{médio}} - x_{\text{aceito}}$$

onde  $x_{\text{médio}}$  é o valor médio das medidas e  $x_{\text{aceito}}$  é o valor aceito para grandeza que está sendo medida. Já o erro relativo ( $e_r$ ) é o valor percentual de  $e_a$ , em relação a  $x_{\text{aceito}}$ , ou seja:

$$e_r = \frac{(x_{\text{médio}} - x_{\text{aceito}})}{x_{\text{aceito}}} \times 100$$

O erro absoluto é ainda composto pela soma de dois tipos de erro: o aleatório (ou indeterminado) e o sistemático (ou determinado).

**ERROS ALEATÓRIOS:** resultam dos efeitos de variáveis que não estão controladas (e que talvez não possam ser controladas) nas medidas. A possibilidade de um erro aleatório ser positivo (para mais) ou negativo (para menos) é sempre a mesma. Ele está sempre presente e não podendo ser eliminado, apenas diminuído em um experimento realizado de forma adequada.

**ERROS SISTEMÁTICOS:** são erros que surgem devido a uma falha no projeto de um experimento ou a uma falha do equipamento ou operador. Têm um valor definido, uma causa determinável e são de mesmo sinal e magnitude para cada repetição de uma medida realizada do mesmo modo. Os erros sistemáticos podem ser instrumentais, pessoais e metodológicos. Nos erros instrumentais, as fontes típicas são circuitos problemas em circuitos eletrônicos, vazamentos em sistemas de vácuo, efeitos da temperatura em detectores, correntes induzidas nos circuitos oriundas de linhas de tensão 110/220V, calibração nos equipamentos de medidas, etc. São facilmente detectados e corrigidos por calibração com padrões adequados. A calibração e manutenção periódica dos equipamentos é uma forma de se evitar este tipo de erro. Os erros pessoais são aqueles introduzidos nas medidas pelo operador de um equipamento. Envolvem a apreciação do experimentador e das decisões que ele precisa tomar, além da operação inadequada de um equipamento ou execução incorreta de um procedimento. A maioria dos erros pessoais pode ser eliminada através de treinamento e do hábito de seguir os protocolos corretos para determinada técnica. Finalmente, os erros metodológicos são freqüentemente induzidos pelo comportamento não-ideal, físico e químico, dos reagentes e das reações nas quais a análise está baseada. Fontes possíveis deste tipo de erro incluem lentidão ou não-efetivação completa de reações químicas, perdas por volatilização, adsorção do analito em sólidos, instabilidade dos reagentes, contaminantes e interferências químicas (Skoog et al., 2002; Harris, 2005).

### 3.3 PRINCÍPIOS DE ESTATÍSTICA

Erros aleatórios fazem com que os resultados de medidas analíticas sejam distribuídos aleatoriamente. Sendo assim, são convenientemente tratados por meio de métodos estatísticos. Para a aplicação correta dos métodos estatísticos, o conhecimento de alguns princípios de estatística fazem-se necessários.

### 3.3.1 RESUMO DE DADOS ESTATÍSTICOS

Os métodos estatísticos envolvem a análise e a interpretação de números. Estes números são designados por dados. Em sua forma não processada, os dados podem quase não ter sentido. O processamento de dados reduz a quantidade de detalhes, enfatizando os aspectos importantes dos dados. Ou seja, os dados se transformam em informações.

Os dados estatísticos se obtêm mediante um processo que envolve a observação ou a outra mensuração de itens. Tais itens chamam-se variáveis, porque originam valores que tendem a exibir certo grau de variabilidade quando se fazem mensurações sucessivas.

Os dados (ou variáveis) podem ser classificados em 4 tipos:

**DADOS CONTÍNUOS:** podem assumir qualquer valor num intervalo contínuo. Estes são os dados típicos gerados pelos métodos estatísticos;

**DADOS DISCRETOS:** assumem valores inteiros. É o resultado da contagem do número de itens;

**DADOS NOMINAIS:** surgem quando se definem categorias e se conta o número de observações pertencentes a cada categoria;

**DADOS POR POSTOS:** consistem de valores relativos atribuídos para denotar ordem.

As medidas de tendência central são usadas para indicar um valor que tende a tipificar, ou a representar melhor, um conjunto de números. As medidas mais usadas são:

**MÉDIA ARITMÉTICA (OU SIMPLEMENTE MÉDIA):** definida pela seguinte expressão:

$$X_m = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

onde  $X_m$  é o valor médio de um conjunto de medidas,  $X_i$  o valor da  $i$ 'ésima medida e  $n$  o número total de medidas. Esta medida de tendência central supõe que cada medida tem a mesma importância. A média é influenciada por cada valor de um conjunto de medidas, inclusive os extremos.

**MÉDIA PONDERADA:** média na qual são atribuídos “pesos” ou importâncias diferentes para cada medida. É definida pela seguinte expressão:

$$X_m = \frac{\sum_{i=1}^n w_i X_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

onde  $w_i$  é o “peso” da  $i$ ’ésima medida;

**MEDIANA:** é uma medida cuja característica principal é dividir um conjunto ordenado de dados em dois grupos iguais; a metade terá valores inferiores à mediana, a outra metade terá valores superiores à mediana. A mediana é relativamente insensível aos valores extremos;

**MODA:** é o valor que ocorre com maior frequência em um conjunto de medidas;

As medidas de dispersão de um conjunto de medidas indicam se os valores estão relativamente próximos ou afastados uns dos outros. Existem quatro medidas básicas de dispersão:

**INTERVALO:** é expresso como a diferença entre o maior e o menor valor de um conjunto de medidas ou pela identificação destes números;

**DESVIO MÉDIO ABSOLUTO:** mede o desvio médio dos valores em relação à média do conjunto, ignorando o sinal do desvio. Sua expressão é a seguinte:

$$DMA = \frac{\sum_{i=1}^n |X_i - X_m|}{n}$$

onde  $DMA$  é o desvio médio absoluto de um conjunto de medidas.

**VARIÂNCIA AMOSTRAL:** é a média dos quadrados dos desvios dos valores a contar da média, utilizando-se  $n-1$  ao invés de  $n$ . Sua expressão é:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X_m)^2}{n-1}$$

onde  $s^2$  é a variância de um conjunto de medidas.

**DESVIO PADRÃO AMOSTRAL:** é a raiz quadrada positiva da variância, ou seja:

$$s = \sqrt{s^2}$$

Os dados estatísticos podem ser apresentados de diversas formas. A representação mais utilizada é a distribuição de frequência. Uma distribuição de frequência é um agrupamento de dados em classes (arranjo ou disposição de itens em subconjuntos que apresentam características similares), exibindo o número ou percentagem de observações em cada classe (frequência). A forma gráfica de representação de uma distribuição de frequência é denominada histograma (Fig.3.1) (Afifi e Azen, 1971; Stevenson, 1981; Mendenhall et al., 1990; Freund, 1998).

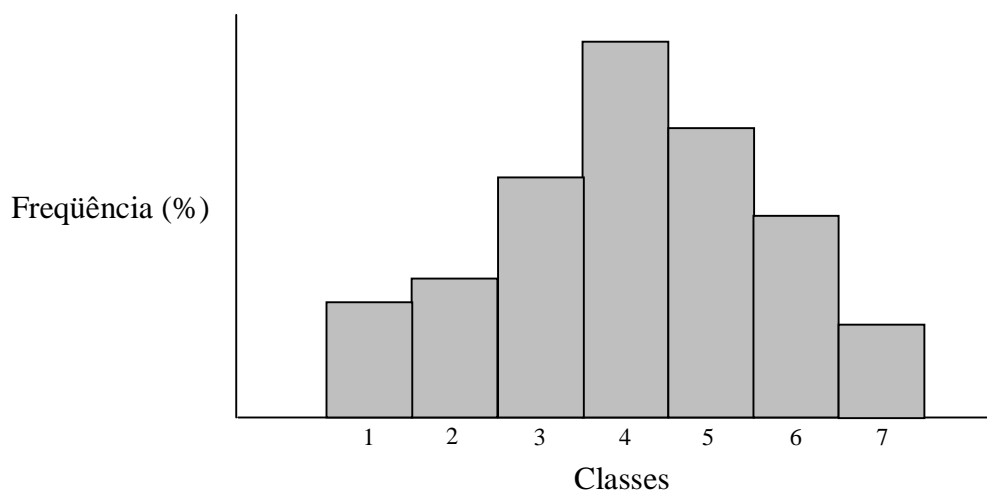


Figura 3.1. Histograma típico de uma distribuição de frequência.

### 3.3.2 DISTRIBUIÇÕES DE PROBABILIDADE

Quando executamos a repetição das medidas de um experimento, se admitirmos que os mesmos fatores atuem de forma análoga, constatamos que existe uma possibilidade de predição “em longo prazo”. Ou seja, certos resultados podem ser mais prováveis que outros, para um grande número de repetições.

Uma variável aleatória é uma função com valores numéricos determinados por fatores do acaso. As variáveis aleatórias podem ser discretas ou contínuas. São discretas se tomam valores que podem ser contados, como por exemplo, número de lâmpadas defeituosas

em um dia de produção, número de defeitos em camisas, número de terremotos, etc...São contínuas quando podem assumir qualquer valor em determinado intervalo, como por exemplo, pesos de caixas de maçãs, o diâmetros de hemácias, tempos de quebra da rigidez dielétrica de capacitores, alturas da população de Fortaleza, etc.

O valor esperado de uma variável aleatória em um experimento é uma média, determinada pela seguinte relação:

$$E( X ) = \sum_{i=1}^n p_i X_i$$

onde  $E(X)$  representa o valor esperado da variável aleatória  $X$  e  $p_i$  a probabilidade correspondente ao valor  $X_i$  da variável aleatória  $X$ .

Uma distribuição de probabilidade é uma distribuição de freqüências relativas (ou probabilidades) para os resultados possíveis para uma variável aleatória (espaço amostral). As distribuições de probabilidade proporcionam um método simples para a determinação de certas probabilidades além dos tipos de distribuição poderem ser considerados como modelos para descrever situações que envolvem resultados gerados pelo acaso. A essência da análise estatística é confrontar as hipóteses de uma distribuição de probabilidades com as especificações de determinado problema. As distribuições de probabilidade podem ser classificadas como discretas e contínuas. Nas distribuições contínuas, as variáveis aleatórias envolvidas são aquelas associadas a dados que podem ser contados. Já as distribuições contínuas de probabilidade são usadas tanto para descrever variáveis aleatórias contínuas como para aproximar variáveis discretas em certos casos.

Para as distribuições discretas, podemos definir uma função (de massa) de probabilidade  $P(X_i)$  de uma variável aleatória  $X$ , que assume valores num conjunto discreto  $\{X_1, X_2, \dots\}$ .  $P(X_i)$  é uma função que associa a cada  $X_i$  a sua probabilidade de ocorrência.

No caso de distribuições contínuas, como uma variável aleatória contínua pode assumir (teoricamente) infinitos valores, a “massa” de probabilidade em cada ponto é zero. Por isso, a definição utilizada para função distribuição para distribuições discretas precisa ser adaptada a esta situação. Para isto define-se a função distribuição de probabilidade  $F(x) = P(X \leq x)$  com as seguintes propriedades:

- $0 \leq F(x) \leq 1$ , para todo  $x \in \mathfrak{R}$ ;
- $F(x)$  é uma função contínua não-decrescente em  $x$ ;



$$\bullet \quad F(x) = \int_{-\infty}^x f(u)du$$

onde  $f(x)$  é chamada função densidade de probabilidade.  $f(x)$  tem as seguintes propriedades:

- $f(x) \geq 0$ ;
- $\int_{-\infty}^{+\infty} f(u)du = 1$

A função distribuição será contínua em todo número real contrastando com a forma “em escada” característica para variáveis discretas. A ausência de descontinuidades indica que a “massa” de probabilidade é zero para todo  $x$ . Portanto, no caso de distribuições contínuas de variáveis aleatórias, o cálculo de probabilidades somente terá sentido para intervalos em  $\Re$  em contraste com probabilidades pontuais do caso discreto. Isto significa que o cálculo de áreas sob a função densidade  $f(x)$  resulta em probabilidades:

$$P(a < X \leq b) = \int_a^b f(x)du = F(b) - F(a)$$

Existem diversos tipos de distribuições de probabilidade, tanto discretas como contínuas. Entretanto, a que ocupa um papel de destaque na análise estatística de dados é a distribuição contínua normal ou Gaussiana, pois ela representa uma boa aproximação às distribuições de frequência encontrada em fenômenos físicos. Admite-se que os erros indeterminados em medidas seguem a lei da distribuição normal (Fletes e Campos, 1985; Mendenhall et al., 1990; Freund, 1998; Magalhães, 2001).

### 3.3.3 DISTRIBUIÇÃO NORMAL

A curva de distribuição normal apresenta determinadas características bem definidas. Tem a forma de sino; é simétrica em relação à média; estenda-se de  $-\infty$  à  $+\infty$ ; fica completamente determinada pelo seu valor médio ( $m$ ) e desvio padrão ( $s$ ) da população; sua área total é considerada 100%; a área sob a curva entre dois pontos é a probabilidade de uma variável normalmente distribuída tomar valores entre estes dois pontos; as probabilidades se referem sempre a intervalos de valores e não a um único valor; a área sob a curva entre a média e um ponto arbitrário é uma função do número de desvios padrões entre a média e aquele ponto (Fig.3.2). Sua função densidade de probabilidade é:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-(x-\mu)^2 / (2\sigma^2)}$$

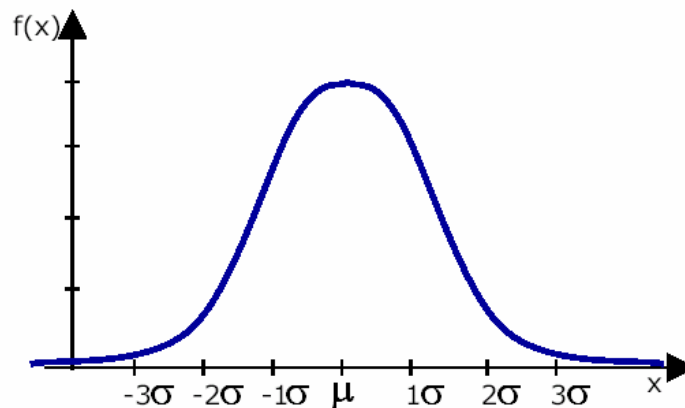


Figura 3.2. Representação gráfica da distribuição normal.

A integração da  $f(x)$  entre limites especificados fornece a probabilidade entre estes limites. Em particular, se os limites forem de  $-\infty$  à  $+\infty$ , tem-se a probabilidade total igual a 1 (100%). Se uma variável tem distribuição normal, cerca de 68% de seus valores estarão no intervalo de um desvio padrão a contar de cada lado da média; cerca de 95,5% no intervalo de dois desvios padrões a contar da média, e cerca de 99,7% dentro de três desvios padrões a contar da média. Isto é válido para todas as distribuições normais (Fig.3.3)

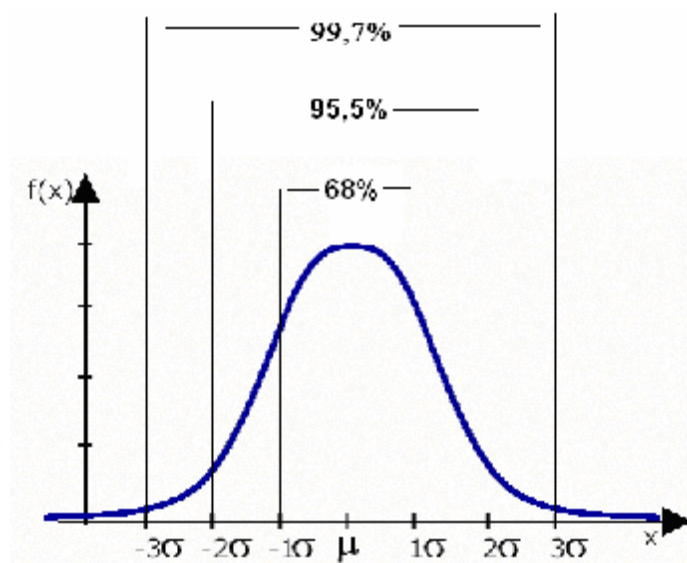


Figura 3.3. Fração aproximada da área sob a curva de distribuição normal entre os limites  $\pm 1s$ ,  $\pm 2s$  e  $\pm 3s$ .

Entretanto, é mais conveniente o uso do número de desvios padrões a contar da média ( $z$ ):

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

onde  $x$  é um valor arbitrário,  $m$  a média da distribuição normal e  $\sigma$  o desvio padrão. Valores de  $z$  positivo significam que os valores de  $x$  estão acima da média; se negativos, abaixo da média. As áreas da curva normal, a contar da média, para dados valores de  $z$  (Fig.3.4) são normalmente tabelados e facilmente encontrados em qualquer livro de estatística.

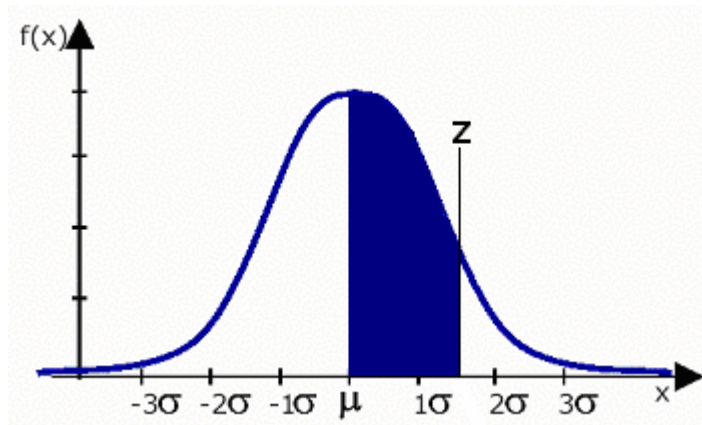


Figura 3.4. Área da curva normal padronizada entre a média e um valor de  $z$ .

Por exemplo, para  $z=1$  (um desvio padrão a contar da média, no sentido de valores maiores que  $m$ ), a área da curva normal entre  $m$  e  $\sigma$ , será de aproximadamente 0,34 (34%) e 0,68 (68%) entre  $-z$  e  $+z$ .

A distribuição normal é um modelo teórico, sendo assim, nenhum conjunto de dados oriundos de medidas se adequará completamente a este modelo. Entretanto têm se constituído como uma excelente aproximação dos dados experimentais (Youmans, 1973, Stevenson, 1981).

### 3.3.4 AMOSTRAGEM

Em estatística, população representa a totalidade ou universo de elementos em estudo. Amostra é uma parcela representativa deste grupo. A finalidade da amostragem é permitir fazer inferências sobre uma população a partir da amostra, já que na maioria dos casos, torna-se inviável um estudo completo da população. Evidentemente supõe-se que a

---

amostra represente a população de que foi extraída. Este objetivo é atingido quando a amostragem é aleatória. Para populações discretas (aquelas que envolvem variáveis discretas), uma amostra aleatória é aquela em que cada item da população tem a mesma probabilidade de ser incluído na amostra. Para populações contínuas (aquelas que envolvem variáveis contínuas), uma amostra aleatória é aquela em que a probabilidade de incluir na amostra qualquer intervalo de valores é igual à percentagem da população que está naquele intervalo.

No tratamento estatístico dos dados analíticos, assume-se que a quantidade de repetições dos resultados experimentais obtidos no laboratório (amostra) é uma fração diminuta do número infinito de resultados que, em princípio, poderiam ser obtidos se houvesse um tempo infinito e uma quantidade infinita de amostras (população). As leis estatísticas aplicam-se somente a populações; quando estas leis são aplicadas a dados analíticos obtidos em laboratório estamos assumindo que estes dados representam a população. Como não se pode afirmar com certeza que esta suposição é verdadeira, então as afirmações sobre erros aleatórios devem ser tratadas em termos de probabilidades (Stevenson, 1981; Soares et al., 1991).

### 3.3.5 DISTRIBUIÇÕES AMOSTRAIS

A finalidade da amostragem é obter uma indicação do valor de um ou mais parâmetros de uma população, como a média e o desvio padrão populacional que possuem determinada característica. As estatísticas amostrais que correspondem a esses parâmetros populacionais são usadas para aproximar os valores desconhecidos daqueles parâmetros. Desta forma, a média amostral é usada para estimar a média da população e o desvio padrão amostral para estimar o desvio padrão da população.

Quando se extraem várias amostras da mesma população, no caso de uma amostragem aleatória, há uma tendência de a estatística amostral variar de amostra para amostra e também em relação ao verdadeiro valor do parâmetro, em razão de fatores aleatórios associados a amostragem. Esta tendência é denominada de variabilidade amostral. Entretanto, pode-se demonstrar que para uma amostragem aleatória a variabilidade amostral pode ser descrita por distribuições de probabilidades, em particular a normal. Uma distribuição amostral é uma distribuição de probabilidades que indica até que ponto uma estatística amostral tende a variar devido a variações na amostragem aleatória. Quando a amostragem é aleatória, há uma elevada probabilidade de que a estatística amostral se aproxime do parâmetro populacional.

Uma distribuição amostral de médias é uma distribuição de probabilidade que indica quão prováveis são diversas médias amostrais. É uma função da média e do desvio padrão da população e do tamanho da amostra. Duas características importantes das distribuições amostrais devem ser consideradas. A primeira, é que a média de uma distribuição amostral é sempre igual à média da população e a segunda, é que o desvio padrão amostral decresce com o aumento no número de amostras.

Quando uma população é muito grande ou infinita, o desvio padrão da distribuição amostral da média ( $\sigma_m$ ) é dado por:

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

onde  $\sigma$  é o desvio padrão da população e  $n$  o tamanho da amostra (Stevenson, 1981; Skoog et al., 2002).

### 3.3.6 TEOREMA DO LIMITE CENTRAL

- Se uma população sob amostragem tem distribuição normal, a distribuição das médias amostrais também será normal para todos os tamanhos de amostra;
- Se a população básica é não normal, a distribuição de médias amostrais será aproximadamente normal para grandes amostras.

A capacidade de se fazer inferências em relação a uma população depende do conhecimento de sua distribuição amostral. O Teorema do Limite Central diz que não é necessário conhecer a distribuição de uma população para se fazer inferências sobre ela a partir de dados amostrais, desde que a amostra seja grande. Na prática, a amostra deve ter um tamanho de 30 ou mais observações (Freund, 1998).

### 3.3.7 ESTIMAÇÃO

Estimação é o processo que consiste em utilizar dados amostrais para estimar parâmetros populacionais desconhecidos. Qualquer característica de uma população pode ser estimada a partir de uma amostra aleatória. As estimativas podem ser pontuais, quando originam uma única estimativa do parâmetro; ou intervalares quando se especifica um intervalo de valores possíveis em se julga que o parâmetro populacional deva estar.

A capacidade de estimar parâmetros populacionais por meio de dados amostrais está associada diretamente ao conhecimento da distribuição amostral usada na estimativa. A distribuição de médias amostrais é normal ou aproximadamente normal quando se consideram erros não determinados em medidas analíticas. Sendo assim, ao fazer-se uma afirmativa de que a média está a menos de 1,96 desvio padrões a contar da média verdadeira, pode-se esperar estar certo 95% das vezes (área entre  $-1,96\sigma_m$  e  $+1,96\sigma_m$  na curva de distribuição normal), e errado 5%. Ou seja, esta afirmativa tem um nível de confiança de 95% (5% de erro ou 95% de certeza). Independente do nível de confiança adotado, não se pode dizer se determinada média amostral é menor, ou maior do que o valor desconhecido da média da população. Sendo assim, é utilizada uma atribuição probabilística do intervalo em que o valor verdadeiro possa estar. Denomina-se intervalo de confiança a um intervalo de valores, centrado na estatística amostral, no qual julga-se, com certa incerteza estatística determinada pelo nível de significância adotado, estar o parâmetro da população. No exemplo acima, o intervalo de confiança para o nível de confiança de 95% é de  $-1,96\sigma_m$  à  $+1,96\sigma_m$ .

A estimativa intervalar da média populacional se baseia na hipótese de que a distribuição das médias é normal. O método para se estimar a média de uma população depende de o desvio padrão ser conhecido ou não. Se o desvio padrão é conhecido, então a estimativa pontual da média será  $m = X_m$  e a estimativa intervalar será  $m = X_m \pm zS_m$ . O valor  $zS_m$  é normalmente denominado erro de estimação. Entretanto, para medidas onde está se considerando erros indeterminados, o desvio padrão da população não é conhecido. Sendo assim, algumas alterações devem ser feitas no cálculo do desvio padrão e do erro de estimação. Ao invés de se utilizar o desvio padrão da população  $S_m$  deve-se utilizar o da amostra  $s$  (que pode ser obtido experimentalmente) e substituir o parâmetro  $z$  pelo  $t$  definido como:

$$t = \frac{x - \mu}{S}$$

O parâmetro  $t$  normalmente é chamado  $t$  de student e está associado a distribuição  $t$ , que é a distribuição mais adequada quando se usa  $s$ . Na verdade, para grandes amostras, é razoável usar valores de  $z$  para aproximar valores  $t$ , muito embora a distribuição  $t$  seja sempre teoricamente correta quando não se conhece o desvio padrão da população, independentemente do tamanho da amostra. Também é importante salientar que a distribuição

$t$  só é teoricamente adequada quando a distribuição é normal. O desvio padrão das médias das amostras, neste caso, é mais conhecido como erro padrão da média ( $EP$ ), dado por

$$EP = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Assim, a estimativa pontual da média será  $m = X_m$  e a estimativa intervalar será  $m = X_m \pm tEP$ . O valor  $tEP$  é o erro de estimação (Stevenson, 1981; Harris, 2005).

### 3.3.8 TESTES DE SIGNIFICÂNCIA

Os testes de significância são testes estatísticos utilizados para avaliar uma afirmação sobre parâmetros populacionais. Em relação à afirmação, estabelecem-se duas hipóteses: a hipótese nula ou de nulidade ( $H_0$ ), onde a afirmação que o parâmetro populacional é tal como especificado é verdadeira; e a hipótese alternativa ( $H_1$ ), onde a afirmação é falsa. O nível de significância ( $\alpha$ ) de um teste é a probabilidade de uma hipótese nula ser rejeitada, quando verdadeira. O nível de confiança é igual a  $(1 - \alpha)$ . A escolha de um nível de significância implica em particionar a distribuição amostral adequada em regiões de aceitação (variação provavelmente casual) e de rejeição (variações provavelmente não casuais), em função de um valor  $z$  quando  $s$  é conhecido e  $t$  quando  $s$  é desconhecido (a maioria dos casos). Os valores de  $z$  ou  $t$  são chamados valores críticos. Calcula-se uma estatística de teste (um parâmetro determinado conforme o teste de significância adotado) com base nos dados amostrais e no valor alegado (esperado) que é então comparado com o valor crítico. Uma estatística de teste que exceda o valor crítico sugere a rejeição de  $H_0$ , não é a variabilidade amostral que corresponde à estatística observada; um teste inferior sugere que se aceite  $H_0$ . Assim, o teste de significância envolve:

- Formular a hipótese nula ou de nulidade;
- Escolher a distribuição amostral adequada. A maioria dos testes envolve a distribuição  $t$  (testes  $t$  de Student), pois não se conhece o desvio padrão da população e sim da amostra;
- Escolher o nível de significância e conseqüentemente o valor crítico;
- Rejeitar a hipótese de nulidade se a estatística teste excede o valor crítico; caso contrário, aceitá-la;

É muito importante que em todo o processo exista uma distribuição amostral baseada na premissa de que a afirmação é verdadeira. Indica até onde os resultados amostrais podem variar simplesmente em conseqüência de variação casual na amostra.



Normalmente em testes de significância de dados analíticos deseja-se responder a pergunta: dois ou mais conjuntos de dados apresentam a mesma média populacional? Ou seja, as diferenças são ou não devido à variabilidade amostral? A hipótese de nulidade ( $H_0$ ) é que as médias de duas ou mais populações são iguais (não existem diferenças significativas). Para responder a estas perguntas, normalmente usam-se os testes  $t$ -student e o ANOVA. Cada um delas gera uma estatística de teste que é comparada com o valor crítico. Também partem da suposição de uma distribuição normal para os dados amostrais.

O teste  $t$ -Student é um teste para médias e tem como objetivo avaliar informações sobre médias de populações. Emprega-se um teste de uma amostra se a afirmação diz respeito a uma única população; e um teste de duas amostras, quando a afirmação envolve duas populações. Se os grupos são independentes, usa-se o  $t$ -Student simples, caso contrário, o pareado. A afirmação é avaliada supondo que seja verdadeira e construindo uma distribuição amostral baseada naquela afirmação, que pode ser usada para avaliar determinado resultado amostral. As médias amostrais que resultam em pequenos desvios do valor esperado (alegado) são consideradas como devidas à variação casual na amostragem; grandes diferenças são consideradas indícios de que a afirmação não é verdadeira. O desvio padrão da distribuição amostral é usado como medida do desvio em relação ao valor esperado, e o nível de significância serve para determinar valores críticos que separam os resultados casuais dos não-casuais.

O teste ANOVA é um teste que utiliza a análise de variância para determinar se as médias de duas ou mais populações são iguais. Se os grupos são independentes, usa-se o ANOVA simples, caso contrário, ANOVA para medidas repetidas. O teste tem como base na extração de uma amostra de cada população. A hipótese de nulidade é que as médias das populações são todas iguais e a hipótese alternativa, é que as médias não são iguais. Se o teste estatístico (análise de variância) leva a aceitar a hipótese de nulidade, conclui-se que as diferenças observadas entre as médias amostrais são devidas as variações aleatórias na amostra e assim, que as médias amostrais são iguais (dentro do nível de significância adotado). No caso de rejeição da hipótese de nulidade, conclui-se que as diferenças entre as médias amostrais são demasiadamente grandes para serem devidas apenas à chance e assim, que as médias populacionais não são iguais. Quando as hipóteses básicas da análise de variância são satisfeitas, isto é, amostras independentes extraídas de populações normais com variâncias iguais, esta técnica é extremamente poderosa para testar a igualdade de médias amostrais. Se as variâncias populacionais são aproximadamente iguais, a hipótese das variâncias iguais é razoavelmente satisfeita. Entretanto, a análise de variância não testa a

hipótese de igualdade entre variâncias populacionais. Assim, quando as variâncias amostrais parecem diferir consideravelmente, deve-se fazer um teste diferente para a sua igualdade. Uma regra prática é que a maior variância amostral não exceda a dez vezes a menor variância amostral.

O teste ANOVA fornece a resposta a questão da existência ou não de diferenças significativas entre as médias de grupos amostrais. Entretanto, na maioria das vezes, precisamos saber em que amostras estas diferenças ocorrem. Para responder a esta nova pergunta, realizamos os testes para comparações múltiplas entre dois grupos (dois a dois), também conhecidos como testes pós ANOVA. Estes testes nos permitem identificar onde estão estas diferenças. Os principais testes de comparações múltiplas são o Fisher, Bonferroni, Sheffe e Tukey. O mais usado, por ser mais sensível, é o Tukey. Entretanto ele exige uma igualdade nos tamanhos amostrais (ou com pequena diferença). No caso das amostras diferirem muito em tamanho, utiliza-se o Sheffe.

Testes de significância como os *t*-Student e ANOVA pertencem à categoria dos chamados testes paramétricos. Testes paramétricos são os testes conduzidos em situações onde sabemos ou assumimos que uma teoria particular de distribuição é apropriada para representar os dados e/ou o teste estatístico. Na realidade, o termo paramétrico pode ser interpretado como sinônimo para “teórico” com respeito às distribuições de probabilidade. Em contraste, os testes não-paramétricos são conduzidos sem assumirmos qualquer particular forma teórica para aquela dada situação. Os mais conhecidos são Wilcoxon, Mann-Whitney, Friedman e Kruskal-Wallis (Scheffe, 1959; Stevenson, 1981; Pereira, 1999).

### 3.3.9 TESTE DE NORMALIDADE

A distribuição normal é uma das distribuições mais importantes na estatística. Os testes mais poderosos utilizados na inferência de dados analíticos, como o ANOVA, partem da suposição que a distribuição amostral é normal. Apesar do Teorema do Limite Central garantir a normalidade para um conjunto grande de amostras, nem sempre é possível seguir este critério em experimentos analíticos. Sendo assim, é importante o emprego de procedimentos que possibilitem testar se um conjunto de dados segue ou não uma distribuição normal, dentro de um nível de significância adotado. Os principais testes de normalidade (ou de aderência, como também são conhecidos) são o de Kolmogorov-Smirnov e o "W" de Shapiro-Wilk (IDL Statistical Library, 1992).

### 3.4 REJEIÇÃO DE RESULTADOS

Quando são feitas várias medidas de uma mesma grandeza, um resultado pode diferir consideravelmente dos demais. A questão é saber se este resultado deve ser rejeitado ou não, pois ele afetará a média. Quando um erro pode ser atribuído a algum acidente ocorrido durante a análise o resultado deve ser rejeitado, mas quando o resultado discrepante não pode ser atribuído a nenhuma causa definida de erro, a sua rejeição deve ser decidida por critérios estatísticos. O teste  $Q$  pode ser utilizado para ajudar a decidir se o dado questionado deve ser mantido ou descartado. O teste  $Q$  utiliza o seguinte procedimento:

- Colocar os valores amostrais em ordem crescente;
- Determinar a diferença entre o maior e o menor valor da amostra (intervalo);
- Determinar a diferença entre o valor questionado e o mais próximo (variação);
- O coeficiente  $Q$  ( $Q_{calculado}$ ) será a razão (em módulo) entre a variação e o intervalo;
- Comparar o  $Q_{calculado}$  com o  $Q_{tabelado}$ . Se  $Q_{calculado} > Q_{tabelado}$  então o valor deve ser descartado.

O teste  $Q$  é utilizado somente quando o número de resultados é inferior a 10 (Baccan et al., 1979; Harris, 2005)

### 3.5 ROTEIRO PARA O TRATAMENTO DE DADOS ANALÍTICOS

Uma vez feitas medidas analíticas e observando-se os cuidados com a confiabilidade dos resultados, os dados devem ser tratados para fornecerem informações relevantes em processos de caracterização ou comparação em um determinado estudo. Inicialmente, verificam-se possíveis discrepâncias nos dados que podem levar a testes  $Q$  (para a rejeição ou não de dados duvidosos) ou a repetição da medida nas condições em que os dados suspeitos ocorreram. A partir daí, os dados são tratados estatisticamente. Para a análise estatística utilizando ferramentas computacionais, deve-se elaborar uma planilha eletrônica para que os dados sejam analisados utilizando-se um programa estatístico (EXCELL, ORIGIN, IDL, STATDISK, etc). Inicialmente, processa-se a estatística descritiva e, em seguida, a estatística inferencial. A partir da estatística descritiva obtém-se: frequência, média ( $X_m$ ), desvio padrão ( $s$ ), erro padrão ( $EP$ ), dentre outros. Com estes dados pode-se construir um histograma, que representa a distribuição amostral. Verificar o tipo de distribuição por meio do teste de normalidade. Normalmente o mais utilizado é o Shapiro-Wilk. Em caso de

distribuição normal, os resultados são expressos em  $X_m \pm tEP$ . O parâmetro  $t$  de Student normalmente deve ser utilizado, já que não se conhece o desvio padrão da população ( $s$ ). Nos casos de distribuição "Não-normal", os resultados são expressos em mediana e valores mínimo e máximo. Na estatística inferencial, nos casos de distribuição normal com variância semelhante, são utilizados os testes paramétricos. Na comparação entre dois grupos independentes, o teste  $t$ -Student; e entre dependentes, o teste  $t$ -Student pareado. Na comparação entre três ou mais grupos independentes, utiliza-se a análise de Variância (ANOVA); e entre dependentes, ANOVA para medidas repetidas. Se na análise de variância houver diferença significativa, seguem-se os testes para comparações múltiplas entre dois grupos (dois a dois), para localizar entre quais grupos existe(m) a(s) diferença(s). Os testes para comparações múltiplas após ANOVA mais frequentemente utilizados são: Tukey, Bonferroni, Dunnett e Student-Newman-Keuls. O mais sensível é o de Tukey. Nos casos de distribuição "Normal" em que não se observam variâncias semelhantes ou nos de distribuição não-Normal se utilizam os testes não-paramétricos. Na comparação entre dois grupos dependentes aplica-se o teste de Wilcoxon e para os grupos independentes utiliza-se o teste de Mann-Whitney. Na comparação entre três ou mais grupos, quando dependentes, o teste de Friedman; e quando independentes, utiliza-se o teste de Kruskal-Wallis. Os testes para comparações múltiplas após Friedman ou Kruskal-Wallis, mais frequentemente utilizados são: Dunn, Tukey, Dunnett e Student-Newman-Keuls. Para toda a análise estatística (teste de normalidade e estatística inferencial) um nível de significância ( $\alpha$ ) deve ser escolhido. Normalmente adota-se  $\alpha = 0,05$ .

Programas muito utilizados em processamento de dados, como o ORIGIN (OriginLab Corporation), proporcionam a realização de estatística descritiva (Fig.3.5) e testes de hipótese  $t$ -Student (Fig.3.6) e ANOVA (Fig.3.7).

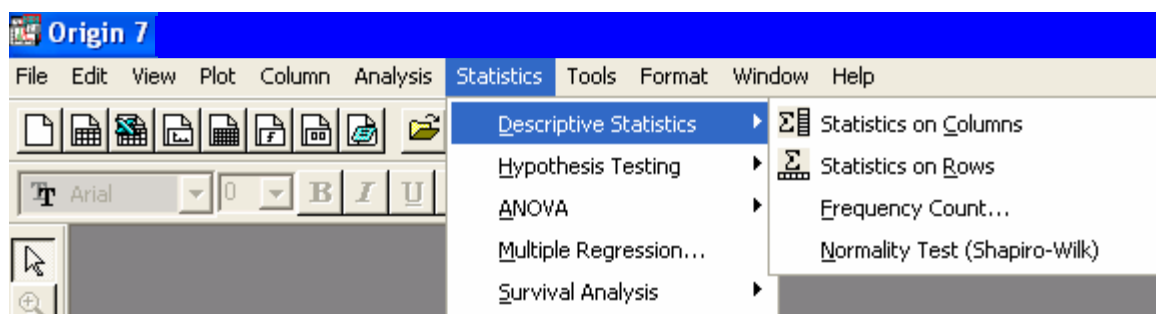


Figura 3.5. Opções de estatística descritiva no Origin.

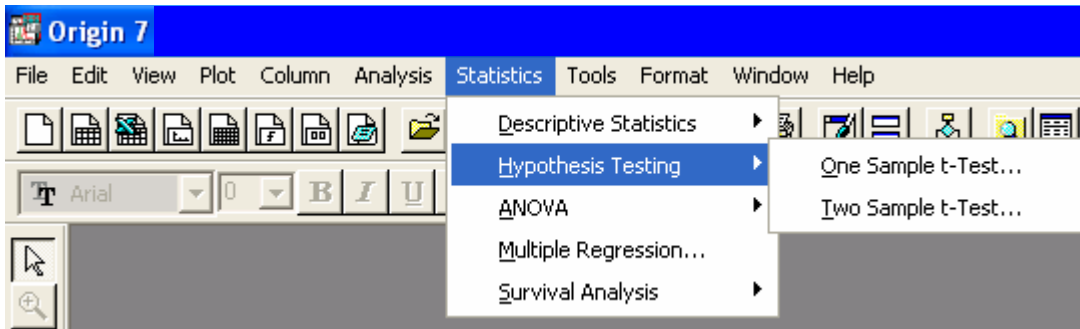
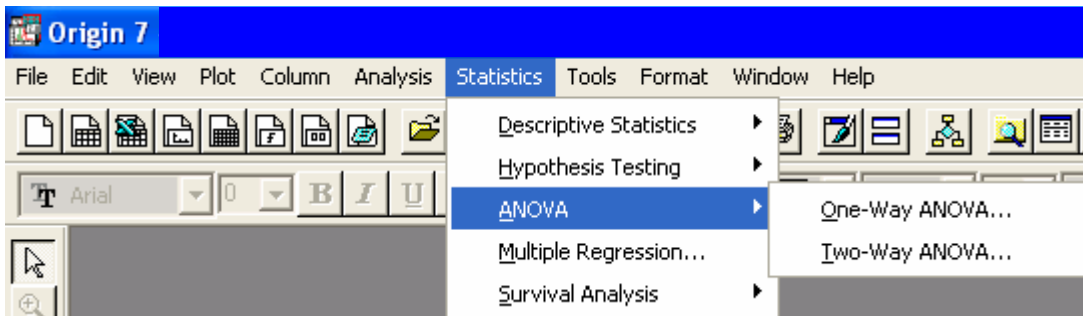
Figura 3.6. Opções do teste de inferência  $t$ -Student.

Figura 3.7. Opções do teste de inferência ANOVA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afifi, A. A.; Azen, S. P. (1971). *Statistical Analysis, A Computer Aided Approach*. London: Academic Press.
- Baccan, N., Andrade, J. C., Godinho, O. E. S.; Barone, J. S. (1979). *Química Analítica Quantitativa Elementar*. São Paulo: Edgard Blucher.
- Fletes, J. F.; Campos, E. F. (1985). *Apostila de estatística*. Santa Catarina: UFSC.
- Freund, J. E. (1998). *Mathematical Statistical*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall.
- Harris, D. C. (2005). *Análise Química Quantitativa*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC.
- IDL Statistical Library (1992). Research Systems, Inc.
- Magalhães, M. N.; Lima, A. C. P. (2001). *Noções de Probabilidade e Estatística*. São Paulo: IME-USP.
- Mendenhall, W., Wackerly, D. D.; Scheaffer, R.L. (1990). *Mathematical Statistics with Applications*. Boston: PWS-Kent.
- Pereira, J. C. R. (1999). *Análise de dados qualitativos: estratégias metodológicas para as ciências da saúde, humanas e sociais*. São Paulo: Edusp.
- Scheffe, H. (1959). *The Analysis of Variance*. New York: John Wiley & Sons.
- Skoog, D. A, Holler, F. J.; Nieman, T. A. (2002). *Princípios da Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman.
- Soares, I. J., Farias, A. A., Cesar, C. C. (1991). *Introdução à estatística*. Rio de Janeiro: Guanabara-Kooganc.
- Stevenson, W. J. (1981). *Estatística Aplicada à administração*. São Paulo: Harper e Row do Brasil.
- Youmans, H. L. (1973). *Statistical for chemistry*. New York: Charles E. Merrill Publishing.

# SEÇÃO II

## APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS



**Estes são os quadros que fazem parte da galeria de arte da sociedade moderna. Será este o legado para as futuras gerações?**



---

---

## LIXO – O QUE FAZER COM ELE?

---

---

### 4.1 INTRODUÇÃO

A palavra lixo, derivada do termo latim *lix*, significa cinza. No dicionário (Larousse, 2004), ela é definida como: substantivo masculino. 1. Restos domésticos ou industriais; despejos, resíduos inaproveitáveis. 2. Tudo o que não presta e se joga fora. 3. Sujeira, imundície. 4. Coisa ou coisas inúteis, sem valor. Já a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) define o lixo como os “restos das atividades humanas, considerados pelos geradores como inúteis, indesejáveis ou descartáveis, podendo se apresentar no estado sólido, semi-sólido (todos aqueles com teor de umidade inferior a 85%) ou líquido, desde que não seja passível de tratamento convencional”. Lixo, na linguagem técnica, tem sido utilizado como sinônimo de resíduos sólidos e compreende materiais descartados pelas atividades humanas. Entretanto, este é um conceito relativo, já que o fato de algo ser descartado não o impossibilita de se tornar matéria-prima para um novo produto ou processo.

Desde os tempos mais remotos até meados do século XVIII, quando surgiram as primeiras indústrias na Europa, o lixo era produzido em pequena quantidade e constituído essencialmente de sobras de alimentos. A partir da Revolução Industrial, as fábricas começaram a produzir objetos de consumo em larga escala e a introduzir novas embalagens no mercado, aumentando consideravelmente o volume e a diversidade de resíduos. Vidros, plásticos, papéis e metais são apenas alguns exemplos da infinidade de materiais formadores de resíduos. Entretanto, não só as fábricas e os consumidores atuam como fontes de dejetos. O aumento da industrialização também trouxe uma elevação no consumo de energia e conseqüente necessidade de ampliar sua produção. Uma das alternativas para a geração de energia está nas termoeletricas a carvão, ainda muito utilizadas no mundo. Porém, estas atuam também como fonte de resíduos, não só na forma de gases, mas também de resíduos sólidos, através das cinzas resultantes da combustão do carvão (mineral ou vegetal). Também se destacam os resíduos gerados pela agroindústria, na forma de bagaços (p. ex. cana-de-açúcar e caju) e cascas (p. ex. arroz), dentre outros.

O fato mais preocupante é que a população mundial está crescendo em ritmo acelerado, esperando-se que duplique nos próximos vinte ou trinta anos. Isso implica na expansão automática da industrialização, o que irá gerar inevitavelmente consideráveis volumes de lixo. O não tratamento desta massa pode contribuir significativamente para a degradação da biosfera, em detrimento da qualidade de vida (Lima, 2004).

Podemos deduzir então o conceito da inesgotabilidade do lixo, ou seja, podemos afirmar que o lixo é inesgotável em vista de sua origem. Também podemos traduzir o conceito de inesgotabilidade como irreversibilidade, pois os mecanismos de origem e produção dos resíduos advêm de processos irreversíveis. Podemos finalmente concluir que os problemas gerados pelo lixo no meio ambiente são irreversíveis, se nada fizermos para contê-los (Lima, 2004).

Temos assim um grande problema gerado com a sociedade industrial: o que fazer com tanto lixo? A resposta mais fácil é: livrar-se dele. O meio ambiente já sofre há muito tempo com as conseqüências desta atitude. Os chamados “lixões” e a crescente poluição de nossos recursos naturais formam um retrato de uma sociedade baseada no “livrar-se”.

Reduzir o consumo e reprojeter os produtos que fabricamos são as melhores formas de diminuir a produção de resíduos e promover a sustentabilidade.

A reciclagem surge como outra resposta. É uma das melhores alternativas para a minimização do lixo, além de gerar economias para o país. Reciclagem é um processo de transformação de materiais que possibilita o seu reaproveitamento pela indústria ou pela agricultura. Pode-se observar este processo na natureza: numa floresta, por exemplo, isso funciona em um perfeito esquema de reciclagem - as folhas caem, os animais morrem, apodrecem e se transformam em adubo para as plantas que reiniciam um novo ciclo (Rodrigues, 2000).

## **4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS**

Para determinar a melhor tecnologia para tratamento, aproveitamento ou destinação final dos resíduos é necessário conhecer a sua classificação. Os resíduos sólidos podem ser classificados de várias maneiras. As mais comuns são quanto aos riscos potenciais de contaminação do meio ambiente e quanto à natureza ou origem.

Conforme a NBR 10.004 da ABNT quanto aos riscos potenciais de contaminação do meio ambiente, os resíduos sólidos podem ser classificados (Monteiro, 2001) em:

- Classe I (perigosos): São aqueles que, por serem inflamáveis, corrosivos, reativos, tóxicos ou patogênicos, apresentam riscos à saúde pública através do aumento da mortalidade ou da morbidade, ou ainda provocam efeitos adversos ao meio ambiente quando manuseados ou dispostos de forma inadequada;
- Classe II (inertes): São resíduos biodegradáveis ou solúveis, com possibilidade de acarretar riscos à saúde ou ao meio ambiente, não se enquadrando nas classificações de resíduos Classe I e Classe III;
- Classe III (inertes): São aqueles que não oferecem riscos à saúde e ao meio ambiente, e que, quando amostrados de forma representativa, segundo a norma NBR 10.007, e submetidos a um contato estático ou dinâmico com água destilada ou deionizada, à temperatura ambiente, conforme teste de solubilização segundo a norma NBR 10.006, não tiverem nenhum de seus constituintes solubilizados a concentrações superiores aos padrões de potabilidade da água, conforme listagem nº 8 (Anexo H da NBR 10.004), excetuando-se os padrões de aspecto, cor, turgidez e sabor.

Já quanto à origem, os resíduos sólidos podem ser classificados (Menin, 1999 e Monteiro, 2001) como:

- Resíduo urbano: Formado por resíduos sólidos em áreas urbanas. Incluem os resíduos domésticos, os efluentes industriais domiciliares (pequenas indústrias de fundo de quintal) e resíduos comerciais;
- Resíduo domiciliar: Formado pelos resíduos sólidos de atividades residenciais. Contém muita quantidade de matéria orgânica, plástico, lata, vidro;
- Resíduo comercial: Formado pelos resíduos sólidos das áreas comerciais. Composto por matéria orgânica, papéis, plástico de vários grupos;
- Resíduo público: Formado por resíduos sólidos oriundos da limpeza pública (areia, papéis, folhagem, poda de árvores);
- Resíduo especial: Formado por resíduos geralmente industriais. Merece tratamento, manipulação e transporte especial, são eles, pilhas, baterias, embalagens de agrotóxicos, embalagens de combustíveis, de remédios ou venenos;
- Resíduo industrial: Nem todos os resíduos produzidos pela indústria, podem ser designados como resíduo industrial. Algumas indústrias do meio urbano produzem resíduos semelhantes ao doméstico. Exemplo disto são as padarias; os demais poderão ser enquadrados em lixo especial e ter o mesmo destino. São resíduos muito variados que apresentam características diversificadas, pois estas dependem do tipo de produto

manufaturado. Devem, portanto, ser estudados caso a caso. Adota-se a NBR 10.004 da ABNT para se classificar os resíduos industriais: Classe I, Classe II e Classe III;

- Resíduo do serviço de saúde (RSS): Os serviços hospitalares, ambulatoriais, farmácias, são geradores dos mais variados tipos de resíduos sépticos, resultantes de curativos, aplicação de medicamentos que em contato com o meio ambiente ou misturado ao lixo doméstico poderão ser patógenos ou vetores de doenças, devem ser destinados à incineração. Segundo a NBR 12.808 da ABNT, os resíduos de serviços de saúde seguem a seguinte classificação: Classe A - Resíduos Infectantes (biológicos, sangue e hemoderivados, cirúrgicos anatomopatológicos e exsudato, perfurantes e cortantes, animais contaminados e assistência a pacientes); Classe B - Resíduos Especiais (rejeitos radioativos, resíduos farmacêuticos e resíduos químicos perigosos); Classe C - Resíduos Comuns (aqueles que não se enquadram nos tipos A e B e que, por sua semelhança aos resíduos domésticos, não oferecem risco adicional à saúde pública)
- Resíduo espacial: Restos provenientes dos objetos lançados pelo homem no espaço, que circulam ao redor da Terra com a velocidade de cerca de 28 mil quilômetros por hora. São estágios completos de foguetes, satélites desativados, tanques de combustível e fragmentos de aparelhos que explodiram normalmente por acidente ou foram destruídos pela ação das armas anti-satélites;
- Resíduo radioativo: Resíduo tóxico e venenoso formado por substâncias radioativas resultantes do funcionamento de reatores nucleares. Como não há um lugar seguro para armazenar esse lixo radioativo, a alternativa recomendada pelos cientistas foi colocá-lo em tambores ou recipientes de concreto impermeáveis e a prova de radiação, e enterrados em terrenos estáveis, no subsolo.

### 4.3 RESÍDUOS E MEIO AMBIENTE

Qualquer resíduo sólido decorrente das atividades produtivas humanas, conforme a sua quantidade, apresenta algum tipo de efeito ao meio ambiente. Entretanto, alguns merecem atenção especial (Monteiro, 2001).

- As pilhas e baterias têm como princípio básico converter energia química em energia elétrica utilizando um metal como combustível. Apresentando-se sob várias formas (cilíndricas, retangulares, botões), podem conter um ou mais dos seguintes metais: chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), níquel (Ni), prata (Ag), lítio (Li), zinco (Zn),

manganês (Mn) e seus compostos. As substâncias das pilhas que contêm esses metais possuem características de corrosividade, reatividade e toxicidade e são classificadas como "Resíduos Perigosos Classe I". As substâncias contendo cádmio, chumbo, mercúrio, prata e níquel causam impactos negativos sobre o meio ambiente e, em especial, sobre o homem. Outras substâncias presentes nas pilhas e baterias, como o zinco, o manganês e o lítio, embora não estejam limitadas pela NBR 10.004, também causam problemas ao meio ambiente;

- O pó que se torna luminoso encontrado no interior das lâmpadas fluorescentes contém mercúrio. Isso não está restrito apenas às lâmpadas fluorescentes comuns de forma tubular, mas encontra-se também nas lâmpadas fluorescentes compactas. As lâmpadas fluorescentes liberam mercúrio quando são quebradas, queimadas ou enterradas em aterros sanitários, o que as transforma resíduos Classe I (perigosos), uma vez que o mercúrio é tóxico para o sistema nervoso humano e, quando inalado ou ingerido, pode causar uma enorme variedade de problemas fisiológicos. Uma vez lançado ao meio ambiente, o mercúrio sofre uma "bioacumulação", isto é, ele tem suas concentrações aumentadas nos tecidos dos peixes, tornando-os perigosos para a alimentação humana. As mulheres grávidas que se alimentam de peixe contaminado transferem o mercúrio para os fetos, que são particularmente sensíveis aos seus efeitos tóxicos. A acumulação do mercúrio nos tecidos também pode contaminar outras espécies selvagens, como marrecos, aves aquáticas e outros animais (Monteiro, 2001);
- São muitos os problemas ambientais gerados pela destinação inadequada dos pneus. Se deixados em ambiente aberto, sujeito a chuvas, os pneus acumulam água, servindo como local para a proliferação de mosquitos. Se encaminhados para aterros de lixo convencionais, provocam "ocos" na massa de resíduos, causando a instabilidade do aterro. Se destinados em unidades de incineração, a queima da borracha gera enormes quantidades de material particulado e gases tóxicos, necessitando de um sistema de tratamento dos gases extremamente eficiente e caro. Por todas estas razões, o descarte de pneus é hoje um problema ambiental grave ainda sem uma destinação realmente eficaz, apesar de serem utilizados na pavimentação de estradas (Monteiro, 2001);

Outros resíduos também merecem destaque, pela sua quantidade e/ou potencial risco ao meio ambiente. As cinzas de carvão mineral gerada por termelétricas sul-brasileiras (milhões de megagramas são produzidas todo o ano), sendo constituída totalmente de material inorgânico; a casca de arroz, resíduo originado do beneficiamento do arroz; a casca do coco,

resultado do consumo da chamada “água de coco”, bebida popular no nordeste brasileiro; o bagaço do “fruto” de caju, resíduo gerado pela agroindústria cajueira, também no nordeste; conchas de mexilhão, produzidas pelo consumo humano deste molusco; dentre outros.

#### **4.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LIXO**

É muito importante conhecer as características físicas e químicas do lixo, assim como suas tendências futuras, pois tais parâmetros possibilitam calcular a capacidade e tipo dos equipamentos de coleta e tratamento, e o destino final. Propriedades como o volume, por exemplo, determinam as dimensões dos locais de descarga ou estações de transbordo, além de tempo de vida. A composição serve para mostrar as potencialidades econômicas do lixo, subsidiando informações para escolha do melhor e mais adequado sistema de tratamento e disposição final. Podemos dizer ainda que a eficiência dos sistemas de coleta e disposição final está fundamentada numa análise criteriosa das características físicas e químicas dos resíduos. Algumas determinações importantes são (Lima, 2004):

- Teor de umidade e resíduos seco;
- Teor de substâncias voláteis e não-voláteis;
- Teor de carbono fixo;
- Teores de hidrogênio e nitrogênio;
- Teores de cálcio, sódio e potássio;
- pH;
- Poder calorífico

#### **4.5 RECICLAGEM**

Reciclagem (do francês, “recyclage”) é um conjunto de técnicas que têm por finalidade aproveitar os detritos, reintroduzindo-os no ciclo produtivo ou transformando-os em produtos úteis (Larousse, 2004).

Os materiais coletados para a reciclagem podem ser reprocessados de suas formas. A reciclagem primária ou em circuito fechado ocorre quando o resíduo é transformado em novos produtos do mesmo tipo – jornais usados em jornais novos e latas de alumínio em novas latas de alumínio, por exemplo. Na reciclagem secundária, também chamada “downcycling”, os materiais residuais são convertidos em produtos diferentes. Por exemplo,

pneus usados podem ser fragmentados e transformados em revestimento emborrachado para estradas; jornais podem ser re-processados em isolamento de celulose (Miller Jr, 2007).

Há dois tipos de resíduos que podem ser reciclados. O resíduo pré-consumo ou interno é gerado em um processo de fabricação e reciclado em vez de ser descartado. O resíduo pós-consumo ou externo é gerado pelo consumo dos produtos. Existe cerca de 25 vezes mais resíduos pré-consumo do que pós-consumo. Entretanto é importante reciclar ambos (Miller Jr, 2007).

Em teoria, quase tudo pode ser reciclado, mas apenas duas questões importam. Primeira, o item será realmente reciclado? Por vezes, os resíduos separados coletados para reciclagem são misturados com outros resíduos e enviados para aterros ou incineradores, isso pode acontecer quando os preços de matérias-primas recicladas caem muito. Segunda, as empresas e os indivíduos completarão o ciclo da reciclagem comprando os produtos feitos de material reciclado? Se não comprarmos tais produtos, a reciclagem não funciona (Miller Jr, 2007).

Em geral considera-se a reciclagem como a solução para todos os resíduos gerados. Entretanto, a tecnologia da reciclagem ainda está em desenvolvimento. Há uma grande discrepância entre a quantidade de resíduos coletados para a reciclagem e a quantidade que atualmente é reciclada ou reusada. Reciclar não é uma tarefa simples. São necessárias atividades de coleta e separação. Alguns produtos compostos não podem ser reciclados, sendo desejável a separação de diferentes tipos de resíduos. Talvez a maior dificuldade na reciclagem seja a falta de mercado para os itens reutilizados. Fatores como transporte, acesso, integridade, limpeza, compactação e armazenagem dos resíduos geram complicações as tentativas de reciclagem. Tendo estes fatores em mente, freqüentemente conclui-se que a reciclagem não é necessariamente um empreendimento lucrativo. Entretanto, alguns negócios tem tido sucesso no uso de materiais reciclados (Khan, 1996).

A Suíça e o Japão reciclam cerca de metade de seus resíduos sólidos urbanos. Os Estados Unidos reciclam perto de 30% desse material – acima dos 6,4% de 1960. Estudos indicam que, com incentivos econômicos e melhor projeto dos sistemas de gerenciamento de resíduos, os Estados Unidos e outros países desenvolvidos poderiam reciclar de 60% a 80% de seus resíduos sólidos urbanos (Miller Jr, 2007).

Segundo dados divulgados no jornal Folha de São Paulo, o Brasil perde cerca de R\$ 4,6 bilhões, por ano, por não reciclar os resíduos. A economia de energia e de recursos naturais não-renováveis são algumas vantagens da reciclagem, além é claro, de reduzir a quantidade de dejetos que resultarão em agentes poluentes. O governo federal lançou um



programa para incentivar a reciclagem de resíduos. Pretende, com isso, reduzir a carga tributária dos reciclados, criar linhas de crédito específicas e fomentar cooperativas de catadores de lixo. Elaborado em conjunto por líderes empresariais, oito ministérios e instituições de pesquisa, ele está sendo coordenado pelo Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e do Comércio. Nos últimos anos, a reciclagem de vidro declinou, a de papel estabilizou-se, mas as de plástico e alumínio cresceram significativamente. O índice brasileiro de recuperação de alumínio, produtos siderúrgicos e papel ondulado já é próximo do registrado em países ricos (Scharf, 1999).

Tabela 4.1: Índices de reciclagem (%) de alguns materiais no Brasil. Fonte: Cempre/PBR, 1999.

Alumínio	61
Vidro	28
Papel de escritório	37
Papel ondulado	60
Plástico – filme	15
Plástico rígido	15
PET	21
Ferro e aço	70

Se a reciclagem compensa economicamente depende de como você percebe seus custos e benefícios ambientais. A Tabela 4.2 mostra as principais vantagens e desvantagens da reciclagem dos resíduos sólidos. Podemos observar que as vantagens são maiores que as desvantagens. Além disto, mesmo que a reciclagem, de uma maneira geral, não fosse economicamente lucrativa, seus benefícios para a preservação de nosso planeta são inquestionáveis. O que seria melhor: arcarmos com alguns possíveis prejuízos financeiros ou evitarmos uma situação que seria catastrófica para toda a vida na Terra? Acredito que a pergunta já contem a resposta (Ricklefs, 2003).

Tabela 4.2 Vantagens e desvantagens da reciclagem dos resíduos sólidos.

Vantagens	Desvantagens
Reduz a poluição do ar e da água	Não economiza espaço em aterros em áreas com vastas terras
Economia de energia	Possível perda de dinheiro no caso do vidro e da maioria dos plásticos
Reduz a demanda de minerais	Reduz os lucros de aterros sanitários e incineradores
Reduz as emissões de gases causadores do efeito estufa	A separação na fonte é um inconveniente para algumas pessoas.
Reduz o descarte de resíduos sólidos	
Ajuda a proteger a biodiversidade	
Pode economizar dinheiro para itens como papel, metais e alguns plásticos.	
Importante parte da economia	

## 4.6 EXPERIÊNCIAS COM RECICLAGEM

Em torno de 20% dos resíduos sólidos municipais são formados por plásticos. Como apenas 2% dos plásticos são reciclados, há a necessidade de se achar usos alternativos para os 16 milhões de megagramas de plásticos gerados anualmente nos Estados Unidos. Devido à demanda de seus produtos recicláveis, as embalagens PET (polyethylene terephthalate) são os plásticos mais recicláveis. PET's têm sido reaproveitados como fibras de vidro residenciais e comerciais, banheiras, chuveiros, etc. Madeiras feitas de resíduos plásticos são fortes e isentas de manutenção; são usadas para fazer piers, cercas e conveses. Timbrex, Petra, Well-Spring, Cloverfill, Syntal são alguns dos novos produtos desenvolvidos a partir de resíduos plásticos, por empresas como a Advanced Recycling Technology, Inc; Mobil Chemical, Co; Allied Signal e Rising Star Futon Company. A Texaco, Inc tem patenteado tecnologias que envolvem o uso de plásticos e borrachas para a produção de energia. Uma empresa do Texas chamada Envirothec, Inc. está utilizando pedaços de pneu em sistemas de irrigação (O'Sullivan, 1982; Martin, 1991; U. S. Environmental Protection Agency, 1992, Steuteville, 1994; Riggle, 1994).

Os resíduos sólidos municipais contem 37,5% em peso de resíduos de papel. Aproximadamente 10% do total é formado por jornais. Para uma casa média americana isto equivale a 12,6 kg por mês sendo 35% agora reciclado. Resíduos de alimentos e grama de jardim somam aproximadamente 25% dos resíduos sólidos municipais. Resíduos de madeira como tábuas e itens de construção podem ser recompostas, utilizada como combustível ou misturada com outros resíduos para produzir itens recicláveis como madeira e sinais de trânsito. Hon Industries; Wood Fibers Internation; Community Environmental Services, Inc.; Forest Products Laboratory; Champion Recycling Corporation, Gardenville; Green Mountais Tecnologies; Ceres Environmental, Inc.; são exemplos de empresas que trabalham com a reciclagem de madeira, papel e resíduos compostos (Brewer, 1987; Comello, 1993; Raftery, 1993; Farcasiu e Smith, 1993; Swanekamp, 1994; Pieper, 1994)

A caracterização e o aproveitamento das cinzas geradas como subprodutos de processos industriais ou a partir da queima de resíduos oriundos de atividades produtivas tem sido tema de diversas pesquisas resultando, inclusive, em patentes de novos produtos (Steven, 1995; U.S. Pat. No. 4,043,831). Cinzas resultantes da queima do carvão mineral e vegetal de indústrias termelétricas (cinzas volantes) vêm sendo utilizadas como aditivos na preparação de cimento (Erel, 1988) e, ainda, na confecção de materiais cerâmicos (Queralt, 1997;

Koizumi, 1998; Demir, 2001). Em ambos os casos, os materiais produzidos apresentam propriedades mecânicas de maior interesse que seus similares. Fertilizantes eficientes têm sido desenvolvidos baseados em uma combinação de fertilizantes inorgânicos, adubo e cinzas do lixo urbano de incineradores municipais de zonas agrícolas (Pasquini, 2004). O grande atrativo das cinzas está no seu baixo valor agregado, composição química inorgânica e, em alguns casos, a geometria de suas partículas.

A compostagem é definida como o ato ou ação de transformar os resíduos orgânicos, através de processos físicos, químicos e biológicos, em uma matéria biogênica mais estável e resistente à ação das espécies consumidoras. A compostagem não representa, necessariamente, uma solução final para os problemas de escassez de alimentos ou do saneamento ambiental, mas pode contribuir significativamente como elemento redutor dos danos provocados pela disposição desordenada do lixo, além de propiciar a recuperação de solos agrícolas exauridos pela ação de fertilizantes químicos aplicados indevidamente (Lima, 2004). A Cargill Dow está fabricando recipientes plásticos recicláveis e biodegradáveis feitos de um polímero chamado polilácticos (PLA), fabricados com açúcar de xarope de milho. Em vez de serem enviados para aterros sanitários, esses recipientes de bioplásticos poderiam ser compostados para produzir um condicionador de solo. A Toyota, segunda maior fabricante de automóveis do mundo, está investindo US\$ 38 bilhões em um processo que utiliza plantas para produzir plástico. Até 2020, a empresa espera controlar dois terços do fornecimento de tais bioplásticos (Miller Jr, 2007).

A conversão biológica do lixo, com fins energéticos, vem a cada dia tornando-se mais interessante uma vez que os resíduos urbanos passaram a serem considerados como fonte inesgotável de energia alternativa. Os métodos biológicos para a produção de combustíveis a partir do lixo baseiam-se no rendimento da atividade microbiana, principalmente de bactérias anaeróbicas que, através de seu metabolismo, transformam a matéria orgânica em produtos combustíveis, como gás metano e o hidrogênio. Os atuais processos em desenvolvimento visam intensificar a produção destes elementos, na expectativa de reduzir os custos derivados do petróleo (Lima, 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brewer, G. (1987). Mixed plastics recycling. *Wast Age*, November, 153-160.
- Comello, V. (1993). Smoother sailing. *R&D Magazine*, October, 20-22.
- Demir I. (2001). Formation and use of coal combustion residues from three types of power plants burning Illinois coals. *Fuel*, 80, 1659-1673.
- Erel, Y., Nathan, A. M. (1988). Potential use of coal ash in the Israel cement industry. *Cement and Concrete Research*, 18, 503-512.
- Farcasiu, M., Smith, C. M. (1993). Coprocessing of coal an waste. Report No. HD226KA, Merton Allen Associates, March.
- Khan, M.R., editor (1996). *Conversion and utilization of waste materials*. New York: Tayler & Francis.
- Koizumi, K., Hatano, M., Tsuyuki, N. (1998). Synthesis and properties of porous ceramics using fly-ash. *J Ceram Soc Jpn*, 106, 899-903.
- Larousse escolar da língua portuguesa. (2004). São Paulo: Larousse do Brasil.
- Lima, L. M. Q. (2004). *Lixo: Tratamento e Biorremediação*. São Paulo: Hemus.
- Martin, A. (1991). The bumpy road to tire recycling. *Garbage*, May, 28-34.
- Menin, D. F. (1999). *Ecologia de A a Z - Pequeno dicionário de Ecologia*. São Paulo: Ed LP&M.
- Miller Jr., G. T. (2007). *Ciência Ambiental*. São Paulo: Thomson.
- Monteiro, J.H.P. (2001). *Manual de Gerenciamento Integrado de resíduos sólidos*. Rio de Janeiro: IBAM.
- O'Sullivan, D. A. (1982). New waste recycling processes show promise. *Chem.Eng.News*, 60, 58-59.
- Pasquini, M. W., Alexander, M. J. (2004). Chemical properties of urban waste ash produced by open burning on the Jos Plateau: implications for agriculture. *Science of The Total Environment*, 319, 225-240.
- Pieper, P. (1994). Wood waste alchemy. *BioCycle*, August, 41-42.
- Queralt, I. (1997). Use of coal fly ash for ceramics: a case study for a large Spanish power station. *Fuel*, 76, 787-791.
- Raftery, M. (1993). Toxic-free products in growing demand. *BioCycle*, August, 27-29.
- Ricklefs, R. E. (2003). *Economia da Natureza*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Riggle, D. (1994). Finding markets from scrap tires. *BioCycle*, March, 41-55.

- 
- Rodrigues, F.L. e Gravinatto, V.M. (2000). Lixo - De onde vem? Para onde vai? São Paulo: Ed. Moderna.
- Scharf, R. (1999). Programa vai Incentivar a Reciclagem de Lixo. Gazeta Mercantil, 31 de março de 1999.
- Steuteville, R. (1994). The state of garbage in America: Part II. BioCycle, May, 30-36.
- Steven, A., (1995). Status of coal ash behavior research. Fuel Processing Technology, 44, 1-12.
- Swanekamp, R. (1994). Ridge station eases Florida's waste disposal problems. Power, October, 84-86.
- U. S. Environmental Protection Agency (1992). Office of Solid Waste, Environmental Fact Sheet, EPA/530-SW-91-024, July.
- U.S. Pat. No. 4,043,831 to Friedman (1977). Densification of coal fly ash

---

---

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CINZAS DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DE CAJU

---

---

## 5.1 INTRODUÇÃO

### 5.1.1 O CAJUEIRO

O cajueiro ocupa um lugar importante entre as plantas frutíferas, devido a crescente comercialização dos seus principais produtos: a amêndoa e o líquido contido no mesocarpo da castanha, o LCC. A planta está presente na América Central, África e Ásia, destacando-se a Índia, Vietnã e Brasil como maiores produtores de castanha (70% da produção mundial). O cultivo do cajueiro é uma das principais atividades agropecuárias do nordeste brasileiro, sendo que quase a totalidade da produção de castanha concentra-se nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. A maior parte da produção de castanha e do LCC destina-se à exportação (EMBRAPA/CNPAD, 1992). O LCC (Líquido da Casca da Castanha de Caju) é utilizado na fabricação de resinas fenólicas e pós de fricção para a indústria automotiva além de apresentar propriedades medicinais anticépticas, vermífugas e vesicantes (Mothé, 1994). Já a castanha, é usada na alimentação humana.

O cajueiro (Fig. 5.1) pertence à família *Anacardiaceae*, gênero *Anacardium*, espécies *Anacardium occidentale* L. (cajueiro comum) (Fig. 5.2) e *Anacardium occidentale* L. *var. nanum* (cajueiro anão precoce). É uma planta perene tipicamente tropical, com crescimento contínuo, podendo atingir até 20 m de altura. Desenvolve-se preferencialmente em regiões de alta temperatura e elevadas precipitações. A temperatura média ideal é de 27°C, com mínimas superiores a 22°C. É sensível ao frio e a geadas, principalmente quando jovem; plantas adultas apresentam redução de floração/frutificação nessas condições. É favorecido por precipitações anuais de 800 a 1500 mm, distribuídos de 5 a 7 meses, mais uma estação seca para florescimento. O vento é prejudicial; mesmo sendo o principal agente polinizador, quando intenso, causa queda de flores. Os solos mais indicados são os leves, profundos e bem drenados. A produtividade normal do cajueiro comum é de 900 kg/ha de castanha e 9 Mg/ha

de frutos; enquanto que a do cajueiro anão é de 1.300 kg/ha de castanha e 13 Mg/ha de frutos, ambos após estabilização da produção. O início da produção é do 3º ao 5º ano para o cajueiro comum e 10 a 18 meses para cajueiro anão precoce.



Figura 5.1. O cajueiro. Em (a), árvore e em (b), detalhes da frutificação.



Figura 5.2. Ilustração da *Anacardium occidentale* L.

### 5.1.2 O CAJU

O caju é um pseudofruto, sendo a castanha o verdadeiro fruto comestível. O que chamamos de polpa ou fruto (Fig.5.3) é na verdade o pedúnculo (Vaughan, 1997). O caju é normalmente classificado conforme a cor de seu pedúnculo, com muitas gradações entre



vermelho e amarelo (Johnson, 1973; Sondhi, 1980). A composição de seu pedúnculo é bastante complexa (Tab. 5.1), apresentando vitaminas, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos, transformando-o em um importante alimento (FAO, 1986). Entretanto, esta riqueza nutricional é responsável por sua alta perecibilidade, exigindo cuidados especiais para estocagem, transporte, limpeza e processamento (Conceição, 1991; Crisóstomo, 1991).



Figura 5.3. Amostras de caju (*Anacardium occidentale L.*) de pedúnculo vermelho, onde estão indicados o fruto (castanha) e o pseudofruto (pedúnculo). Barra = 2cm

Tabela 5.1. Principais componentes do pedúnculo fresco do caju.

Umidade (%)	86,0
Proteínas (%)	0,70
Taninos (%)	0,37
Açúcar total (%)	8,35
Ácido ascórbico (mg/100g)	200
Fósforo (mg/100g)	33,40
Cálcio (mg/100g.)	14,50
Ferro (mg/100g.)	0,35
Vitamina A (U.I.)	10,8

No Brasil, a produção de pedúnculo de caju, praticamente concentrado na Região Nordeste, está em torno de 1,5 milhões de megagramas por ano, com desperdício de 90 a 94%. A indústria de processamento do pedúnculo possui segmentos na produção de bebidas, doces, geléias, néctares, farinhas, fermentados e rações, sendo que seu aproveitamento não atinge 6% da produção (EMBRAPA, 1993; Moura, 1998). Uma das causas para este baixo aproveitamento está associada à rápida deterioração, ocasionando elevadas perdas no campo e



nas indústrias. O principal produto do pedúnculo continua sendo o suco. Existem poucas empresas de grande porte com capacidade operacional para processarem 80 mil megagramas de suco por ano (França, 1992). As demais formas de aproveitamento são realizadas por estabelecimentos classificados como micro e pequenas produções caseiras, cooperativas e associações de produtores.

### 5.1.2 O BAGAÇO DO CAJU

O bagaço do caju (Fig.5.4), como é chamado o subproduto do pedúnculo após a extração do suco, representa aproximadamente 20% em peso do pedúnculo (AGRIANUAL, 2000). É uma das grandes fontes de resíduos produzidos pela agroindústria cajueira. Seu aproveitamento, quando existe, é restrito ao uso como complemento alimentar na forma de ração animal. Entretanto, esta utilização é limitada, devido a sua rápida degradação, tornando inviável o armazenamento.



Figura 5.4: Pedúnculo do caju, após a extração do suco (bagaço). Barra = 2cm

Uma alternativa a reciclagem destes resíduos agroindustriais é a queima em temperaturas acima de 600°C (médias e altas temperaturas) na presença de oxigênio, ou seja, a incineração. Neste processo, os compostos biológicos são destruídos, sendo reduzidos a sólidos inorgânicos inertes (cinzas), não sujeitos aos efeitos da degradação.

### 5.1.3 INCINERAÇÃO

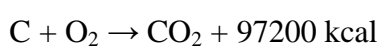
A incineração como forma de destino final dos resíduos agroindustriais é uma prática muito antiga, e os métodos empregados, apesar de rudimentares, consistem em sua grande maioria em empilhar resíduos e atear fogo. A cinza resultante era espalhada no solo ou

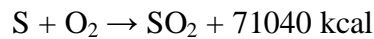
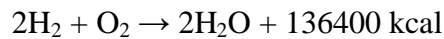
incorporada como elemento auxiliar na agricultura. Com o passar do tempo, novos métodos e tecnologias se incorporaram a este procedimento, sendo exaustivamente estudados (Lima, 2004). Para incineração de resíduos agroindustriais de pequeno e médio porte, o fogo é substituído por muflas (fornos aquecidos por elementos resistivos).

A incineração é definida como o processo de redução de peso e volume dos resíduos através de combustão controlada. Os remanescentes da incineração são, geralmente, gases como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>); dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>); nitrogênio (N<sub>2</sub>); gás inerte proveniente do ar utilizado como fonte de oxigênio e do próprio resíduo; oxigênio (O<sub>2</sub>) proveniente do ar em excesso que não consegue ser completamente queimado; água (H<sub>2</sub>O); cinza e escórias que se constituem de metais ferrosos e inertes (Lima, 2004).

Quando a combustão é incompleta pode aparecer monóxido de carbono (CO) e particulados que consistem de carbono finamente dividido lançado na atmosfera como fuligem e negro de fumo. Quando a combustão é realizada em temperaturas elevadas pode haver dissociação de nitrogênio, surgindo ainda compostos resultantes da combinação deste com o oxigênio, como NO e N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Lima, 2004).

O conceito teórico da incineração consiste de uma reação química entre o combustível e o comburente. Entretanto, para que este conceito seja válido, se faz necessário considerar o resíduo agroindustrial como um combustível, e isso somente é possível quando seus componentes liberam energia térmica à medida que são queimados. Esta energia química latente, quando liberada na forma de calor, pode ser denominada calor de combustão. Os resíduos agroindustriais em sua maioria são combustíveis. Os principais produtos da combustão, como já mencionado, são na maioria gases como SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>, HCl e materiais particulados. Os NO<sub>x</sub>, embora relativamente abundante nos resíduos, são encontrados em quantidades bem inferiores nestes, quando comparados com os combustíveis convencionais. A formação de NO<sub>x</sub> a partir da combustão de resíduos depende mais da temperatura do processo e do nitrogênio contido no ar do que sua quantidade relativa no próprio resíduo. Também é importante salientar que os resíduos agroindustriais contêm pouco enxofre, e em sua combustão os compostos formados (SO<sub>x</sub>) normalmente são precipitados com as cinzas ou ainda na formação de SO<sub>2</sub>. As equações de combustão do carbono, hidrogênio e enxofre são, respectivamente:





Na combustão de resíduos agroindustriais podem ocorrer situações em que as variações de temperatura e pressão podem atingir um estado de equilíbrio químico capaz de inibir ou mesmo interromper a reação por completo. Este fato está relacionado principalmente ao poder calorífico do resíduo. O rendimento da combustão de resíduos está fundamentado em dois princípios básicos (Lima, 2004):

- Regular a quantidade de ar de modo que seja mantida a mistura ar-combustível nos níveis desejados;
- Transferir o máximo de calor gerado na combustão para o material a ser incinerado.

O Japão e alguns países europeus incineram a maior parte de seus resíduos urbanos, mas essa prática perdeu popularidade nos Estados Unidos e na maioria dos países da Europa. Desde 1985, mais de 280 novos projetos de incineradores para queima de grandes quantidades de resíduos foram adiados ou cancelados nos Estados Unidos em função dos altos custos, da preocupação com a poluição do ar e da forte oposição dos cidadãos (Miller Jr, 2007). Entretanto, a utilização dos resíduos da queima para produção de novos produtos para diferentes aplicações tecnológicas tem estimulado recentes estudos na área de ciência de materiais. Cerâmicas, carvões ativados e compostos luminescentes estão entre estes produtos.

Os resíduos agroindustriais são caracterizados por um elevado conteúdo de matéria volátil, o que torna sua queima rápida (Werther, 1995; Ogada, 1996). Devido à presença de enxofre, nitrogênio, etc., gases poluentes como o  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  e o  $\text{HCl}$  podem se formar durante a sua combustão. As cinzas destes resíduos geralmente apresentam um elevado conteúdo de potássio (Bapat, 1997; Grubor, 1995).

#### 5.1.4 OBJETIVOS

Neste capítulo, são apresentados os resultados da preparação e caracterização das cinzas formadas a partir da queima do bagaço de caju, com o objetivo de buscar alternativas para o aproveitamento da grande quantidade de resíduos agroindustriais formados pela extração do suco, através de processos que envolvam a conversão a compostos inorgânicos.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de caju, da variedade de pedúnculo vermelho, obtidas de plantações do estado do Ceará, Brasil, entre os meses de setembro de 2003 e janeiro de 2004. Após a extração da castanha, os pedúnculos foram prensados para a retirada do suco, formando o chamado “bagaço de caju”. O bagaço foi secado em estufa a 36°C durante 48h e triturado em moinho analítico. O pó do bagaço foi queimado, em forno tipo mufla, em atmosfera de ar, a  $(650 \pm 5)^\circ\text{C}$  durante 4h, conforme procedimento para a formação de cinzas, descrito por Gadelha (1995). A taxa de aquecimento foi de  $50^\circ\text{C}/\text{min}$  e a de resfriamento de aproximadamente  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . A Figura 5.5. mostra a representação esquemática do processo de preparação das cinzas, realizada no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC).

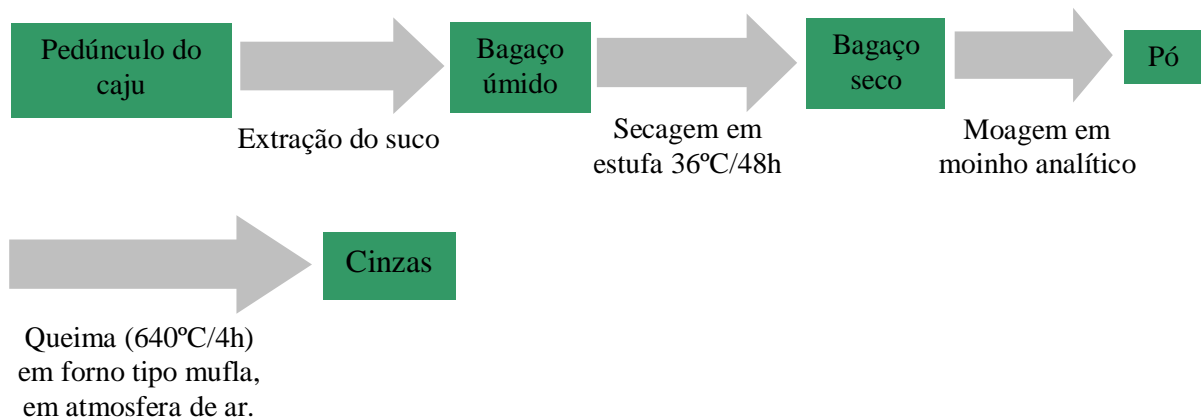


Figura 5.5. Esquema de preparação das cinzas do pedúnculo do caju.

### 5.2.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA DE MASSA

A perda de massa provocada pela queima foi determinada por meio da pesagem do pó do bagaço seco e das cinzas secas, em balança analítica Bioprecisa FA2104N, conforme a relação:

$$\Delta m = \frac{m_{pp} - m_c}{m_{pp}} \times 100$$

onde  $\Delta m$  = perda percentual de massa,  $m_{pp}$  = massa do pó do pedúnculo seco e  $m_c$  = massa das cinzas secas. Foi realizado este procedimento em 20 amostras, obtendo-se a perda de massa média e o intervalo de confiança, com nível de significância de 5%. A determinação da perda de massa foi realizada no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) da Universidade Federal do Ceará.

### 5.2.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR EDX

A determinação dos elementos químicos presentes nas cinzas foi realizada por meio de análise de energia dispersiva de raios-X (EDX) em EDX Philips Model New XL-30, no Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 5.2.4 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD

Os padrões de difração de raios-X (XRD), para a análise mineralógica das cinzas foram obtidos pelo método do pó, na temperatura ambiente (300K) em difratômetro de pó Philips, modelo X'Pert PRO, no Laboratório de Raios-X do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC). Usou-se a geometria Bragg-Bretando com radiação Cu- $\alpha$ . O tubo foi operado com 40kV e 40mA. Os dados de difração foram coletados em um intervalo de varredura de  $10^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$  com passos de  $0,02^\circ$  e tempo de integração de 2s por ponto. Foi utilizado o programa X'Pert HighScore para identificação de fases cristalinas e o método de Rietveld, através do programa Rietica – versão 1.7.7 (C.J. Howard and B.A. Hunter, 1997 - Lucas Heights Research Laboratories), para o refinamento do difratograma e conseqüente análise quantitativa.

### 5.2.5 ANÁLISES TÉRMICAS POR TGA E DSC

As análises térmicas de termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) nas cinzas foram realizadas em atmosfera de nitrogênio, com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , de 23,8 a  $600^\circ\text{C}$  em equipamentos Shimadzu TGA/DSC, no Laboratório de Análises Térmicas Ivo Giolito do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará (UFC). O TGA realizado foi o dinâmico.

### 5.2.6 PRESENÇA DE BICABORNATOS

A presença de bicarbonatos foi testada por meio da liberação de CO<sub>2</sub> em reação de neutralização com ácido, mediante adição de 100mg de cinzas em solução padrão de 50mL de HCl 0,5M (Merck), no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 5.2.7 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO

Imagens de microscopia ótica de campo claro do pó do bagaço e das cinzas foram obtidas em microscópio metalográfico Olympus Model BX51RF, do Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E VARIAÇÃO DE MASSA

O bagaço de caju, após secagem e moagem, deu origem a um pó de coloração avermelhada (Fig.5.6a) e forte odor, característico do caju. A queima em mufla gerou cinzas de coloração amarelada (Fig.5.6b), inodoras e altamente susceptíveis a formação de agregados. A diferença de massa entre o pó do bagaço e as cinzas demonstrou uma perda de 97%, devido à decomposição dos compostos orgânicos e evaporação dos constituintes voláteis presentes no pedúnculo, durante a queima (Maia, 2000; Bicalho, 2001).



Figura 5.6. Pó do pedúnculo de caju, antes (a) e depois (b) da queima. Pode-se observar a alteração na coloração e o elevado poder de agregação das cinzas. Barra = 4.5mm.

### 5.3.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA POR EDX

As medidas de EDX indicaram a presença de C, O, P, K, Mg, S, Na, Al e Si nas cinzas (Fig.5.7). O carbono e oxigênio permaneceram como resíduos dos compostos orgânicos, após a combustão. Os demais elementos originaram-se dos sais minerais contidos no pedúnculo (Smith, 1992; Azoubel, 2005) e do silício e alumínio absorvidos da solução do solo na forma de ácido monossilísico  $\text{Si(OH)}_4$  (Tisdale, 1993; Shimizu, 2001; Mauad, 2003) e hidróxido de alumínio  $\text{Al(OH)}_3$  (Radojevic, 1999; Reeve, 1994; Williams, 2005). A não detecção de cálcio e ferro demonstrou a baixa concentração destes elementos no bagaço, estando presentes em maior quantidade no suco (Taylor, 1998; Azam-Ali, 2001).

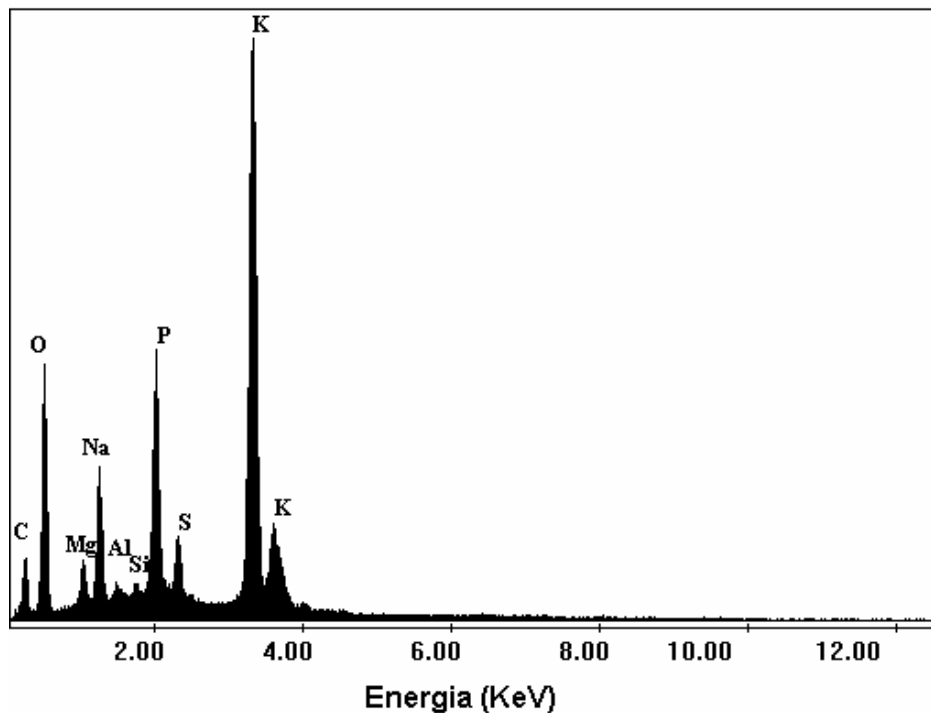


Figura 5.7. EDX das cinzas do pedúnculo do caju, mostrando seus principais elementos químicos: C, O, Mg, Na, P, S e K.

### 5.3.3 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD E PRESENÇA DE BICARBONATOS

A Figura 5.8 apresenta os difratogramas de raios-X antes e depois da queima, mostrando a transformação de um material orgânico caracteristicamente amorfo (resíduos do bagaço seco) para um cristalino (cinzas). A análise cristalográfica das cinzas indicou, como principais fases cristalinas, os seguintes compostos:  $\text{KHCO}_3$  (54,17%),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (34,08%) e  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10,06%). As fases restantes (1,69%) foram  $\text{Mg}_3(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$  e

$\text{NaAl}(\text{HPO}_4)_2$ . Os resíduos  $R_{\text{WP}}$ ,  $R_{\text{EXP}}$  e o grau de qualidade do refinamento ( $\chi^2$ ) foram respectivamente iguais a 5,67, 4,12 e 1,90. O grupo espacial identificado para o carbonato ácido (ou bicarbonato) de potássio ( $\text{KHCO}_3$ ) foi o monoclinico C/2m, representando a fase desordenada de alta temperatura (Ali, 1999). A presença de  $\text{KHCO}_3$  foi confirmada pela dissolução das cinzas em solução padrão de  $\text{HCl}$  0,5M, com liberação de  $\text{CO}_2$  (efervescência) e formação do cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), conforme a reação de neutralização



Devido à baixa temperatura de decomposição (100-200°C), sua formação deve ter ocorrido após a queima (durante o resfriamento), da reação do  $\text{K}_2\text{CO}_3$  com o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  do ar. Este tipo de síntese é relatado por Stern (2004), sendo seu mecanismo ainda não bem compreendido. Os grupos espaciais identificados para o sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) foram o ortorrômbico Pmcn ( $\alpha\text{-K}_2\text{SO}_4$ ), com 16,97% e o Pman ( $\beta\text{-K}_2\text{SO}_4$ ), com 17,11%. O  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  hexahidratado presente nas cinzas é um composto fosfatado análogo a estruvita ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sendo denominado K-estruvita. Através dos resultados das análises de raios-X e de cálculos estequiométricos, determinou-se o percentual em peso dos principais elementos químicos presentes nas cinzas: K (37,92%), S (6,27%), P (1,34%), Mg (1,18%), Si (0,20%) e Al (0,076%).

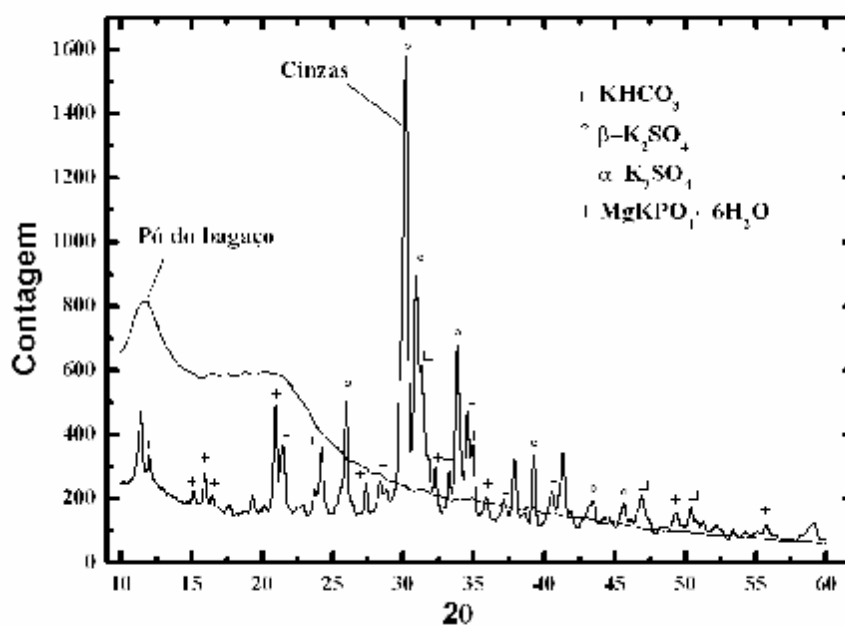


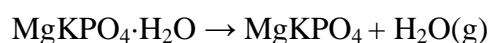
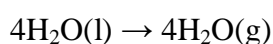
Figura 5.8. Difratograma de raios-X do pó do pedúnculo de caju e suas cinzas, mostrando a alteração na cristalinidade após a queima e a formação das principais fases cristalinas:  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  e  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .



### 5.3.4 ANÁLISES TÉRMICAS POR TGA E DSC

As curvas termais de TGA e DSC (Fig.5.9), indicaram a ocorrência de dois picos próximos, em 95,15 e 105,5°C (entre 23,8 e 134,6°C), correspondendo a uma perda de massa de 26%; e outro, em 170,5°C (entre 134,6 e 207,5°C), com perda de massa de 4,63%.

A perda de água de hidratação do  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  deve seguir a seguinte seqüência de reações (Borchardt, 1957):



correspondendo a uma perda teórica de água de 40,56% (4% nas cinzas). A água que ocorre em sólidos hidratados (água essencial de hidratação) está ligada mediante ligações de coordenação covalentes, que são normalmente mais fracas que as eletrostáticas. Por esta razão, a água de hidratação é facilmente eliminada destes compostos pela ação do calor, iniciando-se em temperaturas abaixo dos 100°C (Baccan, 1979; Christian, 1977).

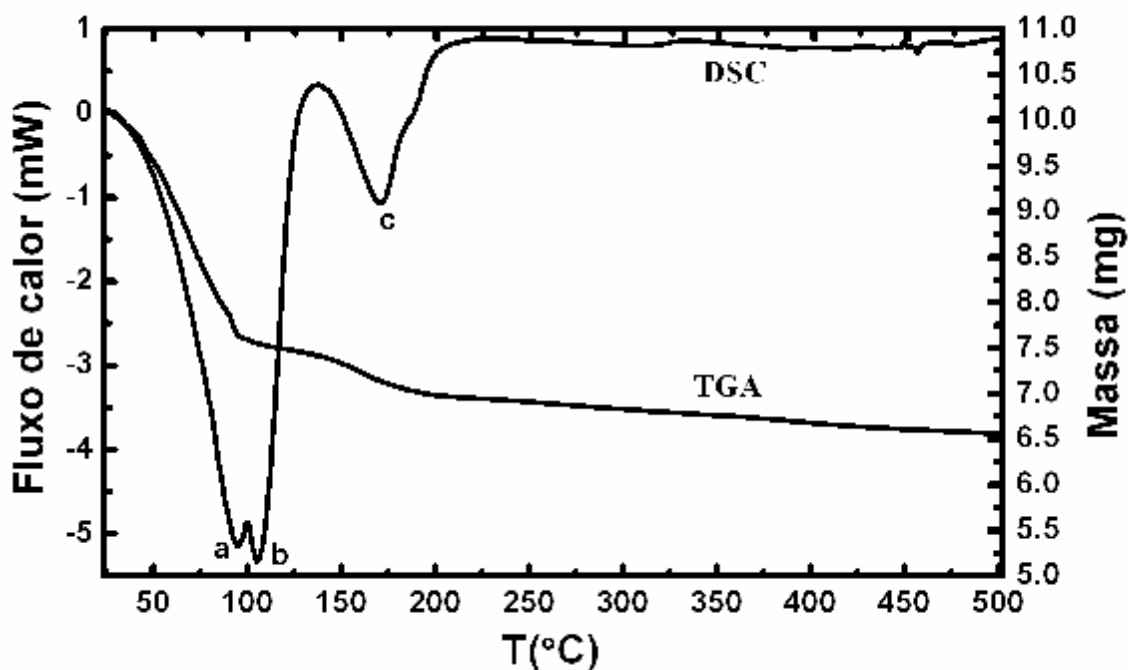
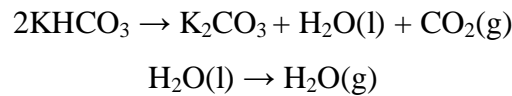


Figura 5.9. Curvas de TGA e DSC mostrando as transformações térmicas das cinzas, entre 23,8 e 600°C. Os pontos a, b e c indicam eventos térmicos. A taxa de aquecimento foi de 10°C/min.

A decomposição térmica do  $\text{KHCO}_3$  até  $\text{K}_2\text{CO}_3$  deve seguir a seguinte seqüência de reações (Lee, 1996):



correspondendo a uma perda teórica de massa de 22% de  $\text{CO}_2$  (11,9% nas cinzas) e 9% de água essencial de constituição (4,8% nas cinzas). A liberação de  $\text{CO}_2$  em compostos bicarbonatos ocorre em temperaturas próximas a  $100^\circ\text{C}$  (Lee, 1996). Já a água (água essencial de constituição), só é eliminada por meio de temperaturas relativamente altas (Baccan, 1979; Blaedel, 1970). Os eventos térmicos ocorridos entre  $23,8$  e  $134,6^\circ\text{C}$  correspondem as perdas de  $\text{CO}_2$  do  $\text{KHCO}_3$ , da água de hidratação do  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Kaloustian, 2002; Ravikumar, 2002) e de umidade (água de adsorção, absorção e oclusão). O percentual de umidade foi estimado pela diferença entre a perda de massa medida nos dois primeiros eventos térmicos (26%) e as perdas teóricas de  $\text{CO}_2$  (11,9%) e de  $\text{H}_2\text{O}$  do  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (4%), resultando em 10,1%. Este elevado conteúdo de umidade é previsto em cinzas originadas da queima do bagaço de resíduos agroindustriais (Werther, 2000) e justifica o alto poder de agregação do material. É claro que este valor não é exato, devido a desvios na análise quantitativa por XRD, provocado pelo próprio refinamento. A proximidade dos dois primeiros picos é explicada pela perda de umidade das amostras (Borchardt, 1957; Newkirk, 1960) durante as medidas térmicas. O terceiro evento térmico corresponde à perda de água essencial de constituição do  $\text{KHCO}_3$ , com valor percentual menor (4,63%) com relação aquele estimado de cálculos estequiométricos e análise quantitativa a partir do refinamento do difratograma (4,8%). Esta diferença pode estar associada às características da técnica de difração de raios-X, que em alguns casos, exige fatores de correção. As principais causas podem ser: orientação preferencial, extinção, microabsorção e rugosidade superficial da amostra. A não observação de quatro eventos associados à decomposição do  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  deve-se a elevada taxa de aquecimento ( $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) utilizada nas análises térmicas, como demonstrado por Frost et al (2004). Taxas de aquecimento acima de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  reduzem o número de eventos observados.

### 5.3.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO

A Figura 5.10 mostra imagens de microscopia ótica de campo claro feitas no pó do bagaço e nas cinzas, em diferentes aumentos. Fica evidente a formação de cristais, após a

queima. Os cristais de coloração laranja são de K-estruvita. Os demais (brancos), são de bicarbonato e sulfato de potássio.

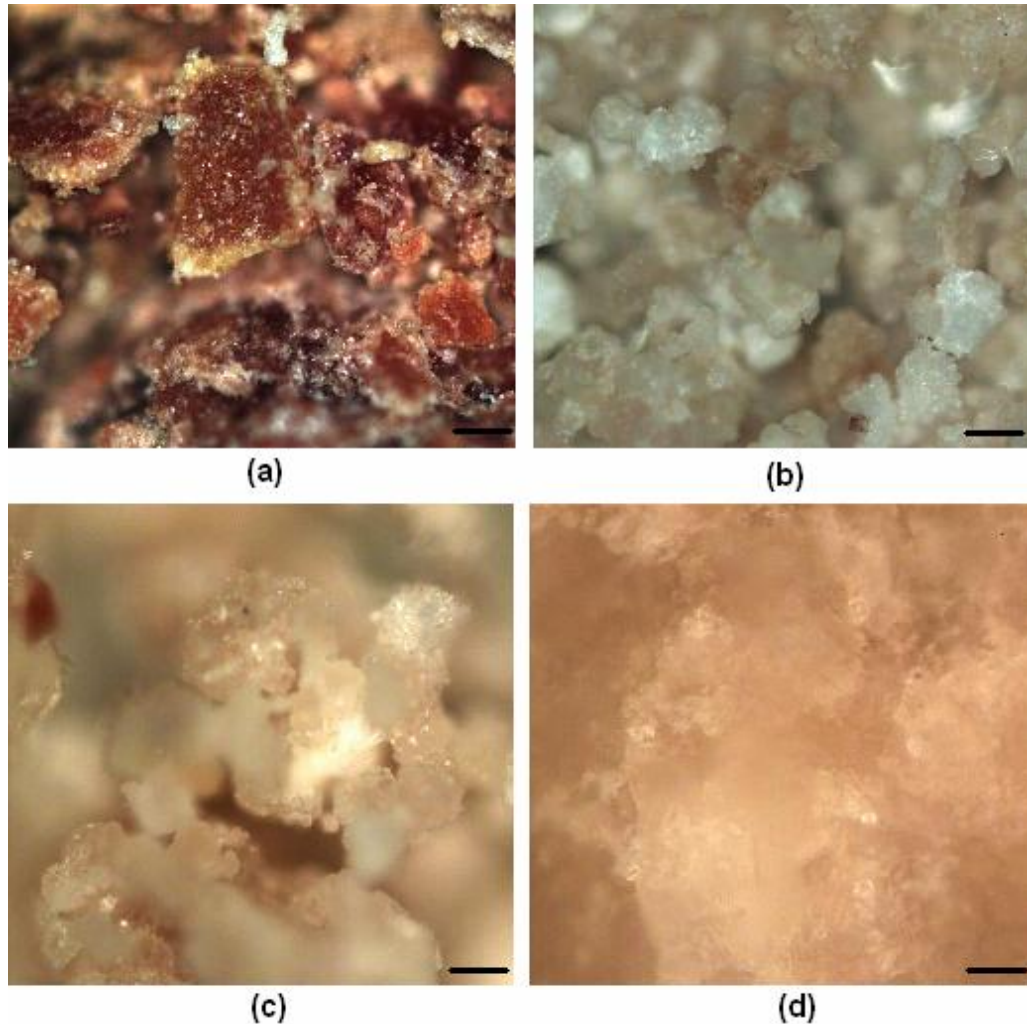


Figura 5.10. Seqüência de imagens feitas por microscopia ótica mostrando o pó do pedúnculo de caju e suas cinzas, em diferentes ampliações. (a) O pó do pedúnculo em um aumento de 50x, evidenciando partes do pedúnculo seco; (b), (c) as cinzas do pedúnculo em um aumento de 50x e 100x, respectivamente, mostrando cristais de  $K_2SO_4$ ,  $KHCO_3$  (claros) e K-estruvita (rosa); (d) Detalhes de cristais de K-estruvita, em um aumento de 200x. Bar = 250 $\mu$ m (a) e (b); 125 $\mu$ m (c) e 62,5 $\mu$ m (d).

## 5.4 CONCLUSÕES

Foram produzidas e caracterizadas as cinzas originadas da queima do bagaço do pedúnculo de caju. Medidas de perda de massa mostraram que as cinzas formadas representam apenas 3% da massa do bagaço. Análises de EDX indicaram a presença dos seguintes elementos químicos: C, O, P, K, Mg, S, Na, Al e Si. Medidas de difração de raios-X

e análises térmicas indicaram, como principais fases cristalinas:  $\text{KHCO}_3$  (54,17%),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (34,08%) e  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10,06%). As fases restantes (1,69%) foram  $\text{Mg}_3(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$  e  $\text{NaAl}(\text{HPO}_4)_2$ . A estimativa de umidade ficou em torno de 10%. A elevada quantidade de compostos de potássio é característica de resíduos agroindustriais. O carbonato ácido de potássio ( $\text{KHCO}_3$ ) é um sólido cristalino, solúvel em água, produzido pela conversão química do carbonato de potássio com o dióxido de carbono, via eletrólise. Não é considerado tóxico e nem listado como carcinogênico. É usado na fabricação de cristais, vidros especiais, cerâmicas, esmaltes, silicatos de potássio, fertilizantes, extintores de incêndio; na redução da perda de cátions em solos ácidos e neutros; na síntese farmacêutica (vitaminas e penicilina) e na indústria de alimentos (NOSN, 1999). Também é usado como antiácido e fungicida (Orme 2004,  $\text{KHCO}_3$  Handbook, 2004). O sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) é freqüentemente incluído como parte de misturas, ligantes e compostos fertilizantes. Têm um custo de fabricação maior do que o  $\text{KCl}$ , outro composto largamente utilizado na produção de fertilizantes potássicos (FAO, 1984). Bridger et. al. (1962) confirmaram as excelentes propriedades agrônômicas da estruvita ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) como fonte de fósforo, nitrogênio e magnésio, sendo de aplicação direta nas folhas e no solo. Em particular, a K-estruvita ( $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) fornece potássio, ao invés do nitrogênio, sendo considerado um “premium quality slow-release fertiliser” (Liberti, 1989). Entretanto, o uso das estruvitas é limitado pelos custos envolvidos em sua produção. A presença destes compostos nas cinzas do pedúnculo de caju transforma este resíduo agroindustrial em uma promissora fonte não precível de potássio, enxofre, fósforo e magnésio em fertilizantes e na ração animal, além das diversas aplicações abrangidas pelo carbonato ácido de potássio.

Este trabalho resultou no artigo publicado em 2007 (Anexo A.3): Ricardo P. Santos, A.A. X. Santiago, C. A. A. Gadelha, J. B. Cajazeiras, B. S. Cavada, J. L. Martins, T. M. Oliveira, G. A. Bezerra, Rinaldo. P. Santos, V. N. Freire. Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes. **Journal of Food Engineering** 79 (2007).

## COLABORADORES

A.A. X. SANTIAGO <sup>a</sup>, C. A. A. GADELHA <sup>b</sup>, J. B. CAJAZEIRAS <sup>c</sup>, B. S. CAVADA <sup>c</sup>, J. L. MARTINS <sup>d</sup>,  
T. M. OLIVEIRA <sup>c</sup>, G. A. BEZERRA <sup>c</sup>, RINALDO. P. SANTOS <sup>e</sup>, V. N. FREIRE <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus Castelo Branco, 58059-000, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, 60455-900, Brasil.

<sup>d</sup> Instituto de Química e Geociências (IQG), Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão, 96160-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>e</sup> Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9500, Avenida Bento Gonçalves, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL – Anuário da Agricultura Brasileira. (2000). FNP Consultoria & Comércio: São Paulo, Brazil, 244-248.
- Albers A.P.F., Melchiades, F.G., Machado, R, Baldo, J.B., Boschi, A.O. (2002). Cerâmica, 305.
- Ali, A.I., Kim, B.K., Yu, I. (1999). Electrical Conduction Properties of  $\text{KHCO}_3$ . J. Korean Phys. Soc., 35, 1439-1422.
- Azam-Ali, S.H., Judge E.C. (2001). Small-scale cashew nut processing. Rugby, Warwickshire, UK: Schumacher Centre for Technology and Development Bourton on Dunsmore.
- Azoubel P.M., Cipriani, D.C., El-Aouar A., Antonio, G.C., Murr, F.E.X. (2005). Effect of concentration on the physical properties of cashew juice. Journal of Food Engineering, 66, 413–417.
- Baccan, N., Andrade, J.C., Godinho, O.E.S., Barone, J.S. (1979). Química Analítica Quantitativa Elementar (2ed). São Paulo: Edgard Blucher.
- Bapat, D.W., Kulkarni, S.V. and Bhandarkar, V.P. (1997). Design and operating experience on fluidized bed boiler burning biomass fuels with high alkali ash. In: F.D.S. Preto (Ed), Proceedings of the 14th International Conference on Fluidized Bed Combustion (pp. 165–174). New York, NY: Vancouver ASME.
- Bicalho, B., Rezende, C.M. (2001). Volatile compounds of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*). Z. Naturforsch, 56, 35–39.
- Blaedel, W.J. and Meloche, V.W. (1970). Elementary quantitative analysis – teory and practice (2<sup>nd</sup> ed). New York: Harper & Row Publishers Inc.
- BNB/ETENE/EPACE/EMBRAPA (1968). A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Fortaleza, Brasil.
- Borchardt, H.J., and Daniels, F. (1957). Differential Thermal Analysis of Inorganic Hydrates. J. Phys. Chem., 61, 917-921.
- Bridger, G.L., Salutsky, M.L., Starostka, R.W. (1962). Metal Ammonium Phosphates as Fertilizers. Agricultural and Food Chemistry, 10, 182-188.
- Christian, G.D. (1977). Analytical chemical (2<sup>nd</sup> ed). New York: John Wiley & Sons.
- Conceição, A.J., (1981). Apostilas de botânica sistemática. Cruz das Almas (BA): E.A.UFBA.

- Crisóstomo, J.R. (1991). Avanços tecnológicos e desafios atuais do agronegócio do caju no Nordeste do Brasil. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT.
- EMBRAPA/CNPAT (1993). O mundo do caju. Fortaleza, Brasil.
- FAO - Food and Agricultural Organization (1986). Food and Fruit-bearing Forest Species. 3. Examples from Latin America. FAO-Forestry Paper 44/3. Rome.
- FAO - Food and Agricultural Organization. (1984). Fertilizer and plant nutrition guide, bulletin 9,. Rome.
- França, F.M.C. (1988). Produção, comercialização e mercado. In: LIMA, V. de P.M.S. A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil (pp. 63-80). Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil.
- Frost, R.L., Weir, M.L., Erickson K.L. (2004). Thermal Decomposition of Struvite. J. Thermal Analysis and Calorimetry, 76, 1025-1033.
- Gadelha, C.A.A. (1995). Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Brasil.
- Grubor, B.D., Oka, S.N. Ilic, M.S. Dakic, D.V. and Arsic, B.T. (1995). Biomass FBC combustion-bed agglomeration problems. In: K.J. Heinschel Editor, Proceedings of the 13th International Conference on Fluidized Bed Combustion (pp. 515-522). New York, NY: FL ASME.
- Johnson, D. (1973). The botany, orig., and spread of cashew *Anacardium occidentale L.* The Journal of Plantation Crops, 2, 1-7.
- Kaloustian, J., Pauli, A.M., Pieroni, G., Portugal, H. (2002). The use of termal analysis in determination of some urinary calculi of calcium oxalate. J. Thermal Analysis and Calorimetry, 70, 959-973.
- KHCO<sub>3</sub> Handbook (2004). Armand Products Company.
- Lee, J.D. (1996). Concise Inorganic Chemistry. New York: Chapman & Hall.
- Liberti, L., Boari, G., Passino, R. (1989). Eur. Pat. 114,038.
- Lima, L. M. Q. (2004). Lixo: Tratamento e Biorremediação. São Paulo: Hemus.
- Maia, J.G.S., Andrade, E. H. A., Zoghbi, M. G. B. (2000). Volatile Constituents of the Leaves, Fruits and Flowers of Cashew (*Anacardium occidentaleL.*). Journal of Food Composition and Analysis, 13, 227-232.
- Mauad, M., Filho, H.G., Crusciol, C.A.C., Corrêa, J.C. (2003). Teores de Silício no solo e na planta de arroz de terras altas com diferentes doses de adubação silicatada e nitrogenada. R. Brás. Ci. Solo, 27, 867-873.
- Miller Jr., G. T. (2007). Ciência Ambiental. São Paulo: Thomson.



- Mothé, C.G. and Milfont Jr., W.N. (1994). Aplicações do LCC (Líquido da Casca da Castanha de Caju). Ver. Quím. Ind., 695,15-19.
- Moura, C.F.H. (1998). Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Brasil.
- NewKirk, A.E. (1960). Thermogravimetric Measurements. Anal. Chem, 32, 1558-1563.
- NOSB Material Database (1999). November 25, 1-4.
- Ogada, T. and Werther, J. (1996). Combustion characteristics of wet sludge in a fluidized bed: release and combustion of the volatiles. Fuel, 75, 617–626.
- Orme, S., and Kegley (2004). PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network.
- Ravikumar, R.V.S.S.N., Chandrasekhar, A.V., Reddy, B.J., Reddy, Y.P., Ikeda, K. (2002). X-Ray Powder Diffraction, DTA and Vibrational Studies of  $\text{CdNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  Crystals. Cryst. Rs. Technol., 37, 1127-1132.
- Reeve, R.N. (1994). Environmental Analysis. Wiley, Chichester.
- Shimizu, K., Del Amo, Y., Brzezinski, M.A., Stucky, G.D., Morse, D.E. (2001). A novel fluorescent silica tracer for biological silicification studies. Chemistry & Biology, 8, 1051-1060.
- Smith, N., Williams, J., Plucknett, D., Talbot, J. (1992). Tropical Forests and their Crops. New York: Comstock Publishing.
- Sondhi, S.P. and Pruthi, J.S. (1980). Effect of variety/strain and stage of maturity on the quality of cashew apples. Indian Journal of Horticulture, 37, 270-375
- Stern, W.B., Gerber Y. (2004). Potassium-Calcium glass: new data and experiments. Archaeometry, 46, 137-156.
- Taylor, L. (1998). Herbal Secrets of the Rainforest. New York: Prima Publishing.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beston, J. D., Haulin, J. L. (1993). Soil fertility and fertilizer. New York: Macmillan.
- Vaughan, J.G. and Geissler, C. (1997). The New Oxford Book of Food Plants. New York: Oxford University Press.
- Werther J, Ogada T, Borodulya V.A, Dikalenko V.I. (1995). Devolatilisation and combustion kinetic parameters of wet sewage sludge in a bubbling fluidized bed furnace. In: Proceedings of the Institute of Energy's 2nd International Conference on Combustion and Emission Control, London, UK, 4–5 December, pp. 149–158.
- Williams, J.R., Pillay, A.E., El Mardi, M.O., S.M.H., Al-Lawati, S.M.H., Al-Hamdi, A. (2005). Levels of selectes metals in the Fard cultivar (date palm). Journal of Arid Environments, 60, 211-225.



---

---

# IMOBILIZAÇÃO DE INVERTASE EM CERÂMICAS DE CINZAS VOLANTES DE CARVÃO MINERAL

---

---

## 6.1 INTRODUÇÃO

### 6.1.1 ENZIMAS

O termo enzima é derivado de "en" = dentro e "zima" = levedura. As enzimas são moléculas de proteína bastante grandes e complexas formadas dentro das células de todos os seres vivos, plantas, fungos, bactérias e organismos microscópicos unicelulares, que agem como catalisadoras em reações bioquímicas. Um catalizador é uma substância que altera a velocidade da reação sem ser consumida nem produzida nela. Esta alteração pode ser no sentido da aceleração, no caso dos catalizadores positivos, ou do retardamento, no caso dos catalizadores negativos ou estabilizadores (Bender, 1964). A generalidade das catálises biológicas decorre no sentido da aceleração. Uma enzima é tipicamente uma proteína de dimensões elevadas que contém um ou mais centros ativos. É nesses centros que ocorrem as interações com as moléculas do substrato. Estes centros ativos têm estruturas compatíveis apenas com certas moléculas com uma relação topológica semelhante à que existe entre a chave e a respectiva fechadura. A estrutura enzimática rígida só se liga a moléculas cuja forma corresponda exatamente a um encaixe do centro ativo. A enzima e a substância sobre a qual vai agir (chamada substrato) formam um composto intermediário que, posteriormente, sofre um desdobramento, regenerando a enzima (Fig.6.1) (Cornish e Bowden, 1976).

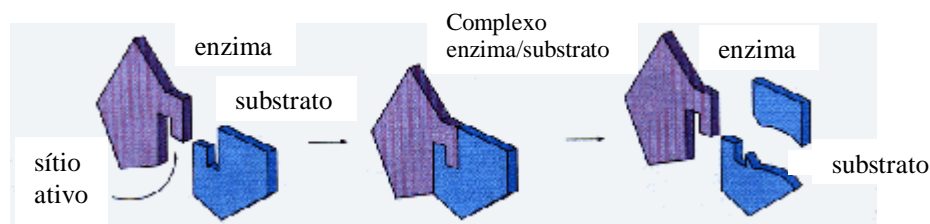


Figura 6.1. Ação catalítica das enzimas.

Existem três métodos para nomenclatura enzimática (Fersht, 1985):

- Nome Recomendado: Mais curto e utilizado no dia a dia de quem trabalha com enzimas. Utiliza o sufixo "ase" para caracterizar a enzima. Exs: Urease, Hexoquinase, Peptidase, etc.
- Nome Sistemático: Mais complexo e nos dá informações precisas sobre a função metabólica da enzima. Ex: ATP-Glicose-Fosfo-Transferase
- Nome Usual: Consagrados pelo uso; Exs: Tripsina, Pepsina, Ptialina.

As enzimas são classificadas segundo os compostos nos quais elas agem:

- Lipases: atuam nas gorduras decompondo-as em glicerol e ácidos graxos;
- Catalases: decompõem a água oxigenada;
- Amilases: decompõem os amidos em açúcares mais simples;
- Proteases: decompõem as proteínas;
- Celulases: decompõem a celulose;
- Pectinases: decompõem a pectina;
- Xilanases: decompõem a xilana;
- Isomerases: catalizam a conversão da glicose em frutose;
- Beta-glucanases: decompõem a beta-glucana; outras.
- Invertases: decompõem a sacarose.

### 6.1.2 ENZIMAS E BIOTECNOLOGIA

As enzimas, como mediadores de reações de síntese e degradação, são catalisadores muito mais eficientes que as técnicas de catálise química convencionais, sendo por isso, atualmente, muito exploradas pela biotecnologia. Sua utilização tem gerado grandes investimentos, incluindo uma grande diversidade de processos industriais, produtos de consumo e no campo dos biosensores (Bender et al, 1964; Cornish-Bowden, 1976; Ferst, 1985). Um importante fator determinante da utilização das enzimas em processos tecnológicos é o seu custo. Várias enzimas que estão comercialmente disponíveis no mercado apresentam preços variando desde muito baixos até extremamente altos. As enzimas são moléculas catalisadoras, usadas como mediadores e não como o produto final dos processos químicos que participam, não sendo gastas diretamente nestes processos. Seu alto custo inicial deveria ser, então, secundário a sua utilização. Porém devido à desnaturação, as enzimas perdem a atividade catalizadora com o tempo. Elas deveriam ser estabilizadas contra a

desnaturação para serem utilizadas de uma maneira eficiente. Quando são usadas em uma forma solúvel, retêm alguma atividade depois da reação; entretanto, nesta forma, não podem ser recuperadas para posterior reutilização sendo perdidas na forma de resíduos. Estes resíduos permanecem como contaminante no produto e sua remoção pode envolver custos de purificação extras. Para eliminar esta perda e aumentar a produtividade devem ser usados métodos simples e econômicos que habilitem a separação da enzima, do produto da reação.

### 6.1.3 IMOBILIZAÇÃO

O modo mais fácil de alcançar isto é separando a enzima e o produto durante a reação, formando um sistema polifásico: uma fase que contém a enzima e a outra fase que contém o produto. A enzima é “aprisionada” dentro de sua fase, tornando-se insolúvel, permitindo a reutilização sem contaminação do produto. Outras moléculas, inclusive os reagentes, podem mover-se livremente entre as duas fases. Isto é conhecido como imobilização e pode ser feita fixando-se a enzima em outro material, conhecido como suporte de fixação. O termo imobilização não significa, necessariamente, que a enzima não pode mover-se livremente dentro de sua fase, embora este seja o caso mais frequentemente. Uma variedade de materiais insolúveis pode ser usada para a imobilização, tais como matrizes polímeras ou materiais inorgânicos normalmente inertes (Chaplin e Bucke, 1990). A elevada eficiência apresentada por moléculas biológicas na seleção de reagentes e na especificidade da interação com seus sítios de reação tem levado a um crescente interesse na pesquisa de suportes imobilizados com enzimas (Mansur, 1999).

A imobilização de enzimas acarreta frequentemente uma despesa adicional e só é levada a cabo se representa vantagens econômicas e técnicas em relação a sua utilização em solução. O benefício mais importante é a separação fácil da enzima dos produtos da reação catalisada, evitando sua contaminação, particularmente se a enzima é notoriamente tóxica. Também permite que processos contínuos sejam praticáveis, com uma economia considerável de enzimas. A imobilização afeta frequentemente a estabilidade e atividade da enzima, porém, as variáveis envolvidas no processo de imobilização são normalmente controláveis, fazendo com que as propriedades catalíticas sejam pouco alteradas (Kennedy e Cabral, 1987; Engasser e Horvath, 1976).

Existem quatro métodos principais de imobilização de enzimas (Chaplin, 1990; Martinek et al, 1977; Woodward, 1985): adsorção física, adsorção química, confinamento em

matriz e confinamento em membrana. Na adsorção física, moléculas de enzimas são imobilizadas no suporte por meio de forças de atração eletrostáticas, a força de van der Waals (Fig.6.2a), enquanto que na química, esta imobilização se dá por ligações covalentes (Fig.6.2b).

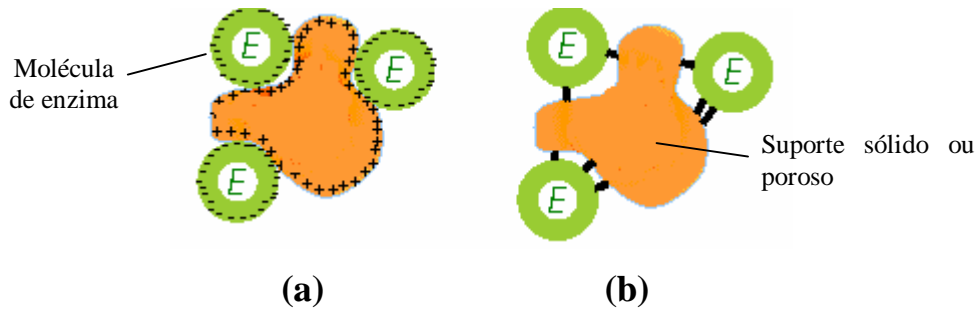


Figura 6.2. Imobilização de enzimas em suporte sólido ou poroso. Em (a), imobilização por adsorção física (força de van der Waals); em (b), por adsorção química (ligações covalentes).

No confinamento em matriz, as enzimas são imobilizadas por retenção em uma matriz polímera fibrosa (Fig.6.3a), enquanto que no confinamento em membrana, em uma membrana semipermeável (Fig.6.3b). A adsorção química por ligações covalentes é o método mais utilizado em processos industriais.

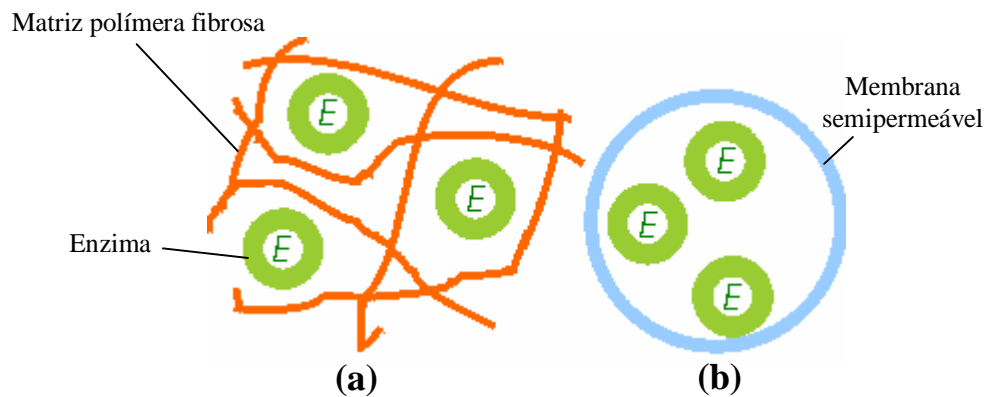


Figura 6.3. Imobilização de enzimas em matriz e membrana. Em (a), imobilização por confinamento em matriz; em (b), por confinamento em membrana.

A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá, essencialmente, de dois fatores: a) das características peculiares da enzima; b) das condições de uso da enzima imobilizada. Dado a variabilidade desses fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral e nem um suporte universal. Geralmente as condições de imobilização para cada enzima só poderão se estabelecidas empiricamente. O procedimento consiste em se

---

imobilizar a enzima em vários suportes por meio de diferentes métodos, avaliando-se, a seguir, a atividade do sistema imobilizado. Logicamente o binômio suporte-método mais adequado será aquele que propiciar mais atividade após imobilização (Picher, 1975; Lima, 2001).

Todos os métodos de imobilização de enzimas envolvem um conjunto de técnicas físicas e químicas, descritas por um protocolo desenvolvido para tal fim. Este protocolo inclui uma série de compostos químicos que preparam o suporte para que a imobilização se realize. Por exemplo, os trialcoxysilanes como a  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane permitem que materiais inertes como vidros sejam imobilizados (Fig.6.4). O Glutaraldeído é outro composto que pode ser usado para unir enzimas entre si ou a suportes (Fig.6.5). É particularmente útil para produzir membranas de enzimas imobilizadas; para uso em biosensores e ainda para a união de enzimas a proteínas específicas (Chaplin e Bucke, 1990).

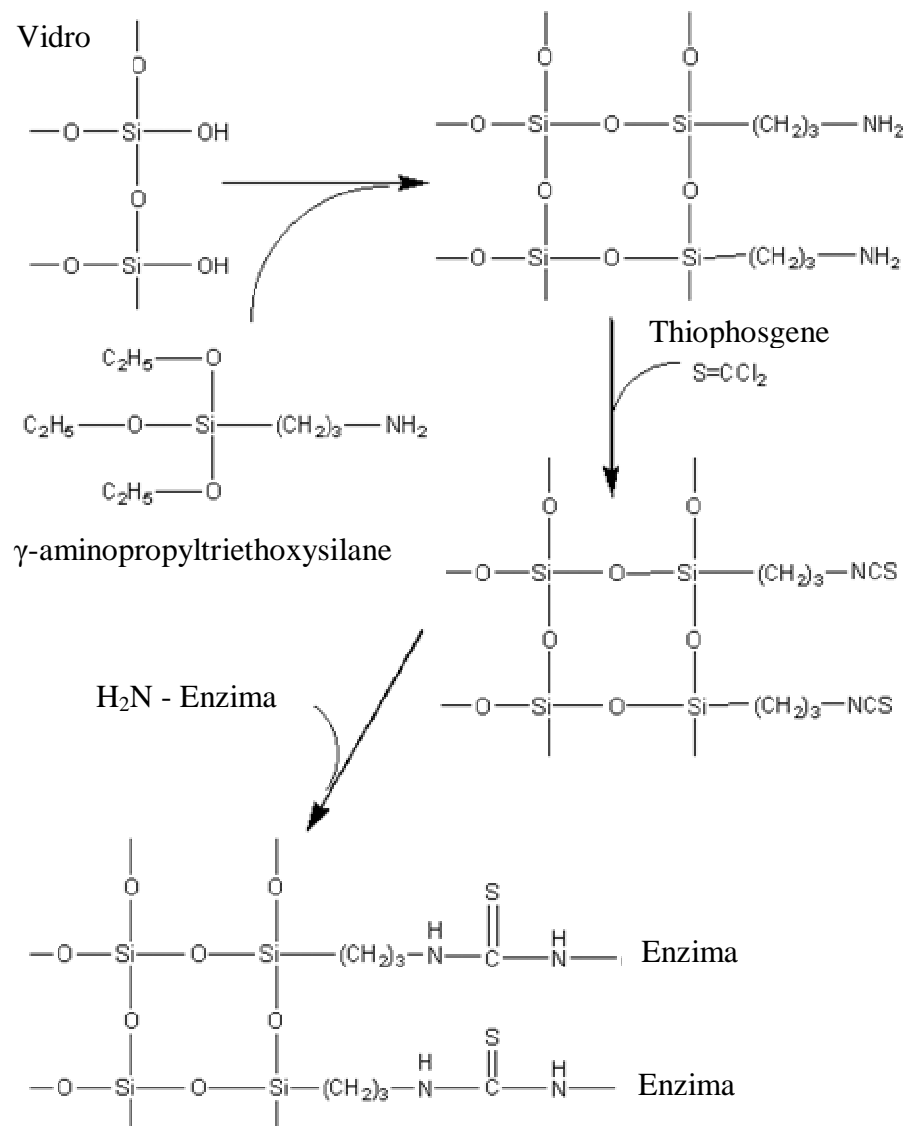


Figura 6.4. Ação do  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane na imobilização de enzimas.

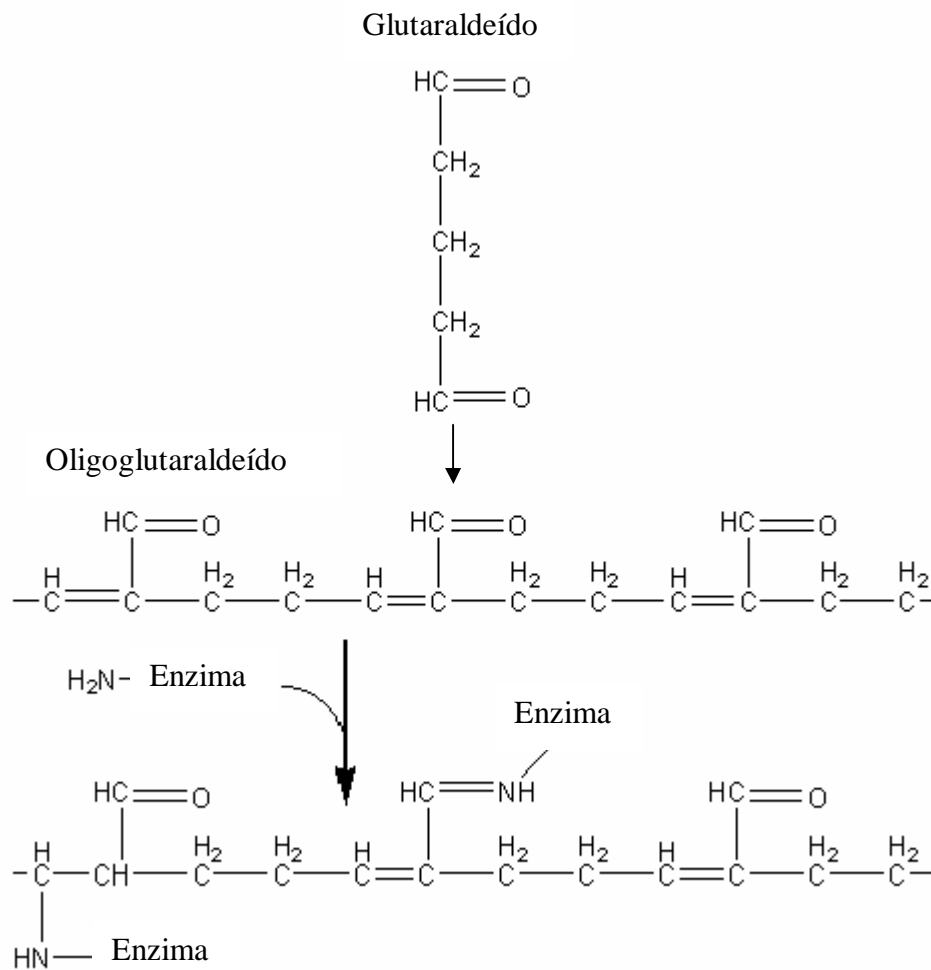


Figura 6.5. Ação do Glutaraldeído na imobilização de enzimas.

Uma vez imobilizada, a enzima pode ser utilizada na reação de catálise dos reagentes para a formação do produto, sem que ocorra sua perda na forma de resíduos (Fig.6.6).

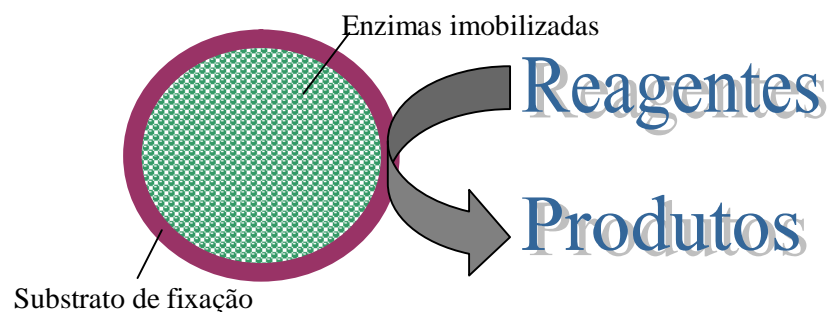


Figura 6.6. Reação mediada por suporte imobilizado por enzimas.

O comportamento cinético de uma enzima imobilizada pode diferir significativamente daquele quando em solução. As propriedades de uma enzima podem ser modificadas por escolha do protocolo de imobilização adequado, considerando que o mesmo método pode ter efeitos apreciavelmente diferentes em enzimas diferentes. Estas modificações podem ser ocasionadas por alterações na conformação da enzima devido ao procedimento de imobilização ou a presença e natureza do suporte de fixação (Chaplin, 1990; Martinek et al., 1977).

Na literatura existem inúmeros materiais inertes que podem ser usados para imobilizar enzimas. A natureza física desses suportes pode variar, desde materiais geliformes até superfícies sólidas (lâminas de aço, pérolas de vidro, por ex.), recobertas com alguma substância capaz de interagir com a enzima. Os suportes inertes podem ser classificados como não poroso (vidro, sílica, aço), microencapsulado (trietado de celolose), entrelaçado (policrilamida, PVA) e macroporoso (alumina, sílica). O primeiro apresenta alta estabilidade das ligações suporte-enzima frente ao pH de utilização do sistema imobilizado; o segundo, com porosidade em torno de 35 Å, estabilidade moderada; o terceiro com porosidade variada, possui estabilidade baixa e o último, porosidade entre 200-1000Å, apresenta elevada estabilidade (Illanes, 1994; Lima et al., 2001). Os suportes porosos devem possuir poros com dimensões um pouco maiores que a das partículas da enzima a ser imobilizada (Zheng, 2002).

Com o advento da técnica de imobilização foi possível diversificar as aplicações, podendo-se citar: a adaptação de reatores químicos convencionais a processo enzimáticos contínuos; em eletrodos enzimáticos (Guilbault et al., 1991), dispositivos formados basicamente de um sensor e da enzima imobilizada; a técnica para diagnóstico clínico chamada enzimaimunoensaio (Porstamnn e Kiessig, 1992), a qual explora a já conhecida reação antígeno-anticorpo e usando a enzima como marcador; a latenciação de fármacos através do aprisionamento de enzimas em lipossomas e microcápsulas ou em dispositivos extracorpóreos. Uma aplicação importante que será destacada neste capítulo é a da hidrólise (inversão) da sacarose, muito utilizada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

#### 6.1.4 AÇÚCAR INVERTIDO

A sacarose é um dissacarídeo, de fórmula  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , encontrado principalmente na cana de açúcar e na beterraba. Estruturalmente, a sacarose resulta da união de uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, com a eliminação de uma molécula de água



(Fig.6.7) (Nelson e Griffin, 1975; Vitolo e Carreira, 1992; Lehninger, 1994). Produtos feitos a base deste dissacarídeo apresentam o inconveniente da cristalização sobre determinadas condições (concentração, temperatura, etc).

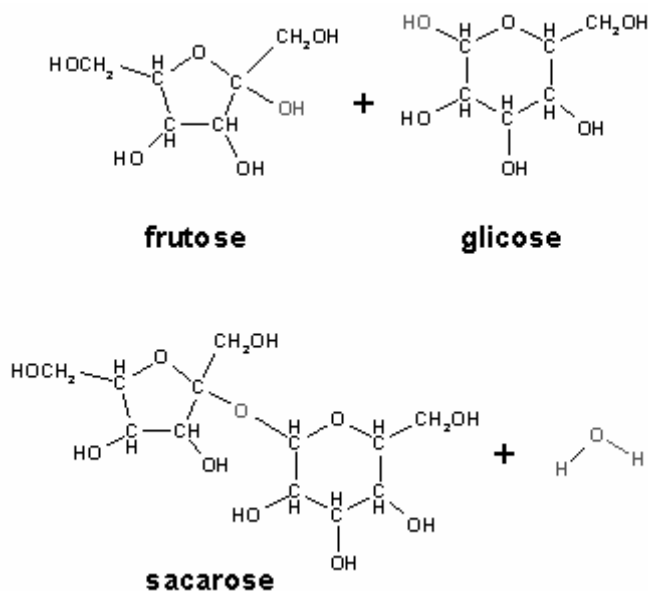


Figura 6.7. Reação que origina uma molécula de sacarose a partir da frutose e da glicose.

A sacarose pode ser hidrolisada por ácidos diluídos ou pela ação da enzima invertase, liberando a glicose e a frutose que existem em sua estrutura. Essa reação é denominada inversão da sacarose, pois durante a sua realização, o plano da luz polarizada desvia-se da direita (+66,5°) para a esquerda (-39,6°). O chamado açúcar invertido é uma mistura de glicose e frutose. O mel, por exemplo, é formado principalmente de açúcar invertido. Os produtos da hidrólise completa ou parcial da sacarose produzidos pela invertase ( $\beta$ -fructofuranosidase – E.C.3.2.1.2.6) são largamente utilizados na produção de cremes, geléias, mel artificial, adoçantes, açúcar líquido, etc. devido ao sua baixa cristalização, comparado com a sacarose. A invertase, quando imobilizada em suportes apropriados e utilizada na hidrólise da sacarose, representa vantagens técnicas e econômicas, já que evita a perda da enzima durante o processo, além da contaminação (resíduos de enzima) do produto resultante (açúcar invertido) (Vitolo, 1989). A inversão da sacarose pode ser obtida através da imobilização da invertase em suportes insolúveis.

### 6.1.5 IMOBILIZAÇÃO DA INVERTASE

A imobilização da invertase em suportes orgânicos tais como, palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar tem sido utilizada, porém possui como desvantagens a possibilidade de liberação de partículas do suporte durante o processo de hidrólise. Suportes inorgânicos têm sido utilizados como método de substituição, destacando o vidro poroso. Entretanto, a utilização de compostos cerâmicos tem demonstrado ser muito promissor comparando em qualidade ao vidro, além de ser bastante econômico. As cinzas resultantes da queima de carvão mineral de termelétricas, além do baixo valor agregado (são resíduos), apresentam grande quantidade de fases amorfas (vítreas) de silicatos e alumino silicatos importantes em processos de imobilização, tornando-se fortes candidatas a material para a preparação de suportes cerâmicos (Weetall e Havewala, 1972).

### 6.1.6 CINZAS DE CARVÃO MINERAL

O carvão mineral (Fig 6.8a) é originado do processo de eliminação do  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , e  $\text{H}_2\text{O}$  (fossilização) da madeira e outros fósseis, há milhões de anos. Ocorre em associação com uma variedade de minerais inorgânicos, entre eles os alumino silicatos (argilas minerais), carbonatos (calcita –  $\text{CaCO}_3$  e dolomita -  $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ), sulfetos (pirita –  $\text{FeS}_2$ ), cloritas ( $(\text{Mg,Al,Fe})_{12}(\text{Si, Al})_8\text{O}_{20}(\text{OH})_{16}$ ), sílica (quartzo –  $\text{SiO}_2$ ), dentre outros; e uma variedade de óxidos, como óxido de Ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), óxido de Alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), óxido de Titânio ( $\text{TiO}_2$ ), óxido de Cálcio ( $\text{CaO}$ ), óxido de Magnésio ( $\text{MgO}$ ), óxido de Fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ), óxido de Sódio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), óxido de Potássio ( $\text{K}_2\text{O}$ ), óxidos de Enxofre ( $\text{SO}_2$  e  $\text{SO}_3$ ). Apresenta ainda elementos traços (metais pesados), tais como o Manganês (Mn), Lítio (Li), Escândio (Sc), Vanádio (V), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Gálio (Ga), Estrôncio (Sr), Ítrio (Y), Zircônio (Zr), Nióbio (Nb), Molibdênio (Mo), Cádmio (Cd), Estanho (Sn), Antimônio (Sb), Bário (Ba), Lantânio (La), Tungstênio (W), Chumbo (Pb) e Arsênio (As). Elementos traços são elementos que ocorrem em sistemas naturais em pequenas concentrações e apresentam densidade igual ou acima  $5\text{g}/\text{cm}^3$  (Victor, 1988; Lutgens, 2001; Skinner et al, 1999).

Quando queimado nas usinas termelétricas, para geração de energia, o carvão mineral origina uma grande quantidade de resíduos industriais, na forma de escórias, cinzas de fundo (do inglês, “botton ash”) e cinzas volantes (do inglês, “fly ash”) (Fig.6.8b) Sua

composição está associada a do carvão de origem e as condições em que a combustão foi realizada, podendo apresentar novas substâncias, a partir de diferentes combinações de seus elementos constituintes, alteração de fases ou ainda, manter outros compostos inalterados, principalmente aqueles com altos pontos de fusão (Smoot e Smith, 1985; Poop, 1988). Por exemplo, o quartzo e o coríndon são tipicamente encontrados, mesmo após a combustão, devido aos seus altos pontos de fusão e o curto intervalo de tempo que as partículas ficam submetidas a altas temperaturas. Contudo, os minerais argilosos podem entrar em fusão, formando alumino silicatos cristalinos e vítreos. Elementos como Fe, Ca e Mg podem combinar-se com o oxigênio do ar para formar óxidos, como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), cal ( $\text{CaO}$ ) e o periclásio ( $\text{MgO}$ ) (Tishmack, 1996). Os vários minerais que foram identificados por difração de raios-X em cinzas volantes e de fundo, incluíram: quartzo ( $\text{SiO}_2$ ), mulita ( $\text{Al}_6\text{Si}_2\text{O}_{13}$ ), aluminato de tricálcio ( $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$ ), melilita ( $\text{Ca}_2(\text{Mg,Al})(\text{AlSi})_2\text{O}_7$ ), merwinita ( $\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{SiO}_4)_2$ ),  $\text{C}_2\text{S}$  ( $\text{Ca}_2\text{SiO}_3$ ), ferrite spinel ( $(\text{Mg,Fe})(\text{Fe,Al})_2\text{O}_4$ ), magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), cal ( $\text{CaO}$ ), anidrida ( $\text{CaSO}_4$ ), periclásio ou magnesita ( $\text{MgO}$ ) e sulfatos alcalinos ( $(\text{Na,K})_2\text{SO}_4$ ) (Helmuth, 1987; Hemmings e Berry, 1988; McCarthy, 1988; McCarthy et al, 1993; Stout, et al, 1988; Thompson et al, 1988).

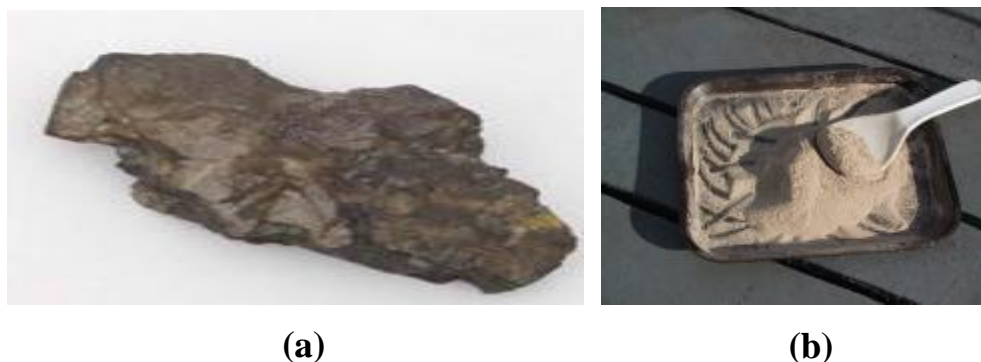


Figura 6.8. Pedra de carvão mineral (a) e suas cinzas volantes (b), após a queima em usina termelétrica.

As cinzas de carvão mineral possuem uma quantidade excessiva de enxofre e ferro que são tóxicas para as plantas, além de apresentarem muita resistência a decomposições, o que acarreta problemas ecológicos se forem simplesmente devolvidas ao meio ambiente (Sartori e Assini, 2001; Kress et al, 1998; Stewart e Konetsky, 1998; Reash et al, 1988). Devido a questões ambientais, baixo valor agregado e diversidade em sua composição química, têm-se, nos últimos anos, buscado aplicações para estes resíduos. A reciclagem tem sido feita por intermédio da construção civil, usando-os como aditivo na

fabricação de cimento e concreto. Além disto, também se tem pesquisado o uso de cinzas resultantes da queima de carvão para fabricação de materiais cerâmicos (Karmanski e Deregowski, 1995; Parras et al, 1996; Queralt, 1997; Wei e Hung, 2001; Santos, 2001; Jung, 2002), tais como: vitrocerâmicos (Cioffi, 1995; Barbieri et al, 2000; Romero et al, 2001; Park e Heo, 2002), filtros (Pila e Loeffler, 1996; Jo, 1997; Berbner, 1997; Park et al, 2001; Lime et al, 2001), refratários e materiais de construção (Hughes, 1996; Wiesbusch e Seyfried, 1997; Sevelius, 1997). Entretanto, foi questionada a utilização das cinzas de carvão mineral na fabricação de cerâmicas devido à presença de elementos traço e conseqüente radioatividade natural (Beretka, 1995). É bem conhecido que vários elementos traços estão presentes no carvão mineral. Uma avaliação da concentração destes elementos em cinzas foi levada a cabo, em 1990, por Eary et al (1990). De acordo com estes estudos, algumas cinzas têm altas concentrações de As, B, Pb, Ni, Se, V e Zn. Após a combustão do carvão, alguns destes elementos podem permanecer nas cinzas enquanto outros podem escapar para a atmosfera nos gases formados durante a combustão. Porém, estudos de Wyszomirski e Brylska (1996) demonstraram que as quantidades de radioatividade produzidas pelas cinzas estão em níveis perfeitamente seguros no que se refere à saúde humana. Também salienta que sua utilização, na fabricação de materiais cerâmicos, representa uma solução pró-ecológica.

Estatísticas mostram que somente nos Estados Unidos, mais de 80 milhões de megagramas de cinzas de carvão mineral são produzidas anualmente (Gupta, 1996). Estima-se que a quantidade de cinzas geradas pelas termelétricas do sul do Brasil representam disponibilidade de três milhões de megagramas por ano de cinzas originadas da queima de carvão mineral, compostas de 65 à 85% de cinzas secas ou volantes e 15 à 35% de cinzas úmidas ou pesadas. Em geral de cada 100 megagramas de carvão mineral consumido pelas termelétricas são geradas 42 megagramas de cinzas, das quais 70% são extraídas a seco (cinzas secas ou volantes) e 30% por via úmida (cinzas úmidas ou pesadas). Devido às suas características físico-químicas, a cinza seca gerada é vendida a cimenteiras e concreteiras que as empregam no cimento Portland ou como adições minerais ao concreto; já as cinzas pesadas não alcançam o mesmo mercado constituindo assim um grande problema de ordem ambiental (Rocha, 1999).

### 6.1.7 OBJETIVOS

Neste capítulo, estudou-se o potencial de imobilização de inversase ( $\beta$ -fructofuranosidase-E.C.3.2.1.2.6) em cerâmicas produzidas com as cinzas volantes de carvão mineral da Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM), Candiota, Rio Grande do Sul e sua aplicação na hidrólise da sacarose, tanto em batelada (processos onde, terminada a reação, a enzima imobilizada pode ser separada da mistura final com relativa facilidade) como em reatores enzimáticos (recipiente ou série de recipientes que executam determinada conversão desejada através de meios de enzimáticos).

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 MATERIAIS

Foram utilizadas as cinzas volantes originadas da queima do carvão mineral da Usina Termelétrica Presidente Médici (cinzas UTPM), Candiota, Rio grande do Sul, Brasil. Apresentam os seguintes elementos químicos: Si (27%), Al (11,3%), Fe (3,7%), K (0,64%), Ti (0,50%), C (0,42%), Ca (0,38%), Na (0,11%), Mg (0,03%), P (0,01%), N (<0.01%), S (0,006%), Mn (368 mg/kg), Zn (70 mg/kg), Ni (62 mg/kg), Cr (48 mg/kg), B (24 mg/kg), Mo (<30 mg/kg), Cu (20 mg/kg), Pb (<10 mg/kg), Cd (<3 mg/kg); sendo o mais abundante o silício, seguido pelo alumínio. São formadas, basicamente, pelas fases cristalinas mulita, quartzo, anidrita e calcita, possuindo também, em quantidades menores, coríndon, hematita e outros, imersos em uma matriz vítrea cenosférica (fase amorfa). Os compostos de maior proporção em massa dentre as fases cristalinas são a mulita e o quartzo. Sua granulometria média é de 43,98  $\mu\text{m}$ , sendo detectados partículas com 0,30 e 400  $\mu\text{m}$ . Apresentam densidade média aparente de 2,50  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Em torno de 40 % de sua massa se concentra em um tamanho de particulado maior ou igual a 63  $\mu\text{m}$ ; 51 % entre 63 e 45  $\mu\text{m}$ ; 7 % entre 45 e 25  $\mu\text{m}$  e 2 % menores que 25  $\mu\text{m}$ . Partículas na forma de cenosferas correspondem a no mínimo 60 % da massa e do volume totais das cinzas. A calcita e a anidrita concentram-se em uma granulometria menor que 63  $\mu\text{m}$ . A transformação termogravimétrica significativa ocorre em torno de 720°C por ocasião da queima da calcita com liberação de  $\text{CO}_2$ . (Santos, 2001).

Como agente ligante para preparação de cerâmicas, foi utilizado glicerina P.A. da Sigma Chemical Co.

Para a imobilização, foi utilizada a invertase de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* 355 U/mg sólida) da Novo Nordisk (Brasil); glutaraldeído e sacarose da Sigma Chemical Co. e diversos reagentes complementares de grau analítico.

### 6.2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizados como suporte para a imobilização de enzimas, pastilhas cerâmicas produzidas com as cinzas UTPM, fornecidas pelo Instituto de Química e Geoquímica (IQG) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e com sílica em pó ( $\text{SiO}_2$ ) fornecida pelo Departamento de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As cerâmicas foram preparadas no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC), conforme a metodologia de Santos (2001): preparação da massa cerâmica com 5% de glicerina (agente ligante), cinzas UTPM e  $\text{SiO}_2$  nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100%; compactação uniaxial de ação simples durante 15s, com as pressões de 127,38, 254,76 e 318,45 MPa, em prensa hidráulica Sky; e sinterização na temperatura de 1200°C, durante 4 horas em forno tipo mufla, com taxa de aquecimento de 50°C/min e de resfriamento de aproximadamente 1°C/min. Os tipos de suportes preparados e suas características estão indicados na Tabela 6.1. Foram preparadas 10 amostras de cada tipo de suporte cerâmica. A Figura 6.9 mostra a fotografia de uma cerâmica tipo 1.

Tabela 6.1. Identificação dos suportes cerâmicos, conforme a pressão de compactação e composição da massa pré-cerâmica.

Tipo	Pressão (MPa)	Composição da massa pré-cerâmica
1	127,38	Cinzas UTPM
2	254,76	Cinzas UTPM
3	318,45	Cinzas UTPM
4	127,38	Cinzas UTPM+ 20% de $\text{SiO}_2$
5	127,38	Cinzas UTPM + 40% de $\text{SiO}_2$
6	127,38	Cinzas UTPM + 60% de $\text{SiO}_2$
7	127,38	Cinzas UTPM + 80% de $\text{SiO}_2$
8	127,38	100% de $\text{SiO}_2$

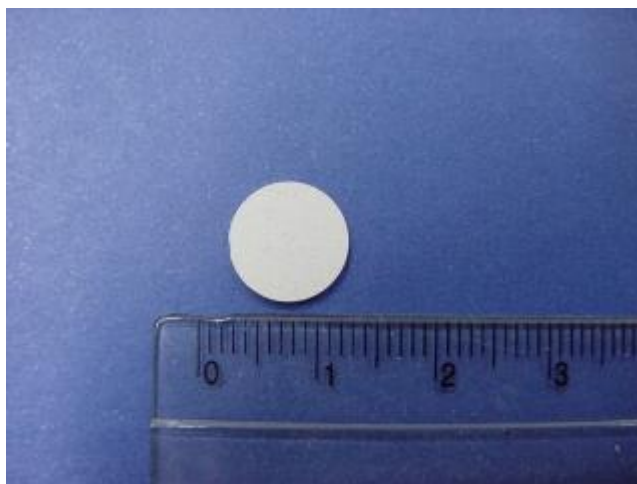


Figura 6.9. Suporte cerâmico utilizado para a imobilização (tipo 1). Os suportes apresentam 10mm de diâmetro e espessura variando entre 0,25 a 0,5mm.

### 6.2.3 SILANIZAÇÃO DAS CERÂMICAS E IMOBILIZAÇÃO DA INVERTASE

Para cada cerâmica (com massa variando entre 0,05 e 0,08g) foi adicionado 2ml de uma solução de  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane (APTS) a 3% em acetona (v/v) e posteriormente aquecida a 80°C “overnight”. Após este período os suportes foram lavados com acetona e água destilada. A seguir, foi adicionado o glutaraldeído como agente bifuncional, o qual irá ligar-se ao suporte e a enzima. Foi utilizado um volume de 2ml a 2,5% em 0,2 M de tampão fosfato a pH 7,0, por um período de 12h a 4°C. Os suportes foram posteriormente lavados exaustivamente com água destilada e tampão citrato de sódio a pH 5,0. A enzima em uma concentração desejada foi adicionada ao suporte por 4h a 4°C. Em seguida o suporte já com a enzima imobilizada foi novamente lavado exaustivamente com água destilado e solução tampão de citrato de sódio. O processo de sinalização e imobilização é esquematizado na Figura 6.10. A Silanização e imobilização da invertase foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 6.2.4 ENSAIO ENZIMÁTICO

A invertase imobilizada nas cerâmicas foi incubada em diferentes concentrações de sacarose sob agitação constante a pH 5,0, a 50 °C em tampão citrato de sódio a 0,1M por 64min. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNSA) descrito por Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática é definida como



sendo a quantidade de enzima suficiente para converter um mol de sacarose/min em pH 5,5 a 50 °C. O ensaio enzimático foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

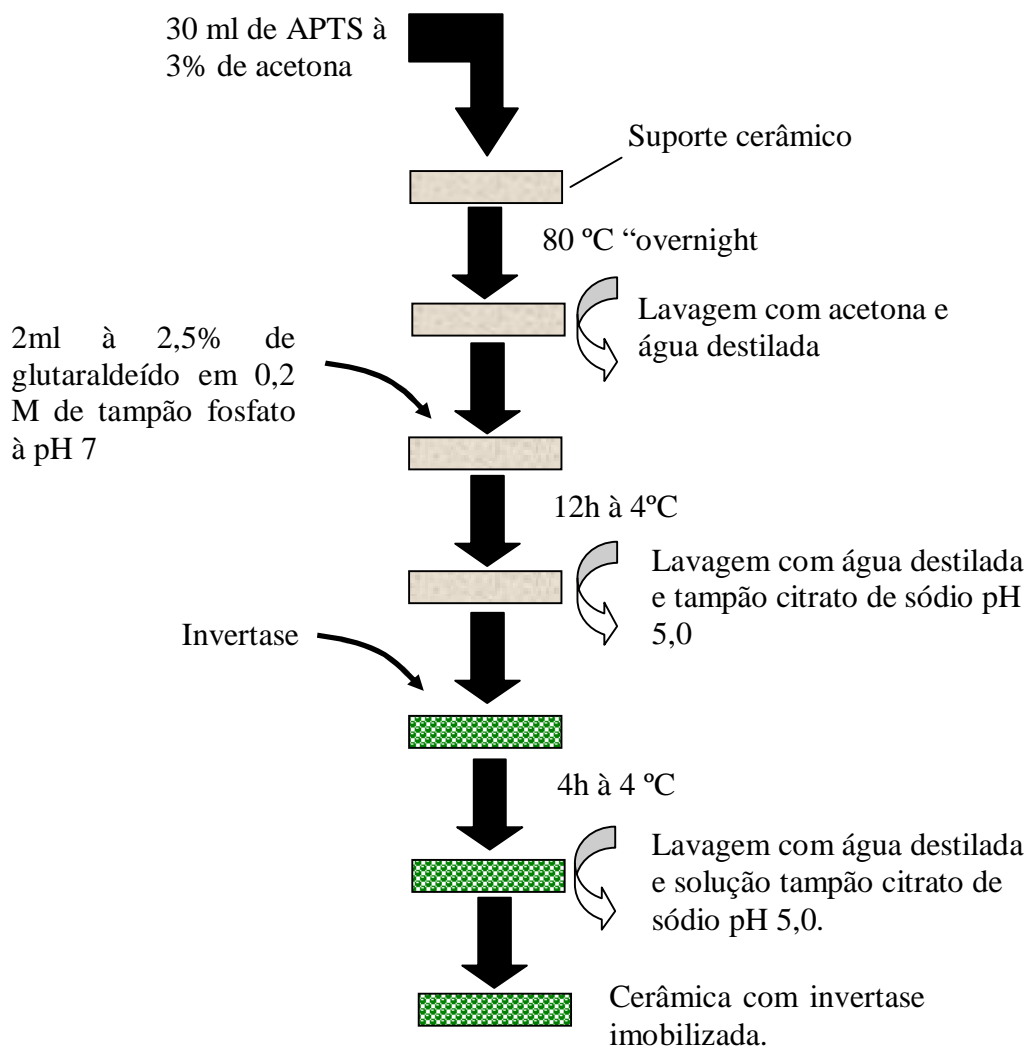


Figura 6.10. Processo de silanização e imobilização da cerâmica e imobilização da invertase.

### 6.2.5 HIDRÓLISE DA SACAROSE

Os experimentos em batelada tanto para a enzima solúvel quanto para a imobilizada foram realizados em tubos de 10ml com 4mL de solução a concentrações variáveis de sacarose, respectivamente 20, 40, 60 and 80% (w/v), preparadas em tampão citrato de sódio 0,1 M a pH 5,0 em 50°C. Os experimentos com o reator "up-flow" foram realizados em colunas de 7,5 cm x 14 mm, contendo a cerâmica de material imobilizado preparado. A solução de sacarose (100ml) em uma concentração de 60% foi preparada em tampão citrato de sódio 0,1M pH 5,0. Os experimentos foram realizados a 52°C com uma



velocidade de fluxo de 10mL/55 seg e uma pressão de 40,5 cm of H<sub>2</sub>O. A hidrólise da sacarose foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA SACAROSE COM A INVERTASE SOLÚVEL (5,39MG/ML)

Nos experimentos com a enzima solúvel foi utilizada uma concentração de 5,39 mg/ml de enzima ou 1913U (cada unidade de enzima hidrolisa 0,0036mg/mL min) em um volume final de 13mL, ou seja, cerca de 68,9mg de enzima (24459,5U). Foram utilizadas três concentrações de sacarose preparadas em tampão citrato de sódio para a manutenção constante do pH. As concentrações foram escolhidas baseadas nos substratos normalmente encontrados nas indústrias alimentícias. Nas três concentrações estudadas, verificamos (Fig.6.11) a hidrólise em torno de 100% nas concentrações de 400 e 600mg/mL de sacarose após 20 minutos de reações e cerca de 85% para a concentração de 800 mg/mL. A não conversão total da sacarose na concentração de 800 mg/mL possivelmente se deve a alta concentração de açúcar presente e o baixo teor de água, o qual é substrato necessário para a reação.

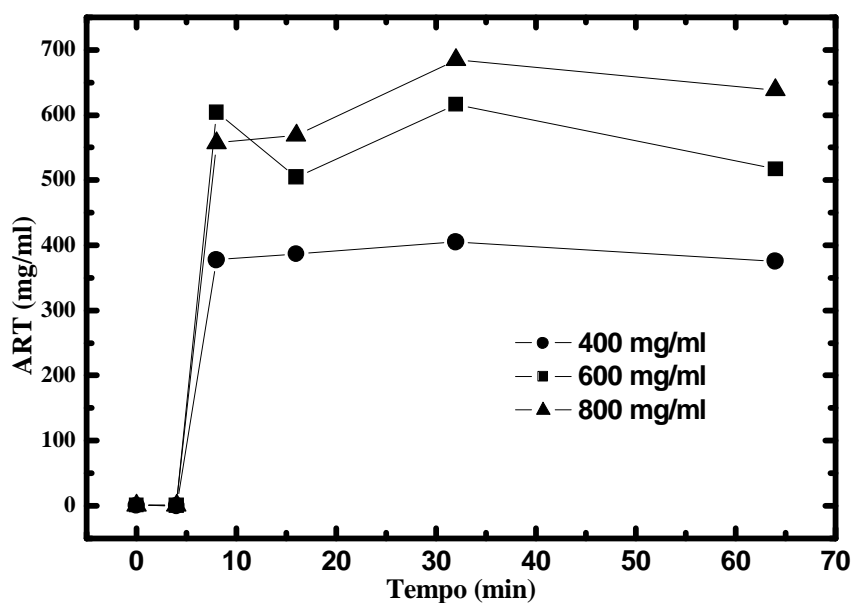


Figura 6.11. Ação da enzima invertase solúvel de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 6.3.2 CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA SACAROSE COM A INVERTASE IMOBILIZADA EM CERÂMICA TIPO 1, 2, E 3

Inicialmente foram realizados todos os experimentos utilizando soluções de sacarose de 60% , nas condições descritas anteriormente, por um período de 64min. Os resultados (Fig.6.12) demonstraram que houve uma hidrólise de cerca de 58 e 45% utilizando as cerâmicas tipos 2 e 3, respectivamente. Entretanto com as cerâmicas tipo 1 (menor pressão de compactação) a atividade foi muito inferior.

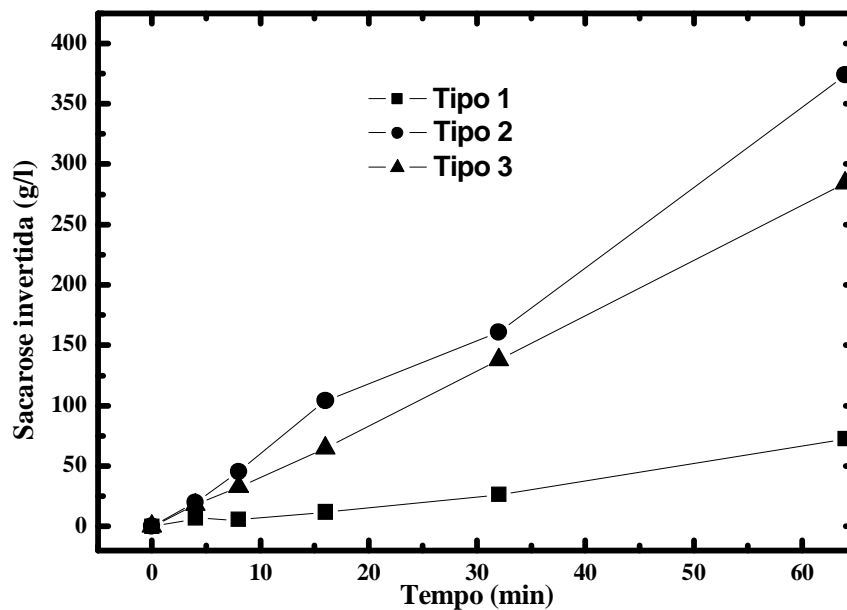


Figura 6.12. Atividade na inversão da sacarose (sacarose 600g/l) da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 1, 2 e 3, utilizando tampão citrato de sódio (0,1M) a pH 5,0 a 4°C. As cerâmicas tipo 1 são as com menor pressão de compactação.

Com o objetivo de determinar a estabilidade do material imobilizado determinamos a atividade da enzima imobilizada nas cerâmicas tipos 2 e 3 a cada 10 dias por um período de 30 dias. Constatou-se que a perda de atividade nos primeiros 20 dias não foi significativa. O sistema enzimático foi armazenado em tampão citrato de sódio a pH 5,0 a 4°C.

### **6.3.3 DETERMINAÇÃO DO MELHOR SISTEMA INVERTASE IMOBILIZADA APÓS O RE-USO**

Foram realizados experimentos de re-uso dos sistemas imobilizados para verificar a durabilidade do material imobilizado, utilizando a solução de sacarose a 60% (600mg/mL), nas condições descritas anteriormente. Verificamos que em todos os experimentos houve variações em termos da reprodutibilidade dos re-usos com todos os suportes cerâmicos. Este comportamento se deve a maneira como o experimento foi conduzido, uma vez que por conta da limitação de material o volume do substrato para cada 26 mg de suporte foi cerca de 3ml, daí a dificuldade na coleta da amostra. Entretanto, verificamos que para as cerâmicas tipo 3, com o terceiro re-uso, ainda tínhamos cerca de 90% de conversão após 60 minutos de experimentação.

### **6.3.4 RE-USO DAS CERÂMICAS TIPO 3 SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE**

Utilizou-se cerâmicas tipo 3 para realizar experimentos com diferentes concentrações de sacarose, devido a sua alta eficiência na inversão. Foram realizados inicialmente três grupos de experimentos com as mesmas concentrações utilizadas com a enzima solúvel. O processo de imobilização seguiu a descrição feita anteriormente, onde uma solução de 5,68mg/mL de proteína ficou em contato com o suporte cerâmico. Após os processos de lavagem verificamos que a atividade retida foi de 694,9U o que corresponde à cerca de 1,96mg de proteína. As cerâmicas tipo 3, foram incubadas com 3mL de solução de sacarose nas seguintes concentrações: 40, 60 e 80% a pH 5,0 a 50°C. Em seguida alíquotas foram retidas em intervalos de tempo e analisadas pelo método do DNSA. Foi observado que após um período de 64min cerca de 81% de inversão já havia ocorrido utilizando a solução de 60% de sacarose (Figs.6.13 – 6.15).

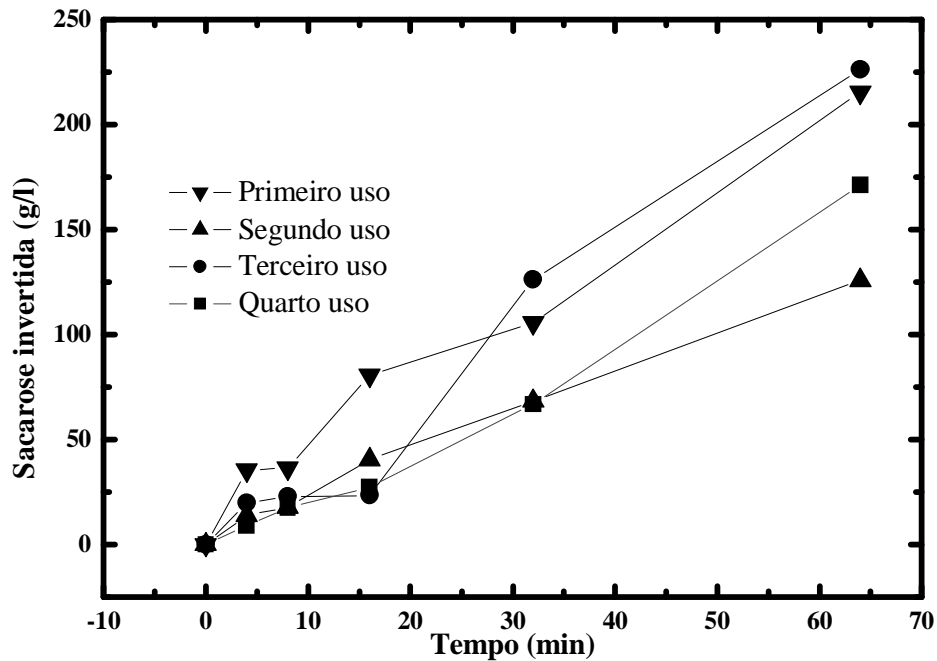


Figura 6.13. Efeito do re-uso sobre a atividade da invertase imobilizada em cerâmicas tipo 3, para uma concentração de 40% de sacarose.

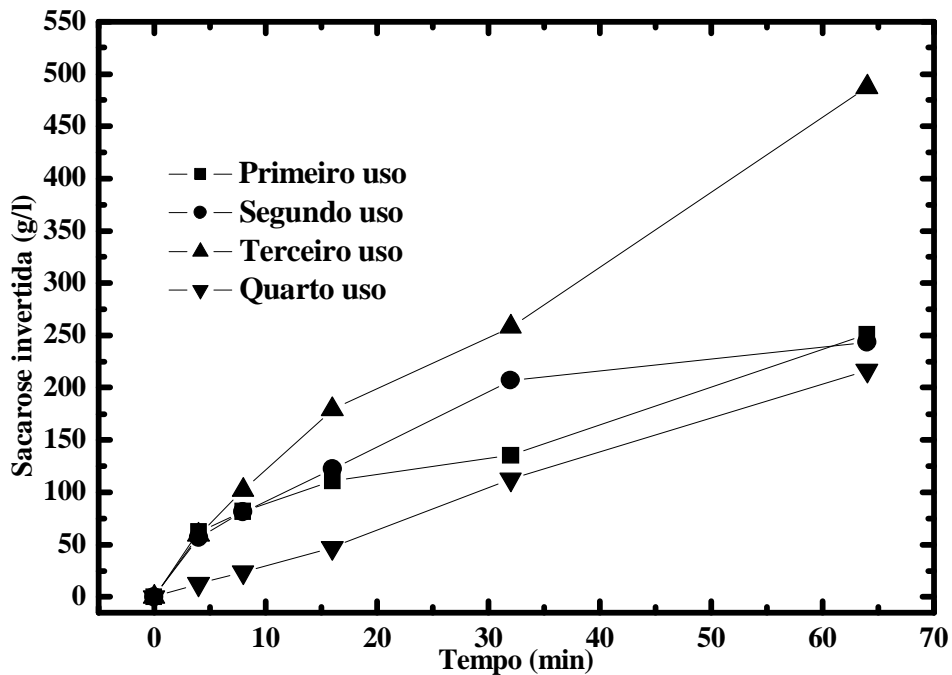


Figura 6.14. Efeito do reuso sobre a atividade da invertase imobilizada em cerâmicas tipo 3, para uma concentração de 60% de sacarose.

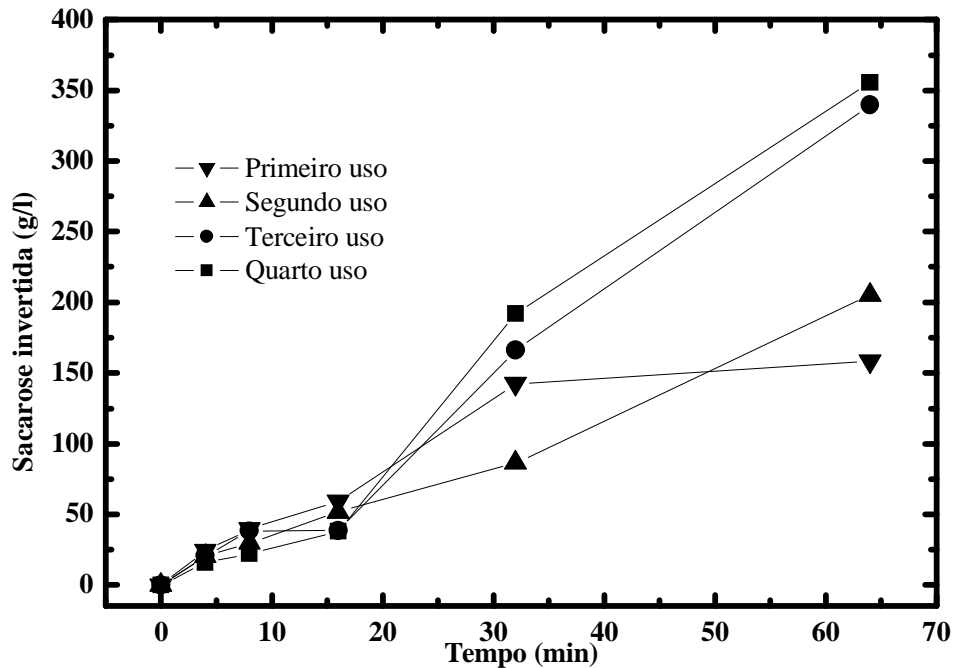


Figura 6.15. Efeito do re-uso sobre a atividade da invertase imobilizada em cerâmicas tipo 1, para uma concentração de 80% de sacarose.

### 6.3.5 EFEITO DA ATIVIDADE DA INVERTASE IMOBILIZADA EM CERÂMICAS COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE ÓXIDO DE SILÍCIO

Foram realizados testes com diversas concentrações de invertase (0,1 – 1,6 mg/mL) nas cerâmicas preparadas com a mistura de cinzas UTPM e sílica, em diversas concentrações (tipos 4, 5, 6, 7 e 8) e com pressão de compactação de 127,38MPa. O objetivo aqui foi verificar alguma alteração nas cerâmicas de baixa atividade enzimática, com o acréscimo de sílica. Entretanto, as cerâmicas mistas (cinzas + sílica) continuaram apresentando baixa inversão de sacarose. O conteúdo de sílica não interferiu na atividade enzimática (Figs 6.16 – 6.20).

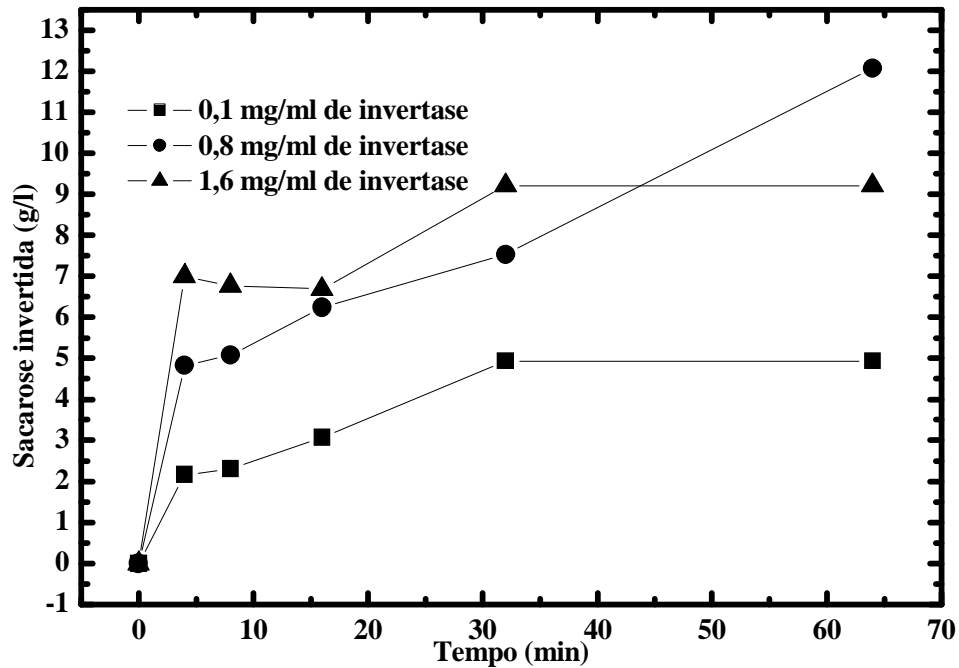


Figura 6.16. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmicas de cinzas UTPM com 20% de SiO<sub>2</sub> (tipo 4).

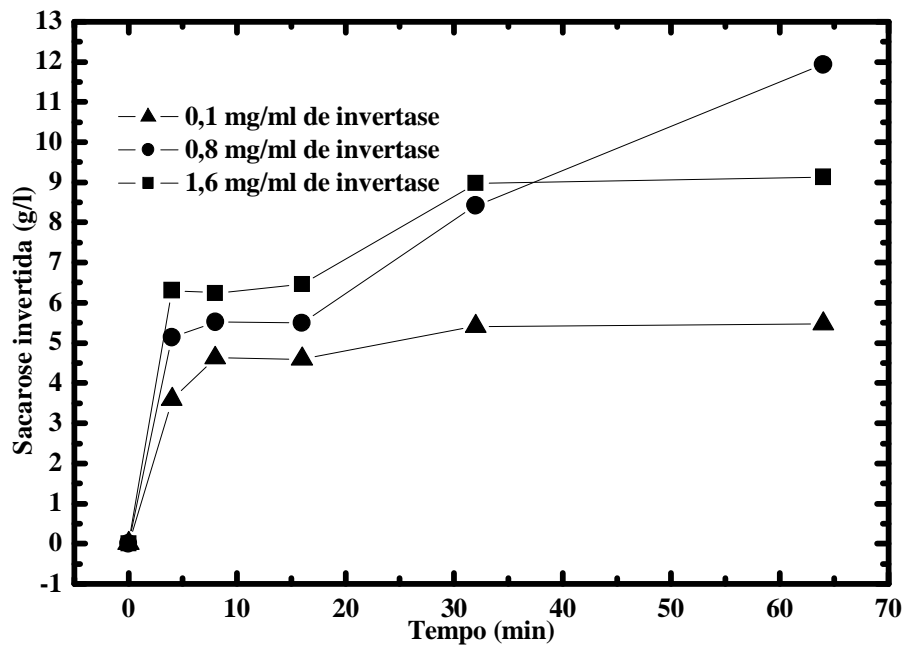


Figura 6.17. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 40% de SiO<sub>2</sub> (tipo 5).

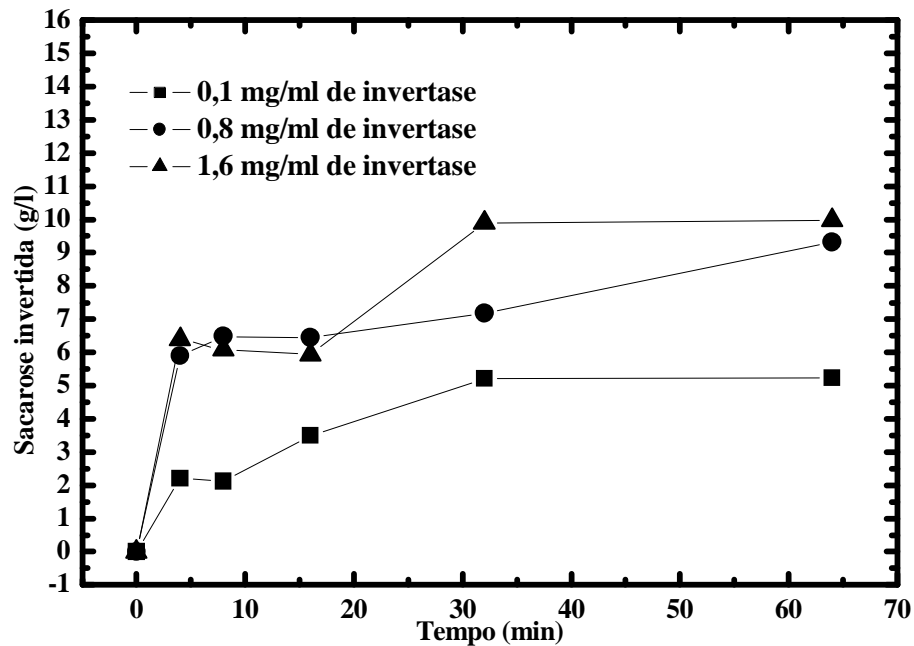


Figura 6.18. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 60 % de SiO<sub>2</sub> (tipo 6).

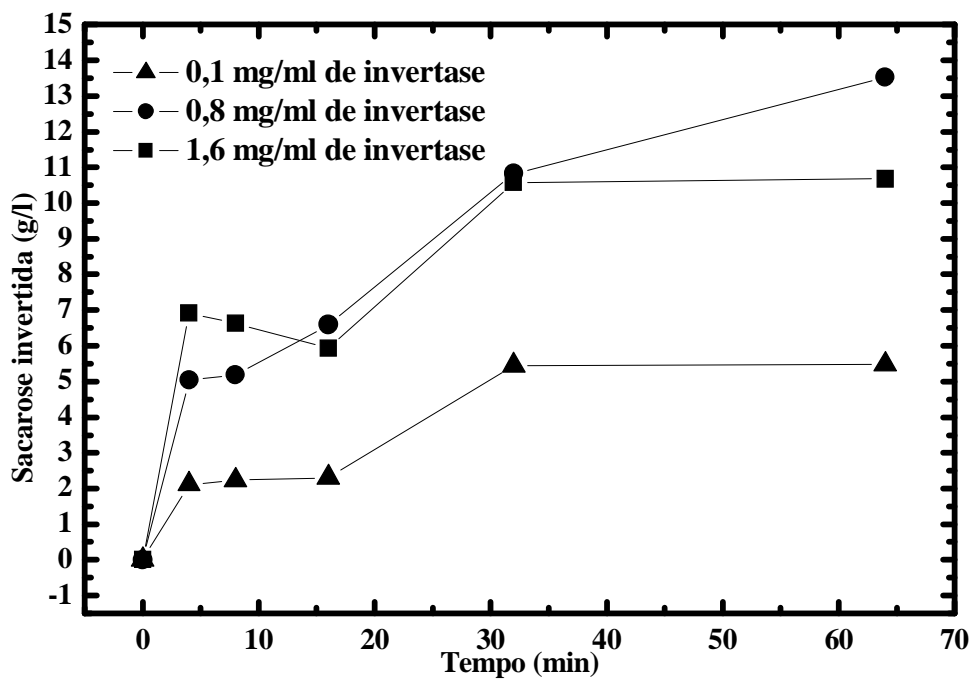


Figura 6.19. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 80 % de SiO<sub>2</sub> (tipo 7).

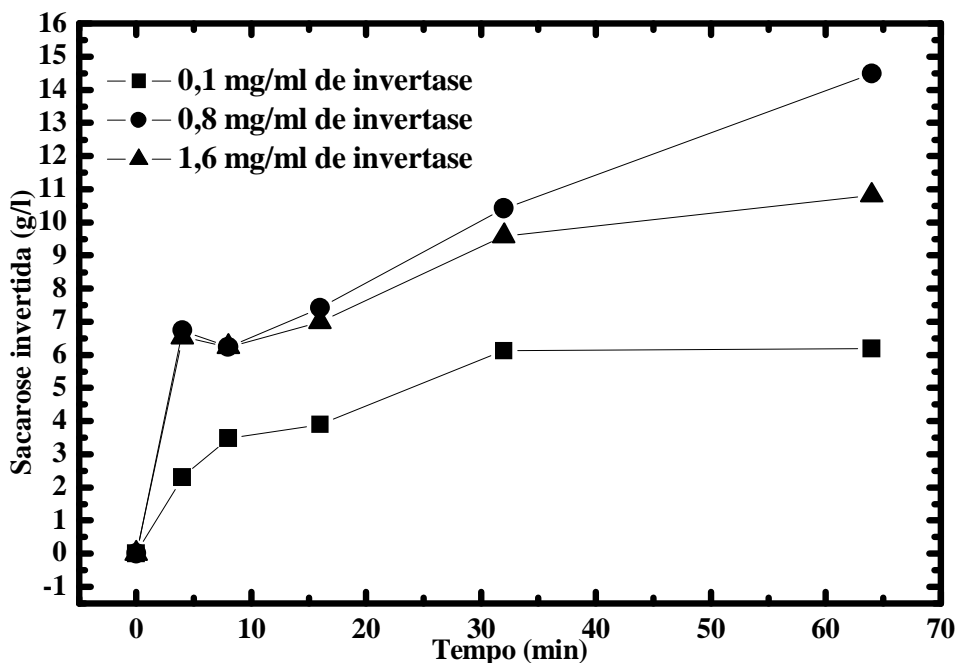


Figura 6.20. Efeito da atividade de diferentes concentrações da invertase imobilizada em cerâmica de cinzas UTPM com 100 % de SiO<sub>2</sub> (tipo 8).

### 6.3.6 EFEITO DA ATIVIDADE DA INVERTASE IMOBILIZADA NAS CERÂMICAS TIPO 4 - 8 COM DIFERENTES CONTEÚDOS DE ENZIMA

Com o objetivo de verificar a relação do teor de enzima imobilizada em cerâmicas com conteúdos diferentes de silício, foram realizados alguns experimentos, onde foram utilizadas cerâmicas de teores de silício que variaram de 20 a 100%, com resultados já discutidos anteriormente. Em relação aos teores de enzima, esta variou de 0,1 a 1,6 mg/mL (Figs.6.21 – 6.23). Como controle utilizamos o experimento realizado inicialmente, que foi a cerâmica com teor de silício abaixo de 20%, mas com o teor de enzima utilizado para a imobilização de 5,68mg/mL (Fig.6.24).



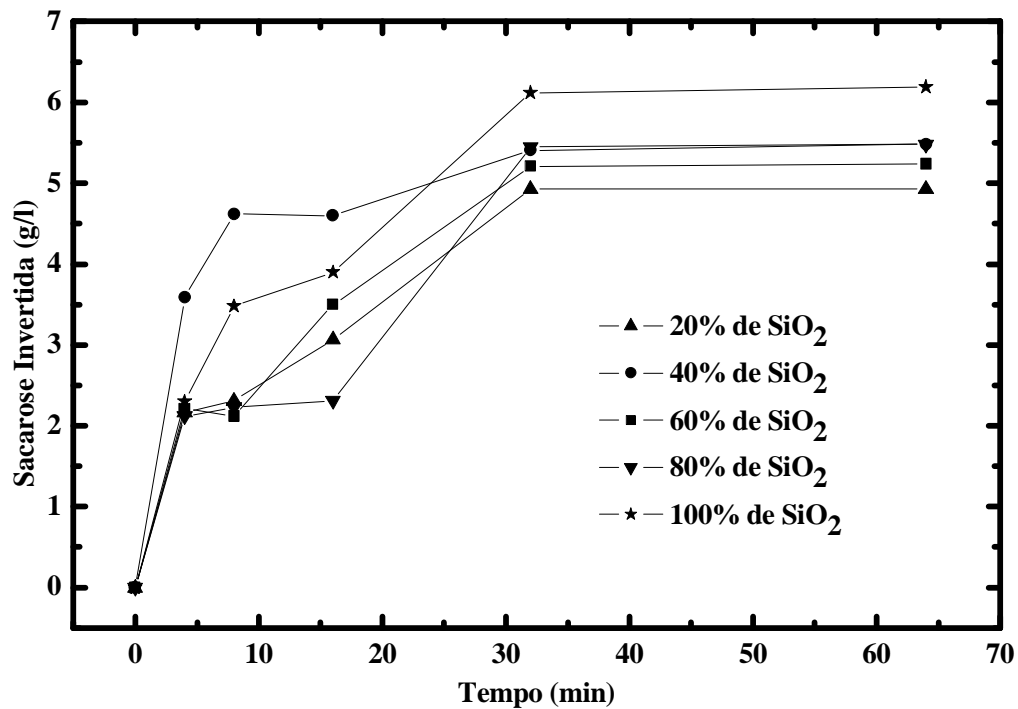


Figura 6.21. Efeito da atividade da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 4 – 10 (20 - 100% de SiO<sub>2</sub>) com 0,1 mg/ml de invertase.

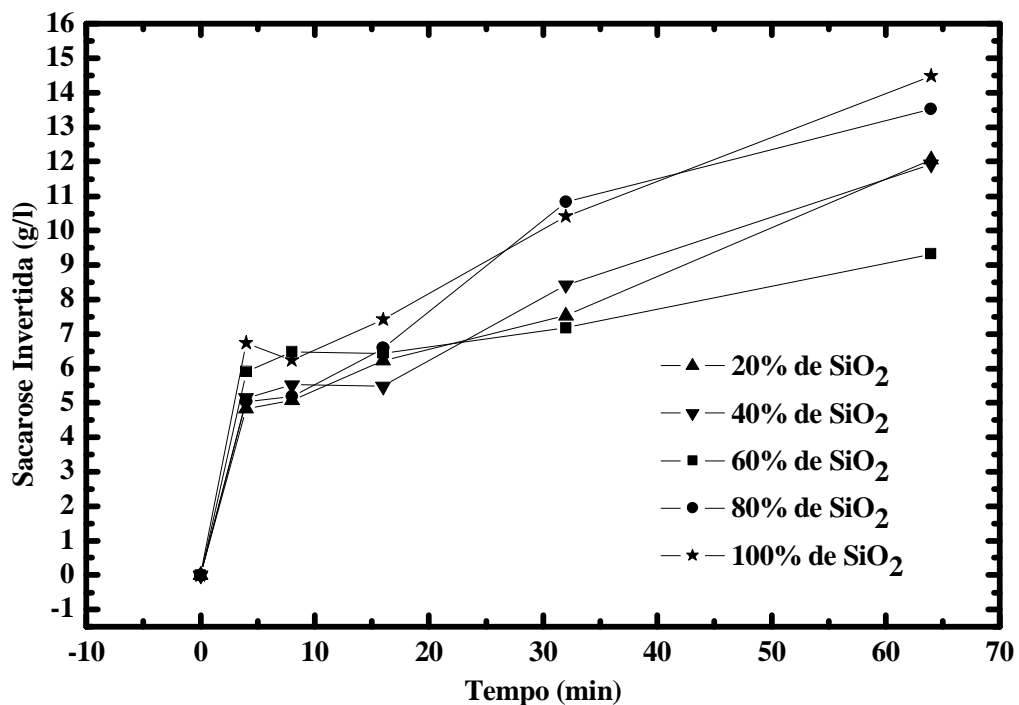


Figura 6.22. Efeito da atividade da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 4 – 8 (20 - 100 % de SiO<sub>2</sub>) com 0,8 mg/ml de invertase.

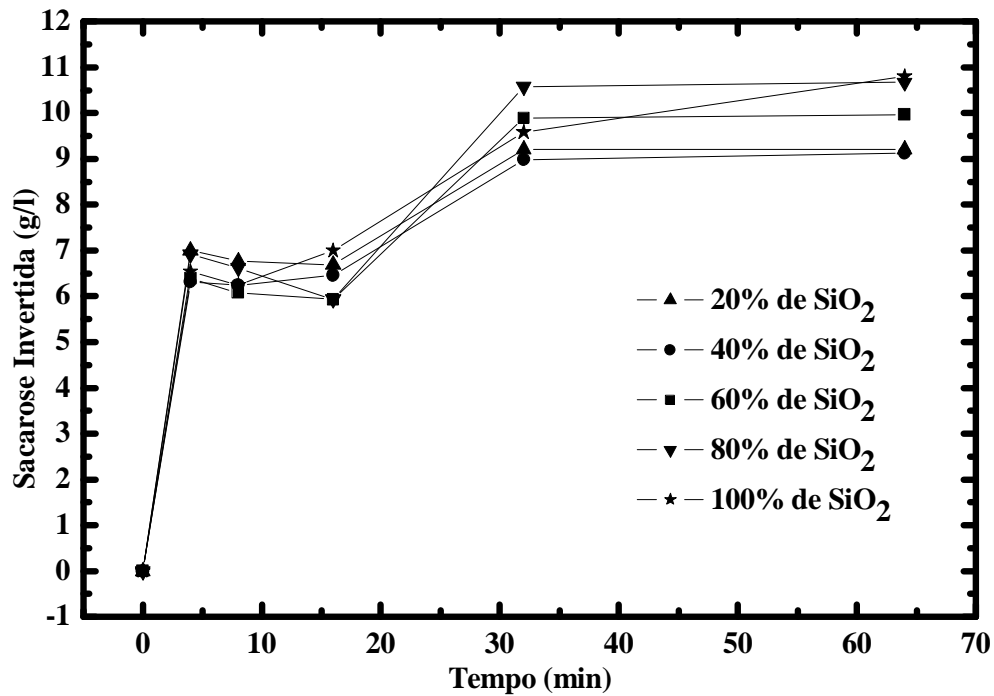


Figura 6.23. Efeito da atividade da invertase imobilizada nas cerâmicas tipo 4 – 8 (20 - 100% de SiO<sub>2</sub>) com 1,6 mg/ml de invertase.

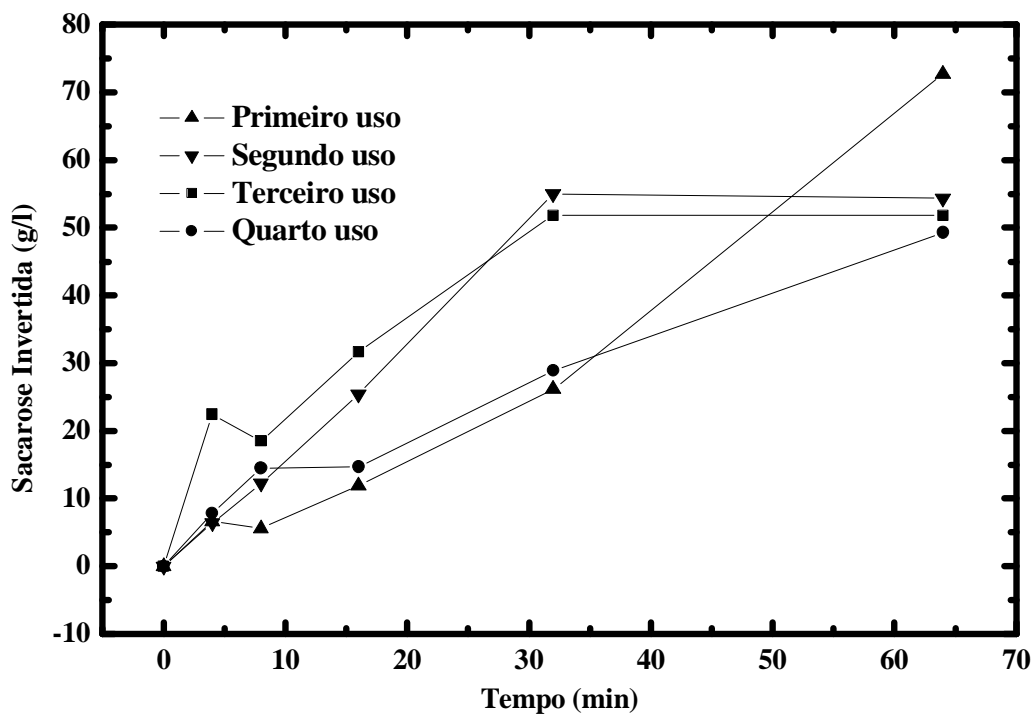


Figura 6.24. Efeito da atividade da invertase imobilizada na cerâmica 4 (20% de SiO<sub>2</sub>) com 5,68mg/ml de invertase, após 4 usos.

Não houve diferença significativa em relação a quantidade de material protéico disponível para a imobilização e o conteúdo do sílica presente na cerâmica, havendo uma estabilidade em torno de 10g/L de inversão de sacarose. Entretanto, quando comparamos com 5,68 g/L de enzima disponível verificamos um aumento significativo de atividade. Estes resultados nos indicam que poderemos aumentar a atividade do material enzimático quando aumentamos a quantidade de enzima disponível.

### 6.3.7 RELAÇÃO DA ATIVIDADE DA INVERTASE IMOBILIZADA NAS CERÂMICAS TIPO 1 (127,32 MPA) COM DIFERENTES CONTEUDOS DE ENZIMA

Com o objetivo de otimizar a quantidade de enzima imobilizada para obter a maior taxa de inversão, foi relacionada a quantidade de enzima disponível para imobilização e a atividade enzimática representada pela quantidade de sacarose invertida (Fig.6.25).

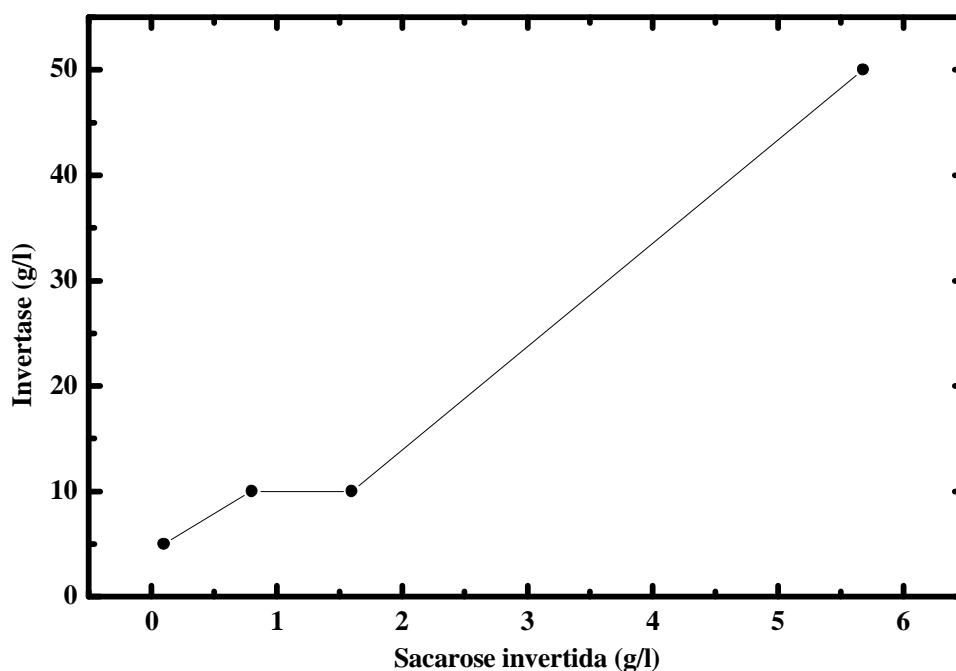


Figura.6.25. Relação da atividade da invertase imobilizada com diferentes conteúdos de enzima.

As cerâmicas preparadas com pressão de compactação de 318,3 MPa apresentaram eficiência 10 vezes maior na inversão da sacarose do que aquelas compactadas com 63,66 MPa. A influência da pressão de compactação na inversão da sacarose exige ainda maiores estudos, entretanto, sabemos que a atividade enzimática está associada a área superficial disponível a imobilização da enzima e que as dimensões dos poros do suporte devem ser um pouco maiores que as da enzima a ser imobilizada. Quando aumentamos a

pressão de compactação, o tamanho dos poros também se reduz. Se esta redução fosse significativa, cerâmicas compactadas a 318,3 MPa (amostras 2, 3A e 3B) deveriam imobilizar uma quantidade menor de enzimas e conseqüentemente apresentariam menor eficiência enzimática que as compactadas a 63,66 e 127,32 MPa (1A, 1B, 4 – 10). Entretanto, o que se observou foi um aumento da atividade enzimática com o aumento da pressão de compactação. Ou seja, o tamanho de poro não teve papel relevante nos experimentos realizados. As cerâmicas compactadas tanto a baixas quanto a altas pressões apresentaram dimensões de poros suficientes para a imobilização. Porém, quando maior a porosidade, menor será a densidade aparente, ou seja, menos material por centímetro cúbico estará disponível para a interação enzimática. As cerâmicas com maior pressão de compactação ainda apresentaram 90% de atividade enzimática com o terceiro re-uso, após 60 min de experimentação.

O acréscimo de sílica, de 20 a 100%, no material cerâmico durante a preparação não resultou em melhorias significativas na atividade enzimática das amostras compactadas na pressão de 127,32 MPa. Ou seja, a sílica utilizada não apresentou silanização no protocolo de imobilização. Isso é um indicativo de baixa amorfização ou alta cristalinidade da sílica usada na preparação das cerâmicas mistas.

## 6.4 CONCLUSÕES

Foram imobilizadas cerâmicas com a enzima invertase ( $\beta$ -fructofuranosidase – E.C.3.2.1.2.6) de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* 355 U/mg sólida). As cerâmicas foram preparadas com as cinzas de carvão mineral da Usina Termelétrica Presidente Médici, Candiota, RS, Brasil, com diferentes pressões de compactação e temperaturas/tempo de sinterização, apresentando dimensões de 10 mm de diâmetro e espessura variando entre 0,25 e 0,5 mm. Os resultados se mostraram promissores, sugerindo a utilização de suportes para imobilização da invertase em escala industrial, com a construção de reatores enzimáticos para produção de açúcar invertido. O baixo valor agregado do material utilizado na fabricação dos suportes cerâmicos e sua elevada capacidade de imobilização justificam plenamente a continuidade nas pesquisas com as cerâmicas das cinzas de carvão mineral da Usina Termelétrica Presidente Médici.

Este trabalho contribuiu para a preparação do artigo a ser submetido em 2007 (Anexo C.1): Albertini, A. V. P.; Reis, A. L. S.; Teles, F. R. R.; Souza, J. C.; Rolim Filho, J. L.; Martins, D. B. G.; Salinas, C. R. M.; Nogueira, V. N.; Santos, R. P.; Gadelha, C. A. A.;

Martins, J. L.; Cavada, B. S.; Lima Filho, J.L. Immobilization of invertase into sinterized coal fly ashes for hydrolysis of sucrose: stability, properties and application in bioreactors. Também está associado à dissertação de mestrado de Alessandro Victor Patrício de Albertini do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UPPE, intitulado “Imobilização de invertase em cinzas de carvão sinterizadas para hidrólise de sacarose: propriedades e aplicação em biorreatores”, defendida em 2006; e ao pedido de patente “Suporte cerâmico para imobilização de invertase”.

## COLABORADORES

C. A. A. GADELHA<sup>b</sup>, B. S. CAVADA<sup>c</sup>, J. L. MARTINS<sup>d</sup>, A.V. P. ALBERTINI<sup>e</sup>, A. L. S REIS<sup>e</sup>, F.R.R. TELES<sup>e</sup>, J. L. LIMA FILHO<sup>e</sup>, V. N. FREIRE<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup> Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus Castelo Branco, 58059-000, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, 60455-900, Brasil.

<sup>d</sup> Instituto de Química e Geociências (IQG), Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão, 96160-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>e</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbieri, L.; Bonamartini, A.C.; Lancellotti, I. (2000). Alkaline and alkaline-earth silicate glasses and glass-ceramics from municipal and industrial wastes. *J Eur Ceram Soc*, 20, 2477-2483.
- Bender, M. L., Kezdy, J. F. e Gunter, C. R. (1964). The anatomy of an enzymatic catalysis: a-Chymotrypsin. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 3714-3721.
- Berbner, S. (1997). Hot gas cleanup separating hard and brown coal fly ashes at temperatures up to 850°C with rigid ceramic barrier filters. *Fuel and Energy Abstracts*, 38, 95.
- Beretka, J.; Matthew, P. J. (1985). Natural radioactivity of Australian building materials, industrial wastes and by-products. *Health Physics*, 48, 87-95.
- Bhagavam. N. V. (1977). *Bioquímica*. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Interamericana.
- Chaplin, M. e Bucke, C. (1990). *Enzyme Technology*. London: Cambridge University Press.
- Cioffi, R. (1995). Glass-ceramic from fly ash with added MgO and TiO<sub>2</sub>. *Fuel and Energy Abstracts*, 36, 286.
- Conn, E. E. e Stumpf, P. K. (1980). *Introdução à Bioquímica*. 4ª Edição. São Paulo: Edgard Blucher.
- Cornish-Bowden, A. (1976). *Principles of enzyme kinetics*. London: Butterworth.
- Datta, S. P. e Ottaway, J. H. (1978). *Bioquímica*. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J. E. (1992). *Biological reaction engineering*. Weinheim: VHC.
- Early, L.E. (1990). Geochemical factors controlling the mobilization of inorganic constituents from fossil fuel combustion residues: II, Review of the minor elements. *J. Environ*, 19, 202-214.
- Engasser, J. M. e Horvath, C. (1976). Diffusion and kinetics with immobilised enzymes. In *Applied biochemistry and bioengineering*, vol. 1 Immobilised enzyme principles. ed. L.B. Wingard.
- Fersht, A. (1985). *Enzyme structure and mechanism*. New York:
- Filho, J.L.L.; Pandey, P. C.; Weetall, H. H. (1996). An amperometric flow injection analysis enzyme sensor for sucrose using a tetracyanoquinodimethane modified graphite paste electrode. *biosensors and bioelectronics*, 11, 719-723.

- Fujimoto, J. (2002). Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. *Quim. Nova*, 25, 757-761.
- Gouda, M. D. (2002). Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 503-507.
- Guilbault, G. G., Kauffmann, J. M., Patriarche, G. J. (1991). Immobilized enzyme electrodes as biosensors. *Bioprocess Technology*, 14, 209-262.
- Gupta, R. (Editor) (1999). *Impact of Mineral Impurities in Solid Fuel Combustion*. New York: Plenum.
- Helmuth, R. (1987). *Fly Ash in Cement and Concrete*. Illinois: Portland Cement Association.
- Hemmings, R. T; Berry, E. E. (1988). On the glass in coal fly ashes: recent advances, in *Fly Ash and Coal Conversion By-Products: Characterization, Utilization and Disposal IV*, Mater. Res. Soc.Symp. Proc., 113, 3-38.
- Hughes, R. E. (1996). Utilization of fly ash in structural and decorative ceramic products. *Fuel and Energy Abstracts*, 37, 426.
- Illanes, A. (1994). *Biotecnologia de Enzimas*. Valparaiso: Ediciones Universitarias de Valparaiso.
- Jo, Y. M. (1997). Preparation of ceramic membrane filters, from waste fly ash, suitable for hot gas cleaning. *Fuel and Energy Abstracts*, 38, 112.
- Jung, J. S. (2002). Mullite ceramics derived from coal fly ash. *Fuel and Energy Abstracts*, 43, 213-214.
- Karmanski; Deregowski, J. (1995). The prospects and methods of fly ash utilization in ceramic ware manufacturing. Proc. IV intern. Symp.: Reclamation, Treatment and Utilization of Coal Mining Wastes, pp.735-741. Poland: Kraków.
- Kennedy, J. F. e Cabral, J. M. S. (1987). Enzyme immobilisation. In *Biotechnology*, vol. 7a, *Enzyme Technology*, ed. J.F.Kennedy, pp 347-404.
- Kress, N.; Hornung, H.; Herut, B. (1998). Concentrations of Hg, Cd, Cu, Zn, Fe and Mn in deep sea benthic fauna from the southeastern Mediterranean Sea: A comparison study between fauna collected at a pristine area and at two waste disposal sites. *Mar Pollut Bull*, 36, 911-921.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. e COX, M. M. (1994). *Princípios de Bioquímica*. 2ª Edição. São Paulo: Sarvier.

- Lim, J. S.; Park, S. J.; Koo, J. K.; Park, H. Evaluation of porous ceramic as microbial carrier of biofilter to remove toluene vapor. *Environmental Technology*, 22, 47-56.
- Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidel, W. (coordenadores) (2001). *Biotecnologia Industrial*. Vol. 3: Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgar Blucher.
- Lutgens, F. K. (2001). *Foundations of Earth Science* (3rd Edition). New York: Prentice Hall.
- Mansur, H. S. (1999). Desenvolvimento de um processo de fabricação de vidros porosos via sol-gel para a fixação de proteínas. *Biotecnologia*, 9, 16-23.
- Martinek, K., Klivanov, A. M., Goldmacher, V. S. e Berezin, I. V. (1977). The principles of enzyme stabilization 1. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 485, 1-12.
- Martinek, K., Klivanov, A. M., Goldmacher, V. S., Tchernysheva, A. V., Mozhaev, V. V., Berezin, I. V. & Glotov, B. O. (1977). The principles of enzyme stabilization 2. Increase in the thermostability of enzymes as a result of multipoint noncovalent interaction with a polymeric support. *Biochimica et Biophysica Acta* 485, 13-28.
- McCarthy, G. J. (1988). X-ray powder diffraction for studying the mineralogy of fly ash, in *Fly Ash and Coal Conversion By-Products: Characterization, Utilization and Disposal IV*. Mater. Res. Soc.Symp. Proc., 113, 75-86.
- McCarthy, G. J.; Solem, J. K.; Bender, J. A.; Eylands, K. E. (1993). Mineralogical analysis of advanced coal conversion residuals by x-ray diffraction. *Proceedings: Tenth International Ash Use Symposium: Ash Use R&D and Clean Coal By-Products*. American Coal Ash Association, 58, 1-14
- Nelson, J. M., Griffin, E. G. (1975). *Immobilized enzymes for industrial reactors*. Londres: Academic Press.
- Park, S. J.; Nam, S. L.; Choi, E. S. (2001). Removal of odor emitted from composting facilities using a porous ceramic biofilter. *Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 44, 301-308.
- Park, Y. J.; Heo, J. (2002). Nucleation and crystallization kinetics of glass derived from incinerator fly ash waste. *Ceramics International*, 28, 669-673.
- Parras, J.; Sánchez-Jiménez, C.; Rodas, M.; Luque, F. J. (1996). Ceramic applications of Middle Ordovician shales from central Spain. *Applied Clay Science*, 11,25-28.
- Pilz, T.; Loeffler, F. (1996). Influence of adhesive and cohesive particle properties in filtration on surface filters. *Fuel and Energy Abstracts*, 37, 58.



- Pitcher, W. H. (1975). Design and operation of immobilized enzyme reactors. In: Messing, R. A. Immobilized enzymes for industrial reactors. Londres: Academic Press.
- Popp, J. H. (1998). Geologia geral. São Paulo: LTC.
- Porstmann, T., Kiessig, S. T. (1992). Enzymeimmunoassay techniques. *J. Immunological Methods*, 50, 5-21.
- Queralt, I. (1997). Use of coal fly ash for ceramics: a case study for a large Spanish power station. *Fuel*, 76, 787-791.
- Reash, R. J.; Vanhassel, J. H.; Wood, K.V. (1988). Ecology of a Southern Ohio Stream Recerving Fly ash Pond Discharge - Changes from acid mine drainage conditions arch *environ tox*, 17, 543-554.
- Rocha, J. C. (1999). Reaproveitamento das cinzas pesadas do complexo Jorge Lacerda na elaboração de materiais de construção: aspectos tecnológicos e ambientais. XV SNPTEE – Seminário Nacional de Produção e Transmissão de energia Elétrica.
- Romero, M.; Rincon, J. M.; Rawlings, R. D. (2001). Use of vitrified urban incinerator waste as raw material for production of sintered glass-ceramics. *Mater Res Bull*, 36, 383-395.
- Santos, R.P. (2001). Dissertação de mestrado. Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.
- Sartori, F.; Assini, S. (2001). Vegetation evolution in a reclaimed area contaminated with dioxin. *Chemosphere*, 43, 525-535.
- Sevelius, D. (1997). Bricks by recycling - Product design based on waste. *Fuel and Energy Abstracts*, 38, 454.
- Skinner, B. J.; Porter, S. C.; Botkin, D. B. (1999). *The Blue Planet: An Introduction to Earth System Science* (2nd Edition). New York: Wiley.
- Smoot, L.D.; Smith, P.J. (1985). *Coal Combustion and Gasification*. New York: Plenum.
- Stewart, A. J.; Konetsky, B. K. (1998). Longevity and reproduction of *Ceriodaphnia dubia* in receiving waters. *Environ Toxicol Chem*, 17, 1165-1171.
- Stout, W. L.; Hem, J. L.; Korcak, R. F.; Carlson, C. W. (1988). *Manual for Applying Fluidized Bed Combustion Residue to Agricultural Lands*. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. Agricultural Research Service, ARS-74.
- Thompson, C. M.; Achord, R. D.; Blythe, G. M. (1988). Laboratory characterization of advanced SO<sub>2</sub> control by-products: spray dryer wastes. (Prepared by ICF Technology Incorp. for Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA, Project 2708-1, EPRI Report CS-5782.

- Tishmack, J. K. (1996). Bulk chemical and mineral characteristics of coal combustion products (CCB). Interactive Forum, School of Civil Engineering, Purdue University, West Lafayette, IN.
- Victor, L. (1988). Geologia Geral. São Paulo: IBEP.
- Vitolo, M. (1989). Imobilização de células e enzimas. Noções de bioreatores. In: Leveduras em biotecnologia. São Paulo: CNPq-PADCT.
- Vitolo, M., Carreira, S. M. S. (1992). Entrapment of *S. cerevisiae* in commercial alginate. *Agr Food Industry High Technology*, 3, 24-25.
- Weetall, H. H.; Havewala, N. B. (1972). *Biotechnol. Bioeng. Syrup.*, 3, 241.
- Wei, M. S.; Huang, K. H. (2001). Recycling and reuse of industrial wastes in Taiwan. *Waste Management*, 21, 93-97.
- Wiebusch, B.; Seyfried, C. F. (1997). Utilization of sewage sludge ashes in the brick and tile industry. *Water Science and Technology*, 36, 251-258.
- Woodward, J. (1985). Immobilised enzymes - Adsorption and covalent coupling. In *Immobilised cells and enzymes. A practical approach*. ed. J.Woodward, pp 3-17. Oxford: IRL Press Ltd.
- Wyszomirski, P.; Brylska, E. (1996). Fly ash in Polish building ceramics – threat or proecology? *Applied Geochemistry* 11, 351.
- Zheng, H.; Xue, H.; Zhang, Y.; Shen, Z. (2002). A glucose biosensor based on microporous polyacrylonitrile synthesized by single rare-earth catalyst. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 541-545.

---

---

## CARACTERIZAÇÃO DE CONCHAS DE MEXILHÃO *PERNA PERNA* TRATADAS TERMICAMENTE

---

---

### 7.1 INTRODUÇÃO

#### 7.1.1 MOLUSCOS

Moluscos, da palavra latina *mollis* – mole, é aplicado a um grande grupo de animais cujos representantes possuem corpo mole, invertebrados, simetria bilateral. Formam o segundo maior grupo de animais em número de espécies, sendo superados apenas pelos artrópodes. Apresentam uma disparidade morfológica sem comparação dentre os demais filos de animais, reunindo os familiares caracóis (reptantes), ostras e mariscos (sésseis) e lulas e polvos (livre-nadantes), assim como formas pouco conhecidas, como os quítons, conchas dente-de-elefante (Scaphopoda) e espécies vermiformes (Caudofoveata e Solenogastres). Geralmente possuem conchas calcáreas duras que protegem seus corpos, embora algumas espécies, como lesmas e polvos, não a possuam. Compreendem caramujos, lesmas, búzios, ostras, mexilhões, lulas e outros menos conhecidos. São predominantemente marinhos, embora existam espécies de água doce e terrestre, podendo ter vida livre, viver fixos ou enterrados. Podem apresentar poucos centímetros de comprimento ou atingir grandes dimensões, como a lula gigante de águas profundas de 15 metros de comprimento. Muitos são usados na alimentação humana, sendo algumas espécies de ostras utilizadas na produção de pérolas. Os moluscos planorbídeos (*Biomphalaria glabrata*) têm importância médica, pois servem de hospedeiros intermediários para as larvas do verme causador da esquistossomose (Marcondes, 1994; Purges et al., 2002).

O corpo é revestido por um epitélio simples, ciliado e com glândulas mucosas. O sistema digestivo é completo. À exceção dos bivalves (ostras, mexilhões e outros), todos possuem rádula, uma estrutura dotada de dentes quitinosos com função de ralar o alimento. O sistema respiratório é aberto ou lacunar, havendo um coração dorsal. A respiração pode ser cutânea, branquial ou pulmonar. A excreção é feita por nefrídios. O sistema nervoso é centralizado. Há estruturas sensoriais tácteis, visuais, receptores químicos e de equilíbrio. A

reprodução é exclusivamente sexuada, podendo haver espécies hermafroditas. A fecundação é externa ou interna e o desenvolvimento é direto ou indireto (Marcondes, 1994; Purges et al., 2002).

O filo *Mollusca* (moluscos) inclui cerca de 100 mil espécies viventes, sendo conhecidas cerca de 35 mil espécies fósseis. Compreende seis classes principais (Marcondes, 1994; Purges et al., 2002):

**Monoplacophora (Monoplacoforados):** eram os moluscos mais abundantes durante o período Cambriano, mas hoje existem apenas algumas espécies. Diferentemente de todos os outros moluscos atuais, os monoplacoforados existentes possuem um grande número de brânquias, músculos e estruturas excretoras que se repetem ao longo do corpo.

**Polyplacophora (Quítons):** São moluscos pouco conhecidos, marinhos, encontrados no fundo do mar. Possuem múltiplas brânquias e conchas segmentadas (oito placas calcárias sobrepostas como telhas), mas as outras partes do corpo não são segmentadas. São todos marinhos (Fig.7.1)



Figura 7.1. *Tonicella lineata*, um Quíton.

**Scaphopoda (Escafópodes):** Possuem concha tubular e recurvada, semelhante a um grande canino, medindo cerca de 6 cm e aberta em uma de suas extremidades. Possuem finos tentáculos que rodeiam a sua boca. Vivem frequentemente enterrados na areia das águas rasas, mas também podem ser encontrados em profundidades de até 4500 metros (Fig.7.2).



Figura 7.2. *Dentalium* sp , um Escafópode.

**Gastropoda (Gastrópodes):** Do latim *gastro* = barriga e *podos* = pé. São os caramujos, lesmas, etc. Divisão do corpo nítida em cabeça, pé (órgão musculoso) e massa visceral coberta por uma concha (na maioria das espécies). Pé em forma de palmilha. Alguns são marinhos, outros de água doce e outros terrestres (Fig.7.3).



Figura 7.3. Caracol de jardim, um Gastrópode.

**Cephalopoda (Cefalópodes):** De *cephalo* = cabeça e *podos* = pé. São as lulas (que possuem 10 tentáculos) e polvos (que possuem 8 tentáculos). O corpo possui massa visceral coberta pelo manto (tipo de saco pendente da cabeça), cabeça, e pés em forma de tentáculos que ficam ligados diretamente à cabeça. Não há concha externa, mas as lulas podem possuir uma concha interna e reduzida (as chamadas penas). As lulas podem usar seu sifão para se deslocar por jato-propulsão (Fig.7.4).



Figura 7.4. Polvo (*Octopus vulgaris*), um Cefalópode.

**Bivalvia (Bivalves):** Os bivalves são um grupo extremamente bem sucedido e diversificado. São animais exclusivamente aquáticos, mas podem ocorrer em ambientes de salinidade diversa como água salgada, doce ou salobra. A maioria das espécies vive junto ao fundo. Alguns bivalves são organismos sésseis que se fixam ao substrato através do bisso, uma

segregação fibrosa, enquanto que outras espécies vivem enterradas nos fundos arenosos. As espécies que vivem soltas podem deslocar-se através de propulsão conseguida por expulsão de água sob pressão. Estes organismos caracterizam-se pela presença de uma concha carbonatada formada por duas valvas. O grupo surgiu no Câmbrio e é atualmente muito diversificado, com cerca de 15000 espécies. A separação das diferentes sub-classes faz-se pelo tipo e estrutura das guelras nos organismos vivos, e pelas características das valvas nos bivalves fósseis. Os mexilhões, mariscos e ostras são exemplos populares de bivalves que servem como alimento ao Homem (Fig.7.5). As ostras são também a origem das pérolas.



Figura 7.5. Marisco com as conchas abertas, um Bivalve.

### 7.1.2 A CONCHA DOS BIVALVES

A concha dos bivalves é em primeira análise semelhante à dos braquiópodes, uma vez que é constituída por duas valvas. A principal diferença reside no fato de, nos braquiópodes, as duas valvas serem desiguais (inequivalves), mas simétricas em relação a um plano médio imaginário. Pelo contrário, nos bivalves, as valvas são iguais, mas inequilaterais, estando o plano de simetria paralelo à charneira. As duas valvas são unidas por ligamentos e músculos adutores. O ligamento, composto pelo resílio e tensílio, controla a abertura das valvas que se dá quando esta estrutura está em repouso. O bivalve fecha a concha através da contração dos músculos adutores, que podem ser um ou dois, conforme a espécie. A geometria e distribuição das cicatrizes dos músculos adutores no interior da valva é um critério importante na classificação dos bivalves atuais e fósseis. A zona mais antiga da valva é o umbo, uma saliência localizada na zona antero-dorsal de cada valva, em torno da qual se dispõem linhas de crescimento radiais. As valvas unem-se pela charneira, através de um conjunto de dentes cardinais e/ou laterais, que são expansões carbonatadas, e respectivas fossetas, onde encaixam na valva oposta. O manto característico dos moluscos está nos bivalves, totalmente confinado e fixo à concha. A linha paleal das valvas soltas mostra o



limite de extensão do corpo mole do organismo. A face externa da valva pode ou não ser ornamentada para além das linhas de crescimento. A concha pode também apresentar várias cores (Figs.7.6 e 7.7).

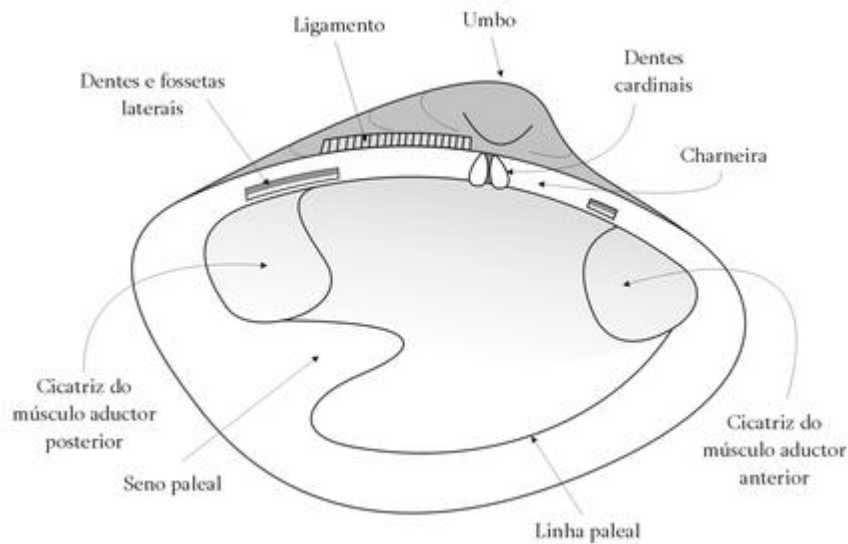


Figura 7.6. Vista interna da concha de um bivalve.

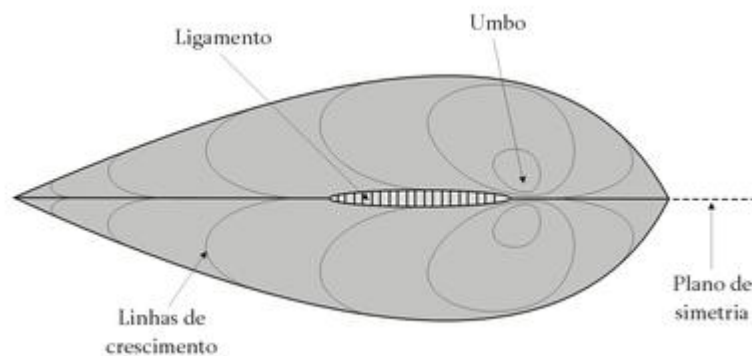


Figura 7.7. Vista externa da concha de um bivalve.

A estrutura e mineralogia das conchas dos moluscos bivalves e gastrópodes têm sido exaustivamente estudadas (Taylor et al., 1968; Multivei, 1977; 1978). Estas conchas são materiais bem estruturados, formados por cristais de calcita e aragonita (polimorfos do  $\text{CaCO}_3$ ) “colados” por uma matriz orgânica (Feng et al., 2000; Warren et al., 1993). A fase mineral representa cerca de 99% da massa da concha (Mann et al., 1993; Marsh et al., 1980). O lado externo da concha, o periostracum, é formado principalmente por proteínas esclerotizadas. O lado interno é dividido em duas regiões: uma, em contato com periostracum, composta de colunas prismáticas de calcita (região prismática) e outra, entre a região

prismática e o organismo, chamada de nácar ou região perolada. O nácar é formado por placas poligonais de aragonita organizados em camadas entre 400 e 500 nm de altura, separadas por filmes finos de 20 a 30 nm de um adesivo orgânico, que também forma a camada mais externa da superfície perolada (Nakara et al., 1983; Weiss et al., 2000) (Fig. 7.8). Esta cola orgânica, que está presente em pequena quantidade (em torno de 1%), é composta por proteínas, glicoproteínas e quitina (Katti et al., 2005; Zentz et al., 2001; Weiss et al., 2002). Ela tem uma importante função no controle espacial e temporal da nucleação e crescimento da aragonita (biomineralização). A espessura do nácar e da camada prismática (e consequente concentração de aragonita e calcita) pode variar com a espécie (Watabe et al., 1976; Addadi and Weiner, 1985; Mann et al., 1992; Liu et al., 1992; Berman et al., 1993; Albeck et al., 1993).

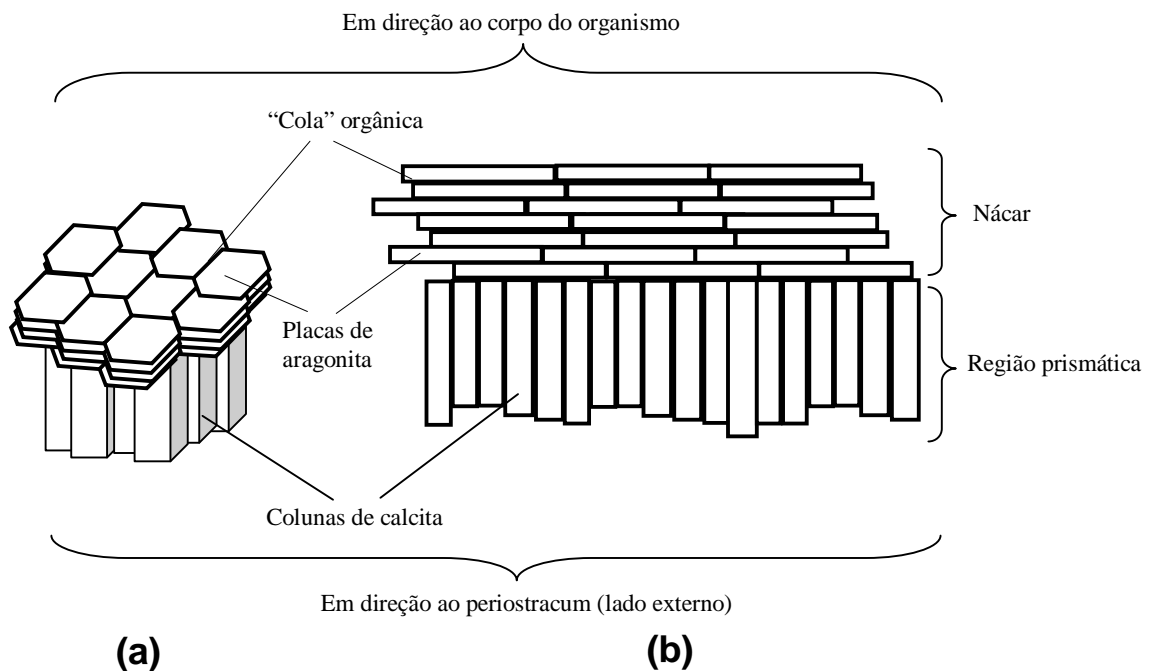


Figura 7.8. Representação esquemática da estrutura típica da concha de um bivalve. Em (a), vista tridimensional; e em (b), o corte transversal (vista de perfil). Os elementos do esquema não estão em proporção.

Microscopias eletrônicas de transmissão (TEM) e varredura (SEM) e, recentemente, a microscopia eletrônica de força atômica (AFM) têm sido usadas para fazer observações diretas da superfície do nácar (Bining et al., 1986; Rugar et al., 1990; Schaffer et al., 1997; Song et al., 2002). O AFM tem a vantagem de ser uma técnica não destrutiva, importante na análise de materiais orgânicos (Song et al., 2003). Imagens de AFM em alta



resolução da superfície perolada do caracol marinho *Haliotis laevigata* revelaram padrões de moléculas globulares fortemente compactadas (Blank et al., 2003). AFM equipado com indentador ultrafino também tem sido usado no estudo das propriedades mecânicas de nanocompostos (Oliver et al., 1992; Li et al., 2004). Medidas do módulo de elasticidade (módulo de Yung) dos constituintes do nácar resultou em valores entre 20 MPa (camada orgânica) e 100 GPa (camada inorgânica) (Katti et al., 2001).

### 7.1.3 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DAS CONCHAS

A biomimética é uma nova ciência que estuda os modelos da natureza e depois os imita ou inspira-se neles ou em seus processos para resolver os problemas humanos. Afinal de contas, após 3,8 bilhões de anos de evolução, a natureza aprendeu: o que funciona, o que é apropriado e o que dura. Diversos pesquisadores têm se inspirado na natureza para projetar novos materiais. Na revolução provocada pela biomimética, eles estão desvendando os segredos de materiais naturais e aplicando-os como auxiliar na produção de substâncias feitas pelo homem que são mais fortes, resistentes e viáveis comercialmente do que os materiais convencionais; além de serem facilmente assimilados pelo ambiente (biodegradáveis) (Sarıkaya et al., 1995). Por exemplo, a estrutura das conchas em geral é 30 vezes mais resistente do que o carbonato de cálcio produzido em laboratório e 300 vezes mais forte do que o óxido de cálcio utilizado no giz comum. Estudos prévios mostraram que os principais mecanismos de fortalecimento da concha são governados por sua micro-arquitetura sem igual (Jackson et al., 1988; Wang et al., 1995). Muitos moluscos bivalves produzem uma concha tão resistente que até mesmo um caminhão pode passar por cima dela, sem quebrá-la.

Além de suas interessantes propriedades mecânicas, o nácar tem sido utilizado como um material natural para a reposição de ossos e na regeneração de defeitos mandibulares (Atlan et al., 1997; Delattre et al., 1997). O nácar é um material biocompatível com propriedades osteogênicas e osteoindutivas que pode iniciar a formação óssea por osteoplastos humanos *in vitro* (Silve et al., 1992; Lopez et al., 1992; Lopez et al., 1995). Ele tem também sido implantado na coluna de ratos (Liao et al., 1997). Este é um fenômeno completamente novo. Bobbio relatou que os índios maias de Honduras usaram conchas para implante dental há 2000 anos atrás (Bobbio, 1972). Recentes estudos mostram que a adição de conchas de ostras aquecidas na dieta de pacientes idosos (65-96 anos) parece proporcionar um aumento na densidade da parte mineral do osso da espinha lombar (Fugita et al., 1996).

Diversos materiais têm sido usados em ortopedia e cirurgias maxilofaciais desde a

década passada (Nizard et al., 1996; Sedel e Rey, 1997). Muitos destes são metálicos, entretanto, tem crescido o uso de polímeros, cerâmicos e compostos baseados em carbono (Sedel e Rey, 1997). Existem poucos materiais de origem biológica, utilizados para este fim. Dentre eles, incluem-se os corais, uma cerâmica porosa natural e o nácar, a região madreperla da concha. A principal estrutura cristalina em ambas as estruturas é a aragonita (Guillemin et al., 1981; Guillemin et al., 1989; Patar et al., 1990; Irigaray et al., 1996; Fricain et al., 1997).

Existe uma considerável necessidade do entendimento de como o nácar pode estar ativamente envolvido na regeneração de tecidos duros tanto em ósseos como em outras aplicações. Sendo assim, o primeiro passo é o estudo de suas propriedades físico-químicas.

#### 7.1.4 COMPORTAMENTO TÉRMICO DA CONCHA

O estudo do comportamento térmico da concha é importante para a compreensão das interações entre as fases orgânicas e inorgânicas e ainda, devido ao seu uso em implantes, para sua esterilização através de processos térmicos. Análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e difração de raios-X (XRD) realizadas por Balmain et al. (1999) em pós de nácar tratados termicamente de conchas da ostra *Pinctada máxima*, mostraram que a matriz orgânica permanece termicamente estável até 300°C; sofre alterações detectáveis entre 300 e 500°C (degradação de grupos amido e presença de bandas devido a grupos amino); e é decomposta em aproximadamente 600°C (com o desaparecimento de ligações C-H). Os difratogramas da matriz mineral mostraram transformações da aragonite para a calcita entre 300 e 400°C, e da calcita para CaO entre 500 e 600°C (pequena ou nenhuma quantidade de calcita foi detectada em 600°C).

#### 7.1.5 MEXILHÕES

Mexilhão é a denominação de várias espécies de bivalves com elevados valores nutricionais, pertencentes à família Mytilidae, utilizados na alimentação humana. As espécies desta família de maior importância comercial pertencem aos seguintes gêneros:

- *Mytilus*: presente em todos os oceanos;
- *Perna*: tropical, presente nos oceanos Atlântico (costa da América do Sul e África) e Índico (África, Ásia e Oceania), além do Mar Mediterrâneo (costa africana);
- *Choromytilus*: sub-tropical, presente nos oceanos Pacífico (costa do Chile) e Índico (África do Sul e Oceania);

- *Aulacomya*: distribuição semelhante ao *Choromytilus*;
- *Mytella*: tropical de águas salobras, presente nas Américas do Sul e Central;
- *Crenomytilus*: de clima temperado, com distribuição limitada ao Mar Negro e Mar Báltico;
- *Semimytilus*: tropical, restrito à costa do Pacífico, desde a Venezuela até o Peru;
- *Perumytilus*: possui a mesma distribuição de *Semimytilus*.

Os mexilhões de maior interesse econômico no Brasil são o *Mytilus edulis platensis* (Rio Grande do Sul), *Mytella guyanensis* e *Mytella falcata* (Amapá até Santa Catarina) e *Perna perna* (entre Rio de Janeiro e Santa Catarina). (Klappenbach, 1965; Carmo et al., 1984; 1988; Henriques, 2004).

O estado de Santa Catarina, no sul do Brasil, é o maior produtor nacional de mexilhão *Perna perna*. Seu uso é restrito ao consumo humano, sendo suas conchas (Fig.7.9), formadora de uma grande quantidade de resíduos. Estes resíduos geram um grande problema ambiental para quais soluções são necessárias. Entretanto, a busca por aplicações tecnológicas de qualquer material envolve o estudo e sua estrutura e composição.



Figura 7.9. Conchas de mexilhão *Perna perna*.

### 7.1.6 OBJETIVOS

No contexto do estudo das propriedades físico-químicas das conchas, aliado ao fato de que o nácar está sendo usado na substituição e regeneração óssea (o que necessita, em geral, tratamento térmico para a sua esterilização), foram utilizadas as técnicas de difração de

raios-X (XRD), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia ótica e de força atômica (AFM) para caracterizar as transformações térmicas nas conchas do mexilhão *Perna perna*. Objetiva-se assim, caracterizar este resíduo para o uso como material biocompatível.

## 7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Espécimes adultos de mexilhões *Perna perna* foram coletados no estado de Santa Catarina. As cascas de mexilhão foram lavadas em água corrente, limpas para retirada de cracas e outros organismos macroscópicos fixados, e secas à temperatura de aproximadamente 35° C sob ventilação. De algumas conchas, foram cortadas amostras quadradas de 4 e 2 mm da região central da concha, por meio de serra circular. Parte das conchas e das amostras quadradas foram tratadas termicamente em forno tipo mufla, em atmosfera de ar nas temperaturas 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 700 e 800°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) durante 2 horas (grupo tratado). A taxa de aquecimento foi de 50°C/min e a de resfriamento de aproximadamente 1°C/min. O restante não sofreu qualquer tipo de tratamento (grupo não tratado). Algumas conchas dos grupos tratados e não tratados também foram transformadas em pó, por meio de maceração com pistilo em cadinho de porcelana. As amostras foram preparadas no Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar da Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina e no LCTM-UFC.

### 7.2.2 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD

Os padrões de difração de raios-X (XRD), para a análise mineralógica do pó das conchas *in natura* e tratadas nas temperaturas de 350, 450, 600, 700 e 800°C foram obtidos na temperatura ambiente (300K) em difratômetro de pó Philips, modelo X'Pert PRO, no Laboratório de Raios-X do Departamento de Física da UFC. Usou-se a geometria Bragg-Bretando com radiação Cu- $\alpha$ . O tubo foi operado com 40KV e 40mA. Os dados de difração foram coletados em um intervalo de varredura de  $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$  com passos de 0,02° e tempo de integração de 1s por ponto. Foi utilizado o programa X'Pert HighScore para identificação de fases cristalinas e o método de Rietveld, através do programa Rietica – versão 1.7.7 (C.J.

Howard and B.A. Hunter, 1997 - Lucas Heights Research Laboratories), para o refinamento do difratograma e conseqüente análise quantitativa.

### **7.2.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)**

Foi realizada a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de amostras de conchas *in natura* e tratadas nas temperaturas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800°C. Para cada tratamento, inclusive *in natura*, foi realizado o procedimento a seguir. Um gral de pistilo de ágata foram umedecidos e limpos com auxílio de papel absorvente umedecido em acetona. No gral foram triturados 1 mg de amostras de mexilhão previamente dessecadas e adicionado 100 mg de brometo de potássio (KBr) seco e finamente pulverizado. O triturado (pó) foi espalhado uniformemente no molde da pastilha e comprimida em prensa uniaxial a uma pressão de 800 MPa, por 1,5 a 2 minutos. A pastilha foi colocada numa célula, coberta com o imã. A pastilha foi então introduzida no equipamento previamente calibrado e zerado com KBr e procedidas as leituras na resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> com 64 varreduras. As medidas foram realizadas em Espectrofotômetro da IV BOMEN Hartmann & Braun - MB Series com método referência: PHARMACOPEIA 24 ed. (1999), no Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar da Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina.

### **7.2.4 MEDIDAS DE MICRODUREZA**

Foram feitas medidas de microdureza Vickers sobre a superfície do nácar em amostras de conchas *in natura* e tratada nas temperaturas de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550°C. As medidas foram realizadas sobre o centro de 10 amostras dos cortes quadrados de 4 mm de 10 conchas (uma amostra/concha) para cada tratamento (*in natura* e nas diferentes temperaturas), totalizando 10 medidas por tratamento. Foi utilizado um microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Test ajustado para uma carga de 490,3 mN durante 15 s, no Laboratório de Caracterização de Materiais (LACAM) da UFC.

### 7.2.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO

Imagens de microscopia ótica de campo claro com luz refletida foram realizadas sobre a superfície do nácar de amostras dos cortes quadrados de 4 mm de conchas *in natura* e tratadas nas temperaturas de 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500 e 600°C, em diferentes aumentos. Também foi realizada microscopia ótica de campo claro com luz refletida na região lateral (seção transversal) de amostras dos cortes quadrados de 2 mm de conchas *in natura*. Foi utilizado um microscópio ótico metalográfico Nikon Elipse LV 100D equipado com câmera digital, no LCTM-UFC e uma lupa Nikon FMZ800 equipada com câmera digital, no BioMol-Lab da UFC.

### 7.2.6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

Para a obtenção de imagens topográficas da superfície do nácar *in natura* e tratados nas temperaturas de 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500 e 600°C, foram utilizadas amostras dos cortes quadrados de 2 mm de conchas. Estas amostras foram fixadas com o nácar voltado para cima, sobre discos de aço cobertos com fita adesiva dupla face (Fig. 7.10a). Foram realizadas varreduras de 5 x 5 e 1 x 1 µm, em regiões centrais das amostras.

Para a obtenção de imagens topográficas de seções transversais do nácar e da camada prismática, foram utilizadas amostras dos cortes quadrados de 2 mm das conchas *in natura*. Estas amostras foram fixadas lateralmente, por meio de adesivo epóxi, em suportes metálicos presos a discos de aço cobertos com fita adesiva dupla face de modo que a superfície do nácar permanecesse perpendicular ao disco de aço. O sentido de varredura de AFM foi da extremidade interna (nácar) à externa (camada prismática) da concha, em direção ao periostracum. (Fig. 7.10b). Foram realizadas varreduras de 45 x 45 e 20 x 20 µm.

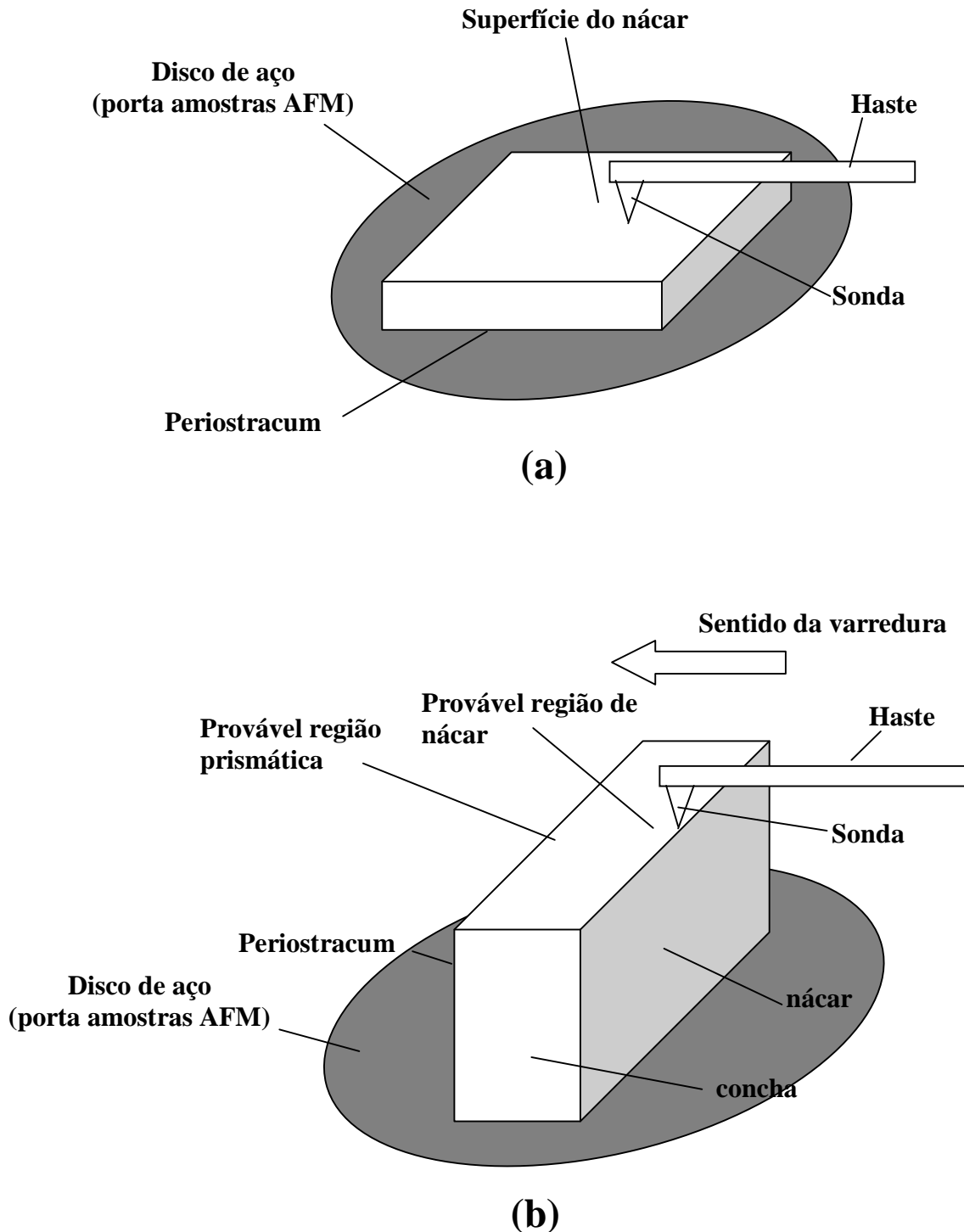


Figura 7.10. Experimentos com AFM. Análise da superfície do nácar de conchas *in natura* e tratadas termicamente (a) e análise do corte transversal do nácar e da camada prismática (b). Os elementos mostrados na figura não estão em proporção.



As amostras tiveram suas superfícies tratadas com jatos de N<sub>2</sub> (99.999% de pureza) para a remoção de partículas livres e poeira. As amostras foram analisadas em ar, com um Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, U.S.A.) no modo de contato e com velocidade de varredura em torno de 0.700Hz. Foram utilizadas hastes de constante elástica média igual a 0.15 N/m, com sondas de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> de raio médio de 15 nm (Digital Instruments). Os controles de varredura foram apropriadamente ajustados (força de contato adequada e elevados ganhos) para evitar artefatos provocados pela sonda durante a varredura. Para as visualizações em duas e três dimensões e captura dos dados de altura (imagem), foi utilizado o software Nanoscope versão 5.12 r3 da Digital Instruments.

### 7.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi baseada em estatística descritiva (tendência central e dispersão), teste de Shapiro-Wilk (para determinar se uma amostra aleatória segue ou não uma distribuição normal) e teste de hipótese (para verificar a existência ou não de diferenças significativas entre grupos amostrais) (Lindman, 1974; Lehman, 1975; Mendenhall, 1990). O nível de significância usado foi de 5%. Todo o tratamento estatístico foi realizado usando os softwares Excel 2002 e Origin 7.0.

## 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.3.1 ANÁLISE MINERALÓGICA POR XRD

A Figuras 7.11-7.16 apresentam uma seqüência de difratogramas de raios-X para os pós da concha *in natura* e tratada nas temperaturas de 350, 450, 600, 700 e 800°C, mostrando o efeito do aquecimento em sua composição cristalográfica. O padrão de difração de raios-X do pó da concha de *Perna perna in natura* (Fig. 7.11) apresentou as linhas de difração características da aragonita (JSPDS 41-1475) e da calcita (JSPDS 86-2334), dois polimorfos do CaCO<sub>3</sub>, na proporção de aproximadamente 90% de aragonita e 10% de calcita. Os resíduos R<sub>WP</sub>, R<sub>EXP</sub> e o grau de qualidade do refinamento ( $\chi^2$ ) foram respectivamente iguais a 6,55, 5,00 e 1,71. Este resultado indicou que a estrutura em forma de placas, formada por aragonita (nácar), predomina significativamente sobre a prismática, formada por calcita. Já o padrão de difração do pó tratado a 350°C (Fig.7.12), indicou a presença de aragonita e



calcita nas proporções de 81 e 19% ( $R_{WP} = 6,43$ ;  $R_{EXP} = 4,73$  e  $\chi^2 = 1,85$ ), representada por um pequeno aumento de intensidade nos picos da calcita e conseqüente redução dos de aragonita. Este é um indicativo das transformações de aragonita para calcita com o tratamento térmico.

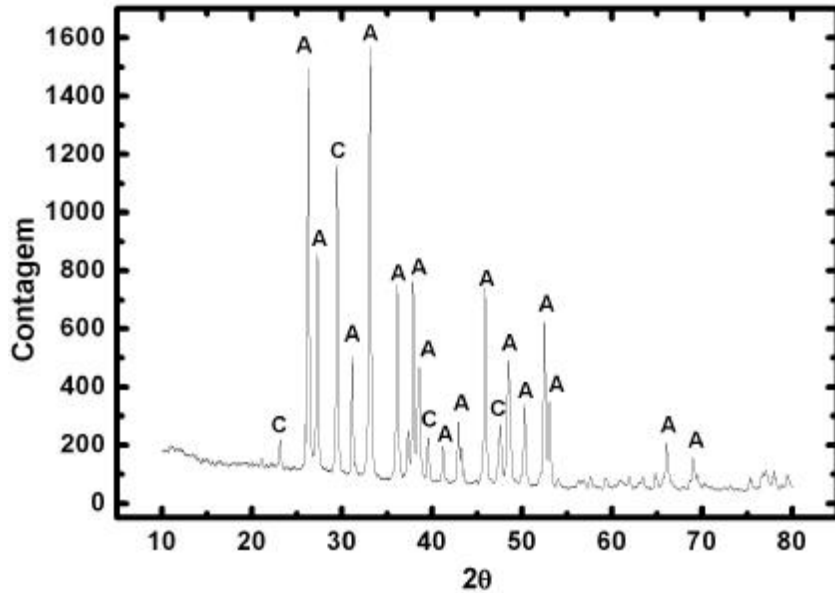


Figura 7.11. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão *Perna perna* *in natura*, indicando a presença de aragonita (A) e calcita (C).

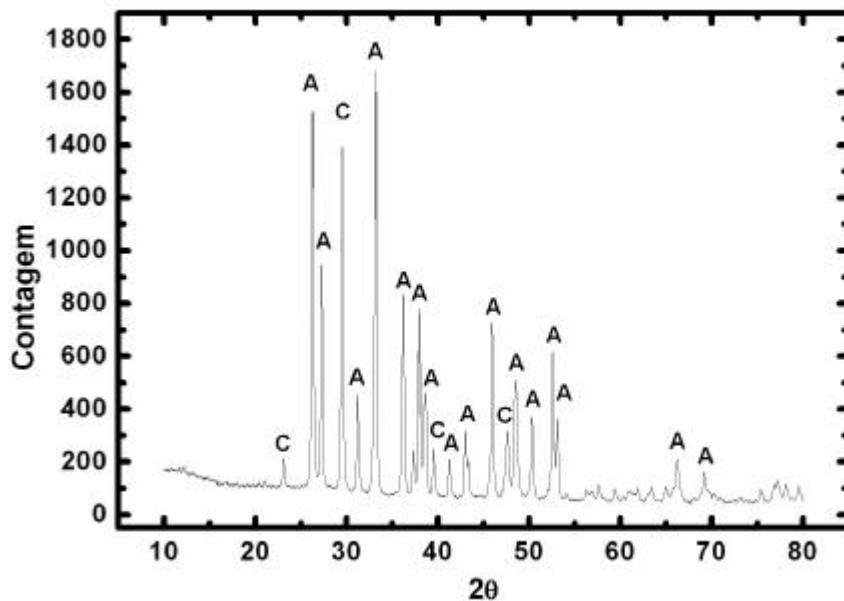


Figura 7.12. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão *Perna perna* tratada a temperatura de 350°C, indicando a presença de aragonita (A) e calcita (C).

Entretanto, em 450°C, o padrão de difração (Fig.7.13) indicou somente a presença de calcita, originada da transformação completa aragonita-calcita nesta temperatura ( $R_{WP} = 8,06$ ;  $R_{EXP} = 6,40$  e  $\chi^2 = 1,60$ ). Padrão de difração semelhante foi encontrado para as conchas tratadas a 600°C (Fig.7.14), indicando a mesma composição cristalográfica ( $R_{WP} = 7,05$ ;  $R_{EXP} = 5,30$  e  $\chi^2 = 1,78$ ).

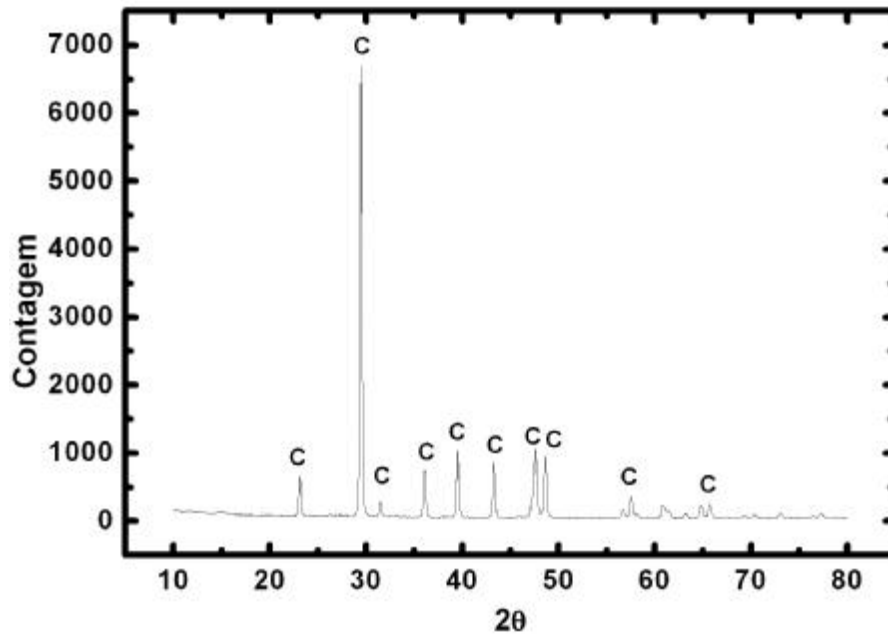


Figura 7.13. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão *Perna perna* tratada a temperatura de 450°C, indicando somente a presença de calcita (C).

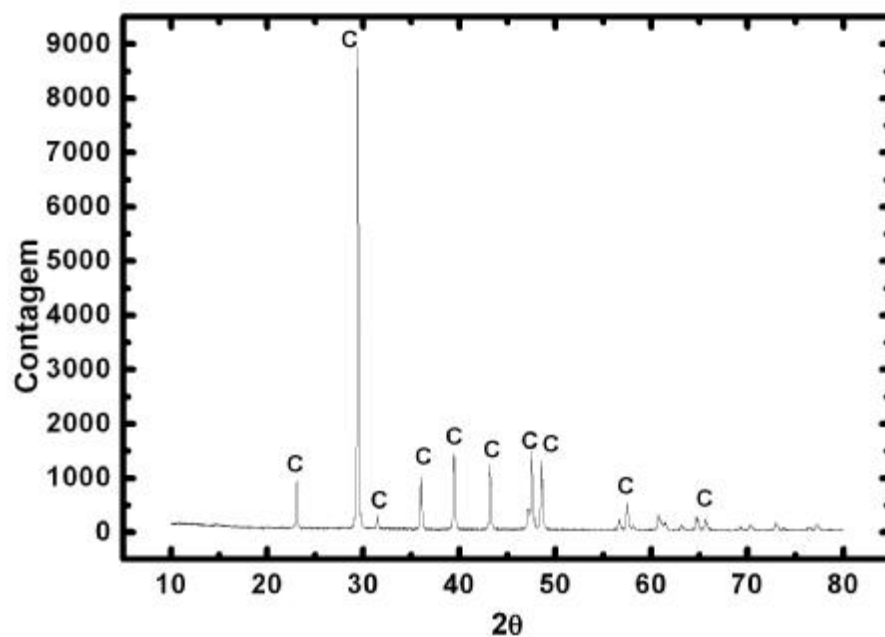


Figura 7.14. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão *Perna perna* tratada a temperatura de 600°C, indicando somente a presença de calcita (C).

O padrão de difração de raios-X do pó da concha tratada a 700°C (Fig. 7.15) apresentou as linhas de difração características da calcita e do hidróxido de cálcio - Ca(OH)<sub>2</sub> (JSPDS 81-2040), na proporção de aproximadamente 53% de calcita e 47% de Ca(OH)<sub>2</sub> (R<sub>WP</sub> = 4,86; R<sub>EXP</sub> = 3,80 e  $\chi^2 = 1,65$ )

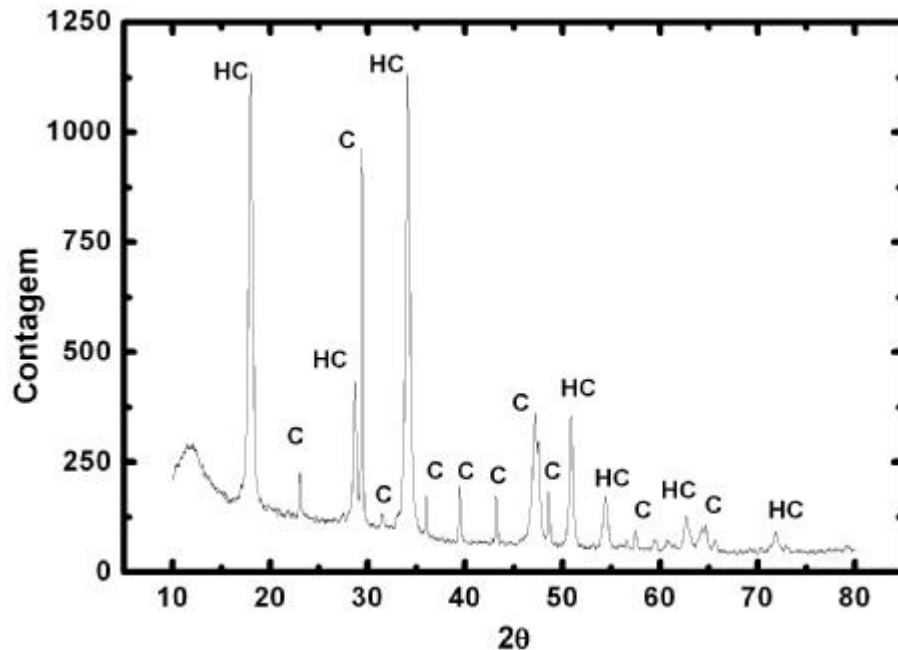
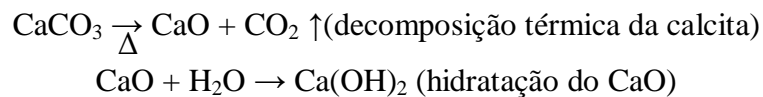


Figura 7.15. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão *Perna perna* tratada a temperatura de 700°C, indicando a presença de calcita (C) e hidróxido de cálcio (HC).

O hidróxido de cálcio se formou durante o resfriamento a partir da hidratação do óxido de cálcio (CaO) originado da decomposição térmica da calcita, conforme a seqüência de reações:



Em 800°C, o padrão de difração (Fig.7.16) indicou a presença Ca(OH)<sub>2</sub> (98%) originada da transformação praticamente completa da calcita em óxido de cálcio em temperaturas acima de 700°C. Ainda é detectada alguma calcita residual (2%) (R<sub>WP</sub> = 5,56; R<sub>EXP</sub> = 7,00 e  $\chi^2 = 1,61$ ).

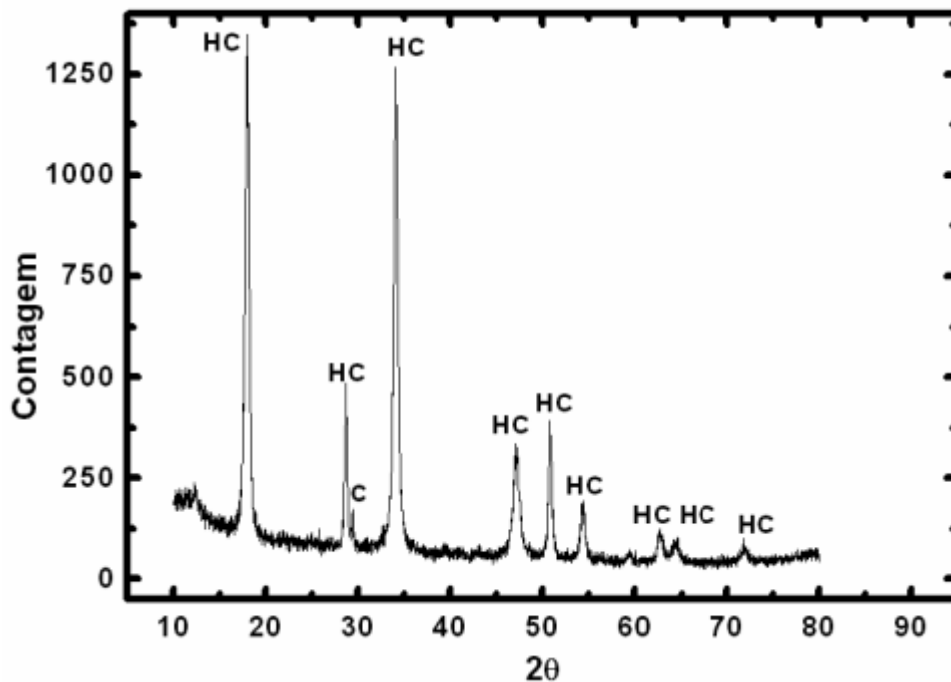


Figura 7.16. Padrão de difração para o pó da concha de mexilhão *Perna perna* tratada a temperatura de 800°C, indicando somente a presença de hidróxido de cálcio (HC).

### 7.3.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros de FT-IR para conchas *in natura* e tratadas termicamente em 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800°C são mostrados na Figura 7.17. Verificou-se a presença de inúmeras bandas entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ . Nas conchas *in natura* foi possível observar a presença de modos vibracionais internos dos íons carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ),  $\nu_4$ : 713, 700;  $\nu_2$ : 864;  $\nu_1$ : 1090 e  $\nu_3$ : 1490  $\text{cm}^{-1}$ . A banda registrada 1792  $\text{cm}^{-1}$  pode também ser atribuída aos grupos C=O dos íons carbonato. A divisão de  $\nu_4$  é característica da estrutura aragonítica. A região entre 3000 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos modos de estiramento dos grupos OH e NH dos compostos da matriz orgânica, enquanto que a região entre 2800 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  aos modos de estiramento C-H. A banda 1656  $\text{cm}^{-1}$  pode ser associada aos grupos amida I (ligação C-O) e/ou amida II (ligação C-N) da matriz orgânica protéica. Outras áreas de absorção podem ser atribuídas a matriz orgânica. Estas bandas estão no intervalo entre 2520 e 2650  $\text{cm}^{-1}$ , estando associadas aos grupos OH de ácidos carboxílicos.

Com relação à composição mineral, os espectros FT-IR das conchas tratadas

termicamente entre 100 e 300°C não apresentaram alterações significativas quando comparados com a concha *in natura*. Entretanto, modificações foram observadas entre 400 e 800°C. A redução de  $\nu_3$  (1490  $\text{cm}^{-1}$ ) e 1792  $\text{cm}^{-1}$ , a quase ausência de  $\nu_1$  (1090  $\text{cm}^{-1}$ ), o deslocamento da banda  $\nu_2$  de 864 para 880  $\text{cm}^{-1}$  e a degenerescência das bandas de  $\nu_4$  (para 713  $\text{cm}^{-1}$ ) em 400°C indicaram a predominância da fase calcita, com relação a aragonita devido a conversão aragonita-calcita. O desaparecimento completo de  $\nu_1$  (1090  $\text{cm}^{-1}$ ) em 500 e 600°C apontou para uma transformação total para calcita. Isto está em acordo com os resultados da difração de raios-X, que mostraram a existência de uma única fase, a calcita, em 450 e 600°C. O desaparecimento das bandas de 1792 e 713  $\text{cm}^{-1}$  e decréscimo de  $\nu_2$  (880  $\text{cm}^{-1}$ ) em 700 e 800°C decorre da formação de hidróxido de cálcio -  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a partir da hidratação do  $\text{CaO}$ , conforme também detectado nos difratogramas nestas temperaturas.

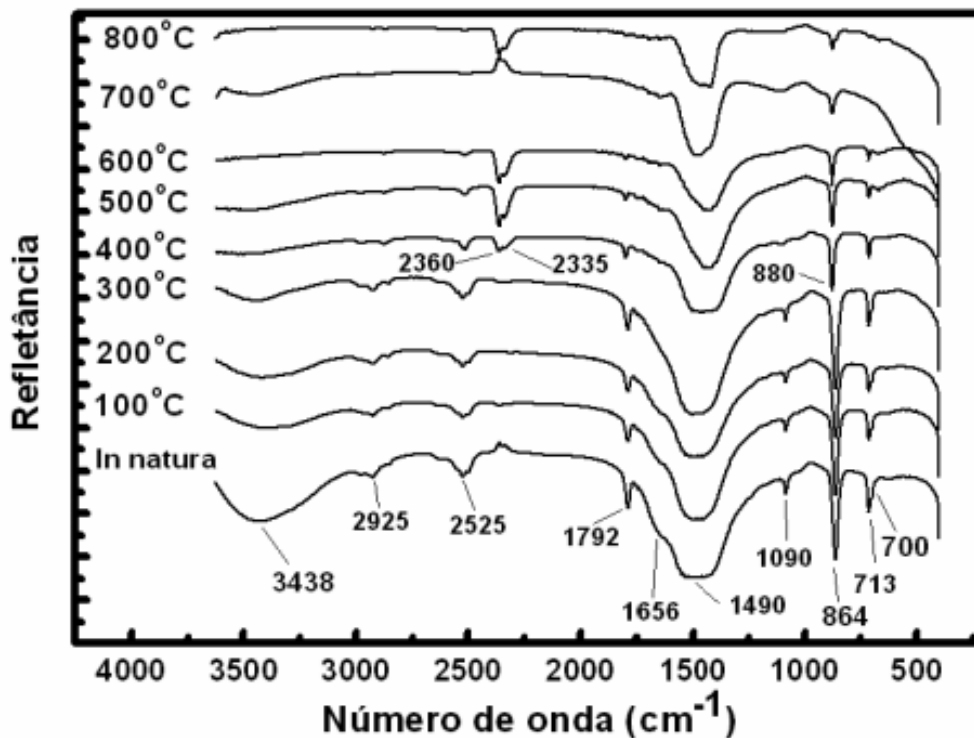


Figura 7.17. Espectro FT-IR do pó da concha de mexilhão *Perna perna in natura* e tratado em diferentes temperaturas.

O melhor indicador da presença da matriz orgânica está nas bandas entre 2800 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , característica das ligações C-H. Estas bandas foram pouco modificadas com o aumento da temperatura, estando presentes em 300°C. Sofrem uma redução drástica em 400 e 500°C (quebra das ligações C-H) e desaparecem completamente em 600°C, representando a total decomposição da matriz orgânica. O mesmo acontece com os modos associados aos

grupos OH dos ácidos carboxílicos. O surgimento das bandas características do CO<sub>2</sub> (2360 e 2335 cm<sup>-1</sup>), em 400-800°C, pode ser atribuído à absorção de CO<sub>2</sub> do ambiente pelo pó das conchas devido à decomposição da matriz orgânica com liberação de dióxido de carbono durante a queima. A redução gradual da banda de 1656 cm<sup>-1</sup> até seu desaparecimento em 300°C representa a degradação de grupos amida. A banda larga entre 3000 e 3500 cm<sup>-1</sup> se altera da concha *in natura* até 800°C, sofrendo uma redução quando comparada com o material *in natura*; mantendo-se pouco alteradas entre 200 e 300°C; diminuindo fortemente a partir de 400°C e desaparecendo em 800°C. Este comportamento representa os efeitos da temperatura sobre os modos de estiramento OH e NH dos compostos da matriz orgânica.

### 7.3.3 MEDIDAS DE MICRODUREZA

A Tabela 7.1 mostra a estatística descritiva para as medidas de microdureza realizadas nas amostras quadradas de 4 mm de conchas *in natura* e tratadas a 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550°C. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk resultou em uma distribuição normal para todos os grupos (conchas *in natura* e tratadas termicamente), o que levou a utilização do teste de significância ANOVA com comparações múltiplas – procedimento Tukey (Tabela 7.2).

Tabela 7.1. Resultados das medidas de microdureza (em HV) e sua estatística descritiva.  $S$  = média amostral,  $\sigma$  = desvio padrão e  $e$  = erro de estimação ( $t = 2,262$ , para  $\alpha = 0,05$ ).

In natura	100°C	150°C	200°C	250°C	300°C	350°C	400°C	450°C	500°C	550°C	
229	331	351	342	393	378	256	208	144	120	102	
222	342	335	360	395	371	242	197	137	132	94	
240	332	345	352	389	382	227	215	137	112	107	
231	334	338	367	382	373	241	211	153	125	102	
236	335	341	343	402	372	235	227	138	113	88	
247	340	339	357	385	389	235	216	144	103	103	
239	327	352	352	397	398	236	211	139	117	94	
249	329	333	362	377	376	235	205	143	121	84	
232	332	333	348	385	369	247	201	146	112	98	
251	313	335	348	390	376	249	206	141	122	96	
$S$	237,6	331,5	340,2	353,1	389,5	378,4	240,3	209,7	142,2	117,7	96,8
$\sigma$	9,43	7,96	7,02	8,26	7,51	9,03	8,49	8,47	4,96	8,13	7,11
$e$	6,74	5,67	5,02	5,90	5,37	6,46	6,07	6,06	3,55	5,81	5,08

Tabela 7.2. Tabela simplificada dos resultados do teste ANOVA com comparações múltiplas (procedimento Tukey) para as medidas de microdureza nas conchas de mexilhão *in natura* e tratadas termicamente ( $\alpha = 0,05$ ).

<i>In natura</i>	Diferenças significativas
100°C	Sim
150°C	Sim
200°C	Sim
250°C	Sim
300°C	Sim
350°C	Não
400°C	Sim
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
100°C	Diferenças significativas
150°C	Não
200°C	Sim
250°C	Sim
300°C	Sim
350°C	Sim
400°C	Sim
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
150°C	Diferenças significativas
200°C	Sim
250°C	Sim
300°C	Sim
350°C	Sim
400°C	Sim
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
200°C	Diferenças significativas
250°C	Sim
300°C	Sim

350°C	Sim
400°C	Sim
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
250°C	Diferenças significativas
300°C	Não
350°C	Sim
400°C	Sim
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
300°C	Diferenças significativas
350°C	Sim
400°C	Sim
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
350°C	Diferenças significativas
400°C	Sim
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
400°C	Diferenças significativas
450°C	Sim
500°C	Sim
550°C	Sim
450°C	Diferenças significativas
500°C	Sim
550°C	Sim
500°C	Diferenças significativas
550°C	Sim

Não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras de conchas *in natura* e tratadas termicamente na temperatura de 350°C o que implica que, nesta temperatura, as conchas apresentam estatisticamente a mesma microdureza média que as *in natura*. Não



foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre 100 e 150°C e entre 250 e 300°C. O gráfico da Figura 7.18, resume os resultados da análise de microdureza. Foi possível observar dois comportamentos mecânicos diferentes: aumento (até 300°C) e redução (entre 350 e 550°C) da microdureza da concha. O primeiro, provavelmente associado aos efeitos da temperatura sobre os modos de estiramento OH e NH e sobre os grupos amida; o segundo, principalmente as quebras das ligações C-H e degradação dos grupos OH de ácidos carboxílicos.

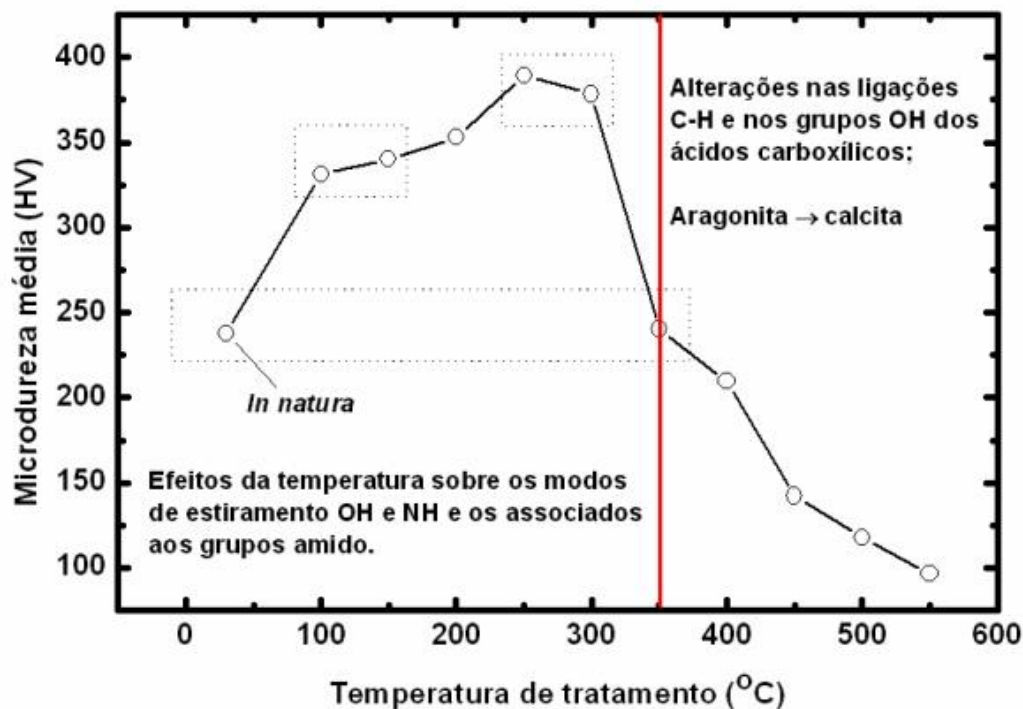


Figura 7.18. Gráfico de microdureza média em função da temperatura de tratamento. Os retângulos pontilhados representam a ausência de diferenças significativas entre os valores médios de microdureza.

### 7.3.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO

A Figura 7.19 mostra a imagem da seção transversal (no plano da espessura), feita com uma lupa, de uma concha de mexilhão *in natura*. Não foi possível distinguir visualmente, nesta ampliação (20x) ou em 1000x, o nácar e a camada prismática. O periostracum é visível, como indicado na figura.

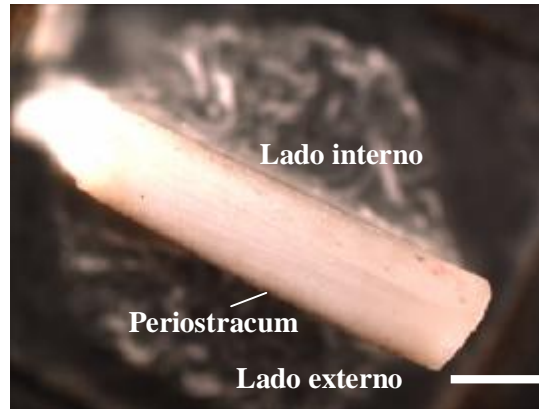


Figura 7.19. Microscopia ótica de campo claro da superfície da seção transversal da concha do mexilhão *in natura*. Nela estão indicados o periostracum e os lados externo e interno da concha (Aumento de 20x). Barra = 1 mm.

As Figuras 7.20-7.24 representam imagens de microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar de conchas *in natura* e tratadas termicamente até 600°C. Observou-se uma alteração na coloração, com escurecimento gradual da superfície, somente em 350-600°C certamente associado à alterações da matéria orgânica. Entre conchas *in natura* e tratadas até 400°C, nenhuma alteração topográfica (além do escurecimento, em 350 e 400°C) foi detectada até o aumento máximo de 200x (Fig.7.20a, b).

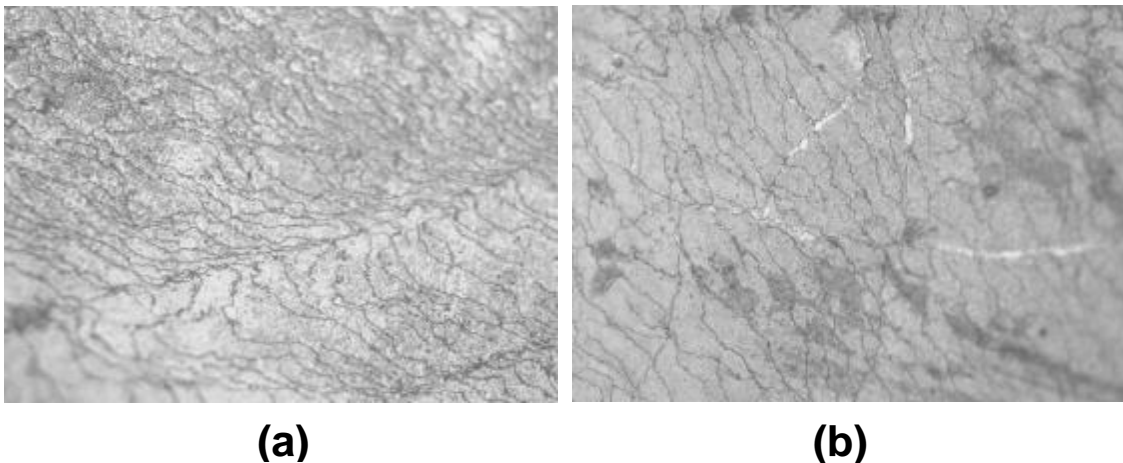


Figura 7.20. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar, *in natura* (a) e tratada a 400°C. Aumento de 200x.

Entretanto, em 450°C, diversas estruturas cristalinas em forma de agulhas puderam ser observadas imersas na superfície do nácar como resultado do aquecimento (Fig.7.21). Em 500, 550 e 600°C, estas agulhas começaram a se projetar para fora da superfície, com o aumento da temperatura (Figs. 7.22, 7.23 e 7.24).

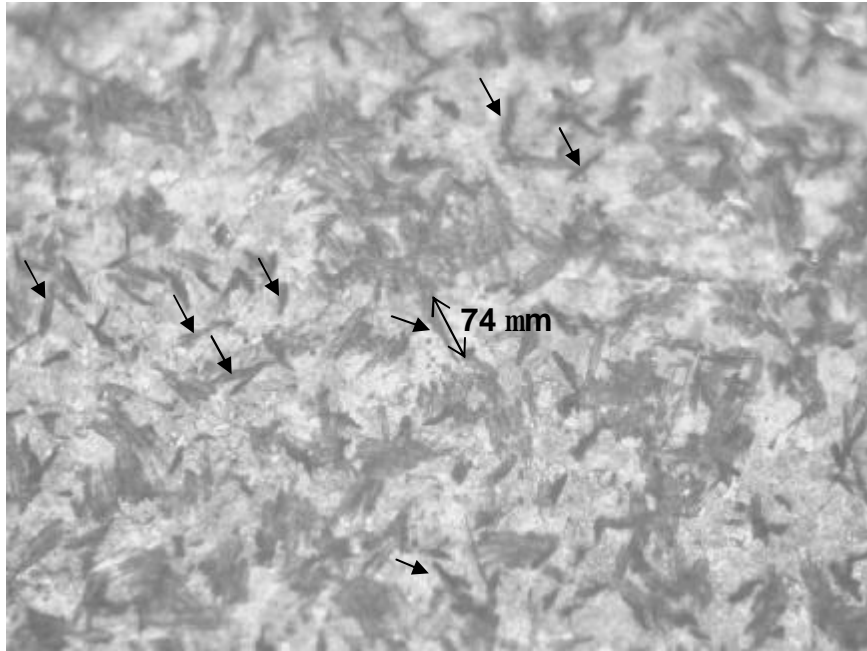


Figura 7.21. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 450°C. Estruturas cristalinas em forma de agulhas (algumas assinaladas por setas) podem ser observadas imersas no nácar. A dimensão de uma destas agulhas está indicada. Aumento de 200x.

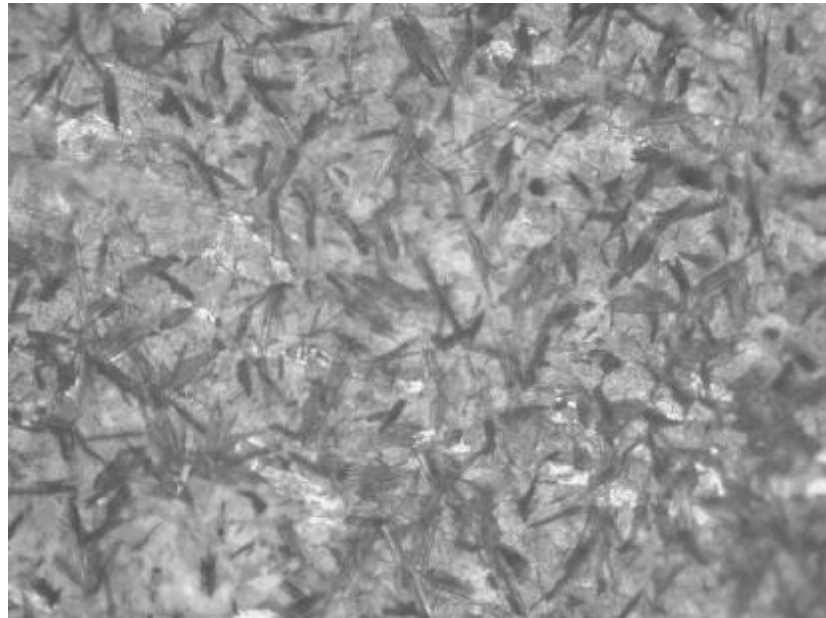


Figura 7.22. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 500°C. Observa-se o início da projeção de agulhas para fora da superfície do nácar. Aumento de 200x.

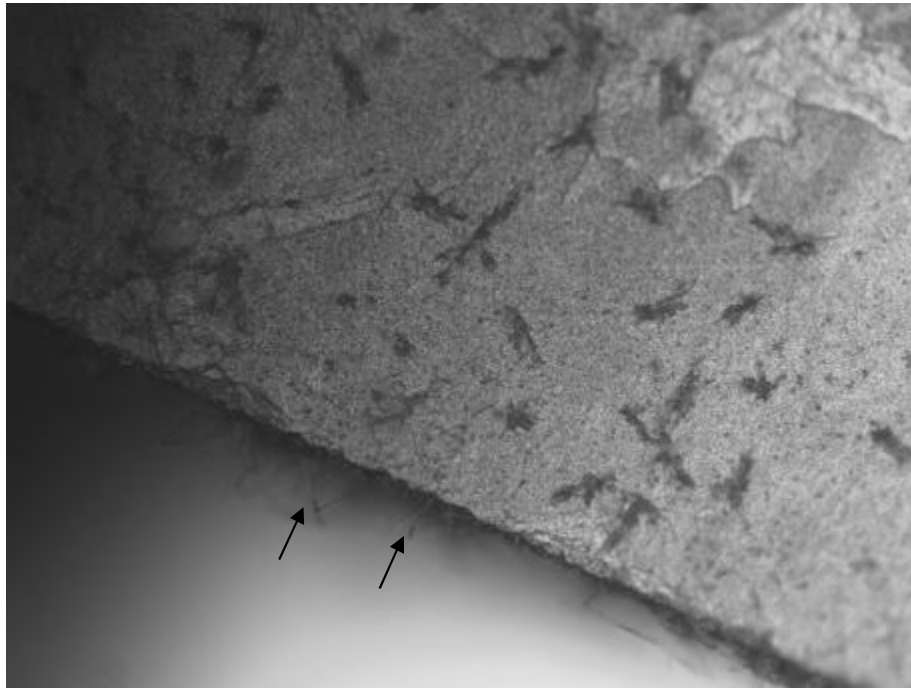


Figura 7.23. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 550°C. É possível observar a projeção de agulhas para fora da superfície, na lateral da concha (setas). Aumento de 100x.

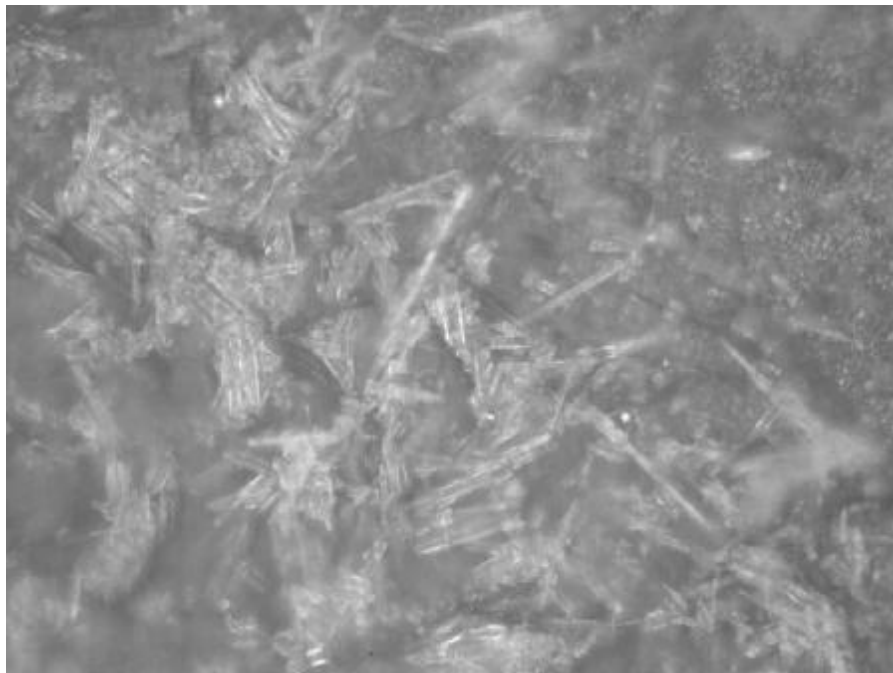


Figura 7.24. Microscopia ótica de campo claro da superfície do nácar tratada a 600°C, mostrando detalhes das agulhas. Aumento de 1000x.

Acima de 600°C não foi possível a obtenção de imagens de microscopia ótica da superfície, devido a fragmentação das conchas durante seu processo de manipulação.

Pelos resultados da difração de raios-X, a única fase cristalina presente em 450-600°C é a calcita, o que leva a conclusão de que as agulhas são provavelmente cristais de calcita formados na transição de fase aragonita/calcita. A microscopia ótica evidenciou alterações na matrix orgânica por meio do escurecimento da superfície do nácar e na matrix inorgânica através da formação das agulhas de calcita.

### 7.3.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A Figura 7.25 mostra imagens de altura feitas sobre a superfície do nácar da concha *in natura*. Podem ser observadas as placas de aragonita (Fig.25a) cobertas por um filme orgânico de estruturas globulares com dimensões em torno de 120 nm (Fig.25b). Análises de localização histoquímica da distribuição dos componentes da matriz orgânica realizadas em diversos tipos de conchas mostraram a existência de 4 zonas com diferentes composições sobre as placas de aragonita (Nudelman et al., 2006). Entretanto, as imagens de AFM obtidas não revelaram diferenças topográficas entre regiões sobre a camada orgânica das placas de aragonita das conchas de *Perna perna*, indicando similaridades topográficas entre estas zonas ou diferente organização dos componentes da matriz orgânica para esta espécie. Análises histoquímicas deverão se realizadas para confirmar esta hipótese.

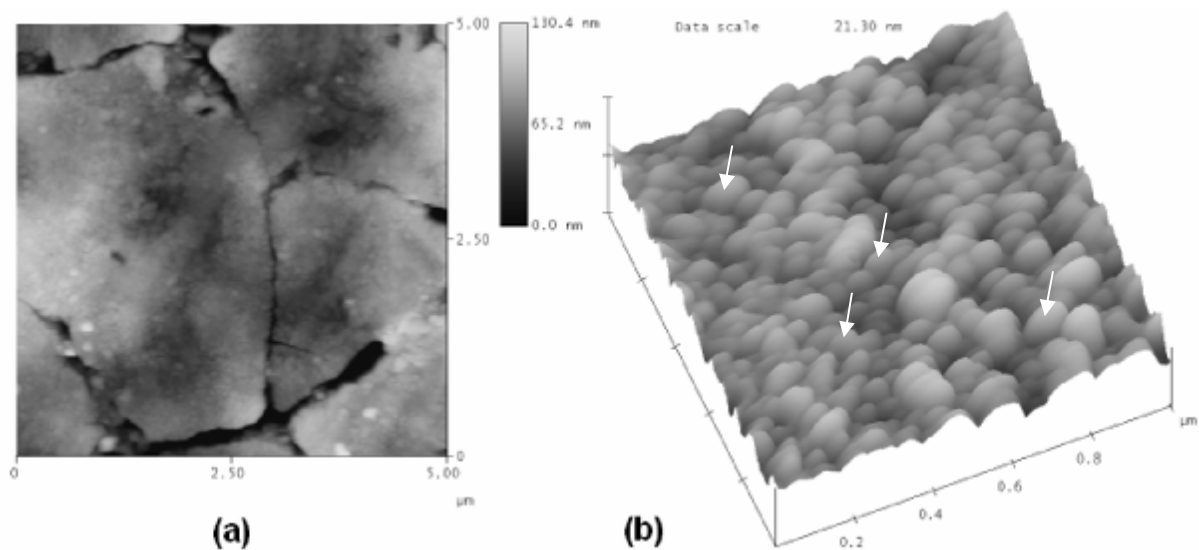


Figure 7.25. Imagens de AFM sobre a matriz orgânica da superfície do nácar *in natura*, mostrando as placas de aragonita (a), e detalhes da camada de proteínas/polissacarídeos (b) com estruturas globulares de 120 nm (setas). Varreduras de 5 x 5 μm (a) e 1 x 1 μm (b).



Nas conchas tratadas termicamente até 300°C, a superfície do nácar não exibiu mudanças topográficas significativas. A Figura 7.26 mostra imagens de AFM feitas sobre a superfície do nácar tratada termicamente entre 350 e 600°C. Foram detectadas transformações progressivas na camada orgânica com o aumento da temperatura. Intumescimento progressivo da camada, desaparecimento dos contornos das placas de aragonita e formação de grãos foram os principais efeitos observados (Figs.7.26a-c). A Figura 7.26d mostra estruturas inorgânicas sobre a superfície, após a destruição da matriz orgânica em torno de 600°C, conforme resultados das análises de FT-IR. Os grãos observados acima de 350°C continuam presentes nesta temperatura, caracterizando sua natureza inorgânica.

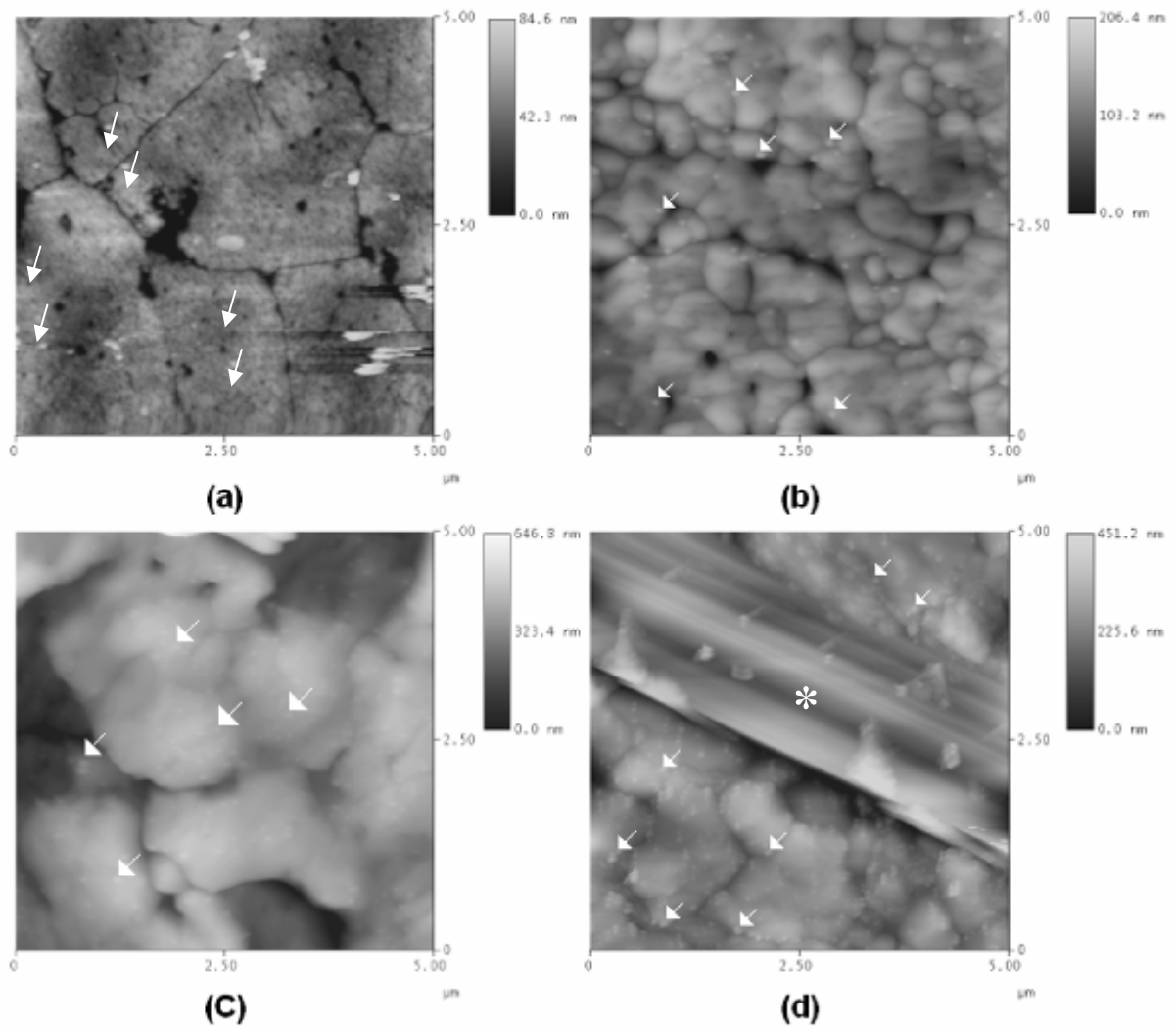


Figure 7.26. Sequência de imagens de AFM mostrando a superfície orgânica do nácar aquecida em diferentes temperaturas: (a) 350, (b) 400, (c) 450 e (d) 600°C. Intumescimento da camada orgânica, desaparecimento dos contornos das placas de aragonita e formação de grãos (setas) são observados sobre a superfície. A estrutura cristalina de calcita em forma de agulhas (asterisco) também é observada em 600°C (d). Varredura de 5 x 5  $\mu\text{m}$ .

Em 600°C, a maior parte da superfície inorgânica consiste de placas cobertas por grãos com dimensões de 200 nm (Fig.7.27a), visualizados também em 350°C; e de estruturas cristalinas em forma de agulhas (Fig.7.27b), as agulhas de calcita, já visualizadas na microscopia ótica.

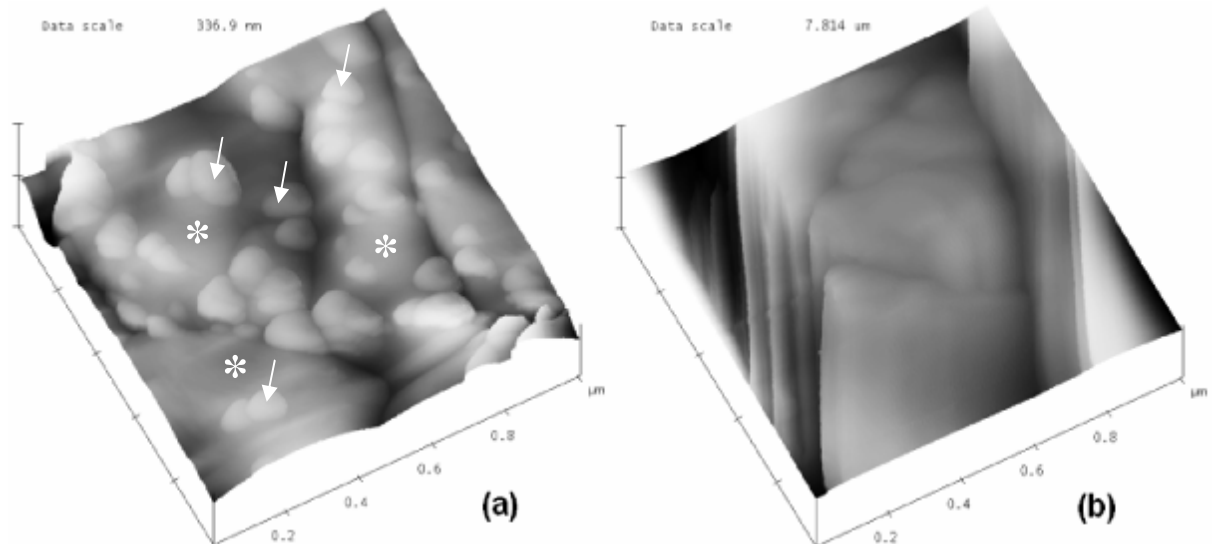


Figure 7.27. Imagens de AFM mostrando detalhes do nácar da superfície aquecida a 600°C. Em (a), observamos grãos (setas) com 200 nm sobre placas (asteriscos); e em (b), agulhas. Varredura de 1 x 1 μm.

Com os resultados da análise de raios-X, FT-IR, microdureza e da microscopia ótica pode-se interpretar as modificações topográficas na camada orgânica da superfície do nácar, registradas por AFM. Nas temperaturas entre 100-300°C, foram detectados efeitos da temperatura sobre os modos de estiramento OH/NH e sobre os grupos amida sem, contudo, ocorrerem alterações significativas nas ligações C-H e dos grupos OH dos ácidos carboxílicos. Na análise por AFM, isto foi representado pela inexistência de modificações topográficas na superfície. Nas temperaturas de 350, 400 e 450°C, as alterações principalmente das ligações C-H e dos grupos OH dos ácidos carboxílicos foram detectadas por meio de modificações na camada orgânica do nácar. Ou seja, as alterações topográficas da camada orgânica do nácar estiveram associadas fundamentalmente ao comportamento das ligações C-H e OH dos ácidos carboxílicos, com a temperatura. Em 600°C, além da destruição completa da matéria orgânica, existe a presença de uma única fase cristalina: a calcita. Os grãos, por também estarem presentes em 350°C, devem representar os primeiros estágios da conversão de aragonita em calcita. Assim, a calcita está presente nesta temperatura em diferentes arranjos: placas, grãos e agulhas.

As Figuras 7.28 e 7.29 mostram imagens de AFM feitas sobre a superfície lateral de conchas *in natura*. Pode ser observada, em meio a impurezas, a seção transversal do nácar com sua estrutura na forma de placas de aragonita.

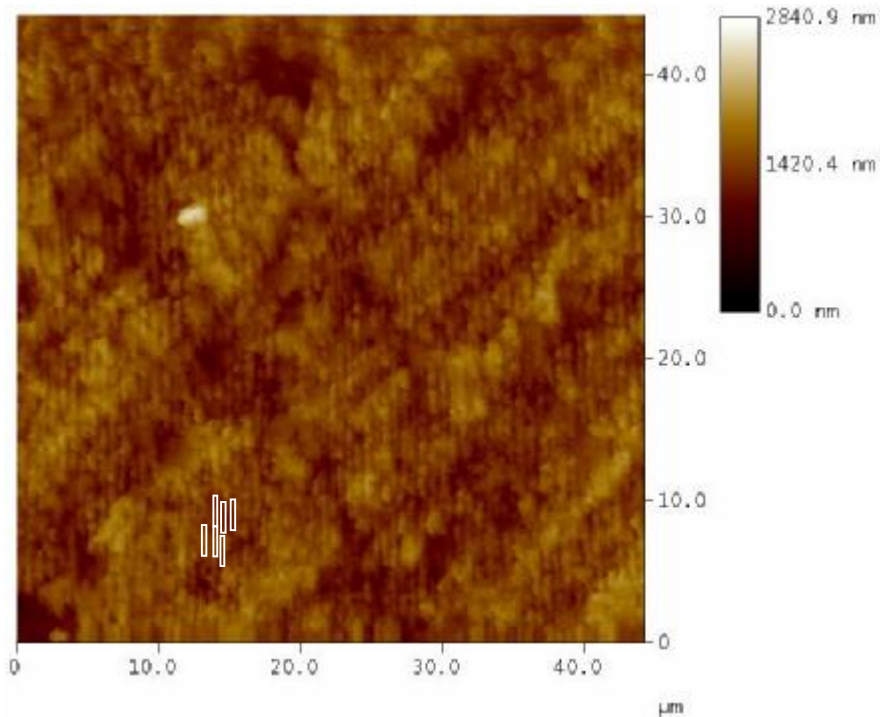


Figure 7.28. Imagem de AFM da seção transversal do nácar de conchas *in natura*, mostrando a estrutura de placas de aragonita (destacada por meio de retângulos brancos desenhados sobre a imagem). Varredura de 45 x 45  $\mu\text{m}$ .

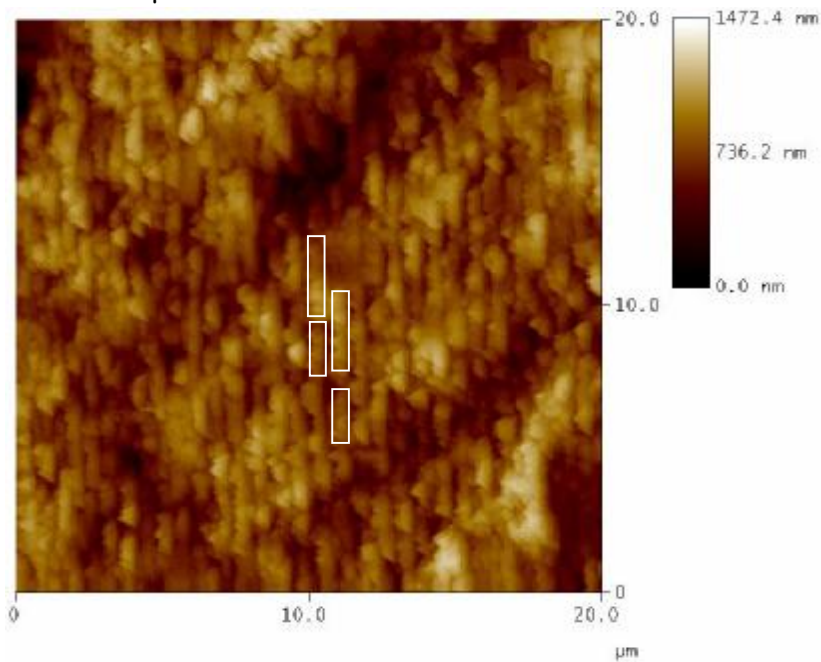


Figure 7.29. Ampliação da imagem da Figura 7.28, mostrando maiores detalhes da estrutura de placas de aragonita (destacada por meio de retângulos brancos desenhados sobre a imagem). Varredura de 20 x 20  $\mu\text{m}$ .



Observou-se que a topografia da superfície da região transversal das conchas *in natura*, revelada pelas imagens de AFM, permaneceu semelhante aquela das Figuras 7.28 e 7.29 (nácar), em praticamente toda a extensão da área analisada, no sentido de varredura lado interno para lado externo da concha. Este resultado corrobora com o obtido por difração de raios-X, no qual a aragonita representa 90% da composição cristalográfica da concha. Ou seja, o nácar é a camada predominante. Em regiões muito próximas ao lado externo, antes do periostracum, não foi possível a obtenção de imagens devido a extrapolação do limite de altura permitido para varredura em  $z$  pelo piezelétrico do equipamento. Certamente, por exclusão, estas regiões correspondem à camada prismática que por ocasião do corte das conchas, talvez tenha projetado suas colunas de calcita acima do valor tolerado pelo piezelétrico, gerando uma topografia que impossibilitou a obtenção de imagens por AFM.

## 7.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, foi investigado por medidas de XRD, FT-IR, microdureza, microscopia ótica e AFM o comportamento das conchas de mexilhão *Perna perna*, quando submetidas a um tratamento térmico. Observou-se uma estabilidade na composição cristalográfica da concha e na topografia do nácar até a temperatura de 300°C, associada a ausências de alterações significativas nos modos de estiramento do C-H, nas bandas dos grupos OH de ácidos carboxílicos e de transições aragonita/calcita. Entretanto, alterações sobre os modos de estiramento OH/NH e sobre os grupos amida da matriz orgânica, até esta temperatura, foram detectadas através do aumento da microdureza da concha. Apesar disto, a degradação da matéria orgânica ainda é reduzida. Acima de 300°C, as alterações na composição cristalográfica, topográfica e na redução da microdureza das conchas, estiveram associadas principalmente a modificações nos modos de estiramento do C-H e nas bandas dos grupos OH de ácidos carboxílicos da matriz orgânica (degradação) e a transições aragonita/calcita/óxido de cálcio da fase mineral. Somente em torno de 600°C, a matriz orgânica sofre uma completa decomposição. Também pode ser observada a transformação da aragonita em calcita, iniciando-se em torno de 350°C e estando completa em torno 450°C. Estes resultados concordam com os reportados nas análises por FT-IR e XRD nos pós de conchas de *Pinctada máxima* (Balmain et al., 1999).

O estudo do comportamento térmico e mecânico da superfície perolada é importante, pois estes materiais têm aplicações em implantes e na regeneração óssea, onde processos de esterilização são necessários. A matriz óssea começa a ser destruída por volta de

200°C e é decomposta em 500°C (Legros et al., 1987). A matriz orgânica da concha do mexilhão *Perna perna* só sofre alterações significativas (degradação acentuada) em sua composição e topografia acima de 300°C sendo completamente destruída somente em temperaturas em torno de 600°C, facilitando os processos de esterilização e conseqüentemente seu uso em implantes. Estudos de regeneração óssea ainda deverão ser realizados com conchas tratadas termicamente para associar aos resultados obtidos neste trabalho e verificar os efeitos das alterações nos modos de estiramento OH/NH e grupos amida da matriz orgânica nas propriedades osteogênicas e osteoindutivas do nácar. Também deverão ser feitas extrações do nácar para posterior caracterização.

Além da caracterização do comportamento térmico das conchas, também se obteve uma informação muito importante: a de que o nácar é a camada mais espessa nas conchas *in natura* desta espécie de mexilhão. Este fato não é evidente já que a espessura do nácar varia conforme o molusco. Como, é nesta camada que reside o maior interesse nas aplicações que envolvem implantes e regeneração óssea, a sua predominância transforma o mexilhão *Perna perna* em uma excelente fonte de nácar.

Este trabalho resultou no artigo a ser submetido em 2007 (Anexo C.2): R. P. Santos, M. L. Pessatti, T. L. P. Pessatti, J. L. Martins, C. A. A. Gadelha, J. B. cajazeiras, B. S. Cavada, T. M. Oliveira, G. A. Bezerra, J. A. K. Freire, V. N. Freire. X-ray diffraction, Fourier Transform Infrared, Microhardness, and Atomic Force Microscopy analysis of the *Perna perna* mussel shells thermally treated. Também está associado ao pedido da patente “Composto Luminescente Nanoestruturado a partir da Concha de Mexilhão *Perna Perna*”.

## COLABORADORES

V. N. FREIRE<sup>a</sup>, M. L. PESSATTI<sup>b</sup>, T. L. P. PESSATTI<sup>b</sup>, J. L. MARTINS<sup>c</sup>, C. A. A. GADELHA<sup>d</sup>, J. B. CAJAZEIRAS<sup>e</sup>, B. S. CAVADA<sup>e</sup>, T. M. OLIVEIRA<sup>e</sup>, G. A. BEZERRA<sup>e</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Curso de Ciências Biológicas Ênfase Em Biotecnologia. Rua Uruguai 458 Centro 88302202 - Itajai, SC, Brasil.

<sup>c</sup> Instituto de Química e Geociências (IQG), Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão, 96160-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

---

<sup>d</sup> Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza - Campus I, Departamento de Biologia Molecular. Cidade Universitária, Campus Castelo Branco, 58059000 - João Pessoa, PB, Brasil.

<sup>e</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas(BIOMOL), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addadi, L. and Weiner, S. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 4110.
- Albeck, S., Aizenberg, J., Addadi, L., Weiner, S. (1993). J. Am. Chem. Soc. **115**, 11691.
- Atlan, G., Balmain, N., Berland, S., Borzeix, S., Lopez, E. (1997). CR. Acad. Sci. Paris **320**, 13.
- Balmain, J., Hannover, B., Lopez, E. (1999). J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.) **48**, 749.
- Berman, A., Hanson, J., Leiserowitz, L., Koetzle, T.F., Weiter, S., Addadi, L. (1993). Science **259**, 776.
- Bining, G., Quate, C.F., Gerber, C. (1986). Phys. Rev. Lett. **56**, 930.
- Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., Grathwohl, G., Fritz, M. (2003). Journal of Microscopy **212**, 280.
- Carmo, T. M. S, Costa, M. B., Siqueira, H. P. (1984). Determinação do valor nutritivo da carne de mexilhões, *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). Estudos sobre o teor de proteínas, lípidos, glicogênio e água. Resumos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 36, 750.
- Delattre, O., Cattone, Y., Berland, S., Borzeix, S., Lopez, E. (1997). Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol **7**, 1.
- Feng, Q.L., Cui, F.Z., Pu, G., Wang, R.Z., Li, H.D. (2000). Materials Science and Engineering **11**, 19.
- Gadelha, C.A.A. (1995) Ms thesis, Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Brasil.
- Henriques, M. B. (2004). Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Jackson, A.P., Vincent, J.F.V., Turner, R.M. (1988). Proc R Soc London **234**, 415.
- Jena, B.P., Horber, J.K.H. (2002) (editors). In “Methods in Cell Biology: Atomic Force Microscopy Cell Biology”, Academic Press, California, USA **68**.
- Katti, D.R., Katti, K.S., Sopp, J.M., Sarikaya, M. (2001). Computational and Theoretical Polymer Science **11**, 397.
- Katti, K., Katti, D.R., Tang, J., Pradhan, S. (2005). J. Matter. Sci. **40**, 1749.
- Klappenback, M. A. (1965). Lista preliminar de los Mytilidae brasileños con claves para determinación y notas sobre su distribución. Anais Acad. Bras. Cienc., 37, 327-352.
- Legros, R., Balbain, N., Bonel, G. (1987) Calcif. Tissue Res. **41**, 41.

- Lehman, E.L. (1975). In “Nonparametrics: Statistical Methods Bases on Ranks”. Holden-Day, Inc, San Francisco.
- Li, X., Chang, W., Chao, Y.J., Wang, R., Chang, M. (2004). *Nano Lett.* **4**, 613.
- Lindman, H.R. (1974) In “Analysis of Variance in Complex Experimental Designs”. W.H. Freeman Company, San Francisco.
- Liu, J., Sarikaya, M., Aksay, I. (1992). *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **255**.
- Lopez, E., Berland, S., LeFaou, A. (1995). *Bull. de l’Inst. Océano Monaco* **3**, 49.
- Lopez, E., Vidal, B., Berland, S., Comprasse, S., Comprasse, G., Couly, G. (1992). *Tissue Cell* **24**, 667.
- Mann, S. (1992). In “Inorganic Materials”. (D. W. Bruce and D. O’Hare, Eds). Wiley, New York **237**.
- Mann, S., Rchibald, D.D.A., Didymus, J.M., Douglas, T., Heywood, B.R., Meldrum, F.C., Reeves, N.J. (1993). *Science* **261**, 1286.
- Marcondes, A. C. (1994). *Biologia – ciência da vida*. São Paulo: Atual.
- Marques, H. L. A. (1988). *Dissertação de Mestrado em Ecologia*, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Marsh, M.E., Sass, R.L. (1980). *Science* **208**, 1262.
- Mendenhall, W., Wackerly, D.D., Scheaffer. R.L. (1990). In “Mathematical Statistics with Applications”, PWS-Kent Publishing Company, Boston.
- Nakara, H. (1983). In “Calcification of Gastropode Nacre” (West-broeck, P., and De jong, E. W. Eds), Reidel, Dordrecht, Netherlands **225**.
- Nudelman, F., Gotliv, B.A., Addadi, L., Weiner, S. J. (2006). *Structural Biology* (in Press).
- Ogada, T., Werther, J. (1996). *Fuel* **75**, 617.
- Oliver, W.C., Pharr, G.M. (1992). *J. Mater. Res.* **7**, 1564.
- Purges, W. K., Sadava, D., Orians, G. H., Heller, H. C. (2002). *Vida: A Ciência da Biologia*. 6ed. Porto Alegre: Artmed.
- Radmacher, M., Fritz, M., Hansma, P. K. (1995). *Biophys. J.* **69**, 264.
- Rugar, D., Hansma, P. (1990) *Phys. Today* **43**, 23.
- Sarikaya, M., Liu, J., Aksay, I.A. (1995). In “Biomimetics: design and processing of materials”. New York: Woodbury. **35**, 90.
- Schaffer, T.E., Zanetti, C.I., Proksch, R., Fritz, M., Walters, D.A., Almqvist, N., Zaremba, C.M., Belcher, A.M., Smith, B.L., Stucky, G.D., Morse, D.E., Hansma, P.K. (1997). *Chem. Mater.* **9**, 1731.

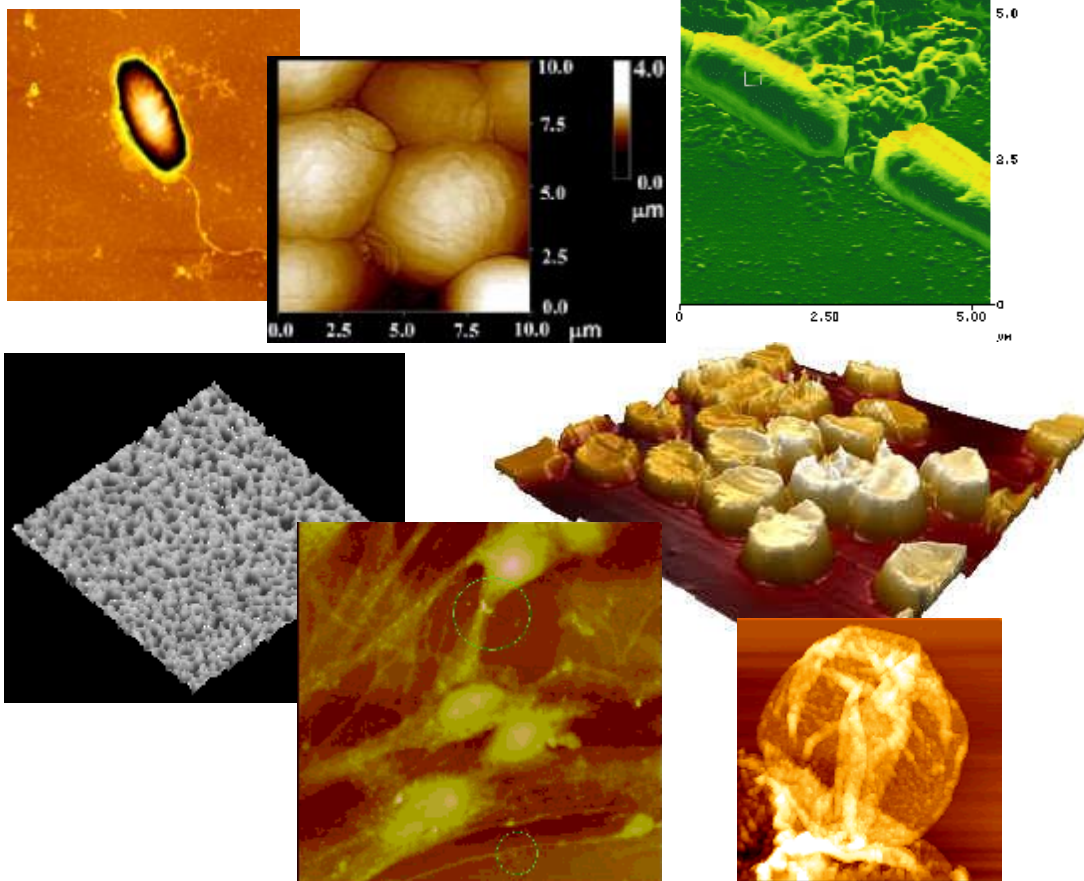
- Silve, C., Lopez, E., Vidal, B., Smith, D.C., Comprasse, S., Comprasse, G., Couly, G. (1992). *Calcif. Tissue Int.* **51**, 362.
- Sneddon, I.N. (1965). *Int. J. Eng. Sci.* **3**, 47.
- Song, F., Soh, A. K., and Bai, Y. L. (2003). *Biomaterials* **24**, 3623.
- Song, F., Zhang, X.H., Bai, Y.L. (2002). *J. Mater. Res* **17**, 1567.
- Tao, N.J., Lindsay, N.M., Lees, S. (1992). *Biophys. J.* **63**, 1165.
- Treloar, L.R. (1975). In “The Physics of Rubber Elasticity”, Clarendon Press, Oxford.
- Wang, R.Z., Wen, H.B., Cui, F.Z., Zhang, H.B., Li, H.D. (1995). *J Mater Sci.* **30**, 2299.
- Warren, E.L. (1993) *The New York Times*. Aug. **31**.
- Watabe, N., Wilbur, K.M. (1976). (Eds). In “The mechanisms of Biomineralization in Invertebrates and Plants”. University of South Carolina Press, Columbia, SC. **283**.
- Weisenhorn, A.L., Hansma, P.K., Albrecht, T.R., Quate, C.F. (1989) *Appl. Phys. Lett.* **54**, 2651.
- Weiss, I.M., Kaufmann, S., Mann, K., Fritz, M. (2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**, 17.
- Weiss, I.M., Renner, C., Strigl, M.G., Fritz, M. (2002). *Chem. Mat.* **14**, 3252.
- Zentz, F., Bédouet, L., Almeida, M.J., Milet, C., Lopes, E., Giraut, M. (2001). *Mar. Biotechnol* **3**, 36.
- Liao, H, Brandsten C., Lundmark, T, Li, J. (1997). Responses of bone to tiania-hydroxyapatite composite an nacreous implants: a preliminary comparison by in situ hybridization., F., Bédouet, L., Almeida, M.J., Milet, C., Lopes, E., Giraut, M. *J Mat Sci Mater Med* **8**, 823.
- Bobbio, A. (1972). The first endosseous alloplastic implant in the history of man. *Bull Hist Dent* **20**, 1.
- Fujita, T., Ohue, T., Fujii, Y., Miyauchi, A., Takagi, Y. (1996). Heated oyster shell-seaweed calcium (AAA Ca) on osteoporosis. *Calcif Tissue Int* **58**, 226.
- Nizard, R., Bizot, P., Kerboull, L., Sedel, L. (1996). *Biomatériaux orthopédiques*. *Encycl Med Chir, Techniques chirurgicales – Orthopédie – Traumatologie*, 40-003. Paris: Elsevier; p; 20.
- Sedel, L., Rey, C. (1997). *Bioceramics*. Vol. 10. Paris: Pergamon (Elsevier Science).
- Guillemin, G., Fournie, J., Pastat, J. L., Chetail, M. (1981). Contribution á l’étude du devenir d’un fragment de squelette de corail madrépore implanté dans la diaphyse des os longs chez le chien. *CR Acad Sci Paris*; 293:371-376

- 
- Guillemin, G., Meunier, A., Dallant, P., Christel, P., Pouliquen, J. C., Sedel, L. (1989). Comparison of coral resorption and bone apposition with two naturals of different porosities. *J Biomed Mater Res* **23**, 765.
- Patar, J. L., Pouliquen, J. C., Guillemin, G. (1990). Le corail naturel utilise comme substitute de greffon osseux. In: Mainard D, Delagoutte J. P., Merle M., editors. *Application clinique en chirurgie orthopédique et traumatologique. Actualités en biomatériaux*. Paris: Romillat; p. 161-175.
- Irigaray, J. L., Braye, F., Oudadesse, H., Jallot, E., Weber, G., Amiribadi, A., Tixier, H. (1996). Diffusion of mineral elements evaluated by PIXE at the bone-coral interface. *J Biomater Sci Polymer Ed* **7**, 741.
- Fricain, J. C., Baquey, C., Basse-Cathalinat, B., Dupuy, B. (1997). Comparison of resorption and bone conduction of two CaCO<sub>3</sub> bone substitutes. In: Sedel, L., Rey, C., editors. *Bioceramics*. Vol. 10. London: Elsevier Science. p. 383-387.



# SEÇÃO III

## MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MATERIAIS BIOLÓGICOS



A microscopia de força atômica é uma técnica poderosa no estudo de materiais biológicos devido a sua resolução, opções de análise e não destrutividade do método.



---

---

## AFM EM CÉLULAS, TECIDOS E BIOMATERIAIS

---

---

### 8.1 INTRODUÇÃO

O microscópio de força atômica (AFM), como já explicado no capítulo 2, é um dos membros mais versáteis de uma família de microscópios conhecidos como microscópio de varredura por sonda (SPM). Estes instrumentos geram imagens por meio da interação de uma sonda com a amostra. Seu potencial para gerar imagens de sistemas biológicos de forma não destrutiva e em tempo real, sob condições “naturais” (como no microscópio ótico) é claramente de interesse para os pesquisadores de áreas biológicas. Desde os primeiros estudos no início dos anos 80, publicações descrevendo aplicações biológicas do SPM têm crescido rapidamente.

Os SPM's não são estritamente microscópios. Eles obtêm imagens da superfície varrendo-a com uma sonda muito fina. Os microscópios convencionais (microscópios óticos) formam uma imagem pela coleta da radiação transmitida através, ou refletida da amostra. A resolução é limitada pela difração e depende do comprimento de onda da radiação. Assim, os microscópios óticos têm resolução limitada por aproximadamente 200 nm. Imagens de altas resoluções de materiais biológicos podem ser obtidas usando elétrons de alta energia em microscópios eletrônicos. Apesar do desenvolvimento de novas técnicas de microscopia eletrônica que levaram ao desenvolvimento de muitos métodos elegantes para a preservação da estrutura original dos materiais biológicos, altas resoluções envolvem o uso de alto vácuo no exame de amostras. Pelo fato dos SPM's formarem imagens por um princípio diferente dos microscópios eletrônicos, possíveis alterações estruturais na amostra devido às condições experimentais necessárias as técnicas eletrônicas são evitadas.

Os primeiros estudos biológicos com SPM foram feitos com o microscópio de tunelamento (STM). Como a corrente de tunelamento decai rapidamente com a distância à superfície, materiais isolantes muito finos como interfaces e biopolímeros necessitariam serem metalizados para que a corrente de tunelamento fosse detectável. O AFM e seus refinamentos como o crio-AFM (microscopia de força atômica em baixa temperatura) elimina estas restrições, sendo os métodos de SPM preferenciais na biologia. Originalmente acreditava-se

que os SPM's fossem técnicas não evasivas. Na prática, a amostra sofre danos que, no entanto, podem ser minimizados com ajustes apropriados das variáveis envolvidas na aplicação da técnica.

Outros tipos de SPM estão também crescendo em importância na biologia. Um candidato, agora disponível comercialmente, é o microscópio ótico de varredura de campo próximo (em inglês, Scanning Near-Field Optical Microscope – SNOM, como é mais conhecido). É uma combinação de microscopia de varredura por sonda com microscopia ótica convencional e que surgiu como uma modificação de um microscópio de tunelamento (apesar de que a teoria do seu funcionamento já era conhecida há muito tempo) supera o limite de difração. O SNOM melhora a resolução da ótica convencional em pelo menos uma ordem de grandeza. Ele pode alcançar uma resolução espacial de até 25 nm, o que é bem menor que a resolução de um microscópio de força atômica ou de um de tunelamento, mas acrescenta informação que só é acessível com contraste ótico. É por isso que esta técnica se utiliza como complementar ao AFM. O princípio é simples. A amostra a ser resolvida é varrida com uma fibra ótica, que tem uma abertura muito estreita (de algumas centenas de ângstroms de diâmetro na sua extremidade) e que está recoberta por uma película metálica opaca. Pela fibra passa luz visível, que é refletida pela amostra, ou passa através dela para um detector. A intensidade do sinal ótico detectado em cada ponto da varredura constitui um conjunto de dados que irão reproduzir uma imagem da superfície da amostra com resolução entre 25 e 50 nm, com a única condição de que a distância entre a fonte de luz e a amostra seja da ordem de 50Å. Há também um crescimento no desenvolvimento de combinações de AFM's ou SNOM's com microscópios óticos convencionais e confocais, ou seu uso em conjunção com técnicas de superfícies como a ressonância plasmônica de superfície (Morri set al., 2001).

## 8.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O AFM é projetado para produzir imagens de alta resolução sobre superfícies duras e planas. Poucos sistemas biológicos aproximam-se deste ideal. Biominerais como dentes, ossos e conchas são duros e freqüentemente parcialmente cristalinos. Entretanto, o maior problema está no preparo de amostras com superfícies suficientemente planas. Isto pode ser freqüentemente obtido através de cortes e polimentos.

Células são normalmente largas em relação ao tamanho da sonda, além de serem altamente deformáveis. Sendo assim, existe uma variedade de métodos de preparação e

análise de deformação e indentação de células. Tecidos apresentam problemas únicos. Em geral, podem ser examinados usando procedimentos modificados desenvolvidos para a microscopia ótica e eletrônica sendo o principal problema a produção de superfícies suficientemente planas para serem analisadas com o AFM.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para imobilizar células. Cada método deveria proporcionar a realização de imagens de células vivas sobre condições fisiológicas. Claro que nem sempre isto é possível. Normalmente a célula será imobilizada em algum tipo de substrato (normalmente mica ou lamínula) para que possa ser varrida pela sonda do AFM. Esta varredura poderá ser feita em solução (normalmente um meio fisiológico) ou em ar. A primeira opção é sempre preferível, já que mantém as condições originais da célula, sem provocar qualquer tipo de alteração em sua estrutura. Para tal é utilizado um dispositivo especial acoplado ao AFM que permite a realização de varreduras em meio líquido. Entretanto, o estudo de estruturas biológicas também podem ser feito em ar.

Diversas dificuldades surgem na realização de imagens de células imobilizadas em substratos. Se as células são rígidas e mantêm sua forma quando imobilizadas, a superfície poderá ter uma rugosidade que impossibilite a obtenção de imagens, devido às células excederem os limites do deslocamento vertical do dispositivo de varredura piezelétrico (“scanner”). A solução para este problema é fazer com que as células “penetrem” a superfície, diminuindo assim sua altura. Duas técnicas têm sido utilizadas: o aprisionamento em meio poroso, como mostrado na Figura 8.1 (Holstein et al, 1994; Kasas e Ikai, 1996) e a completa anexação das células em um meio como agar, como na Figura 8.2 (Gad e Ikai, 1996).

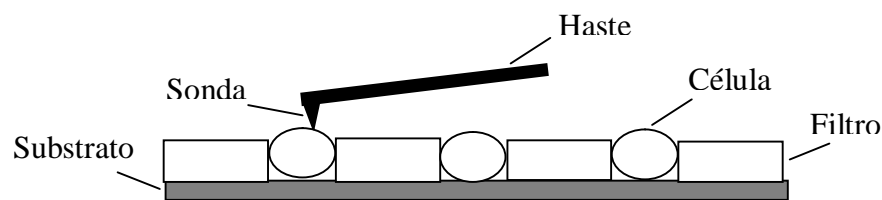


Figura 8.1. Aprisionamento em meio poroso.

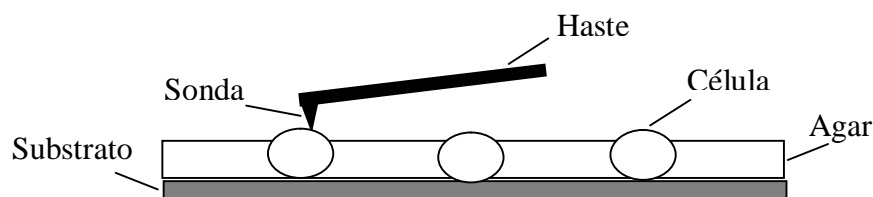


Figura 8.2. Anexação de células em agar.

O crescimento de monocamadas confluentes providencia também uma redução da rugosidade da superfície da amostra permitindo assim a realização de imagens sobre as células (Fig.8.3).

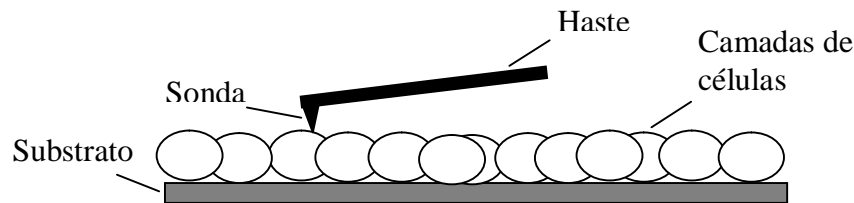


Figura 8.3. Crescimento de monocamadas confluentes de células.

Para células individuais, é possível imobilizá-las por secagem em ar sobre o substrato através do uso de camadas superficiais não específicas como poly-L-lysine (Butt et al., 1990) ou específicas como anticorpos ligantes (Prater et al, 1990).

Muitas células são facilmente imobilizadas pela simples secagem sobre um substrato como, por exemplo, vidro. Durante a secagem, a célula creta (perde água), diminuindo consideravelmente seu volume e conseqüentemente, sua altura. Assim, podem atingir os limites de deslocamento vertical do “scanner”, possibilitando a realização das medidas de AFM.

Células são materiais “macios”, sendo facilmente deformáveis durante o contato da sonda com a amostra, principalmente quando as medidas são feitas em solução (meio fisiológico), onde as características elásticas da membrana permanecem intactas. Sendo assim, é necessário reduzir ao máximo a força de contato entre a superfície da célula e a sonda para a formação de imagens sem artefato. Em solução, detalhes da estrutura interna da célula não são acessíveis (Fig.8.4).

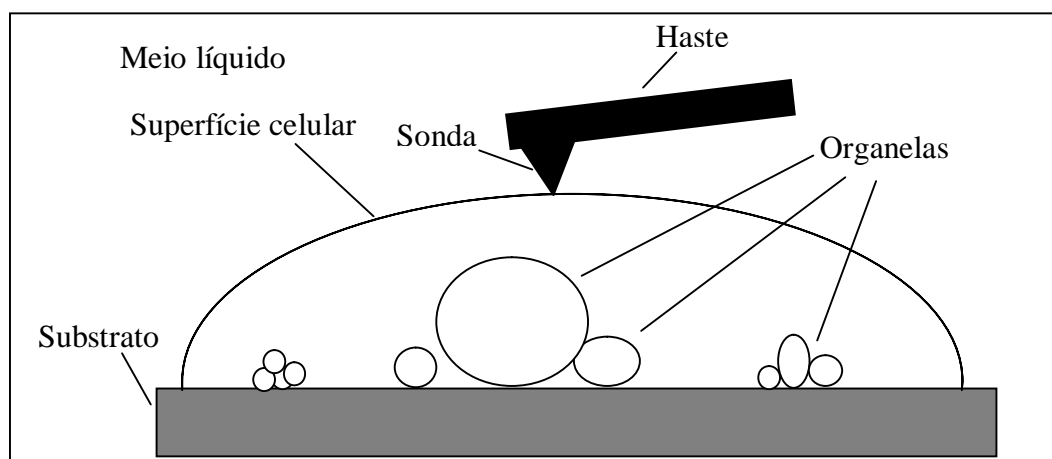


Figura 8.4. Célula em meio líquido.

Entretanto, quando a análise de AFM é feita em ar, a perda de água e conseqüente redução do volume celular aliada a alta elasticidade da membrana (que também vai diminuindo com a desidratação) resulta em um efeito interessante: a superfície celular passa a ser “moldada” pelas organelas celulares, revelando assim detalhes da estrutura interna (Fig.8.5).

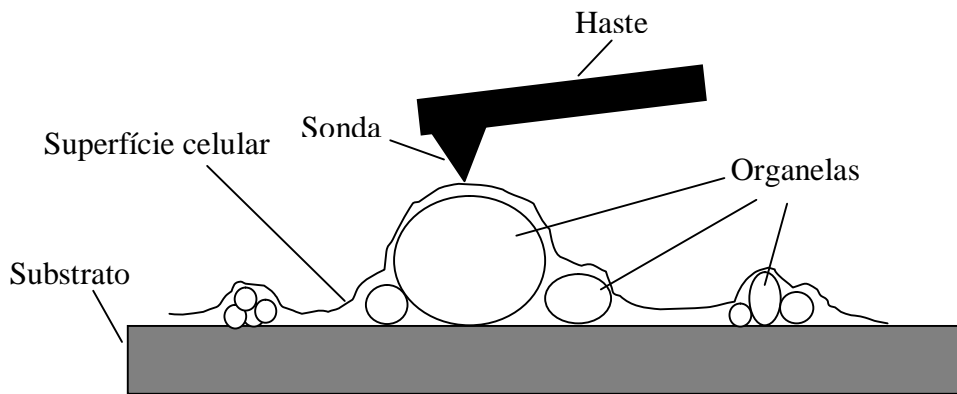


Figura 8.5. Célula seca em ar.

É claro que este efeito depende muito da elasticidade da superfície. Em baterias, por exemplo, onde há a presença de uma parede celular resistente, este efeito não é muito significativo.

Tecidos intactos são muito grandes, macios e rugosos para serem vistos diretamente com o AFM. Além disto, o AFM mostrará apenas a estrutura externa da amostra. Portanto, técnicas histológicas e citológicas deverão ser utilizadas para converter materiais grandes, moles e rugosos em pequenos, rígidos e planos para serem analisados pela sonda do AFM. A técnica mais utilizada é a secção ultrafina de tecidos em meios de inclusão como parafina, metacrilato dentre outros. Além desta técnica já ser utilizada em microscopia ótica e eletrônica de transmissão, proporciona condições favoráveis à obtenção de imagens de microscopia de força atômica tanto da superfície externa como interna de tecidos (Fig.8.6).

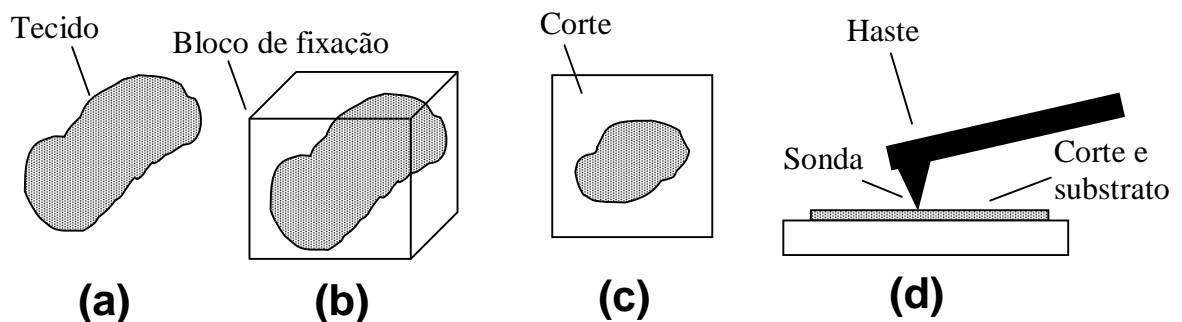


Figura 8.6. Estudo de tecidos em AFM. Tecido (a); Tecido fixado (b); Corte do tecido fixado (c) e Corte analisado com AFM (d).

### 8.3 AFM EM CÉLULAS

Bactérias isoladas, depositadas sobre substratos, também podem ser analisadas em ar ou solução aquosa por AFM. As estruturas da parede celular são rígidas, possibilitando uma análise de sua rugosidade (Gunning et al, 1996). Imagens dos flagelos de bactérias podem ser obtidas, sendo observada sua subestrutura (Jaschke et al, 1994). A ação de antibióticos sobre bactérias tem sido investigada por AFM. Estes estudos incluem a observação da ação da penicilina sobre *Bacillus subtilis* (Kasas et al 1994) e o uso do AFM para examinar alterações na estrutura da superfície de *E. coli* devido à exposição ao antibiótico cefodixime (Braga e Ricci, 1998). A maior vantagem do AFM neste tipo de estudo é a possibilidade de obter imagens em condições naturais e com uma preparação de amostras simples, quando comparado com os métodos de microscopia eletrônica.

Poucos estudos têm sido realizados sobre fungos, sendo estes concentrados no *Saccharomyces cerviceae* (Henderson, 1994; Kasas e Ikai, 1996; Gad e Ikai, 1996). Células de fungos são grandes e macias, tornando difícil o estudo dinâmico de células vivas em ambientes naturais: as células são facilmente deformáveis e as amostras normalmente apresentam elevada rugosidade, dificultando a análise de AFM devido as limitações do movimento vertical da sonda. Fungos secos em ar, imobilizados sobre substratos de vidro, têm sido preparados para o estudo da morfologia de sua superfície. Algumas características principais podem ser reconhecidas e utilizadas para demonstrar diferenças na morfologia da superfície para diferentes espécies (Henderson, 1994). Vários métodos têm sido desenvolvidos para o estudo *in vivo* de fungos em condições naturais, por AFM. O principal deles envolve a imobilização dos fungos em filtros Millipore com dimensões de poros similares aos das células (Kasas e Ikai, 1996). Isto reduz a rugosidade da amostra na ambiente natural: o meio líquido de cultura. Um refinamento deste método é a imobilização em agar gel, permitindo também a obtenção de imagens em meio de cultura líquido (Gad e Akai, 1996).

Microscópios de forma atômica são originalmente projetados para estudos de superfícies com alta resolução. Assim, os primeiros AFM's (que possuíam apenas faixas de varredura sub-micrométrica) não permitiam estudos de células intactas. Somente com o desenvolvimento de novas faixas de varredura, sistemas celulares começaram a serem estudados e as células sanguíneas foram as primeiras amostras investigadas.

Células vermelhas são de fácil obtenção e identificação sendo ideais para as primeiras aplicações de AFM ao estudo de sistemas celulares. Os estudos iniciais estavam centralizados com a realização de imagens de células intactas e na determinação do nível de resolução no qual a morfologia da superfície poderia ser estudada. A forma das células vermelhas é uma característica particular de doenças e há um interesse crescente na identificação ultra-estrutural destas características associadas com doenças ou infecções de eritrócitos por parasitas. As primeiras imagens de células vermelhas foram feitas por meio de fixação em ar (Gould et al., 1990) ou solução tampão (Butt et al., 1990). A fixação evita a deformação da célula pela sonda, evidenciando sua forma côncava. Imagens de alta resolução com AFM têm revelado detalhes da estrutura da membrana que antes permaneciam ocultos por outras técnicas, como a organização nanoestrutural do citoesqueleto e das proteínas na superfície da membrana (Almqvist et al., 1994; Zhang et al., 1995; Han et al., 1995; Zhang et al., 1996). Marcadores estão sendo usados, juntamente com a microscopia de força atômica, para localizar e identificar sítios específicos sobre a superfície das células vermelhas. Neagu et al. (1994) usaram partículas superparamagnéticas acopladas a anticorpos para localizar os receptores da transferrina sobre a superfície de eritrócitos. O AFM tem sido usado para comparar as estruturas de células vermelhas normais e com alguma patologia (Zachee et al., 1992; 1994; 1996) e também as diferenças no citoesqueleto de membranas não infectadas e infectadas com o *Plasmodium falciparum* (Garcia et al., 1997). Alterações como formação de espículas, diminuição da cavidade central, alterações nas dimensionais, aumento da rugosidade, alterações na forma e até na elasticidade da membrana são indicativos de patologias e da presença de parasitas (Garcia et al., 1997).

Leucócitos (células brancas) também podem ser analisados por AFM, apresentando uma forma mais variada e uma superfície mais irregular que os eritrócitos. O uso combinado de microscópios óticos e de força atômica (Putman et al., 1992) e/ou métodos de marcação imunológica (Putman et al., 1993) são de evidente importância na identificação dos tipos de células e no uso subsequente do AFM para estudos de alta resolução em condições naturais. Imagens comparativas de células antes e depois da marcação fornecem um meio de identificação das características específicas da superfície. Marcadores específicos podem ser utilizados para isolar e ligar tipos específicos de células. Anticorpos fixados em lamínulas de vidro têm sido usados para ligar preferencialmente linfócitos B para a realização de imagens em AFM (Prater et al., 1990).

Megacariócitos são células grandes que permanecem na medula óssea e partem-se continuamente em fragmentos de célula denominadas plaquetas. A plaqueta é somente uma



minúscula porção de uma célula, mas está carregada com as enzimas e substâncias químicas necessárias para a sua função: vedar vazamentos em vasos sanguíneos e iniciar a coagulação sanguínea. A lesão a um vaso sanguíneo expõe fibras de colágenas. Quando uma plaqueta encontra fibras colágenas ela é ativada. Ela incha, assume um formato irregular, torna-se viscosa e libera substâncias químicas que ativam outras plaquetas e iniciam a coagulação sanguínea. As plaquetas viscosas formam um tampão no local danificado e a coagulação subsequente produz uma rede mais forte no vaso. O AFM tem permitido a obtenção de imagens em tempo real da ativação de plaquetas aderidas a superfícies de vidro em condições fisiológicas (Fritz et al., 1993; 1994). Detalhes do citoesqueleto e mudanças durante a ativação podem ser visualizadas no AFM.

Existem dois tipos principais de células no tecido nervoso: neurônios e células gliais. As primeiras, que apresentam variações em forma e tamanho, geram e conduzem sinais eletroquímicos; as segundas, não produzem nem conduzem sinais elétricos, mas realizam o suporte físico dos neurônios e desenvolvem muitas funções de manutenção. Há um grande interesse no crescimento e desenvolvimento destas células e suas interações com superfícies e neurônios. A microscopia de força atômica é uma técnica para a investigação da estrutura de superfícies, entretanto, estudos recentes sobre células gliais demonstraram a possibilidade de obtenção de imagens de seus componentes intracelulares (Henderson et al., 1994; Papura et al., 1993; Vinckier et al., 1995). Em estudos de culturas misturadas de células gliais e neurônios, foi possível observar as interações entre estas duas células (Papura et al., 1993). Também o AFM tem sido utilizado para investigar a localização de canais de cálcio sobre a fase de um terminal nervoso pré-sináptico (Haydon, et al., 1994) e ainda, através de alterações na elasticidade da membrana de neurônios, seu comportamento durante processos de geração de sinais eletroquímicos (Laney et al., 1997).

A capacidade do AFM em gerar imagens de células vivas, com resolução molecular, aliado a possibilidade de mapeamento de propriedades mecânicas de células com elevada resolução espacial e temporal fornece um meio para o estudo dos mecanismos de batimento em células contráteis. Por meio de imagens de AFM e das curvas de força (força versus deformação da superfície) de células cardíacas é possível monitorar a atividade localizada de sua contração com uma resolução espacial entre 1-3 nm e temporal entre 60-100  $\mu$ s e as mudanças de sua elasticidade durante esta contração (Hofmann et al., 1997). Usando um modelo geométrico simples (Hertz, 1982) para a indentação da sonda na célula, a interpretação das curvas de força versus distância têm fornecido um mapa do módulo de Young da superfície de células cardíacas, durante o batimento.



As células de plantas foram um dos primeiros sistemas vivos a serem analisados por AFM (Butt et al, 1990). Estudos do corte de folhas têm revelado a ultraestrutura da parede de células vegetais (Butt et al., 1990; Canet et al., 1996). Há poucos estudos de AFM com grãos de pólen (Rowley et al., 1995; van der Wel et al, 1996; Demanet and Sankar, 1996), sendo a maioria deles feitos com microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão. Entretanto, o AFM tem-se demonstrado uma alternativa interessante, já que possui uma metodologia de preparação de amostras mais simples e a capacidade de revelar detalhes da subestrutura da superfície da exima não atingida pelo SEM.

#### 8.4 AFM EM MONOCAMADAS E BIOFILMES BACTERIANOS

Um grande número de superfícies formadas por monocamadas bacterianas tem sido estudado por meio da microscopia de força atômica. Estas estruturas são geralmente rígidas, bem ordenadas e podem ser isoladas na forma de grades folhas. Exemplos incluem a camada HPI de *Deinococcus radiodurans* (Schabert et al., 1992), a membrana roxa de *Halobacterium* (Muller et al, 1995), camadas S de *Bacillus coagulans* e *Bacillus sphaericus* (Ohnesorge et al., 1992). Outras estruturas mais complexas incluem espículas, aros e projeções cilíndricas da estrutura superficial de *Methanospirillum hungatei* (Southam et al, 1996) e as vesículas da *cyanobacterium Anabaena flo-aquae* (McMaster et al., 1996).

Em adição a realização de imagens de bactérias depositadas em suportes sólidos, é também possível usar o AFM para investigar a formação e estrutura de biofilmes formados sobre interfaces ou superfícies sólidas. Há diversos métodos microscópicos que podem ser aplicados ao estudo de biofilmes (Surman et al., 1996; Beech et al., 1996) e o AFM complementa o uso das microscopias ótica e eletrônica. A maior vantagem no uso do AFM é a capacidade de cobrir a faixa de ampliação tanto do microscópio ótico como do eletrônico e a produção de imagens tridimensionais de superfícies. A maior limitação é a curvatura ou rugosidade dos substratos e dos biofilmes formados sobre eles. Normalmente o AFM tem sido usado no estudo de biofilmes formados sobre vidro (Surman et al., 1996), superfícies metálicas (Bremer et al, 1992; Steele et al, 1994; Beech, 1996; Beech et al., 1996), óxidos de ferro (Maurice et al., 1996) e sobre interfaces óleo-água (Gunning et al., 1996). Estudos de biofilmes bacterianos hidratados formados sobre superfícies de cobre têm mostrado que as bactérias são observadas ligadas a cavidades metálicas adjacentes por meio de polímeros extracelulares estendendo-se até estas cavidades (Bremer et al., 1992). Este fato é importante

na explicação do papel dos polissacarídeos extracelulares na formação de “buracos” por biocorrosão em superfícies metálicas.

## 8.5 AFM EM TECIDOS

Com uma preparação adequada das amostras, tecidos também podem ser estudados por AFM. Imagens no modo intermitente de seções ultrafinas de tecidos coletados de ratos revelaram detalhes de organelas citoplasmáticas (mitocôndrias e demais grânulos), componentes nucleares (nucléolo e cromatina), o retículo endoplasmático rugoso e ribossomos associados, microvilosidades e cílios, etc...(Yamashino e Shigeno, 1995). Similarmente, imagens no modo de contato de seções ultrafinas de fibras da madeira revelaram detalhes de sua composição celular (Titcombe et al., 1997). Cortes de tecidos do intestino e do pâncreas de ratos têm mostrado detalhes de sua superfície inacessíveis por outras técnicas (Ushiki et al., 1994). As microvilosidades foram claramente identificadas no intestino e imagens de alta resolução evidenciaram a presença de estruturas globulares, possivelmente glicoproteínas, sobre a superfície das microvilosidades.

Um dos benefícios adicionais do uso do AFM é possibilidade de realização de amostras em seu estado natural. Um exemplo do uso de cortes frescos e úmidos é o estudo da córnea bovina, onde foi possível visualizar a rede de colágeno e detalhes da periodicidade de suas fibras (Fullwood et al., 1994).

## 8.6 AFM EM BIOMATERIAIS

Biomateriais são provavelmente os materiais biológicos menos estudados por AFM. Estes materiais são geralmente complexos, mas seus componentes minerais formam um meio rígido e provavelmente bem ordenado, possibilitando assim a obtenção de imagens de AFM.

A estrutura final do osso é baseada na interação entre colágeno e a apatita depositada. Estudos combinados de TEM e AFM sobre tendões mineralizados e desmineralizados têm sido usados para refinar os modelos de composição para tendões das patas de peru. Estudos de TEM e AFM complementam ou ao outro, um revelando a estrutura interna e outro, aspectos da superfície (Lee et al., 1994). Alterações topográficas na estrutura de ossos devido à osteoporose também podem ser analisadas por AFM, que com sua

sensibilidade é capaz de detectar flutuações nas propriedades elásticas a distâncias na ordem de 50 nm (Tao et al., 1992).

Existem inúmeros trabalhos demonstrando o uso do AFM para estudar a dentina (Kinney et al., 1993; 1996; Cassinelli e Morra, 1994; Marshall Jnr. et al., 1993; 1995) e o esmalte dentário (Sollbohmer et al., 1995). A dentina é protegida da abrasão e corrosão durante a alimentação, de ataques químicos oriundos dos ácidos dos alimentos ou de metabólicos bacterianos, por uma camada externa de esmalte composta de 86% de cristais de hidroxiapatita. Foram verificadas alterações na rugosidade de superfícies dentárias, medida por AFM, em experimentos envolvendo a desmineralização da dentina por ação de ácidos (Marshall et al., 1995). Outros experimentos envolvem a ação de substâncias clareadoras e de enxágüe bucal na topografia da superfície dentária.

Conchas, cascos e carapaças são um dos poucos exemplos de materiais biológicos sobre o qual é possível observar detalhes com resolução atômica (Friedbacher et al., 1991; Manne et al., 1994). Resoluções em escala atômica têm sido obtidas sobre a carapaça do ouriço do mar *Stronglyocentrotus purpuratus*, após redução a pó e compactação em discos de KBr antes da análise de AFM. (Friedbacher et al., 1991). Diatomáceas são algas unicelulares freqüentemente utilizadas no teste da resolução de objetivas de microscópios óticos. Suas carapaças são basicamente de silício, coberto por filmes de polissacarídeos e lipídeos. A investigação de várias espécies de diatomáceas, por meio de AFM, mostrou poros e ondulações em seus nodos centrais (Linder et al., 1992). O nácar, a camada perolada das conchas de moluscos, consiste de camadas de placas de aragonita cristalina, aderidas por uma “cola” biológica. O AFM tem sido usado para examinar as diferentes distribuições das placas de aragonita em um bivalve (*Atina* sp.) e um gastrópode (*Haliotis rufescens*) (Manne et al., 1994).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P. (2001). *Atomic Force Microscopy for Biologists*. London: Imperial College Press.
- Almqvist, N., Backman, L., Fredriksson, S. (1994). Imaging human erythrocyte spectrin with atomic force microscopy. *Micron* 25, 227-232.
- Beech, I. B. (1996). The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms – an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 37, 141-149.
- Beech, I. B., Cheung, C. W. S., Johnson, D. B. e Smith, J. R. (1996). Comparative studies of bacterial biofilms on steel surfaces using atomic force microscopy and environmental scanning electron microscopy. *Biofouling* 10, 65-77.
- Braga, P. C., Ricci, D. (1998). Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 42, 18-22.
- Bremer, P. J., Geesey, G. G. e Drake, B. (1992). Atomic force microscopy examination of the topography of a hydrated bacterial biofilm on a copper surface. *Current Microbiology* 24, 223-230.
- Butt, H. J., Wolff, E. K., Gould, S. A. C., Northern, B. D., Peterson, C. M., Hansma, P. K. (1990). Imaging cells with the atomic force microscope. *J. Structural Biol.* 105, 54-61.
- Canet, D., Rohr, R., Chamel, A., Guillian, F. (1996). Atomic force microscopy study of isolated ivy leaf cuticles observed directly and after embedding in Epo. *New Phytol.* 134, 571-577.
- Cassinelli, C., Morra, M. (1994). Atomic force microscopy studies of the interaction of a dentin adhesive with tooth hard tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 1427-1431.
- Demant, C. M., Sankar, K. V. (1996). Atomic force microscopy images of a pollen grain: a preliminary of rat sperm nuclei. *Science* 258, 269-271.
- Friedbacher, G., Hansma, P. K., Ramli, E., Stucky, G. D. (1991). Imaging powders with the atomic force microscopy: from biominerals to commercial materials. *Science* 253, 1261-1263.
- Fritz, M., Radmacher, M., Gaub, H. E. (1993). *In vitro* activation of human platelets triggered and probed by atomic force microscopy. *Experimental Cell Res.* 205, 187-190.

- Fritz, M., Radmacher, M., Gaub, H. E. (1994). Granule motion and membrane spreading during activation of human platelets imaged by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 66, 1328-1334.
- Fullwood, N. J., Hammiche, A., Pollock, H. M., Hourston, D. J., Song, M. (1994). Atomic force microscopy of the cornea and sclera. *Current Eye Res.* 14, 529-535.
- Gab, M., Ikai, A. (1996). Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies. *Biophys. J.* 69, 2226-2233.
- Garcia, C. R. S., Takeuchi, M., Yoshioka, K., Miyamoto, H. (1997). Imaging *Plasmodium falciparum* – infected ghost and parasite by atomic force microscopy. *J. Structural Biol.* 119, 92-98.
- Gould, S. A. C., Drake, B., Prater, C. B., Weisenhorn, A. L., Manne, S., Hansma, H. G., Hansma, P. K., Massie, J. Longmire, M., Elings, V., Northern, B. D., Mukerjee, B., Peterson, C. M., Stoeckenius, W., Albrecht, T. R., Quate, C. F. (1990). From atoms integrated circuit chips, blood cells, and bacteria with then atomic force microcope. *J. Vac. Sci. & Technol. A* 8, 369-373.
- Gunning, P. A., Kirby, A. R., Parker, M. L., Gunning, A. P., Morris V. J. (1996). Comparative imaging of Psefomonas putida bacterial biofilms by Scanning Electron Microscopy and both dc contact and ac non-contact Atomic Force Microscopy. *J. Appl. Bact.* 81, 276-282.
- Hans, W., Mou, J., Sheng, J., Yang, J., Shao, Z. (1995). Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry* 34, 8215-8229.
- Haydon, H. G., Henderson, E., Stanley, E. F. (1994). Localization of individual calcium channels at the release face of a presynaptic nerve terminal. *Meuron* 13, 1275-1280.
- Henderson, E. (1994). Imaging of living cells by atomic force microscopy. *Progr. Surface Sci.* 46, 39-60.
- Hertz, H. (1982). Uber die beruhrung fester elastisher Koper. *J. Reine Angew Math.* 92, 156-171.
- Hofmann, U. G., Rotsh, C., parak, W. J., Radmacher, M. (1997). Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *J. Structural Biol.* 119, 84-91.
- Holstein, T. W., Benoit, M., von Herder, G., Wanner, G., David, C. N., Gaub, H. E. (1994). Fibrous mini-collagens in hydra nematocysts. *Science* 265, 402-404..

- Jaschke, M., Butt, H. J., Wolff, E. K. (1994). Imaging flagella of Halobacteria by atomic force microscopy. *Analyst* 119, 1943-1946.
- Kasas, S., Fellay, B., Cargnello, R. (1994). Observation of the action of penicillin on *Bacillus subtilis* using atomic force microscopy-techniques for the preparation of bacteria. *Surface & Interface Anal.* 21, 400-401.
- Kasas, S., Ikai, A. (1996). A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophys. J.* 68, 1678-1680.
- Kinney, J. H., Balooch, M., Marshall Jr., G. W., Marshall, S. J. (1993). Atomic force microscope study of dimensional changes in dentine during drying. *Arch. Oral Biol.* 38, 1003-1007.
- Laney, D. E., Garcia, R. A., Parsons, S. M., Hansma, H. G. (1997). Changes in the elastic properties of cholinergic synaptic vesicles as measured by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 72, 806-813.
- Le Grimellac, C., Lesniewska, E., Cachia, C., Schreiber, J. P., de Fornel, F., Goudonnet, J. P. (1994). Imaging of the membrane surface of MDCK cells by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 67, 36-41.
- Linder, A., Colchero, J., Apell, H. J., Marti, O., Mlynek, J. (1992). Scanning force microscopy of diatom shells. *Ultramicroscopy* 42, 329-332.
- Manne, S., Zaremba, C. M., Giles, R., Huggins, L., Walters, D. A., Becker, A., Morse, D. E., Stucky, G. D., Didymus, J. M., Mann, S., Hansma, P. K. (1994). Atomic force microscopy of the nacreous layer in mollusk shells. *Proc. Royal Soc. London B* 256, 17-23.
- Marshall Jr., G. W., Balloch, M., Tench, R., Kinney, J. H., Marshall, S. J. (1993). Atomic force microscopy of acid effects on dentin. *Dent. Mater.* 9, 265-268.
- Marshall Jr., G. W., Balloch, M., Kinney, J. H., Marshall, S. J. (1995). Atomic force microscopy of conditioning agents on dentin. *J. Biomedical Materials Res.* 29, 1381-1387.
- Maurice, P., Forsythe, J., Hersman, L., Sposito, G. (1996). Application of atomic-force microscopy to studies of microbial interactions with hydrous Fe (III)-oxides. *Chemical Geology* 132, 33-43.
- McMaster, T. J., Miles, M. J., Walsby, A. E. (1996). Direct observation of protein secondary structure in gas vesicles by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 70, 2132-2436.

- Muller, D. J., Schabert, F. A., Buldt, G., Engel, A. (1995). Imaging purple membranes in aqueous solutions at subnanometer resolution by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 68, 1681-1686.
- Neagu, C., van der Werf, K. O., Putman, C. A. J., Kraan, Y. M., de Grooth, B. G., van Hulst, N. F., Greve, J. (1994). Analysis of immunolabeled cells by atomic force microscopy, optical microscopy, and flow cytometry. *J. Structural Biol.* 112, 32-40.
- Ohnesorge, F., Heckl, W. M., Harberle, W., Pum, D., Sara, M., Schindler, H., Schilcher, K., Kiener, A., Smith, D. P. E., Sleytr, U. B., Binnig, G. (1992). Scanning force microscopy studies of the S-layers from *Bacillus coagulans* E38-66, *Bacillus sphaericus* CCM2177 and of on antibody binding process. *Ultramicroscopy* 42, 2183-2194.
- Parpura, V., Haydon, P. G., Henderson, E. (1993). Three-dimensional imaging of living neurons and glial with the atomic force microscope. *J. Cell Sci.* 104, 427-432.
- Prater, C. B., Wisenhorn, A. L., Northern, B. D., Peterson, C. M., Gould, S. A. C., Hansma, P. K. (1990). Imaging molecules and cells with the atomic force microscopy. Proc. XIIth International Congress for Electron Microscopy, San Francisco, USA, San Francisco Press, Inc., pp 254-255.
- Putman, C. A. J., van der Werf, K. O., de Grooth, B. G., van Hulst, N. F., Segerink, F. B., Greve, J. (1992). Atomic force microscope with integrated optical microscope for biological applications. *Rev. Sci. Instrum.* 63, 1914-1917.
- Putman, C. A. J., de Grooth, B. G., Hansma, P. K., van Hulst, N. F. (1993). Immunogold labels: cells surface markers in atomic force microscope. *Ultramicroscopy* 48, 177-182.
- Rowley, J. R., Flynn, J. J., Takahashi, M. (1995). Atomic force microscopic information on pollen exine substructure. *Nuphar. Bot. Acta* 108, 300-3008.
- Schabert, F. A., Helfti, A., Goldie, K., Stemmer, A., Engel, A., Meyer, E., Overney, R., Guntherdott, H., J. (1992). Ambient pressure scanning probe microscopy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59, 135-143.
- Sollbohrer, O., May, K. P., Anders, M. (1995). Force microscopical investigation of human teeth in liquids. *Thin Solid Films* 264, 176-183.
- Southam, F., Firtel, M., Blackford, B. L., Jericho, M. H., Xu, W., Mulhern, P. J., Beveridge, T. J. (1993). Transmission electron microscopy, scanning tunneling microscopy, and atomic force microscopy of the cell-envelope layers of the archaeobacterium *Methanospirillum hungateis* GP1. *J. Bacteriol.* 175, 1946-1955.



- Steele, A., Goddard, D. T., Beech, I. B. (1994). An atomic force microscopy study of the biodeterioration of stainless steel in the presence of bacterial biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 34, 34-46.
- Surman, S. B., Walker, J. T., Goddard, D. T., Morton, L. H. G., Keevil, C. W., Weaver, W., Skinner, A., Hanson, K., Caldwell, D., Kurtz, J. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J. Microbiol. Methods* 25, 57-70.
- Tao, N. J., Lindsay, S. M., Lees, S. (1992). Measuring the microelastic properties of biological material. *Biophys. J.* 63, 1165-1169.
- Ticombe, L. A., Huson, M. G., Turner, P. S. (1997). Imaging the internal cellular structure of Merino wool fibres using atomic force microscopy. *Micron* 28, 69-71.
- Ushiki, T., Hitomi, J., Ogura, S., Umemoto, T., Shigeno, M. (1996). Atomic force microscopy in histology and cytology. *Arch. Histol. Cytol.* 59, 421-431.
- Vinckier, A., Heyvaert, I., D'Hoore, A., van Haesendonck, C., Engelborghs, Y., Hellemans, L. (1995). Immobilising and imaging microtubules by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 57, 337-343.
- Van der Wel, H. H., Putman, C. A. J., van Noort, S. J. T., de Grooth, B. G., Emons, A. M. C. (1996). Atomic force microscopy of pollen grains, cellulose microfibrils, and protoplasts. *Protoplasma* 194, 29-39.
- Yamashina, S., Shigeno, M. (1995). Application of atomic force microscopy to ultrastructural and histochemical studies of fixed and embedded cells. *J. Electron Microscopy* 44, 462-466, 1995.
- Zachee, P., Boogaerts, M., Hellemans, L.; Snauwaert, J. (1992). Adverse role of the spleen in hereditary spherocytosis: evidence by the use of the atomic force microscope. *Brit. J. Haematology* 80, 264-265.
- Zachee, P., Boogaerts, M., Snauwaert, J., Hellemans, L. (1994). Imaging uremic red blood cells with the atomic force microscope. *Amer. J. Nephrology* 14, 197-200.
- Zachee, P., Snauwaert, J., Vandenberghe, P., Hellemans, L., Boogaerts, M. *Brit. J. Haematology* 95, 472-481.
- Zhang, P. C., Bai, C., Huang, Y. M., Zhao, H., Fang, Y., Wang, N. X., Li, Q. (1995). Atomic force microscopy study of fine structures of the entire surface of red blood cells. *Scanning Microscopy* 9, 981-988.
- Zhang, P. C., Bai, C., Cheng, Y., Fang, Y., Liming, F., Pan, H. (1996). Direct observation of uncoated spectrin with the atomic force microscope. *Science in China Ser. B* 39, 378-385.



---

---

# ESTUDO TOPOGRÁFICO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* POR AFM

---

---

## 9.1 INTRODUÇÃO

### 9.1.1 CÉLULAS PROCARIÓTICAS E EUCARIÓTICAS

Todos as células vivas podem ser classificadas como procarióticas, da palavra grega *pro* (antes) e *karyon* (núcleo), ou eucarióticas, de eu (verdadeiro) e *karyon* (núcleo). As células procarióticas não possuem núcleo e outras estruturas contidas em membrana, ao passo que as eucarióticas possuem tais estruturas. Todos os grandes organismos procariontes são unicelulares, como exemplificado pelas bactérias. Os seres eucariontes incluem todos os vegetais, animais, fungos e protistas (organismos como a *Amoeba*, o *Paramecium* e o parasita da malária). Tanto as células procaróticas quanto eucarióticas possuem membranas que definem as fronteiras da célula viva, e ambas contêm informações genéticas armazenadas no DNA. Entretanto, as procarióticas se diferenciam por não possuírem núcleo definido e organelas envolvidas por membrana (exceto alguns corpos simples cobertos por membrana em certos tipos de procariontes) (Black, 2002).

### 9.1.2 BACTÉRIAS

Os seres procariontes podem ser classificados em dois grandes grupos (ou domínios): *Archaea* (arqueobactérias) e *Bacteria* (eubactéria). Todos os membros dos grupos *Archaea* e *Bacteria* são tradicionalmente denominados bactérias. As diferenças são mais moleculares do que estruturais. A maioria das bactérias deste planeta pertence ao domínio *Bacteria* (Borzani et al., 2001).

Os procariontes estão entre os menores organismos. A maioria mede entre 0,2 e 5,0 micrometros. As bactérias geralmente apresentam as seguintes formas: esféricas (coco),

em bastão (bacilo), ondulados (espirilos), em forma de vírgula (vibriões) e de espiral (espiroquetas) (Fig.9.1). Algumas bactérias, chamadas cocobacilos, são pequenos bastonetes com tamanho intermediário entre cocos e os bacilos. Outras bactérias não se encaixam em nenhuma destas categorias, mas possuem um formato fino, comprido ou lobado e irregular. Também já foram observadas bactérias quadradas (Purges et al., 2002).

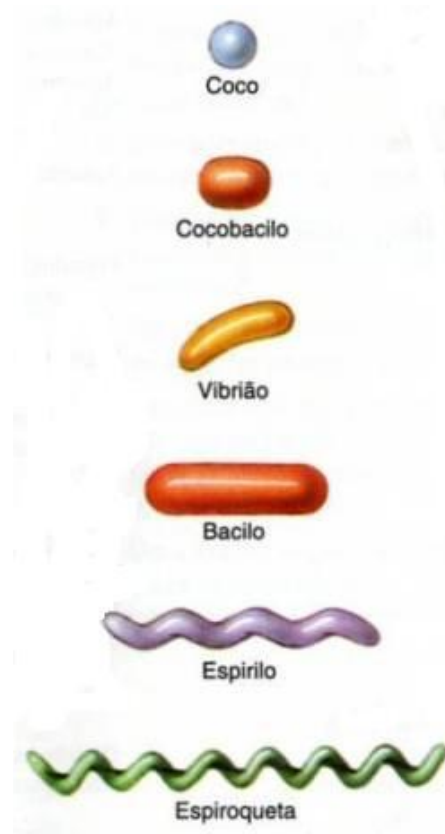


Figura 9.1. Algumas formas típicas de bactérias.

Além de serem encontradas em suas formas características, muitas bactérias formam grupos ou arranjos de células. Tais grupos se formam quando as células se dividem sem separar. Nos cocos, estes arranjos incluem grupamentos como pares (indicado pelo prefixo *diplo*), quatro células dispostas em um cubo (*tétrade*), oito células dispostas em cubo (*sarcina*), grupos em forma de cacho de uva (*estafilo*) e em cadeias longas (*estrepto*) (Fig.9.2). Os bacilos produzem células conectas pelas extremidades (como trens), ou lado a lado; enquanto que as baterias espirais geralmente não são agrupadas (Blach, 2002).

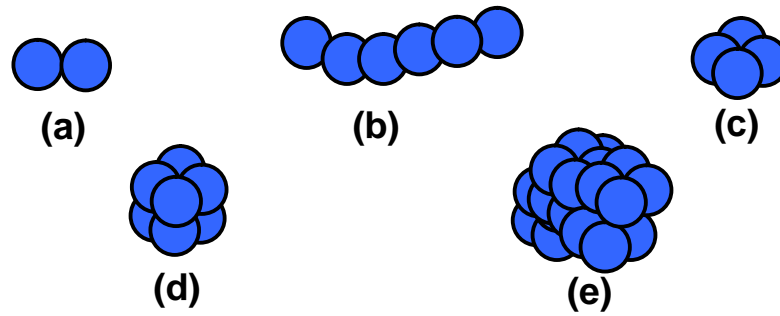


Figura 9.2. Arranjos mais comuns das bactérias: diplococo (a), estreptococos (b), téttrade (c), sarcinas (d) e estafilococos (e).

Estruturalmente, as células bacterianas consistem de uma membrana celular, geralmente envolta pela parede celular e às vezes por uma camada exterior adicional; de citoplasma interno com ribossomos, região nuclear e alguns casos grânulos e/ou visículas; e uma variedade de estruturas externas, tais como cápsulas, flagelos e pêlos (Fig.9.3).

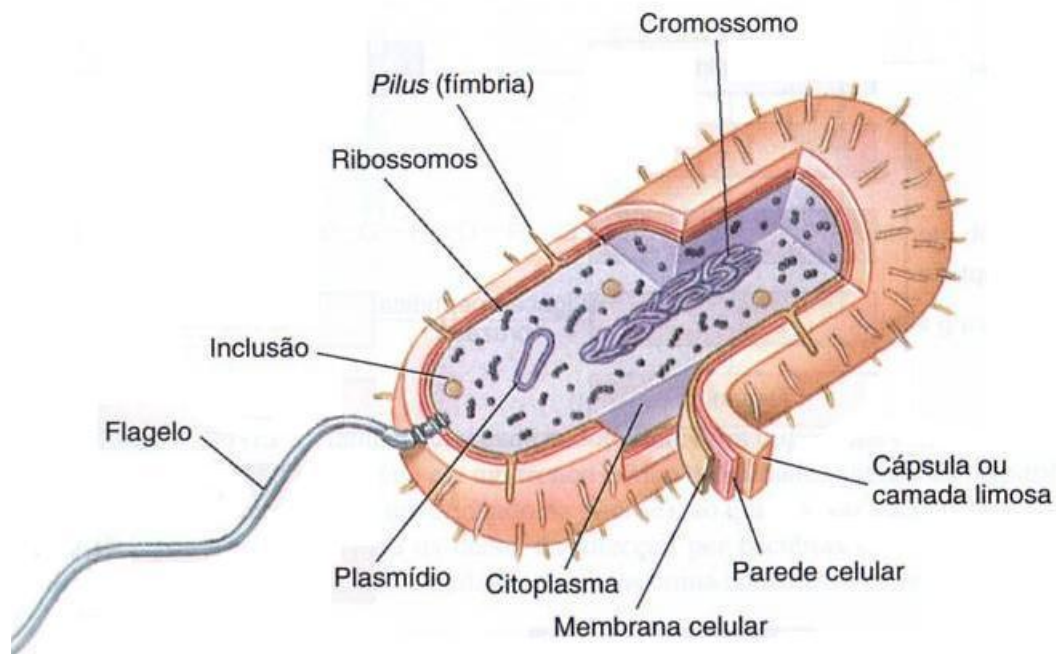


Figura. 9.3. Estrutura típica de uma célula bacteriana.

A parede celular é uma estrutura presente na maioria das bactérias conhecidas, exceto em micoplasmas e algumas *Archaea*, que não a possuem. Corresponde a uma das estruturas mais importantes nas células bacterianas, estando localizada na porção mais externa, acima da membrana citoplasmática. É composta principalmente pelo polímero peptidoglicano. A dureza da parede celular é responsável por manter a forma do microrganismo. Como o ambiente intracelular é bastante concentrado em relação ao meio

externo, a parede atua como uma barreira física rígida mantendo a forma celular e impedindo o rompimento da célula em decorrência do turgor. Além disso, a parede celular atua como uma barreira de proteção contra determinados agentes físicos e químicos externos, tais como o choque osmótico. A parede pode ainda desempenhar importante papel em microrganismos patogênicos, em decorrência da presença de componentes que favorecem sua patogenicidade, tais como antígenos ou moléculas envolvidas no reconhecimento celular (Blach, 2002; Purges et al., 2002).

Christian Gram desenvolveu em 1884 um método de coloração de bactérias que permitia sua separação em dois grupos distintos, as Gram-positivas (coloração roxa) e as Gram-negativas (coloração vermelha). Este método continua sendo um dos mais úteis para classificar bactérias. Neste método, as bactérias são submetidas primeiramente à ação de um corante violeta, seguido de fixação com iodo e depois um agente de descoloração, como o metanol. Logo em seguida, são novamente coradas com safranina. As bactérias Gram-positivas fixam o primeiro corante, devido à maior espessura da parede celular, e ficam coradas de azul ou violeta; enquanto que as bactérias Gram-negativas, após a descoloração pelo metanol, são coradas pela safranina e ficam vermelhas. As bactérias que retêm a coloração violeta são designadas por Gram-positivas. As bactérias que perdem a coloração violeta depois de descoloradas e que adquirem um corante de contraste (ficando com um tom cor-de-rosa) são Gram-negativas. A partir do advento da microscopia eletrônica e do aperfeiçoamento das técnicas de análise bioquímica dos diferentes componentes celulares, verificou-se que esta diferença era devido às diferenças de estrutura e composição das paredes celulares (Borzani et al., 2001; Black, 2002).

As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa (de 20 a 80 nm), de aspecto homogêneo e superfície lisa, composta de peptidoglicano (formando até 20 camadas) e ácido teicóico. Cerca de 90% da parede celular é composta pelo peptidoglicano (Fig.9.4). O restante da parede é composto essencialmente por ácido teicóico. Já as células Gram-negativas exibem uma parede mais delgada (de 9 a 20 nm) de aspecto bastante complexo e superfície mais rugosa, composta de peptidoglicano (uma ou duas camadas), separada pelo espaço periplasmático (espaço entre a membrana celular e a parede celular) e envolta por uma membrana externa composta de lipopolissacarídeo, ou endotoxina (Fig.9.5). Apenas 10% da parede corresponde ao peptidoglicano (Purges et al., 2002).

A membrana celular ou plasmática é uma membrana viva que estabelece a fronteira entre a célula e o meio. Possui uma estrutura em mosaico fluido com fosfolipídios formando uma dupla camada e proteínas espalhadas em forma de mosaico. A principal função

da membrana celular é regular o movimento de materiais para dentro e para fora da célula. As membranas das células bacterianas também exercem funções geralmente realizadas por organelas de células eucarióticas.

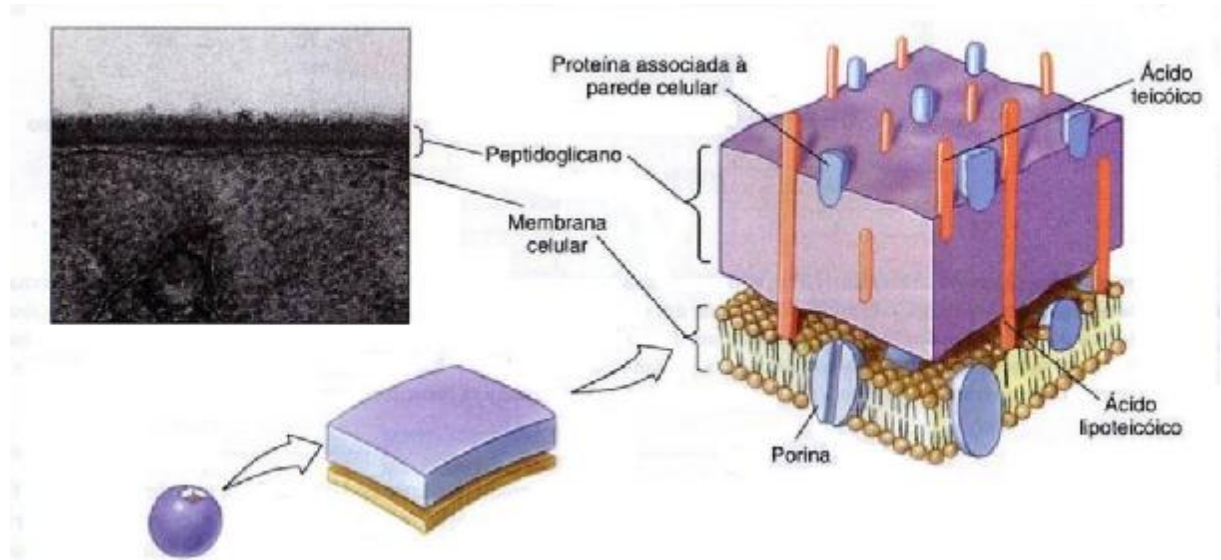


Figura 9.4. Parede celular de uma bactéria Gram-positiva.

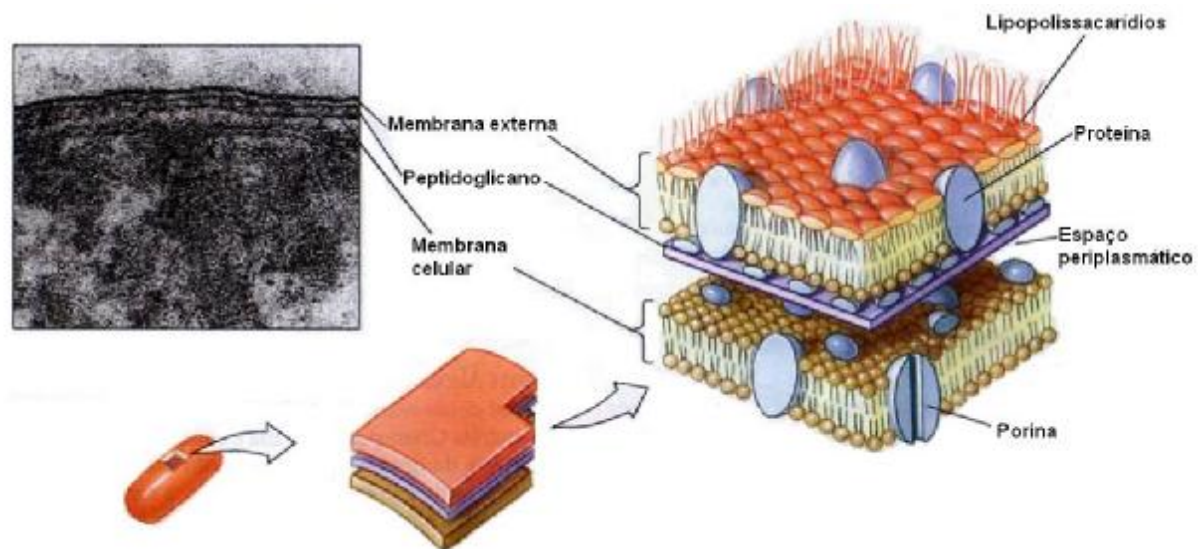


Figura 9.5. Parede celular de uma bactéria Gram-negativa.

São exemplos de bactérias Gram-positivas várias espécies de: estreptococos, estafilococos, enterococos. São exemplos de bactérias Gram-negativas: vibrão colérico, colibacilo, salmonelas (Purges et al., 2002; Borzani et al., 2001).

### 9.1.3 ENTEROCOCOS

Os Enterococos (gênero *Enterococcus*) são cocos, antes classificados como estreptococos do Grupo D, que ocorrem como cocos individuais, aos pares e em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, que podem crescer em condições extremas e numa grande variedade de meios, incluindo solo, alimentos, água e em muitos animais. O seu principal habitat natural parece ser o tubo digestivo dos animais, incluindo o do homem, onde representam uma porção significativa da flora normal. Podem também estar presente, em menor número, nas secreções orofaríngeas e vaginais. Por viver mais tempo na água do mar do que os coliformes, o enterococos é considerado pela Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos como um indicador mais adequado de doenças transmitidas pelo contato com a água ([www.portalambiental.com.br](http://www.portalambiental.com.br); Black, 2002).

As infecções por enterococos ocorrem em doentes internados, frequentemente após cirurgia ou instrumentação (por exemplo, algaliação). Os enterococos podem causar superinfecções em doentes internados, sob terapêutica antibiótica. A superinfecção pode ocorrer quando os antibióticos alteram o equilíbrio bacteriano no organismo, permitindo o crescimento dos agentes oportunistas, como o enterococos. A superinfecção pode ser muito difícil de tratar, porque é necessário optar por antibióticos eficazes contra todos os agentes que podem causá-la. As infecções por enterococos incluem: infecções urinárias; infecções de queimaduras e feridas cirúrgicas, bacteremia, endocardite, infecções intra-abdominais e pélvicas (estas infecções são habitualmente mistas, causadas por enterococos e outros agentes patogênicos), infecções de feridas e dos tecidos moles, sépsis neonatal e Meningite (raro) ([www.portalambiental.com.br](http://www.portalambiental.com.br), Black, 2002).

Da grande quantidade de espécies do gênero *Enterococcus* descritas até agora, o *Enterococcus faecalis* é a mais frequentemente encontrada em casos clínicos humanos. Inúmeras infecções causadas por *E. faecalis* têm-se demonstrado resistentes ao tratamento com as terapias antibióticas correntes, em parte devido a sua resistência intrínseca a antibióticos e sua capacidade de formação de biofilmes (O'Toole et al., 2000). Em estudos clínicos, biofilmes de *E. faecalis* têm sido implicados como agentes etiológicos de infecções crônicas. Biofilmes de *E. faecalis* foram observados sobre cateteres uretais e válvulas cardíacas (Carniol e Gilmore, 2004; Mohamed et al, 2004).



#### 9.1.4 BIOFILMES

Procariontes crescendo como células individuais de maneira planctônica (livres, em suspensão) raramente são encontrados na natureza. Sabe-se atualmente que, quando em seu habitat natural, as bactérias são encontradas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme, isto é, um ecossistema estruturado altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada (Donlan e Costerton, 2002).

Os biofilmes (Fig. 9.6), complexos ecossistemas microbianos, podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. Desta maneira, muitos autores definem biofilmes como associações de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies bióticas ou abióticas. Geralmente, a dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. Inicialmente temos os organismos denominados colonizadores primários, que se aderem a uma superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos. As células aderidas passam a se desenvolver, originando microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS), que passam a atuar como substratos para a aderência de microrganismos denominados colonizadores secundários. Estes colonizadores secundários podem se aderir diretamente aos primários, ou promoverem a formação de coagregados com outros microrganismos e então se aderirem aos primários. Assim, o biofilme corresponde a uma "entidade" dinâmica, pois, de acordo com os microrganismos que o compõem, teremos estruturas físicas, químicas e biológicas distintas. Estas alterações fazem com que cada biofilme seja único, de acordo com os microrganismos presentes. Neste sentido, ao longo do tempo a composição microbiana dos biofilmes geralmente sofre alterações significativas (Beveridge e Grahan, 1991).

Diversos estudos têm sido feitos sobre o processo de formação de biofilmes de uma única espécie. Este processo, em geral, pode ser subdividido nas seguintes etapas: a) Aderência inicial à superfície, b) Formação das microcolônias, c) Maturação das microcolônias em um biofilme contendo a matriz de EPS, d) Crescimento do biofilme (Fig.9.6).

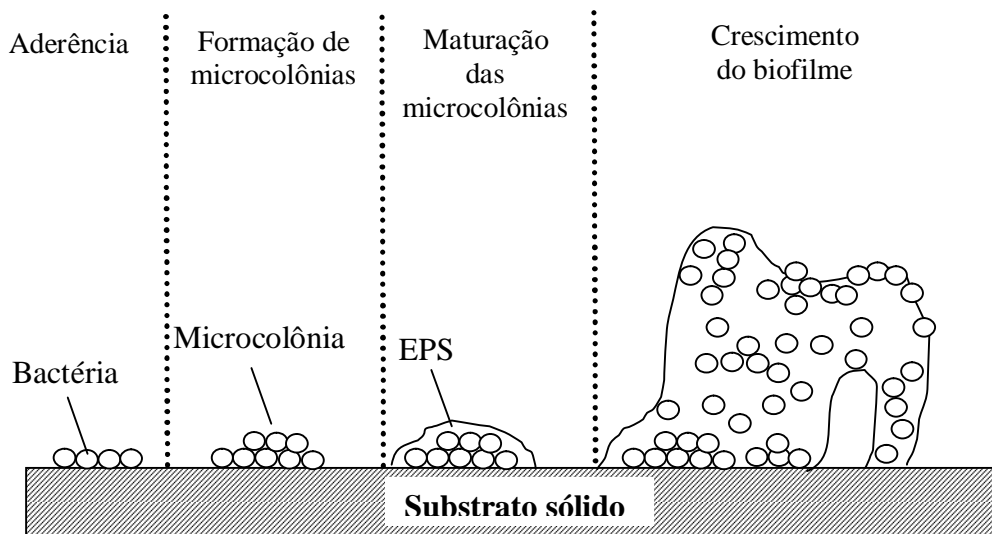


Figura 9.6. Esquema de formação de um biofilme sobre um substrato sólido.

A formação de microcolônias está normalmente relacionada à produção de EPS. A maior parte dos biofilmes exibe uma certa heterogeneidade, existindo conjuntos de agregados celulares distribuídos ao longo da matriz exopolissacarídica, que exibem densidades variáveis, originando aberturas e canais por onde a água pode trafegar. Os espaços intersticiais (canais) também são componentes importantes do biofilme, pois permitem a circulação de nutrientes e a troca de metabólicos (Dufrêne, 2004).

Os microrganismos do biofilme são difíceis de erradicar com antibióticos e levam à infecção crônica. Métodos preventivos e terapêuticos devem ser desenvolvidos, para monitorar os biofilmes relacionados às infecções (Gilbert et al., 1997).

### 9.1.5 CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES

A caracterização de biofilmes, entre 1978 e 1990, foi baseada em técnicas de observações diretas, como as de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, estas técnicas apresentam algumas dificuldades. Na primeira, ocorrem problemas de perda de foco devido às diferenças topográficas na superfície do biofilme; e na segunda, a necessidade da desidratação de uma matriz altamente hidratada, o biofilme, necessária a realização da técnica. É uma técnica destrutiva. A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), inventada em 1950, produz cortes óticos de estruturas complexas de modo que os efeitos da perda de foco quase não ocorrem. Esta técnica não necessita de uma preparação de amostras complexa, tal que organismos vivos podem ser observados se fluorescência for



utilizada para visualizar células. O primeiro estudo de biofilmes vivos realizados por MCVL produziu uma série de revelações que formam à base dos conceitos atuais de biofilmes (Donlan e Costerton, 2002). Parsek e Fuqua (2003) salientaram a importância de observações microscópicas no campo da microbiologia de biofilmes.

Kristich et al. (2004) analisaram por microscopia eletrônica de varredura o biofilme desenvolvido por um *E. faecalis* esp-negativo, descrevendo suas características em 4, 8 e 24 horas. Os resultados mostraram que o processo de formação de um biofilme de *E. faecalis*, nas condições realizadas, seguiu os seguintes estágios: adesão inicial de células individuais (2,4 horas); formação de microcolônias (2,8 horas); e desenvolvimento de um biofilme maduro com arquitetura complexa contendo espaços vazios correspondendo presumivelmente a canais de água (20 horas).

Atualmente, a microscopia de força atômica (AFM) tem sido usada por diversos pesquisadores para visualizar a arquitetura de células bacterianas (Morris et al, 1999). Imagens de AFM são geradas pela interação de uma ponta fina (sonda) com a superfície da amostra, revelando informações morfológicas e físicas de uma forma não destrutiva (Bustamante e Keller, 1995; Hansma e Pietrasanta, 1998; Dufrêne, 2002). Duas principais técnicas de AFM são utilizadas para a formação de imagens de uma superfície bacteriana: modos de contato e intermitente. O modo de contato mede a topografia pelo deslizamento da sonda através da superfície da amostra. O modo intermitente mede a topografia pelo deslizamento de uma sonda presa em uma haste oscilante. Este é o modo mais usado para o estudo de superfícies biológicas, pois elimina as forças de contato, que pode danificar amostras macias (Binnig et al., 1986; Jena e Horber, 2002). O uso do AFM para o estudo da formação de biofilmes é novo (Ahimou et al., 2002). Tem-se demonstrado uma poderosa ferramenta para caracterizar quantitativa e qualitativamente diversos aspectos das interações do biofiles/substrato (Beveridge and Grahan, 1991; Beech et al., 2002; Dufrêne, 2004).

Razatos et al. (1998) mostraram que medidas de força de adesão por AFM na superfície de células de *E. coli* são afetadas pelas dimensões das moléculas de lipídeos e polissacarídeos sobre a superfície da célula. Medidas de rugosidade para descrever a superfície de biofilmes têm sido relatadas na literatura (Gibbs and Bishop, 1995; Murga et al., 1995; Bishop et al., 1997). Auerbach et al. (2000) estudaram, por AFM, a morfologia e as propriedades da superfície de biofilms de *Pseudomonas putida*, determinando a rugosidade e as forças de adesão nas camadas de células de biofilmes frescos e dissecados. Camesano e Abu-Lail (2002) analisaram a heterogeneidade de macromoléculas da superfície bacteriana de *Pseudomonas putida* KT2442 via espectroscopia de força molecular, usando AFM. Junior e

Teschke (2005) monitoraram a dinâmica da ação do políptídeo antimicrobiano PGLa sobre *Escherichia coli* através de medidas de rugosidade, curvas de força e imagens de AFM.

Para fazer imagens de AFM em biofilmes, métodos variados têm sido usados para preparar células, incluindo aprisionamento de células vivas em filtros, captura do crescimento de células em ágar ou permitir que células colonizem uma superfície como cobre ou mica (Casemano et al., 2000). A diferença entre bactérias fixadas em uma lamínula e depositadas sobre um filtro é que os exopolissacarídeos celulares (EPS) não estão aderidos à lamínula na reação de fixação, mas o EPS é frequentemente visível com as bactérias sobre o filtro. A deposição de bactérias sobre filtros é o método mais viável para o estudo de EPS celular, contanto que a sonda não seja contaminada pelo EPS (Camesano et al., 2002).

### 9.1.6 OBJETIVOS

Neste capítulo, foi investigada por microscopia de força atômica, a alteração topográfica nas superfícies de biofilmes de *Enterococcus faecalis* após 24, 36, 72, 192, 360 horas de crescimento. Imagens de altura, gráficos de seção e análise de rugosidade foram realizadas sobre biofilmes crescidos sobre membranas esterilizadas de nitrocelulose, buscando parâmetros topográficos qualitativos e quantitativos que caracterizem as diferentes etapas de desenvolvimento do biofilme estudado.

## 9.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 9.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 / Culti-loops-OXOID) foram inoculadas em um meio de cultura complexo formado pela infusão de cérebro e coração (ICC) estocada a 2-8°C e incubada a 37°C. Os biofilmes foram gerados em membrana estéril de nitrocelulose (MN) com porosidade média de 0,22 µm (Millipore) (Fig. 9.7). O inóculo foi preparado em meio líquido conforme descrição a seguir. Um volume de 50 µl de caldo de ICC fresco com bactérias na turbidimetria de 6 MacFarland foi inoculado sobre amostras de membranas de nitrocelulose colocadas sobre um meio sólido de aga e ICC. As amostras foram incubadas aerobicamente durante 24 horas (Abdullah et al., 2005). Para o estudo topográfico da idade dos biofilmes de 24, 36, 72, 192, 360 horas, as amostras de membrana inoculadas

(MNI) foram colocadas em meio sólido de aga e ICC e incubadas aerobicamente até o momento das análises de microscopia de força atômica (AFM), conforme os períodos estabelecidos para este estudo.



Figura 9.7. Membrana de nitrocelulose.

### 9.2.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

Para a realização das medidas de microscopia de força atômica da superfície da membrana de nitrocelulose em diferentes condições experimentais, amostras de MN, MN em meio sólido de aga e ICC (MN-ICC) e MN inoculadas em meio sólido de aga e ICC por 24, 36, 72, 192 e 360 horas (M24, M36, M72, M192 e M360 respectivamente) foram retiradas do meio, secas em ar durante 5 min, cortadas com bisturi e colocadas sobre discos metálicos (porta amostras do AFM) cobertos com fita adesiva dupla face. A superfície das amostras sofreram uma varredura em ar com um Nanoscope IIIa Multimode AFM (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, U.S.A.) no modo intermitente com uma taxa de varredura de 0,400 Hz e frequência de ressonância variando entre 200 e 380 kHz. Foram utilizadas hastes de constante elástica média igual a 40 N/m, com sondas de cristal de silício de raio médio de 15 nm (Digital Instruments). Foram realizadas varreduras de 30 x 30, 15 x 15, 10 x 10 e 5 x 5  $\mu\text{m}$ . Os controles de varredura foram apropriadamente ajustados (força de contato adequada e elevados ganhos) para evitar artefatos provocados pela sonda durante a varredura. Para as visualizações em duas e três dimensões dos dados de altura (imagem), foi utilizado o software Nanoscope versão 5.12 r3 da Digital Instruments. A representação esquemática da medição realizada por AFM é mostrada na Figura 9.8.

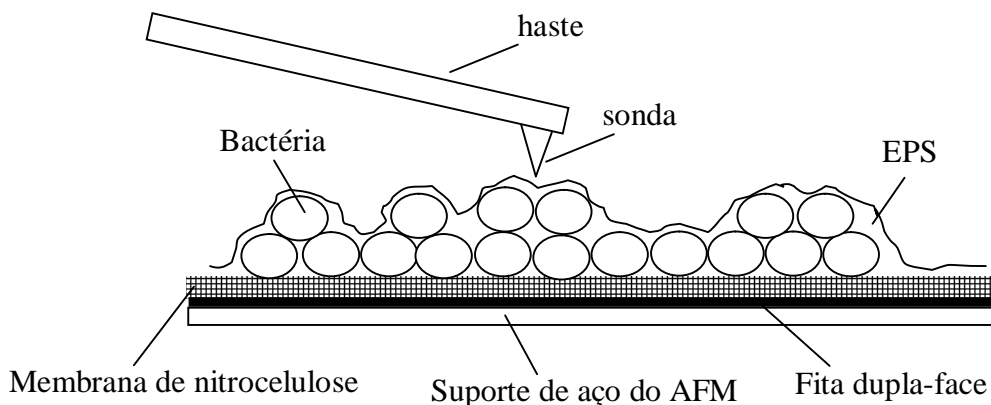


Figura 9.8. Esquema de medição da superfície da membrana de nitrocelulose por AFM. Os elementos não estão em escala.

### 9.2.3 GRÁFICO DE SEÇÃO

Foi utilizado o software Nanoscope para construir gráficos de seção das imagens de altura bidimensionais, nas varreduras de  $30 \times 30 \mu\text{m}$  e  $5 \times 5 \mu\text{m}$ . No gráfico de seção, um “corte” por meio de uma linha reta pode ser realizado sobre qualquer parte da imagem e o perfil de altura ao longo deste “corte” pode ser visualizado (Digital Instruments, 2001). O limite de altura da imagem foi ajustado para  $1500 \text{ nm}$  e as seções foram feitas na região central da imagem, paralelo ao eixo horizontal (eixo x).

### 9.2.4 REALCE DE CONTORNOS

Foi utilizado o software Nanoscope, para acentuar os contornos ou bordas entre áreas diferentes de imagens com varredura de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ . Este procedimento é eficaz para a detecção de estruturas na superfície analisada. A rotina para realce de contornos detecta os contornos em imagens por meio da aplicação de um filtro Sobel em células de  $3 \times 3$  pixels. Este é um tipo especial de filtro “passa altas” (filtros que eliminam as feições de baixa frequência, deixando apenas as de alta frequência, expressas por bordas ou limites entre áreas de diferentes valores de cor).

### 9.2.5 ANÁLISE DE RUGOSIDADE

Foi utilizado o software Nanoscope para calcular a rugosidade da superfície para as imagens de altura na varredura de 30 x 30 µm. As imagens foram suavizadas por meio do software para a análise. Trinta regiões por amostra foram aleatoriamente escolhidas para a determinação do valor médio da rugosidade média ( $R_a$ ).  $R_a$  é a média aritmética dos valores de altura ( $Z$ ), em relação ao plano central de referência, em uma dada região, conforme a seguinte relação (Digital Instruments, 2001; Sayles, 1992):

$$R_a = \frac{\sum_{i=1}^N |z_i - z_{ref}|}{N},$$

onde  $Z_{ref}$  é o valor  $Z$  do plano de referência,  $Z_i$  é o valor pontual de  $Z$  e  $N$  é o número de pontos dentro de uma dada área.

### 9.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das medidas de rugosidade foi baseada em estatística descritiva (tendência central e dispersão), teste de Shapiro-Wilk (para determinar se uma amostra aleatória segue ou não uma distribuição normal) e teste de hipótese (para verificar a existência ou não de diferenças significativas entre grupos amostrais) (Lindman, 1974; Lehman, 1975; Mendenhall, 1990). O nível de significância usado foi de 5%. Todo o tratamento estatístico foi realizado usando os softwares Excel 2002 e Origin 7.0.

## 9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.3.1 IMAGENS DE AFM E GRÁFICOS DE SEÇÃO

Nas Figuras 9.9a e 9.9b são apresentadas imagens de AFM feitas sobre a superfície da MN, em duas diferentes resoluções, mostrando sua topografia rugosa formada por projeções semelhantes a pólipos de material polímero. O gráfico de seção (Fig. 9.9c) evidencia a estrutura porosa da membrana.

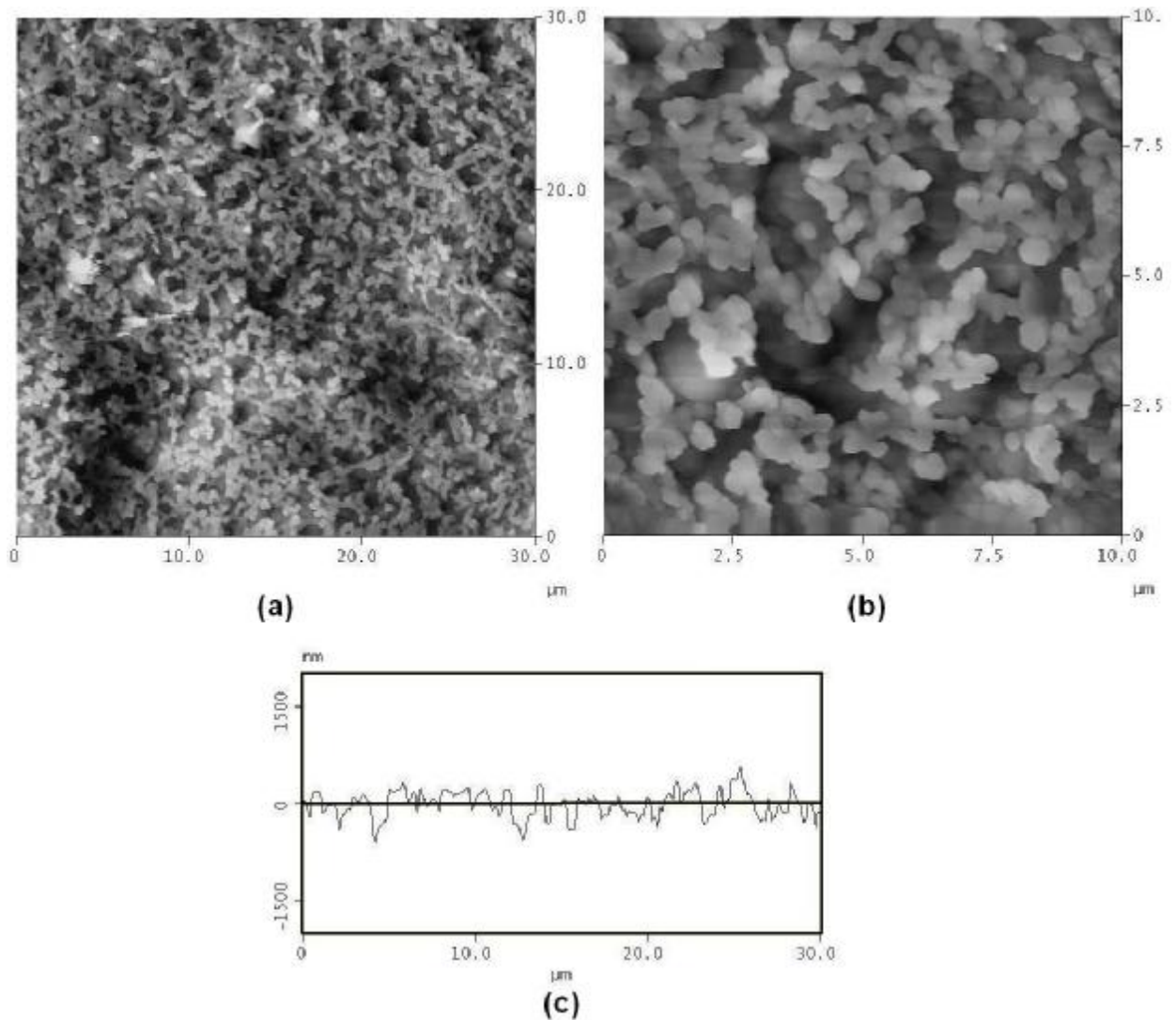


Figura 9.9. Imagens de AFM sobre amostras de MN com varreduras de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). O gráfico de seção (c) mostra um corte transversal de 30 μm da membrana. Escala de altura: 1408 nm (a), 1324 nm (b) e 1500 nm (c).

A solução utilizada como meio de cultura (ICC) pode ser observada sobre a superfície da MN-ICC nas Figuras 9.10a e 9.10b na forma de estruturas globulares com diâmetro médio de 500 nm (setas na Fig. 9.10b), aderidas sobre a MN. O gráfico de seção na Figura 9.10c mostra a alteração transversal sofrida pela membrana, devido à presença da ICC. Estas alterações podem ser vistas como um aumento da altura dos picos no corte transversal. O ICC formou uma rede complexa e organizada pela estrutura de poros da membrana, responsáveis pela difusão da solução nutritiva para as regiões superficiais.



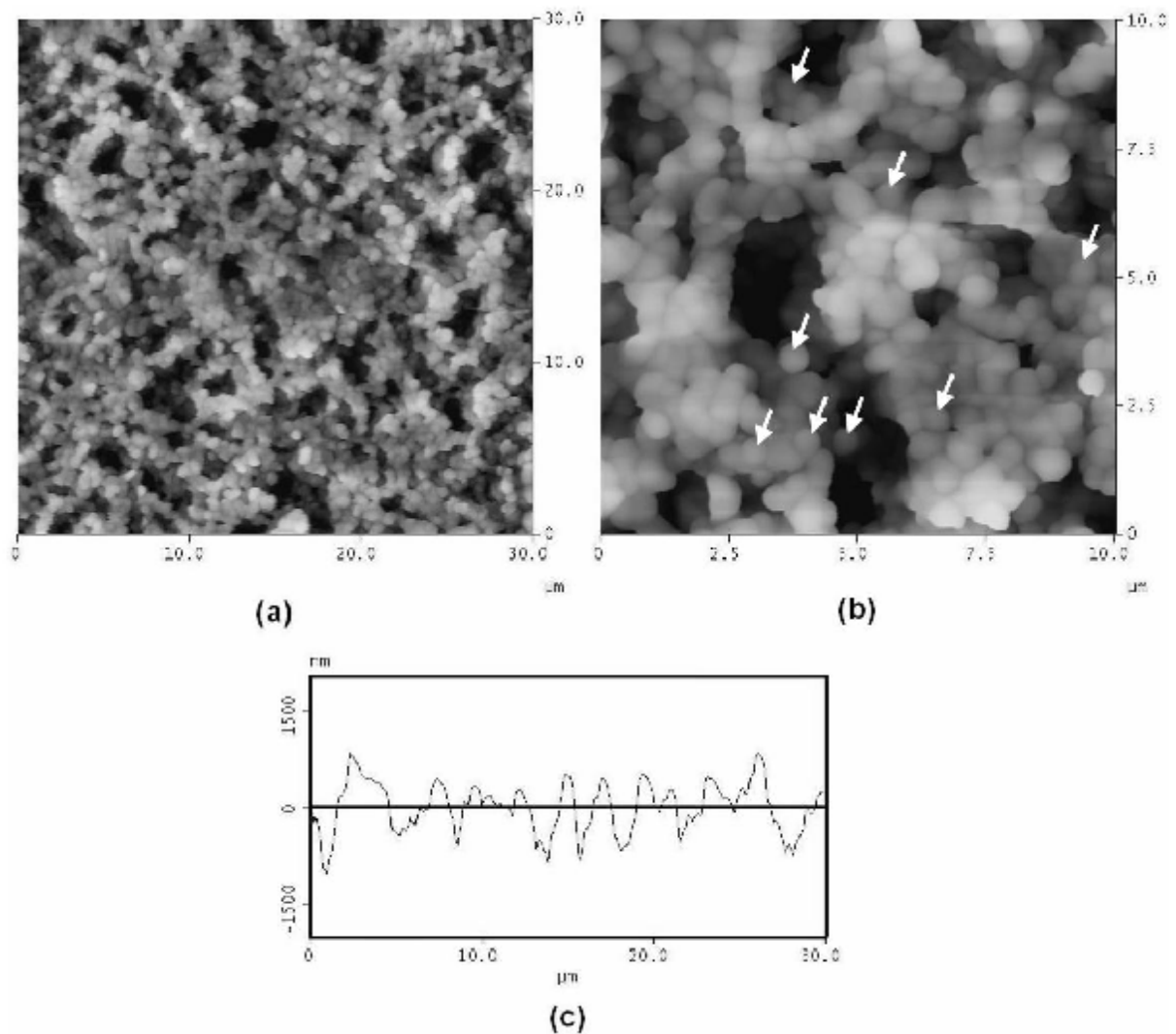


Figura 9.10. Imagens de AFM sobre amostras de MN-ICC com varreduras de 30 x 30  $\mu\text{m}$  (a) e 10 x 10  $\mu\text{m}$  (b). As setas em (b) indicam algumas estruturas globulares oriundas do meio de cultura. No gráfico de seção (c) pode ser observada a alteração na topografia da membrana devido à presença da ICC. Escala de altura: 1687 nm (a), 1457 nm (b) e 1500 nm.

Após 24 horas de crescimento bacteriano (M24), inúmeras células de *Enterococcus faecalis* cobriram a superfície da membrana inoculada (Fig. 9.11a). Observaram-se células bacterianas esferoidais (indicadas por asteriscos na Fig. 9.11b) em vários estágios de crescimento e a presença de alguns septos transversais (setas, na Fig. 9.11b), característicos da divisão celular. O aspecto homogêneo e liso da parede bacteriana (característico do peptidoglicano de bactérias Gram-positivas), a clara distinção dos contornos celulares e dos septos transversais foi um indicativo da reduzida quantidade de substâncias extracelulares (EPS) sobre a superfície, representando possivelmente, a fase de adesão na formação do biofilme. Foi evidente a redução dos picos no corte transversal (Fig. 9.11c)



quando comparada com a MN-ICC, provocada pela presença de células. Entretanto, a irregularidade da superfície ainda é fortemente determinada pela porosidade da MN-ICC.

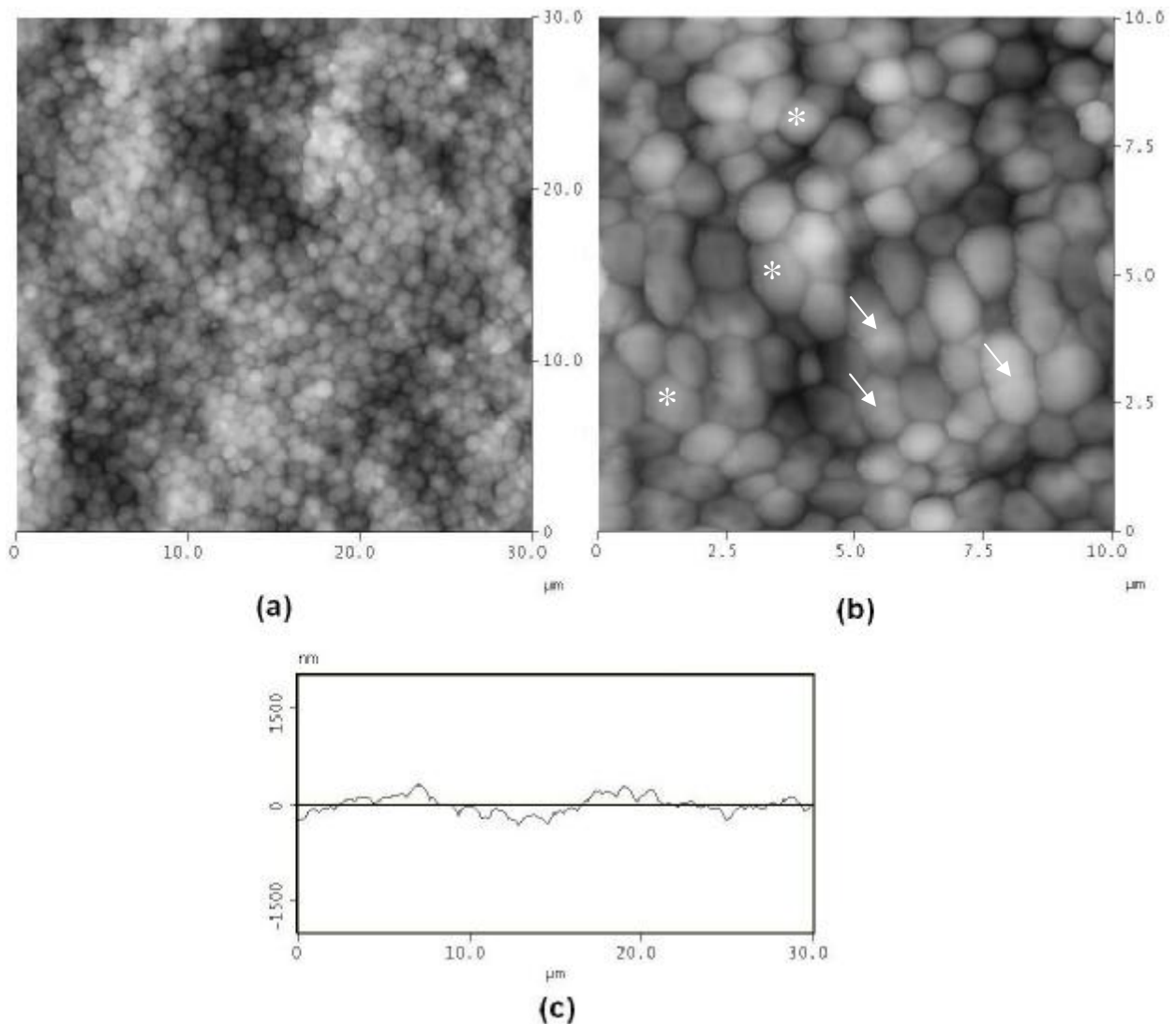


Figura 9.11. Imagens de AFM sobre amostras de M24, com varreduras de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). Os asteriscos em (b) indicam algumas células bacterianas enquanto que as setas, septos transversais. No gráfico de seção (c) pode ser observada a alteração na topografia da membrana devido à presença de células bacterianas. Escala de altura: 837,7 nm (a), 510,9 nm (b) e 1500 nm (c).

Após 36 horas de crescimento (M36), as imagens de AFM da membrana inoculada (Figs. 9.12a e 9.12b) foram parcial e uniformemente obscurecidas pela presença de EPS, consolidando a formação do biofilme. Foram observadas depressões associadas à presença de microcolônias. A redução da rugosidade da superfície (quando comparado com 24 horas de crescimento), como mostrado no gráfico de seção (Fig. 9.12c), é o indicativo de um biofilme jovem e de uma influência reduzida da porosidade na irregularidade da

superfície do biofilme. Provavelmente esta fase corresponde a de maturação das microcolônias, com produção de EPS.

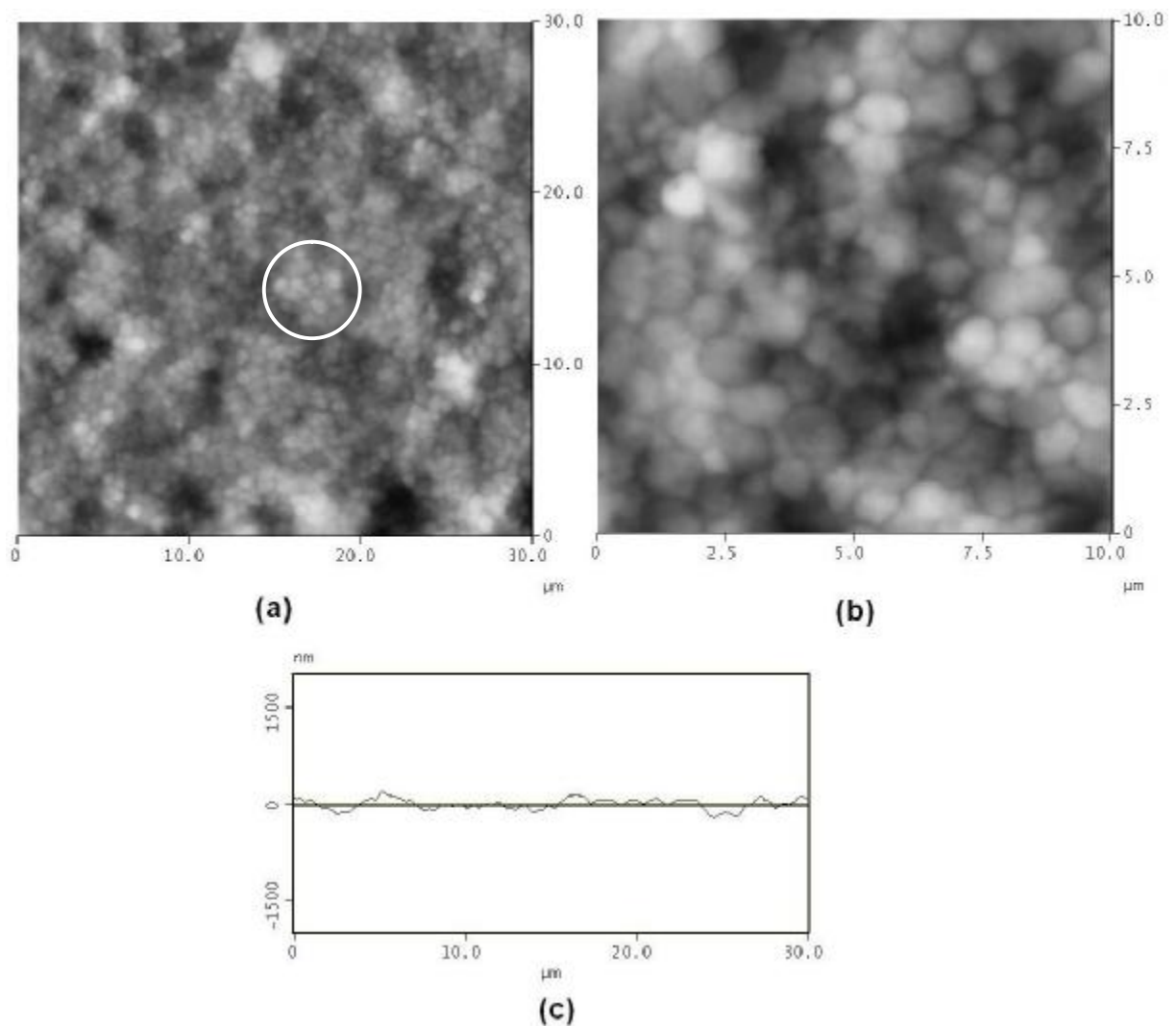


Figura 9.12. Imagens de AFM sobre amostras de M36, com varreduras de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). Um círculo em (a) indica a presença de uma microcolônia. No gráfico de seção (c), pode ser observada uma clara redução da rugosidade da superfície. Escala de altura: 900,2 nm (a), 461,9 nm (b) e 1500 nm.

Após 72 horas de crescimento (M72), observou-se a formação de uma rede de EPS (Fig. 9.13a) encobrindo células de estágios anteriores (< 72 horas). Poucas bactérias foram observadas sobre a superfície. A presença de canais (setas na Fig. 9.13b) e espaços intersticiais (sinais de soma na Fig. 9.13b) são evidentes como estruturas integrantes do biofilme. A superfície não obscurecida e os contornos bem definidos das poucas bactérias presentes na superfície da rede extracelular (asteriscos na Fig. 9.13b) indicaram a pequena quantidade (ou ausência) de EPS sobre sua parede celular (peptidoglicano). Isto é uma

característica de células jovens provavelmente originadas daquelas abaixo da rede extracelular. O gráfico de seção mostra o perfil deste estágio de desenvolvimento do biofilme (Fig. 9.13c), com aumento da irregularidade com relação a 36 horas de crescimento, devido aos espaços intersticiais presentes na rede de EPS. Esta fase deve representar os estágios iniciais de crescimento do biofilme.

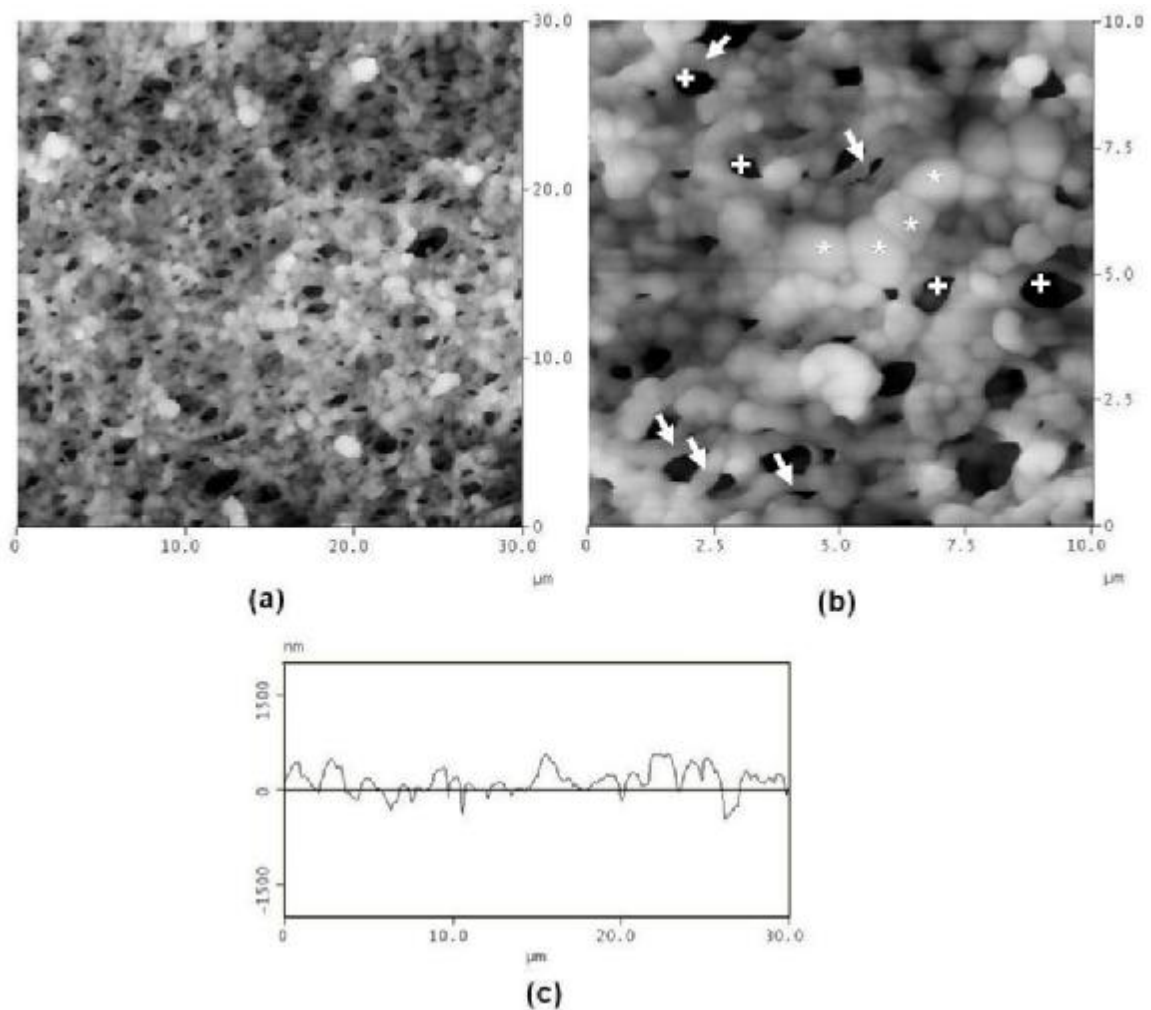


Figura 9.13. Imagens de AFM sobre amostras de M72, com varreduras de 30 x 30  $\mu\text{m}$  (a) e 10 x 10  $\mu\text{m}$  (b). As setas, sinais de soma e asteriscos (b) indicam, respectivamente, a presença de canais, espaços intersticiais e bactérias. O gráfico de seção (c), indica o perfil desta superfície. Escala de altura: 2585 nm (a), 1416 nm (b) e 1500 nm.

Após 192 horas de crescimento (M192), “ilhas” de agregados bacterianos (microcolônias) e depressões são observadas sobre a superfície. Muitas células estão presentes sobre a rede de EPS, que apresenta algumas regiões ainda visíveis (setas na Fig. 9.14a). A aparência de “bolas de algodão” das células bacterianas dá-se devido à presença de

grande quantidade de material extracelular sobre sua superfície (Fig. 9.14b). O gráfico de seção (Fig. 9.14c) mostra pequenas diferenças no perfil da superfície quando comparado com 72 horas de crescimento.

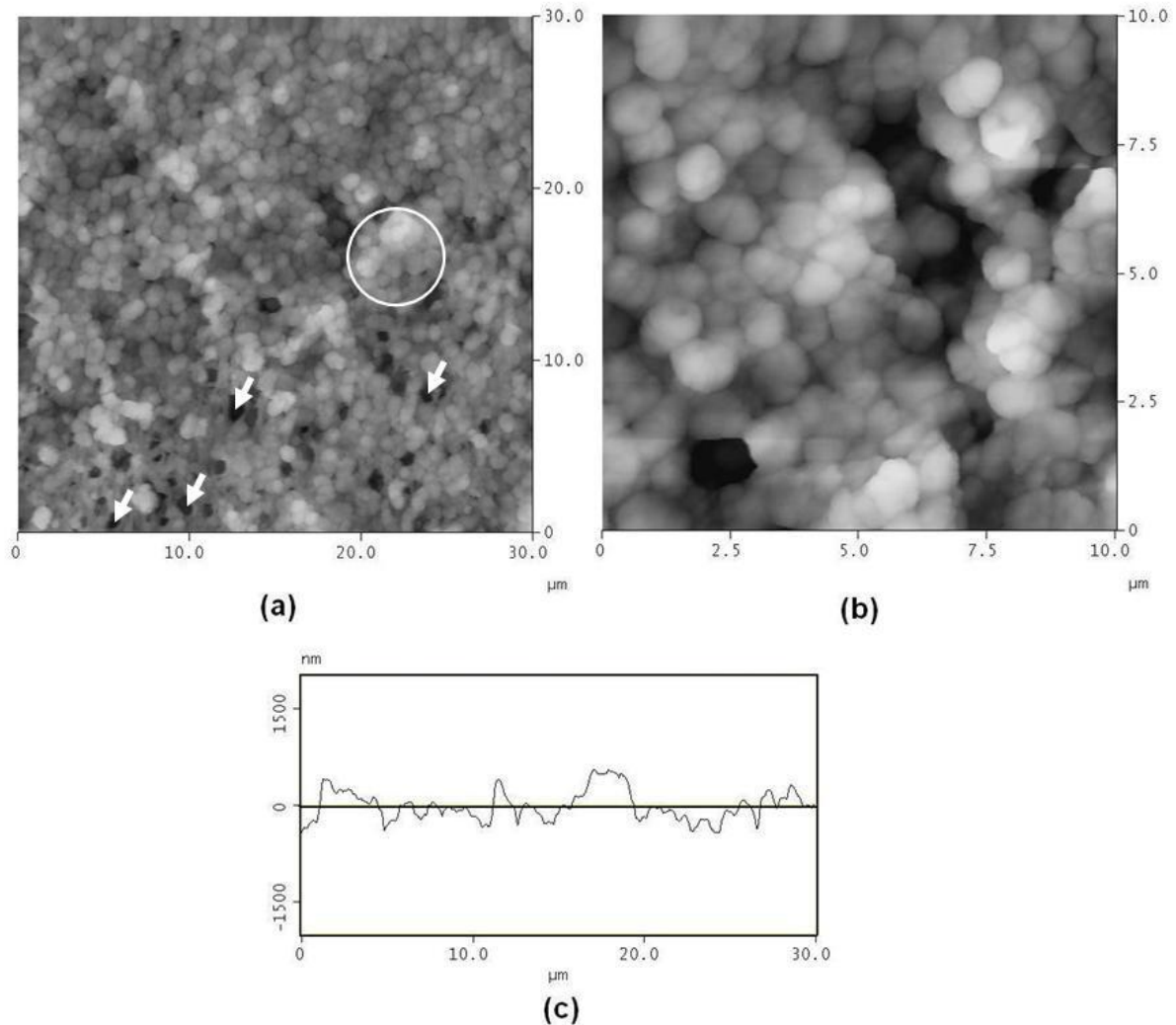


Figura 9.14. Imagens de AFM sobre amostras de M192, com varreduras de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). Um círculo em (a) indica a presença de uma das “ilhas” de microcolônias presentes na superfície e as setas, a presença da rede polimérica. O perfil da superfície é mostrado no gráfico de seção (c). Escala de altura: 2268 nm (a), 1234,3 nm (b) e 1500 nm.

Após 360 horas de crescimento (M360), um biofilme altamente complexo formou-se sobre a superfície (Fig. 9.15a). As células bacterianas não são distinguíveis, estando encobertas pela grande quantidade de EPS. Estruturas semelhantes a espículas podem ser vistas (Fig. 9.15b), dificultando a captura de dados de altura. A irregularidade da superfície aumenta significativamente, conforme gráfico de seção (Fig. 9.15c), com relação a

192 horas de crescimento. Temos aqui um biofilme totalmente desenvolvido e em pleno crescimento.

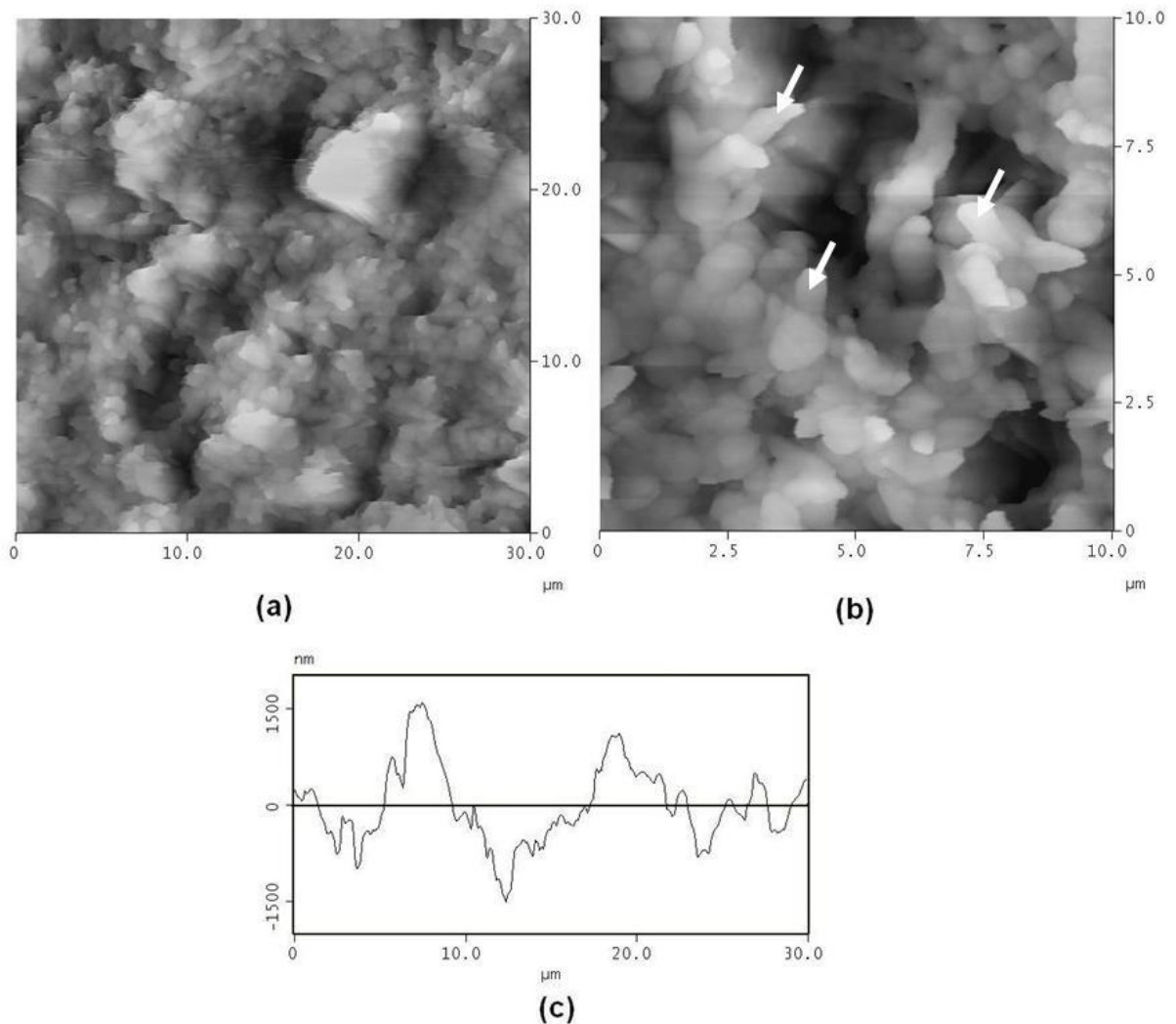


Figura 9.15. Imagens de AFM sobre amostras de M360, com varreduras de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). As setas em (b) indicam algumas espículas presentes na superfície. No gráfico de seção (c), pode ser observada um aumento significativo da irregularidade da superfície. Escala de altura: 5159,6 nm (a), 2732,8 nm (b) e 1500 nm.

A Figura 9.16 mostra uma seqüência de imagens em três dimensões da MN-ICC e M24-360 horas, feitas na varredura de 15 x 15 μm, mostrando a formação e evolução do biofilme com o tempo nos experimentos realizados.



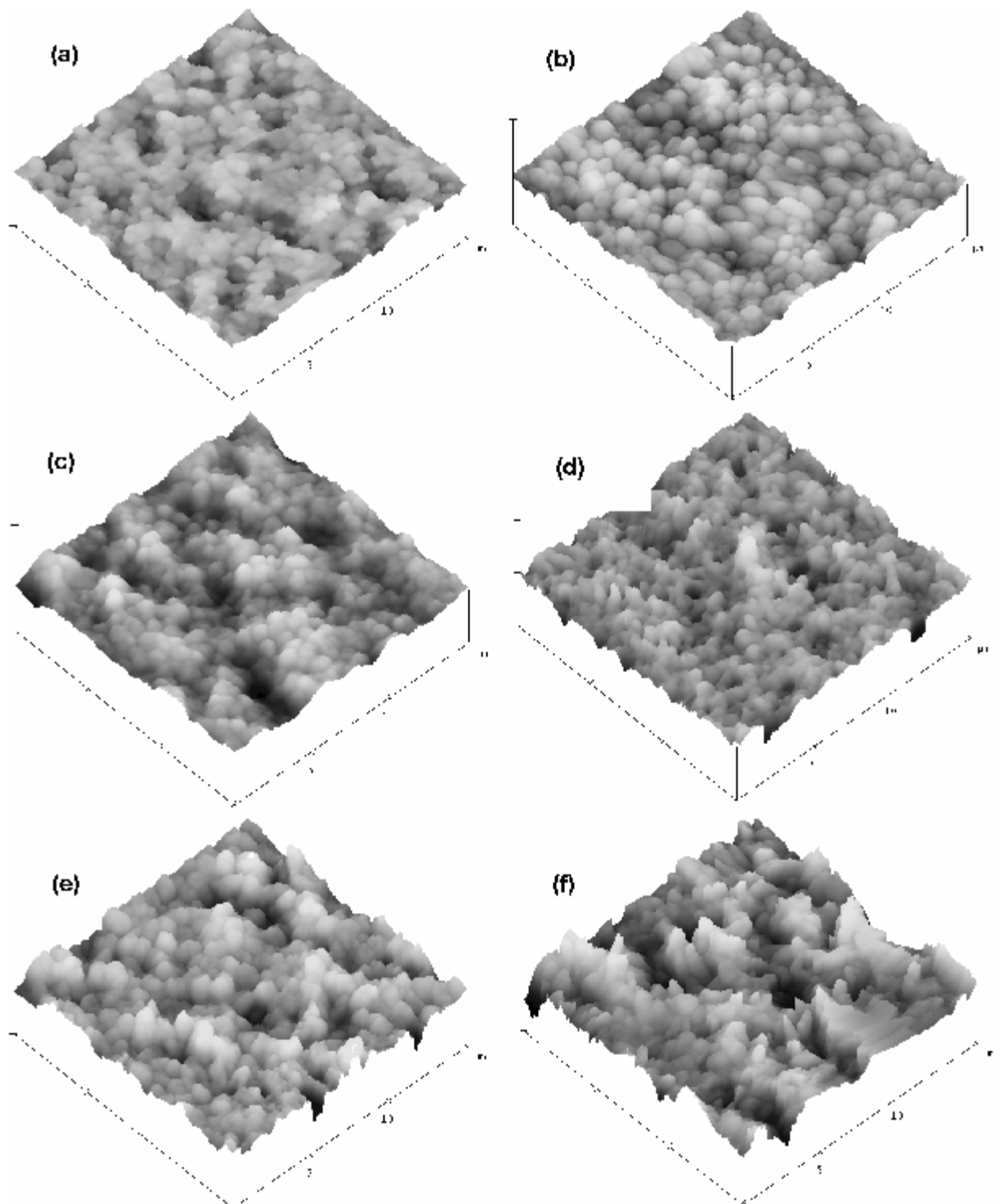


Figura 9.16. Imagens de AFM sobre MN-ICC (a) e M24 (b), M36 (c), M72 (d), M192 (e), e M360 (f). As medidas foram realizadas com varredura de 15 x 15  $\mu\text{m}$ . Diferenças topográficas com a idade do biofilme são facilmente observadas. Escala de altura: 3,300 (a), 0,981 (b), 0,950 (c), 2,103 (d), 2,190 (e), e 3,469  $\mu\text{m}$  (f)

Uma comparação mais detalhada entre as membranas de nitrocelulose inoculadas de 24 e 36 horas (M24 e M36, respectivamente) é feita nas Figuras 9.17, em 5 x 5  $\mu\text{m}$ . Nesta

varredura, poucas células bacterianas ficaram dentro da área analisada. Na Figura 9.17a e 9.17b, são mostradas imagens de AFM em três dimensões e gráficos de seção (Fig.9.17c e 9.17d). Os picos e depressões no gráfico de seção representam, respectivamente, o limite superior das superfícies celulares e as regiões de contato entre as bactérias. Foi possível identificar mais claramente a presença de EPS devido à formação de um filme sobre a superfície das bactérias.

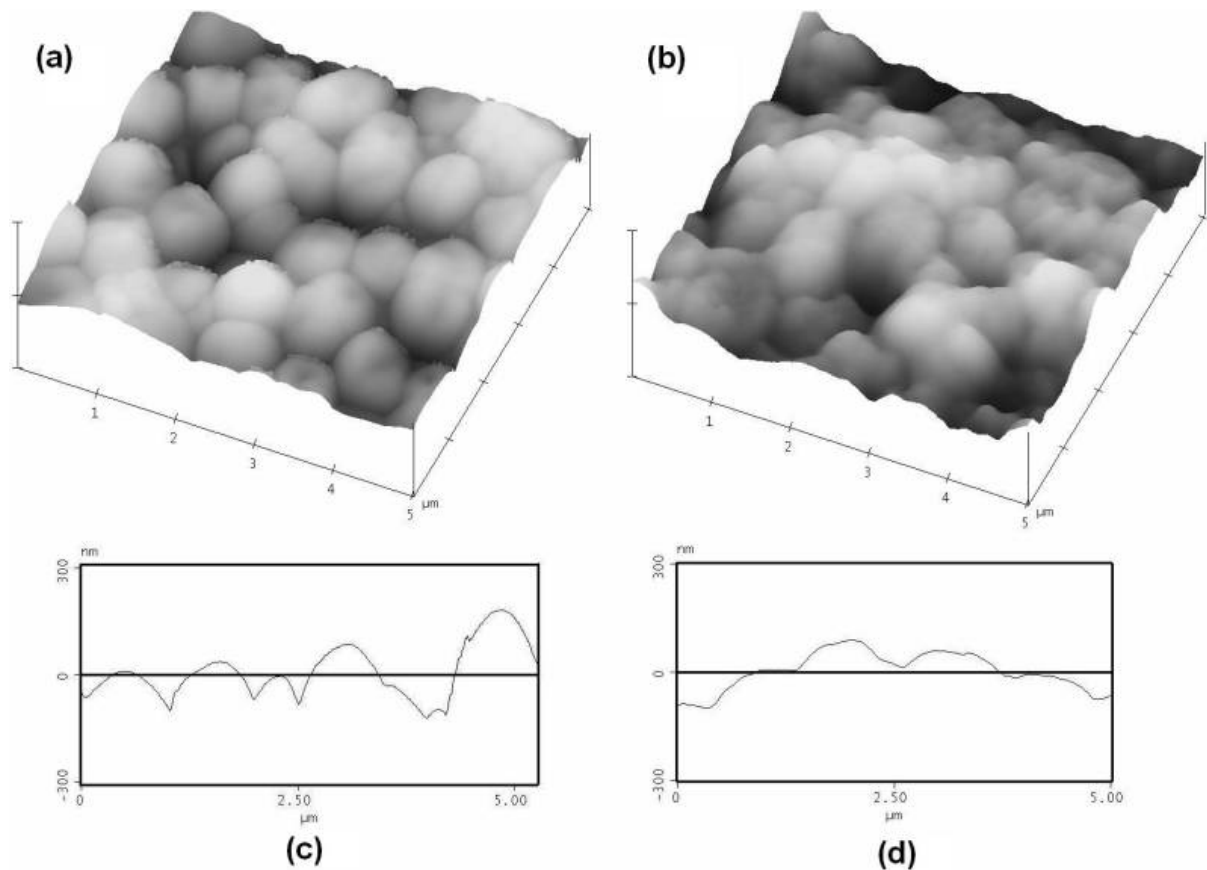


Figura 9.17. Imagens de AFM e gráficos de seção sobre MNI-ICC de 24 (a, c) e 36 horas (b, d) realizadas em uma varredura de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ . É possível identificar a presença de EPS devido a formação de um filme sobre a superfície bacteriana (obscurecimento da imagem das células) e redução da diferença entre picos e depressões no gráfico de seção de 36 horas. Escala de altura: 600 nm.

### 9.3.2 ANÁLISE DE RUGOSIDADE

As Figuras 9.18-9.24 mostram gráficos de distribuição de frequência dos valores de  $R_a$  para a superfície da membrana de nitrocelulose MN, MN-ICC e M24-360, com varreduras de  $30 \times 30 \mu\text{m}$ . O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) de  $R_a$  são



apresentados na Tabela 9.1. O teste de Shapiro Wilk resultou em uma distribuição normal para cada um dos grupos.

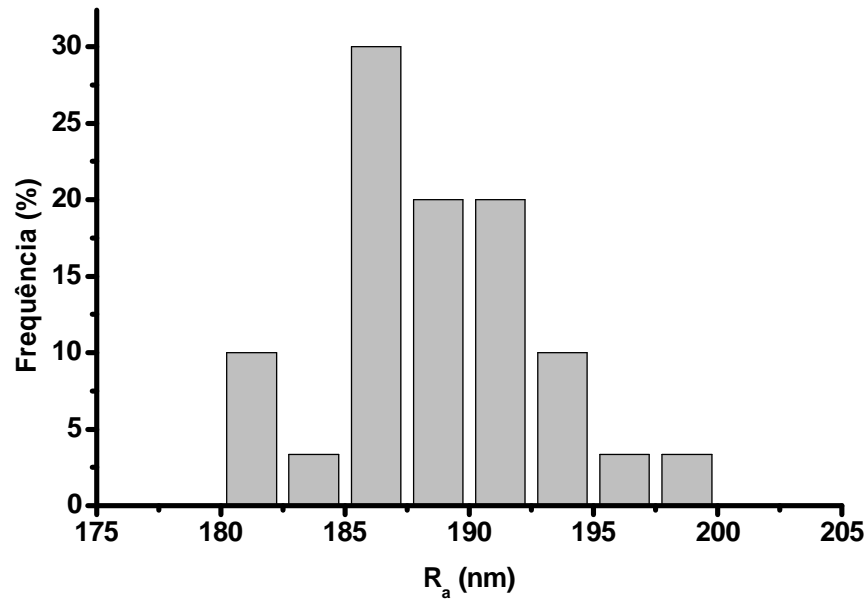


Figura 9.18. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade  $R_a$  da superfície da membrana MN.

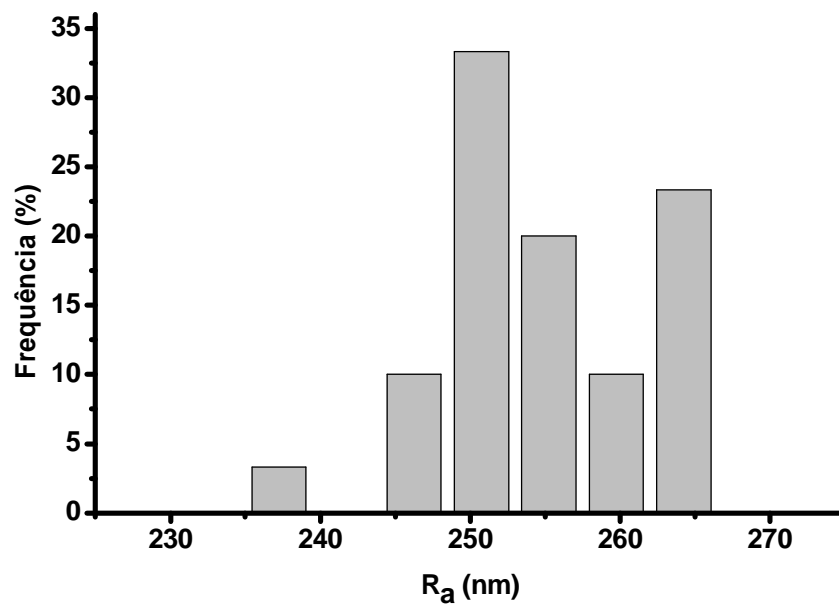


Figura 9.19. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade  $R_a$  da superfície da membrana MN-ICC.

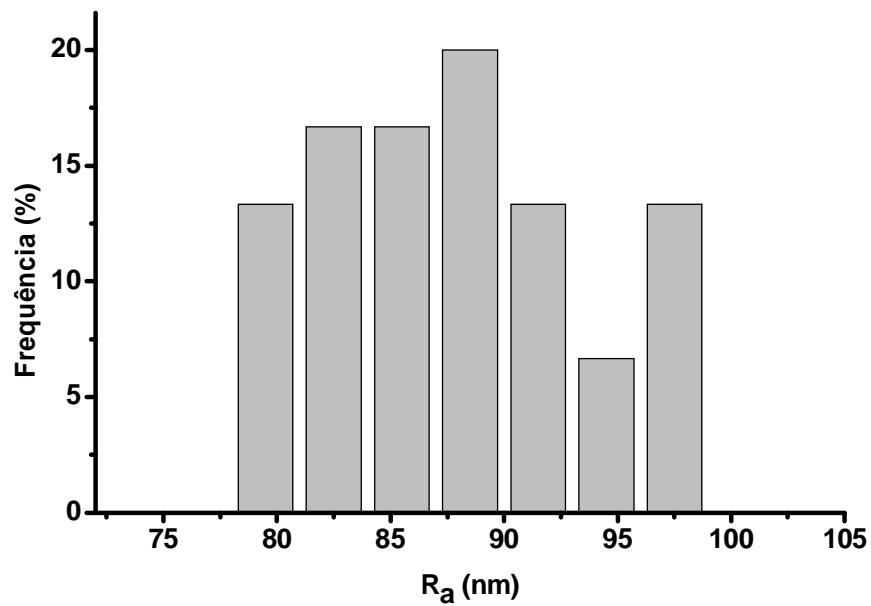


Figura 9.20. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade  $R_a$  da superfície da membrana M24.

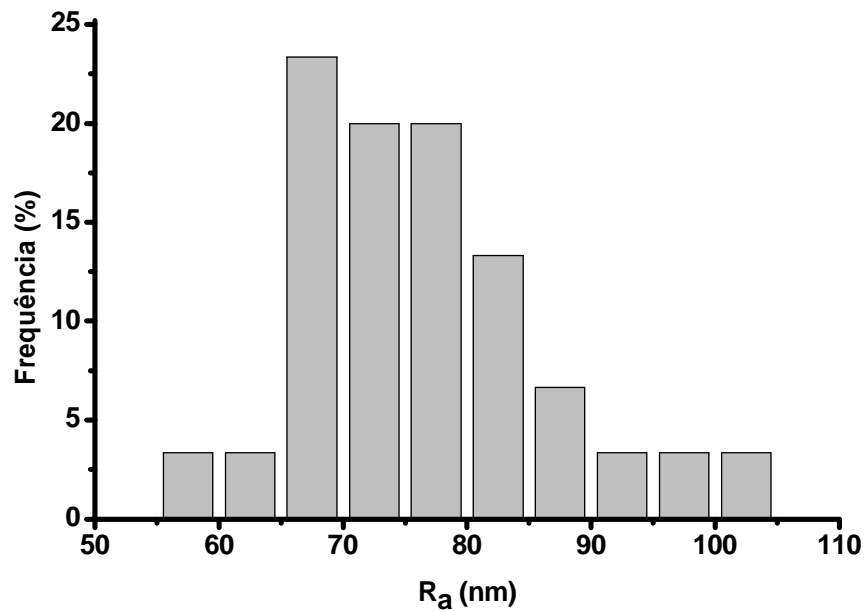


Figura 9.21. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade  $R_a$  da superfície da membrana M36.

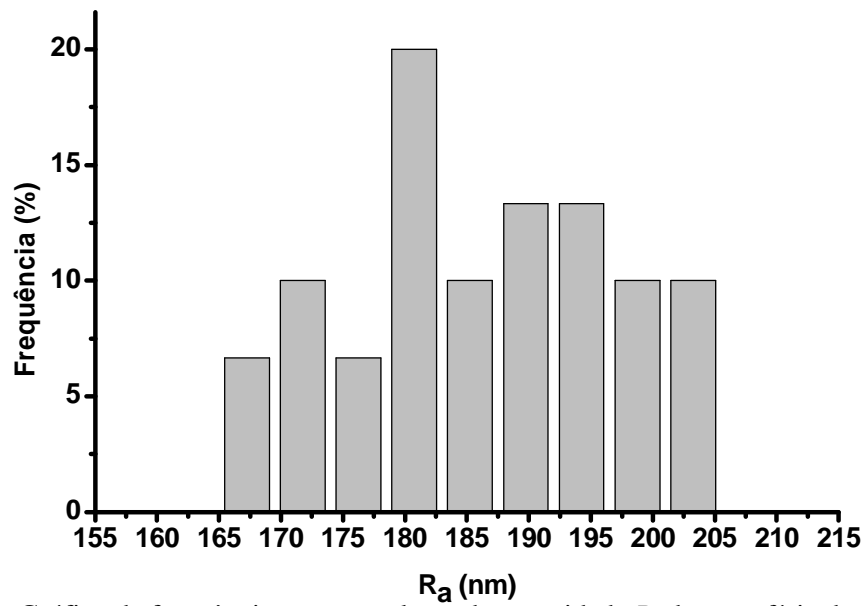


Figura 9.22. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade  $R_a$  da superfície da membrana M72.

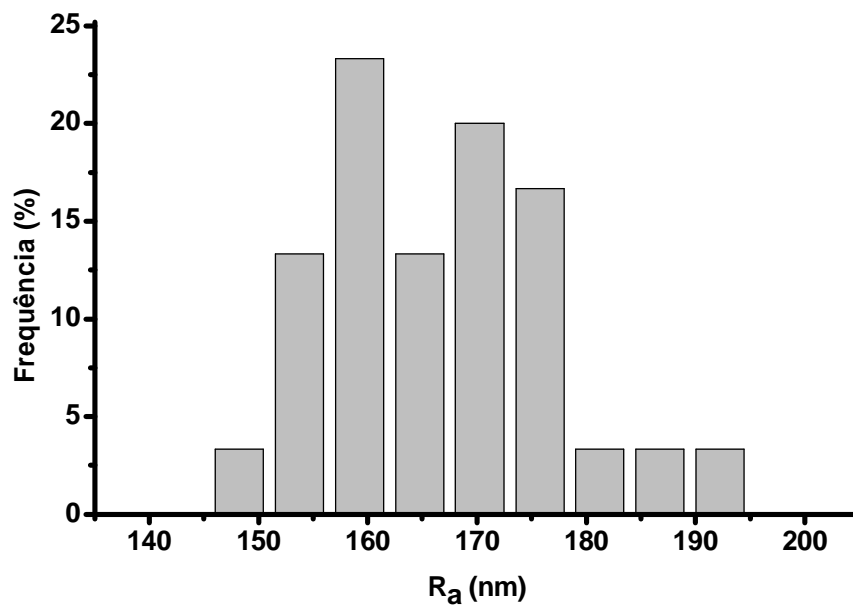


Figura 9.23. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade  $R_a$  da superfície da membrana M192.

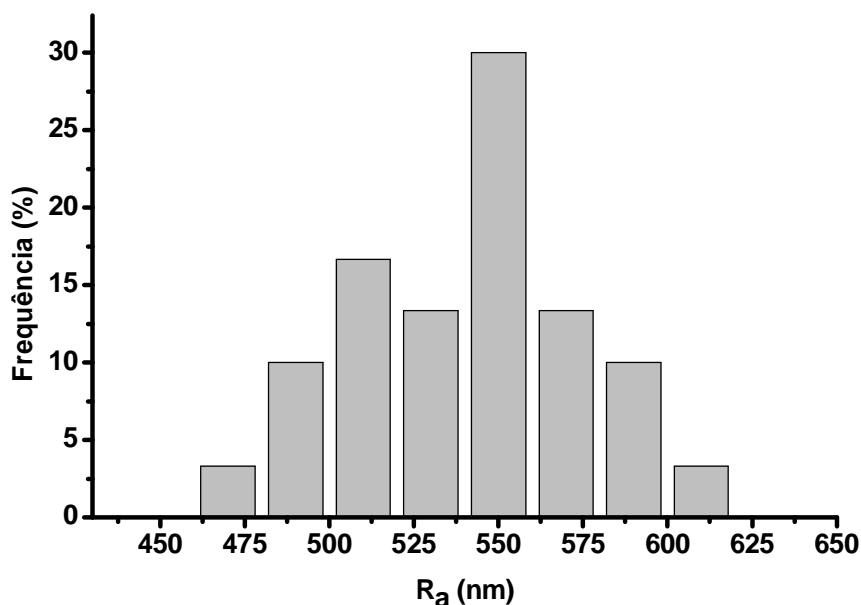


Figura 9.24. Gráfico de frequência para os valores de rugosidade  $R_a$  da superfície da membrana M360.

Tabela 9.1. O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) de  $R_a$  para a superfície da membrana de nitrocelulose MN, MN-ICC e M24-360 horas. Varredura de 30 x 30  $\mu\text{m}$  e escala de altura de 2000 nm.

	MN	MN-ICC	M24	M36	M72	M192	M360
$R_a$ médio	188,77	254,68	88,23	76,28	186,57	166,83	541,14
$\sigma$	4,24	6,57	5,63	9,99	10,38	10,41	35,60
$e$	1,58	2,45	2,10	3,73	3,85	3,88	13,27

Como todos os grupos seguiram distribuições normais, dentro do nível de significância adotado (5%), utilizou-se o teste ANOVA com o procedimento Tukey, para a verificação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios de  $R_a$ . A Tabela 9.2 apresenta os resultados resumidos do teste ANOVA. Com exceção dos grupos MN e M72, todos apresentaram diferenças significativas em suas médias.

Tabela 9.2. Tabela simplificada dos resultados do teste ANOVA.

MN	Diferenças significativas
MN-ICC	Sim
MN-ICC de 24 horas	Sim
MN-ICC de 36 horas	Sim
MN-ICC de 72 horas	Não
MN-ICC de 193 horas	Sim
MN-ICC de 360 horas	Sim
MN-ICC	Diferenças significativas
MN-ICC de 24 horas	Sim
MN-ICC de 36 horas	Sim
MN-ICC de 72 horas	Sim
MN-ICC de 193 horas	Sim
MN-ICC de 360 horas	Sim
MN-ICC de 24 horas	Diferenças significativas
MN-ICC de 36 horas	Sim
MN-ICC de 72 horas	Sim
MN-ICC de 193 horas	Sim
MN-ICC de 360 horas	Sim
MN-ICC de 36 horas	Diferenças significativas
MN-ICC de 72 horas	Sim
MN-ICC de 193 horas	Sim
MN-ICC de 360 horas	Sim
MN-ICC de 72 horas	Diferenças significativas
MN-ICC de 193 horas	Sim
MN-ICC de 360 horas	Sim
MN-ICC de 193 horas	Diferenças significativas
MN-ICC de 360 horas	Sim

O aumento de 65,91 nm no valor médio de  $R_a$  entre CNM e CNM-BHI foi devido à presença dos glóbulos da solução de crescimento (ICC); a redução de 165,77 nm entre MN-ICC e M24, à presença de células bacterianas sobre a superfície; a redução de 11,95 nm entre M24 e M36, à formação do EPS; o aumento de 110,29 nm entre M36 e M72, à presença da rede de EPS, com seus interstícios e canais; a redução de 19,74 nm entre M72 e M192, ao crescimento bacteriano sobre a rede de EPS; e finalmente, o aumento de 374,31 nm na rugosidade entre M192 e M360, ao crescimento do biofilme. A igualdade estatística entre os

valores médios de  $R_a$  entre MN e M72 não foi relevante já que são estados qualitativamente diferentes (sem e com bactérias). A superfície modificada foi a da membrana de nitrocelulose com ICC (MN-ICC) e as alterações sobre a sua topografia é que são consideradas importantes para efeitos de comparação.

A Figura 9.25 mostra o gráfico de barras de  $R_a$  médio para MN-ICC e M24-360. As medidas de rugosidade da superfície puderam caracterizar inequivocamente os vários estágios de formação e estrutura do biofilme:

- 24 horas – pouco ou nenhum EPS. Contornos das células e septos distinguíveis (rugosidade determinada pela disposição das bactérias sobre a superfície). Fase de adesão;
- 36 horas – Biofilme jovem consolidado. Células bacterianas parcialmente obscurecidas (pequena diminuição da rugosidade devido à formação de EPS).
- 72 horas – Rede de EPS, com poucas bactérias na superfície (aumento da rugosidade provocada pela grande quantidade de espaços intersticiais da rede);
- 192 horas – Formação de ilhas de microcolônias bacterianas, por cima da rede de EPS. Células com aparência de “bolas de algodão”, devido ao EPS sobre sua superfície (diminuição da rugosidade devido ao recobrimento dos espaços intersticiais);
- 360 horas – Biofilme com grande quantidade de EPS, formando espículas. Impossibilidade de distinção de células bacterianas (aumento expressivo da rugosidade). Biofilme em pleno crescimento.

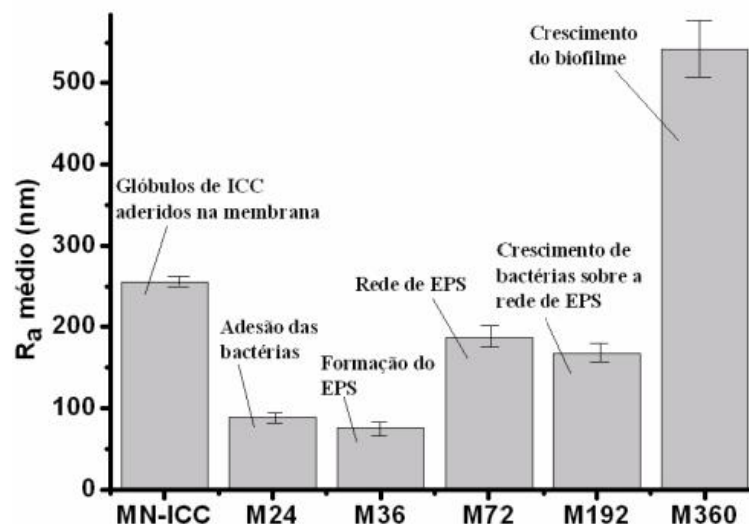


Figura 9.25. Valor médio de  $R_a$  ( $\pm e$ ) da superfície de amostras da membrana MN-ICC e M24-M360. As medidas de rugosidade distinguiram as diferentes alterações na topografia da superfície da membrana de nitrocelulose: Adesão de glóbulos de ICC (a); adesão de bactérias (b); formação de EPS (c); rede de EPS (d); crescimento bacteriano sobre a rede de EPS (e), crescimento do biofilme (f).

### 9.3.3 REALCE DE CONTORNOS

Detalhes da superfície da parede bacteriana (peptidoglicano) com o tempo podem ser vistos na Figura 9.26. Foi aplicado uma rotina de realce de contornos nas imagens de 5 x 5  $\mu\text{m}$  de membranas inoculadas M24, M36 e M192 horas. Após 24 horas (M24), a superfície da parede bacteriana apresentou um aspecto homogêneo e liso, característico do peptidoglicano de bactérias Gram-positivas. Observou-se a presença de material polimérico (EPS) sobre a superfície da parede após 36 e 192 horas de crescimento (M36 e M192) (Fig.9.26b e 9.26c), inexistente após 24 horas (Fig.9.26a).

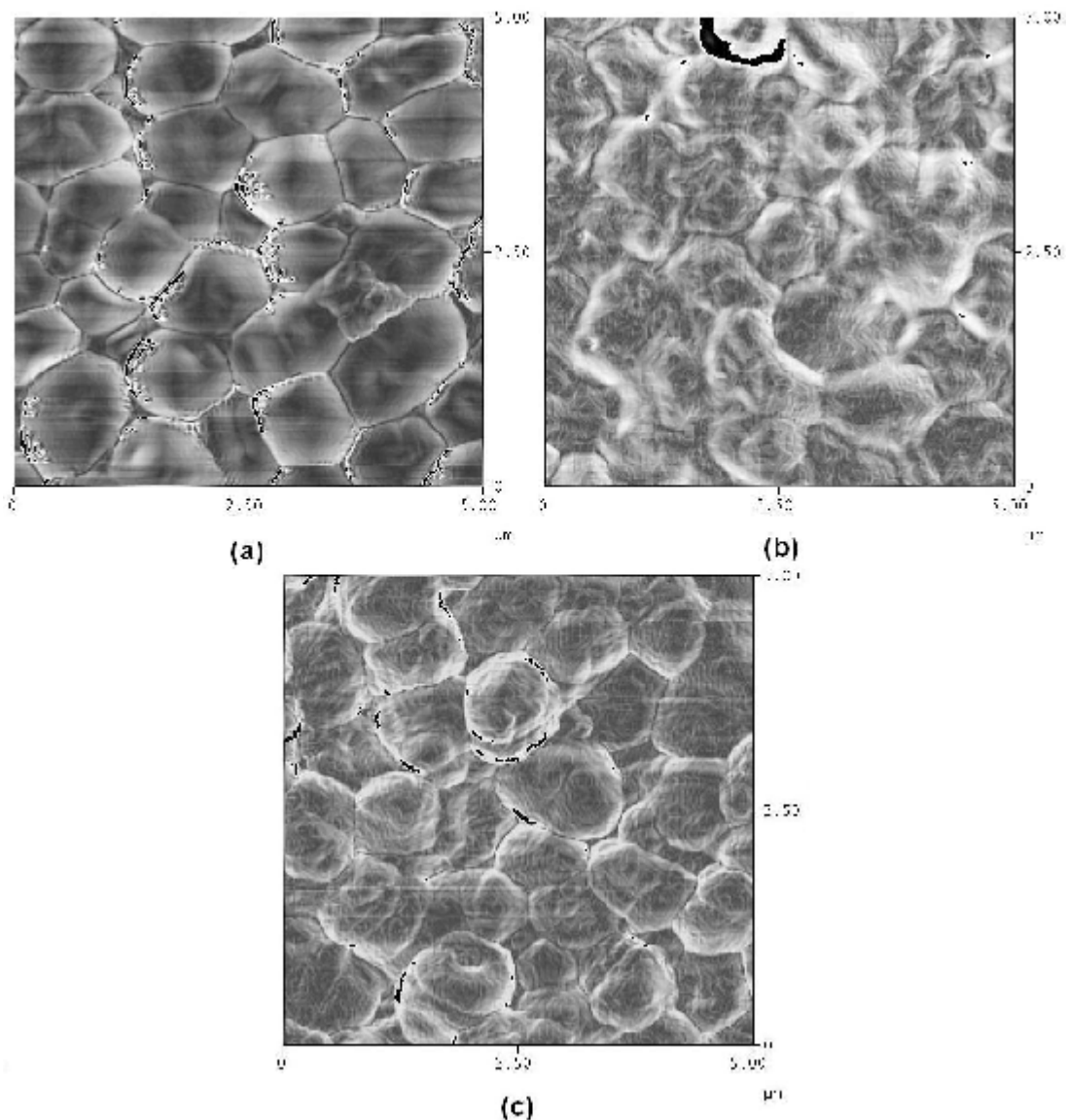


Figura 9.26. Imagens de AFM com realce de contornos sobre M24 (a), M36 (b) e M192 (c) realizadas em uma varredura de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ . As alterações da rugosidade da parede celular bacteriana devido a presença de EPS são evidentes. Podem-se observar detalhes da estrutura polimérica. Escala de altura: 500 nm.



## 9.4 CONCLUSÕES

O estudo de biofilmes é importante na moderna medicina devido a sua influência no tratamento de doenças infecciosas com antibióticos. Bactérias patogênicas raramente existem na natureza como uma cultura planctônica pura. Elas persistem aderidas a superfícies dentro do ecossistema de um complexo e estruturado biofilme no organismo infectado. Biofilmes bacterianos podem ser mais resistentes ao tratamento com antibióticos do que uma cultura pura (Gilbert et al., 1997). Assim, em qualquer estudo de infecções clínicas causadas por bactérias deve-se considerar a formação do biofilme. A compreensão da ação do biofilme requer o conhecimento de sua estrutura e propriedades físicas. Neste capítulo, foi demonstrado que a microscopia de força atômica é uma poderosa técnica não destrutiva para o estudo qualitativo e quantitativo da evolução da superfície de um biofilme, possibilitando diferenciar diferentes estágios de desenvolvimento e estruturas topográficas. Este fato abre perspectivas para o estudo dos efeitos de agentes antibacterianos na topografia do biofilme, fornecendo importantes informações para o tratamento deste tipo de infecção.

Este trabalho está associado a um artigo submetido em 2006 (Anexo C.1): Cibele Barreto Mano de Carvalho, Teodora T P Arruda, Marco Antonio Botelho, Benildo Souza Cavada, Edson H. Teixeira, Ricardo P Santos. Topographical alterations and antimicrobial effect of *Lippia sidoides* essential oil against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006; e resultou em outro, submetido em 2007 (Anexo C.2): Ricardo P. Santos, Theodora T. P. Arruda, Cibele B. M. Carvalho, Victor A. Carneiro, Lara Q. V. Braga, Edson H. Teixeira, Francisco V. S. Arruda, Benildo S. Cavada, Alexandre Havt, Taianá M. de Oliveira, Gustavo A. Bezerra, Valder N. Freire. Aging of *Enterococcus faecalis* biofilms: observation of topographical changes by Atomic Force Microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, 2007.

## COLABORADORES

T. T. P. ARRUDA <sup>b</sup>, C. B. M. CARVALHO <sup>b</sup>, V. A. CARNEIRO <sup>c</sup>, L. Q. V. BRAGA <sup>c</sup>, E. H. TEIXEIRA <sup>c</sup>, B. S. CAVADA <sup>d</sup>, A. HAVT <sup>d</sup>, V. N. FREIRE <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>d</sup> Faculdade de Medicina/Sobral, Universidade Federal do Ceará, Av. Gerardo Rangel s/n, Campus do Derby 62041-180, Sobral, Ceará Brazil

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Purges, W. K., Sadava, D., Orians, G. H., Heller, H. C. (2002). Vida: A Ciência da Biologia. 6 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Borzani, W., Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E. (2001). Biotecnologia Industrial: Voll. Fundamentos. São Paulo: Edgar Blucher.
- Black, J. G. (2002). Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Abdullah, M., McClintock, Yuan-Ling Ng, Gulabivala K, Moles D.M., Spratt D.A., 2005. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. Journal of Endodontics, 31(1):30-36.
- Ahimou, F., Denis, F.A., Touhami, A., Dufrêne, Y.F., 2002. Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy. Langmuir 18, 9937-9941.
- Auerbach, I.D., Sorensen, C., Hansma, H.G., Holden, P.A., 2000. Physical Morphology and Surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. J. Bacteriol. 182, 3809-3815.
- Beech, I.B. Smith, J.R., Steele A.A., Penegar, I., Campbell, S.A., 2002. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. Coll. Surf. Biointerfaces 23, 231-247.
- Beveridge, T.J., Grahan, L.L., 1991. Surface layers of bacteria. Microbiol. Rev. 55, 684-705.
- Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C., 1986. Atomic Force Microscope. Phys. Rev. Lett. 56, 930-933.
- Bishop, P.L., Gibbs, J.T., Cunningham, B.E., 1997. Relationship between concentration and hydrodynamic boundary layers over biofilms. Environ. Technol. 18, 375-386.
- Bustamante, C., Keller, D., 1995. Scanning force microscopy in biology. Phys. Today 48, 32-38.
- Camesano, T.A., Abu-Lail, N.I., 2002. Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on single-molecule basis. Biomacromolecules 3, 661-667.
- Carniol, K., Gilmore, M.S., 2004. Signal transduction, quorum – sensing and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. J. bacterial 186, 8161-8163.
- Casemano, T.A., Natan, M.J., Logan, B.E., 2000. Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. Langmuir 16, 4563-4572.
- Digital Instruments Veeco Metrology Group., 2001. Command Reference Manual – Software version 5.12 r3.

- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193.
- Dufrêne, Y.F., 2002. Atomic Force Microscopy, a Power Tool in Microbiology. *J. Bacteriol.* 184, 5205-5213.
- Dufrêne, Y.F., 2004. Refining our perception of bacterial surfaces with the atomic force microscope. *J. Bacteriol.* 186, 3283-3285.
- George, S., Kisben, A., Song, K.P., 2005. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J. Endodon* 31, 867-872.
- Gibbs, J.T., Bishop, P.L., 1995. A method for describing biofilm surface roughness using geostatistical techniques. *Water Sci. Technol.* 32, 91-98.
- Gilbert, P.J., Das, J., Foley, I., 1997. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160-167.
- Hansma, H.G., Pietrasanta, 1998. Atomic force microscopy and others scanning probe microscopies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 579-139.
- Jena, B.P., Horber, J.K.H. (editors), 2002. *Methods in Cell Biology: Atomic Force Microscopy Cell Biology*, Academic Press, California, USA 68.
- Junior, A.S., Teschke, O., 2005. Dynamics of the antimicrobial peptide PGLa action on *Escherichia coli* monitored by atomic force microscopy. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21, 1103-1110.
- Kristich, C.J., Li Yung-Hua, Cvitkovitch, D.G., Dunny, G.M., 2004. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 186, 154-163.
- Lehman, E.L., 1975. *Nonparametrics: Statistical Methods Bases on Ranks*. Holden-Day, Inc., San Francisco.
- Lindman, H.R., 1974. *Analysis of Variance in Complex Experimental Designs*. W. H. Freeman Company, San Francisco.
- Mendenhall, W., Wackerly, D.D., Scheaffer, R.L., 1990. *Mathematical Statistics with Applications*. PWS-Kent Publishing Company, Boston.
- Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F., Murray, B.E., 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72, 3658-3663.
- Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P. (ed.), 1999. *Atomic force microscopy for biologists*. Imperial College Press, London, United Kingdom.
- Murga, R., Stewart, P.S., and Daly, D., 1995. Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 503-510.

- 
- O'Toole, G., 2003. To build a biofilm. *J. Bacteriol.* 185, 2687-2689.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49-79.
- Parsek, M.R., Fuqua, C., 2004. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 186, 4427-4440.
- Razatos, A., Ong, Y., Sharma, M.M., Georgiou, G., 1998. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11059-11064.
- Sayles, R.S., 1982. *The profile as a random process: rough surfaces*. Longman, London, England.

---

---

## NANOESTRUTURA DA ESPOROPOLENINA DE GRÃOS DE POLÉN DE *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL

---

---

### 10.1 INTRODUÇÃO

#### 10.1.1 ESPERMATÓFITAS

Espermatófitas (que significa plantas com semente) são plantas superiores caracterizadas por apresentarem raiz, caule, folhas, flores e sementes. Também são chamadas de fanerógamas (por possuírem flor) ou ainda embriófitas sifonógamas, por formarem tubo polínico. As espermatófitas podem ser classificadas como angiospermas (em que as sementes estão no interior dos frutos) e gimnospermas (no qual não há fruto, isto é, a semente é nua). Como exemplos de angiospermas podemos citar as plantas frutíferas em geral (macieira, laranjeira, goiabeira, etc...); de gimnospermas, o pinheiro e o cipreste (Schultz, 1990; Redondo e Theófilo, 1997).

#### 10.1.2 A FLOR

A flor pode ser considerada como um ramo modificado para a função de reprodução, em que os entre-nós se encontram reduzidos e em cujos nós se encontram estruturas que se podem considerar como folhas modificadas (Eames, 1961). É o aparelho reprodutor das Espermatófitas. Nas gimnospermas, que surgiram primeiro, as flores são incompletas, ou seja, possuem sépalas e pétalas que formam o revestimento externo e não produzem os óvulos dentro de um ovário. Não formam, assim, frutos. Já as angiospermas, por outro lado, surgiram mais tarde e suas flores são completas. Isto significa que os óvulos, que irão produzir as sementes, formam-se dentro de uma estrutura fechada, o ovário, que irá se transformar no fruto (Esaú, 1965).

A flor completa, ou seja, das angiospermas (Fig.10.1) é constituída das seguintes partes (Rosique, 1978; [www.herbario.com.br](http://www.herbario.com.br)):

- Pedúnculo: é ramo de caule em cuja extremidade a flor se forma, sendo sua haste de sustentação;
- Receptáculo: é a extremidade superior dilatada do pedúnculo onde as peças da flor se fixam;
- Sépala: são folhas modificadas, geralmente verdes, cuja função é de proteção. As sépala fecham botão floral antes que este se abra. Seu conjunto denomina-se cálice. Quando as sépala não são verdes e possuem a mesma cor das pétala, o cálice recebe o nome de petalóide e a flor é dita homoclamídea;
- Pétala: são folhas profundamente modificadas, geralmente de diversas cores (raramente verdes), cuja função é proteger os órgãos reprodutores e atrair animais, que irão transportar os grãos de pólen de uma flor a outra. Seu conjunto forma a corola;
- Estames: São folhas modificadas, formando os órgãos reprodutores masculinos do vegetal e cuja função é produzir os grãos de pólen. O conjunto de estames é chamado de androceu;
- Carpelos: São folhas modificadas, formando os órgãos reprodutores femininos do vegetal. Apresentam um ovário onde serão produzidos os óvulos. O conjunto dos carpelos forma o gineceu ou pistilo.

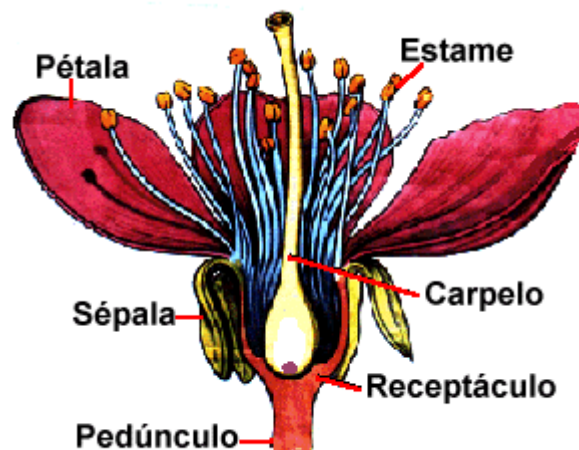


Figura 10.1. As partes de uma flor completa ([www.herbario.com.br](http://www.herbario.com.br)).

O cálice, a corola, o androceu e o gineceu formam juntos, o que se denomina verticilos florais.

Cada estame (Fig.10.2) é constituído de três partes (Rosique, 1978; [www.herbario.com.br](http://www.herbario.com.br)):



- Antera: é a parte superior do estame com forma globulosa e cuja função é de produzir os grãos de pólen;
- Conectivo: é o local por onde o filete se fixa na parte superior do estame que é a antera;
- Filete: é a haste que liga o estame ao receptáculo da flor;

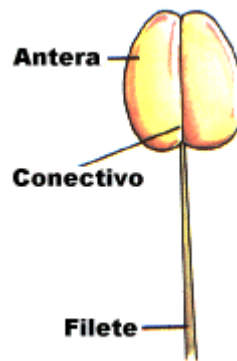


Figura 10.2. As partes de um estame ([www.herbario.com.br](http://www.herbario.com.br)).

O carpelo (Fig.10.3) é constituído de três partes (Rosique, 1978; [www.herbario.com.br](http://www.herbario.com.br)):

- Estigma: é a parte superior do carpelo, geralmente achatada, cuja finalidade é receber o grão de pólen (elementos masculinos de reprodução). Contém formações glandulares que segregam uma substância viscosa que fixa melhor o grão de pólen.
- Estilete: é a haste que se estende desde o estigma até o ovário, estando cheio de uma substância gelatinosa. É pelo estilete que o tubo polínico do grão de pólen atinge o ovário;
- Ovário: é a porção do carpelo, dilatada e que está ligada ao receptáculo. É no seu interior que se encontram os óvulos.



Figura 10.3. As partes de um carpelo ([www.herbario.com.br](http://www.herbario.com.br)).

A flor das gimnospermas (flor incompleta) é conhecida com o nome de estróbilo e é sempre unissexuada, isto é, existe uma flor com o aparelho reprodutor masculino e outra com o aparelho reprodutor feminino. O aparelho reprodutor feminino é representado por um óvulo destituído de ovário e que guarda no seu interior o arquegônio (órgão que dá origem a gametas femininos) (Raven, 2001).

### 10.1.3 O PÓLEN

O pólen (do grego “pales” = “farinha” ou “pó”) é o conjunto dos minúsculos grãos produzidos pelas flores das plantas espermatófitas. São normalmente arredondados, embora os dos pinheiros sejam alados, e podem ser muito pequenos, apenas alguns micrômetros. O menor grão de pólen conhecido é o do *Myosotis*, com cerca de 6  $\mu\text{m}$  (0.006 mm) de diâmetro. A forma e ornamentação dos grãos de pólen são típicas de cada família ou mesmo espécies de plantas (Fig.10.4).

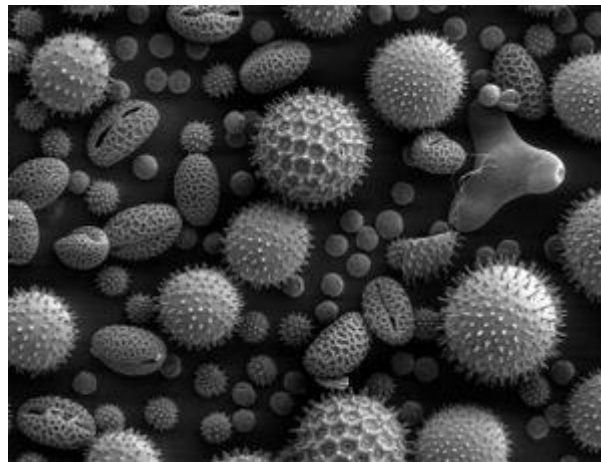


Figura 10.4. Diferentes tipos de grãos de pólen ([www.pt.Wikipedia.org](http://www.pt.Wikipedia.org)).

Como uma célula que é, o grão de pólen apresenta membrana (em número de duas: exina e intina), citoplasma (chamado de foveola) e núcleo (em número de dois: gerador e vegetativo) (Fig.10.5). A exina é a mais externa, constituída por uma substância resistente e quebradiça, chamada esporopolenina. A intina, localizada abaixo da exina, possui natureza celulósica e é bem mais elástica que a anterior (Vidal, 2000; Esaú, 1965).

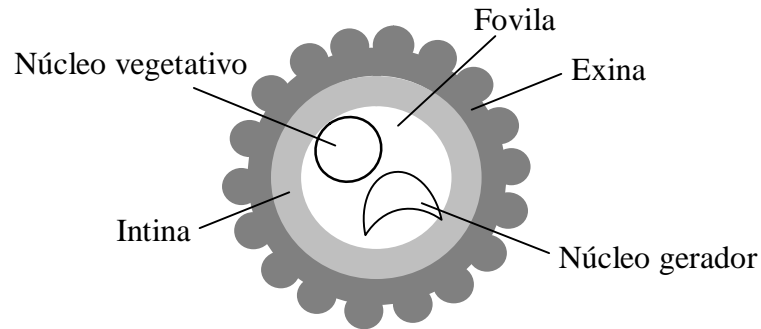


Figura 10.5. Seção de um grão de pólen, mostrando seus constituintes.

O pólen contém uma grande proporção de proteínas (16 a 40 %) contendo todos os aminoácidos conhecidos, assim como numerosas vitaminas, principalmente as vitaminas C e PP, sendo a principal fonte de alimentação das abelhas. Outro importante produto fabricado com pólen é a geléia real. Esta composição do pólen pode ser responsável pelas alergias que lhe são atribuídas. O estudo do pólen é a palinologia (Apezato e Carmelo, 2003).

#### 10.1.4 *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL.

O *Ilex paraguariensis* St. Hil. conhecida como erva-mate (Fig.10.6), é uma planta da família *Aquifoliaceae*. Tem altura de 4-8 m, com tronco curto de 30-40cm de diâmetro e folhas coráceas, de 8-10cm de comprimento por 3-4cm de largura (Lorenzi, 1980).



Figura 10.6. Árvore e detalhes das folhas de *Ilex paraguariensis* (Lorenzi, 1980).

Floresce durante os meses de outubro-dezembro. Os frutos amadurecem em janeiro-março (Fig.10.7).



Figura 10.7. Ilustração de *Ilex paraguariensis*, mostrando detalhes da flor e do fruto ([www.illustratedgarden.org](http://www.illustratedgarden.org)).

Sua madeira pode ser empregada na confecção de lenha. Suas folhas são utilizadas na preparação do "mate", o mais popular dos chás consumidos no país e exportado para todo o mundo. Por essa razão é muito cultivada no sul do país; entretanto, a maior parte da produção ainda provém da exploração de ervais nativos. A árvore é ornamental e pode ser empregada no paisagismo. Seus frutos são muito consumidos por várias espécies de pássaros. Pode ser utilizada no plantio de áreas degradadas destinadas à recomposição da vegetação.

O cultivo da erva-mate abrange cerca de 180000 propriedades dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul. As propriedades em que ela é cultivada são, na maioria, pequenas e médias. Isto assegura sua importância social expressiva. Assim sendo, foi escolhida para dar início a uma série de Sistemas de Produção publicados em forma eletrônica e que servirão de base para uma agência de informação sobre os principais produtos de origem florestal (Lorenzi, 1980).

Em relação ao comportamento das flores, a erva-mate é unissexual em árvores diferentes (espécie dióica). As flores, que são pequenas, pedunculadas, agrupadas em cimeiras fasciculadas nas axilas das folhas, possuem uma característica especial, pois, embora em todas elas se encontrem estames e pistilos, ocorre que, nas femininas, os estames não funcionam e, nas masculinas, o pistilo aborta. Em função disso, ocorre certa dificuldade na polinização natural (Ferreira Filho, 1957; Ferreira et al., 1982).

O grão de pólen de *Ilex paraguariensis* (Figs.10.8 e 10.9) é tricolporado, circunscrito, subprolato (subesferoidal), com relação entre o eixo polar e equatorial (P/E) igual a 1,31. Apresenta tamanho pequeno. A exina é relativamente espessa. O pólen apresenta-se clavado (Takeda et al., 2000).

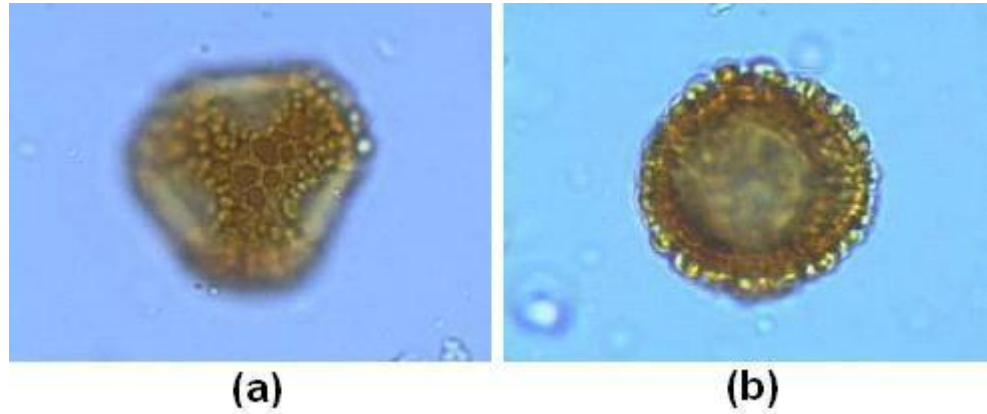


Figura 10.8. Imagens de microscopia ótica de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis*, nas vistas polar (a) e equatorial (b). Barra = 10  $\mu$ m (Alvez, 1999).

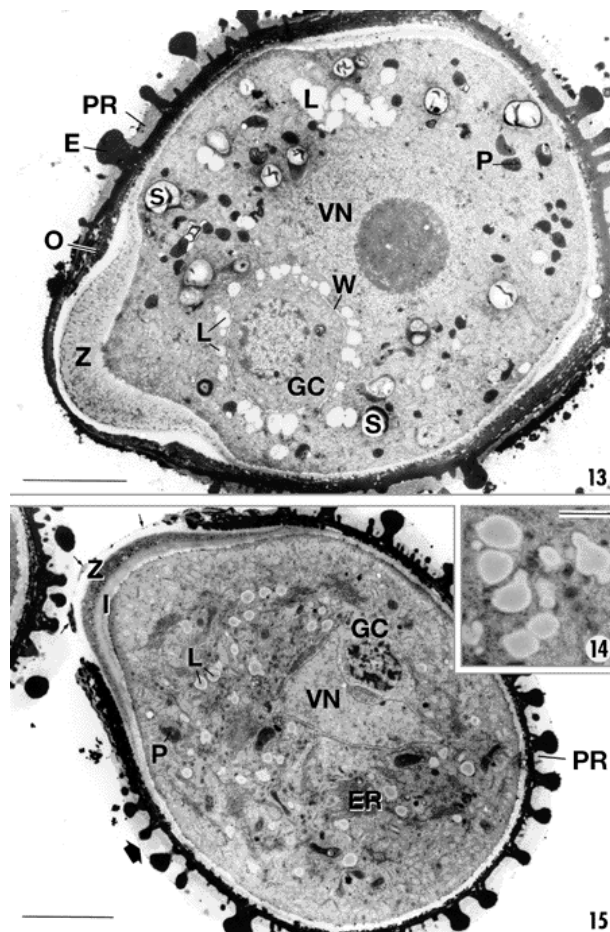


Figura 10.9. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de grão de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* (Santos e Mariath, 1999).



### 10.1.5 A ESPOROPOLENINA

Os grãos de pólen têm atraído a atenção da ciência de materiais, pois o biopolímero formador da exina, a esporopolenina, é um dos materiais conhecidos como mais resistentes a processos físicos, químicos e biológicos de degradação não-oxidativa, incluindo a acetólise. Esta propriedade permite que a esporopolenina mantenha-se intacta em sedimentos muito antigos, como do período Ortoviciano, 400 milhões de anos atrás (Erdtman, 1960).

A esporopolenina é uma mistura de ácidos graxos, fenólicos derivados como o ácido p-coumárico e carotenos (Scott, 1994). Sua subestrutura ainda não foi completamente revelada e muitos estudos ainda estão sendo feitos. Vários modelos têm sido propostos para a nanoestrutura da esporopolenina de esporos e grãos de pólen (Wittborn, 1998). Rowley (Rowley, 1981) interpretou a estrutura da exina como sendo formada por subunidades helicoidais, baseado em estudos com microscópios eletrônicos de transmissão e varredura (TEM e SEM). Entretanto, a microscopia de força atômica (AFM) tem-se mostrado o método ideal para o estudo deste tipo de estrutura (Xing, 2000), já que a organização de seus componentes não é visualizada facilmente por meio de outras técnicas microscópicas.

### 10.1.6 OBJETIVOS

No presente capítulo, foi utilizado o microscópio de força atômica para estudar a nanoestrutura da exina (esporopolenina) de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* St. Hil, visando caracterizá-la qualitativamente e quantitativamente.

## 10.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 10.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Grãos de pólen maduros e frescos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. foram pré-tratados em uma mistura de ácido acético anidro e ácido sulfúrico (solução de acetólise) por 10 min, lavados em água destilada, desidratados em acetona e embebidos em resina Spurr de baixa viscosidade (Erdtman, 1960, Spurr, 1969). Foram realizadas seções semifinas de grãos de pólen (1 µm) em um ultramicrotomo Leica Ultracut equipado com navalha de vidro e

depositadas em lamínulas para corte histológico. Parte das lamínulas com seções semifinas foram tratados com uma solução aquosa de 1% de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) por 24 horas (Claugher, 1986) e outra parte não foi tratada. A acetólise remove a intina (camada de polissacarídeos da parede) e o  $\text{KMnO}_4$  ataca a exina, tornando exposta a subestrutura da esporopolinina.

### 10.2.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

Para a realização das medidas de microscopia de força atômica da superfície dos polens, as lamínulas com as seções semifinas foram retiradas da solução de  $\text{KMnO}_4$ , lavadas em água destilada por 5 min, secas em estufa à  $36^\circ\text{C}$  por 48 horas e montadas sobre discos metálicos (porta amostras do AFM) cobertos com fita adesiva dupla face. Também foram montadas as lamínulas com seções semifinas não tratadas com  $\text{KMnO}_4$ . A superfície das amostras sofreu uma varredura em ar com um Nanoscope IIIa Multimode AFM (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, U.S.A.) no modo intermitente com uma taxa de varredura de 0,400 Hz e frequência de ressonância variando entre 200 e 380 kHz. Utilizou-se hastes de constante elástica média igual a 40 N/m, com sondas de cristal de silício de raio médio de 15 nm (Digital Instruments). Foram realizadas varreduras de  $70 \times 70 \mu\text{m}$ ,  $30 \times 30 \mu\text{m}$ ,  $15 \times 15 \mu\text{m}$ ,  $1 \times 1 \mu\text{m}$  e  $0,600 \times 0,600 \mu\text{m}$ . Os controles de varredura foram apropriadamente ajustados (força de contato adequada e elevados ganhos) para evitar artefatos provocados pela sonda durante a varredura. Para as visualizações em duas e três dimensões de dados de altura (imagem), foi utilizado o software Nanoscope versão 5.12 r3 da Digital Instruments. A representação esquemática do experimento é mostrada na Figura 10.10.

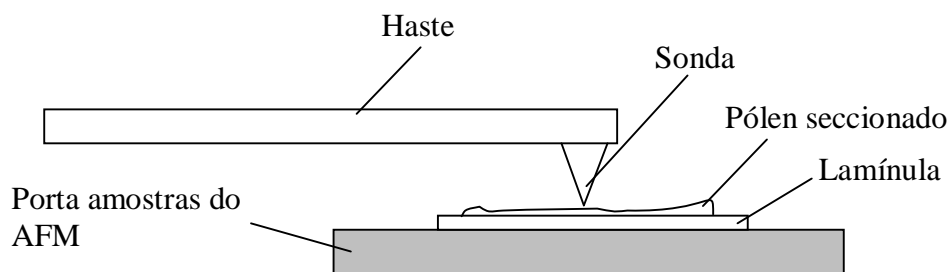


Figura 10.10. Representação esquemática do experimento de microscopia de força atômica com polens. Os elementos do desenho não estão em proporção.



### 10.2.3 GRÁFICO DE SEÇÃO

Foi utilizado o software Nanoscope para construir gráficos de seção das imagens de altura bidimensionais, em varreduras apropriadas, para a obtenção de medidas lineares. No gráfico de seção, um “corte” por meio de uma linha reta pode ser realizado sobre qualquer parte da imagem e o perfil de altura, ao longo deste, “corte” pode ser visualizado (Digital Instruments, 2001).

### 10.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

Amostras de grãos de pólen intactas foram tratadas com 1% de  $\text{KMnO}_4$  durante 24 horas, desidratados em acetona, montados sobre discos de Al e cobertos com uma camada de 20 nm de Au (metalização). As amostras foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5800 com a tensão de 20 kV.

### 10.2.5 MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO

As seções semifinas não tratadas/tratadas com  $\text{KMnO}_4$  e montadas sobre lamínulas histológicas foram observadas em um microscópio ótico metalográfico Olympus BX51RF.

### 10.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das medidas lineares feitas no gráfico de seção foi baseada em estatística descritiva (tendência central e dispersão), teste de Shapiro-Wilk (para determinar se uma amostra aleatória segue ou não uma distribuição normal) e teste de significância (para verificar a existência ou não de diferenças significativas entre grupos amostrais). O nível de significância ( $\alpha$ ) usado foi de 0,05. Todo o tratamento estatístico foi realizado usando os softwares Excel 2002 e Origin 7.0.

## 10.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 10.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

Após o tratamento com  $\text{KMnO}_4$  os grãos de pólen não seccionados ainda apresentaram um aspecto normal quando observada de baixa ampliação por meio da microscopia de varredura. Nenhuma modificação aparente foi detectada (Fig.10.11a). Entretanto, quando a clava foi examinada em alta ampliação, a superfície da exina revelou um aspecto granular (Fig.10.11b), resultado típico de um ataque químico por  $\text{KMnO}_4$  (Rowley, 198; Wittborn, 1998).

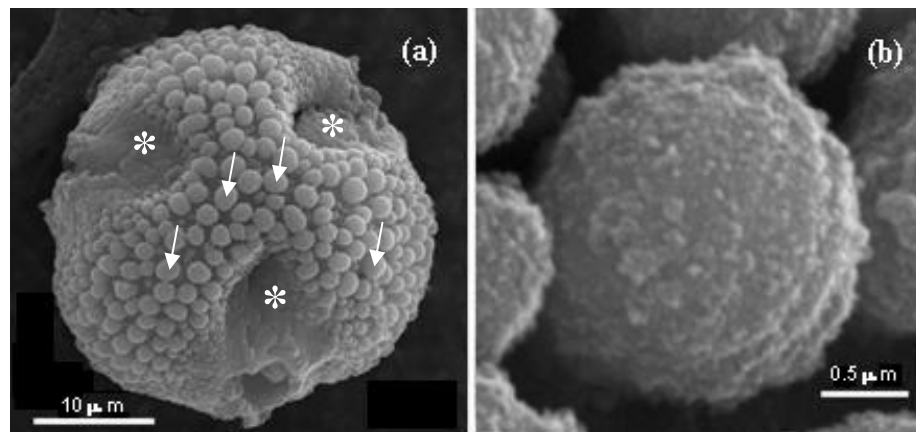


Figura 10.11. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* previamente tratados com  $\text{KMnO}_4$  por 24 h. Muitas clavas (setas) podem ser observadas na exina, exceto na região das aberturas (asterisco) (a); Detalhes da clava na superfície da exina, mostrando sua irregularidade após tratamento químico (b).

### 10.3.2 MICROSCOPIA ÓTICA DE CAMPO CLARO

A Figura 10.12 mostra imagens de microscopia ótica de seções semifinas de polens tratados com  $\text{KMnO}_4$  por 24 horas sobre uma lamínula histológica, montados sobre o porta amostras do AFM. As imagens de polens não tratados apresentam o mesmo aspecto. Podemos observar as clavas sobre as paredes dos polens. É sobre a superfície destas estruturas que a microscopia de força atômica foi realizada.

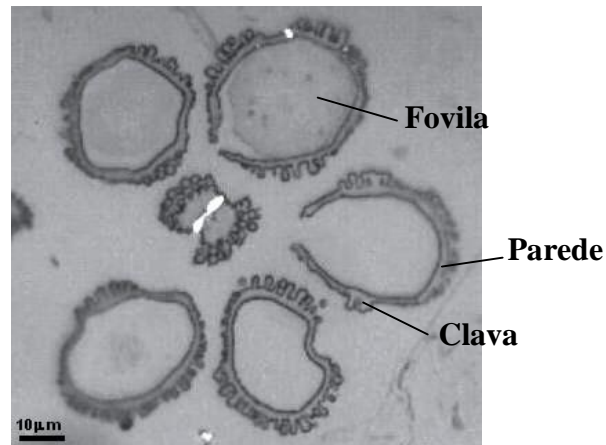


Figura 10.12. Imagem de microscopia ótica (1000x) de seções semifinas de grãos de pólen previamente tratados com  $\text{KMnO}_4$  por 24 horas. Nela aparecem indicados a parede e as clavas.

### 10.3.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As Figuras 10.13-10.16 mostram uma seqüência de imagens de AFM sobre as superfícies das seções semifinas de grãos de polens não tratados com  $\text{KMnO}_4$ , em diferentes ampliações. A parede observada é formada apenas por exina, devido a acetólise (que degrada a intina). Podemos observar na imagem sobre a clava (Fig.10.16) que nenhum detalhe da nanoestrutura da esporopolenina é revelado, devido à ausência do ataque com  $\text{KMnO}_4$ . A clava e o restante da exina é formada por esporopolenina.

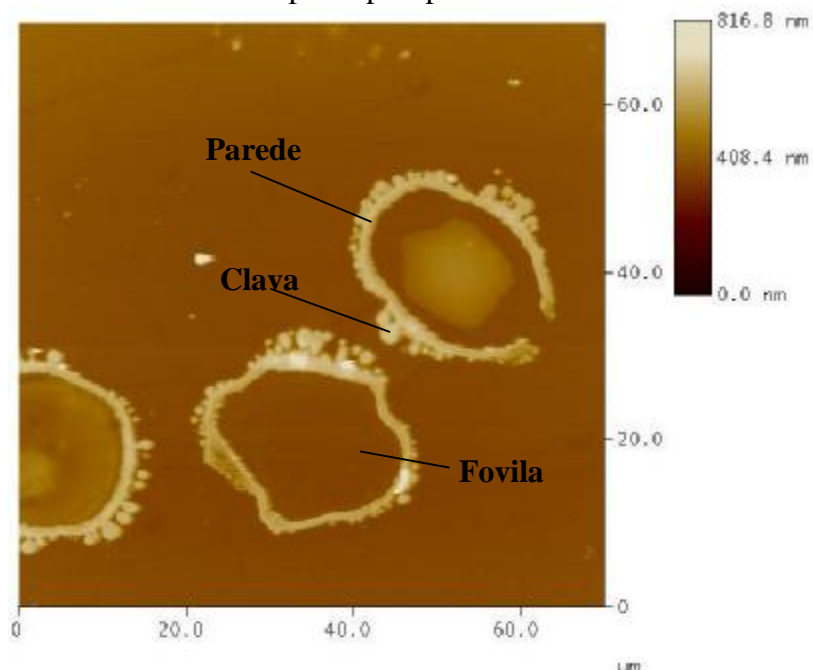


Figura 10.13. Imagem de AFM de seções semifinas de grãos de polens não tratado, em varredura de  $70 \times 70 \mu\text{m}$ . Nela está indicando a clava, a parede e a fovina retraída.

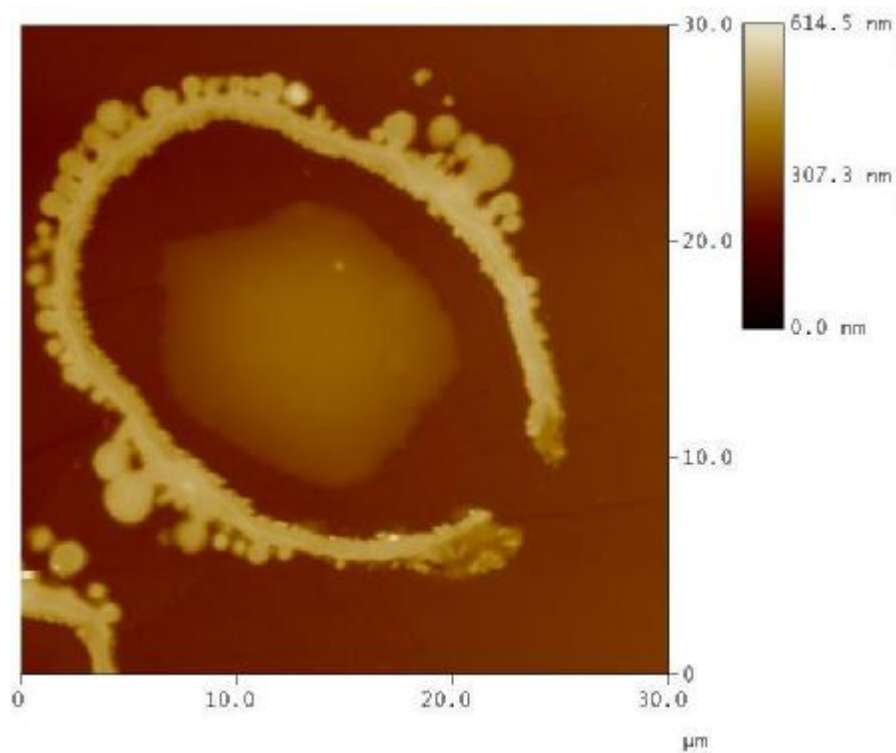


Figura 10.14. Imagem de AFM da seção semifina de um único grão de pólen, em varredura de 30 x 30  $\mu\text{m}$ .

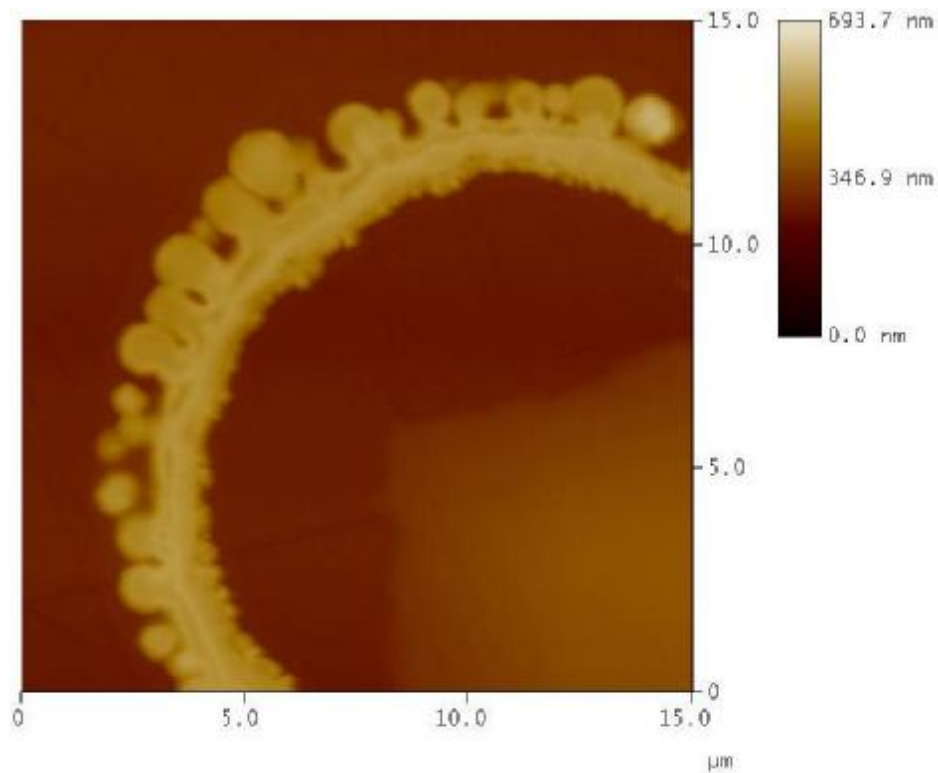


Figura 10.15. Imagem de AFM de seções semifina de um único grão de pólen, em varredura de 15 x 15  $\mu\text{m}$ . Podemos observar algumas camadas formadoras da exina, sobre a parede.

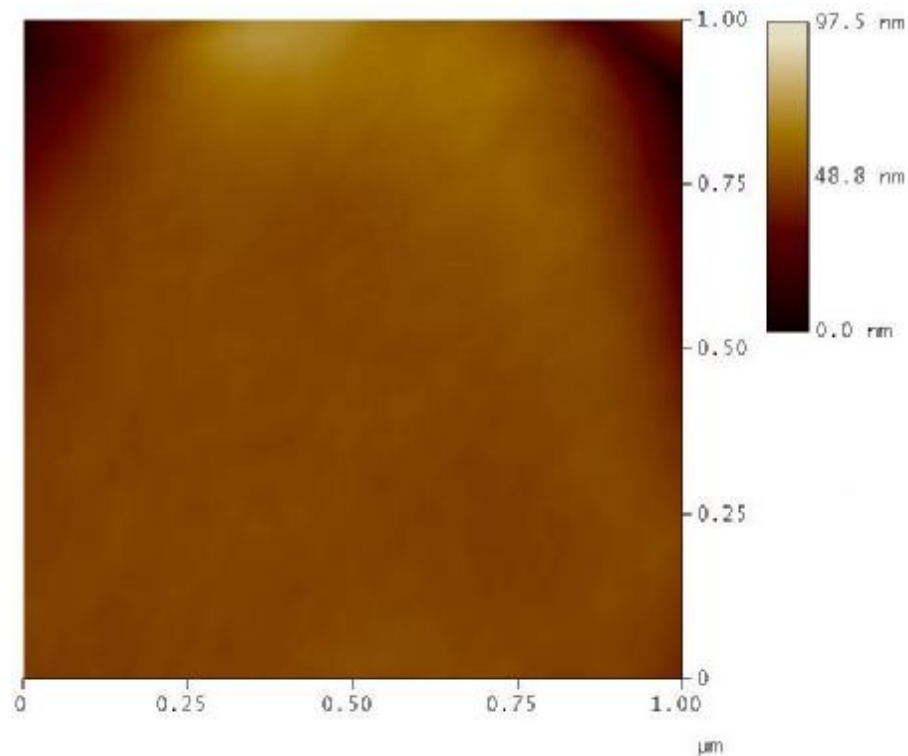


Figura 10.16. Detalhe da clava de uma seção semifina de um único grão de pólen, em varredura de 1 x 1  $\mu\text{m}$ . A superfície não revela nenhum detalhamento da nanoestrutura da exina.

As Figuras 10.17-10.22 mostram imagens de AFM sobre a superfície das seções semifinas de grãos de polens tratados quimicamente com  $\text{KMnO}_4$  por 24 horas. Podem-se perceber alterações na qualidade das imagens, devido à presença de resíduos resultantes da decomposição de partes da exina e do citoplasma. Nas Figuras 10.17-10.19 (baixas ampliações), as clavas e as paredes são distinguíveis, mas não é possível mais diferenciar os as diferentes camadas da exina. Alguma fovina ainda está presente. Nestas ampliações, nenhum detalhe da sub estrutura da superfície da exina aparece.

Entretanto, em altas ampliações (Figs.10.20-10.22), as imagens de AFM da exina tratada indicam a presença de estruturas paralelas semelhante a helicóides (algumas indicadas por setas na Fig.10.20) na clava da sexina (exina esculpida), conforme o modelo de estrutura helicoidal de Rowley (1981). Uma destas estruturas (região retangular na Fig.10.20) é ampliada sucessivamente por meio da varredura de 600 x 600 nm na Figura 10.21 e por “zoom” de software na Figura 10.22 (em três dimensões).

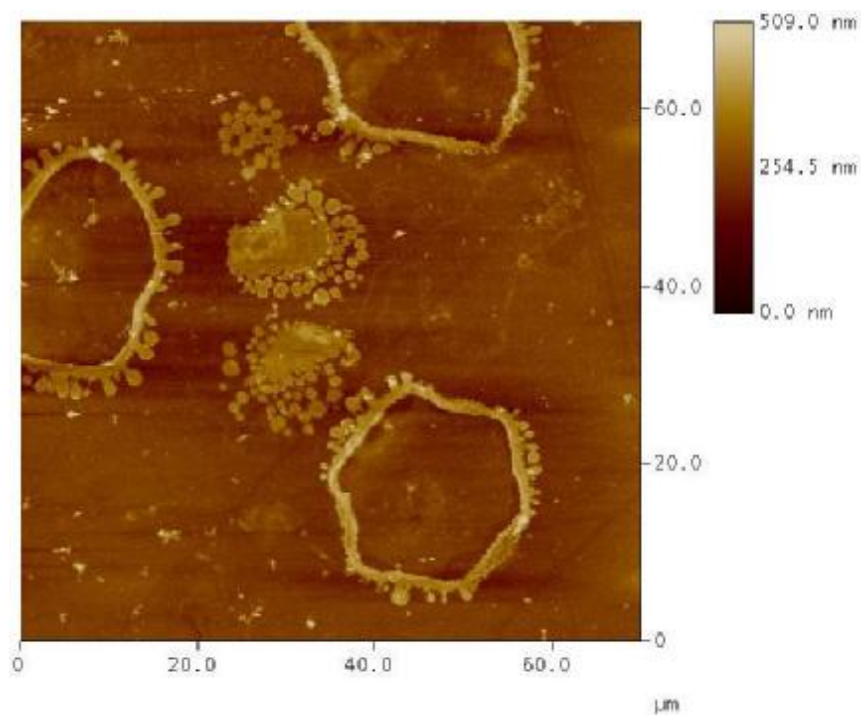


Figura 10.17. Imagem de AFM de seções semifinas de grãos de pólen tratados com  $\text{KMnO}_4$ , na varredura de  $70 \times 70 \mu\text{m}$ .

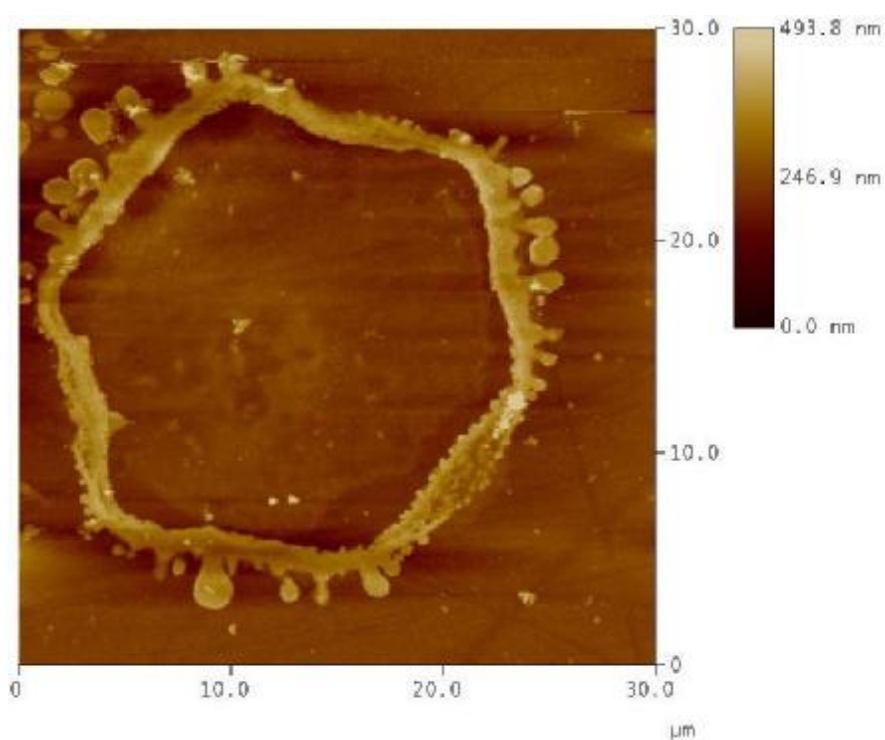


Figura 10.18. Imagem de AFM da seção semifina de um único grão de pólen tratado com  $\text{KMnO}_4$ , na varredura de  $30 \times 30 \mu\text{m}$ .



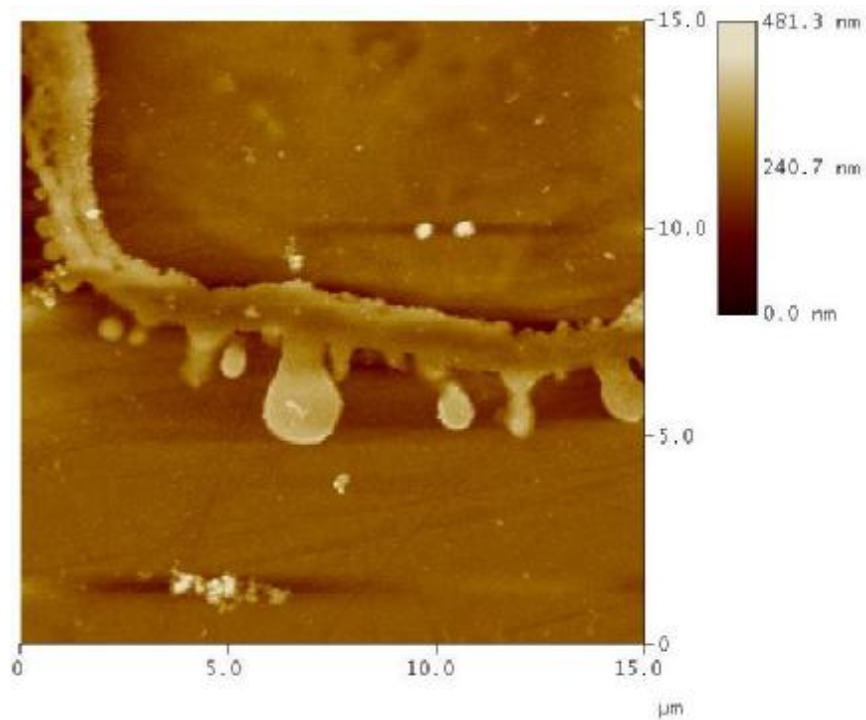


Figura 10.19. Imagem de AFM da seção semifina de um único grão de pólen tratado com  $\text{KMnO}_4$ , na varredura de  $15 \times 15 \mu\text{m}$ .

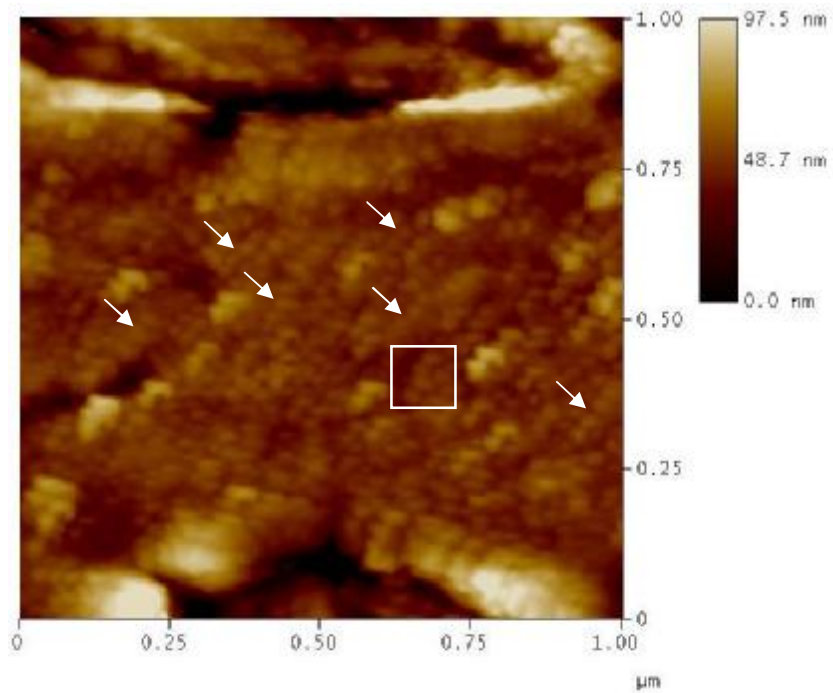


Figura 10.20. Imagem de AFM da clava de uma seção semifina de um único grão de pólen tratado com  $\text{KMnO}_4$ , na varredura de  $1 \times 1 \mu\text{m}$ . Estruturas paralelas, semelhante a helicóides, são visíveis sobre a superfície (setas). A região retangular é ampliada na Figura 10.21.



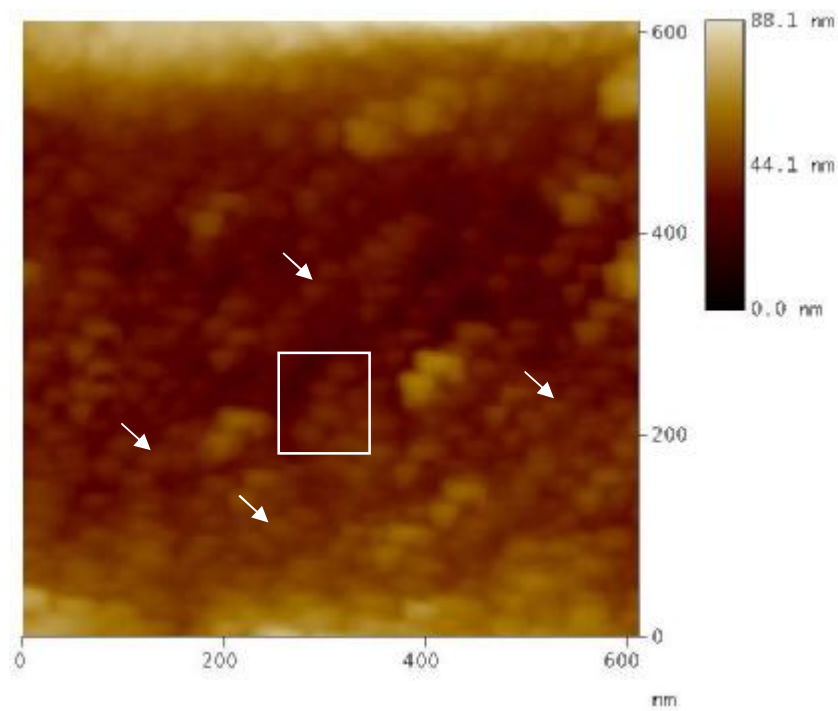


Figura 10.21. Imagem de AFM da clava de uma seção semifina de um único grão de pólen tratado com  $\text{KMnO}_4$ , na varredura de 600 x 600 nm. Observa-se com mais detalhes as estruturas helicoidais (setas). A região retangular é ampliada por “zoom” de software na Figura 10.22.

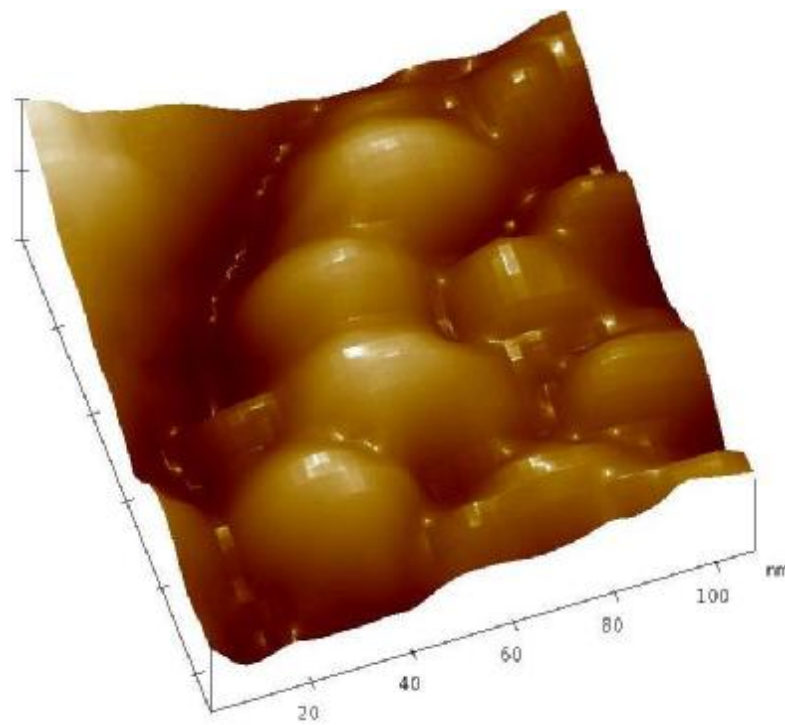


Figura 10.22. Detalhe de uma estrutura helicoidal em uma clava da seção semifina de um grão de pólen com “zoom” por software de 125 x 125 nm.

O pré-tratamento (acetólise) removeu a intina (camada de polissacarídeos da parede do pólen) e parte do citoplasma enquanto que a exina permaneceu intacta devido a sua resistência a oxidação, nos polens que sofreram apenas acetólise. O tratamento com  $\text{KMnO}_4$ , que tem sido relatado como um meio de degradar a exina e revelar detalhes de sua nanoestrutura (Gabarayeva, 2003) mostrou-se eficiente neste processo. O modelo para a nanoestrutura da esporopolenina de *Ilex paraguariensis* sugerido pelos dados experimentais obtidos é mostrado na Figura 10.23.

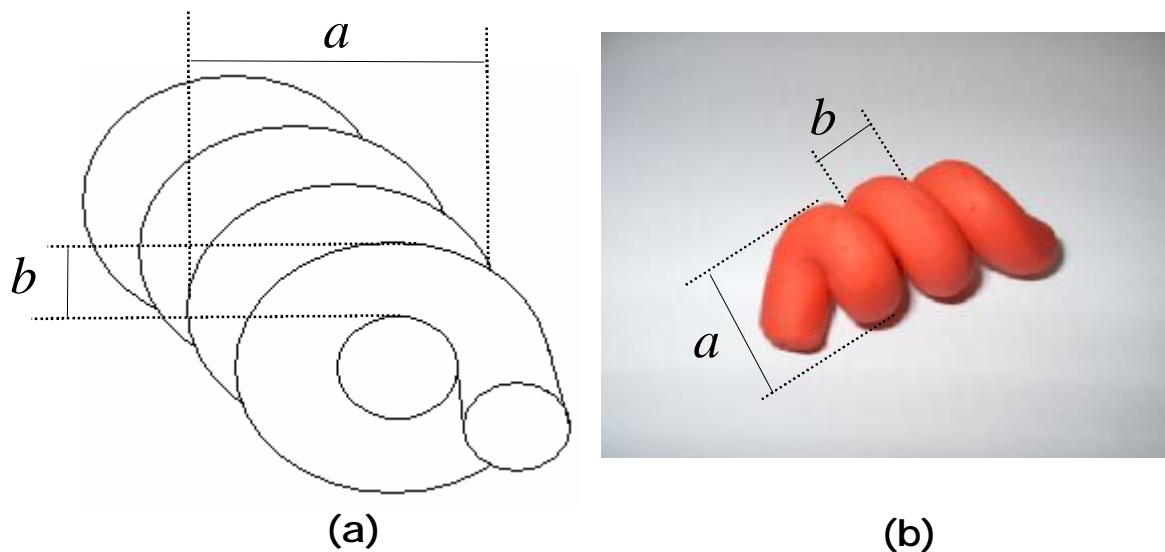


Figura 10.23. Modelo para a nanoestrutura da esporopolinina de *Ilex paraguariensis*: representação pictográfica (a) e modelo físico (b). Dois parâmetros característicos da estrutura (a e b), aparecem indicados na Figura.

#### 10.3.4 GRÁFICOS DE SEÇÃO

Foram medidos os parâmetros  $a$  (largura da helicóide) e  $b$  (espessura do braço da helicóide) (Fig. 10.23) por meio de gráficos de seção. Realizou-se duas medidas de cada parâmetro em gráficos de seção de 15 estruturas helicoidais de seções semifinas de 5 grãos de pólen tratados com  $\text{KMnO}_4$ , resultando assim, em 30 medidas de  $a$  e  $b$  por pólen (5 polens ao todo). A análise de seção foi feita sobre o “zoom” de 125 x 125 nm de imagens com varreduras de 600 x 600 nm (Figs.10.24 e 10.25).

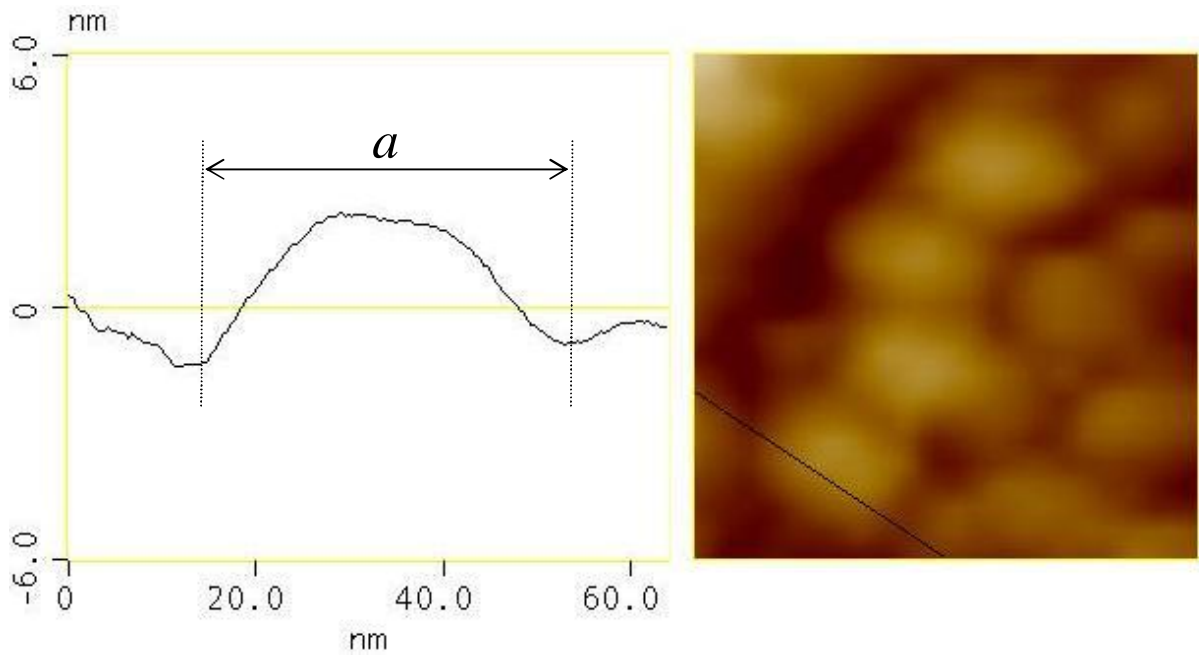


Figura 10.24. Gráficos de seção para a medida de  $a$  de uma estrutura helicoidal feito sobre o “zoom” de 125 x 125 nm de uma imagem com varredura de 600 x 600 nm.

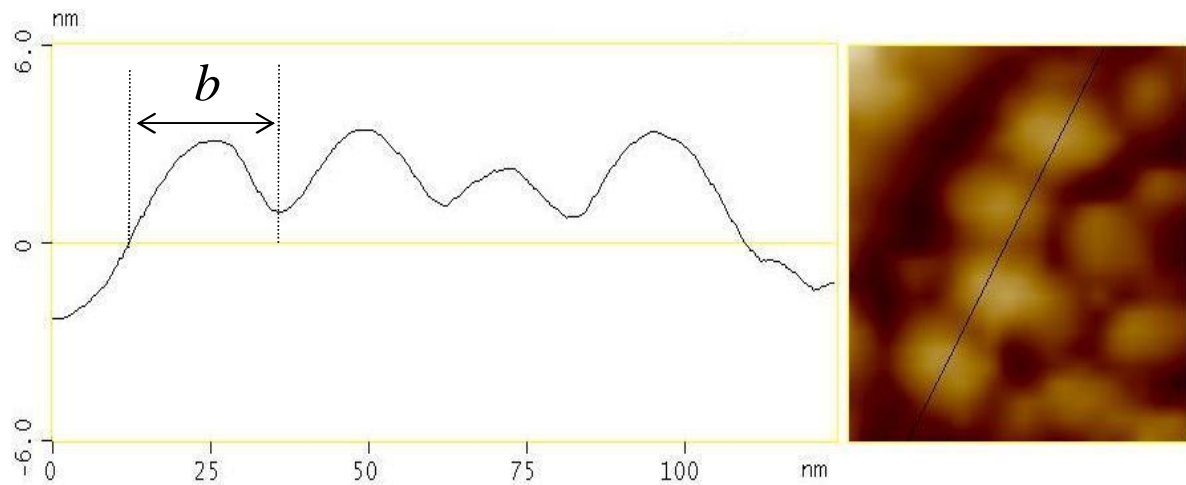


Figura 10.25. Gráficos de seção para a medida de  $b$  de uma estrutura helicoidal feito sobre o “zoom” de 125 x 125 nm de uma imagem com varredura de 600 x 600 nm.

As Figuras 10.26-10.35 mostram gráficos de distribuição de frequência dos valores de  $a$  e  $b$  para estruturas helicoidais dos 5 polens analisados (polens 1, 2, 3, 4 e 5). O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) para  $a$  e  $b$  são apresentados nas Tabelas 10.1 e 10.2. O teste de Shapiro-Wilk resultou em uma distribuição normal para os parâmetros  $a$  e  $b$  de cada um dos grupos (polens) e o teste ANOVA indicou a inexistência de diferenças significativas entre as médias destes parâmetros. Sendo assim, os valores médios de  $a$  e  $b$

considerando 150 medidas para cada parâmetro (30 medidas em 5 polens) com nível de significância ( $\alpha$ ) = 0,05 e  $t = 1,96$  foram  $a = (34,27 \pm 0,60)$  nm e  $b = (24,86 \pm 0,46)$  nm.

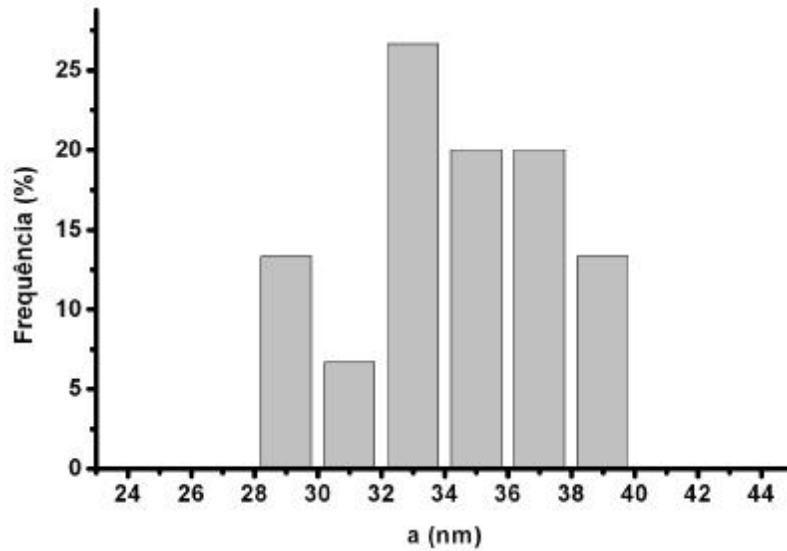


Figura 10.26. Histograma de frequência para os valores de  $a$  para a amostra de pólen 1.

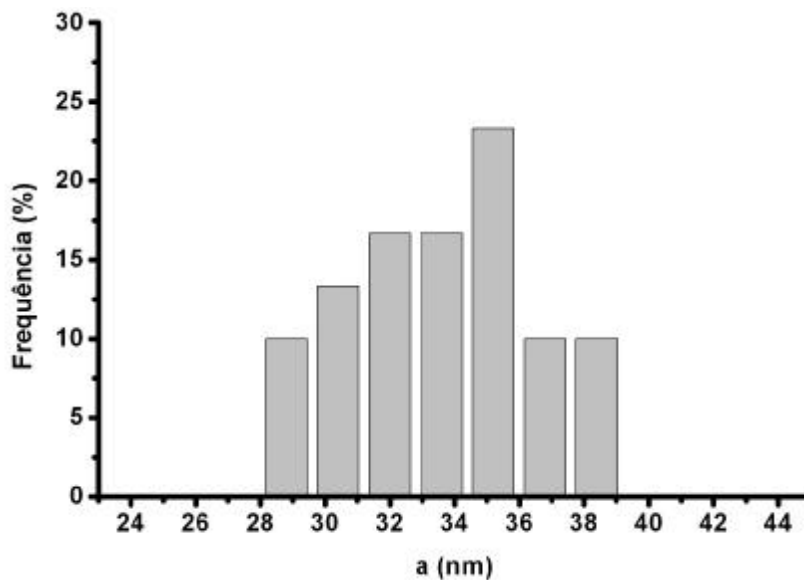


Figura 10.27. Histograma de frequência para os valores de  $a$  para a amostra de pólen 2.

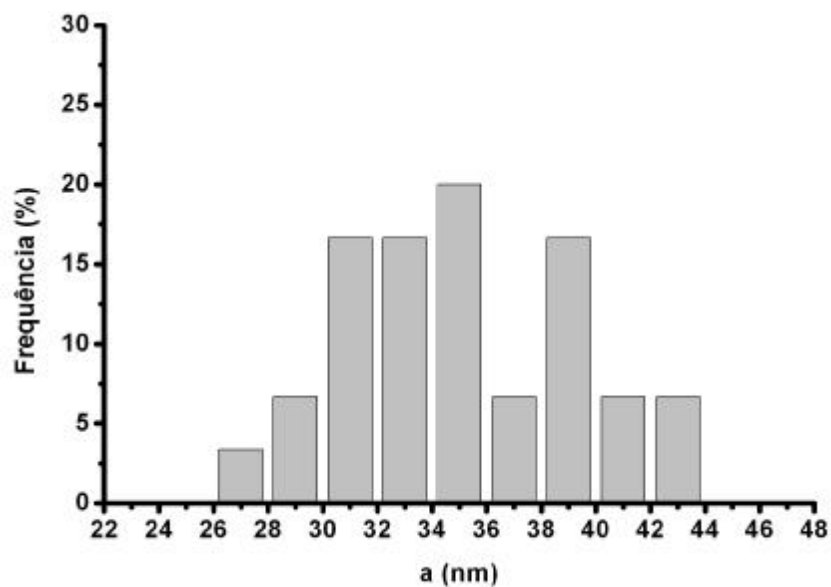


Figura 10.28. Histograma de frequência para os valores de  $a$  para a amostra de pólen 3.

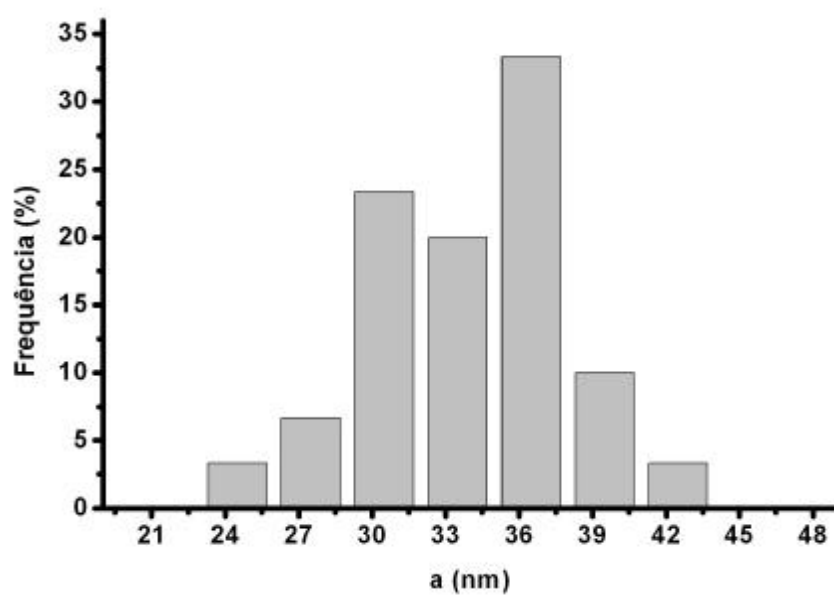


Figura 10.29. Histograma de frequência para os valores de  $a$  para a amostra de pólen 4.

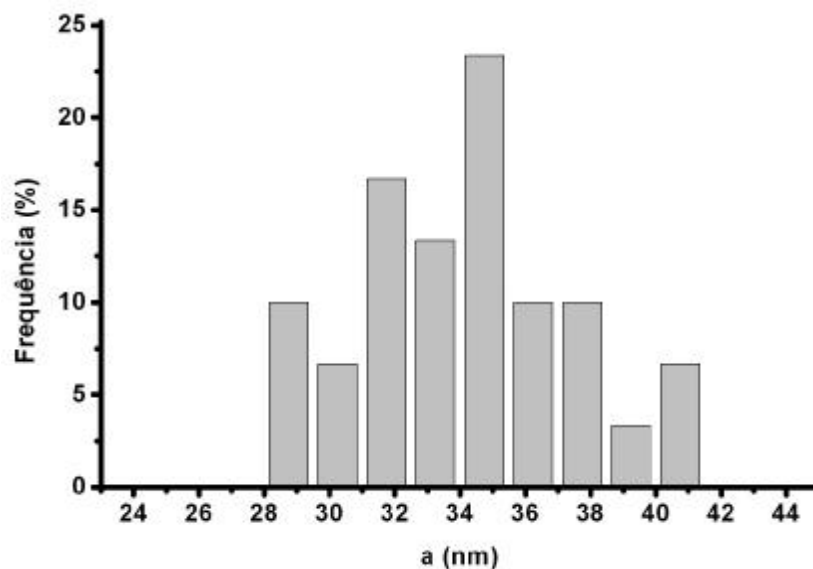


Figura 10.30. Histograma de frequência para os valores de  $a$  para a amostra de pólen 5.

Tabela 10.1. O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) de  $a$  para estruturas helicoidais presentes na superfície de grãos de pólen tratados quimicamente com  $\text{KMnO}_4$ . Nível de significância ( $\alpha$ ) = 0,05 e ( $t$ ) = 2,045).

	Pólen 1	Pólen 2	Pólen 3	Pólen 4	Pólen 5
$a$ médio	34,18	33,75	35,06	34,24	34,07
$\sigma$	3,04	2,75	4,11	4,09	3,33
$e$	1,13	1,03	1,54	1,53	1,24

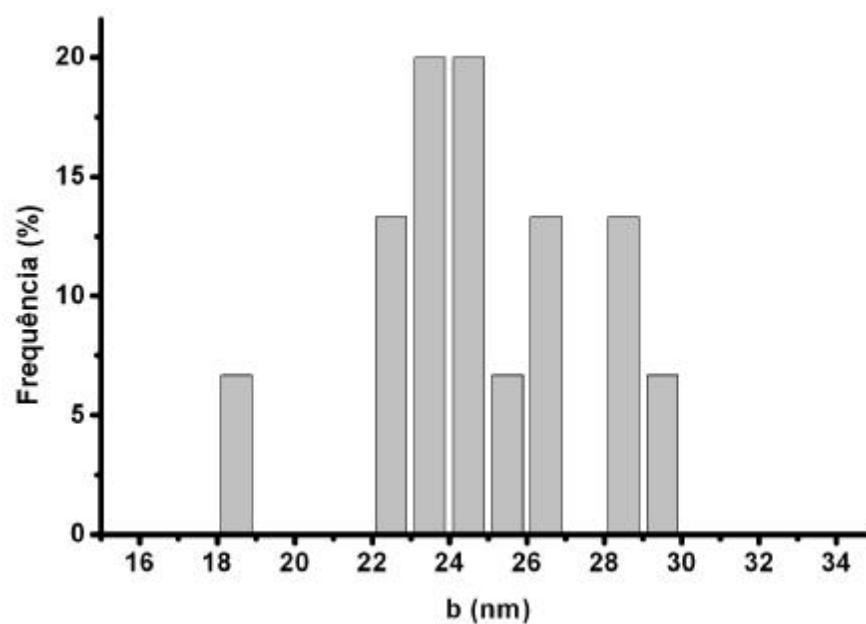


Figura 10.31. Histograma de frequência para os valores de  $b$  para a amostra de pólen 1.

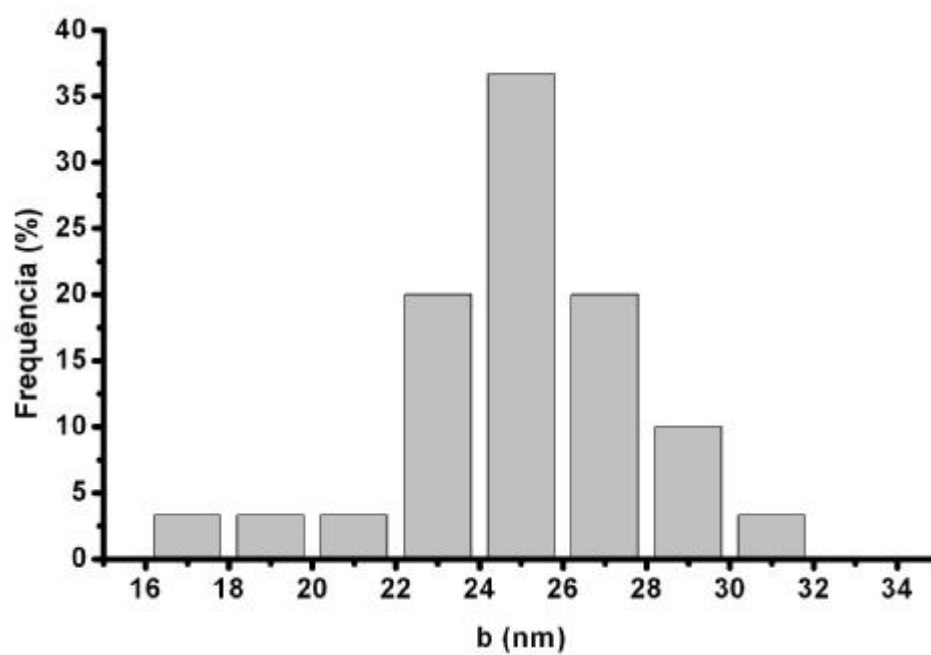


Figura 10.32. Histograma de frequência para os valores de  $b$  para a amostra de pólen 2.

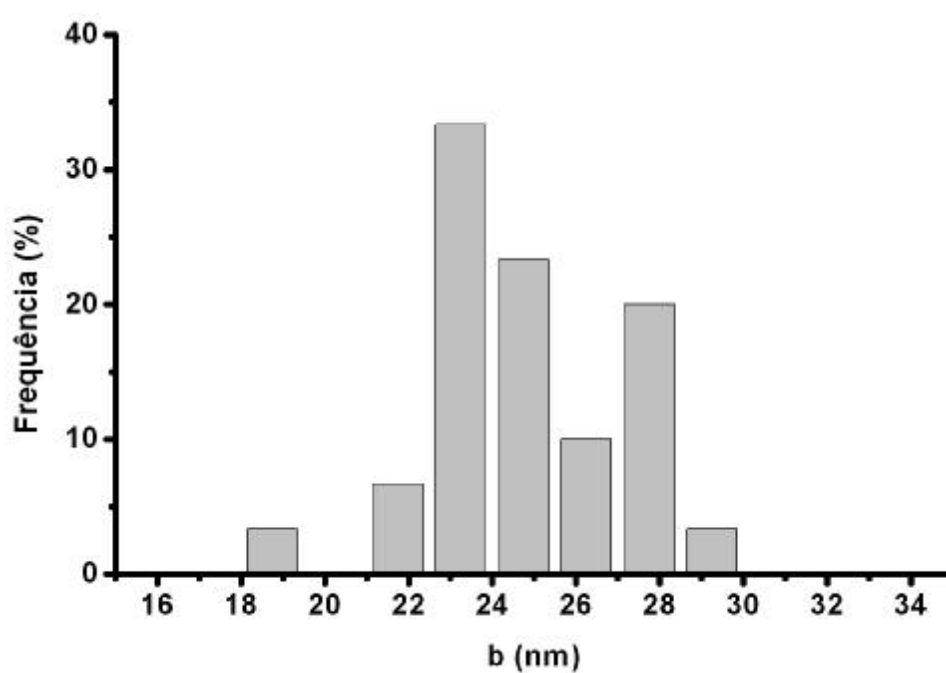


Figura 10.33. Histograma de frequência para os valores de  $b$  para a amostra de pólen 3.



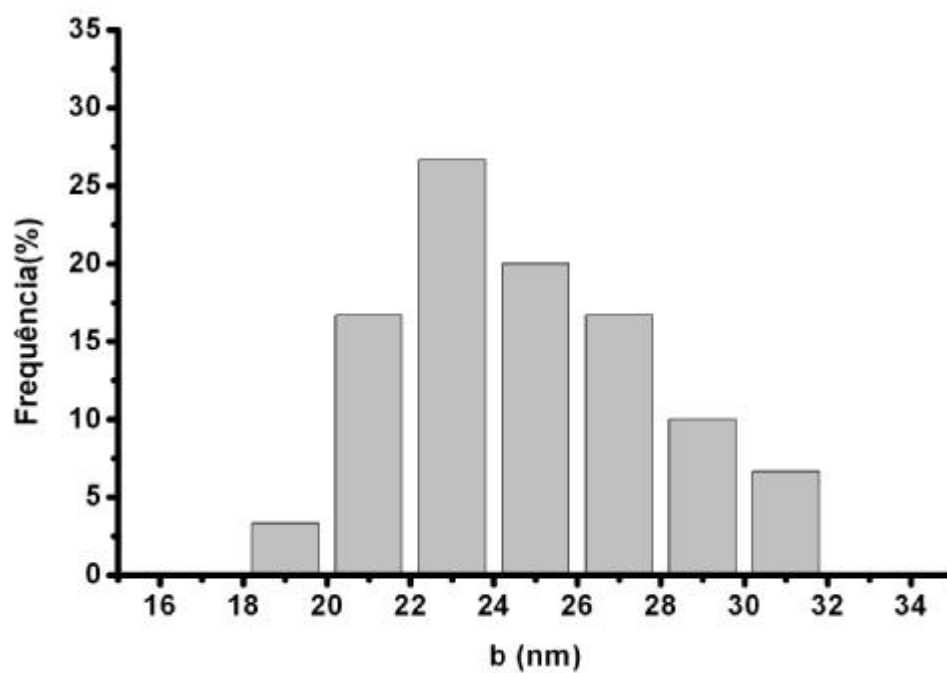


Figura 10.34. Histograma de frequência para os valores de  $b$  para a amostra de pólen 4.

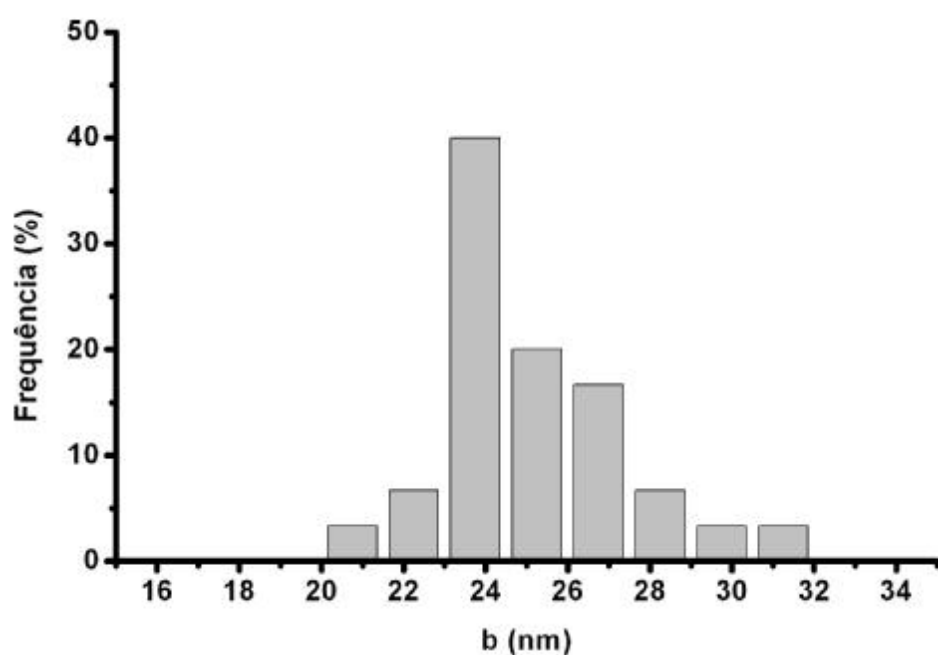


Figura 10.35. Histograma de frequência para os valores de  $b$  para a amostra de pólen 5.

Tabela 10.2. O valor médio, desvio padrão ( $\sigma$ ) e erro de estimação ( $e$ ) de  $b$  para estruturas helicoidais presentes na superfície de grãos de polens tratados quimicamente com  $\text{KMnO}_4$ . Nível de significância ( $\alpha$ ) = 0,05 e ( $t = 2,045$ ).

	Pólen 1	Pólen 2	Pólen 3	Pólen 4	Pólen 5
<b><math>b</math> médio</b>	24,83	24,92	24,77	24,73	25,03
<b><math>\sigma</math></b>	2,88	2,93	2,34	3,26	2,24
<b><math>e</math></b>	1,08	1,10	0,87	1,21	0,84

Estudos recentes da nanoestrutura da esporopolenina da exina de polens de *Cedrus* e *Metasequoia* mostraram subunidades esféricas arranjadas de forma aleatória, sem formar estruturas helicoidais paralelas (Xing, 2000). Entretanto, os resultados apresentados neste capítulo estão de acordo com o modelo da estrutura helicoidal (modelo de Rowley). É possível que exista mais de um modo de polimerização para a organização da estrutura da exina em grãos de pólen, explicando as diferenças nos resultados para diferentes espécies. Também os recentes estudos de Rowley (1981) têm mostrado que os parâmetros  $a$  (largura do helicóide) e  $b$  (largura da espira) são característicos da espécie analisada, sugerindo que o tipo de polimerização pode estar associado a fatores específicos do grupo taxonômico.

## 10.4 CONCLUSÕES

Foi utilizada a microscopia de força atômica (AFM) para estudar a nanoestrutura da exina de *Ilex paraguariensis*. As imagens revelaram estruturas paralelas supostamente helicoidais, com parâmetros métricos  $a$  (largura da helicóide) e  $b$  (espessura do braço da helicóide) característicos. Estes resultados concordam com o modelo da estrutura helicoidal de Rowley (1981), e que os parâmetros  $a$  e  $b$  podem ser característicos da espécie. Novos experimentos deverão ser realizados, aumentando o tempo de ataque químico e a resolução das análises por AFM (scanner de maior resolução e sondas com raio menor que 15 nm) para visualizar, mais detalhadamente, a estrutura das unidades helicoidais. Também outras espécies deverão ser analisadas, visando a comparação dos parâmetros  $a$  e  $b$ .

Este trabalho resultou no artigo publicado em 2005 (Anexo A.1): R. P. Santos, L. M. Rebelo, E. F. Costa, A. A. X. Santiago, V. N. Freire, J.A.K. Freire, G.A. Farias, T. M. Oliveira, G. A. Bezerra, and B. S. Cavada. Sporopollenin Nanostructure of *Ilex paraguariensis* A.St.Hil Pollen Grains. **Microsc Microanal** 11 (supp 3) (2005).

## COLABORADORES

A.A. X. SANTIAGO <sup>a</sup>, C. A. A. GADELHA <sup>b</sup>, J. B. CAJAZEIRAS <sup>c</sup>, B. S. CAVADA <sup>c</sup>, T. M. OLIVEIRA <sup>c</sup>, G. A. BEZERRA <sup>c</sup>, RINALDO. P. SANTOS <sup>e</sup>, J.A.K. Freire <sup>a</sup>, L. M. Rebelo <sup>a</sup>, E. F. Costa <sup>a</sup>, V. N. FREIRE <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus Castelo Branco, 58059-000, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, 60455-900, Brasil.

<sup>e</sup> Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9500, Avenida Bento Gonçalves, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, L. R., Araújo, A. A., Bastos, E., Neto, J. L. S. (1999). Aplicação da Computação na Identificação de Pólen em Produtos Apícolas. Minas Gerais: UFMG.
- Appenzato-da-Gloria, B., Carmelo-Guerreiro, S. M. (eds). (2003). Anatomia vegetal. Viçosa: UFV.
- Claugher, D. (1986). Scanning Electron Microscopy, 1, 291.
- Eames, A. J. (1961). Morphology of the Angiosperms. New York: McGraw-Hill Book Co.
- Erdtman, G. (1960). Svensk Botanisk Tidskrift, 54, 561.
- Esaú, K. (1965). Plant Anatomy. 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons.
- Ferreira Filho, J.C. (1957). Cultura e preparo da erva-mate. Rio de Janeiro: M.A. -Serviço de Informação Agrícola.
- Ferreira, A.G., Kaspary, R., Ferreira, H.B., Rosa, L.M. (1983). Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hill. Brasil Florestal, 53, 29-33.
- Gabarayeva, N. I. (2003). Review of Paleobotany and Palynology, 124, 203.
- Lorenzi, H. (1980). Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. São Paulo: Instituto Plantarum Ltda.
- Raven, P. H., Evert, R. F., Eichorn, S. E. (2001). Biologia Vegetal. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Redondo, G., Theóphilo, R. (1997). Botânica Elementar. Fortaleza: Fundação Waldemar Alcântara.
- Rosique, I. R., Rosique, I., Chein, L. A. (1978). Fundamentos de Botânica. São Paulo, FTD.
- Rowley, J. R. (1981). Nordic Journal of Botany, 1, 357.
- Rowley, J. R. (1981). Review of Palaeobotany and Palynology, 35, 1.
- Santos, Rinaldo P., Mariath, J. E. A. (1999). Storage substances in the androgametogenesis and mature pollen grain of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). Revta. Brasil. Bot., 22, 125-131.
- Schultz, A. Introdução a Botânica Sistemática – Volume 2. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS.
- Scott, R. J. (1994). Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction. England: Cambridge University Press.
- Spurr, A. R. (1969). Journal of Ultrastructure Research, 26, 31.

- 
- Takeda, I. J. M., Farago, P. V., Souza, M. K. F., Gelinski, V. V. (2000). The Pollen catalogue of the park of Vilha Velha, Paraná. *Biological and Health Sciences*, 6, 61-73.
- Vidal, M. R. R., Vidal, W. N. *Botânica- Organografia*. 4.ed. Viçosa: UFV, 2000.
- Wittborn, J. (1998). *Annals of Botany*, 82, 141.
- [WWW.herbario.com.br](http://WWW.herbario.com.br), 2006.
- [WWW.illustratedgardem.org](http://WWW.illustratedgardem.org), 2006.
- [WWW.pt.Wikipedia.org](http://WWW.pt.Wikipedia.org), 2006.
- Xing, S. (2000). *Chinese Science Bulletin*, 45, 1500.

---

---

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

---

Esta tese apresentou os resultados de pesquisas envolvendo a transformação, caracterização e o aproveitamento de resíduos bem como a utilização da microscopia de força atômica (AFM) no estudo da topografia de superfícies de algumas estruturas biológicas.

Três resíduos foram estudados: o bagaço do pedúnculo de caju da agroindústria cajueira do Estado do Ceará; as cinzas volantes originadas da queima de carvão mineral para a geração de energia elétrica da termelétrica Presidente Médici do Estado do Rio Grande do Sul e conchas de mexilhão *Perna perna* da indústria pesqueira do Estado de Santa Catarina. Estes três resíduos se destacam pela sua elevada produção, perigo potencial ao meio ambiente e associação a diferentes atividades econômicas importantes nos estados citados.

O bagaço do pedúnculo de caju, depois de queimado, transformou-se predominantemente nos seguintes compostos inorgânicos:  $\text{KHCO}_3$  (54,17%),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (34,08%) e  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10,06%). A presença destes compostos transformou este resíduo agroindustrial em uma promissora fonte não perecível de potássio, enxofre, fósforo e magnésio em fertilizantes e na ração animal, além das diversas aplicações abrangidas pelo bicarbonato de potássio. Devido ao elevado conteúdo de carbono do bagaço, novas pesquisas estão sendo realizadas através do tratamento térmico em atmosfera inerte (pirólise ou carbonização), para a síntese de carvão ativado.

As cinzas volantes de carvão mineral demonstraram-se uma excelente matéria-prima para a preparação de suportes cerâmicos de baixo custo para serem utilizados na imobilização da enzima invertase, proporcionando um elevado rendimento no processo de produção de açúcar invertido. Reatores para a inversão da sacarose, tendo como substratos estas cerâmicas, já estão sendo construídos, em parceria com a indústria e com os laboratórios de Ciência e Tecnologia de Materiais (LCTM-UFC), Keizo Assami (LIKA) e de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab).

As conchas de mexilhão *Perna perna*, quando submetidas a um tratamento térmico, apresentaram estabilidade na composição da matriz orgânica com aumento da microdureza até a temperatura de 300°C. Acima desta temperatura, a matriz orgânica sofreu modificações composicionais, mecânicas e topográficas. Somente em torno de 600°C, ocorre

a completa decomposição da matriz orgânica. Também pode ser observada a transformação da aragonita em calcita, iniciando-se em torno de 350°C e finalizando acima de 400°C. O estudo do comportamento térmico e mecânico da superfície perolada é importante, pois estes materiais têm aplicações em implantes e na regeneração óssea, onde processos de esterilização são necessários. A matriz orgânica da concha do mexilhão *Perna perna* só sofreu alterações significativas (composicionais, estruturais e mecânicas) acima de 300°C sendo destruída somente em temperaturas acima de 500°C (em contraste com a matriz óssea), facilitando os processos de esterilização e conseqüentemente seu uso em implantes. Além disto, verificou-se a predominância do nácar sobre a camada prismática nas conchas do mexilhão *Perna perna*, sendo este um resultado muito importante para a valorização deste resíduo, visto que o nácar é a camada de maior interesse nos processos de regeneração óssea e implantes. As propriedades óticas e eletrônicas do nácar também estão em fase final de investigação, com resultados promissores na aplicação de dispositivos optoeletrônicos.

Na utilização da microscopia eletrônica em materiais biológicos, dois estudos foram feitos: as alterações topográficas da superfície de biofilmes de *Enterococcus faecalis* durante seu desenvolvimento e a nanoestrutura da exina de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis*.

Foi mostrado que a microscopia de força atômica é uma poderosa técnica não destrutiva para o estudo qualitativo e quantitativo da evolução da superfície de um biofilme, possibilitando diferenciar seus estágios de desenvolvimento e estruturas topográficas. Este fato abre perspectivas para o estudo dos efeitos de agentes antibacterianos na topografia do biofilme, fornecendo importantes informações para o tratamento deste tipo de infecção.

Análises por AFM da nanoestrutura da exina dos grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* revelaram estruturas paralelas supostamente helicoidais, com parâmetros métricos *a* (largura da helicóide) e *b* (espessura do braço da helicóide) característicos dos pólenes analisados. Novos experimentos deverão ser realizados, aumentando-se o tempo de ataque químico e a resolução das análises por AFM (scanner de maior resolução e sondas com raio menor que 15 nm) para visualizar, mais detalhadamente, a estrutura das unidades helicoidais. Também outras espécies deverão ser analisadas para comparação taxonômica.

Novos resíduos estão sendo estudados pelo LCTM-UFC e seus colaboradores, tais como: Mesocarpo do coco, bagaço da cana-de-açúcar, resíduos da parbolização do arroz, cinzas resultantes da incineração do lixo hospitalar, etc...A lista cresce a cada reunião (formal e informal) de nosso grupo de pesquisa e colaboradores. É surpreendente o fato de que ainda faltam pesquisas mais detalhadas sobre a caracterização dos resíduos oriundos de processos



agroindustriais, domésticos e hospitalares, fundamentais no desenvolvimento de uma ciência e engenharia de materiais voltadas ao aproveitamento destes resíduos. Isto limita as opções para a sua reciclagem, já que o desempenho de qualquer material passa pelo conhecimento de suas propriedades, associadas diretamente com sua estrutura e processamento. Processamento, estrutura, propriedades e desempenho são quatro componentes básicos da ciência e engenharia de materiais. Sem isto, como aumentar o valor agregado do que não se conhece?

Também crescem os trabalhos com microscopia de força atômica em materiais biológicos. Estudos como a ação de medicamentos na parede celular, crescimento de fungos, resolução da estrutura de cristais de proteínas, interação lectina/açúcar, efeito de doenças sobre tecidos e células, nanoestrutura de compostos orgânicos, estudo conformacional de polissacarídeos, espectroscopia de força em macromoléculas, etc. são algumas das pesquisas em pleno andamento. Como diz o Prof. Benildo Cavada, “o céu é o limite” ou ainda meu orientador, Prof. Valder Freire, “podemos tirar muito leite”.

De uma forma geral, esta tese mostrou mais do que o aproveitamento de resíduos e a utilização da microscopia de força atômica em materiais biológicos. Mostrou a importância da interdisciplinaridade por meio da interação com laboratórios e especialistas de diversas áreas do conhecimento. De simples conversas na “mesa de um bar”, encontros em congressos ou até mesmo no saguão de um aeroporto podem nascer grandes parcerias. Foi o que aconteceu com muitos dos trabalhos apresentados aqui. E destas interações, laboratórios foram construídos e grupos de pesquisas consolidados. E assim a ciência deve caminhar. Ela é uma só. Divisões acadêmicas como Física, Química, Matemática, Medicina, Biologia, etc. foram criadas pelo ser humano. O conhecimento não reconhece essas divisões e lamenta a formação de “tribos” que muitas vezes criam barreiras ao desenvolvimento em todos os níveis.

Segundo alguns filósofos da ciência, existem cinco concepções de desenvolvimento: econômica, biológica, cultural, política e integral. A concepção biológica está associada a uma melhoria das condições que procuram satisfazer as necessidades básicas do ser humano (saúde, alimentação, moradia, etc.). Na concepção econômica, temos o desenvolvimento identificado com o crescimento econômico. Na política, o desenvolvimento está associado ao crescimento dos direitos políticos e humanos. A concepção cultural considera o desenvolvimento como uma consequência de atividades relacionadas às áreas da cultura e educação.

A sociedade não é um sistema estático. Não podemos isolar suas variáveis políticas, culturais, econômicas ou biológicas, construindo um sistema com grau de resposta

dependente unicamente de uma destas variáveis. Por exemplo, não podemos esperar que a liberdade política, propiciada pelo voto, seja utilizada de uma forma efetiva em uma coletividade com um nível cultural precário, que por sua vez influencia e é influenciada pela política econômica e social. Ou seja, temos um sistema não linear, realimentado, que apresenta sensibilidade as condições de suas variáveis sociais. Na verdade, os aspectos políticos, econômicos, biológicos e culturais estão interligados, formando uma rede de interações. Desta forma, o grau de desenvolvimento não pode ser avaliado sob qualquer uma destas concepções isoladamente. Ao invés disto se procurarmos promover o desenvolvimento simultâneo destes aspectos estaremos mais próximos de um desenvolvimento real, pleno. Assim, chegamos na concepção integral de desenvolvimento. Nesta, as variáveis que interagem no sistema social são vistas de uma forma global, tendo igual importância na resposta do meio (desenvolvimento ou subdesenvolvimento).

Então, qual o papel da ciência no desenvolvimento? Assim como a arte e a religião, a ciência entra como uma das ferramentas para o desenvolvimento. Entretanto, a ciência encontrou a possibilidade de uma abordagem mais eficaz da realidade uma vez que permite uma maior previsibilidade dos fenômenos e, com isto, maior poder para provocar transformações na natureza. Aliada a tecnologia, que é a técnica aprimorada pelo saber científico, conseguiu alterar nossas vidas com grande velocidade a partir do século 20. O poder da ciência e da tecnologia provocou maravilhas jamais sonhadas pelos nossos antepassados. Contudo, este poder é ambíguo, pois também tem levado o homem a uma sociedade voltada ao consumo e o nosso planeta, a um destino nada animador. O que então está errado com a ciência? O erro está na sua concepção. A ciência deve ter uma concepção integral, onde cada parte contribui igualmente para a visão geral do todo. Uma área não é mais importante que outra. Um grupo não é, em tese, melhor que outro. Nada de “tribos”. No desenvolvimento integral só há lugar para uma ciência integral. Isto deveria ser ainda mais evidente no meio público acadêmico, onde as verbas para o investimento em pesquisa originam-se do Estado e, conseqüentemente, do povo. E a ele devemos satisfação.

O que foi descrito nesta tese representa apenas uma parte de todo o trabalho que foi realizado durante meu período de pós-graduação. Não tenho a pretensão de que este texto sirva como um “caminho das pedras”, mas espero que o material contido aqui possa servir como uma orientação principalmente aos estudantes de iniciação científica, que representam o futuro de nossa pós-graduação. Como esta tese nasceu de questionamentos, a estes estudantes dou um conselho: questionem seus professores e seus orientadores. Nem sempre eles estão certos. Não sejam meros espectadores do mundo ao seu redor. Como disse David Copperfield

em David Copperfield de Charles Dickens: "Serei eu o herói de minha própria história ou alguém me substituirá?". Portanto, sejam vocês os heróis das suas próprias histórias.



# ANEXOS

---

**A.1 SPOROPOLLENIN NANOSTRUCTURE OF ILEX PARAGUARIENSIS A.ST.HIL POLLEN GRAINS (2005)****Periódico: Microscopy and Microanalysis 11 (supp 3), 2005****Sporopollenin Nanostructure of *Ilex paraguariensis* A.St.Hil Pollen Grains**

R. P. Santos\*, R. P. Santos\*\*, L. M. Rebelo\*, E. F. Costa\*, A. A. X. Santiago\*, V. N. Freire\*, J. A. K. Freire\*, G.A. Farias\*, T. M. Oliveira\*\*\*, G. A. Bezerra\*\*\*, and B. S. Cavada\*\*\*

\*Laboratório de Microscopia Atômica, Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, C. P. 6030, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, 60455-900, Brasil. e-mail: erivelton@fisica.ufc.br

\*\*Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brasil.

\*\*\*Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL), Universidade Federal do Ceará, C. P. 6020, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, 60455-900, Brasil.

Keywords: atomic force microscopy, sporopollenin, nanostructure, exine, pollen grains, *Ilex paraguariensis*

Pollens appear like a fine to coarse powder that is liberated by the microsporangia of Gymnosperms and Angiosperms. The pollen grain wall, the sporoderm, envelopes the microgametophytes (male gametophytes), which produce the male gametes of seed plants. Pollen grains are interesting from the material science point of view since the native polymer, the sporopollenin, found in the sporoderm outer layer (exine), is one of the toughest known materials which is degraded by oxidation but is resistant to reduction. This property permits the sporopollenin persistence as an unaltered polymer in sediments of great age, e.g the Ordovician period, 400 million years ago. Sporopollenin is a mixture of fatty acids, phenyl-derivatives as *p*-coumaric acid, and carotenes [1]. Its nanostructure is not yet completely revealed. Therefore, more studies must be performed. A number of models have been proposed for the sporopollenin nanostructure of spores and pollen grains [2]. Rowley *et al.* [3-4] interpret exine structure as being formed by helical subunits, based on transmission and scanning electron microscope (TEM and SEM) studies. The atomic force microscopy (AFM) is the ideal method to study the sporopollenin nanostructure [5] since the arrangement of components is not visualized easily through other microscope techniques (e.g. TEM and SEM). In the present work, we used AFM to study the sporopollenin nanostructure of the *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. exine, an Angiosperm (Aquifoliaceae).

## **A.2 EVALUATION OF RED BLOOD CELLS OF HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME (2005)**

**Periódico: Microscopy and Microanalysis 11 (supp 3), 2005**

### **Evaluation of Red Blood Cells of Healthy Subjects and Patients with Myelodysplastic Syndrome**

E. F. Costa\*, S. M. M. Magalhães\*\*, M. S. Pitombeira\*\*, J. A. K. Freire\*, V. N. Freire\*, M. S. F. Barreto\*\*, L. M. Rebelo\*, R. P. Santos\*, and G. A. Farias\*

\*Laboratório de Microscopia Atômica, Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, C. P. 1 6030, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, 60455-970, Brasil. e-mail: erivelton@fisica.ufc.br

\*\*Unidade de Hematologia, Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Campus do Porangabussu, Fortaleza, Ceará, 60435-160, Brasil.

**Keywords:** AFM, red blood cells, MDS, erythrocyte, membrane, hematopoiesis, holes

Atomic Force Microscopy (AFM) is a recent technique that allows evaluation of features in biological systems that could not be previously observed by other instruments. Red Blood Cells (RBC) have been extensively studied because of their relatively simple membrane structure, convenience of preparation and scanning [1]. As an ancillary way of confirming diagnoses, AFM has mostly been used to determine shape and size of RBCs, which are important indicators of some blood diseases or disordered erythropoiesis [2]. In Myelodysplastic Syndrome (MDS) hematopoiesis is inefficient with consequent anemia that may evolve to acute leukemia. Genomic alterations lead to structural defects in the biomolecular network that forms the erythrocyte membrane. The deformation capability of the cells and their lifetime in circulation are diminished [5]. AFM allows us to observe in a controlled way the response of these membrane molecular networks under physical and chemical stimuli in many different physiological conditions, such as in air and liquids [6]. Using this technique, many new characteristics have been found in erythrocyte membranes that are still of undetermined significance [3,4]. The aim of our work is to compare membrane morphology of two groups of blood donors, that is, healthy subjects and patients with MDS. The images yielded by AFM confirm the structure of the erythrocytes and reveal interesting submicron features on the cell, suggesting a way to distinguish between RBCs from healthy donors and RBCs from patients with MDS.

### **A.3 PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE CASHEW (ANACARDIUM OCCIDENTALE L.) PEDUNCLE BAGASSE ASHES (2007)**

Periódico: **Journal of Food Engineering 79 (2007) 1432-1437**



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Food Engineering 79 (2007) 1432–1437

JOURNAL OF  
FOOD  
ENGINEERING[www.elsevier.com/locate/jfoodeng](http://www.elsevier.com/locate/jfoodeng)

## Production and characterization of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse ashes

Ricardo P. Santos<sup>a,\*</sup>, A.A.X. Santiago<sup>a</sup>, C.A.A. Gadelha<sup>b</sup>, J.B. Cajazeiras<sup>c</sup>,  
B.S. Cavada<sup>c</sup>, J.L. Martins<sup>d</sup>, T.M. Oliveira<sup>c</sup>, G.A. Bezerra<sup>c</sup>,  
Rinaldo P. Santos<sup>e</sup>, V.N. Freire<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus Castelo Branco, 58059-000 João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Química e Geociências (IQG), Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão, 96160-000 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 9500, Avenida Bento Gonçalves, 91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Received 18 November 2005; accepted 21 April 2006

Available online 11 May 2006

### Abstract

A novel method for using residues from the cashew culture is presented. This work aimed to produce and characterize the incineration ashes of the primary residue derived from the cashew's juice extraction, the peduncle bagasse. Measurements showed that these ashes represent only 3% of the incinerated material. EDX analysis indicated the presence of the following elements: C, O, P, K, Mg, S, Na, Al and Si. X-ray diffraction and thermal analyses pointed  $\text{KHCO}_3$  (54.17%),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (34.08%) and  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10.06%) as the most significant crystalline phases. These results indicate a possible use of this material as an imperishable source of potassium, sulfur, phosphorus and magnesium in fertilizers and animal ration. Moreover, it may have many applications since its most abundant component is potassium bicarbonate, compound with several uses.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Anacardium occidentale*; Cashew apple; Peduncle bagasse; Incineration ashes;  $\text{KHCO}_3$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{MgKPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

A.4 AFM AND HYDRODYNAMIC ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE SELF-ASSEMBLED 1,4-DITHIANE ON GOLD SURFACE (2007)

Periódico: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 603 (2007) 21-26



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)Journal of  
Electroanalytical  
Chemistry

Journal of Electroanalytical Chemistry 603 (2007) 21–26

[www.elsevier.com/locate/jelechem](http://www.elsevier.com/locate/jelechem)

## AFM and hydrodynamic electrochemical characterization of the self-assembled 1,4-dithiane on gold surface

Pedro de Lima-Neto <sup>a,\*</sup>, Marcelo M.V. Parente <sup>a</sup>, Ícaro S. Moreira <sup>b</sup>, Izaura C.N. Diógenes <sup>b</sup>, Oscar R. Mattos <sup>c</sup>, Oswaldo E. Barcia <sup>c</sup>, Ricardo P. Santos <sup>d</sup>, Valder N. Freire <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 940, 60455-970, Fortaleza, Ce, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 940, 60455-970, Fortaleza, Ce, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Corrosão "Prof. Manoel de Castro", PEMM/COPPE/UFRJ, C.P. 68505, 21945 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, C.P. 6030, Campus do Pici, 60455-970 Fortaleza, Ce, Brazil

Received 20 October 2006; received in revised form 19 January 2007; accepted 5 February 2007

Available online 15 February 2007

### Abstract

Polycrystalline gold electrode surface spontaneously modified by 1,4-dithiane (1,4-dt) organosulfur species was characterized by rotating disk electrode (RDE) and electrohydrodynamic impedance (EHD) using  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  as the electrochemical probe molecule. The gold(111) monocrystal surface was also modified with 1,4-dt to assess the surface morphology by atomic force microscope (AFM). The electrochemical measurements showed that the polycrystalline gold surface modified with 1,4-dt exhibits a typical behavior of a partially blocked surface and that the blocking effect increases with the increase of the immersion time in the precursor solution. The AFM image clearly shows the presence of defects on the modified surface. Even for a high immersion time (72 h) the electrode surface was not entirely blocked. The surface roughness of the Au/1,4-dt is approximately three times greater than the surface roughness of the bare-gold electrode.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** SAM; Rotating disk electrode; Electrohydrodynamic impedance; AFM

**B.1 TOPOGRAPHICAL ALTERATIONS AND ANTIMICROBIAL EFFECT OF LIPPIA SIDOIDES ESSENCIAL OIL AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS BIOFILMS (2006)**

Periódico: Journal of Ethnopharmacology

Topographical alterations and antimicrobial effect of *Lippia sidoides* essential oil against Enterococcus faecalis biofilms.

C.B.M. Carvalho<sup>1</sup>, T.T.P. Arruda<sup>1</sup>, M.A. Botelho<sup>2</sup>, B.S. Cavada<sup>3</sup>, E. H. Teixeira<sup>4</sup>, V. A. Carneiro<sup>1</sup>, V. N. Freire<sup>5</sup>, R. P. Santos<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina/Sobral, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil.

<sup>5</sup> Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

**Keywords:** AFM, essential oil; *Lippia sidoides*, topographical, biofilms

Running title: "*Lippia sidoides* essential oil Ultrastructure alterations"

## Abstract

To evaluate and compare the effects of a topical essential oil-based formulation (*Lippia sidoides*) against two strains of *Enterococcus faecalis* grown as biofilm using an atomic force microscope the study was done. The *E. faecalis* biofilms were grown at 8 days on cellulose nitrate membrane placed on agar medium. The biofilms were immersed in the *Lippia sidoides* 0,5% essential oil for 10 minutes. Sterile saline was used as a control. After the time tested aliquots of the dilution were plated on D/E agar plates and incubated in conventional atmosphere. Colony-forming units were then calculated. Biofilm topography changes were evaluated by atomic force microscopy. There was significant alteration on *Enterococcus faecalis* biofilm structure after the treatment in comparison with the control. These results demonstrated topographical alterations of *E. faecalis* 8-day biofilm and a statistically significant cells reduction after the treatment with the essential oil-based formulation of *L. sidoides*.

---

## **B.2 AGING OF ENTEROCOCCUS FAECALIS BIOFILMS: OBSERVATION OF TOPOGRAPHICAL CHANGES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY (2007)**

**Periódico: Microscopy and Microanalysis**

### **Aging of *Enterococcus faecalis* biofilms: observation of topographical changes by atomic force microscopy**

Ricardo P. Santos<sup>a,\*</sup>, Theodora T. P. Arruda<sup>b</sup>, Cibele B. M. Carvalho<sup>b</sup>, Victor A. Carneiro<sup>c</sup>, Lara Q. V. Braga<sup>c</sup>, Edson H. Teixeira<sup>d</sup>, Francisco V. S. Arruda<sup>d</sup>, Benildo S. Cavada<sup>c</sup>, Alexandre Havt<sup>c</sup>, Taianá M. de Oliveira<sup>c</sup>, Gustavo A. Bezerra<sup>c</sup>, Valder N. Freire<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>d</sup>Faculdade de Medicina/Sobral, Universidade Federal do Ceará, Av. Gerardo Rangel s/n, Campus do Derby, 62041-180 Sobral, Ceará, Brazil

---

\* Corresponding author: Tel.: +55-85-3217-1551; Fax: +55-85-4008-9450  
E-mail address: [rpsantos2000@yahoo.com](mailto:rpsantos2000@yahoo.com) (Ricardo P. Santos) or [valder@fisica.ufc.br](mailto:valder@fisica.ufc.br) (Valder N. Freire)

**ABSTRACT**

Biofilms are assemblages of microorganisms and their associated extracellular products at an interface and typically with an abiotic or biotic surface. The study of the morphology of biofilms is important because they are associated with processes of biofouling, corrosion, catalysis, pollutant transformation, dental caries, drug resistance, etc. Biofilms have been examined by atomic force microscopy (AFM), which was proven to be a potent tool to characterize, qualitatively and quantitatively, the aspects of biofilm/substratum interactions. In this work, we used AFM to investigate topographical changes during the aging process of *Enterococcus faecalis* biofilms, which were generated on sterile cellulose nitrate membrane (CNM) filters in brain heart infusion (BHI) broth agar blood plates, after 24, 36, 72, 192, and 360 h. AFM height images showed topographical changes due to biofilm aging, which were used to characterize several aspects of the bacterial surface such as the presence of extracellular polymeric substance, and the biofilm age. The mean roughness ( $R_a$ ) was shown to quantify the general topographical changes in the biofilm surface due to its aging, highlighting the technical power of AFM in the quantitative and qualitative, non-destructive study of the *Enterococcus faecalis* biofilm surface.

Keywords: AFM, biofilm, cellulose nitrate membrane, *Enterococcus faecalis*, EPS, Mean roughness, topographical behavior.



### **B.3 DEFORMATION INDUCED MARTENSITE IN AN AISI 301LN STAINLESS STEEL: CHARACTERIZATION AND INFLUENCE ON PITTING CORROSION RESISTANCE (2007)**

Periódico: **Materials Research Bulletin**

#### **Deformation induced martensite in an AISI 301LN stainless steel: characterization and influence on pitting corrosion resistance**

Abreu, H.F.G.<sup>1,\*</sup>; Carvalho, S.S.<sup>1</sup>; Lima-Neto<sup>1</sup>, P; L.<sup>1</sup>; Santos, R.P<sup>1</sup>.; Freire, V.N.<sup>1</sup>; Silva, P.O.<sup>2</sup>.  
Tavares, S.S.M.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Brazil, e-mail: [hamilton@ufc.br](mailto:hamilton@ufc.br)

<sup>2</sup>Petrobras- Lubnor – Fortaleza –CE, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal Fluminense, Brazil

#### **Abstract**

In austenitic stainless steels, plastic deformation can induce martensite formation. The induced martensite is related to the austenite ( $\gamma$ ) instability at temperatures close or below ambient temperature. The deformation process can induce the formation of two types of martensite:  $\epsilon$  and  $\alpha'$ . In this work, the deformation induced martensite was analyzed by X-ray diffraction, electron back scatter diffraction (EBSD), magnetic methods and atomic force microscope (AFM) in samples of austenitic stainless steel AISI 301LN. Results did not show the presence of  $\epsilon$  martensite. Both techniques, x-ray diffraction and ebsd, presented similar quantities for the  $\alpha'$ -martensite. Texture results indicate that the crystallographic orientation of the formed  $\alpha'$ -martensite is  $\{001\}\langle 110\rangle$  and  $\{103\}\langle 110\rangle$  and the parent austenite is  $\{hkl\}\langle 111\rangle$ . The morphology of  $\alpha'$ -martensite was analyzed by AFM. Corrosion tests showed that deformation reduces pitting corrosion resistance. All results were compared with AISI 316L stainless steel.

**Key words:** Stainless steel, induced martensite, corrosion.

**B.4 OPTICAL ABSORPTION AN ELECTRONIC BAND STRUCTURE  
FIRST-PRINCIPLES CALCULATIONS OF  $\alpha$ -GLYCINE CRYSTALS  
(2007)**

**Periódico: Physical Review B**

Optical absorption and electronic band structure  
first-principles calculations of  $\alpha$ -glycine crystals

M.Z.S. Flores, V.N. Freire, R.P. dos Santos, G.A. Farias  
*Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará,  
Caixa Postal 6030, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil*

E.W.S. Caetano  
*Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará,  
Av. 13 de Maio, 2081, Benfica, 60040-531 Fortaleza, Ceará, Brazil*

M.C.F. de Oliveira  
*Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará,  
Campus do Pici, 60451-970 Fortaleza, Ceará, Brazil*

J.R.L. Fernandez, L.M.R. Scolfaro  
*Instituto de Física, Universidade de São Paulo,  
Caixa Postal 66318, 05315-970 São Paulo, SP, Brazil*

M.J.B. Bezerra, T.M. Oliveira, G.A. Bezerra, B.S. Cavada  
*Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica Molecular,  
Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil*

H. W. Leite Alves  
*Departamento de Ciências Naturais, UFSJ,  
Caixa Postal 110, 36300-000 São João Del Rei, MG, Brazil*

(Dated: March 26, 2007)

---

## Abstract

Light absorption of  $\alpha$ -glycine crystals grown by slow evaporation at room temperature was measured, indicating a  $5.11 \pm 0.02$  eV energy band gap. Structural, electronic, and optical absorption properties of  $\alpha$ -glycine crystals were obtained by first-principles quantum mechanical calculations using density functional theory (DFT) within the generalized gradient approximation (GGA) in order to understand this result. The calculated lattice parameters, bond lengths, and Mulliken charges are in good agreement with experimental/theoretical results recently published. To take into account the contribution of core electrons, ultrasoft (USP) and norm-conserving (NC) pseudopotentials, as well as an all electron (AE) approach were considered to compute the electronic density of states and band structure of  $\alpha$ -glycine crystals. They exhibit three indirect energy band gaps and one direct  $\Gamma - \Gamma$  energy gap around 4.95 eV. The optical absorption related to transitions between the top of the valence band and the bottom of the conduction band involves O- $2p$  valence states and C,O- $2p$  conduction states, with the carboxyl group contributing significantly to the origin of the energy band gap. The calculated optical absorption is highly dependent on the polarization of the incident radiation due to the spatial arrangement of the dipolar glycine molecules; in the case of a polycrystalline sample, the first-principles calculated optical absorption is in good agreement with the measurement when a rigid energy shift is applied.

## **B.5 DETERMINATION OF THE FRACTAL DIMENSION OF LEAF VASCULAR SYSTEM SPECIES OF GENUS RELBUNIMUM (ENDL.) HOOK. F. (RUBIACEAE) (2007)**

**Periódico: Journal Theoretical Biology**

### **Determination of the fractal dimension of leaf vascular system species of genus *Relbunium* (Endl.) Hook. F. (RUBIACEAE)**

RICARDO P. SANTOS <sup>\*1</sup>, RINALDO P. SANTOS <sup>\*2</sup>, B. S. CAVADA<sup>3</sup>, J. L. MARTINS<sup>4</sup>, T. M. OLIVEIRA<sup>3</sup>, G. A. BEZERRA<sup>3</sup>, J. E. A. MARIATH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas(BIOMOL), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Química e Geociências (IQG), Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão, 96160-000, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

The fractal analysis has been used as a powerful tool to characterize the complexity of plant structures. Trees ramification, root systems and vascular process are some examples of patterns studied by this geometry. The fractal dimension quantifies the complexity of these structures. In this paper, the fractal dimension of leaf vascular system was determined in three species of genus *Relbunium* (Endl.) Hook. F.: *R. megapotamicum* (Spreng.) Ehreng., *R. hirtum* (lam.) K. Schum, and *R. hypocarpium* Hemsl. The results showed significant differences among the fractal dimension of these species: 1.387 (*R. megapotamicum*), 1.561 (*R. hirtum*) and 1.763 (*R. hypocarpium*), indicating that this parameter can to be used as taxonomic attribute to distinguish species, and as numerical expression of the venation density.

**Key words:** Biometry, fractal dimension, leaf, *Relbunium*, vascularization, venation density.

---

\* Corresponding authors. E-mail: [rpsantos2000@yahoo.com](mailto:rpsantos2000@yahoo.com) and [rinaldo.santos@ufrgs.br](mailto:rinaldo.santos@ufrgs.br)

### **C.1 IMMOBILIZATION OF INVERTASE INTO SINTERIZED COAL FLY ASHES FOR HYDROLYSIS OF SUCROSE: STABILITY, PROPERTIES AND APPLICATION IN BIOREACTORS (2007)**

Periódico: a definir

#### **Immobilization of invertase into sinterized coal fly ashes for hydrolysis of sucrose: stability, properties and application in bioreactors**

Albertini, A. V. P.<sup>1</sup>; Reis, A. L. S.<sup>1</sup>; Teles, F. R. R.<sup>1</sup>; Souza, J. C.<sup>2</sup>; Rolim Filho, J. L.<sup>2</sup>; Martins, D. B. G.<sup>1</sup>; Salinas, C. R. M.<sup>3</sup>; Nogueira, V. N.<sup>4</sup>; Santos, R. P.<sup>4</sup>; Gadelha, C. A. A.<sup>5</sup>; Martins, J. L.<sup>6</sup>; Cavada, B. S.<sup>5</sup>; Lima Filho, J.L.<sup>1</sup>

1. Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami Universidade Federal de Pernambuco.

4. Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil.

5. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza - Campus I, Departamento de Biologia Molecular, Cidade Universitária, Campus Castelo Branco, 58059000 João Pessoa, Paraíba, Brazil

6. Instituto de Química e Geociências (IQG), Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão, 96160-000 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

7. Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

Author's address E-mail: [alessandro.albertini@gmail.com](mailto:alessandro.albertini@gmail.com)

---

---

**Abstract**

Ceramics prepared with coal fly ashes added to non-porous glass beads were used as a support for immobilization of invertase. The silanization of glass was done with 2% 3-aminopropyltriethoxysilane solution in toluene, through covalent binding immobilization of the alkyl amine to glutaraldehyde and subsequent attachment of the enzyme molecule to glutaraldehyde via Schiff's base linkage. The protein amount and specific activity of the immobilized enzyme on 0.438 M sucrose (pH 5.0 at 45°C) were 1.37 mg/ 0.25g of particles and 0.67 U/mg protein (19.89 %) of that estimated for the free enzyme, respectively. The apparent  $K_m$  for immobilized invertase was approximately 10-fold lower than free enzyme. Moreover, the results in bioreactor the effect of continuous flow injection (influent, effluent and alternated) showed obtained 100% of inversion at 16h of reaction with alternated flow injection.

Key words: immobilization; invertase; coal fly ashes; ceramics; glass; bioreactors.

## **C.2 X-RAY DIFFRACTION, FOURIER TRANSFORM INFRARED, MICROHARDNESS, AND ATOMIC FORCE MICROSCOPY ANALYSES OF THE OF THE PERNA PERNA MUSSEL SHELLS THERMALLY TREATED (2007)**

**Periódico: a definir**

**X-ray diffraction, Fourier Transform Infrared, Microhardness, and Atomic Force Microscopy analyses of the of the *Perna perna* mussel shells thermally treated**

R. P. SANTOS<sup>a\*</sup>, M. L. PESSATTI<sup>b</sup>, T. L. P. PESSATTI<sup>b</sup>, J. L. MARTINS<sup>c</sup>, C. A. A. GADELHA<sup>d</sup>, J. B. CAJAZEIRAS<sup>e</sup>, B. S. CAVADA<sup>e</sup>, T. M. OLIVEIRA<sup>e</sup>, G. A. BEZERRA<sup>e</sup>, V. N. FREIRE<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>b</sup>Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Curso de Ciências Biológicas, Rua Uruguai, 458, Centro, 88302-202 Itajaí, Santa Catarina, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Química e Geociências (IQG), Universidade Federal de Pelotas, Campus do Capão do Leão, 96160-000 Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>d</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza - Campus I, Departamento de Biologia Molecular, Cidade Universitária, Campus Castelo Branco, 58059000 João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>e</sup>Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55-85-4008-9915; Fax: +55 (85) 4008-9450

E-mail address: [rpsantos2000@yahoo.com](mailto:rpsantos2000@yahoo.com) (R. P. SANTOS) or [valder@fisica.ufc.br](mailto:valder@fisica.ufc.br) (V. N. FREIRE)



---

**Abstract:** Mussel shells are extraordinarily tough natural nano-composites with crack- and shatter-resistant properties due to their complex nano-architecture, inspiring material scientists and having applications as biomaterial for implants and ceramics. They are formed by well structured calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) and aragonite ( $\text{CaCO}_3$  polymorph) platelets glued by organic matrix components. The nacre (mother pearl side) is formed of polygonal shaped aragonitic platelet layers, separated by a thin layer of biological organic adhesive. Their nanostructure can be strongly modified by heat, which acts inducing crystal structure and chemical transformations, as well as protein denaturation. In this work, we used X-ray diffraction, fourier transform infrared, microhardness, and atomic force microscopy in the study of *Perna perna* mussel shells *in natura* and thermally treated in the 100–600°C range. Analysis revealed physical and chemical changes in the shell associated to organic/inorganic phase transformations, and degradation material organic.

Key words: AFM, FT-IR, microhardness, nacre, *Perna perna* mussel shells, XRD,

# LABORATÓRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAS (LCTM)

---

---

# D

O Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais (LCTM-UFC) do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará nasceu de um sonho do Prof. Dr. Valder Nogueira Freire. Até o momento da defesa desta tese (11/04/2007), o LCTM-UFC está dividido em dois laboratórios: um de preparação de amostras e outro de caracterização de materiais.

O laboratório de preparação de amostras foi montado com a seguinte infraestrutura:

- Pia;
- Exaustor para saída de gases e ventilação do meio;
- Instalação de gases (duas linhas);
- Cilindro de N<sub>2</sub> para uso comercial;
- Dois desumidificadores;
- Uma estufa para secagem e esterilização;
- Dois fornos tipo mufla até 1200°C;
- Um forno tubular para queima em atmosfera controlada até 1200°C;
- Um forno tubular para queima em atmosfera controlada até 1800°C (a ser adquirido, já aprovado em projeto);
- Dois fornos de microondas adaptados para queima (temperatura estimada de 2000°C);
- Dois tubos (reatores) de mulita para queima em atmosfera controlada;
- Um peneirador automático (a ser adquirido, já aprovado em projeto);
- Peneiras com malhas de 22, 45 e 65 µm;
- Uma capela para exaustão de gases (a ser adquirido, já aprovado em projeto);
- Uma prensa para compactação uniaxial;
- Um moinho de bolas (a ser adquirido, já aprovado em projeto);
- Vidrarias diversas (Becker, pipeta, placa de Petri, etc...);
- Reagentes diversos;

As Figuras D.1-D.4, mostram detalhes de alguns equipamentos do laboratório de preparação de amostras.

**(a)****(b)**

Figura D.1. Prensa Sky para compactação uniaxial (a) e estufa Ícamo para secagem e esterilização de materiais (b)

**(a)****(b)**

Figura D.2. Forno tubular para queima em atmosfera controlada (a) e detalhe interno do forno tubular mostrando o tubo de alumina (b)

**(a)****(b)**

Figura D.3. Muflas para tratamento térmico em atmosfera de ar. (a) e Forno de microondas adaptado para tratamento em atmosfera de ar (b).

**(a)****(b)**

Figura D.4. Forno tubular, microondas adaptado e os elementos da linha de gases (a). Em (b), detalhe da tubulação das duas linhas da instalação de gases.

O laboratório de caracterização de materiais foi montado com a seguinte infraestrutura:

- Split de 18000 Btu's;
- Rede com 8 pontos para conexão com a Internet;
- Três microcomputadores IBM-PC para captura de dados e controle de equipamentos;
- Uma balança analítica;
- Um espectrômetro UV-VIS-IV TIDAS;
- Um medidor de área superficial e porosidade AUTOSORB-1MP;
- Um analisador térmico TGA/DTA-60 (a ser adquirido, já aprovado em projeto);
- Um microscópio ótico metalográfico Nikon LV 100D com câmera de captura de imagens.

As Figuras D.5-D.7, mostram detalhes de alguns equipamentos do laboratório de caracterização de materiais.



(a)



(b)

Figura D.5. Medidor de área superficial e porosidade AUTOSORB-1-MP (a) e balança analítica Bioprecisa (b) para a medição da massa de materiais.



(a)



(b)

Figura D.6. Espectrômetro UV-VIS-IR TIDAS para análise de sólidos e soluções (a) e microscópio óptico metalográfico LV 100D para o estudo de superfícies (b).



Figura D.7. Microcomputadores para a análise de dados e controle de equipamentos.

# O MICROSCÓPIO DE VARREDURA POR SONDA DO LMA

---

---

# E

O Laboratório de Microscopia Atômica (LMA) do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará está equipado com um microscópio de varredura por sonda MultiMode SPM Nanoscope IIIa, fabricado pela Digital Instruments Co., atualmente pertencente ao grupo Veeco Instruments Inc. Sua aquisição deve-se aos esforços do Prof. Dr. Valder Nogueira Freire, juntamente com pesquisadores associados. Este equipamento representou uma grande conquista para o grupo de semicondutores, pois permitiu a interação através de pesquisas experimentais com diferentes áreas do conhecimento (Medicina, Microbiologia, Odontologia, Bioquímica, Zoologia, Veterinária, dentre outras).

O MultiMode SPM é um microscópio de varredura por sonda capaz de realizar vários modos de análise de superfície, dentre eles:

- Contato – Mede a topografia da superfície de uma amostra através da varredura de uma sonda mantida em contato com a superfície. Opera em ar e em fluidos;
- Intermitente – Mede a topografia da superfície de uma amostra através da varredura de uma sonda que toca a superfície de forma oscilatória. Neste modo, a força de atrito entre a sonda e a superfície são eliminadas, reduzindo assim seu dano sobre amostras macias. Tipicamente usado em amostras biológicas. Opera em ar e em fluidos;
- Fase – Permite obter imagens contrastadas pelas diferenças na adesão e na viscoelasticidade da superfície;
- Não contato – Mede a topografia através das forças de Van der Waals entre a superfície e a sonda, acima da superfície;
- Microscopia de força magnética – Mede a distribuição do gradiente do campo elétrico em cima da superfície da amostra;
- Microscopia de força elétrica - Mede a distribuição do gradiente da força magnética em cima da superfície da amostra;
- LiftMode<sup>TM</sup> – É uma combinação de duas técnicas, que mede separadamente a topografia e uma outra propriedade selecionada (magnética ou elétrica);
- Modulação de força – Mede a elasticidade relativa da superfície;
- Microscopia de força lateral – Mede as forças de atrito entre a sonda e a superfície da amostra;



- Microscopia de tunelamento – Mede a topografia da superfície através da corrente de tunelamento que depende da distância de separação entre a sonda e a superfície da amostra condutora.
- Microscopia eletroquímica – Mede a estrutura da superfície e propriedades de condução de materiais imersos em soluções eletrólitas com ou sem controle de potencial.

O MultiMode SPM (Fig. E.1) consiste de um computador para o controle e análise, um vídeo para a imagem, um vídeo para o controle via programa, um controlador Nanoscope IIIa e o microscópio propriamente dito. Ele está montado sobre uma mesa pneumática, em cima e arreja, para evitar os efeitos de vibração. Também possui uma lupa com câmara digital acoplada ao microscópio, conectada a um monitor de TV, para a visualização da haste, durante sua aproximação da superfície. A lupa possui uma fonte de alimentação para iluminação episcópica.

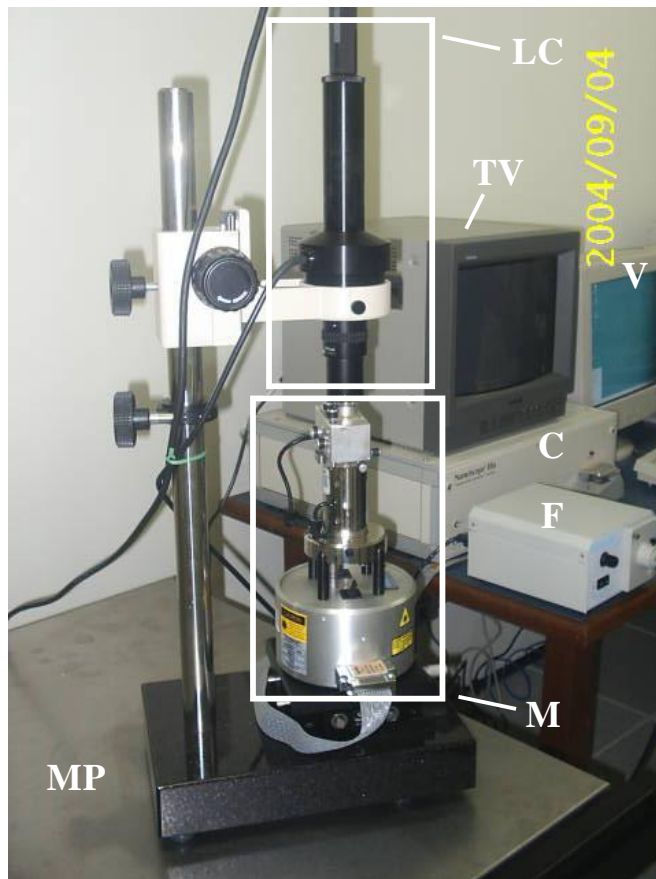


Figura E.1. O MultiMode SPM do LMA. MP = mesa pneumática; M = microscópio; LC = sistema lupa mais câmera de vídeo; TV = monitor de TV; V = vídeo de imagem; C = controlador Nanoscope IIIa; F = fonte de iluminação episcópica para a lupa.

O microscópio é a parte principal do sistema (Fig. E.2). Nele, a sonda interage com a amostra colhendo as informações sobre a topografia e outras propriedades da superfície. O microscópio é composto pelo cabeçote, scanner e a base.

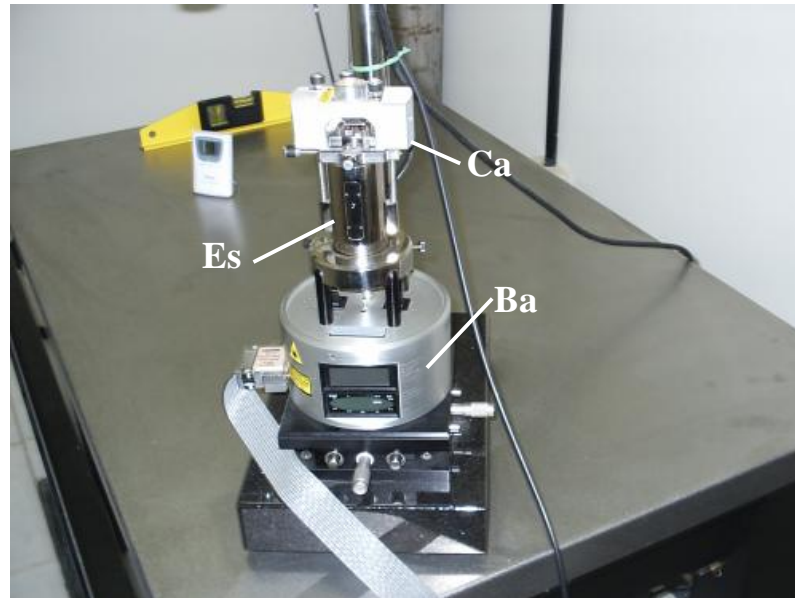


Figura E.2. O Microscópio. Ca = cabeçote; Es = scanner; Ba = base

É no cabeçote (Fig. E.3) que estão localizados o arranjo de fotodiodos, o laser e o porta sonda (tipholder) (Fig. E.4), onde a sonda é instalada. O cabeçote está fixado sobre um posicionador X-Y que facilita um posicionamento macrocópico da sonda sobre a superfície. Para que a deflexão da haste seja percebida, o feixe de um laser incide sobre a mesma, de modo que é refletido para o arranjo de fotodiodos onde a diferença de potencial gerada dá a medida desta deflexão.

A sonda (Fig. E.5) é instalada no porta sonda para permitir a colocação correta da haste com a ponta na cavidade do cabeçote, no feixe do laser. Este suporte fixa a sonda em relação ao cabeçote permitindo a operação em diferentes modos de microscopia.



Figura E.3. Detalhe do cabeçote



Figura E.4. Um dos porta sondas de AFM do SPM

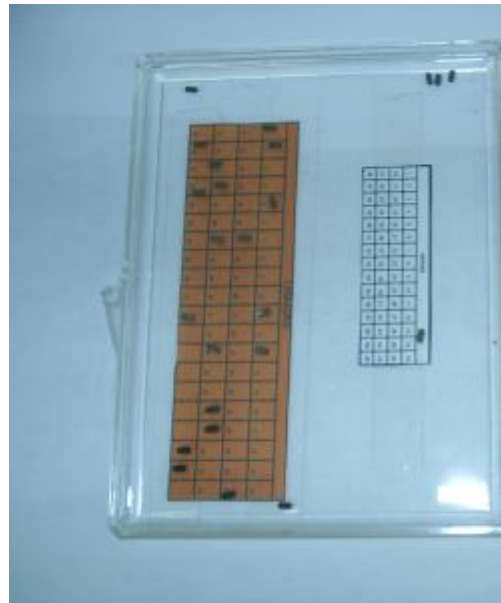


Figura E.5. Caixa com sondas para AFM no modo intermitente

O scanner é a parte responsável pela varredura da superfície. Quem se movimenta é o controlador e não a amostra. O controlador é responsável pelos movimentos nos eixos X, Y e Z.

A base, além de sustentar o scanner e o cabeçote, possui mostradores que indicam as voltagens no arranjo de fotodiodos dependendo do modo de operação do microscópio. Estas voltagens contêm informações sobre o comportamento da haste na superfície da amostra. Em modo STM, os mostradores ficam desligados.

Existem diversos tipos de sondas sendo cada uma para um tipo específico de interação sobre a superfície. As sondas são compostas por substrato, haste e ponta (Fig. E.6).

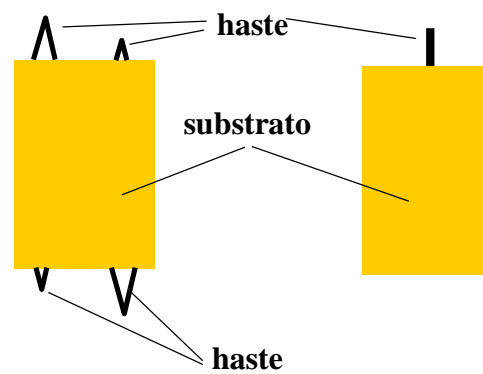


Figura E.6. As partes de uma sonda de AFM

Na microscopia de força atômica (AFM) são utilizados dois tipos de sondas: uma com quatro hastes em “V” e outra com apenas uma haste. A sonda com haste única é usada no modo intermitente (“tapping mode”). Apresentam diversos tipos de constantes de elasticidade, desde 0,2 a 42 N/m. São utilizadas, em geral, no estudo de materiais biológico ou macios. Já as sondas com haste em “V”, utilizadas no modo de contato (“contact mode”), são menos susceptíveis a movimentos de torção durante a varredura. Apresentam constantes de elasticidade normalmente entre 0,06 e 0,58 N/m. São indicadas no estudo de superfícies duras, onde a quebra da ponta pode ocorrer facilmente.

