

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**

**Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia**

**Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências**

**Dissertação de Mestrado**

**UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMON DE  
SUPERFÍCIE NA INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES HEMOCOMPATÍVEIS  
DO DENDRÍMERO PAMAM**

**Marcelo Gonçalves Vivas**

**Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI**

**Fevereiro de 2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia  
Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências

## **Dissertação de Mestrado**

# **Utilização da Espectroscopia de Ressonância de Plásmon de Superfície na Investigação das Propriedades Hemocompatíveis do Dendrímero PAMAM**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de Itajubá, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências dos Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Biomateriais.

**Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI**

Itajubá, 2007

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca Mauá –  
Bibliotecária Margareth Ribeira – CRB\_6/1700

V836u

Vivas, Marcelo Gonçalves

Utilização da Espectroscopia de Ressonância de Plásmon de Superfície na Investigação da Hemocompatibilidade do dendrímero PAMAM/ Marcelo Gonçalves Vivas. -- Itajubá, (MG) : UNIFEI. 2007.

128p. :il.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiroz.  
Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Ressonância. 2. Plásmon. 3. Hemocompatibilidade. 4. PAMAM. I. Queiroz, Álvaro Antônio Alencar de, orient. II. Universidade Federal de Itajubá. III. Título.

CDU 575. 133(043)

O Conhecimento não  
é propriedade de  
ninguém!

## **Agradecimentos**

A Deus, cheio de bondade, que me deu saúde e força de vontade para vencer todos os meus obstáculos;

A minha família que sempre me deu carinho e amor sem nada me cobrar, a não ser um dia o retorno para casa;

A minha namorada, Vanessa Moreira Giarola, pelo seu amor, carinho, companheirismo, amizade e apoio durante toda essa jornada;

Ao professor Dr. Alvaro Antônio Alencar de Queiroz, exemplo de caráter, brilhantismo e dedicação, por sua orientação acadêmica, amizade, paciência e por dividir comigo essa jornada;

As professoras Dra. Olga Zazuco Higa (Laboratório de Biologia Molecular) e Dra. Izilda Marcia Ranieri (Centro de Aplicações de Laser) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo-IPEN/USP;

Aos professores Dr. Julio San Román Dal Barrio (ICTP/CSIC) e Dr. Roberto Sastre (ICTP/CSIC), da rede de pesquisa CYTED (Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo, Jornada VIII.J, Biomateriales para la salud);

Aos demais professores do curso de mestrado em Materiais para Engenharia pelo desenvolvimento do meu conhecimento científico;

Aos funcionários da secretaria do ICE-UNIFEI, em especial à Edvandra, Marília e Roseli;

Às funcionárias da PPG, em especial à Maria Alta e a Margareth;

Ao técnico responsável pelos laboratórios didáticos de Física, Kalu, sempre disposto a colaborar;

Aos colegas do curso de mestrado em Materiais para Engenharia e da república pelos momentos de descontração;

A CAPES pelo suporte financeiro;

Por fim, a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii

### **CAPÍTULO 1 – ASPECTOS GERAIS DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS: A HEMOCOMPATIBILIDADE.....1**

1.1 – Hemocompatibilidade de materiais poliméricos.....	1
1.2 – O Sangue e seus constituintes.....	3
1.2.1– Proteínas Séricas.....	4
1.3 – A cascata de coagulação sanguínea.....	8
1.3.1 – Mecanismo de inibição da coagulação sanguínea.....	9
1.4 – Métodos para quantificação de adsorção de proteínas .....	10
1.5 – Considerações Parciais.....	11

### **CAPÍTULO 2 – DENDRÍMEROS: SISTEMAS NANOTECNOLÓGICOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS.....14**

2.1 – Introdução.....	14
2.2 – Os dendrímeros e suas propriedades .....	15
2.3 – Síntese de dendrímeros.....	17
2.3.1 – Método divergente.....	17
2.3.2 – Método Convergente.....	18
2.4 – Os dendrímeros e suas aplicações.....	19
2.5 – O Dendrímero PAMAM.....	19
2.6 – Considerações Parciais.....	21
2.7 – Referências Bibliográficas.....	22

<b>CAPÍTULO 3 – FÍSICO-QUÍMICA DE ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS SOBRE SUPERFÍCIES SINTÉTICAS.....</b>	<b>23</b>
3.1 – Processos de adsorção de proteínas em superfícies sintéticas.....	23
3.2 – Características da superfície sintética no processo de adsorção de proteínas séricas.....	24
3.2.1 – Rugosidade de Superfície.....	25
3.2.2 – Potencial Zeta.....	26
3.2.3 – Constante de ionização pK.....	28
3.3 – As isotermas de adsorção.....	29
3.3.1 – A isoterma de Langmuir.....	29
3.3.2 – A isoterma de Adsorção de Freundlich.....	31
3.4 – Cinética da interação bioespecífica.....	31
3.5 – Considerações Parciais.....	33
3.6 – Referências Bibliográficas .....	34
<b>CAPÍTULO 4 – FUNDAMENTOS DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA DE PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE .....</b>	<b>36</b>
4.1 – Reflexão interna total.....	36
4.2 – Princípios físicos da ressonância de plásmom.....	38
4.2.1 – Métodos práticos de excitação de plásmom de superfície.....	38
4.2.2 – Configuração de Kretschmann.....	39
4.2.3 – Configuração de Otto.....	40
4.3 – Aspectos físicos da configuração de Kretschmann.....	41
4.4 – Cálculo da reflectância para uma estrutura de n-camadas na configuração de Kretschmann.....	42
4.5 – Determinação de parâmetros óticos para um sistema de cinco interfaces utilizando a aproximação lorentziana na configuração de Kretschmann.....	47
4.6 – Obtenção da estimativa inicial da espessura e permissividade complexa do filme metálico.....	54
4.7 – Obtenção da estimativa inicial da espessura e constante dielétrica da camada dendrítica e protéica.....	56

4.8 – Aplicações da espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície.....	57
4.8.1 – Caracterização de propriedades ópticas e estruturais de filmes finos.....	57
4.8.2 – Análise em tempo real de reações imunológicas.....	58
4.9 – Considerações parciais.....	59
4.10 – Referências bibliográficas.....	60
<b>CAPÍTULO 5 – OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO 6 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
6.1 – Síntese do dendrímero PAMAM.....	65
6.2 – Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	65
6.3 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	67
6.4 – Ressonância magnética nuclear de prótons ( <sup>1</sup> H-NMR).....	69
6.5 – Cromatografia de permeação em gel.....	70
6.6 – Síntese e caracterização do eletrodo.....	72
6.6.1 – Filmes finos de ouro evaporados sobre um substrato de vidro.....	72
6.6.2 – Filmes de PAMAM G4 adsorvidos sobre o filme fino de ouro.....	73
6.6.3 – Filmes de BSA adsorvidos sobre o filme de PAMAM.....	74
6.6.4 – Filmes de HFb adsorvidos sobre o filme de PAMAM.....	75
6.6.5 – Ensaio de adesão plaquetária do dendrímero PAMAM.....	76
6.7 – Montagem do Aparato Experimental RPS: Sistema de medida e Aquisição de dados.....	76
6.8 – Determinação experimental do índice de refração do prisma.....	78
6.9 – Procedimento numérico para obtenção de parâmetros óticos de filmes ultrafinos.....	80
6.9.1 – Procedimento numérico para obtenção de parâmetros óticos de filmes finos metálicos.....	80
6.10 – Considerações Parciais.....	84
6.11 – Referências bibliográficas .....	84

<b>CAPÍTULO 7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
7.1 – Caracterização do dendrímero PAMAM.....	86
7.1.1 – Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	86
7.1.2 – Caracterização espectroscópica (FTIR, UV-Vis, <sup>1</sup> H-NMR).....	87
7.2 – Influencia dos parâmetros óticos dos Filmes de Ouro depositados em Substratos de vidro .....	89
7.3 – Caracterização do filme metálico por RPS.....	92
7.4 – Influência da polarização sobre o fenômeno RPS.....	93
7.5 – Estudo do comportamento da adsorção das proteínas séricas sobre o PAMAM (isotermas de Langmuir e Freundlich).....	94
7.5.1 – Adsorção do dendrímero PAMAM sobre a superfície do filme de ouro.....	94
7.5.2 – Adsorção de BSA sobre a superfície do dendrímero PAMAM.....	95
7.5.3 – Adsorção de HFb sobre a superfície do dendrímero PAMAM.....	102
7.6 – Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb.....	106
7.7 – Ensaios de adsorção plaquetária .....	108
7.8 – Referências Bibliográficas.....	113
<b>CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO 9 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE A – CÁLCULO DA RELAÇÃO DE DISPERSÃO DOS PLÁSMONS DE SUPERFÍCIE .....</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICE B – MÉTODO DAS CORREÇÕES DIFERENCIAIS.....</b>	<b>124</b>

## Lista de Figuras

Figura 1.1: Comparação entre estruturas químicas de polímeros clássicos (a) e estruturas dendríticas (b).....	3
Figura 1.2: Representação em fitas da molécula de HSA. Cada subdomínio está marcado com diferentes cores (amarelo para o subdomínio Ia, verde Ib, vermelho IIa, rosa IIb, azul escuro IIIa e azul claro IIIb). Arg 117, Lys 475 e Lys 351, representados em branco, são subdomínios que se ligam a sítios de aminoácidos de longas cadeias.....	5
Figura 1.3: Representação de fitas da imunoglobulina G. As duas cadeias de polipeptídeos de cadeias leves e cadeias pesadas são apresentadas em amarelo e vermelho, respectivamente.....	7
Figura 1.4: Diagrama representativo da conversão da molécula de fibrinogênio em fibrina insolúvel.....	7
Figura 1.5: Diagrama representativo da molécula de fibrinogênio. Ele é composto por duas subunidades idênticas cada uma composta por três cadeias de polipeptídeos ( $\alpha A$ , $\beta B$ e $\gamma$ ) as quais são interligadas por ligações de dissulfeto. A ação da trombina cliva a molécula de fibrinogênio em quatro pequenos peptídeos sendo dois fibrinopeptídeos A (FPA) e dois fibrinopeptídeos B (FPB) .....	8
Figura 1.6 – Diagrama representativo da cascata de coagulação proposto por Macfarlane e Davie & Ratnoff em 1964, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias: extrínseca e intrínseca .....	9
Figura 2.1: Número de artigos publicados sobre dendrímeros nos anos de 1992 a 2005.....	14
Figura 2.2: Figura representativa do crescimento em gerações no dendrímero poli(amido amina) (PAMAM).....	15
Figura 2.3: Figura esquemática do método divergente de crescimento de dendrímeros.....	18
Figura 2.4 Representação esquemática de uma síntese dendrímica convergente.....	18
Figura 2.5 – Representação gráfica da evolução dos dendrímeros PAMAM do núcleo até a sétima geração mostrando um aumento linear no diâmetro e um aumento exponencial dos grupos de superfície .....	20
Figura 2.6 – Estrutura química do dendrímero PAMAM de 2º geração com núcleo de etilenodiamida (a) e a estrutura química separada dos três grupos (núcleo, ramificação e superfície) que o constitui .....	21
Figura 3.1 – Características de rugosidades em superfícies. (a) Rugosidade física. (b) Rugosidade química.....	25
Figura 3.2 – Diagrama esquemático da formação de uma dupla camada metálica.....	28
Figura 4.1: Comportamento da reflectância em função do ângulo de incidência para uma interface prisma/ar. O ângulo crítico para o qual acontece o fenômeno RIT está representado na figura pela linha tracejada.....	37

Figura 4.2: Configuração de Kretschmann para excitação de PS.....	41
Figura 4.3: Configuração de Otto para excitação de PS.....	42
Figura 4.4: (a) Diagrama representativo da configuração de Kretschmann para excitação de PS. A RPS é excitada em uma interface prisma/metal quando o ângulo de incidência da fonte de laser é tal que $k_{sp} = k_x$ . (b) Espectro RPS característico para uma interface prisma/metal e metal/ar.....	43
Figura 4.5: Diagrama representativo da estrutura de seis camadas para a estimativa dos parâmetros óticos de filmes ultrafinos utilizando a configuração de Kretschmann.....	44
Figura 4.6: (a) Curva de ressonância representada no espaço $k_x$ , (b) dependência angular da reflectância.....	48
Figura 6.1: Diagrama representativo de um espectrofotômetro de absorção no UV-vis .....	61
Figura 6.2: Espectrômetro UV/Vis Varian Serie 643 (A) e Biospectro SP-22 (B) utilizados para obtenção do espectro UV/Vis.....	62
Figura 6.3: Diagrama representativo do espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier.....	64
Figura 6.4: Equipamento de RMN Bruker 300 MHz (A) e Bruker 500 MHz (B) do ICTP/CSIC. Nota-se em (B) a introdução da amostra no equipamento de RMN.....	66
Figura 6.5: Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 510 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/ SP.....	67
Figura 6.6: (a) Foto digital da Evaporadora Balzer PLS500 do IPEN. (b) Lâminas de vidro com ouro evaporado em sua superfície.....	68
Figura 6.7: Diagrama representativo do procedimento experimental para a adsorção de filmes dendríticos sobre substratos de ouro e adsorção de proteínas sobre a superfície dendrítica.....	69
Figura 6.8: Diagrama representativo do eletrodo para as análises por RPS.....	70
Figura 6.9: Diagrama representativo do sistema ótico utilizado no laboratório de Biomateriais na Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) para análise de hemocompatibilidade de materiais poliméricos.....	72
Figura 6.10: Prisma reto ajustado para (a) o ângulo externo nulo e (b) um ângulo externo $\theta_e$ graus.....	74
Figura 6.11: Fluxograma do procedimento de cálculo para obtenção da espessura e constantes óticas de filmes ultrafinos.....	76
Figura 6.12: Espectro RPS para um sistema de três interfaces (prisma/óleo, óleo/filme de ouro e filme de ouro/ar) obtido através de simulação computacional das equações de Fresnell da sua forma matricial como descrito na seção 4.4.....	77
Figura 6.13: Espectro RPS para um sistema de três interfaces. Curva pontilhada em vermelho representa os dados de entrada e a curva em preto o cálculo teórico obtido através do modelo matemático e pelo método das correções diferenciais.....	78
Figura 7.1: Curva de calibração (a) e análise por GPC (b) do PAMAM G4 obtido neste trabalho.....	81

- Figura 7.2: Espectro UV-vis do PAMAM G4. O espectro contém duas bandas de absorção em 240 e 290 nm.....82
- Figura 7.3: Espectro FTIR do dendrímero PAMAM G4. As bandas de absorção em  $3210\text{ cm}^{-1}$  e  $1647\text{ cm}^{-1}$  caracterizam as frequências vibracionais características das aminas primárias existentes na periferia do dendrímero PAMAM.....83
- Figura 7.4: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  do dendrímero PAMAM G4. Os picos de aminas primárias, secundárias e terciárias bem como os picos correspondentes a carbonila do monômero metacrilato de metila característicos do dendrímero PAMAM G4 são evidenciados.....84
- Figura 7.5: Simulação computacional da influência da espessura do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).....86
- Figura 7.6: Simulação computacional da influência da parte imaginária da constante dielétrica do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).....86
- Figura 7.7: Espectro RPS para um sistema de três interfaces. Curva pontilhada em vermelho representa o espectro RPS obtido experimentalmente e a curva em preto o ajuste de curva obtido através do método das correções diferenciais. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram:  $d = 77,8(\pm 1,21)\text{nm}$ ,  $\varepsilon_{Au} = -10,6(\pm 0,412) + 1,32i(\pm 0,214)$  com o coeficiente de correlação igual a  $R = 0,99355$ .....87
- Figura 7.8: Espectros RPS obtidos experimentalmente. Curva em vermelho representa o espectro para a fonte de laser plano-polarizada e a curva em preto para o feixe s-polarizado.....88
- Figura 7.9: Mudança conformacional do dendrímero PAMAM ao adsorver sobre a superfície do substrato de ouro devida a interações eletrostáticas entre os grupos amino terminais do PAMAM e a densidade de carga negativa da superfície do ouro .....89
- Figura 7.10: Espectro RPS para a adsorção do dendrímero PAMAM sobre substratos de ouro. O valor obtido através do modelo matemático concomitantemente com o ajuste de curva foi de 2,67 nm. Os parâmetros utilizados no modelo foram:  $\lambda = 632,8\text{nm}$ ,  $\varepsilon_{Au} = -11,02 + 1,212i$ ,  $d_{Au} = 77,65\text{nm}$ ,  $n = 1,55$ .....90
- Figura 7.11: Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (6.7). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. As curvas em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PAMAM sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína BSA ( $4,2\text{ mg/L}$ ) sobre o filme de PAMAM.....92
- Figura 7.12: Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Oringin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....93
- Figura 7.13: Curva de calibração da massa de BSA adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o

ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....	93
Figura 7.14: Isoterma de Langmuir para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....	95
Figura 7.15: Isoterma de Freundlich para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....	95
Figura 7.16: Modelo de interação dentre a proteína sérica BSA e o dendrímero PAMAM. Os círculos em azul representam o dendrímero PAMAM com os seus respectivos grupos amino terminais protonados ( $\text{pH} = 7,0$ ) e os três círculos em branco representam os três domínios da proteína BSA.....	96
Figura 7.17: Diagrama representativo do empacotamento da proteína sérica BSA sobre a superfície do dendrímero PAMAM. O retângulo em amarelo representa o substrato de vidro e as elipses de cor azul clara e branca representam, respectivamente, a molécula do dendrímero PAMAM e os domínios I, II e III que constituem a molécula da BSA.....	97
Figura 7.18: Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (6.7). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. As curvas em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PAMAM sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína HFb ( $0,24 \text{ mg/L}$ ) sobre o filme de PAMAM.....	98
Figura 7.19: Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Oringin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....	98
Figura 7.20: Curva de calibração da massa de HFb adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....	99
Figura 7.21: Isoterma de Langmuir para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....	100
Figura 7.22: Isoterma de Freundlich para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.....	100
Figura 7.23: Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb sobre a superfície do dendrímero PAMAM. A curva em vermelho representa a cinética de adsorção da BSA e a curva em preto a adsorção a adsorção do HFb. As curvas em vermelho e preto são curvas de tendência e não ajustes numéricos.....	103

Figura 7.24: Micrografias de epifluorescência das superfícies de vidro (A) e vidro revestido com o PAMAM (B) após exposição ao sangue humano. Aumento: 1000x.....	105
Figura 7.25: Mapas de cores representativos da adesão plaquetária sobre a superfície de vidro (a) e sobre a superfície de vidro revestida com PAMAM (b). As Figuras (a) e (b) representam as micrografias da Figura 7.24 (A) e (C), respectivamente.....	106
Figura 7.26: Mapa de cor representativo dos diferentes graus de protonação do dendrímero PAMAM em pH = 7.0. A barra de cor representa o grau de protonação do dendrímero PAMAM normalizado.....	108
Figure A.1: Figura representativa das componentes do campo eletromagnético na interface entre um metal e um meio dielétrico transparente. $ E_{sp} $ é o módulo do campo eletromagnético gerado pelos plásmons de superfície.....	116
Figura A.2: Diagrama representativo da configuração de Kretschmann para excitação de PS. A RPS é excitada em uma interface prisma/metal quando o ângulo de incidência da fonte de laser é tal que $k_{sp} = k_x$ .....	118
Figura C.1: Estrutura utilizada no cálculo do coeficiente de reflexão.....	125

## Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Aplicações de polímeros na biomedicina.....	1
Tabela 1.2: Concentração das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo humano.....	4
Tabela 7.1: Parâmetros experimentais .....	91
Tabela 7.2: Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM através do ajuste de curva linear e com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 298 K.....	94
Tabela 7.3: Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de HFb sobre o dendrímero PAMAM através do ajuste de curva linear e com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 298 K.....	101

## Lista de Abreviaturas

$Y_2O_3$  – Óxido de ítrio

$^1H$ -RMN – Ressonância magnética nuclear de próton

AT – antitrombina

BSA – Albumina do soro bovino

DNA – ácido desoxirribonucléico

FFT – Transformada Rápida de Fourier

FPA – Fibrinopeptídeos A

FPB – Fibrinopeptídeos B

FT – Fator tecidual

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

FTIR-ATR – Infravermelho com transformada de Fourier acoplada a reflectância total atenuada

G0 – Geração 0

G4 – Geração 4

GPC – Cromatografia de permeação em gel

Hfb – Fibrinogênio do soro humano

HMWK – Cininogênio de alto peso molecular

HSA – Albumina do soro humano

Ig – Imunoglobulina

IPEN – Instituto de Pesquisa Energéticas e nucleares

MCQ – Microbalança de cristal de quartzo

MT – Modo magnético transversal

NaCl – Cloreto de Sódio

OHS – Oscilador harmônico simples

PS – Plásmons de superfície

PAMAM G4 – Dendrímero poli(amido amina) de quarta geração

PEG – poli(etileno glicol)

PK – pré-caliceína

RIT – Reflexão interna total

rpm – rotações por minuto

RPS – Ressonância de plásmons de superfície

TFPI – Inibidor do Fator Tecidual

UV-vis – Ultravioleta visível

## Resumo

---

Dendrímeros são sistemas nanoscópicos com propriedades biomiméticas de proteínas globulares. A estrutura globular e altamente ramificada dos dendrímeros são características interessantes para o designer de revestimentos bioativos de próteses cardiovasculares. Aqui, os dendrímeros de poli(amido amina) (PAMAM) com o núcleo de etilenodiamida foi sintetizado pela rota divergente e sua hemocompatibilidade *in vitro* foi estudada. Utilizando um aparato experimental baseado no fenômeno de Ressonância de Plásmon de Superfície (RPS) desenvolvido em nosso laboratório, foram investigadas as características hemocompatíveis do dendrímero PAMAM. Neste estudo, o mecanismo de interação entre o dendrímero de poli(amido amina) e as proteínas Albumina de soro bovino (BSA) e Fibrinogênio de soro humano (HFb) foram investigadas. Além disso, experimentos de adesão plaquetária com microscopia de epifluorescência foram realizados. A espessura da camada de proteínas adsorvida sobre a superfície do dendrímero PAMAM foi calculada utilizando um programa computacional baseado no modelo Kretschmann. Através da análise por RPS a distribuição das moléculas de proteínas sobre a superfície do dendrímero PAMAM foi elucidada. Os resultados mostraram que a adsorção de proteínas séricas é termodinamicamente favorecida com a formação de multicamadas heterogêneas obedecendo ao modelo da isoterma de Freundlich. Os valores da energia livre de Gibbs de adsorção de proteínas ( $\Delta G_{BSA} = -42,24 \text{ kJ/mol}$  e  $\Delta G_{HFb} = -37,17 \text{ kJ/mol}$ ) sobre a superfície do dendrímero PAMAM indicam uma alta interação entre a macromolécula sintetizada e os componentes biológicos do sangue. As microscopias de epifluorescências comprovaram que o dendrímero PAMAM não possui características ideais de hemocompatibilidade corroborando com os resultados observados por RPS. Esta incompatibilidade com o sangue pode ser explicada pela mudança conformacional do dendrímero ao se adsorver sobre a superfície do vidro. Esta mudança conformacional provavelmente modifica o sítio de interação do dendrímero com as proteínas, modificando assim a constante de ionização ( $pK$ ) do grupo funcional da molécula dendrítica. Os ensaios de adesão plaquetária observados através de microscopia de epifluorescência revelaram um comportamento antitrombogênico do dendrímero PAMAM pela supressão da adesão plaquetária comparativamente a superfície de vidro. Contudo, a alta adsorção de fibrinogênio sobre a superfície do dendrímero PAMAM não é uma característica desejável as propriedades hemocompatíveis para aplicação de um biomaterial no revestimento de próteses cardiovasculares.

Dendrimers are nanoscopic systems with biomimetic properties of globular proteins. The globular and highly branched structure of dendrimers are interesting characteristics to design bioactive coatings of cardiovascular prosthesis. Here, polyamidoamine dendrimer (PAMAM) with diaminoethane as core was synthesized by divergent route and their *in vitro* blood compatibility was studied. Using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor developed in our laboratory we have investigated the blood compatibility of PAMAM. In this study the mechanism of interactions between polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and bovine serum albumin (BSA) and human fibrinogen (HFb) was investigated. Additionally, experiments with epifluorescence microscopy for platelet adhesion were carried out. The adsorbed layers of proteins onto the PAMAM surface was calculated by using software interfaced with the SPR biosensor. With SPR analyses of the distribution of the protein molecules on PAMAM surfaces have been recognized. The results show that the seric proteins adsorption is thermodynamically favored with formation of heterogeneous multilayers obeying the isotherm model of Freundlich. The values for the Gibbs free energy adsorption of proteins on PAMAM dendrimer indicate a high interaction between the synthetic macromolecule and the biological components of the blood. The epifluorescence microscopy proved that PAMAM dendrimer does not possess good characteristics of haemocompatibility in good agreement with SPR results. The blood incompatibility can be explained by the conformational change of dendrimer adsorbed on the glass surface. This conformational change probably modifies the site of interaction of the dendrimer with the proteins, which possess different values of ionization constants (pK). The epifluorescence microscopy of the PAMAM-coated coverslips after contact with blood showed antithrombogenic behaviour of the dendrimer due to the suppressed platelet adhesion. However, the higher HFb adsorption by PAMAM is not desirable as haemocompatibility property of a biomaterial and compromises the performance of PAMAM in coating cardiovascular prostheses for long-term.

## Capítulo 1 – Aspectos Gerais da Biocompatibilidade dos Polímeros Sintéticos: A Hemocompatibilidade

---

### 1.1 – Hemocompatibilidade de materiais poliméricos

Nas últimas três décadas a pesquisa relacionada ao desenvolvimento de materiais poliméricos usados em implantes e dispositivos biomédicos vêm crescendo acentuadamente. Materiais que entram em contato com o organismo humano e não são rejeitados são conhecidos como materiais biocompatíveis [1].

Como os biomateriais são amplamente utilizados em cirurgias reconstrutivas, plásticas, ortopédicas e na confecção de próteses cardiovasculares é necessário que ele seja a priori hemocompatível, ou seja, que o biomaterial não induza a formação de coágulos sanguíneos ou minimize ao máximo este evento.

Embora os dispositivos médicos estejam sendo empregados em larga escala, os materiais que os constituem não são inteiramente compatíveis com o sangue e seus componentes. Esta incompatibilidade resulta em uma superfície que induz a formação de trombos (coágulos) que podem prejudicar ou incapacitar a função do dispositivo e, o mais importante, ameaçar a saúde do paciente [1-2].

Dentre todos os tipos de materiais, os polímeros são os mais empregados na biomedicina como pode ser observado na Tabela 1.1,

**Tabela 1.1** – Aplicações de polímeros na biomedicina.

<b>Polímero</b>	<b>Aplicação Biomédica</b>
Polietileno de baixa densidade	Cirurgia Reconstrutiva
Polietileno de alta densidade	Ortopédica
Borracha de silicone	Cirurgia Plástica e ortopédica
<i>Dracon</i> Poliéster (PET)	Próteses Cardiovasculares
Poli(metacrilato de metila)	Implantes
Hidrogéis	Cirurgias Oftálmicas
Poli(ácido Lático)	Suturas Biodegradáveis

A principal exigência para que um polímero a ser utilizado em próteses cardiovasculares seja classificado como um bom biomaterial é que ele seja hemocompatível. Quando um material polimérico é colocado em contato com o sangue o primeiro evento que ocorre é a adsorção de proteínas do plasma sanguíneo sobre a sua superfície. Após a adsorção, o próximo evento é a adesão plaquetária e a sua ativação levando à formação de trombos (coágulos). Este evento é promovido quando o fibrinogênio (HFb) é adsorvido do plasma sanguíneo na interface fluido fisiológico/material sintético [1]. Neste momento, a molécula de fibrinogênio é polimerizada a fibrina pela ação da trombina (é uma proteína do tipo protease cuja principal função é converter fibrinogênio em fibrina).

Um problema extremamente grave associado à adesão plaquetária é que a trombose obstrui a artéria e interrompe o fluxo sanguíneo levando ao evento isquêmico (fornecimento inadequado de sangue), manifestado por angina, infarto agudo do miocárdio ou até mesmo morte súbita. Por causa disto, um grande esforço tem sido dedicado ao estudo de superfícies poliméricas não aderentes ou repelentes a proteínas (fibrinogênio) para, com isto, minimizar a ativação de contato dos mecanismos coagulantes do sangue [5].

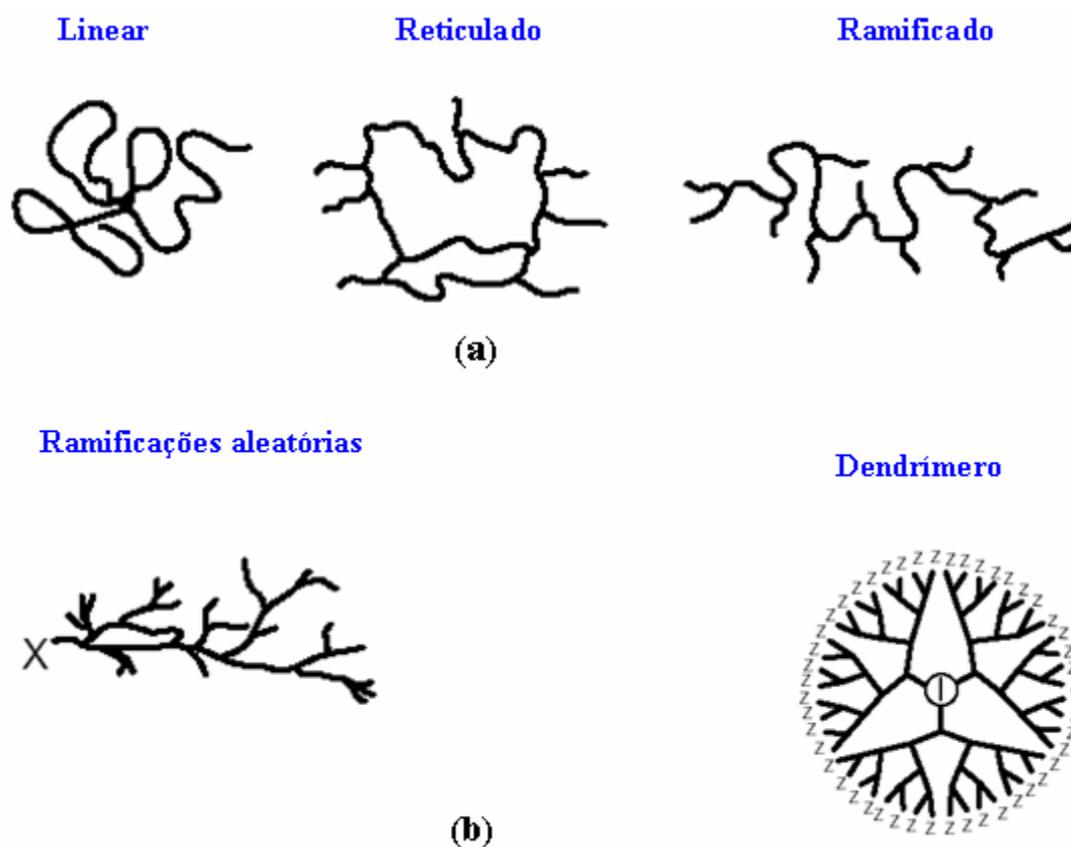
Do ponto de vista molecular, a biocompatibilidade dos materiais poliméricos e o grau de aceitabilidade do polímero estranho pelo organismo são determinados pelos seus grupos funcionais ao longo da cadeia e pelas possibilidades de interações com as moléculas do próprio organismo [3].

Os biopolímeros presentes no organismo dos seres humanos possuem estruturas complexas, com grupos polares ao longo da cadeia polimérica. As proteínas, por exemplo, são sequenciamentos de aminoácidos que formam um polímero por condensação, já os polímeros sintetizados pelos homens são mais simples, sendo formados a partir de uma única unidade, ou talvez duas diferentes, que se repete. Essa diferença em complexidade é uma das razões pelas quais os polímeros sintéticos são identificados pelo organismo como objetos estranhos [3]. Outra razão é que pode existir pouco ou nenhum grupo polar na cadeia polimérica capaz de interagir com o meio aquoso e formar uma camada de água estruturada na interface tecido biológico/material sintético mimetizando desta forma o organismo humano.

Neste sentido, as macromoléculas dendríticas (nova classe de materiais poliméricos) sintetizadas por Vögtle em 1978 surgem como uma alternativa para a otimização de próteses cardiovasculares e dispositivos biomédicos devido à sua extraordinária capacidade mimetizante das proteínas globulares (albumina e fibrinogênio). Tanto o caráter inerte, quanto à sua imunogenicidade aliado à elevada funcionalidade superficial e microestrutura

composta essencialmente de nanocavidades homogeneamente distribuídas pela macromolécula dendrítica [6], têm atraído a atenção de pesquisadores do mundo inteiro. Devido a estas características, os dendrímeros também são conhecidos como proteínas sintéticas.

A estrutura dos dendrímeros ao contrário dos polímeros clássicos pode ser controlada durante sua síntese o que os torna altamente promissores para uma gama de aplicações biomédicas. Além disso, observa-se a partir da Figura 1.1b que os dendrímeros possuem uma estrutura bem definida com alto grau de simetria bem como a presença de grupos funcionais periféricos ao contrário dos polímeros tradicionais (Figura 1.1a).



**Figura 1.1** – Comparação entre estruturas químicas de polímeros clássicos (a) e estruturas dendríticas (b). (Fonte: referência [20]).

## 1.2 – O Sangue e seus constituintes

O sangue é um tecido vivo que circula pelo sistema vascular sanguíneo dos animais vertebrados e que tem como função o transporte de oxigênio entre as células [21]. O sangue é constituído, em volume, por 45% de células sanguíneas e 55% de plasma sanguíneo. As

células do sangue são de 3 tipos: hemácias (ou eritrócitos, glóbulos vermelhos), leucócitos (ou glóbulos brancos) e plaquetas (ou trombócitos). O plasma, o componente líquido, é formado por 90% de água, 1% de substâncias inorgânicas (como potássio, sódio, ferro, cálcio, etc), 7% de proteínas plasmáticas (albumina, imunoglobulinas e fibrinogênio, principalmente) e 1% de substâncias orgânicas não protéicas, resíduos resultantes do metabolismo, hormônios. Apresenta dissolvidos gases como oxigênio e dióxido de carbono. Devido à presença da molécula da hemoglobina nas hemácias, nos animais vertebrados o sangue é de cor vermelha. A quantidade total de sangue no ser humano representa cerca de 8% de sua massa total.

### 1.2.1 – Proteínas Séricas

Como descrito anteriormente, as proteínas que constituem o plasma sanguíneo humano, denominadas proteínas séricas, são basicamente albumina (HSA), imunoglobulinas (Ig) e fibrinogênio (Hfb). A Tabela 1.2 ilustra a concentração dessas proteínas presentes no plasma sanguíneo humano.

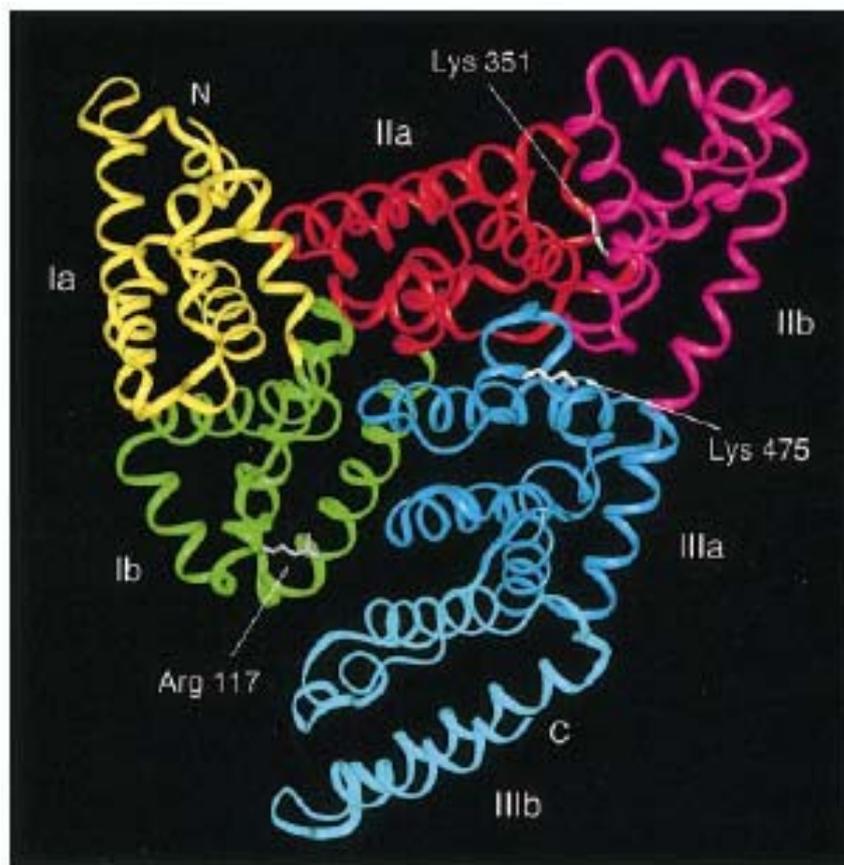
**Tabela 1.2** – Concentração das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo humano.

<b>Proteína</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Albumina	35 - 45
Fibrinogênio	2 - 4
Imunoglobina G	9,2 - 14,8
Imunoglobina A	1,4 - 2,6
Imunoglobina M	0,9 - 1,8

Como pode ser observado na Tabela 1.2 a albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo. Dentre as suas inúmeras funções destaca-se a manutenção da pressão osmótica necessária para a distribuição adequados de fluídos corpóreos entre compartimentos intravasculares e tecidos do corpo [10].

A molécula de HSA consiste de 585 resíduos de aminoácidos, é monomérica, mas contém três domínios de alfa-hélice estruturalmente homólogos (I, II e III) como mostrado na Figura 1.2. Cada domínio pode ser subdividido em subdomínios **a** e **b**, que possuem 6 e 4 alfa-hélice, respectivamente. O subdomínio **a** possui duas pequenas estruturas tipo alfa-

hélices unidas por um par de pontes de dissulfeto, formando um pequeno *loop* (laço) duplo [10].



**Figura 1.2** – Representação em fitas da molécula de HSA. Cada subdomínio está marcado com diferentes cores (amarelo para o subdomínio Ia, verde Ib, vermelho IIa, rosa IIb, azul escuro IIIa e azul claro IIIb). Arg 117, Lys 475 e Lys 351, representados em branco, são subdomínios que se ligam a sítios de aminoácidos de longas cadeias. (Fonte: referência [10]).

Já as imunoglobulinas, são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, presentes no plasma, tecidos e secreções que atacam proteínas estranhas ao corpo, chamadas de antígenos, realizando assim a defesa do organismo [9]. Depois que o sistema imunológico entra em contato com um antígeno (proveniente de bactérias, fungos, etc.), são produzidos anticorpos específicos contra ele. Há cinco classes de imunoglobulina com função de anticorpo: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM [9].

A estrutura básica de uma molécula de imunoglobulina (mero) consiste em duas cadeias polipeptídicas de cadeias com baixo peso molecular e duas cadeias com elevado peso

molecular, sempre em pares idênticos. As quatro cadeias mantêm-se unidas por ligações de pontes dissulfeto, sendo que as duas cadeias com baixo peso molecular são menores e comuns a todas as classes de imunoglobulinas. Já as cadeias que possuem um alto peso molecular, contêm cerca de 440 aminoácidos, com estruturas distintas em cada classe ou subclasse.

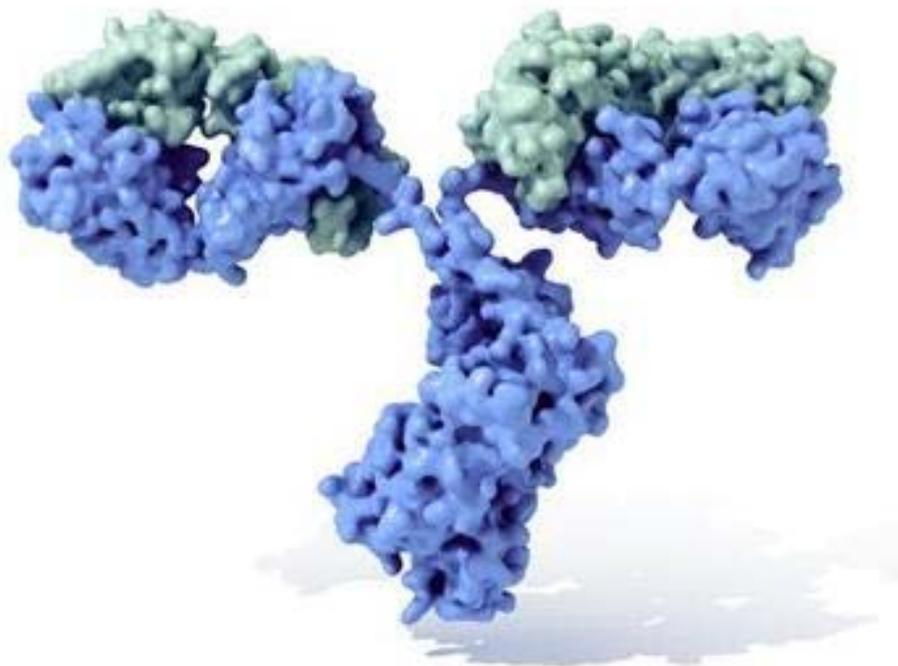
As imunoglobulinas possuem dois sítios idênticos de ligação com o antígeno. Um é feito pela cadeia com alto peso molecular, e outro, pela cadeia de baixo peso molecular. São bifuncionais, pois cada molécula de imunoglobulina apresenta uma região que age na ligação com o antígeno, enquanto a outra promove a ligação das imunoglobulinas às células do sistema imune.

Dentre as imunoglobulinas citadas a IgG é a principal imunoglobulina do sangue. Seu peso molecular é de 150 *kD* e constitui 80% das imunoglobulinas presentes no organismo [16]. Sua estrutura química tridimensional é ilustrada na Figura 1.3.

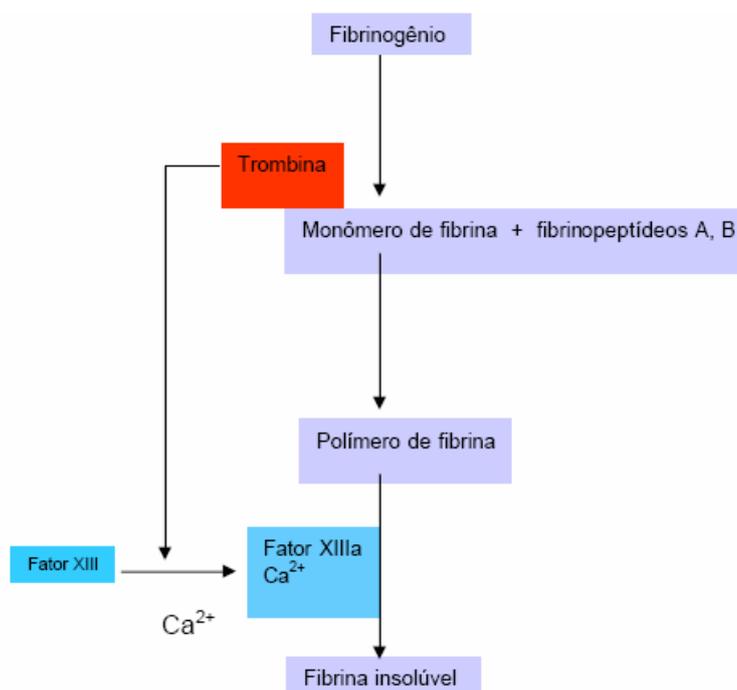
Já o fibrinogênio é uma glicoproteína de alto peso molecular (340 *kD*) codificada no cromossomo 4 e sintetizada por hepatócitos [8]. Ele é composto por duas sub-unidades idênticas, cada uma contendo três cadeias de polipeptídeos ( $\alpha A$ ,  $\beta B$  e  $\gamma$ ) as quais são unidas por ligações dissulfeto [8]. Além disso, possui dois domínios carregados negativamente (domínios D e E) e um domínio carregado positivamente ( $\alpha C$ ) (Figura 1.5).

O fibrinogênio é um fator de coagulação sanguínea. Grande parte dos infartos são ocasionados devido o aumento da formação de fibrina, viscosidade plasmática e agregação plaquetária os quais estão diretamente relacionados com o aumento da concentração de fibrinogênio no sangue [8].

A conversão de fibrinogênio em fibrina é o processo fundamental da coagulação sanguínea e ocorre em três estágios (Figura 1.4). O primeiro evento é a clivagem da molécula de fibrinogênio em quatro pequenos peptídeos, dois fibrinopeptídeos A (FPA) e dois fibrinopeptídeos B (FPB) pela ação da trombina (Figura 1.5). Os FPAs são liberados no aminoácido terminal das duas cadeias  $\alpha A$  e os FPBs pelas duas cadeias  $B\beta$ . A liberação dos FPAs ocorre mais rápido que a dos FPBs, o que parece ser essencial na polimerização dos monômeros de fibrina. A clivagem isolada do FPA é capaz de formar fibrina, enquanto a clivagem isoladas dos FPBs é insuficiente para a polimerização. O segundo passo para a conversão de fibrinogênio em fibrina é a polimerização dos monômeros de fibrina. E o terceiro passo é a formação da fibrina insolúvel que requer a participação do fator XIII e cálcio. Uma vez formada, a fibrina pode ser degradada pelo sistema fibrinolítico [19].

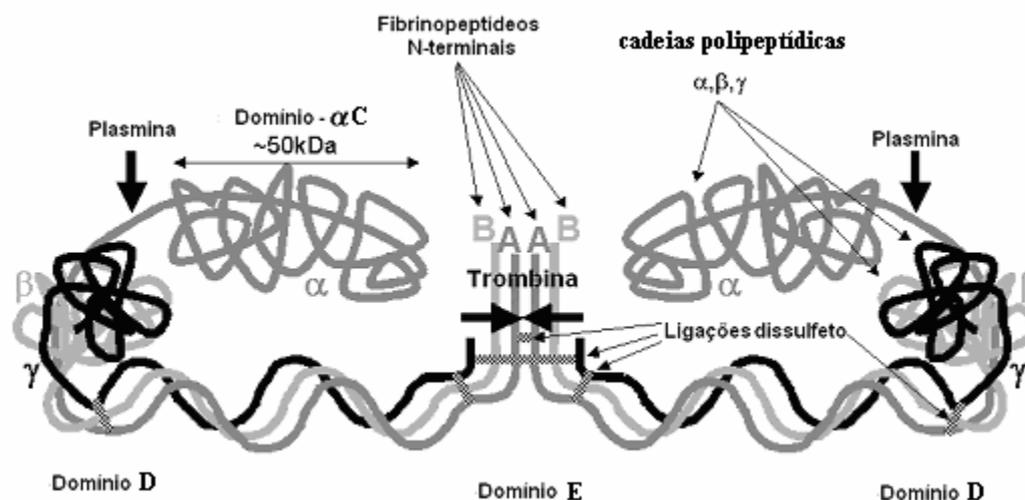


**Figura 1.3** – Representação tridimensional da imunoglobulina G. As duas cadeias de polipeptídeos com baixo peso molecular e alto peso molecular estão ilustradas em verde água e azul, respectivamente (Fonte: referência [16]).



**Figura 1.4** – Diagrama representativo da conversão da molécula de fibrinogênio em fibrina insolúvel.

A conversão de fibrinogênio em fibrina é o primeiro passo para a “cascata de coagulação”, que consiste de uma série de reações bioquímicas no sangue provocadas por lesão do tecido ou pela ativação plaquetária.



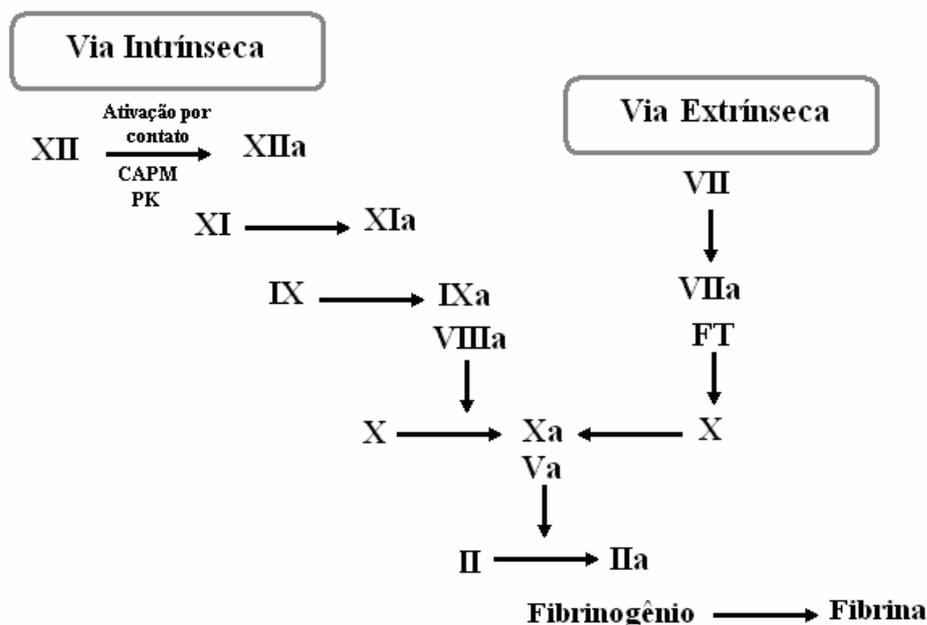
**Figura 1.5** – Diagrama representativo da molécula de fibrinogênio. Ele é composto por duas subunidades idênticas cada uma composta por três cadeias de polipeptídeos ( $\alpha A$ ,  $\beta B$  e  $\gamma$ ) as quais são interligadas por ligações de dissulfeto. A ação da trombina cliva a molécula de fibrinogênio em quatro pequenos peptídeos sendo dois fibrinopeptídeos A (FPA) e dois fibrinopeptídeos B (FPB) (adaptado da referência [8]).

### 1.3 – A cascata de coagulação sanguínea

Em 1964, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue [17-19]. Nesse modelo (Figura 1.6), a coagulação ocorre por meio da ativação proteolítica, sequencial de zimógenos, por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, converte a molécula de fibrinogênio em fibrina. O esquema divide a coagulação em duas vias denominadas via extrínseca e via intrínseca.

Na via extrínseca, o fator VII plasmático (na presença do seu cofator, o fator tecidual ou tromboplastina) ativa diretamente o fator X. Na via intrínseca, a ativação começa quando o fator XII se une à fibrila de colágeno sub-endotelial que fica exposta após lesão do vaso

sangüíneo. Ao se unir à fibrila de colágeno, o fator XII forma um complexo com o cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e com a pré-caliceína (PK). Na união do fator XII com o CAPM e o colágeno, o fator XII é ativado (fator XIIa). O fator XIIa ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIIIa, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina.



**Figura 1.6** – Diagrama representativo da cascata de coagulação proposto por Macfarlane e Davie & Ratnoff em 1964, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias: extrínseca e intrínseca (Adaptado da referência [17]).

### 1.3.1 – Mecanismo de inibição da coagulação sanguínea

As reações bioquímicas da coagulação do sangue devem ser estritamente reguladas de modo a evitar a ativação excessiva do sistema, formação inadequada de fibrina e oclusão vascular [18]. Dentre as inúmeras proteínas inibitórias da ativação da coagulação existem duas que são mais relevantes e que atuam em caminhos diferentes, nomeadamente, antitrombina (AT), TFPI (inibidor do caminho do fator tecidual).

A antitrombina (AT) é o inibidor primário da trombina e também exerce efeito em outras enzimas incluindo os fatores IXa, Xa e XIa. Ela atua formando um complexo enzima/inibidor, bloqueando o sítio ativo da enzima. A deficiência parcial de ATIII é uma causa bastante comum de problemas trombogênicos. Tanto em ensaios clínicos quanto *in vivo*

a ação da AT pode ser acelerada por heparina (anticoagulante). A heparina, ou fragmentos dela aumentam em muito (1000x) a atividade intrínseca da antitrombina. Ela não é consumida durante a sua ação. O seu efeito pode apenas ser revertido em emergências com injeção de protamina (complexo protéico de baixo peso molecular), que a inibe ao complexar-se com ela. Os fragmentos de heparina (heparina de baixo peso molecular) possuem a mesma função e são mais seguros.

Já a TFPI reage com o fator Xa para formar o complexo TFPI-Xa o qual inibe o TF-VIIa tornando inativa a formação de trombina e fibrina. A sua concentração no plasma sanguíneo é muito baixa cerca de 1-2 nM. Contudo, ela pode ser liberada por células endoteliais e plaquetas, aumentando significativamente a sua concentração local sob várias condições de estimulação celular. O efeito da deficiência do TFPI no sangue ainda não está devidamente esclarecido pela literatura [17].

#### **1.4 – Métodos para quantificação de adsorção de proteínas**

Após várias décadas de pesquisas intensas, não existe mais nenhuma dúvida de que uma superfície compatível com o sangue adsorve preferencialmente albumina (HSA) do que fibrinogênio em sua superfície [1-4]. Se o material apresenta uma estrutura composta de domínios hidrofílicos, a albumina é seletivamente adsorvida nestas regiões. Em síntese, um material apresenta uma tendência a hemocompatibilidade se ele adsorver mais albumina do que fibrinogênio.

Existem vários métodos para se quantificar a interação entre proteínas do sangue e superfícies sintéticas. Dentre elas pode-se citar a microbalança de cristal de quartzo (MCQ) [11], Elipsometria [12], Espectroscopia de Fluorescência por Reflexão interna total [13], Infravermelho com Transformada de Fourier acoplada a Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) [14], Ressonância de Plásmon de Superfície (RPS) [15], Técnicas radioisotópicas [1-2] dentre outras.

Atualmente a espectroscopia de ressonância de plásmon emerge como uma técnica promissora quanto à avaliação do processo de adsorção protéica por superfícies sintéticas. A utilização da técnica de RPS deve-se principalmente à sua fácil implementação, baixo custo e alta sensibilidade [15].

## 1.5 – Considerações Parciais

A hemocompatibilidade dos materiais poliméricos é uma característica desejável para uma gama de aplicações de dispositivos biomédicos que entram em contato com o sangue durante o uso clínico. No entanto, os materiais utilizados em aplicações biomédicas hoje em dia não são inteiramente compatíveis com o sangue e necessitam de anticoagulantes para minimizar a formação de trombos ocasionando efeitos colaterais graves. A fim de solucionar estes problemas, os dendrímeros surgem como materiais alternativos para o desenvolvimento e revestimentos de dispositivos biomédicos destinados à área cardiovascular.

Existem na literatura poucos trabalhos científicos baseados no fenômeno RPS para a quantificação da adsorção de proteínas séricas sobre a superfície do dendrímero PAMAM com o intuito de investigar a viabilidade deste material no emprego de dispositivos biomédicos e próteses cardiovasculares.

Dendrímeros PAMAM são sistemas nanoscópicos cujas características principais são o biomimetismo das proteínas globulares, elevada funcionalidade em sua periferia e grande área superficial devido à existência de nanocavidades em sua estrutura. O próximo capítulo abordará as principais características físico-químicas dos dendrímeros, particularmente o dendrímero PAMAM.

## 1.6 – Referências Bibliográficas

- [1] de Queiroz, A.A.A.; Gallardo, A.; Román, J. S. Hemocompatible properties of polymeric derivative of paracetamol. *Journal of Biomaterials*, 6:523-530, 1995.
- [2] Fernandes, E.G.R.; de Queiroz, A.A.A.; Abraham, G.A.; Román, J.S. Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. *J.Mater.Sci.Mater Med.* 17: 105-111, 2006.
- [3] Griffith, L. G. Polymeric Biomaterials, *Acta matter.* 48: 263-277, 2000.
- [4] de Queiroz A.A.A.; Castro, S.C.; Higa, O.Z. Adsorption of plasma proteins to DMAA hydrogels obtained by ionizing radiation and its relationship with blood compatibility. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 8: 335-347, 1997.
- [5] Alves, S. B.; de Queiroz, A.A.A.; Higa, O.Z. Digital image processing for biocompatibility studies of clinical implant materials. *Artif. Organs.* 5: 444-446, 2003.

- [6] Svenson, S.; Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 57: 2106-2129, 2005.
- [7] de Queiroz A.A.A.; Abraham, G.A.; Román, J.S. Polyglycerol dendrimers: a new approach to design fibrinolytic coatings. **III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (Campinas, SP)**. 1: 184-184, 2004.
- [8] Disponível em: <http://tollefsen.wustl.edu/projects/coagulation/coagulation.html#III.D> (último acesso em 15/12/2006).
- [9] Disponível em: <http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/imunoglobulinas.shtml> (último acesso em 15/12/2006).
- [10] Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumina 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**. 12: 439-446, 1999.
- [11] Cheng, Z.; Friedt, J.; Angelova, A. Human Immunoglobulin Adsorption Investigated by Means of Quartz Crystal Microbalance Dissipation, Atomic Force Microscopy, Surface Acoustic Wave, and Surface Plasmon Resonance Techniques. **Langmuir**, 20:5870 – 5878, 2004.
- [12] Elwing, H. Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. **Biomaterials**. 19: 397-406, 1998.
- [13] Thompson, N. L.; Burghardt, T. P. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. **Biophysical Society**. 33:435-454, 1981.
- [14] Chittur, K.K., FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. **Biomaterials**. 19: 357-36, 1998.
- [15] Green RJ, Frazier RA, Shakesheff KM, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**. 21: 1823-1835, 2000.
- [16] Disponível em: <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/igs/mikeimages.html> (último acesso em 15/12/2006).
- [17] Franco, F. R. Overview of Coagulation, Anticoagulation and Fibrinolysis. **Simposio: Hemostasia e trombose**. 34: 229-237, 2001.
- [18] Disponível em: (<http://www.uhmc.sunysb.edu/internalmed/hematol/jj/coag.pdf>) (último acesso em 15/09/2006).
- [19] Jozefowicz M, Jozefonvicz J, Antithrombogenic Polymers. **Pure & Appl. Chem**. 56:1335-1344, 1984.

[20] Vieira, N. C. S. Biossensores de Glicose Nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ . *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Itajubá, Brasil, 2006.

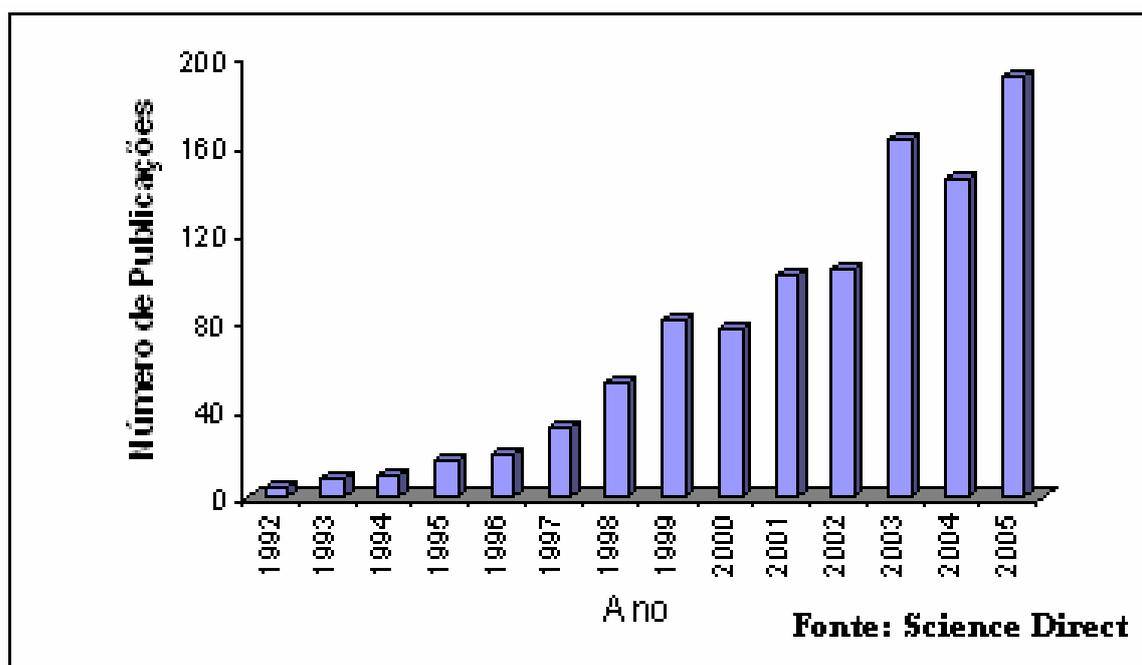
[21] Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Blood> (último acesso em 12/01/2007)

## Capítulo 2 – Dendrímeros: Sistemas Nanotecnológicos para Aplicações Biomédicas

---

### 2.1 – Introdução

Uma das áreas da química macromolecular que alcançou um grande desenvolvimento foi a síntese de polímeros em cascata, também conhecidos como arboróis, dendrímeros ou polímeros altamente ramificados. Eles foram descobertos acidentalmente em 1978 por Vögtle e, durante alguns anos, eles foram apresentados apenas como uma curiosidade química [1-3]. De acordo com a Figura 2.1, somente depois de cerca de uma década é que eles passaram a serem investigados e, dessa forma, começaram a aparecer às suas primeiras aplicações na área da saúde.

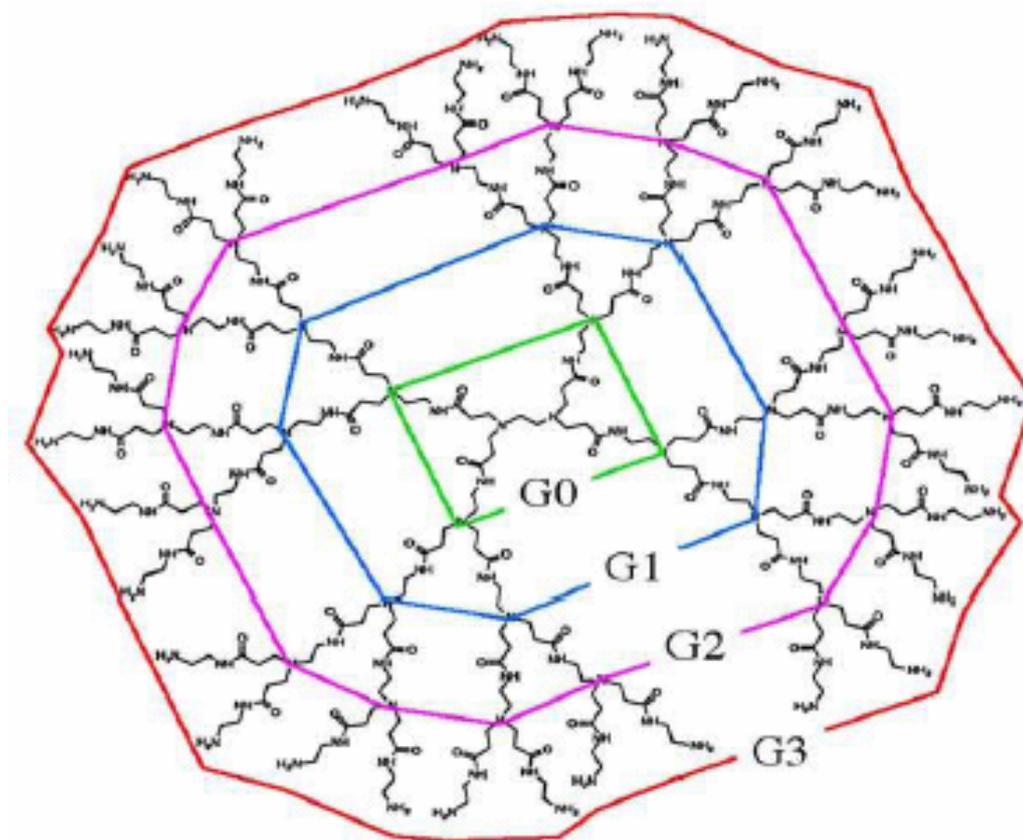


**Figura 2.1** – Número de artigos publicados sobre dendrímeros nos anos de 1992 a 2005.

Os dendrímeros são macromoléculas sintéticas, monodispersas, com elevado peso molecular, elevada área superficial, tamanho nanométrico, arquitetura tridimensional quase esférica e altamente organizada e que apresentam uma enormidade de grupos funcionais em sua periferia, ao contrário dos polímeros lineares. Este tipo de molécula possui superfícies e interfaces altamente controladas e apresentam cavidades internas, o que permite, por exemplo, o encapsulamento de moléculas bioativas [1-7].

O processo de polimerização clássico, o qual resulta em polímeros lineares, é usualmente randômico em natureza e produz moléculas de diferentes tamanhos, enquanto o tamanho e a massa molecular dos dendrímeros podem ser especificamente controlados durante a síntese.

Essas macromoléculas tridimensionais possuem pontos de ramificação em cada unidade métrica que é capaz de conduzir a estruturas com definidos números de geração e grupos funcionais terminais. Estas moléculas crescem a partir de um núcleo, designado de Geração 0 (G0) e, cada conjunto de unidades métricas adicionadas torna cada geração mais ramificada que a anterior até se obter uma estrutura globular, como é mostrado na Figura 2.2 [2].



**Figura 2.2** – Figura representativa do crescimento em gerações no dendrímero poli(amido amina) (PAMAM) (Fonte: referência [9]).

## 2.2 – Os dendrímeros e suas propriedades

Devido à sua arquitetura molecular, os dendrímeros mostram uma melhora significativa nas suas propriedades físicas e químicas quando comparados a polímeros lineares tradicionais. Dentre as propriedades dos dendrímeros, pode-se mencionar:

1. Em solução, as cadeias lineares são flexíveis enquanto que os dendrímeros formam sistemas micelares.
2. Soluções de dendrímeros possuem uma viscosidade significativamente menor que os polímeros lineares e, esta, é uma das propriedades mais importantes dessas macromoléculas. A viscosidade aumenta com o aumento do número de meros, mas a partir de certa geração (em geral, a partir da geração 4), a viscosidade volta a diminuir, de tal forma que os dendrímeros de geração mais alta apresentam mais grupos terminais, porém menor viscosidade que os dendrímeros de geração mais baixa. Este comportamento é diferente dos polímeros lineares. Para os polímeros clássicos a viscosidade intrínseca aumenta continuamente com a massa molecular.
3. O número de grupos funcionais na superfície da macromolécula determina a geração do dendrímero.
4. A presença de muitas cadeias terminais é responsável por uma alta solubilidade, micibilidade e reatividade dos dendrímeros. A sua solubilidade é fortemente influenciada pela natureza dos grupos da superfície. Os dendrímeros terminais em grupos hidrofílicos são solúveis em solventes polares enquanto os dendrímeros terminais com grupos hidrofóbicos são solúveis em solventes apolares.
5. A massa molar dos dendrímeros pode ser calculada pela seguinte relação matemática:

$$M = M_c + n_c \left[ M_m \left( \frac{n_m^G - 1}{n_m - 1} \right) + M_t n_m^G \right] \quad (2.1)$$

sendo  $M_c$  é a massa molar do núcleo,  $M_m$  é a massa molar do mero ramificado,  $M_t$  é a massa molar do grupo terminal,  $n_c$  é a multiplicidade do núcleo,  $n_m$  é a multiplicidade da ramificação e  $G$  é o número de geração.

6. O aumento do número de grupos terminais é descrito por uma progressão geométrica da seguinte forma:

$$Z = n_c \cdot n_m^G \quad (2.2)$$

sendo  $n_c$  a multiplicidade do núcleo,  $n_m$  é a multiplicidade da ramificação e  $G$  é o número de geração.

7. A massa molecular ponderal média e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros muito importantes para a determinação e explicação do comportamento físico desses sistemas macromoleculares. Dendrímeros de peso molecular muito baixo geralmente apresentam uma menor área superficial, o que é indesejável para o projeto de biossensores. Já as macromoléculas de peso molecular muito elevado são pouco solúveis e, por isso, geralmente não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.
8. Capacidade de encapsulamento de moléculas bioativas no interior da macromolécula. Esta é uma das propriedades únicas que os dendrímeros apresentam devido a sua forma globular e à presença de cavidades internas.

### **2.3 – Síntese de dendrímeros**

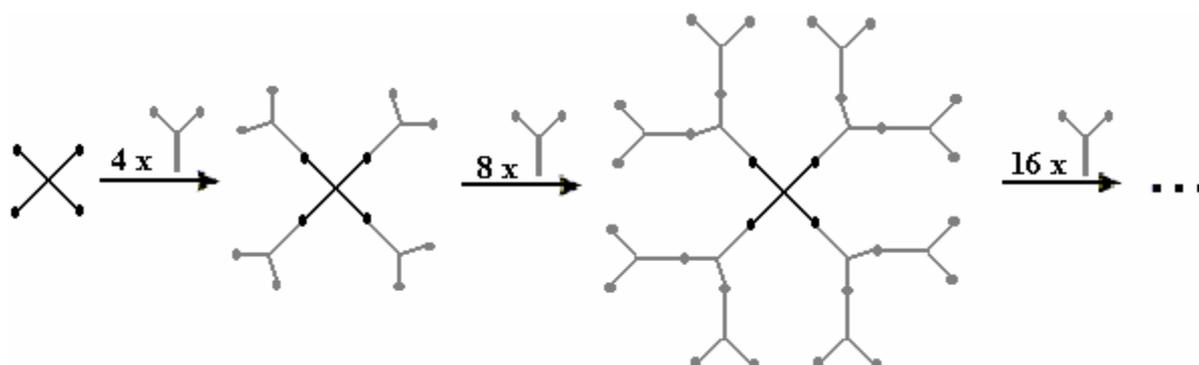
Os dendrímeros são preparados por uma síntese tridimensional repetitiva e bem controlados através de dois métodos: o método divergente e o método convergente. Essas técnicas permitem a formação de estruturas tridimensionais cujas ramificações estendem-se concentricamente, o que conduz a uma molécula altamente simétrica. Além disso, a síntese repetitiva permite um controle do peso molecular e do tamanho, o que leva a macromoléculas monodispersas [4].

#### **2.3.1 – Método divergente**

O método divergente foi desenvolvido por Vögtle em 1978, sendo considerado a primeira técnica que se originou para sintetizar dendrímeros [6].

Este método envolve o crescimento de um núcleo central, onde as ramificações são justapostas através de etapas sintéticas repetitivas; ou seja, começa-se com o núcleo e vão se adicionando sucessivas camadas de meros até se obter o dendrímero desejado. Ele é caracterizado por reações que ocorrem por um aumento do número de locais reativos, como se o dendrímero estivesse sendo construído de dentro para fora. As camadas externas passam a constituir a estrutura interna do dendrímero. Uma característica deste método é que há um rápido aumento do número de grupos terminais reativos. Entretanto, quanto mais a molécula

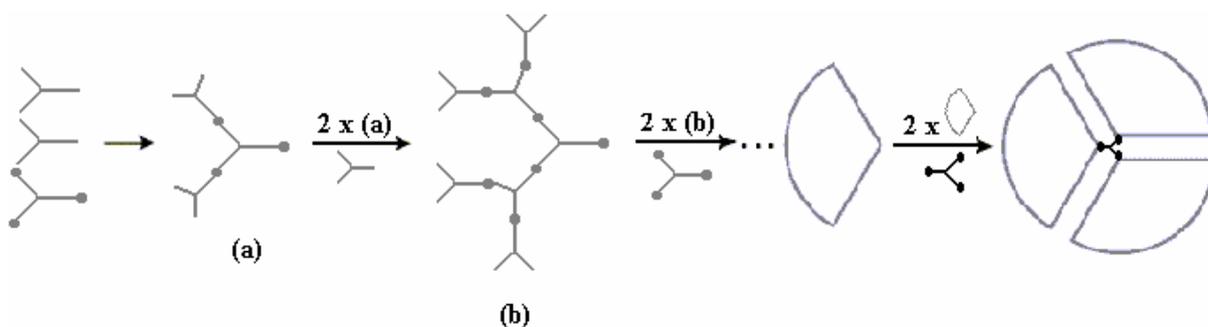
crece, maiores imperfeições e falhas ocorrem devido às reações incompletas dos grupos terminais [1-5]. O procedimento geral desta técnica de síntese de dendrímeros está mostrado na Figura 2.3.



**Figura 2.3** – Figura esquemática do método divergente de crescimento de dendrímeros.

### 2.3.2 – Método Convergente

Os pioneiros do método convergente de síntese de dendrímeros foram Hawker e Fréchet [6]. Essa síntese começa pelo que se tornará a periferia do dendrímero, ou seja, fazendo-se os ramos e só depois introduzindo o núcleo para produzir o dendrímero. O princípio básico do método convergente envolve a construção de pequenas unidades fragmentais que são chamadas dendrons. Esses dendrons são, então, unidos para a constituição do núcleo central e, conseqüentemente, para a formação final do dendrímero [1-5]. A Figura 2.4 ilustra o procedimento geral da técnica de síntese convergente.



**Figura 2.4** – Representação esquemática de uma síntese dendrímica convergente.

Embora a formação de defeitos no dendrímero seja minimizada na rota sintética convergente e a purificação do produto final seja mais fácil relativamente à rota sintética divergente, o impedimento estérico causado pelos grupos volumosos na periferia do dendrímero impede a obtenção de sistemas de elevadas gerações.

## 2.4 – Os dendrímeros e suas aplicações

Hoje em dia existem mais de 50 famílias de dendrímeros, cada um com propriedades específicas. Muitas aplicações potenciais de dendrímeros são baseadas em suas propriedades tais como: uniformidade molecular, superfície multifuncional e cavidades internas. Estas propriedades específicas tornam os dendrímeros altamente satisfatórios para uma gama de aplicações de alta tecnologia.

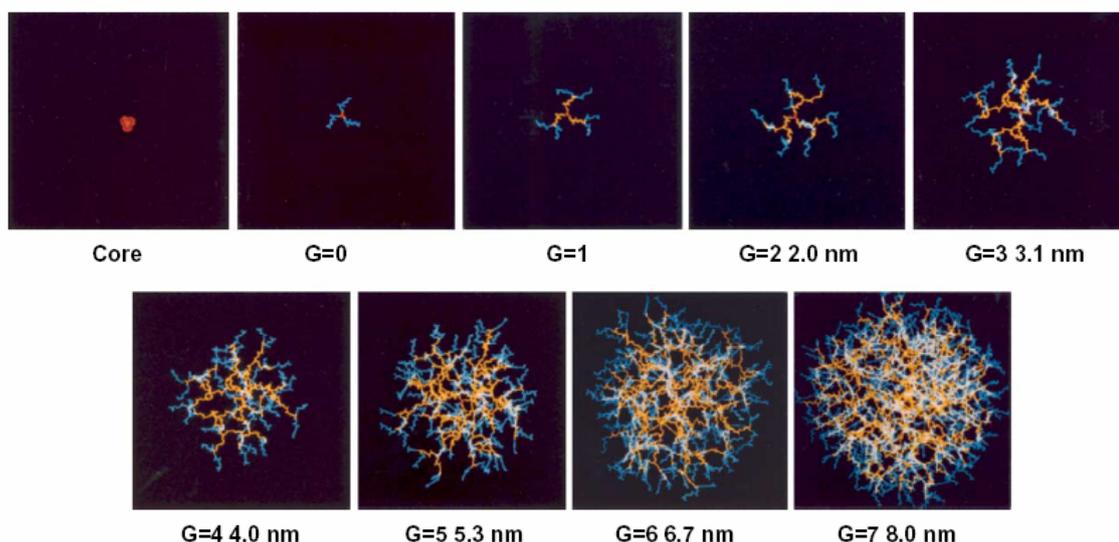
Na área médica, os dendrímeros são empregados como captadores seletivos e transportadores macromoleculares [2]. São utilizados como captadores seletivos devido ao controle preciso de sua topologia, funcionalidade e a flexibilidade de dendrímeros, sendo possível à construção de um dendrímero capaz de selecionar as moléculas de interesse com alta seletividade. Como transportadores macromoleculares de drogas, os dendrímeros apresentam uma alta capacidade de vetorização, baixa toxicidade e uma boa solubilidade em água.

O dendrímero poliglicerol super-ramificado, por exemplo, é utilizado no processo de encapsulamento e transporte de hospedeiros polares (tais como tintas e drogas) e, também, na criação de microambientes especiais no seu núcleo. Através desta arquitetura núcleo-casca, o transporte seletivo e a liberação dos hospedeiros encapsulados são possíveis tanto no meio hidrofílico quanto no meio hidrofóbico. Além disso, nanocapsulas de dendrímeros podem ser empregadas como moldes para a preparação de nanopartículas com propriedades antimicrobianas, úteis para o tratamento de queimados [8].

Os dendrímeros também são aplicados para diagnósticos *in vitro* de testes cardíacos, onde são usados como agentes fixadores de imunoglobulinas ou como agentes de contraste para a ressonância magnética nuclear (RMN) pela adição, ainda na síntese, de cátions paramagnéticos que melhoram em muito a sensibilidade e a especificidade do teste de RMN [8].

## 2.5 – O Dendrímero PAMAM

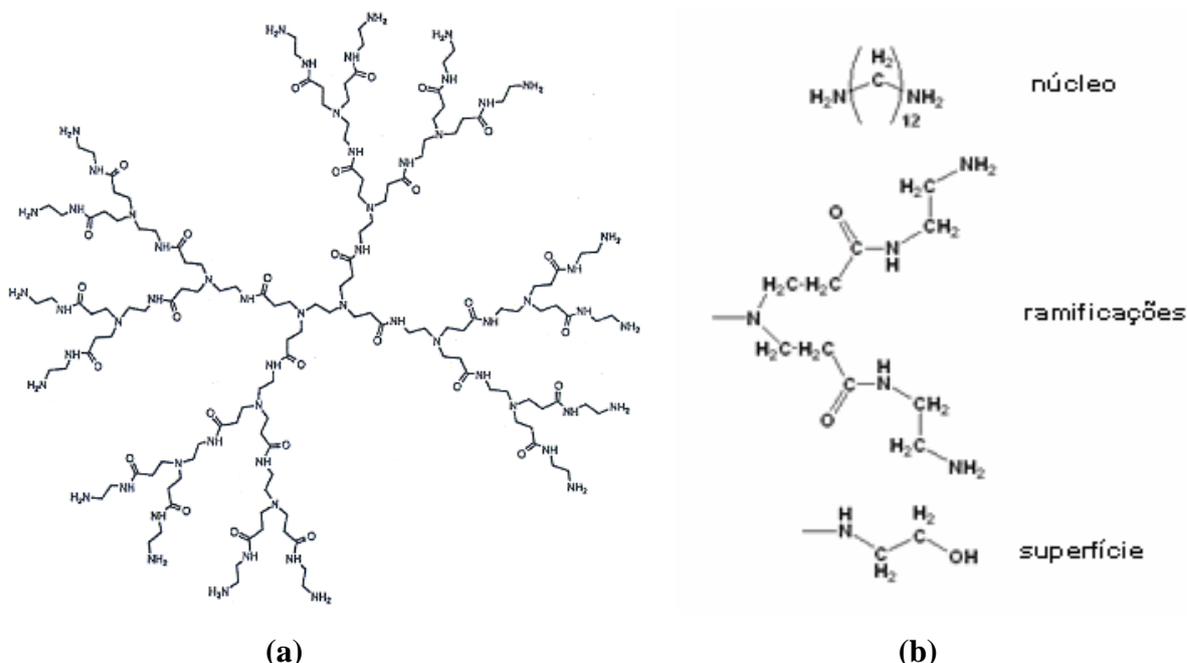
O dendrímero poli(amido amina) (PAMAM) é um dos sistemas mais estudados atualmente com relação à sua aplicação na biotecnologia. Em 1984, eles foram a primeira família de dendrímeros ( $G = 0-7$ ) a serem sintetizados e caracterizados, seguidos de comercialização em 1990 [6]. O dendrímero PAMAM é constituído de um núcleo de amônia ( $\text{NH}_3$ ) ou etilenodiamina, ligado a ramificações de grupamentos amida e amina. O diâmetro da sua arquitetura molecular aumenta sistematicamente cerca de 1 nanômetro de geração para geração, conforme ilustrado na Figura 2.5. Já seus grupos de superfície aumentam exponencialmente [6].



**Figura 2.5** – Representação gráfica da evolução dos dendrímeros PAMAM do núcleo até a sétima geração mostrando um aumento linear no diâmetro e um aumento exponencial dos grupos de superfície (Fonte: referência [6]).

A síntese do PAMAM é realizada na presença de metanol, onde a amônia reage com o acrilato de metila e então a etilenodiamina é acrescentada. Na extremidade de cada ramificação existe um grupo amino livre que pode reagir com os dois monômeros provenientes do acrilato de metila e com duas moléculas de etilenodiamina. Cada seqüência completa da reação resulta em uma nova geração do PAMAM. Estes dendrímeros possuem uma alta concentração de grupos aminas em sua superfície. A Figura 2.6 ilustra a estrutura do dendrímero PAMAM.

Devido a sua extraordinária capacidade mimetizante das proteínas globulares aliado ao seu caráter inerte e a sua elevada funcionalidade superficial e microestrutura composta essencialmente de nanocavidades homogeneamente distribuídas pela macromolécula dendrítica, o dendrímero PAMAM se apresenta como uma boa alternativa para a otimização de próteses cardiovasculares e dispositivos biomédicos.



**Figura 2.6** – Estrutura química do dendrímero PAMAM de 2<sup>o</sup> geração com núcleo de etilenodiamida (a) e a estrutura química separada dos três grupos (núcleo, ramificação e superfície) que o constitui (Adaptado da referência [6]).

Embora sintetizados há pouco mais de uma década, muito pouco se conhece a respeito das interações entre o dendrímero PAMAM e o organismo biológico. Alguns estudos *in vivo* de biodistribuição têm demonstrado que o dendrímero PAMAM apresenta algumas propriedades não desejáveis para os biomateriais tais como citotoxicidade e caráter hemolítico [10]. Entretanto, o estudo da hemocompatibilidade envolvendo a adesão plaquetária e a adsorção de proteínas séricas não foi até este momento convenientemente explorado pela literatura.

## 2.6 – Considerações Parciais

O alto nível de controle sob a arquitetura molecular, seu tamanho, forma, densidade e funcionalidade tornam os dendrímeros PAMAM compostos altamente satisfatórios para uma gama de aplicações biomédicas.

A síntese de um dendrímero se dá através de dois métodos, divergente e convergente, sendo que no segundo, a ocorrência de defeitos é minimizada.

Devido à presença de grupos amino-terminais, o dendrímero de poli(amido amina) apresenta-se como um material promissor para aplicações em revestimentos a fim de minimizar a adsorção de proteínas do plasma sanguíneo humano (fibrinogênio). Ao mesmo tempo, pode promover a adsorção de HSA, uma proteína sérica que favorece as características hemocompatíveis das superfícies sintéticas.

As características físico-químicas de superfícies sintéticas as quais são de extrema importância para o processo de adsorção protéica e conseqüentemente para a análise da hemocompatibilidade de polímeros sintéticos será abordado no próximo capítulo.

## 2.7 – Referências bibliográficas

- [1] Bosman, A.W.; Janssen, H.M.; Meijer, E.W. About dendrimers: structure, physical properties, and applications. *Chemical Reviews*. 99: 1665-1688, 1999.
- [2] Disponível em: [www.ciencia.com-palavras.com/download/review-dendrimeros-Alexandre.pdf](http://www.ciencia.com-palavras.com/download/review-dendrimeros-Alexandre.pdf) (último acesso 01/08/2006).
- [3] Klajnert, B.; Bryszewska, M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*. 48: 199-208, 2001.
- [4] Montanari, M.L.C.; Montanari, C.A.; Piló-Veloso, D. Sistemas transportadores de drogas. *Química Nova*. 21: 470-476, 1998.
- [5] Vögtle, F.; Gestermann, S.; Hesse, R.; Schwierz, H.; Windisch, B. Functional dendrimers. *Progress in Polymer Science*. 25 987-1041, 2000.
- [6] Svenson, S.; Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 2106-2129, 2005.
- [7] de Queiroz, A.A.A., Abraham, G.A.; Román, J.S. Polyglycerol dendrimers: a new approach to design fibrinolytic coatings. *III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*. 1: 184-184, 2004.

- [8] Haag, R.; Frey, H.; Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible material. *Reviews in Molecular Biotechnology*. 90:257-267, 2002.
- [9] Disponível em: [http://nano.cancer.gov/objects/img\\_resource/dendrimer.jpg](http://nano.cancer.gov/objects/img_resource/dendrimer.jpg) (último acesso (15/12/2006).
- [10] Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R., Lorenz, K.; Frey, H.; Werner, J.W.; Meijer, E.W.; Paulus, W.; Duncan, R. Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of <sup>125</sup>I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release* 65: 133-148, 2000.

## Capítulo 3 – Físico-química da adsorção de Proteínas Séricas sobre Superfícies Sintéticas

---

### 3.1 – Processos de adsorção de proteínas em superfícies sintéticas

O processo de adsorção ocorre quando há uma retenção de um ou mais constituintes (adsorbato) de uma fase fluida (adsortivo) em uma superfície de fase sólida (adsorvente) devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente. O grau de adsorção depende da temperatura, da pressão e da área da superfície. Neste caso, as forças que atraem o adsorbato podem ser químicas ou físicas [1].

Na adsorção química, também conhecida como quimissorção, os átomos se ligam à superfície do adsorvente através da formação de ligações químicas, geralmente ligações covalentes, e estes tendem a se acomodarem em sítios que propiciem o maior número de coordenação possível com o substrato.

Já na adsorção física, também conhecida como fisissorção, as moléculas do adsorbato e do adsorbato interagem através de interações de van der Waals que, apesar de serem interações de longo alcance, são fracas e não formam ligações químicas e, também, através de interações eletrostáticas. A contribuição da força de van der Waals está sempre presente no processo de fisissorção enquanto que, a contribuição eletrostática é significativa apenas no caso de adsorbentes que possuem uma estrutura iônica.

Deste modo, nas vizinhanças da superfície do adsorbente ocorre uma mudança das propriedades da fase fluida, sendo esta região tratada como uma fase termodinamicamente diferente. Por isso, é conveniente considerar esta camada interfacial como sendo composta pela camada da superfície do adsorbente e o espaço de adsorção no qual o enriquecimento do adsorbato pode ocorrer. Sendo assim, pode-se definir a adsorção física como aquela que ocorre quando as forças intermoleculares de atração das moléculas na fase fluida e da superfície sólida são maiores que as forças atrativas entre as moléculas do próprio fluido. O calor de adsorção é pequeno e da mesma ordem de grandeza dos calores de condensação (de uns poucos quilojoules no máximo) [1].

Por outro lado, a quimissorção envolve a interação química entre o fluido adsorbido e o sólido adsorbente, conduzindo à formação de um composto químico de superfície ou complexo de adsorção. Neste caso, o calor de adsorção é da mesma ordem de grandeza dos

calores de reação química, variando de alguns quilojoules até, aproximadamente,  $400 \text{ kJ}$  [1]. Por esta razão, somente a adsorção física é apropriada a uma operação contínua em estágios. Além disso, na adsorção física podem formar-se camadas moleculares sobrepostas, enquanto que na adsorção química se forma uma única camada molecular adsorvida (monocamada) [1].

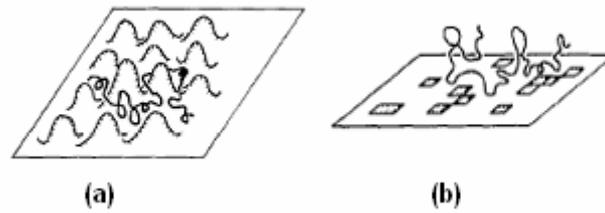
No processo de adsorção há uma diminuição da energia livre superficial do sistema sendo, portanto, um processo espontâneo, ou seja, a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é menor do que zero. Entretanto, há uma diminuição do número de graus de liberdade do sistema, pois as moléculas do adsorvato só podem se deslocar sobre a superfície do adsorvente, isto é, o a variação da entropia ( $\Delta S$ ) é menor do que zero. Como  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , a variação da entalpia ( $\Delta H$ ) será negativo, o que mostra que a adsorção é um processo exotérmico.

### **3.2 – Características da superfície sintética no processo de adsorção de proteínas séricas**

A maximização ou minimização das forças de interação entre proteínas séricas e materiais sintéticos depende de vários fatores, tais como: rugosidade da superfície sintética, densidade de carga da proteína e do material sintético (Potencial Zeta) e também da constante de ionização da proteína e do dendrímero. A seguir será descrito qual a importância destas características.

#### **3.2.1 – Rugosidade de Superfície**

O fenômeno de adsorção de polímeros sintéticos sobre superfícies metálicas é amplamente utilizado na confecção de sensores, imunossensores e biossensores [12]. No entanto, durante este processo há formação de rugosidades que modulam a capacidade do material de interagir com outros compostos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos. A origem dessa rugosidade pode ser química ou física, como ilustrado na Figura 3.1. No caso da rugosidade física a curvatura da superfície é uma variável randômica de modo que a superfície pode ser modelada consistindo de picos e vales. Já superfícies que apresentam rugosidade química há certas regiões da superfície que possuem mais afinidade ao polímero quando comparada com o resto da superfície [7].



**Figura 3.1** – Características de rugosidades em superfícies. (a) Rugosidade física. (b) Rugosidade química (Fonte: referência [7]).

O princípio físico da adsorção de polímeros é a competição entre o ganho de energia potencial obtido pelos monômeros ao se ligar com a superfície atrativa do suporte e a perda na entropia da cadeia associada com a redução no número de possíveis configurações das cadeias quando elas se encontram no estado adsorvido.

Quando a superfície apresenta certa rugosidade há três efeitos físicos principais que podem ocorrer: (i) O espaço deixado para a cadeia assumir várias configurações é maior perto do topo do pico que o espaço deixado na parte inferior do vale. Neste caso, considerando apenas a entropia do sistema, levaria a uma adsorção preferencial perto do pico. (ii) O número de contatos por cadeia com a superfície será maior no vale do que no pico. Portanto, considerando apenas a energia potencial a adsorção se daria preferencialmente no vale. (iii) A interação potencial entre os monômeros e a superfície é dependente da curvatura local que afeta as condições de contorno usadas para determinar o processo de adsorção característico [7].

Neste sentido, a rugosidade da superfície em que o material polimérico será adsorvido influencia na morfologia do filme polimérico que, por sua vez, altera o processo de adsorção protéica.

Em síntese, quanto maior for a rugosidade da superfície de um determinado substrato, maior é o favorecimento da adsorção de partículas sobre ela.

### 3.2.2 – Potencial Zeta

Quase todos os materiais macroscópicos adquirem uma carga elétrica superficial quando estão em contato com um meio polar (por exemplo, meio aquoso). O potencial Zeta,  $\zeta$ , é um indicador dessa carga e é importante nos estudos de química de superfície, visto que

pode ser usado para prever e controlar a estabilidade do processo de adsorção protéica em superfícies sintéticas.

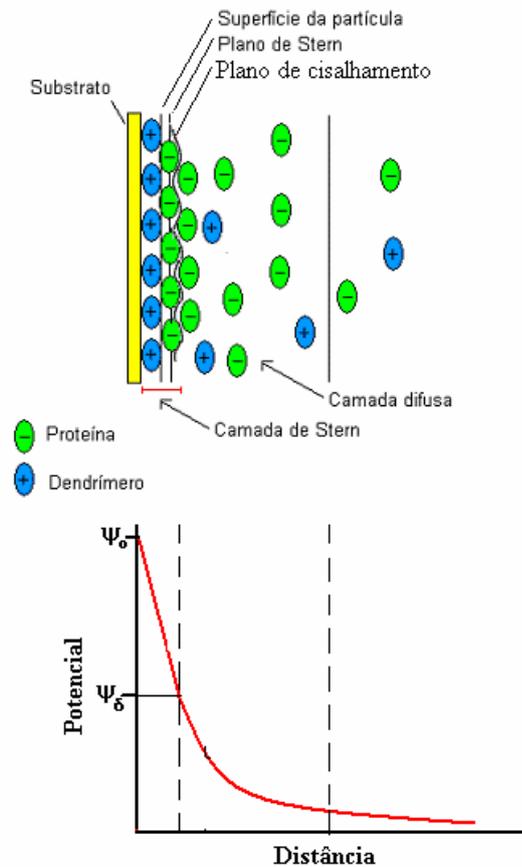
Estudos eletroquímicos onde há formação de interface entre metal e solução de eletrólitos representam uma aproximação do que ocorre nos sistemas partícula/meio aquoso e têm contribuído consideravelmente para o estudo das interfaces.

No presente trabalho, quando o dendrímero PAMAM é adsorvido sobre a superfície do eletrodo de ouro e é colocado em contato com a solução protéica ele se torna protonado na presença da molécula de água ( $R - NH_2 + H_2O \rightarrow R - NH_3^+ + OH^-$ ), formando uma camada de íons positivos sobre a superfície do eletrodo. Esta carga líquida afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície devido à presença de proteínas com carga líquida negativa (pH próximo a 7.4) presente na solução. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface do dendrímero com a solução (Figura 3.2). Segundo a teoria de Stern [9] essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons adsorvidos à superfície das partículas, chamada de camada de Stern, e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico, chamada de camada difusa. (Figura 3.2). A parte da dupla camada entre o plano no qual o dendrímero está localizado e o plano de Stern, que passa pelos contra-íons, é considerado um condensador molecular, no qual o potencial de superfície,  $\psi_o$ , decresce linearmente com a distância da superfície para um valor  $\psi_\delta$  no plano de Stern [9]. A densidade de carga nas camadas de Stern é dada por:

$$\sigma_1 = \frac{N_1 z e}{1 + \frac{N_A \rho}{M n} \exp\left[\frac{-(z e \psi_\delta + \phi)}{k T}\right]} \quad (3.1)$$

sendo  $N_1$  o número disponível de sítios, por  $cm^2$ , para adsorção de íons;  $N_A$  o número de Avogadro;  $M$  a massa molecular do solvente;  $n$  a concentração de íons ( $n = \text{moles/litro} \times n^\circ$  de Avogadro);  $\rho$  é a densidade do solvente;  $\psi_\delta$  é potencial elétrico no plano de Stern e  $\phi$  é o potencial de adsorção específica do contra-íon pelo colóide.

O potencial Zeta é o potencial elétrico na superfície de cisalhamento da dupla camada metálica. Ele se reduz a partir da superfície da partícula, e se torna zero onde a concentração de cargas elétricas são iguais.



**Figura 3.2** – Diagrama esquemático da formação de uma dupla camada metálica.

### 3.2.3 – Constante de ionização $pK$

Cada ácido tem uma tendência característica de perder o seu próton em solução aquosa. Quanto mais forte o ácido, maior a tendência para perder o seu próton. A tendência de qualquer ácido (HA) de perder um próton e formar a sua base conjugada ( $A^-$ ) é definida pela constante de dissociação ácida ( $K_a$ ) da reação. Seja a seguinte reação química arbitrária  $HA + H_2O \rightarrow H_3O^+ + A^-$ , a sua constante de equilíbrio será dada por:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (3.2)$$

A concentração da água é omitida da equação geral da constante de equilíbrio devido o seu alto valor (55.5 M) em relação as outras concentrações da expressão. Já a constante,  $pK_a$ , é definida como sendo o antilogaritmo da constante de dissociação ácida:

$$pK_a = -\log(K_a) \quad (3.3)$$

Quanto maior a tendência para dissociar um próton, mais forte é o ácido e menor o seu  $pK_a$ .

De forma análoga, a constante de ionização básica da base conjugada  $A^-$  para a seguinte reação química,  $A^- + H_2O \rightarrow HA + OH^-$ , é dado por:

$$K_b = \frac{[HA][OH^-]}{[A^-]} \quad (3.4)$$

Da mesma forma o valor de  $pK_b$  é descrito por:

$$pK_b = -\log(k_b) \quad (3.5)$$

O produto de  $pK_a$  por  $pK_b$  se mantém sempre constante. Além disso, a relação entre o  $pK_a$  e o pH de uma solução é dada pela equação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (3.6)$$

ou

$$pH = pK_b - \log \frac{[HA]}{[OH^-]} \quad (3.6a)$$

O valor da constante  $pK_a$  e  $pK_b$  influencia várias características dos compostos tais como a sua reatividade, solubilidade e propriedades espectrais (cor). Os valores de  $pK_a$  e  $pK_b$  de proteínas e aminoácidos que constituem as proteínas, são de extrema importância para a atividade de enzimas e a estabilidade de proteínas.

### 3.3 – As isotermas de adsorção

A adsorção pode ser avaliada quantitativamente através das isotermas. As isotermas derivadas teórica ou empiricamente podem, freqüentemente, ser representadas por equações simples que relacionam diretamente o volume adsorvido em função da pressão e/ou

concentração do adsorvato. As isotermas mais utilizadas no estudo da adsorção são as seguintes: Langmuir, Freundlich, Henry, Temkin, Giles e Brunauer, Emmett, Teller (BET) [3]. As isotermas de Langmuir e Freundlich serão detalhadas uma vez que são as mais utilizadas na modelagem da adsorção de proteínas séricas sobre superfícies sintéticas em função da homogeneidade/heterogeneidades superficiais.

### 3.3.1 – A isoterma de Langmuir

Este é o modelo mais simples de uma isoterma de adsorção. Segundo ele, a adsorção restringe-se a uma monocamada, havendo zonas localizadas de adsorção e sendo o calor de adsorção independente da quantidade de substância adsorvida. Inicialmente as seguintes considerações a respeito do processo de adsorção das proteínas séricas sobre superfícies sintéticas podem ser explicitadas:

- i - o sistema é ideal;
- ii - as moléculas são adsorvidas e aderem à superfície do adsorvente em sítios definidos e localizados, com adsorção em monocamada em superfície homogênea;
- iii - cada sítio pode acomodar uma, e somente uma, entidade adsorvida;
- iv - a energia da entidade adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende da presença ou ausência de outras entidades adsorvidas nos sítios vizinhos, ou seja, apresenta interação desprezível entre as moléculas adsorvidas.

A isoterma de Langmuir é a mais freqüentemente utilizada e pode ser expressa como [2,3]:

$$\frac{C}{m} = \frac{1}{bm_{\max}} + \frac{C}{m_{\max}}, \quad (3.7)$$

em que  $m$  é a quantidade de massa adsorvida,  $C$  a concentração da solução,  $b$  é o coeficiente de adsorção e  $m_{\max}$  é a quantidade máxima de material adsorvido na superfície sintética.

Um gráfico de  $C/m$  em função de  $C$  é uma reta cujos coeficientes angular e linear fornecem os parâmetros  $m_{\max}$  e  $b$ , respectivamente.

O parâmetro  $b$  está relacionado com a energia livre de Gibbs de adsorção,  $\Delta G_{ADS}$ , através da seguinte equação [2]:

$$b = \frac{1}{C_s} e^{\left(\frac{-\Delta G_{ADS}}{RT}\right)} \quad (3.8)$$

sendo  $C_s$  a concentração molar do solvente em  $mol/L$ . No presente trabalho foi utilizado  $C_s=55.5 mol/L$  que é a concentração molar da água. Valores de  $\Delta G$  negativos indicam que a reação é espontânea e valores positivos indicam que a reação é não espontânea.

Além disso, existe uma relação linear entre o coeficiente de adsorção,  $b$ , e a constante de equilíbrio de Langmuir,  $K_e$ , descrito pela equação (3.9):

$$K_e = m_{max} b \quad (3.9)$$

A constante de equilíbrio pode ser utilizada para determinar a entalpia de adsorção,  $\Delta H$ , segundo a equação de Clausius-Clapeyron:

$$K_e = A e^{\left(\frac{-\Delta H}{RT}\right)}, \quad (3.10)$$

sendo  $A$  uma constante empírica.

Vale ressaltar que valores da entalpia de adsorção,  $\Delta H$ , menores que  $10 kJ/mol$  correspondem a um processo de adsorção física ao passo que valores superiores a  $200 kJ/mol$  correspondem a um processo de adsorção química [10]. Os valores entre  $10 kJ/mol$  e  $200 kJ/mol$  não encontram-se bem definidos na literatura.

### 3.3.2 – A isoterma de Adsorção de Freundlich

A isoterma de Freundlich considera a adsorção em multicamadas e é útil para descrever a adsorção em superfícies altamente heterogêneas e, em muitos casos, fornece uma representação do equilíbrio de adsorção de um único soluto melhor do que a isoterma de Langmuir [3]. Matematicamente, esta isoterma é descrita por:

$$m = k_F C^{1/n} \quad (3.11)$$

em que  $m$  é a quantidade de massa adsorvida,  $C$  a concentração da solução,  $k_F$  é o coeficiente de adsorção e  $n$  é uma constante de linearidade que indica se o processo é favorável ou não. Valores de  $n$  no intervalo de 1 a 10 indicam que o processo é favorável.

A equação (3.11) pode ser linearizada, a fim de se obter os parâmetros  $k_F$  e  $n$  os quais são extremamente importantes para a análise do processo de adsorção, considerando o logaritmo na base 10 em ambos os lados da equação:

$$\log(m) = \frac{1}{n} \log(C) + \log(k_F), \quad (3.12)$$

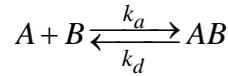
A equação de Freundlich sugere que a energia de adsorção decresce logaritmicamente, à medida que a superfície vai se tornando coberta pelo soluto, o que a diferencia da equação de Langmuir. O modelo de Freundlich pode ser derivado teoricamente ao se considerar que o decréscimo na energia de adsorção com o aumento da superfície coberta pelo soluto é devido à heterogeneidade da superfície [11].

### 3.4 – Cinética da interação bioespecífica

A caracterização da afinidade de uma biomolécula bem como o número de interações bioespecíficas é fundamental em muitas áreas de pesquisas biomédicas. Métodos que medem mudanças dos parâmetros óticos, tais como fluorescência e absorvância, podem ser utilizados para análise da cinética de reação. Contudo estes métodos requerem que um dos reagentes seja freqüentemente marcado com material radioativo ou fluorescente e, portanto, não mais na sua forma nativa. Já a detecção por ressonância de plásmon de superfície (RPS) nenhum produto radiativo é necessário para a realização do experimento. Quando o sensor é colocado em contato com o analito há três fases essenciais, nominalmente, associação do analito com o ligante; equilíbrio (se atingido), onde a taxa de analito ligado é balanceada com o complexo de dissociação; e dissociação do complexo analito-ligante devido à injeção da solução padrão imediatamente após o fim da injeção do analito.

Com a análise apropriada dos dados da ligação entre o adsorbato e o ligante, os parâmetros cinéticos e de afinidade podem ser obtidos por experimentos de RPS. Uma

interação de 1:1 entre um adsorbato (A) fluindo continuamente da solução para a superfície sintética (B) pode ser descrita por:



Considerando que na fase de associação, a superfície do sensor RPS é continuamente alimentada com solução do adsorbato livre e a quantidade de adsorbato ligado é negligenciada com respeito à concentração total, uma cinética de pseudo-primeira ordem pode ser assumida [4-7]. Assim, velocidade de formação do complexo AB é dada pela seguinte equação:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (3.13)$$

na qual, em termos de resposta RPS, pode ser expressa como [4-7]:

$$\frac{dm}{dt} = k_a C m_{\max} - (k_a C - k_d) m \quad (3.14)$$

sendo  $m$  a quantidade de massa adsorvida na superfície do sensor no tempo  $t$ ,  $m_{\max}$  é a capacidade máxima de ligação do adsorbato, a qual reflete o número de sítios de ligação do ligante, isto é, a massa ligante total,  $k_a$  é a constante da taxa de associação e  $k_d$  é a constante da taxa de dissociação.

Neste sentido, um gráfico de  $dm/dt$  contra  $m$  seria uma reta cujo coeficiente angular é  $-(k_a C - k_d)$  ou  $-k_s$ , onde  $k_s$  é a taxa de ligação aparente e o gráfico de  $k_s$  versus a concentração do adsorbato fornece uma reta cujo coeficiente angular é  $k_a$  e o coeficiente linear fornece  $k_d$ .

Resolvendo a equação (3.14) pode-se expressar a resposta do sensor RPS em função do tempo para a fase de associação como:

$$m = \frac{k_a C m_{\max} \left\{ 1 - e^{-((Ck_a + k_d)t)} \right\}}{k_a C + k_d} \quad (3.15)$$

Quando o equilíbrio é atingido, a taxa de ligação total ( $dm/dt$ ) é zero e, partindo da equação (3.11) obtêm-se:

$$k_a C(m_{\max} - R_{eq}) = k_d m_{eq} \quad (3.16)$$

sendo  $m_{eq}$  a massa total adsorvida no equilíbrio. Considerando que a constante de associação de afinidade ( $K_A$ ) é dada por  $k_a/k_d$ , a afinidade de ligação pode ser determinada das medidas de equilíbrio incluindo a constante de afinidade na equação (3.16) e rearranjando os termos:

$$\frac{m_{eq}}{C} = K_A m_{\max} - K_A m_{eq} \quad (3.17)$$

Assim, o gráfico de  $m_{eq}/C$  versus  $m_{eq}$  fornece  $K_A$  e  $m_{\max}$ . Durante a fase de dissociação, a solução contendo o analito é trocada por uma solução padrão (solução salina sem a proteína) e a concentração de adsorbato retorna a zero. Para um modelo cinético pseudo-primeira ordem, a dissociação do complexo pode ser descrita como:

$$\frac{dm}{dt} = -k_d m \quad (3.18)$$

a qual, após integração fornece:

$$\ln\left(\frac{m}{m_o}\right) = -k_d(t - t_o) \quad (3.19)$$

sendo  $m_o$  a resposta para uma dissociação inicial arbitrária no tempo  $t_o$ . Consequentemente, um gráfico de  $\ln(m/m_o)$  contra  $t$  fornece a constante de dissociação  $k_d$ .

Este modelo teórico básico é aplicado apenas quando a interação é homogênea e quando a cinética de primeira ordem é realmente observada.

### 3.5 – Considerações Parciais

A análise do processo de adsorção de proteínas séricas em superfícies sintéticas é de extrema importância para o desenvolvimento de novos materiais para revestimentos de dispositivos biomédicos e próteses cardiovasculares.

A análise do processo de adsorção permite quantificar a interação do material a ser analisado com proteínas presentes no plasma sanguíneo humano, o qual é o evento primário da cascata de coagulação sanguínea.

A espectroscopia RPS é atualmente uma das técnicas mais utilizadas na análise da cinética de adsorção de proteínas sobre superfícies sintéticas. No próximo capítulo será abordado em maiores detalhes os princípios físicos desta técnica e suas aplicações na biomedicina.

### 3.6 – Referências Bibliográficas

- [1] Castellan, G. Fundamentos de físico-química. *São Paulo: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora*. 1986.
- [2] Smiechowski, F. S.; Lvovich, V. F.; Roy, A.; Fleischman, A.; Fissell, W. H.; Riga, A. T. Electrochemical detection and characterization of Proteins. *Biosensors and Bioelectronics*. 22:670-677, 2006.
- [3] Bhattacharyya, K. G.; Sharma, A. Kinetics and thermodynamics of Methylene Blue adsorption on Neem (*Azadirachta indica*) leaf powder. *Dyes and Pigments*. 65:51-59, 2005.
- [4] Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J.B. Surface Plasmon Resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*. 21:1823-1835, 2000.
- [5] Morton, T. A.; Myszka, D. G.; Chaiken, I. M. Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical Biosensors: A Comparison of analysis by Linearization, the integrated Rate Equation, and Numerical Integration. *Analytical Biochemistry*. 227:176-185, 1995.
- [6] O’Shannessy, D. J.; Brigham-Burke, M.; Soneson, K. K.; Hensley, P.; Brooks, I. Determination of rate and equilibrium binding constants for Macromolecular Interactions using Surface Plasmon Resonance: Use of nonlinear Least Square Analysis Methods. *Analytical Biochemistry*. 227:176-185, 1995.
- [7] Baumgartner, A.; Muthukumar, M. Effects of surface roughness on adsorbed polymer. *Journal Chemistry Physics*. 5:4062-4071, 1991.
- [8] PDF disponível em: <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta%20potential%20An%20introduction%20in%2030%20minutes.pdf>
- [9] Aleoni, L. R. F.; Camargo, O.A. Modelos de dupla camada difusa de gouy-chapman e stern aplicados a latossolos ácidos paulistas. *Scientia Agricola*. 51:315-320, 1994.

- [10] PDF disponível em:  
[www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qf2/QF2/AulasPraticas2/Protocolos/ProtocoloAds.PDF](http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qf2/QF2/AulasPraticas2/Protocolos/ProtocoloAds.PDF)  
(último acesso:15/01/2006).
- [11] Alleoni, L.R.F.; Camargo, O.A.; Casagrande, J.C. Isotermas de langmuir e de freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. *Scientia Agricola*. 55, 1998.
- [12] Rodriguez-Mozaz, S.; Maria-Pilar M.; de Alda, M. J. L.; Barceló, D. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Applied Chemistry*. 76:723-752, 2004.

## Capítulo 4 – Fundamentos da Espectroscopia de Ressonância de Plásmem de Superfície

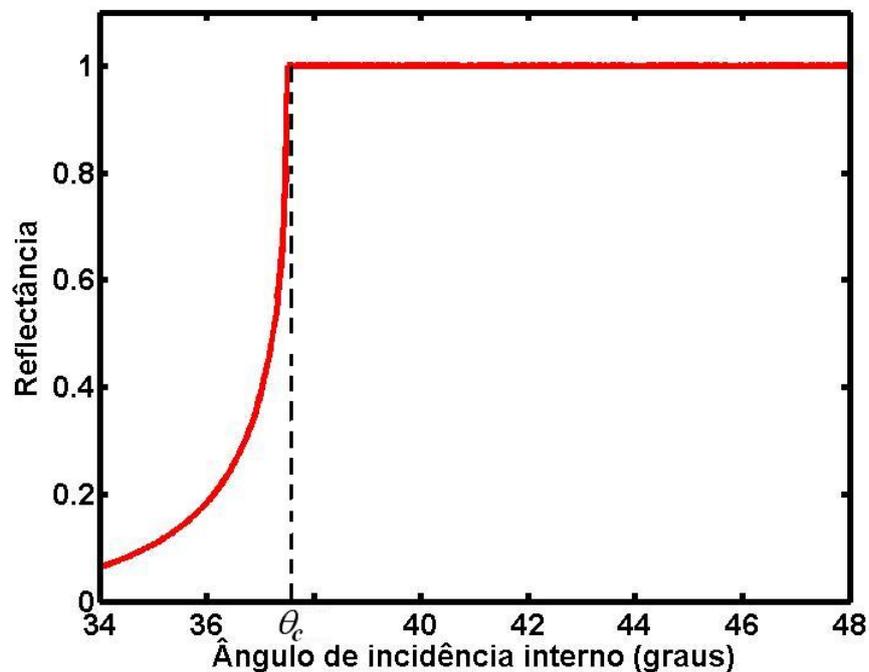
---

### 4.1 – Reflexão interna total

Quando um feixe de luz propagando através de um meio com alto índice de refração,  $n_1$  (prisma de vidro ou quartzo) encontra uma interface com um segundo meio que apresenta baixo índice de refração,  $n_2$ , o feixe de luz será totalmente refletido internamente para todos os ângulos incidentes maiores que um ângulo crítico,  $\theta_c$  (Figura 4.1):

$$\theta_c = \arcsen\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (4.1)$$

sendo  $\theta$  o ângulo entre o feixe incidente e o eixo normal no plano da interface. O fenômeno é conhecido como reflexão interna total (RIT).



**Figura 4.1** – Comportamento da reflectância em função do ângulo de incidência para uma interface prisma/ar. O ângulo crítico para o qual acontece o fenômeno RIT está representado pela linha tracejada.

Sendo totalmente refletido, o feixe incidente estabelece um campo eletromagnético que penetra a uma distância pequena no segundo meio, onde ele propaga paralelamente ao plano da interface. Este campo eletromagnético é chamado de onda evanescente. A intensidade do campo elétrico evanescente,  $I(z)$ , decai exponencialmente com a distância perpendicular  $z$  da interface [1]:

$$I(z) = I_o e^{-z/d} \quad (4.2)$$

sendo  $d$  a profundidade de penetração para ângulos de incidências  $\theta < \theta_c$  e luz de comprimento de onda  $\lambda_o$ :

$$d = \left( \frac{\lambda_o}{4\pi} \right) [n_1^2 \text{sen}^2(\theta) - n_2^2], \quad (4.3)$$

Observa-se que  $d$  é independente da polarização da luz incidente, mas depende do seu comprimento de onda. A intensidade do campo elétrico evanescente em  $z = 0$ ,  $I_o$ , depende de  $\theta$  e da polarização do feixe incidente. Quando o feixe é polarizado paralelamente ao plano da interface,  $I_o$  é dado por  $I_o^{//}$ :

$$I_o^{//} = \frac{I^{//} \{4 \cos^2(\theta) [2 \text{sen}^2(\theta) - n^2]\}}{n^4 \cos(\theta) + \text{sen}^2(\theta) - n^2} \quad (4.4)$$

Quando o feixe é polarizado perpendicularmente ao plano da interface, a intensidade do campo em  $z = 0$  é igual a:

$$I_o^\perp = \frac{I^\perp \{4 \cos^2(\theta)\}}{1 - n^2}. \quad (4.5)$$

As grandezas  $I^{//}$  e  $I^\perp$  são as intensidades dos feixes de luz incidente polarizados paralelamente e perpendicularmente ao plano da interface, respectivamente, e  $n = (n_2 / n_1) < 1$ . Portanto, as duas maiores características de ondas evanescentes são:

1. A profundidade da onda evanescente é tipicamente menor que o comprimento de onda, mas se estende em poucas centenas de nanômetros para dentro do dielétrico ( $n_2$ );
2. A intensidade do campo evanescente,  $I_o$ , para ângulos com poucos graus acima do ângulo crítico é várias vezes a intensidade incidente,  $I$ .

No entanto, quando um filme de metal fino é inserido na interface metal/dielétrico, um novo fenômeno chamado de Ressonância de Plásmons de Superfície (RPS) pode ocorrer. Tal fenômeno manifesta-se em superfícies metálicas e está diretamente relacionado com as propriedades óticas e estruturais na vizinhança da superfície [1-5].

#### 4.2 – Princípios físicos da Ressonância de Plásmon

Plásmons de superfície (PS) são oscilações eletromagnéticas confinadas à interface de separação entre um metal e um meio transparente e cujas características são fortemente dependentes dos parâmetros óticos dos dois meios, bem como da estrutura da interface.

Estas ondas de superfície eletromagnética, as quais possuem sua intensidade máxima sobre a superfície do metal, decaem exponencialmente em amplitude com o aumento da distância da interface.

A condição de ressonância associada à excitação de PS implica que, sob condições ideais de acoplamento, toda a energia do feixe de luz incidente na superfície metálica é transferida para a oscilação (Figura 4.4 b). Sendo essa uma onda confinada à interface metálica, isso implica que toda a energia inicialmente contida no feixe de luz incidente fica confinada a uma distância de aproximadamente um comprimento de onda, em relação à superfície. Essa característica traz conseqüências interessantes. Uma delas é o grande aumento na amplitude de campo elétrico na superfície em relação a amplitude de campo do feixe de luz incidente. Uma segunda conseqüência é a alta sensibilidade do efeito a variações minutas nas propriedades óticas na vizinhança da interface metálica. Essas propriedades têm sido freqüentemente exploradas por diversos pesquisadores no desenvolvimento de sistemas de microscopia ótica, dispositivos óticos e biosensores óticos.

### 4.2.1 – Métodos Práticos de Excitação de Plásmos de Superfície

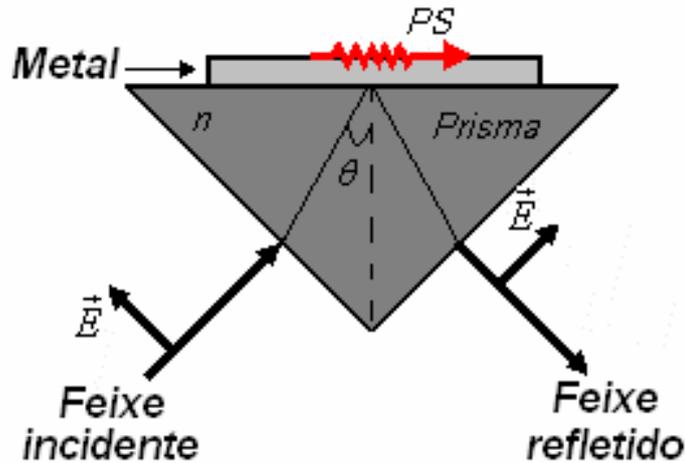
A permissividade elétrica  $\epsilon$  de metais utilizados em RPS para excitação de PS é uma função complexa que tem a parte real negativa na faixa de frequências inferiores à frequência de plasma.

Essa condição implica em uma restrição fundamental que governa a interação entre fótons e oscilações de PS. Desde modo, PS não podem ser gerados pela iluminação direta da superfície. Essa restrição pode ser contornada com a utilização de um prisma de acoplamento, cujo papel é aumentar a projeção na superfície do vetor de onda da luz incidente. Essa condição pode ser atingida iluminando-se internamente uma das faces do prisma, com um ângulo de incidência superior ao valor correspondente a reflexão interna total. Se um filme metálico cobre a face iluminada do prisma, torna-se possível acoplar a onda evanescente existente na condição de reflexão interna total com o PS na superfície externa do metal. Esse foi o esquema de acoplamento originalmente concebido por Kretschmann [6]. Efeito semelhante pode ser obtido se uma superfície metálica for posicionada a uma distância da ordem de um comprimento de onda da face internamente iluminada, conforme proposto por Otto [5]. A configuração adotada no estudo desenvolvido no presente trabalho é a configuração de Kretschmann, discutida a seguir.

### 4.2.2 – Configuração de Kretschmann

A configuração de Kretschmann é composta de um prisma de vidro com uma das faces em contato óptico com um filme fino metálico. A estrutura do filme define duas interfaces, ou seja, a interface prisma-metal e metal-ar, como mostrado na Figura 4.2. Essa configuração permite a determinação das constantes ópticas e espessura de filmes metálicos cuja espessura é da ordem de algumas dezenas de nanômetros.

Normalmente o filme metálico, utilizado nesse tipo de configuração não é depositado diretamente na face do prisma, para evitar danos a superfície. Substratos de vidro são utilizados para a deposição dos filmes e um líquido casador de índices de refração é empregado na região de ar formada entre substrato e prisma, para evitar reflexão interna total devido a não uniformidade das duas superfícies.



**Figura 4.2** – Configuração de Kretschmann para excitação de PS.

#### 4.2.3 – Configuração de Otto

A configuração de Otto para o acoplamento de luz ao PS utiliza o esquema ilustrado na Figura 4.3. Como pode ser observado, a superfície metálica fica posicionada a uma certa distância da face do prisma. Para que haja possibilidade de acoplamento de um feixe de luz iluminando a base do prisma é necessário que o meio de separação tenha índice de refração inferior àquele do prisma, permitindo assim que se atinja a condição de reflexão interna total necessária ao acoplamento da luz com o PS.

Um outro aspecto a ser considerado nessa configuração é que a distância de separação entre as superfícies do metal e do prisma é em geral da ordem de um comprimento de onda, uma vez que é essa a distância típica de penetração do campo do PS no meio adjacente ao metal [5].

Um aspecto que deve ser considerado na questão de acoplamento de luz com PS é a necessidade de utilização de luz polarizada no plano de incidência, definido como aquele que contém a direção normal à superfície do prisma e a direção do feixe incidente, uma vez que oscilações de PS exibem uma componente de campo elétrico normal à superfície do metal.

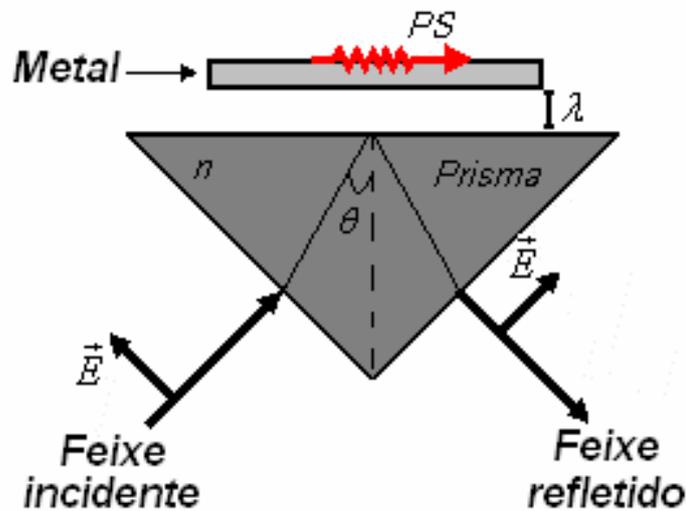


Figura 4.3 – Configuração de Otto para excitação de PS.

#### 4.2.4 – Aspectos físicos da configuração de Kretschmann

Plásmons de superfície em uma superfície plana metálica são modos eletromagnéticos não radiativos e como tal não podem ser excitados pela iluminação direta da superfície [11]. Uma forma possível de excitar PS em uma interface plana é a partir de um prisma de acoplamento, com uma das faces coberta com um filme metálico de espessura apropriada, de forma que um feixe de luz injetado em uma segunda face do prisma seja refletido na face metalizada, sob condição de reflexão interna total. Para uma determinada faixa de ângulos de incidência, acima da condição de reflexão interna total, parte da luz refletida é absorvida pelo PS (Figura 4.4).

A configuração mais popular é a configuração proposta por Kretschmann em 1971, na qual a onda eletromagnética proveniente da fonte de laser é acoplada aos PS por meio de um prisma de vidro (Figura 4.4). Nesta configuração, a relação de dispersão dos PS é obtida resolvendo as equações de Maxwell em cada meio e as suas respectivas condições de contorno (como apresentado no Apêndice A) e é matematicamente descrita por:

$$k_{PS} = \left( \frac{\omega}{c} \right) \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}}, \quad (4.6)$$

sendo  $\omega$  a frequência angular,  $c$  é a constante da velocidade da luz no vácuo,  $\epsilon_m$  é a constante dielétrica do metal e  $\epsilon_d$  é a constante dielétrica do dielétrico.

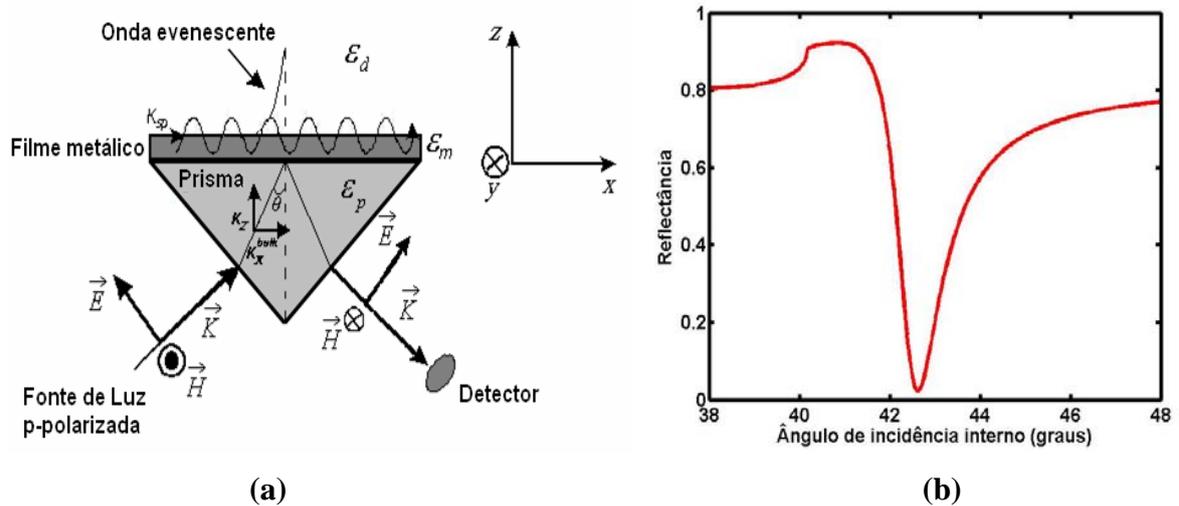
Através de uma relação trigonométrica elementar a componente  $x$  do vetor de onda proveniente da radiação incidente pode ser obtida como dado pela equação (4.7).

$$k_x = \left(\frac{\omega}{c}\right) \sqrt{\epsilon_d} \text{sen } \theta, \tag{4.7}$$

sendo  $\theta$  o ângulo da radiação incidente e  $\epsilon_p$  é a constante dielétrica do prisma. Quando o vetor de onda da radiação incidente for de igual magnitude do vetor de onda ( $k_{sp}$ ) dos PS ocorre o fenômeno de RPS (Figura 4.4 b). Matematicamente, descrito por:

$$\theta_R = \arcsen \left( \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{(\epsilon_d + \epsilon_m) \epsilon_d}} \right), \tag{4.8}$$

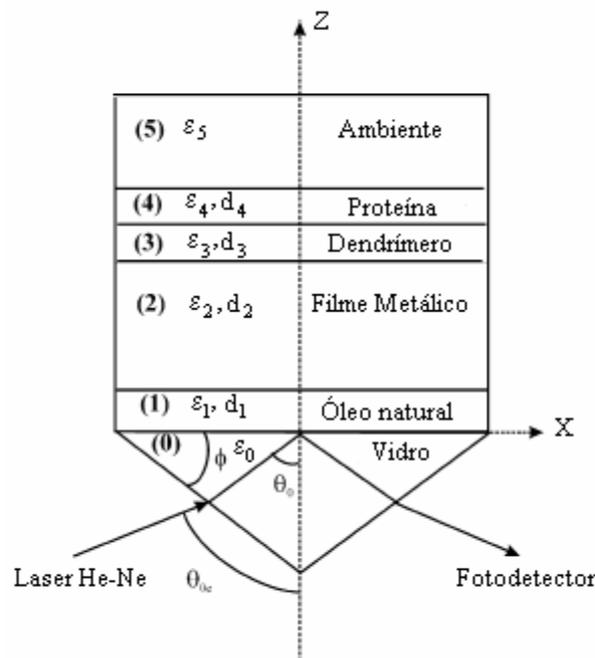
onde  $\theta_R$  é o ângulo incidente para o qual os PS entram em ressonância com a radiação incidente, chamado de ângulo ressonante.



**Figura 4.4** – (a) Diagrama representativo da configuração de Kretschmann para excitação de PS. A RPS é excitada em uma interface prisma/metal quando o ângulo de incidência da fonte de laser é tal que  $k_{sp} = k_x$ . (b) Espectro RPS característico para uma interface prisma/metal e metal/ar.

#### 4.4 – Determinação de parâmetros óticos para um sistema de cinco interfaces utilizando a aproximação lorentziana na configuração de Kretschmann

A estrutura geométrica considerada está ilustrada na Figura 4.6, sendo composta dos meios (0), (1), (2), (3), (4) e (5) que correspondem, respectivamente, as camadas de vidro, óleo natural com índice de refração próximo ao do vidro, filme metálico (Au, Ag, Cr), dendrímero (PAMAM), proteína e o ambiente. A propagação do feixe de luz monocromático plano-polarizado no sistema de multicamadas é descrito através do sistema cartesiano como mostrado na Figura 4.6. Os feixes de luz incidente e refletido estão contidos no plano  $xz$ , sendo  $\phi$  o ângulo da base do prisma. O ângulo de incidência externo,  $\theta_e$ , está relacionado com o ângulo de incidência interno,  $\theta_o$ , do prisma por  $\theta_e = \phi + \arcsen\left[\sqrt{\varepsilon_o} \sen(\theta_o - \phi)\right]$ . A constante dielétrica ( $\varepsilon_j$ ) e a espessura ( $d_j$ ,  $j=0,1,2,3,4,5$ ) de cada camada estão indicadas na Figura 4.5.



**Figura 4.5** – Diagrama representativo da estrutura de seis camadas para a estimativa dos parâmetros óticos de filmes ultrafinos utilizando a configuração de Kretschmann (Adaptado da referência [4]).

A refletância para um sistema de cinco interfaces pode ser aproximada por uma forma Lorentziana, quando o ângulo de incidência se aproxima da condição de ressonância, dada por [4]:

$$R(012345) \approx |r_{02}^o|^2 \left[ 1 - \frac{4K_0''K_1''}{\left\{ (k_x - K')^2 + K''^2 \right\}} \right], \quad (4.9)$$

com

$$k_x = \tilde{\omega} \sqrt{\varepsilon_0} \sin(\theta_o) \quad (4.10)$$

$$r_{02}^o = \frac{\varepsilon_2 k_{0z} - \varepsilon_0 k_{2z}}{\varepsilon_2 k_{0z} + \varepsilon_0 k_{2z}}, \quad (4.11)$$

$$k_{mz} = \sqrt{\tilde{\omega}^2 \varepsilon_m - k_o^x}, \quad \text{para } m=0,2 \quad (4.11a)$$

$$k_o^x = \tilde{\omega} \left( \frac{\varepsilon_2 \varepsilon_4}{\varepsilon_2 + \varepsilon_4} \right)^{1/2}. \quad (4.11b)$$

Sendo  $k_x$  a componente paralela do vetor de onda da radiação incidente através do prisma,  $r_{02}^o$  representa o coeficiente de reflexão para a interface 0-2 medida em  $k_x = k_o^x$ ;  $k_{mz}$  é a componente perpendicular do vetor de onda da interface no meio  $m$ . Os demais parâmetros são:

$$K = K' + iK'' = k_o^x + \Delta k_x^{(2)} + \Delta k_x^{(3)} + \Delta k_x^{(4)}, \quad (4.12)$$

com

$$\Delta k_x^{(2)} = \frac{2\tilde{\omega}r_{02}^o}{\left|\varepsilon_2'\right| + \varepsilon_4} \left( \frac{\left|\varepsilon_2'\right|\varepsilon_4}{\left|\varepsilon_2'\right| - \varepsilon_4} \right)^{3/2} \exp(\alpha), \quad (4.13)$$

$$\alpha = \frac{-2\tilde{\omega}d_2\left|\varepsilon_2'\right|}{\left(\left|\varepsilon_2'\right| - \varepsilon_5\right)^{1/2}}, \quad (4.13a)$$

$$\Delta k_x^{(3)} = \frac{i\left(\tilde{\omega}^2 d_3\right)\left(\varepsilon_2 - \varepsilon_5\right)\left(\varepsilon_3 - \varepsilon_5\right)}{\rho_{25}\varepsilon_3}, \quad (4.14)$$

$$\Delta k_x^{(4)} = \frac{i\left(\tilde{\omega}^2 d_4\right)\left(\varepsilon_2 - \varepsilon_5\right)\left(\varepsilon_3 - \varepsilon_5\right)}{\rho_{25}\varepsilon_4} \quad (4.15)$$

e

$$\rho_{25} = \frac{\left(\varepsilon_2^2 - \varepsilon_5^2\right)\left(\varepsilon_2 + \varepsilon_5\right)}{\left(\varepsilon_2\varepsilon_5\right)^{3/2}}. \quad (4.16)$$

Sendo  $K''$  o vetor de onda correspondente as perdas associadas a dissipação de energia no metal e da radiação dos PS de volta para o meio 0;  $K'$  a componente paralela do vetor de onda dos PS;  $k_o^x$  o vetor de onda complexo dos PS na interface metal/ambiente na ausência do prisma;  $\Delta k_x^{(2)}$ ,  $\Delta k_x^{(3)}$  e  $\Delta k_x^{(4)}$  representam a correção devido as perturbações causadas por todas as demais camadas entre a interface primária dos meios 2 e 5. Os símbolos ' e '' representam as partes real e imaginária das quantidades em questão.

Em um regime de pequenas perdas, uma aproximação de primeira ordem para as partes real e imaginária do vetor de onda PS leva a,

$$k_o'^x = \tilde{\omega} \left( \frac{\varepsilon_2 \varepsilon_5}{\varepsilon_2 + \varepsilon_5} \right)^{1/2}, \quad (4.17)$$

$$k_o''^x = k_o'^x \frac{\varepsilon_2 \varepsilon_5}{2\varepsilon_2(\varepsilon_2 + \varepsilon_5)}. \quad (4.18)$$

Como mostrado por Chen e Chen [9], em uma aproximação Lorentziana, o vetor de onda complexo dos PS,  $K$ , pode ser descrito na forma:

$$K = K_0 + K_1, \quad (4.19)$$

com

$$K_0 = K_0' + iK_0'' = k_o^x + \Delta k_x^{(3)} + \Delta k_x^{(4)} \quad (4.20)$$

e

$$K_1 = K_1' + iK_1'' = \Delta k_x^{(2)}. \quad (4.21)$$

$K_1$  representando a componente de perturbação do vetor de onda  $K$  na presença do prisma. As partes imaginárias de  $K_0$  e  $K_1$  representam o amortecimento intrínseco e da radiação, respectivamente.

Quando a condição de ressonância é satisfeita,  $k_x = K'$ , a reflectância atinge o seu valor mínimo dado por:

$$R_{\min}(012345) \approx \left| r_{02}^o \right| \left[ 1 - \frac{4\eta}{(\eta+1)^2} \right], \quad (4.22)$$

com,

$$\eta = \frac{K_0''}{K_1''}, \quad (4.23)$$

definido como o coeficiente de acoplamento dos PS conforme descrito por [7]. Para um ângulo de incidência tal que  $k_x = K' \pm |K''|$ , obtêm-se:

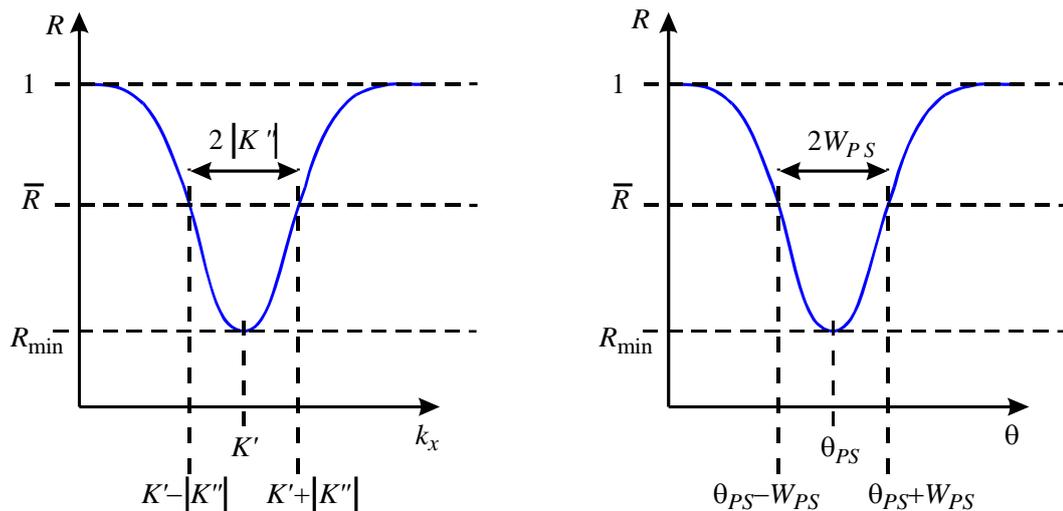
$$R = \bar{R} = |r_{02}|^2 \left[ 1 - \frac{1}{2} \frac{4K_0'' K_1''}{K''^2} \right]. \quad (4.24)$$

Substituindo a equação (4.22) em (4.24), o parâmetro  $\bar{R}$  pode ser expresso como:

$$\bar{R} = \frac{1}{2}(1 + R_{min}). \quad (4.25)$$

Esta grandeza representa a média aritmética entre os pontos de máximo e mínimo da reflectância, ocorrendo nos pontos de inflexão da curva.

A Figura 4.6 (a) apresenta a curva de ressonância representada no espaço  $k_x$ , já em (b), a dependência angular da reflectância.



**Figura 4.6 - (a)** Curva de ressonância representada no espaço  $k_x$ , **(b)** dependência angular da reflectância.

Observa-se, a partir das relações acima e da Figura 4.6 (a), que a largura de linha da ressonância é dada por  $2|K''|$ , e portanto o parâmetro  $|K''|$  representa a meia largura de linha da ressonância como já havia sido descrito [4,7]. A Figura 4.7b mostra a representação típica da reflectância obtida em experimentos de RPS. Esta é geralmente representada como função do ângulo de incidência. O mínimo da ressonância ocorre no ângulo  $\theta_{PS}$  e a largura de linha angular, medida entre os pontos de inflexão da curva é dada por  $2W_{PS}$ , com  $W_{PS}$  representando a meia largura.

Uma comparação direta das curvas mostradas na Figura 4.6 permite estabelecer a correspondência entre os parâmetros referentes ao vetor de onda do PS e as variáveis angulares. Com base na equação (4.10), obtém-se a seguinte relação:

$$K' = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\varepsilon_0} \text{sen } \theta_{PS} \quad (4.26)$$

Dessa última expressão, considerando-se o caso em que  $2W_{PS} \ll \theta_{PS}$ , a meia largura angular da curva da Figura 4.7 (b) fica diretamente relacionada ao parâmetro  $|K''|$  pela expressão,

$$|K''| \approx \frac{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}}{\lambda} W_{PS} \cos \theta_{PS}, \quad (4.27)$$

Neste caso, utilizou-se a aproximação  $\text{sen}(\theta_{PS} + W_{PS}) - \text{sen}(\theta_{PS} - W_{PS}) \approx 2W_{PS} \cos(\theta_{PS})$ , válida para  $2W_{PS} \ll \theta_{PS}$ . É importante salientar que a equação (4.27) corrige um erro obtido pelos autores da referência [7] e corrigido por Fontana [14].

#### **4.6 – Obtenção da estimativa inicial da espessura e permissividade complexa do filme metálico**

Uma vez definidos os parâmetros representativos da aproximação lorentziana para a RPS, é necessário obter a estimativa inicial para a espessura e partes real e imaginária do filme metálico e das camadas adjacentes. Assim, de posse dos valores medidos para  $\theta_{PS}$ ,  $W_{PS}$  e  $R_{min}$ , as expressões da seção anterior devem ser utilizadas para obtenção dessa estimativa inicial.

Para a obtenção da espessura e da constante dielétrica do filme metálico a variável responsável pela perturbação causada pelas camadas adjacentes pode ser simplificada por:

$$K_0 = K_0' + iK_0'' = k_o^x. \quad (4.28)$$

Observa-se nesta estimativa que as camadas (3) e (4) não estarão presentes. Neste caso, o procedimento pode ser facilmente realizado na aproximação em que  $|\varepsilon_2''| \ll |\varepsilon_2'|$  e pode ser sumarizado da seguinte forma:

- i.* Uma vez que o efeito dominante da espessura finita do filme é aumentar o grau de perdas do sistema e tendo esse efeito pouca influência na estimativa da condição de ressonância, as equações (4.17) e (4.26) podem ser utilizadas para obtenção da estimativa inicial do parâmetro  $\varepsilon_2'$ :

$$\varepsilon_2' = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_5 [\text{sen}(\theta_{PS})]^2}{\varepsilon_0 [\text{sen}(\theta_{PS})]^2 - \varepsilon_5}. \quad (4.29)$$

- ii.* Para estimar os valores de espessura e parte imaginária da permissividade do filme metálico, determinam-se inicialmente as duas soluções para o coeficiente de acoplamento, a partir do parâmetro  $R_{min}$ . Essas são as soluções, diretamente obtidas da equação de segundo grau correspondente à equação (4.22), ou seja,

$$\eta_{a,b} = \frac{|r_{02}|^2}{1 - R_{min}} \left[ (1 + R_{min}) \pm 2\sqrt{R_{min}} \right]. \quad (4.30)$$

- iii.* Para calcular a relação entre os amortecimentos intrínseco e da radiação com as variáveis angulares  $(\theta_{SP}, W_{SP})$  faz uso da parte imaginária da equação (4.19) junto com as equações (4.23) e (4.27). Assim,

$$K_0'' = \frac{\eta}{\eta + 1} \frac{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}}{\lambda} W_{PS} \cos \theta_{PS} \quad (4.31)$$

e

$$K_1'' = \frac{1}{\eta+1} \frac{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}}{\lambda} W_{PS} \cos \theta_{PS}, \quad (4.32)$$

Ressalta-se que existem duas soluções para cada uma das duas expressões anteriores dada pela equação 4.60. Esta ambigüidade na obtenção do coeficiente de acoplamento dos PS foi primeiro atacado por Chen e Chen [7] que sugeriram que uma forma para se contornar essa ambigüidade seria realizar duas medidas em comprimentos de onda distintos. Sob essas condições, sugerem os autores, a espessura deveria ser a mesma em ambas as medidas, e a solução correta do problema poderia ser obtida. No entanto, Robertson e Fullerton [10] também discutiram este problema considerando esta questão do ponto de vista das perdas de dissipação do metal e chegaram a conclusão que era necessário uma terceira medição em um terceiro comprimento de onda para levantar a ambigüidade no valor da espessura. Ao realizar estes experimentos os autores chegaram a conclusão que a solução a era a solução correta para o problema. Contudo Fontana e Neto [15] baseados nestes relatos chegaram a conclusão de que medidas de apenas um único comprimento de onda é suficiente para obtenção dos parâmetros do filme desde que a faixa angular de medição seja maior do que aquela em que ocorre o efeito de ressonância.

Tomando a parte imaginária da equação (4.28) e inserindo as expressões (4.18) e (4.31) a parte imaginária da permissividade complexa do filme metálico fica descrita como:

$$\varepsilon_2'' = \frac{2\varepsilon_2'(\varepsilon_2' + \varepsilon_5)}{K_0'\varepsilon_5} \frac{\eta}{\eta+1} \frac{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}}{\lambda} W_{PS} \cos(\theta_{PS}). \quad (4.33)$$

Combinando a parte imaginária da expressão (4.13) em conjunto com o parâmetro obtido na equação (4.32) a espessura do filme metálico pode ser explicitada na seguinte forma:

$$d_2 = \frac{\lambda}{4\pi} \frac{(|\varepsilon_2'| - \varepsilon_5)^{1/2}}{|\varepsilon_2'|} \ln \left\{ \frac{(\eta+1)\lambda}{2\pi\sqrt{\varepsilon_0}W_{PS} \cos \theta_{PS}} \left| \operatorname{Im} \left[ K_0 \left( \frac{2}{\varepsilon_2 + \varepsilon_5} \right) \left( \frac{\varepsilon_2\varepsilon_5}{\varepsilon_2 + \varepsilon_5} \right)^{3/2} \right] \right| \right\}. \quad (4.34)$$

As equações (4.29), (4.33) e (4.34), com o auxílio da equação (4.30) são as expressões que serão utilizadas na estimativa inicial da espessura e permissividade complexa dos filmes metálicos, necessários para a implementação do algoritmo de ajuste de curvas descrito na Seção (6.8).

#### 4.7 – Obtenção da estimativa inicial da espessura e constante dielétrica da camada dendrítica e protéica

No presente formalismo, a espessura da camada protéica adsorvida sobre o filme metálico foi explicitada combinando a parte imaginária da expressão (4.20) junto com a equação (4.31):

$$d_4(\theta_{PS}, R_{\min}, W_{PS}) = \left[ K_0''(\eta) - \left( k_o''^x + \Delta k_x''^{(3)} \right) \right] \cdot \delta, \quad (4.35)$$

com

$$\delta = \text{Im} \left[ \frac{\varepsilon_3 \rho_{25}}{i \tilde{\omega}^2 (\varepsilon_2 - \varepsilon_4)(\varepsilon_3 - \varepsilon_4)} \right] \quad (4.35a)$$

$$\eta = \left( \frac{\left( |r_{02}^o|^2 + R_{\min} \right) + 2 |r_{02}^o| \sqrt{R_{\min}}}{|r_{02}^o|^2 - R_{\min}} \right) \quad (4.36)$$

Para calcular a camada dendrítica adsorvida sobre o filme de ouro basta apenas negligenciar o parâmetro  $\Delta k_x''^{(3)}$  e trocar  $d_3$  e  $\varepsilon_3$  por  $d_4$  e  $\varepsilon_4$ , respectivamente. Note que esta nova expressão para calcular a espessura das camadas (3) e (4) depende de todas as variáveis angulares da curva de ressonância. Além disso, através deste formalismo proposto não é necessário uma curva de referência para estimar a espessura destas camadas ao contrário dos modelos vigentes na literatura [27]. As variáveis angulares podem ser obtidas através de um procedimento numérico iterativo conforme será apresentado na seção 6.8.

É necessário salientar que para um sistema de quatro ou cinco interfaces não é possível obter separadamente a espessura e a constante dielétrica da camada a ser analisada. Neste caso, o índice de refração do dendrímero PAMAM e das proteínas serão inicializadas no algoritmo apresentado na secção (6.8) com os valores obtidos experimentalmente através de um refratômetro de Abbe. A partir do índice de refração e da relação de Lorentz-Lorenz, dada pela equação 4.67, pode-se estimar o valor da constante dielétrica tanto do dendrímero quanto das proteínas considerando-os como substâncias semi-polares.

$$\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \quad (4.67)$$

É necessário salientar que esta relação só pode ser utilizada uma vez que nem o dendrímero nem as proteínas séricas utilizadas durante os ensaios absorvem na região do comprimento de onda do laser ( $632.8 \text{ nm}$ ).

Além disso, será utilizado o método das correções diferenciais para minimizar o erro quadrático médio entre as curvas teórica e experimental a fim de obter a estimativa mais precisa do filme dendrítico adsorvido na superfície do metal e das proteínas adsorvidas na superfície deste filme.

## **4.8 – Aplicações da espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície**

### **4.8.1 – Caracterização de propriedades ópticas e estruturais de filmes finos**

Kretschmann [16] em 1972 investigou a dependência angular da luz espalhada de filmes finos ligeiramente rugosos sob condição de excitação ressonante de PS. A característica de alta intensidade de campo, associada à oscilação, foi utilizada para detectar, com relativa facilidade, a distribuição de luz espalhada e a partir daí inferir valores aproximados para as dimensões típicas das irregularidades nas superfícies estudadas. No entanto, o modelo teórico que utilizava uma aproximação em primeira ordem para o efeito das irregularidades não podia explicar satisfatoriamente as dependências angulares da luz espalhada e da reflexão especular da superfície.

A partir dos resultados de Kretschmann [16], vários trabalhos foram então desenvolvidos com o objetivo de utilização de RPS na determinação de rugosidade de filmes metálicos, podendo-se destacar aqueles de Braundmeier and Tomascheke [17] (1975), Simon

e Guha [18] (1976), no aspecto experimental e no aspecto teórico, os trabalhos de Toigo e outros [19]; e Fontana e Pantell [20], no desenvolvimento de formulação teórica para modelar a influência da rugosidade na dispersão de plásmons de superfície.

Chen e Chen [7] em 1991 analisaram o problema de determinação simultânea das constantes ópticas e espessura de filmes finos a partir de experimentos de RPS na configuração de Kretschmann, e desenvolveram um modelo teórico, a partir do qual esses parâmetros poderiam ser determinados através de um procedimento de ajuste numérico. Fontana [24] utilizando os princípios delineados nas referências [7] e [20] desenvolveu o protótipo de um sistema óptico operando no comprimento de onda de 670 nanômetros com o objetivo de determinar simultaneamente espessura, constantes ópticas e parâmetros de rugosidade de superfícies de filmes de ouro e prata. Observações das topografias das superfícies, com o emprego de um microscópio de força atômica confirmaram os valores das dimensões típicas de irregularidades medidas pelo sistema óptico [21].

#### **4.8.2 – Análise em tempo real de reações imunológicas**

O alto grau de sensibilidade do efeito de RPS foi explorado por diversos pesquisadores no desenvolvimento de sistemas ópticos de medição em tempo real de reações imunológicas. O elemento básico de transdução nesses sistemas envolve um filme de ouro ou prata, caracterizado por exibir RPS quando iluminado por luz monocromática polarizada e recoberto com uma monocamada de macromoléculas biológicas denominadas de anticorpos. Essas proteínas têm dimensão típica de alguns nanômetros e são sintetizadas pela maioria dos seres vivos. Detecção de antígenos com marcadores fluorescentes ou radioativos é uma técnica comumente utilizada em laboratórios e clínicas para o diagnóstico de doenças.

Quando uma camada de antígenos é formada na superfície metálica, e exposta a um fluido biológico contendo o anticorpo correspondente, ocorre uma reação imunológica altamente específica na superfície. O efeito resultante dessa reação é o crescimento de um filme orgânico que afeta a condição de ressonância e que pode ser detectado com alta sensibilidade pelas variações do sinal refletido da superfície. Esse foi o princípio básico proposto por Liedberg e outros [22] e Flanagan e Pantell [23] no início da década de 80 para o desenvolvimento de uma nova classe de sistemas ópticos que possibilitassem não só a detecção de reações imunológicas sem o emprego de marcadores fluorescentes ou radioativos, como também a possibilidade de uso da técnica para a caracterização em tempo real da reação. Esse último aspecto é de vital importância, uma vez que a caracterização da cinética

da reação é uma ferramenta freqüentemente utilizada para a otimização dos processos de sintetização, em laboratório, de reagentes biológicos e de novas drogas na indústria farmacêutica.

A partir dos trabalhos contidos nas referências [22] e [23] teve início uma intensa investigação por diversos grupos de pesquisa para o aprimoramento da técnica e otimização da interface metal/filme orgânico. Este aprimoramento permitiu a eliminação do efeito de componentes não específicos da reação e melhoria do limite de detecção, o que possibilitou o emprego de RPS na detecção específica de macromoléculas em uma mistura biológica mais complexa. Como fruto dessa intensa investigação, foi lançado em 1990 o primeiro sistema comercial de tempo real para caracterização de reações imunológicas, baseado em RPS. O sistema batizado com a sigla BIACORE, foi desenvolvido por pesquisadores da multinacional Pharmacia, com um investimento estimado da ordem de US\$ 1 bilhão.

Uma tendência natural que surgiu a partir do fenômeno de RPS para análises de interações biomoleculares foi à possibilidade de miniaturização do elemento óptico responsável pelo acoplamento entre luz polarizada e o filme metálico. Em 1989 [24] foram propostas duas configurações em fibra óptica capazes de permitir a excitação de PS em filmes metálicos. Nessas configurações o papel do prisma de acoplamento, convencionalmente utilizado em experimentos de RPS, seria desempenhado pela fibra óptica, cujas propriedades de guiamento óptico sob condição de reflexão interna total são equivalentes àsquelas do prisma.

Dentre os diversos trabalhos podem-se citar aqueles de Fontana [24-26] no desenvolvimento teórico e experimental de uma fibra monomodo tendo uma das extremidades cortada em um ângulo particular, na qual o filme metálico deveria ser depositado.

Versões comerciais dessa classe de sensores foram lançadas no mercado a partir de 1997 pela *Texas Instruments* e pela *BIACORE* para aplicação na análise cinética em tempo real de reações biológicas.

#### **4.9 – Considerações Parciais**

Devido à extrema sensibilidade na variação dos parâmetros óticos da interface metal/dielétrico e ainda pela possibilidade de obter resultados em tempo real, a espectroscopia de Ressonância de Plásmos de Superfície tornou-se uma dos principais métodos para o estudo de propriedades óticas de filmes finos bem como de interações biomoleculares.

A partir de uma modelagem matemática relativamente simples é possível quantificar a interação entre proteínas do plasma sanguíneo e dendrímeros utilizando para tanto, um aparato experimental de fácil implementação e de baixo custo.

Apesar de o fenômeno RPS ter sido primariamente empregado para o estudo de caracterização de propriedades óticas e estruturais de filmes finos, hoje em dia há uma grande variedade de aplicações deste fenômeno no que diz respeito tanto à ciência básica quanto no desenvolvimento de dispositivos óticos de alta tecnologia.

No próximo capítulo, será descrito em detalhes o aparato experimental utilizado no presente trabalho para a excitação de PS em filmes finos de ouro bem como a sua utilização na análise da hemocompatibilidade de dendrímeros PAMAM.

#### 4.10 – Referências bibliográficas

- [1] Carvalho Gomes, P. A. SPR as a tool in the functional analysis of an immunodominant site in FMDV. *Tese de Doutorado*. Universidade de Barcelona, 2000.
- [2] Zayats, A. V.; Smolyaninov, I. I.; Maradudin, A. A. Nano-optics of surface plasmon polaritons. *Physics Reports*. 408: 131-314; 2005.
- [3] Jackson, J. D. Classical Electrodynamics. *New York: John Wiley*. 1963; 641 p.
- [4] Roy, D. Optical characterization of multi-layer thin films using the surface plasmon resonance method: a six-phase model based on the Kretschmann formalism. *Optics Communications*. 200: 119-130, 2001.
- [5] Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators*. 54: 3-15, 1999.
- [6] Kretschmann, E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen, *Zeitschrift für Physik*. 241:313-324, 1971.
- [7] Chen, W. P.; Chen, J. M. Use of surface plasma waves for determination of the thickness and optical constants of thin metallic films. *Journal of the Optical Society of America*.; 71:189-191, 1981.
- [8] Fontana, E. Analysis of optical surfaces by means of surface plasmon spectroscopy. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. 45:399-405, 1996.
- [9] Jorgenson, R. C.; Yee, S. S. A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B*. 12:213-220; 1993.

- [10] Robertson, W. M.; Fullerton, E. Reexamination of the surface-plasma-wave technique for determining the dielectric constant and thickness of metal films. *Journal of the Optical Society of America B*. 6:435-536, 1989.
- [11] Disponível em: <http://physics.mtsu.edu/~wmr/wmr.html> (último acesso em 01/12/2006).
- [12] Kurosawa, K., Pierce, R. M.; Ushioda, S. Ramam scattering and attenuated-total-reflection studies of surface plasmon polaritons. *Physical Review B*. 33: 789-798, 1986.
- [13] Roy, D. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Dielectric Coated Gold and Silver Films on Supporting Metal Layers: Reflectivity Formulas in the Kretschmann Formalism. *Applied Spectroscop.* 55:1046-1055, 2001.
- [14] Fontana, E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics*. 45:7632-7642, 2006.
- [15] Fontana, E.; Neto, J. O. M. Sobre a ambigüidade na determinação de parâmetros de filmes finos em experimentos de RPS. *IX Simpósio Brasileiro de Microondas e Optoeletrônica (João Pessoa, Brasil)*, 2000.
- [16] E, Kretschmann. The angular dependence and the polarisation of light emitted by surface plasmons on metals due to roughness. *Optics Communications*. 5:331-336, 1972.
- [17] Braundmeier, A. J.; Tomascheke, H. E. Observation of the simultaneous emission of roughness-coupled and optical-coupled surface plasmon radiation from silver. *Optics Communications*. 14:99-103, 1975.
- [18] Simon, H. J.; Guha, J. K. Directional surface plasmon scattering from silver films. *Optics Communications*. 18:394-394, 1976.
- [19] Toigo, F.; Marvin, A.; Celli, V.; Hill, N. R. Optical properties of rough surfaces: general theory and the small roughness limit. *Physical Review B*. 15: 5618-5626; 1977.
- [20] Fontana, E., Pantell, R. H. Characterization of multilayer rough surfaces by use of surface-plasmon spectroscopy. *Physical Review B*. 37:3164-3182, 1988.
- [21] Fontana, E., Analysis of optical surfaces by means of surface plasmon spectroscopy. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. 45:399-405, 1996.
- [22] Liedberg, B.; Nylander, C.; Lündstrom, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators B*. 4: 299-304, 1983.
- [23] Flanagan, M. T.; Pantell, R. H. Surface plasmon resonance and immunosensors. *Electronics Letters*. 20:968-970, 1984.
- [24] Fontana, E.; Pantell, R. H.; Strober, S. Surface plasmon immunoassay. *Applied Optics*. 29: 4694-4704, 1990.

- [25] Fontana, E. A theoretical analysis of the coupling of light to surface plasmon oscillations at the edge of a slab waveguide. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*. 46: 234-241, 1998.
- [26] Fontana, E.; Dulman, H. D.; Doggett, D. E.; Pantell, R. H. Surface plasmon resonance on a single mode optical fiber. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. 47:168-173, 1998.
- [27] de Bruijin, H. E.; Altenburg, B. S. F. Determination of thickness and dielectric constant of thin transparent dielectric layers using Surface Plasmon Resonance. *Optics Communications*. 82:425-432, 1990.

## Capítulo 5 – Objetivos

---

O estudo de novos materiais sintéticos que possam ser utilizados na biomedicina é de extrema importância para o desenvolvimento de dispositivos biomédicos que entram em contato o sangue durante o uso clínico. Tais dispositivos têm como principal objetivo aumentar a qualidade de vida da população em geral.

Embora existam hoje vários materiais sintéticos que são utilizados em larga escala na biomedicina, estes materiais requerem a utilização de anticoagulantes que muitas das vezes proporcionam efeitos colaterais graves.

Os dendrímeros; sistemas cuja estrutura biomimética é rica em grupos funcionais que podem ser facilmente ativáveis por mecanismos da química orgânica despontam como um horizonte promissor na química supramolecular para a obtenção de revestimentos para próteses cardiovasculares.

Observa-se na literatura que os ensaios de hemocompatibilidade de dendrímeros ainda são escassos embora esta seja uma propriedade fundamental quando estes são utilizados para o projeto de sistemas de liberação de fármacos, área esta a mais explorada atualmente para a aplicação do PAMAM na área biomédica.

A adsorção protéica é o primeiro fenômeno investigado quando um polímero sintético é colocado em contato com o fluído biológico. A fenomenologia do processo de adsorção protéica sobre superfícies sintéticas é amplamente estudado pela literatura por técnicas que envolvem a marcação da biomolécula com  $^{125}\text{I}$  ou mesmo através da lei de Lambert-Beer onde a absorvância e a concentração são diretamente proporcionais.

O objetivo geral do presente trabalho é o estudo da hemocompatibilidade do dendrímero PAMAM utilizando a espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície. Neste sentido, a hemocompatibilidade do dendrímero PAMAM foi estudada *in vitro* levando-se em consideração a interação do dendrímero com as proteínas séricas albumina e fibrinogênio bem como a adesão plaquetária.

Para a realização dos objetivos gerais os objetivos específicos podem ser resumidos da seguinte forma:

- Desenvolver uma configuração de um aparato experimental de fácil implementação, baseado na configuração de Krestchmann, capaz de excitar plásmons de superfície interfaciado com um software (Phywe) para armazenamento dos dados;

- Desenvolver um procedimento numérico concomitantemente com um modelo matemático baseado no modelo proposto por Chen e Chen (1981) em linguagem MATLAB 7.0 para leitura e extração de parâmetros óticos de filmes finos metálicos e dielétricos;
- Estudar a hemocompatibilidade de filmes finos do dendrímero PAMAM através de espectroscopia RPS levando em consideração sua possível utilização no revestimento de dispositivos biomédicos e próteses cardiovasculares;
- Analisar a hemocompatibilidade de filmes finos do dendrímero PAMAM através de ensaios de adesão plaquetária a fim de complementar os resultados obtidos através da técnica RPS;
- Por fim, compreender os mecanismos de interação e o processo de adsorção entre proteínas séricas e dendrímeros de poli(amido amina) (PAMAM).

## Capítulo 6 – Materiais e Métodos

---

### 6.1 – Síntese do dendrímero PAMAM

Neste trabalho, o dendrímero poli(amido amina) PAMAM foi sintetizado via rota divergente utilizando como precursor um monômero tipo AB<sub>2</sub> resultante da condensação de Michael entre o acrilato de metila e o ácido 4-amino-benzóico [3,4]. A reação de polimerização foi efetuada a 160 °C por 30h em atmosfera de argônio. O produto obtido foi purificado por diálise e solubilizado em metanol a 10%.

Para controle do índice de polidispersão e peso molecular, o dendrímero PAMAM foi purificado por cromatografia de permeação em gel (GPC). A espectroscopia UV/Vis (Varian 634) foi utilizada para investigação das propriedades eletroópticas.

O dendrímero PAMAM também foi estudado por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para identificação dos grupos funcionais presentes na macromolécula e confirmação da estrutura dendrítica do polímero.

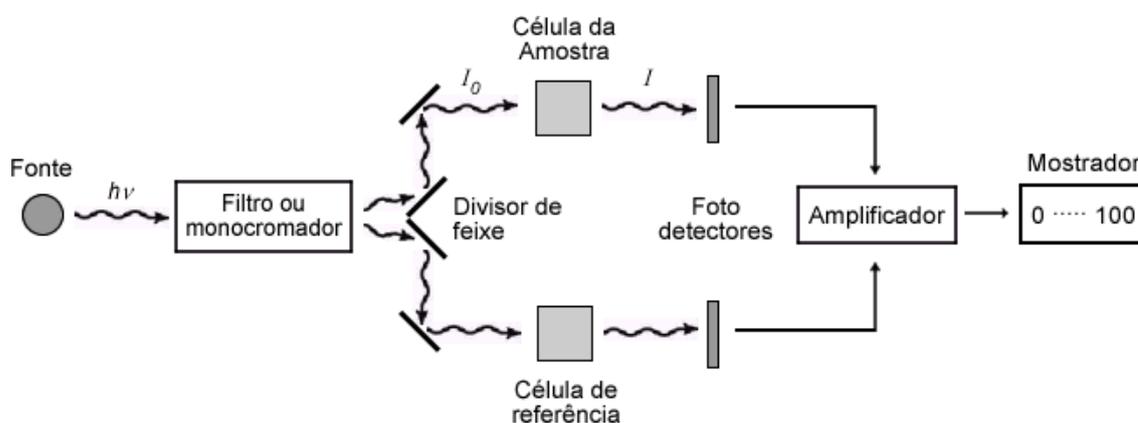
### 6.2 – Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Na região espectral do ultravioleta-visível (1500 a 7000 Å), a radiação promove a transição de elétrons do estado fundamental para estados eletrônicos excitados. Ocorre absorção de radiação quando a energia da mesma for igual à diferença de energia entre dois estados eletrônicos [1,5]. A espectroscopia de absorção no UV-visível compara a intensidade de um feixe de luz transmitido através de uma amostra, com a intensidade incidente e os dados experimentais são expressos em termos da intensidade absorvida em função do comprimento de onda da radiação. Em muitas moléculas orgânicas e sintéticas que apresentam ligações duplas envolvendo átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio, o arranjo eletrônico é tal que as diferenças de energia entre o estado fundamental e os primeiros estados excitados corresponde à região do UV-visível e, assim, elas podem ser estudadas pela espectroscopia de absorção óptica [1,5].

O espectrofotômetro UV-visível consiste de uma fonte de radiação eletromagnética, um conjunto de componentes ópticos que levam esta radiação até a amostra, um compartimento de amostra e um ou mais detectores que medem a intensidade de radiação.

A Figura 6.1 apresenta um diagrama esquemático do espectrofotômetro utilizado no trabalho para análise das amostras. Um feixe de luz na região espectral UV-vis é produzido por uma fonte com o auxílio de um filtro ou monocromador e dividido em dois raios separados por um divisor de feixes. Um passa pela amostra, e o outro por uma referência que é normalmente a substância na qual a mostra está dissolvida ou misturada. Em seguida os feixes passam por fotodetectores de sinal e referência e então são amplificados. A diferença entre o fotodetector de sinal e de referência é então apresentado em um mostrador digital.

A espectroscopia de absorção UV-visível é muito utilizada para obter a concentração de substâncias presentes na amostra e a estimativa da diferença de energia entre os orbitais moleculares de fronteira HOMO e LUMO do material a ser analisado.



**Figura 6.1** – Diagrama representativo de um espectrofotômetro de absorção no UV-vis (Fonte: referência [5]).

Para se determinar a concentração de substâncias presentes na amostra são realizados ensaios com diferentes concentrações do material no comprimento de onda de máxima absorção do mesmo e, então, é medido a absorvância. Através destes dados é construída uma curva da absorvância em função da concentração, chamada de curva de calibração. A lei que rege esta relação é a Lei de Lambert-Beer, descrita matematicamente por:

$$A = \log \left( \frac{I_0(x)}{I_t(x)} \right) = \varepsilon dc, \quad (6.1)$$

onde  $A$  é a absorvância medida,  $I_0$  é a intensidade da luz monocromática incidente,  $I$  é a intensidade transmitida pela amostra,  $d$  é o caminho óptico pela amostra (distância que a luz

percorreu por ela),  $\epsilon$  é uma constante conhecida como absorvividade molar (a qual depende da substância a ser analisada), e  $c$  é a concentração da substância.

O espectro eletrônico do dendrímero PAMAM foi obtido através de uma varredura entre 200 nm e 1000 nm a temperatura ambiente (25 °C) utilizando um espectrofotômetro UV/Vis Varian Serie 643 (200 nm a 400 nm) e um espectrofotômetro UV/Vis Biospectro SP-22 (400 nm a 100 nm) (Figura 6.2).



**Figura 6.2** – Espectrômetro UV/Vis Varian Serie 643 (A) e Biospectro SP-22 (B) utilizados para obtenção do espectro UV/Vis.

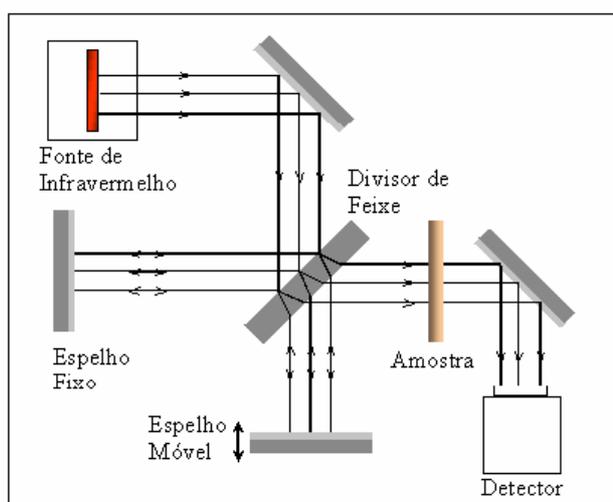
### 6.3 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) baseia-se nas frequências fundamentais das ligações químicas existentes em macromoléculas orgânicas e inorgânicas. Quando a radiação na região espectral do infravermelho interage com moléculas contidas na amostra produz um tipo de alteração no comportamento vibracional e rotacional da mesma. Este tipo de alteração é devido às ligações químicas das moléculas possuírem frequências vibracionais específicas (“impressão digital”) dentro da região espectral do infravermelho [4,8]. Neste sentido, as vibrações moleculares são aproximadas pelo modelo do Oscilador Harmônico Simples (OHS) e a frequência fundamental da ligação pode ser dada pela *Lei de Hooke* de acordo com a expressão (6.2):

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (6.2)$$

sendo  $\nu$  é a frequência de vibração fundamental,  $c$  é a constante da velocidade da luz,  $k$  é a constante de força da ligação química e  $\mu = m_1 m_2 / m_1 + m_2$  é a massa reduzida do sistema ( $m_1$  e  $m_2$  são as massas dos átomos envolvidos na ligação química).

O sistema ótico utilizado para quantificar os espectros vibracionais de moléculas é denominado por espectrofotômetro FTIR. Ele é baseado no interferômetro de Michelson conforme ilustrado na Figura 7.3. O interferômetro consiste em uma fonte de radiação na região espectral do infravermelho, divisor de feixe, espelhos e fotodetectores. A luz proveniente da fonte de radiação, depois de colimada por um espelho incide no divisor de feixes e é separada em dois feixes que são novamente refletidos (um deles pelo espelho fixo e o outro pelo espelho móvel) em direção ao divisor de feixes. Desta forma, quando estas duas partes se recombinaem ocorre um processo de interferência. O resultado desta interferência dependerá da diferença entre os caminhos ópticos percorridos por cada feixe (que é determinada pela distância dos espelhos móvel e fixo ao divisor de feixe). À medida que o caminho óptico varia (devido ao movimento do espelho), a intensidade da interferência também varia. Dessa forma, após a radiação passar pelo sistema ótico é direcionada para a amostra e a luz transmitida pelo material é focalizada sobre um detector, onde é convertida em um sinal digital. Um diagrama da intensidade da radiação em função da diferença de caminho óptico (entre os espelhos móvel e fixo) é chamado de interferograma. Finalmente, o espectro infravermelho pode ser obtido a partir da transformada de Fourier do interferograma.



**Figura 6.3** – Diagrama representativo do espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier.

#### 6.4 – Ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ )

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode ser considerada a técnica mais importante para a investigação a nível molecular, pois ela permite obter informações sobre a estrutura da amostra em qualquer estado da matéria [9,10]. Além do mais, como os átomos de hidrogênio aparecem abundantemente nos materiais orgânicos, a ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) é muito utilizada na caracterização desses materiais. A técnica se baseia no fato dos núcleos de  $^1\text{H}$  possuírem momentos magnéticos diferentes de zero. Os momentos magnéticos dos átomos podem se orientar em campos magnéticos sendo, esta orientação, dependente da energia dos núcleos bem como do campo magnético externo. Dessa forma, uma dada amostra vai apresentar absorção em vários valores de frequência, cada valor correspondendo a um certo tipo de átomo ao qual está ligado o hidrogênio [9,10].

As seguintes informações podem ser obtidas num espectro de  $^1\text{H-NMR}$ :

1. O número de sinais que indica o número de hidrogênios em ambientes químicos diferentes.
2. A área de cada sinal que é proporcional ao número de hidrogênios de cada tipo de ambiente.
3. A posição dos sinais que indica o ambiente químico de cada hidrogênio.
4. A forma do sinal que mostra o número de hidrogênios vizinhos ao núcleo considerado.
5. A distância entre as linhas do sinal que informa a intensidade da interação do spin do núcleo considerado em relação aos seus vizinhos.

Neste trabalho, o dendrímero de poli(amido amina) foi caracterizado por espectroscopia de RMN de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) utilizando-se um equipamento Bruker 300 MHz do Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros do “Consejo Superior de Investigación Científica” – ICTP/CSIC-Madri/Espanha, instituto este onde o orientador desta dissertação, prof. Alvaro A.A. de Queiroz é pesquisador visitante. A Figura 6.4 ilustra os equipamentos de RMN utilizados neste trabalho.



**Figura 6.4** – Equipamento de RMN Bruker 300 MHz (A) e Bruker 500 MHz (B) do ICTP/CSIC. Nota-se em (B) a introdução da amostra no equipamento de RMN.

### 6.5 – Cromatografia de permeação em gel

O peso molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros de maior importância para a determinação e explicação do comportamento físico destes sistemas macromoleculares. Dendrímeros de peso molecular muito baixo geralmente não apresentam as propriedades mecânicas desejáveis para a área médica enquanto que os de peso molecular muito elevado são muito pouco solúveis e geralmente, não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma técnica que tem sido destacada como fundamental para a ciência macromolecular. Esta técnica de separação foi introduzida por Moore em 1964 para a determinação da distribuição de pesos moleculares de um polímero [11,12]. A técnica GPC utiliza colunas empacotadas com géis de poliestireno ou polietileno glicóis reticulados de diferentes porosidades constituindo a fase estacionária. O polímero dissolvido em um solvente conveniente é separado de acordo com seu volume hidrodinâmico, ou seja, moléculas pequenas tendem a permanecer na fase estacionária enquanto que moléculas grandes são excluídas preferencialmente da fase estacionária. Os detectores utilizados podem ser do tipo refratométricos, UV ou IR, dependendo da natureza do polímero.

A eficiência do processo de separação é função do volume de retenção (ou eluição) ( $V_R$ ) e da massa molar do material. O volume de retenção por sua vez é função do volume intersticial  $V_o$  e o volume do poro acessível no gel, ou seja:

$$V_R = V_o + K_D V_i \quad (6.3)$$

sendo  $V_i$  o volume interno total do poro e  $K_D$  é o coeficiente de partição entre  $V_i$  e a porção acessível para um dado soluto.

Quando  $K_D = 0$  (moléculas grandes) implica em  $V_R = V_o$ , ocorrendo uma eluição rápida da coluna. Para moléculas pequenas que penetram no volume do poro,  $K_D = 1$  e a eluição da coluna é mais lenta. Esta técnica está limitada a moléculas onde  $V_R \leq V_o$  ou,  $V_R \geq V_o + V_i$ .

Uma vez que o peso molecular de um polímero determinado por GPC não representa o seu valor absoluto sendo neste caso, um valor obtido com base em uma curva de calibração de polímeros de conhecidos pesos moleculares, pode-se escrever:

$$\log[\eta]_s M_s = \log[\eta]_u M_u \quad (6.4)$$

sendo  $[\eta]$  e  $M$  a viscosidade intrínseca e a massa molar do polímero, respectivamente. Os índices  $s$  e  $u$  representam o padrão e a amostra em análise, respectivamente.

Desde que os volumes hidrodinâmicos da amostra e do padrão não são necessariamente iguais, tem-se que  $[\eta]_s = K_s M_s^{v_s}$  e  $[\eta]_u = K_u M_u^{v_u}$ . A massa molar da amostra  $u$  pode ser determinada a partir de [10]:

$$\log M_u = \frac{1}{1 + v_u} \cdot \log \left[ \frac{K_s}{K_u} \right] + \frac{1 + v_s}{1 + v_u} \log M_s \quad (6.5)$$

Freqüentemente as curvas de calibração são construídas a partir de poliestireno (PS) ou poli(etileno glicol) (PEG) uma vez que o peso molecular absoluto destes polímeros é bem conhecido. O peso molecular absoluto de um polímero pode ser determinado a partir de técnicas como o espalhamento de luz e a osmometria

O equipamento GPC utilizado no presente trabalho foi o modelo da Waters 510 conforme ilustrado pela Figura 6.5.

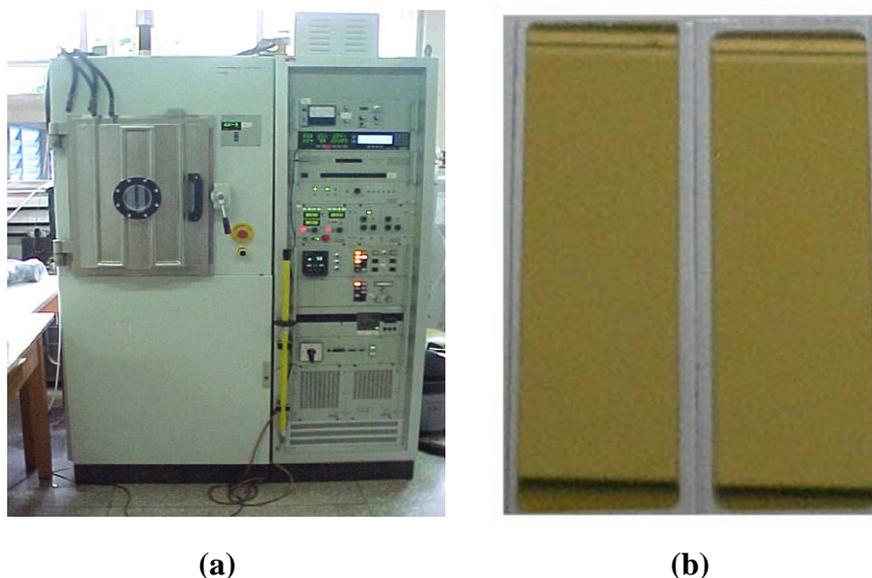


**Figura 6.5** – Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 510 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/ SP.

## 6.6 – Síntese e caracterização do eletrodo

### 6.6.1 – Filmes finos de ouro evaporados sobre um substrato de vidro

Neste trabalho foram evaporados filmes finos de ouro sobre um substrato de vidro utilizando uma Evaporadora *Balzer PLS500* (Figura 6.6a) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo. Os filmes de ouro foram evaporados em uma atmosfera de argônio sob uma pressão de  $4 \times 10^{-4}$  mbar. Foi utilizada uma camada extremamente fina de aproximadamente 2-3 nanômetros do isolante  $Y_2O_3$  (óxido de ítrio) como uma camada ligante a fim de proporcionar uma maior adesão do filme de ouro no substrato de vidro (lâmina de microscópio). Os parâmetros óticos desta fina camada de óxido de ítrio não foram levados em consideração na estrutura de multicamadas uma vez que o seu efeito é insignificante para esta espessura. A Figura 6.6b apresenta uma fotografia dos filmes finos de ouro evaporados na superfície do substrato obtidos neste trabalho.



**Figura 6.6** – (a) Foto digital da Evaporadora Balzer PLS500 do IPEN. (b) Lâminas de vidro de microscópio com ouro evaporado em sua superfície.

As propriedades óticas dos filmes fino de ouro evaporados sobre os substratos de vidro foram caracterizadas através de espectroscopia RPS.

#### **6.6.2 – Filmes de PAMAM G4 adsorvidos sobre o filme fino de ouro**

O substrato de vidro com o filme fino de ouro evaporado em sua superfície foi imerso, durante cinco minutos, em uma solução de poli(amido amina) dendrítico G4 (geração 4) solubilizado em metanol. A concentração da solução de PAMAM utilizada foi de 0,6334 mg/mL. A Figura 6.7 ilustra o procedimento experimental utilizado para a deposição de filmes finos de PAMAM sobre substratos de ouro.

Após a adsorção do PAMAM sobre o filme de ouro, o substrato foi seco a temperatura e atmosfera ambiente (25 °C, 90,66 kPa) e, em seguida, as propriedades óticas do filme adsorvido foram caracterizadas por espectroscopia RPS.

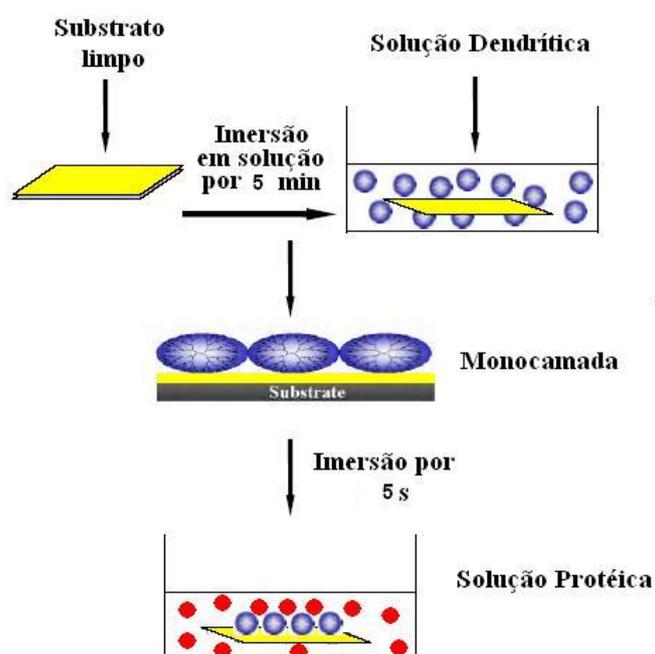
#### **6.6.3 – Filmes de BSA adsorvidos sobre o filme de PAMAM**

O substrato com o filme de PAMAM adsorvido sobre o filme fino de ouro, foi imerso em soluções de albumina de soro bovino (BSA) e soro fisiológico de 0.9 % de NaCl com

diferentes concentrações. As concentrações das soluções de BSA utilizadas foram de 1,4; 2,8; 4,2; e 5,6 mg/L.

Para a construção da curva de calibração, o substrato ficou imerso por um período de 5 segundos em cada solução de BSA. Já para a curva de adsorção de albumina em função do tempo, o substrato foi imerso na solução de BSA com concentração de 1,4 mg/L em intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20, 30 e 40 segundos.

Após a adsorção da BSA sobre o filme de PAMAM, o eletrodo foi seco a temperatura e atmosfera ambiente para que, em seguida, as propriedades óticas dos filmes adsorvidos fossem caracterizadas através do método de espectroscopia RPS. A Figura 6.7 ilustra o procedimento experimental adotado.



**Figura 6.7** – Diagrama representativo do procedimento experimental para a adsorção de filmes dendríticos sobre substratos de ouro e adsorção de proteínas sobre a superfície dendrítica.

#### 6.6.4 – Filmes de HFb adsorvidos sobre o filme de PAMAM

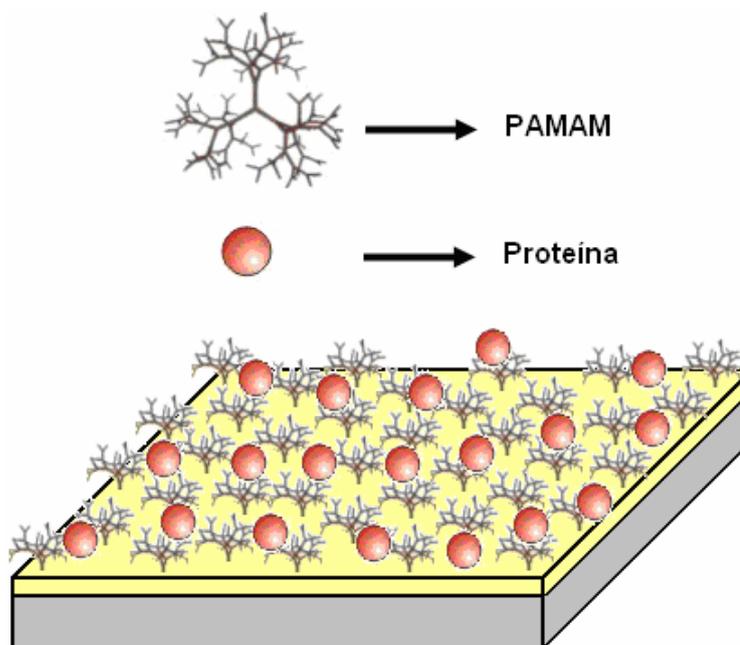
O substrato com o filme de PAMAM adsorvido sobre o filme fino de ouro, foi imerso em soluções de fibrinogênio de soro humano (HFb) e soro fisiológico de 0,9 % NaCl com diferentes concentrações. As concentrações das soluções de BSA utilizadas foram de 0,12;

0,24; 0,36; e 0,48 *mg/L*. A concentração de HFb foi cerca de doze vezes menor que a concentração de BSA uma vez que essa proporção é a mesma encontrada no plasma sanguíneo humano.

Para a construção da curva de calibração, o substrato ficou imerso por um período de 5 segundos em cada solução de HFb. Já para a curva de adsorção de albumina em função do tempo, o substrato foi imerso na solução de BSA com concentração de 0,12 *mg/L* em intervalos de tempo de 5, 10, 15, 20, 30 e 40 segundos.

Após a adsorção do HFb sobre o filme de PAMAM, o eletrodo foi seco a temperatura e atmosfera ambiente para que, em seguida, as propriedades óticas dos filmes adsorvidos fossem caracterizadas através do método de espectroscopia RPS.

O resultado final do eletrodo para a análise por RPS é apresentado na Figura 6.8. A proteína em vermelho representa ambos, BSA e HFb.



**Figura 6.8** – Diagrama representativo do eletrodo para as análises por RPS.

### 6.6.5 – Ensaio de adesão plaquetária do dendrímero PAMAM

A fim de se observar a deposição dos elementos sanguíneos no revestimento dendrítico após exposição ao sangue, as superfícies dos substratos de vidro revestidos com o

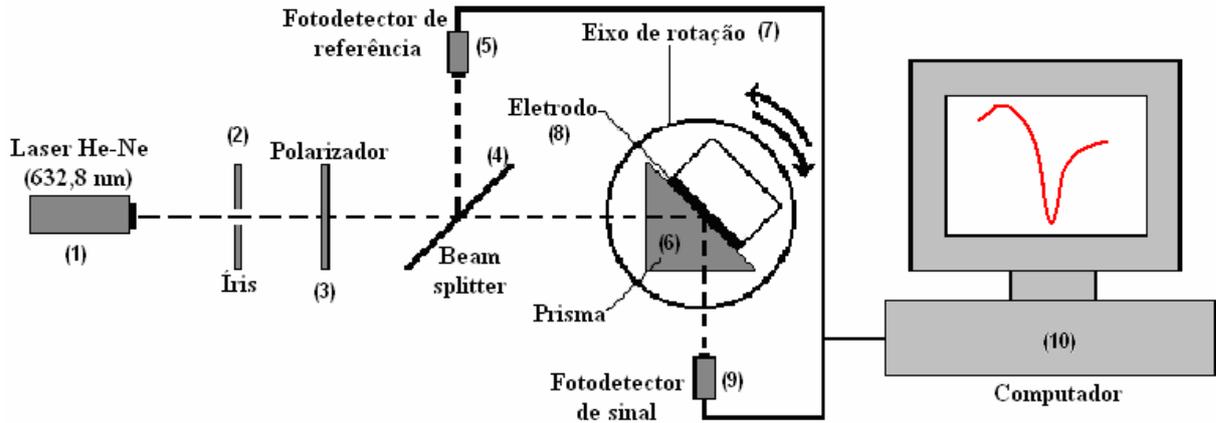
dendrímero PAMAM (através de técnica de spin-coat) e não revestidos foram analisadas por microscopia de epifluorescência.

Os substratos de vidro revestidos com o dendrímero PAMAM e não revestidos foram fixados em placas de Petri contendo solução salina 0,2M e em seguida o sistema foi ambientado em estufa a 37 °C e 1 atm. Após os substratos ficarem imersos em sangue humano (coletado na hora do ensaio) por 3 minutos a 37 °C os substratos foram lavados com solução salina 0,2 M, pH 7,4 para interrupção das cinéticas de adesão plaquetária. Em seguida, as amostras foram imersas em glutaraldeído a 2,5% por 10 minutos a 25 °C e foram desidratadas com etanol a concentração de 50%, 75% e 95%, por 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. Em seguida os substratos foram secos sob vácuo a 25 °C. As superfícies foram então molhadas com o corante alaranjado de acridina (10 g/mL), cobertas com lamínulas e observadas diretamente em um microscópio Zeiss axiomat plano apochromatic com excitação 470 nm, emissão 550 nm e filtro 09.

### **6.7 – Montagem do Aparato Experimental RPS: Sistema de medida e Aquisição de dados**

O sistema RPS utilizado para o estudo da interação de proteínas do plasma sanguíneo e o dendrímero PAMAM biofuncionalizado baseia-se na configuração de refletância total atenuada desenvolvida por Kretschmann. A Figura 6.9 apresenta o diagrama representativo do aparato experimental utilizado para as análises das amostras.

Inicialmente, o feixe de luz proveniente da fonte de laser (1) atravessa o polarizador (2) e logo em seguida passa pela íris polarizado (3) no plano óptico do conjunto prisma/eletrodo (4). Posteriormente, o feixe de luz polarizado é dividido em duas componentes pelo *beam splitter* (divisor de feixe), uma em direção do eixo de rotação (5) e outra para o fotodetector de referência (6). A parte da fonte de luz transmitida incide na interface prisma/eletrodo e é coletada pelo fotodetector de referência. O eixo de rotação é varrido de 30 a 70 graus e então os dados dos fotodetectores de sinal e de referência são coletados pelo software de aquisição dos dados. Finalmente, os dados coletados são quantificados através do programa computacional desenvolvido em ambiente MATLAB 7.0 descrito na seção (6.9).



**Figura 6.9** – Diagrama representativo do sistema óptico utilizado no laboratório de Biomateriais na Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) para análise de hemocompatibilidade de materiais poliméricos.

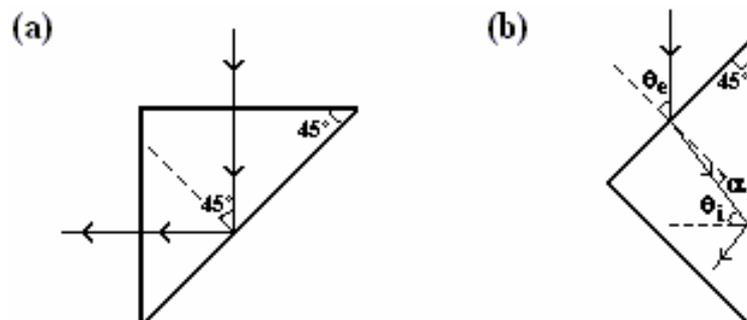
Os elementos que constituem o aparato experimental são:

1. Laser de He-Ne: apresenta um comprimento de onda de 632,8 nm e uma potência de saída de 1,2 mW.
2. Polarizador: é utilizado para polarizar o feixe de luz corretamente no plano de incidência.
3. Íris: esta componente apresenta uma abertura variável que é utilizada para bloquear ruídos espaciais do feixe de luz proveniente do laser.
4. *Beam splitter*: é um espelho parcialmente transmissivo. Ele é colocado inclinado em cerca de 45° na linha óptica do feixe incidente de tal forma que ele reflita uma amostra do feixe incidente para o fotodetector de referência. A parte do feixe incidente que é transmitido pelo *beam splitter* incide na superfície do prisma.
5. Fotodetector de referência: é utilizado para monitorar o nível de potência do laser de forma a eliminar efeitos decorrentes de flutuações no nível de potência.
6. Prisma reto: esta componente é utilizada para permitir o acoplamento do feixe de luz incidente em uma de suas faces aos plásmos de superfície (PS) na superfície do filme metálico.
7. Eixo de rotação: é o elemento de suporte do prisma de acoplamento. Ele é utilizado para ajustar o ângulo de incidência do feixe incidente em relação à direção normal a superfície do prisma. Com esta componente conseguimos determinar o valor do ângulo com uma precisão de 0,05 grau.

8. Eletrodo: é um elemento de extrema importância para a sensibilidade do nosso sensor. O filme fino metálico é depositado sobre um substrato de vidro que é colocado em contato óptico com uma das faces do prisma. Sobre o filme fino metálico é imobilizada uma camada do dendrímero PAMAM.
9. Fotodetector de sinal: é utilizado para medir o nível de potência da luz refletida na interface prisma/eletrodo. No início de cada medida o fotodetector de referência é posicionado na linha óptica da entrada para a calibração do sinal de entrada com relação ao medido pelo fotodetector de referência. Uma vez realizada essa calibração, o valor absoluto da reflectância pode ser medido pela razão entre os sinais gerados nos fotodetectores de sinal e de referência.
10. Computador: este componente é utilizado como sistema de aquisição de dados. Os fotodetectores de silício são conectados ao microcomputador através de uma interface de medida cobra 3 da PHYWE (empresa multinacional de equipamentos para laboratórios de física, química e biologia). Estes dados são então registrados através do software de medidas *Measure 4.2.1.2*.

### 6.8 – Determinação experimental do índice de refração do prisma

Um procedimento importante para a determinação dos parâmetros ópticos é a medida do índice de refração do prisma cujo valor influencia diretamente no cálculo do ângulo de ressonância  $e$ , conseqüentemente, no cálculo da espessura e da constante dielétrica do filme metálico, filme dendrítico e protéico. A expressão matemática que relaciona o índice de refração do prisma ( $n$ ) com os ângulos externos ( $\theta_e$ ) e interno ( $\theta_i$ ) pode ser determinada através da Figura 6.10.



**Figura 6.10** – Prisma reto ajustado para (a) o ângulo externo nulo e (b) um ângulo externo  $\theta_e$  graus.

Quando o feixe de luz incide sobre uma das faces do prisma reto, de tal forma que o ângulo externo seja nulo, Figura 6.7 (a), o ângulo de incidência interno é igual a  $45^\circ$ . Se for aplicada uma pequena rotação nesse prisma, a refração do feixe de luz nessa face dará origem a um ângulo  $\alpha$  que, no caso do prisma reto, se relaciona com o ângulo interno  $\theta_i$  pela seguinte equação matemática:

$$\theta_i = 45^\circ + \alpha . \quad (6.6)$$

Aplicando a lei de Snell nessa face do prisma, obtém-se:

$$\alpha = \arcsen\left(\frac{\text{sen}(\theta_e - 45^\circ)}{n}\right). \quad (6.7)$$

Substituindo a equação (6.7) na equação (6.6), tem-se:

$$\theta_i = 45^\circ + \arcsen\left(\frac{\text{sen}(\theta_e - 45^\circ)}{n}\right). \quad (6.8)$$

Entretanto, o índice de refração desse prisma pode ser obtido através do ângulo externo correspondente a condição de reflexão interna total (RIT), matematicamente expresso por:

$$\theta_i = \theta_{RIT} = \arcsen\left(\frac{1}{n}\right). \quad (6.9)$$

Fazendo-se algumas operações algébricas com as equações (6.8) e (6.9), obtém-se a expressão matemática para o índice de refração do prisma utilizado no aparato experimental:

$$n = \left[ 1 + \left( 1 - \sqrt{2}(\theta_{e,RIT} - 45^\circ) \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (6.10)$$

onde  $\theta_{e,RIT}$  é o ângulo externo correspondente a reflexão interna total na face da hipotenusa do prisma reto.

## 6.9 – Procedimento numérico para obtenção de parâmetros óticos de filmes ultrafinos

Nesta secção será descrito o programa computacional, implementado em linguagem *MATLAB 7.0*, para obtenção da espessura e constantes óticas de filmes ultrafinos metálicos e dielétricos. Este programa consiste na estimativa inicial da espessura e das constantes óticas (índice de refração, constante dielétrica) dos filmes metálicos e dielétricos depositados na superfície do eletrodo. A partir dessa estimativa inicial é executado o método das correções diferenciais em um processo iterativo até que o erro absoluto quadrático entre as curvas teórica e experimental seja mínimo.

### 6.9.1 – Procedimento numérico para obtenção de parâmetros óticos de filmes finos metálicos

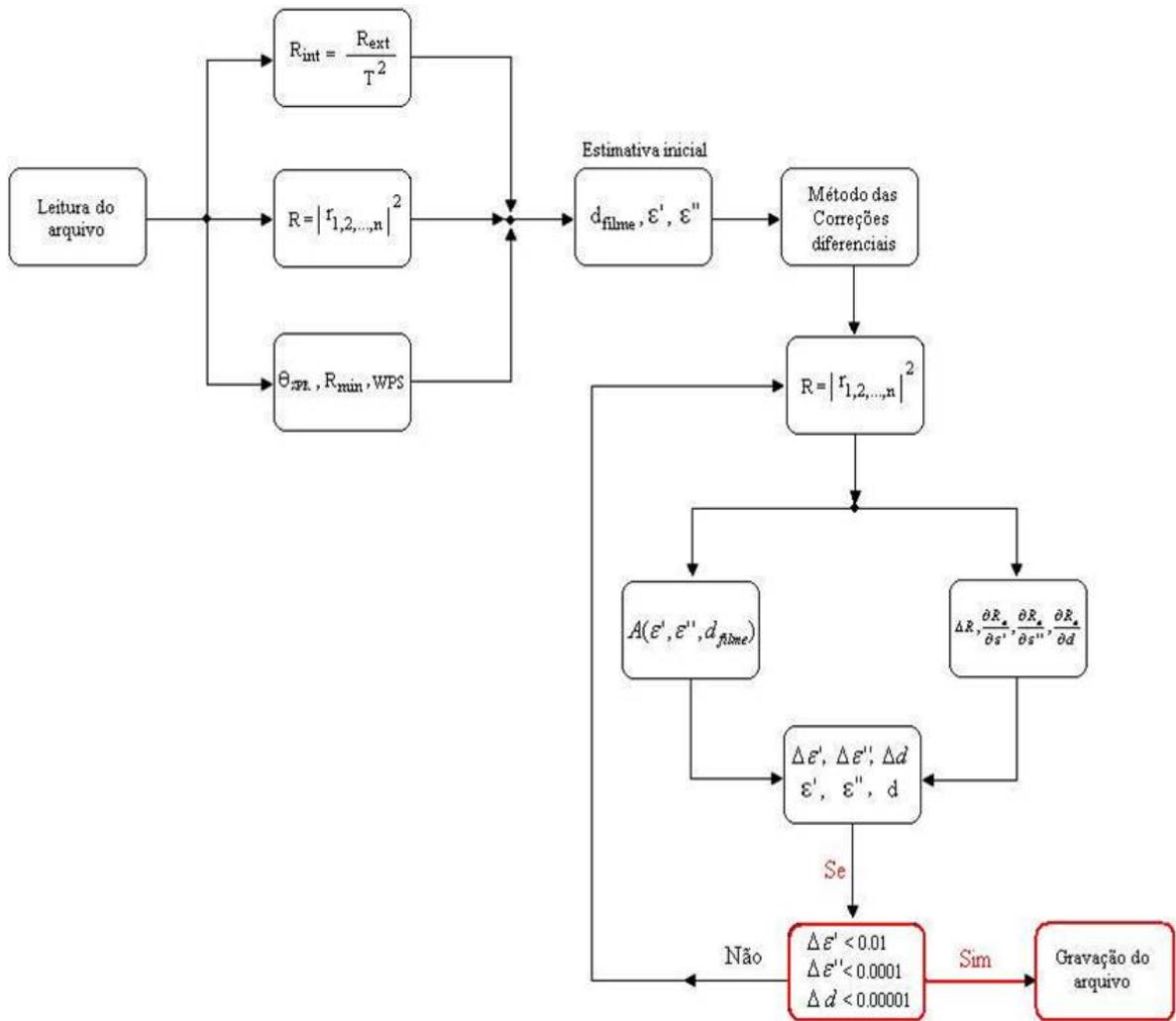
O procedimento de cálculo para a obtenção dos parâmetros óticos de filmes finos metálicos pode ser sumarizado a partir do fluxograma apresentado na Figura 6.11.

Inicialmente, é realizada a leitura do arquivo contendo os vetores correspondentes ao coeficiente de reflexão externo (obtido pela razão entre o sinal medido no fotodetector de sinal e no fotodetector de referência) e o ângulo de incidência externo, obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na secção 6.7. Os dados apresentados na Figura 6.12 não correspondem a um resultado experimental e sim uma simulação computacional da Reflectância em função do ângulo de incidência externo para um sistema de três interfaces (prisma/óleo de silicone, óleo de silicone/filme de ouro e filme de ouro/ar). Foram utilizados para os dados de entrada os pontos obtidos através da simulação computacional uma vez que os parâmetros óticos são conhecidos. Estes parâmetros simulados foram:  $\lambda = 632,8nm$ ,  $d_{Au} = 50nm$ ,  $\varepsilon = -11 + 1.5i$ .

Em seguida, é calculado o coeficiente de reflexão interno a partir da razão entre o coeficiente de reflexão externo e o quadrado do coeficiente de transmissão, ou seja,

$$R_{int} = \frac{R_{ext}}{T^2}, \quad (6.11)$$

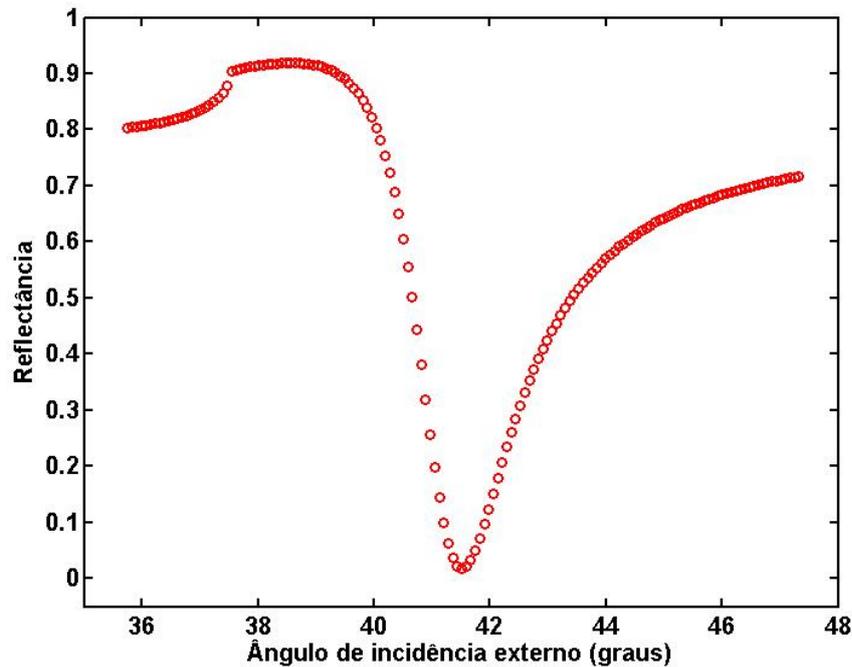
sendo  $T = (1 - R_{ext})$  o coeficiente de transmissão de potência em cada face correspondente aos catetos do prisma reto.



**Figura 6.11** – Fluxograma do procedimento de cálculo para obtenção da espessura e constantes óticas de filmes ultrafinos.

A reflectância mínima,  $R_{min}$ , é calculada utilizando a função intrínseca  $min(vector)$  do *MATLAB 7.0*. O ângulo ressonante,  $\theta_{PS}$ , é obtido projetando o valor do mínimo da reflectância do eixo das ordenas para o eixo das abscissas. Já para a meia largura angular,  $W_{PS}$ , o valor médio da reflectância é calculado e armazenado. Posteriormente, é realizado um processo de iteração com o decréscimo da variável angular até que o valor médio da reflectância seja atingido. Este novo valor da variável angular é registrado,  $\theta_a$ , permitindo assim calcular a meia largura angular do espectro RPS utilizando a equação:

$$W_{PS} = \theta_{RPS} - \theta_a \tag{6.12}$$



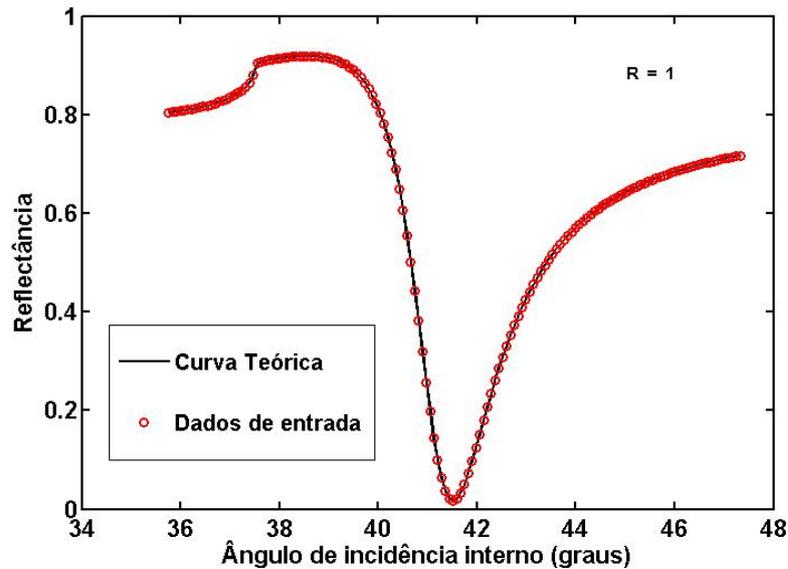
**Figura 6.12** – Espectro RPS para um sistema de três interfaces (prisma/óleo, óleo/filme de ouro e filme de ouro/ar) obtido através de simulação computacional das equações de Fresnel da sua forma matricial como descrito na seção 4.4.

As equações (4.59), (4.60), (4.63), (4.64) e (4.66) são utilizadas para a determinação da estimativa inicial da espessura e das partes real e imaginária da constante dielétrica dos filmes metálico e dielétrico. Como verificado anteriormente, duas estimativas iniciais dos parâmetros óticos dos filmes podem ser obtidas. No entanto, segundo Fontana [13] a estimativa que mais se aproxima do valor real é:

$$\eta_a = \frac{|r_{02}|^2}{1 - R_{min}} \left[ (1 + R_{min}) + 2\sqrt{R_{min}} \right] \quad (6.13)$$

A partir das estimativas iniciais dos parâmetros óticos dos filmes é inicializado o método das correções diferenciais (apêndice A) a fim de obter o melhor ajuste entre as curvas teórica e experimental. Nesta etapa, a função de reflectância para o sistema de n-camadas é implementada (ver apêndice C). A partir dela é calculada as derivadas da reflectância em função de cada parâmetro ótico e a diferença entre o valor teórico e experimental da reflectância concomitantemente com os elementos da matriz dada pela equação (A.17). Obtidas estas variáveis são, então, calculadas as variações dos parâmetros óticos dando

origem a novos valores da espessura e das constantes dielétricas. Este processo recursivo é realizado até que o erro absoluto quadrático seja totalmente minimizado. Quando isto é atingido, as curvas experimental e teórica e os valores dos parâmetros óticos são armazenados em um arquivo de gravação, como mostrado na Figura 6.13. Os valores dos parâmetros óticos obtidos através do ajuste de curva foram:  $d_{Au} = 50,0nm$ ,  $\epsilon_{Au} = -10,99 + 1,5i$ . O procedimento numérico para as demais camadas segue a mesma rotina.



**Figura 6.13** – Espectro RPS para um sistema de três interfaces. Curva pontilhada em vermelho representa os dados de entrada e a curva em preto o cálculo teórico obtido através do modelo matemático e pelo método das correções diferenciais. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram:  $d_{Au} = 50,0nm$ ,  $\epsilon_{Au} = -10,99 + 1,5i$  com o coeficiente de correlação igual a  $R = 1,0$ .

### 6.10 – Considerações Parciais

A montagem experimental para análises de parâmetros óticos de filmes finos metálicos e dielétricos baseado no fenômeno RPS se mostrou eficaz uma vez que foi possível confinar os PS na interface prisma/metal e a partir disto detectar variações diminutas nas propriedades óticas da mesma.

O programa computacional baseado no modelo matemático foi de extrema importância para as análises de interações biomoleculares uma vez que, através dele foi

possível quantificar tanto as propriedades óticas do filme de ouro evaporado sobre substratos de vidro quanto pequenas adsorções de materiais sintéticos e biológicos.

As técnicas espectroscópicas descritas neste capítulo foram utilizadas para caracterização e comprovação do dendrímero PAMAM sintetizado no laboratório de Biomateriais da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Os resultados da caracterização do dendrímero bem como da sua hemocompatibilidade serão apresentados no próximo capítulo.

### 6.11 – Referências bibliográficas

- [1] Solomon, D.H. The chemistry of organic film formers. *New York, John Wiley*. 90-93, 1967.
- [2] Disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared\\_spectroscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared_spectroscopy) (ultimo acesso: 12/12/2006).
- [3] Disponível em: <http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia> (último acesso: 12/12/2006).
- [4] Coates, J. Interpretation of infrared spectra. *A Practical Approach, Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 12:10815-10837, 2000.
- [5] Martins, M. Biossensores de colesterol baseados no sistema Poli(álcool vinílico)/ftalocianina. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Itajubá - Brasil, 2006.
- [6] Cowie, J.M.G. Polymers: chemistry & physics of modern materials. *New York, Chapman & Hal*. 210-213, 1991.
- [7] Knischka, R.; Lutz, P.J.; Sunder, A.; Mulhaupt, R.M.; Frey, H. Functional poly(ethylene oxide) multiarm star polymers: core-first synthesis using hyperbranched polyglycerol initiators. *Macromolecules*. 33: 315-320, 2000.
- [8] Tager, A. Physical chemistry of polymers. *Moscow, Mir Publishers*. p.130-34, 1972.
- [9] Disponível em: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm> (ultimo acesso: 12/12/2006).
- [10] Akitt, J.W.; Mann, B.E. NMR and Chemistry. *Stanley Thornes*. 265-273, 2000.
- [11] Moreira, J.C.; Silva, I.F.; Wang, S.H.; Bologh, D.T. Determinação das constantes K e alfa da equação de Mark-Houwink de poli(p-acetoxiestireno). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 14:80-82, 2004.
- [12] Cowie, J.M.G. Polymers: chemistry & physics of modern materials. *New York, Chapman & Hall*, p. 210-213, 1991.

- [13] Fontana, E. Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media. *Applied Optics*. 45:7632-7642, 2006.

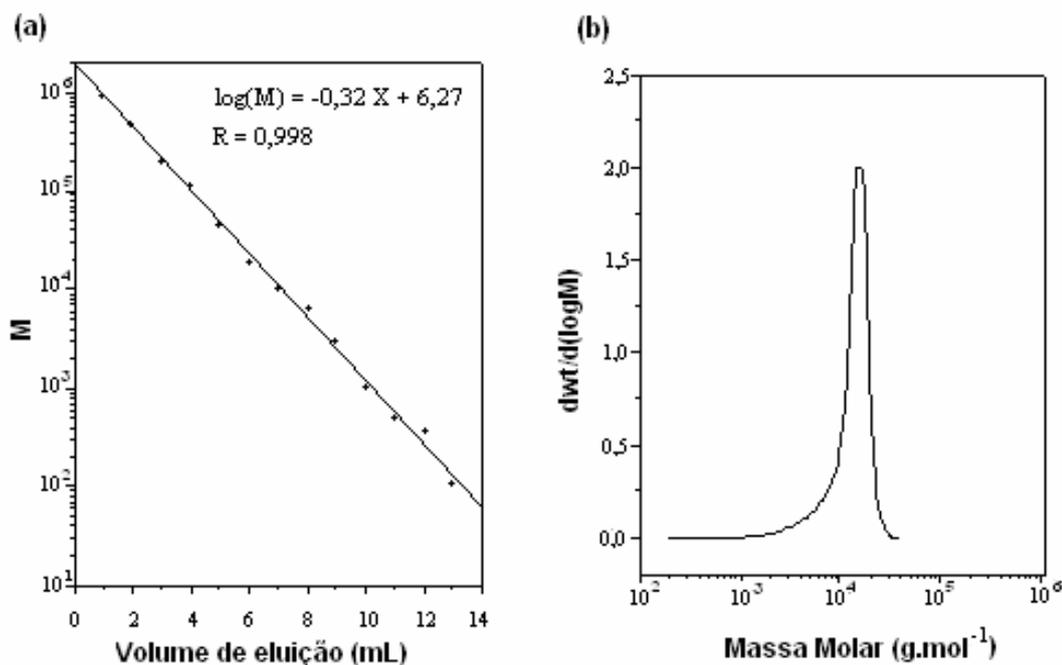
## Capítulo 7 – Resultados e Discussões

### 7.1 – Caracterização do dendrímero PAMAM

#### 7.1.1 – Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

O peso molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros de maior importância para a determinação e explicação do comportamento físico de sistemas macromoleculares. Estes parâmetros podem ser obtidos através da técnica GPC.

A Figura 7.1b apresenta a análise por GPC do dendrímero PAMAM de geração 4 (G4) obtido neste trabalho. A presença de um pico bem definido confirma a natureza monodispersa do dendrímero obtido. Ao mesmo tempo, observa-se na Figura 7.1 b uma distribuição de peso molecular monomodal, e um baixo índice de dispersão no peso molecular ( $M_w/M_n = 1,15$ ); o que confirma a estrutura dendrítica da macromolécula PAMAM G4.

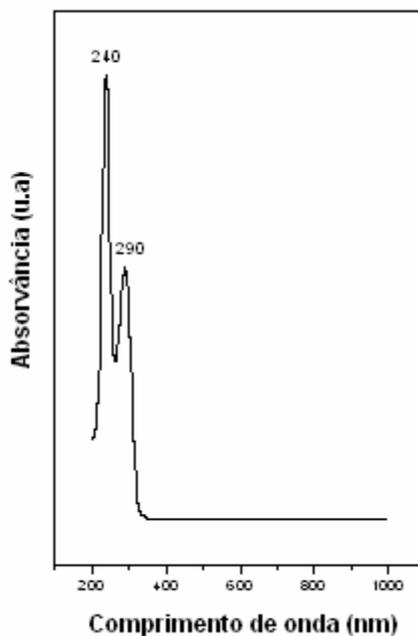


**Figura 7.1** – Curva de calibração (a) e análise por GPC (b) do PAMAM G4 obtido neste trabalho.

### 7.1.2 – Caracterização espectroscópica (FTIR, UV-Vis, $^1\text{H-NMR}$ )

As observações ópticas estão relacionadas à transição eletrônica que ocorre por absorção de fótons por parte do material. Um espectro de absorção será, portanto, formado por um conjunto de bandas associadas às diversas transições vibracionais e rotacionais possíveis dos dois estados eletrônicos envolvidos na transição e dependerá das regras de seleção espectroscópicas válidas para cada caso.

Na Figura 7.2 é mostrado o espectro de absorção na região UV-Vis característico de dendrímero PAMAM G4. O espectro exibiu dois máximos de absorção em 240 nm e 290 nm. A absorção máxima em 240 nm está associada a transições  $\pi-\pi^*$ , separação entre a diferença de energia entre os orbitais moleculares de fronteira HOMO (orbital molecular mais alto ocupado) e LUMO (orbital molecular mais baixo desocupado) da molécula de PAMAM. A banda de absorção em 290 nm corresponde à absorção por parte de grupos carbonila (grupo funcional constituído de um átomo de carbono e um átomo de oxigênio) provenientes dos grupamentos amida da molécula de PAMAM [1].



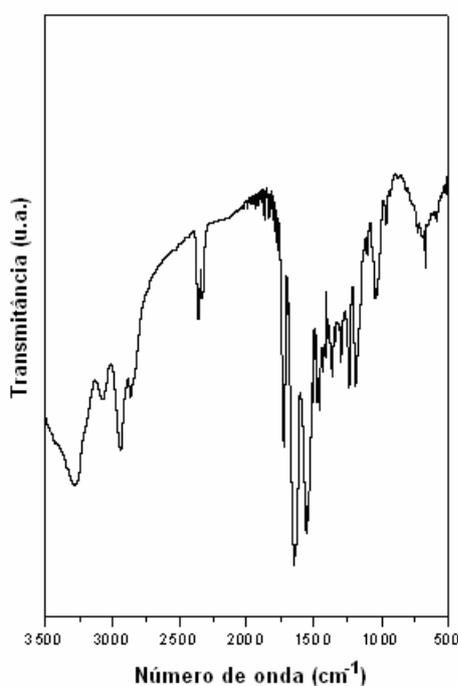
**Figura 7.2** – Espectro UV-vis do PAMAM G4. O espectro contém duas bandas de absorção em 240 e 290 nm.

A Figura 7.3 apresenta o espectro FTIR para o dendrímero PAMAM G4 entre 3500 e 500  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas de absorção em 3210  $\text{cm}^{-1}$  e 1647  $\text{cm}^{-1}$  caracterizam as frequências vibracionais características das aminas primárias existentes na periferia do dendrímero

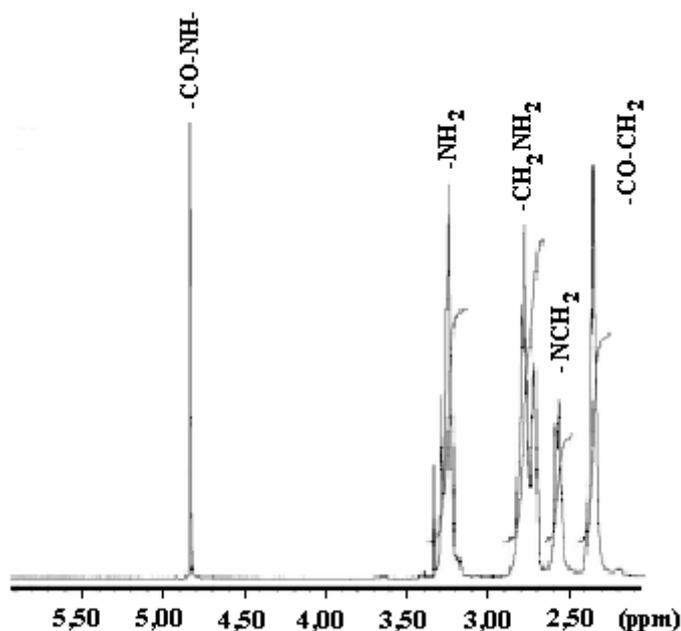
PAMAM. A banda de absorção a  $3070\text{ cm}^{-1}$  é característica da banda de amida II e é representativa do processo de síntese dendrítica divergente. As bandas de absorção a  $2862\text{ cm}^{-1}$  e  $2935\text{ cm}^{-1}$  representam as vibrações do grupo  $\text{CH}_2$ , antissimétrico e simétrico, respectivamente.

A análise de estruturas dendríticas continua sendo um problema relativamente complexo uma vez que possíveis erros estruturais podem estar presentes no polímero. O maior problema na síntese de dendrímeros PAMAM via rota de síntese de Michael envolve o aparecimento de estruturas não simétricas bem como as reações secundárias de ciclização intramoleculares devido à presença de muitos grupos funcionais na periferia do dendrímero.

Na Figura 7.4 é apresentado o espectro de ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) do dendrímero PAMAM G4. Os picos de aminas primárias, secundárias e terciárias bem como os picos correspondentes a carbonila do monômero metacrilato de metila, característicos de um dendrímero PAMAM G4 sintetizado via reação de Michael, são claramente observadas no espectro corroborando os dados experimentais observados na literatura [2].



**Figura 7.3** – Espectro FTIR do dendrímero PAMAM G4. As bandas de absorção em  $3210\text{ cm}^{-1}$  e  $1647\text{ cm}^{-1}$  caracterizam as frequências vibracionais características das aminas primárias existentes na periferia do dendrímero PAMAM



**Figura 7.4** – Espectro  $^1\text{H-NMR}$  do dendrímero PAMAM G4. Os picos de aminas primárias, secundárias e terciárias bem como os picos correspondentes a carbonila do monômero metacrilato de metila característicos do dendrímero PAMAM G4 são evidenciados.

## 7.2 – Influência dos parâmetros óticos dos Filmes de Ouro depositados em Substratos de Vidro

Para ilustrar de que forma os parâmetros do filme metálico de ouro depositado influenciam a reflectância será inicialmente apresentado o resultado de algumas simulações de espectros RPS com base nas equações descritas na seção (4.4). Estas simulações foram realizadas a partir do *software MATLAB 7.0*.

Inicialmente foram realizadas simulações a fim de verificar a influência da espessura do filme metálico (ouro) sobre a dependência angular da reflectância. Uma vez que a espessura do filme tem como objetivo aumentar as perdas do sistema é importante observar como este parâmetro influencia no comportamento da curva RPS. A estrutura utilizada nas simulações é composta por três camadas corresponde a um prisma de vidro, um filme metálico de ouro e o ar. O comprimento de onda do laser utilizado nesta simulação foi igual ao experimental ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ). O índice de refração do prisma e a constante dielétrica do filme de ouro foram  $n = 1.55$  e  $\varepsilon = -10,5 + 1,5i$ , respectivamente. A Figura 7.5 mostra o

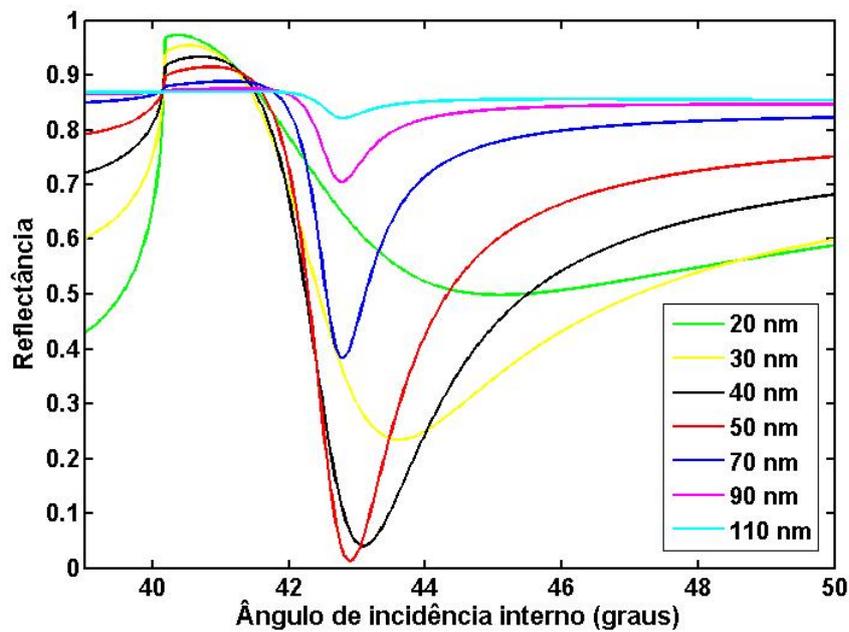
resultado das simulações com curvas correspondendo a filmes de ouro de espessuras 20, 30, 40, 50, 70, 90 e 110 nm, respectivamente.

Observa-se através dessas simulações que a espessura dos filmes metálicos altera o valor mínimo da reflectância, a posição angular desse mínimo e a largura de linha da ressonância como apresentado através das equações no capítulo 4. Além disso, a espessura ótima do filme metálico de ouro encontra-se por volta de 50 nm conforme pode ser observado na Figura 7.5.

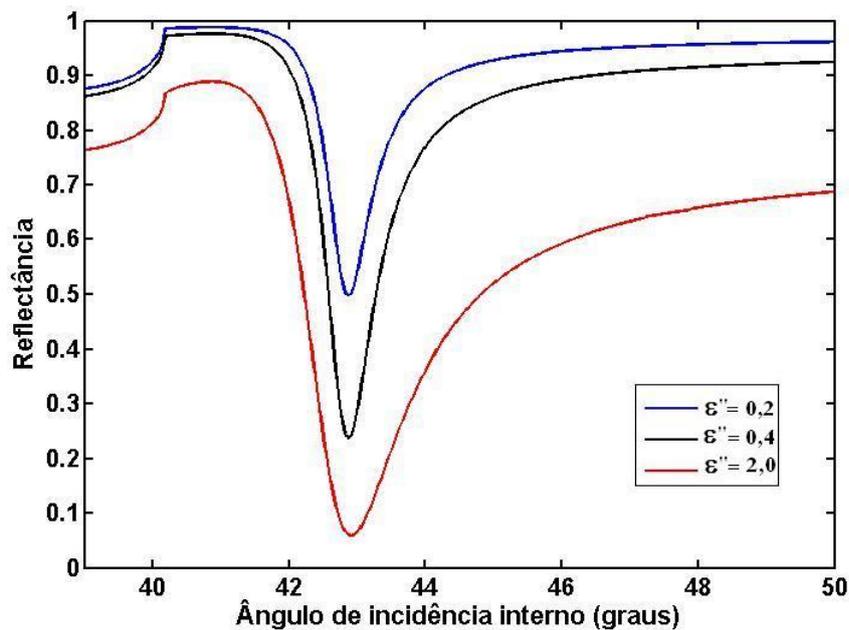
Espessuras menos elevadas deslocam o mínimo de ressonância para a direita, aumentam a largura da linha de ressonância e aumentam o valor do mínimo de reflectância. Já filmes de ouro com espessuras mais elevadas deslocam o mínimo de ressonância para a esquerda, diminuem a largura da linha de ressonância e aumentam o valor do mínimo de reflectância.

Um outro parâmetro importante é a parte imaginária da constante dielétrica do filme metálico. A Figura 7.6 ilustra a influência da variação da parte imaginária da constante dielétrica do filme de ouro ( $\varepsilon'' = 0,2$ ;  $\varepsilon'' = 0,4$ ;  $\varepsilon'' = 2,0$ ) sobre a dependência angular da reflectância. Estas simulações correspondem também a uma estrutura de três camadas (prisma, filme de ouro, ar). A espessura foi fixada em  $d = 50 \text{ nm}$  e com a parte real da constante dielétrica do filme fixada em  $\varepsilon' = -10,5$ . Observa-se que a parte imaginária da constante dielétrica influencia a largura de linha da ressonância, bem como o grau de acoplamento do campo incidente com os plásmons de superfície. É importante notar que a largura de linha da ressonância aumenta com a absorção, representada pelo valor do parâmetro  $\varepsilon''$ .

Estes resultados são importantes devido ao fato de que a quantificação da adsorção de proteínas séricas sobre a superfície de filmes finos dendríticos leva em consideração os parâmetros óticos do filme metálico. Um outro fator importante é que a sensibilidade dos sensores baseados em RPS está diretamente relacionada com os parâmetros óticos do filme metálico. Além disso, dependendo do procedimento experimental adotado para a deposição de filmes finos metálicos como, por exemplo, a limpeza do substrato de vidro, pode-se observar pequenas rugosidades que alteram o espectro RPS contribuindo para um falso resultado do processo de adsorção.



**Figura 7.5** – Simulação computacional da influência da espessura do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).

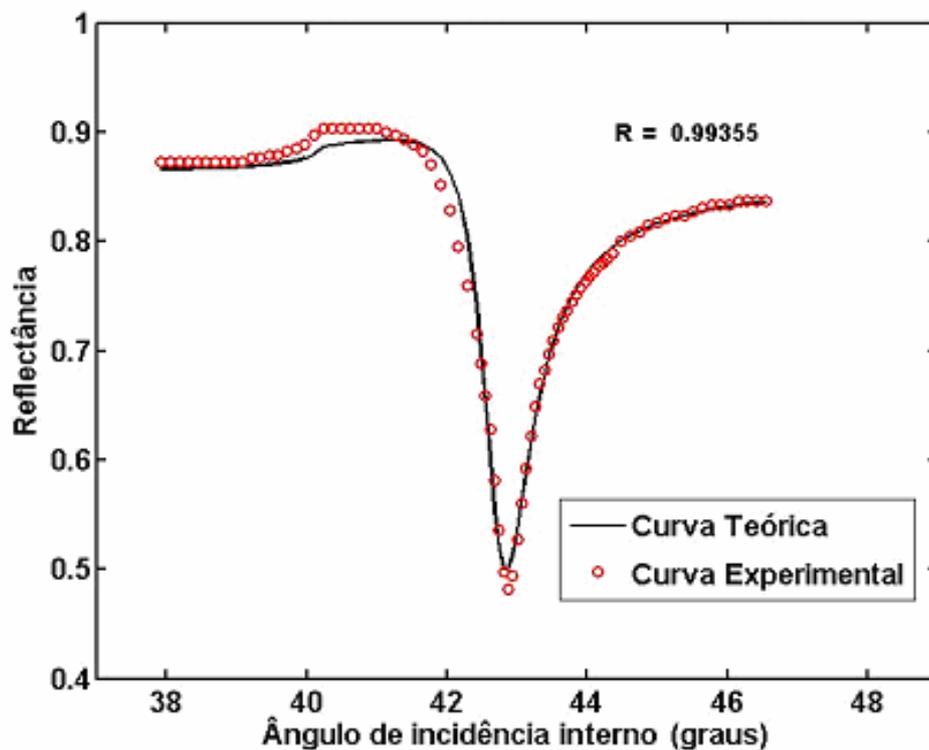


**Figura 7.6** – Simulação computacional da influência da parte imaginária da constante dielétrica do filme metálico de ouro sobre a dependência angular da reflectância para uma estrutura de três camadas (prisma, ouro, ar).

### 7.3 – Caracterização do filme metálico por RPS

Como os parâmetros óticos (constante dielétrica e espessura) do filme metálico são de extrema importância para a excitação dos PS e também para a monitoração da camada protéica adsorvida sobre a superfície do dendrímero, foram realizados experimentos a fim de se obter tais parâmetros.

A Figura 7.7 ilustra o espectro RPS para o filme de ouro de uma das lâminas que foram preparadas pela técnica de evaporação. A partir do modelo matemático concomitantemente com o ajuste de curva baseado no método das correções diferenciais foi possível estimar os valores da espessura e da constante dielétrica do filme metálico. Os valores obtidos foram:  $d = 77,8(\pm 1,21)nm$ ,  $\epsilon_{Au} = -10,6(\pm 0,412) + 1,32i(\pm 0,214)$  com um coeficiente de correlação igual a  $R = 0,99355$ .

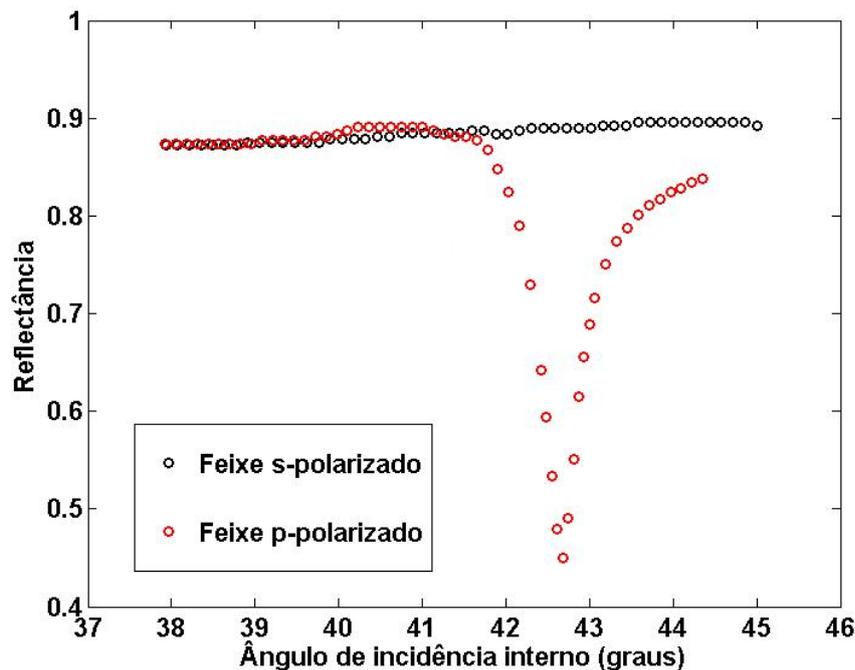


**Figura 7.7** – Espectro RPS para um sistema de três interfaces. Curva pontilhada em vermelho representa o espectro RPS obtido experimentalmente e a curva em preto o ajuste de curva obtido através do método das correções diferenciais. Os valores obtidos dos parâmetros óticos foram:  $d = 77,8(\pm 1,21)nm$ ,  $\epsilon_{Au} = -10,6(\pm 0,412) + 1,32i(\pm 0,214)$  com o coeficiente de correlação igual a  $R = 0,99355$ .

#### 7.4 – Influência da polarização sobre o fenômeno RPS

Uma das condições necessárias para o confinamento dos PS é a exigência de que o feixe de luz incidente a interface prisma/metal seja plano-polarizado, ou seja, que a polarização esteja contida no plano óptico da interface. A fim de verificar se a polarização do feixe de luz do aparato experimental descrito na seção 6.6 encontrava-se corretamente ajustada, foram realizados experimentos a fim de obter a polarização ótima que permitisse o maior confinamento dos PS o qual está diretamente relacionado com a sensibilidade do sensor.

A Figura 7.8 apresenta dois espectros RPS com duas diferentes polarizações do feixe de luz incidente. Observa-se que apenas na curva em vermelho há o acoplamento dos PS indicado pela perda de energia da radiação incidente ao refletir na interface prisma/metal. Portanto, com este experimento foi possível ajustar a polarização do feixe de luz incidente a fim de se obter a resposta máxima do sensor.



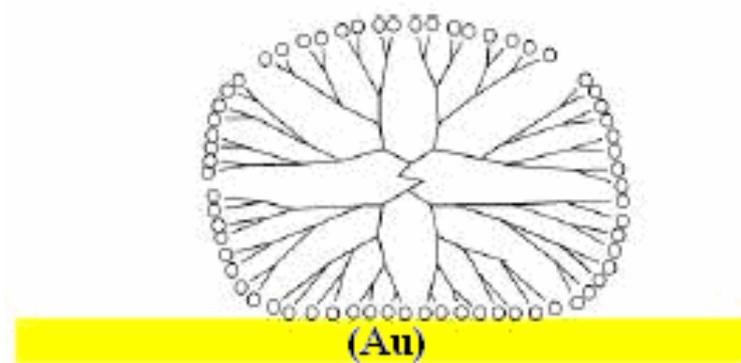
**Figura 7.8** – Espectros RPS obtidos experimentalmente. Curva em vermelho representa o espectro para a fonte de laser plano-polarizada e a curva em preto para o feixe s-polarizado.

## 7.5 – Estudo do comportamento da adsorção das proteínas séricas sobre o PAMAM (isotermas de Langmuir e Freundlich)

Antes da apresentação dos resultados experimentais da adsorção das proteínas séricas sobre a superfície do dendrímero PAMAM faz-se necessário entender a interação entre o dendrímero PAMAM e o filme de ouro evaporado sobre um substrato de vidro.

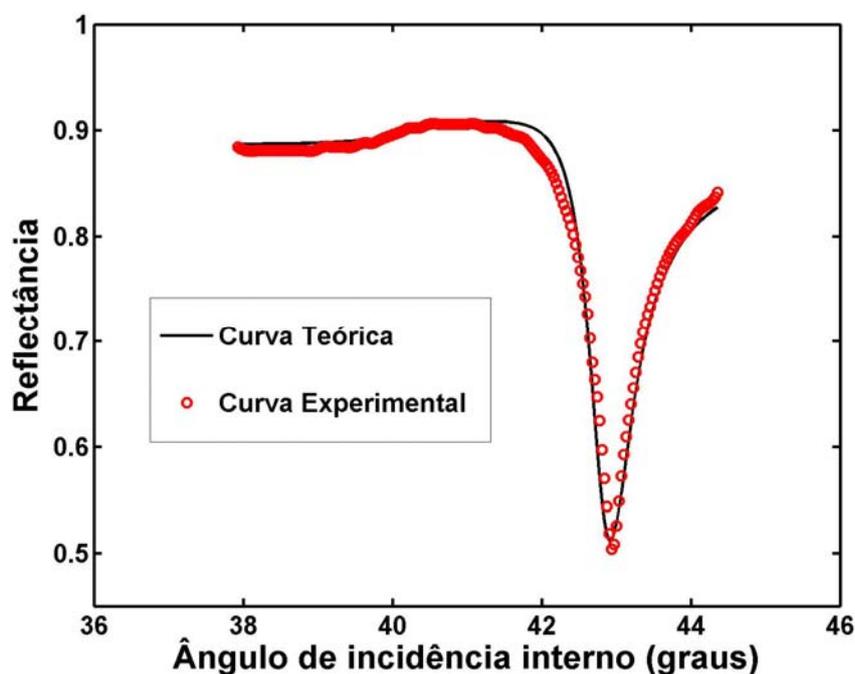
### 7.5.1 – Adsorção do dendrímero PAMAM sobre a superfície do filme de ouro

Quando o substrato de ouro é imerso em uma solução do dendrímero PAMAM solubilizado em metanol, uma monocamada estável é formada devido à interação eletrostática entre a densidade de carga negativa proveniente dos grupos amino terminais do dendrímero PAMAM protonado (em pH = 7.0 todos os 64 grupos amino terminais estão protonados), e a superfície do ouro com densidade de carga negativa [12]. Além disso, uma mudança conformacional da monocamada dendrítica é observada reduzindo cerca de 60 %, conforme dados de Microscopia de Força Atômica da literatura, do diâmetro hidrodinâmico da molécula de PAMAM também devido às interações favoráveis entre os grupos amino terminais do PAMAM e a superfície do ouro [13]. A Figura 7.9 ilustra uma possível conformação do dendrímero PAMAM adsorvido sobre um substrato de ouro.



**Figura 7.9** – Mudança conformacional do dendrímero PAMAM ao adsorver sobre a superfície do substrato de ouro devida a interações eletrostáticas entre os grupos amino terminais do PAMAM e a densidade de carga negativa da superfície do ouro (Fonte: referência [13]).

Essa mudança conformacional corrobora os resultados experimentais obtidos através da técnica RPS da adsorção do dendrímero PAMAM sobre o filme de ouro uma vez que a espessura média da monocamada dendrítica observada foi de  $3,0(\pm 0,52) \text{ nm}$  enquanto que o diâmetro hidrodinâmico do PAMAM G4 é da ordem de  $4,0 \text{ nm}$  conforme elucidado na secção 2.5. A Figura 7.10 apresenta um espectro RPS característico da adsorção do dendrímero PAMAM sobre o substrato de ouro obtido experimentalmente. O valor da camada de PAMAM adsorvida neste experimento foi de  $2,66 \text{ nm}$ .



**Figura 7.10** – Espectro RPS para a adsorção do dendrímero PAMAM sobre substratos de ouro. O valor obtido através do modelo matemático concomitantemente com o ajuste de curva foi de  $2,67 \text{ nm}$ . Os parâmetros utilizados no modelo foram:  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon_{Au} = -11,02 + 1,212i$ ,  $d_{Au} = 77,65 \text{ nm}$ ,  $n = 1,55$ .

### 7.5.2 – Adsorção de BSA sobre a superfície do dendrímero PAMAM

Um importante procedimento para o estudo da adsorção de proteínas sobre superfícies sintéticas é verificar o comportamento da adsorção através das isotermas de Langmuir e Freundlich. Neste sentido, foram realizados experimentos RPS variando-se a concentração da solução protéica a fim de se obter uma curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida sobre a superfície do dendrímero PAMAM em função da concentração. A Tabela

7.1 ilustra os parâmetros óticos utilizados para a obtenção da espessura das camadas metálica, dendrítica e protéica.

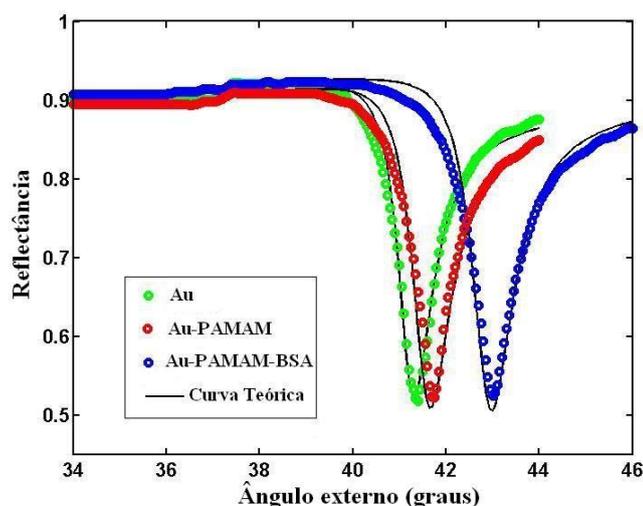
**Tabela 7.1** – Parâmetros experimentais.

Comprimento de onda do laser	$\lambda = 632.8nm$
Índice de refração do prisma	$n_0 = \sqrt{\varepsilon_0} = 1.5501$
Índice de refração do líquido casador	$n_1 = \sqrt{\varepsilon_1} = 1.495$
Espessura do líquido casador	$d_1 = 2nm$
Índice de refração do PAMAM	$n_3 = \sqrt{\varepsilon_3} = 1.451$
Índice de refração das proteínas	$n_4 = \sqrt{\varepsilon_4} = 1.52$
Índice de refração do ambiente	$n_5 = 1.0$

A Figura 7.11 apresenta os espectros RPS para o filme de ouro (curva pontilhada em verde), para o PAMAM adsorvido sobre a superfície do ouro (curva pontilhada em vermelho) e para a solução de BSA com concentração de  $5,6 \text{ mg/L}$  (curva pontilhada em azul). A curva contínua em preto representa o ajuste teórico obtido através do modelo matemático proposto na secção 4.4. Observa-se através da Figura 7.11 que quando o filme de ouro é colocado em contato com a solução dendrítica ocorre o processo de adsorção que pode ser quantificado através da alteração dos parâmetros  $R_{\min}$ ,  $W_{PS}$  e  $\theta_{PS}$ , alterados durante este processo. O mesmo é observado quando o eletrodo contendo o filme de ouro e o dendrímero PAMAM é colocado em contato com a solução de BSA.

Observa-se ainda na Figura 7.11 que os três espectros possuem praticamente a mesma forma (pequenas alterações nos parâmetros  $R_{\min}$ ,  $W_{PS}$ ). Este fato indica uma boa uniformidade do filme dendrítico adsorvido sobre o ouro bem como do filme protéico adsorvido sobre a superfície do PAMAM. No entanto, nem todos os espectros da adsorção de BSA seguiram este mesmo comportamento. Esta variabilidade dos espectros pode ser explicada devido o procedimento experimental utilizado não ser o mais adequado.

Com os valores da espessura e do índice de refração obtidos através do programa computacional (descrito na secção 6.9) foi construída uma curva de calibração da espessura em função da concentração de proteína como mostrado na Figura 7.12. Observa-se uma alta linearidade entre a espessura da camada protéica adsorvida sobre a superfície do filme dendrítico e a concentração da mesma.



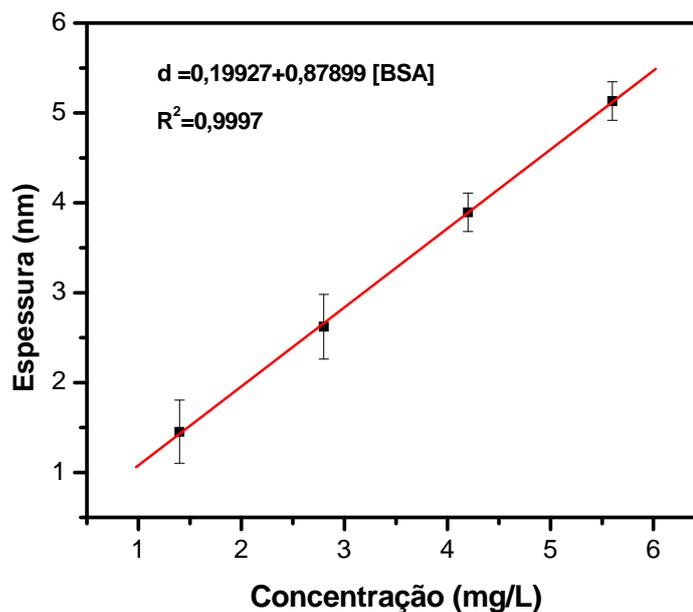
**Figura 7.11** – Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (6.7). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. As curvas em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PAMAM sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína BSA (5,6 mg/L) sobre o filme de PAMAM. A curva contínua em preto representa o ajuste teórico obtido através do modelo matemático proposto na secção 4.4.

A partir da reta obtida e da equação de Feijter [6], foi possível converter espessura em massa de proteína adsorvida sobre a superfície do filme polimérico e verificar qual a isoterma foi predominante durante o processo de adsorção. A equação de Feijter relaciona a espessura da camada de proteína adsorvida ( $d$ ) e dos índices de refração da proteína ( $n_p$ ) e do substrato ( $n_{\text{PAMAM}}$ ) no qual a proteína será adsorvida, através da seguinte equação matemática:

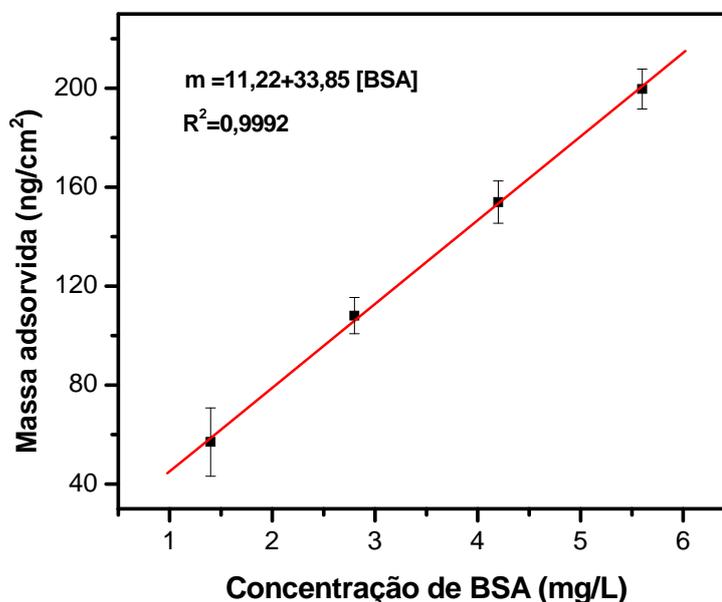
$$m = d_p \frac{n_p - n_s}{\frac{\partial n}{\partial C}} \quad (7.1)$$

sendo  $\frac{\partial n}{\partial C}$  é o incremento do índice de refração das moléculas o qual pode ser medido através de um refratômetro diferencial,  $d_p$  é a espessura da camada protéica adsorvida sobre a superfície do dendrímero obtida através da técnica RPS,  $n_p$  e  $n_s$  são os índices de refração da camada protéica e do substrato ao qual a proteína foi adsorvida (PAMAM), respectivamente.

Para proteínas séricas o incremento do índice de refração é  $0,183 \text{ cm}^3/\text{g}$  [8,9]. A partir destes dados foi possível estimar a quantidade de massa de proteína adsorvida sobre a superfície do dendrímero PAMAM como pode ser observado através da Figura 7.13.



**Figura 7.12** – Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Oringin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.



**Figura 7.13** – Curva de calibração da massa de BSA adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de BSA. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

Com o auxílio das equações 3.1 e 3.6 foram construídos os gráficos das isotermas de Langmuir e Freundlich apresentados nas Figuras 7.14 e 7.15. A partir do ajuste de curva linear foi possível determinar os parâmetros  $b$ ,  $m_{max}$  para as isotermas de Langmuir e  $n$  e  $k_F$  para a isoterma de Freundlich. Os valores são apresentados na Tabela 7.2.

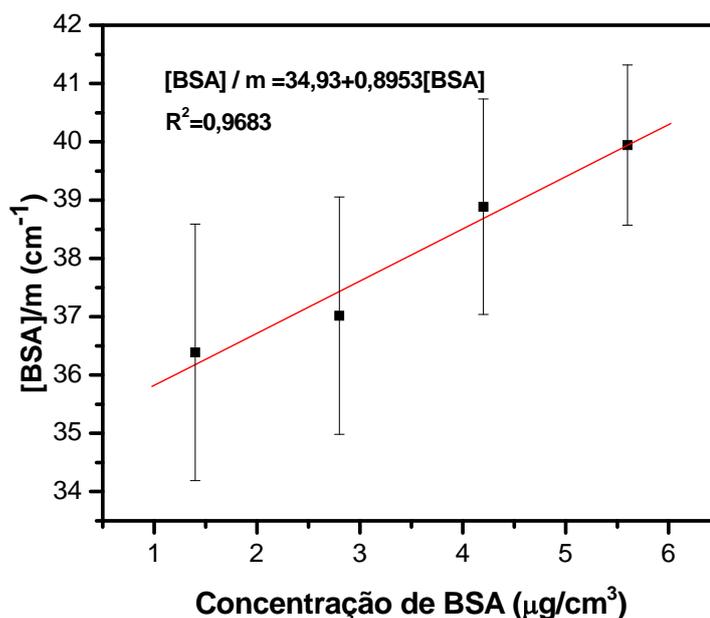
**Tabela 7.2** - Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM através do ajuste de curva linear e com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 298 K.

Langmuir			Freundlich		
$b$ (L/mg)	$m_{max}$ ( $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ )	$R^2$	$N$	$k_F$ (cm)	$R^2$
25,63	1,117	0,9683	1,0899	41,34	0,9996

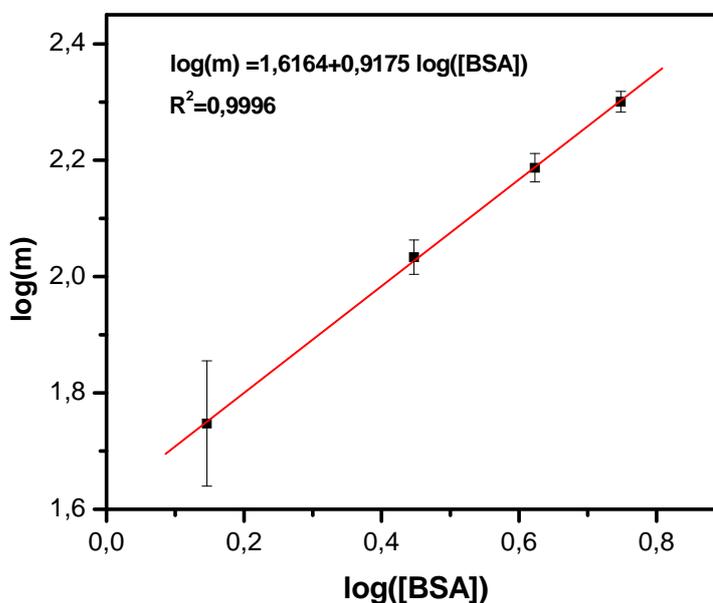
A partir do coeficiente de correlação pode-se determinar a isoterma predominante no processo de adsorção de proteínas séricas sobre o dendrímero PAMAM. Neste sentido, a isoterma que melhor representa o processo de adsorção de BSA em filmes finos de PAMAM foi à isoterma de Freundlich. Este resultado indica que há formação de multicamadas protéicas adsorvidas sobre o filme dendrítico de poli(amido amina). Além disso, o processo de adsorção é favorável tendo em vista que a constante de linearidade da isoterma de Freundlich é igual a  $n = 1,0899$ .

Através do modelo de adsorção de Freundlich, pode-se inferir que o filme protéico adsorvido sobre a superfície do dendrímero é heterogêneo uma vez que há uma distribuição logarítmica de adsorção da camada protéica sobre a superfície do dendrímero prevista pelo modelo.

A partir dos parâmetros obtidos da isoterma de Langmuir em conjunto com a equação 7.2 foi possível determinar o valor da Energia Livre de Gibbs de adsorção. O valor obtido foi de  $-42,24 \text{ kJ/mol}$ . Este valor implica em um processo de adsorção espontâneo e, além disso, uma alta interação entre o dendrímero PAMAM e a proteína sérica BSA. Este resultado corrobora os valores encontrados na literatura para a adsorção de BSA em materiais hemocompatíveis [7].

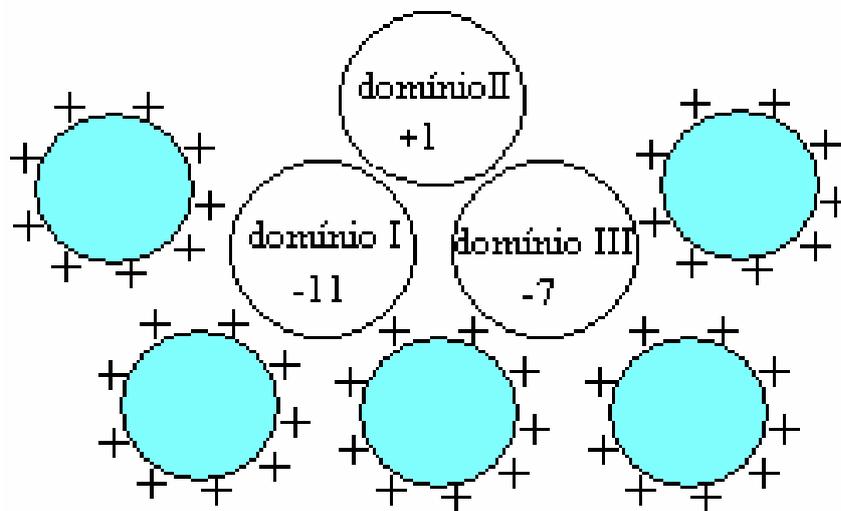


**Figura 7.14** – Isotherma de Langmuir para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.



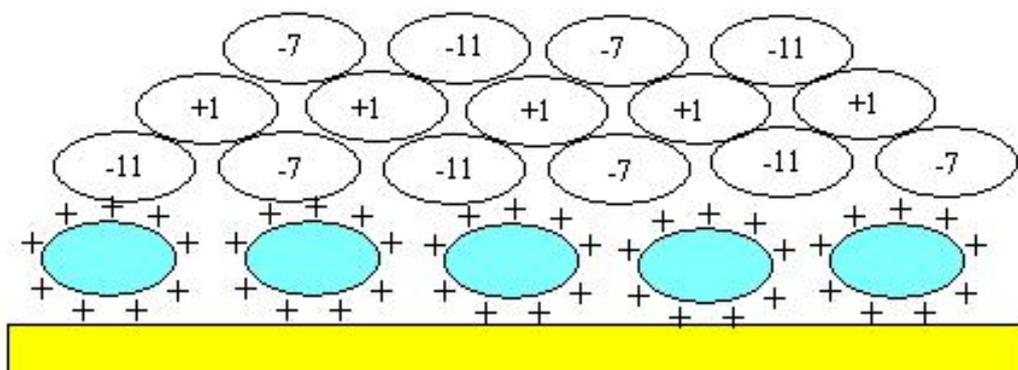
**Figura 7.15** – Isotherma de Freundlich para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

A interação entre o dendrímero PAMAM e a proteína sérica BSA pode ser explicada através de interações eletrostáticas [8]. Em pH 7,40 (pH do sangue) a proteína sérica BSA possui uma carga líquida negativa e igual a -17. Já o dendrímero PAMAM solubilizado em metanol (pH = 7,0 – 8,0) possui uma densidade de carga positiva devido aos seus grupos amino terminais que se tornam protonados em meio aquoso (Figura 7.16). Neste sentido, há uma elevada interação entre as cargas negativas da molécula de BSA e as cargas positivas do dendrímero PAMAM protonado o que favorece a interação entre o dendrímero e a proteína sérica.



**Figura 7.16** – Modelo de interação entre a proteína sérica BSA e o dendrímero PAMAM. Os círculos em azul representam o dendrímero PAMAM com os seus respectivos grupos amino terminais protonados (pH = 7,4) e os três círculos em branco representam os três domínios da proteína BSA.

No entanto, a interação eletrostática entre os grupos amino-catiônicos na periferia do dendrímero PAMAM e a carga negativa dos domínios II e III mudam a conformação da proteína adsorvida. Uma possível configuração de empacotamento da proteína sérica BSA sobre a superfície do dendrímero PAMAM é apresentada na Figura 7.17.



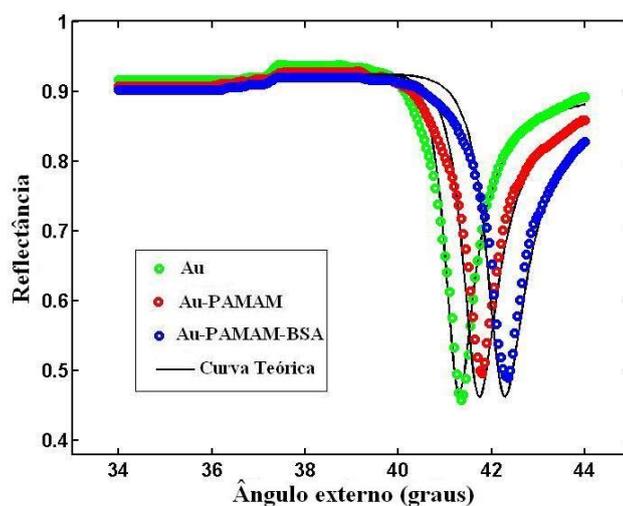
**Figura 7.17** – Diagrama representativo do empacotamento da proteína sérica BSA sobre a superfície do dendrímero PAMAM. O retângulo em amarelo representa o substrato de vidro com ouro depositado e as elipses de cor azul clara e branca representam, respectivamente, a molécula do dendrímero PAMAM e os domínios I, II e III que constituem a molécula da BSA, respectivamente.

### 7.5.3 – Adsorção de HFb sobre a superfície do dendrímero PAMAM

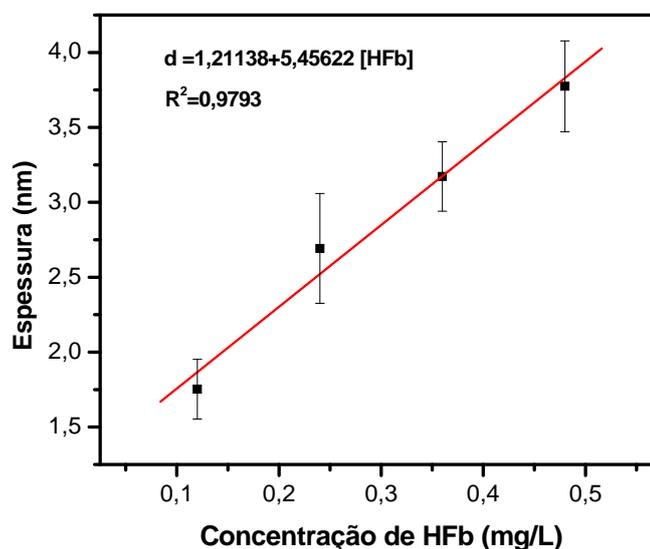
De forma análoga ao que foi realizado para a adsorção de BSA sobre a superfície do dendrímero PAMAM a Figura 7.18 apresenta os espectros RPS para o filme de ouro (curva pontilhada em verde), para o PAMAM adsorvido sobre a superfície do ouro (curva pontilhada em vermelho) e para a interação entre o HFb (0,24 mg/L) com o PAMAM (curva pontilhada em azul). A curva contínua em preto representa o ajuste teórico obtido através do modelo descrito na secção 4.4. É necessário salientar que a concentração de fibrinogênio no plasma sanguíneo humano é cerca de doze vezes menor que a concentração de albumina. Portanto, para a construção das isotermas de adsorção de HFb sobre o dendrímero PAMAM foi mantido a mesma proporção encontrada no plasma sanguíneo humano.

Como observado na adsorção de BSA sobre o filme dendrítico os três espectros de ressonância para os ensaios de HFb apresentados na Figura 7.18 mantiveram a mesma forma, indicando uma boa uniformidade dos filmes. Contudo, nem todos os espectros para a proteína HFb seguiram este mesmo comportamento.

Com os valores da espessura e do índice de refração obtidos através do programa computacional (descrito na secção 6.9) foi construída uma curva de calibração da espessura em função da concentração de proteína como mostrado na Figura 7.19. Observa-se uma alta linearidade entre a espessura da camada protéica adsorvida sobre a superfície do filme dendrítico e a concentração da mesma.



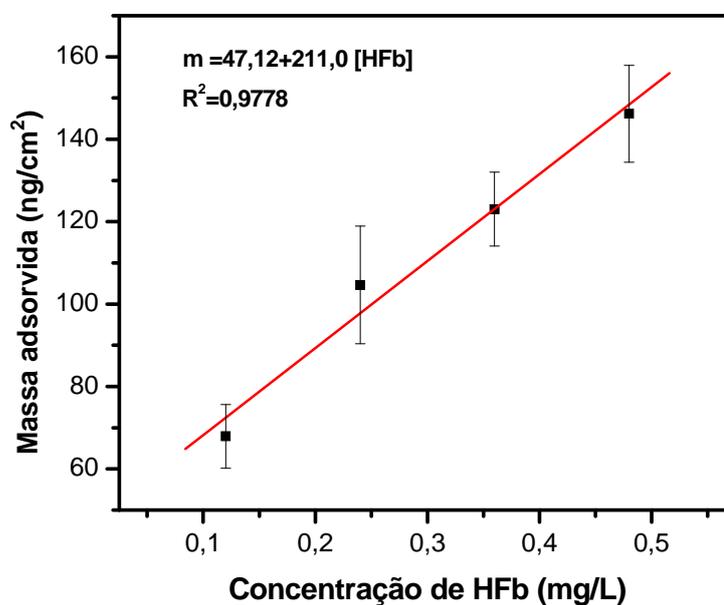
**Figura 7.18** – Espectros RPS obtidos experimentalmente através do aparato experimental descrito na seção (6.7). A curva em verde representa o espectro do filme fino de ouro depositado sobre o substrato de vidro. As curvas em vermelho e azul representam, respectivamente, os espectros RPS para a adsorção do dendrímero PAMAM sobre o substrato de ouro e a adsorção da proteína HFb (0,24 mg/L) sobre o filme de PAMAM. A curva contínua em preto representa o ajuste teórico obtido através do modelo matemático proposto na seção 4.4.



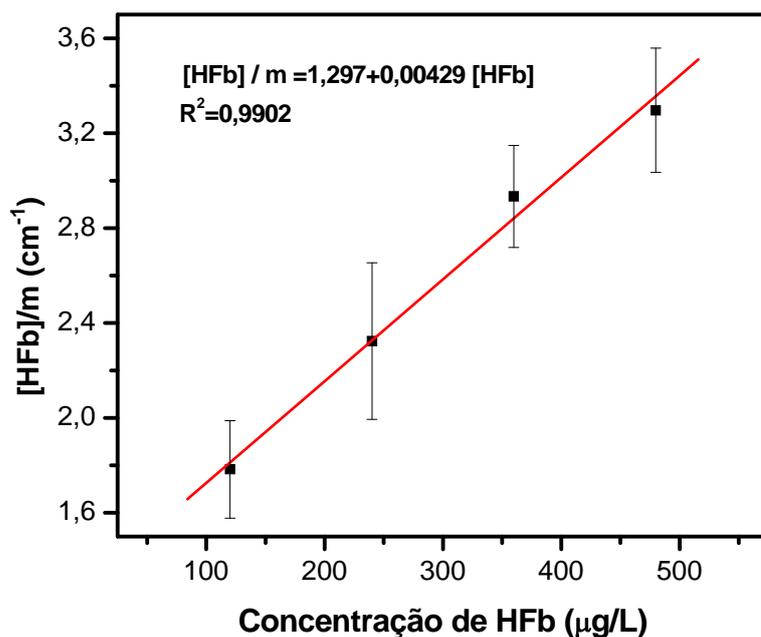
**Figura 7.19** – Curva de calibração da espessura da camada protéica adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Oringim 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

De forma análoga ao que foi realizada para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM, a espessura da camada adsorvida foi convertida para massa adsorvida através da equação (7.1). A curva convertida para massa de HFb adsorvida sobre a superfície do dendrímero PAMAM é apresentada na Figura 7.20.

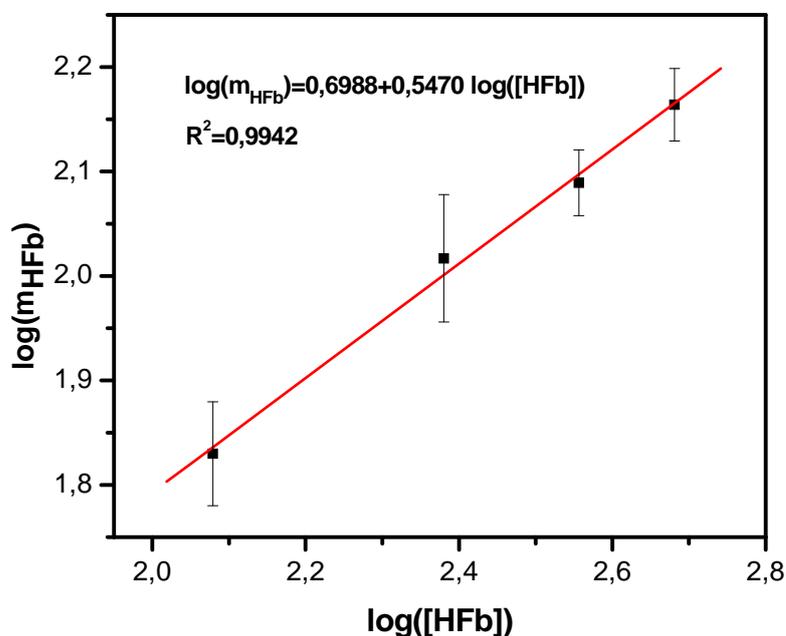
Posteriormente, com o auxílio das equações 3.1 e 3.6 foram construídos os gráficos das isotermas de Langmuir e Freundlich apresentados nas Figuras 7.21 e 7.22. A partir do ajuste de curva linear foi possível determinar os parâmetros  $b$ ,  $m_{max}$  para as isotermas de Langmuir e  $n$  e  $k_F$  para a isoterma de Freundlich. Os valores são apresentados na Tabela 7.3.



**Figura 7.20** – Curva de calibração da massa de HFb adsorvida na superfície do filme dendrítico (PAMAM) em função da concentração de HFb. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.



**Figura 7.21** – Isoterma de Langmuir para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão do conjunto de medidas.



**Figura 7.22** – Isoterma de Freundlich para a adsorção de HFb sobre o dendrímero PAMAM. A reta em vermelho representa o ajuste de curva obtido através do software Origin 7.5. As barras representam o desvio padrão de um conjunto de três medidas.

**Tabela 7.3** - Valores das constantes das isotermas de Langmuir e Freundlich obtidos para o processo de adsorção de HFb sobre o dendrímero PAMAM através do ajuste de curva linear e com o respectivo coeficiente de correlação a uma temperatura de 298 K.

Langmuir			Freundlich		
$b$ (L/mg)	$m_{max}$ (ng/cm <sup>2</sup> )	$R^2$	$n$	$k_F$ (cm)	$R^2$
3,307	233,1	0,9902	1,828	4,998	0,9942

Assim como verificado para a adsorção de BSA sobre o dendrímero PAMAM, a isoterma predominante no processo de adsorção de HFb também é a de Freundlich. No entanto, os coeficientes de correlação estão bem próximos indicando que a presença de multicamadas deve ter sido desfavorecida uma vez que o domínio positivo  $\alpha C$  da molécula de fibrinogênio só interage com uma superfície carregada negativamente se ela estiver em contato direto com a mesma [22]. O modelo de Freundlich indica que o processo de adsorção é favorável tendo em vista que a constante de linearidade da isoterma é maior do que 1.

Através do modelo de adsorção de Freundlich, pode-se inferir que o filme dendrítico adsorvido sobre a superfície do filme de ouro é heterogêneo uma vez que há uma distribuição logarítmica de adsorção da camada protéica sobre a superfície do dendrímero prevista pelo modelo.

A partir dos parâmetros obtidos da isoterma de Langmuir em conjunto com a equação 7.2 foi possível determinar o valor da Energia Livre de Gibbs de adsorção do HFb sobre o dendrímero PAMAM. O valor obtido foi de  $\Delta G_{ADS} = -37,17 \text{ kJ/mol}$ . Este valor implica em um processo de adsorção espontâneo e, além disso, uma alta interação entre o dendrímero PAMAM e a proteína sérica HFb. No entanto, a energia livre de Gibbs de adsorção para o HFb é menor do que a energia livre de Gibbs de adsorção da BSA, o que indica um processo de adsorção menos favorável para a proteína sérica HFb.

A interação entre o dendrímero PAMAM e a proteína sérica HFb pode ser explicada através de interações eletrostáticas [8]. Em pH 7,4 (pH do sangue) a proteína sérica HFb possui uma carga líquida negativa [22]. Já o dendrímero PAMAM em meio aquoso (pH = 7,0) possui uma densidade de carga positiva devido aos seus grupos amino terminais que se tornam protonados. Neste sentido, há uma elevada interação entre as cargas negativas da

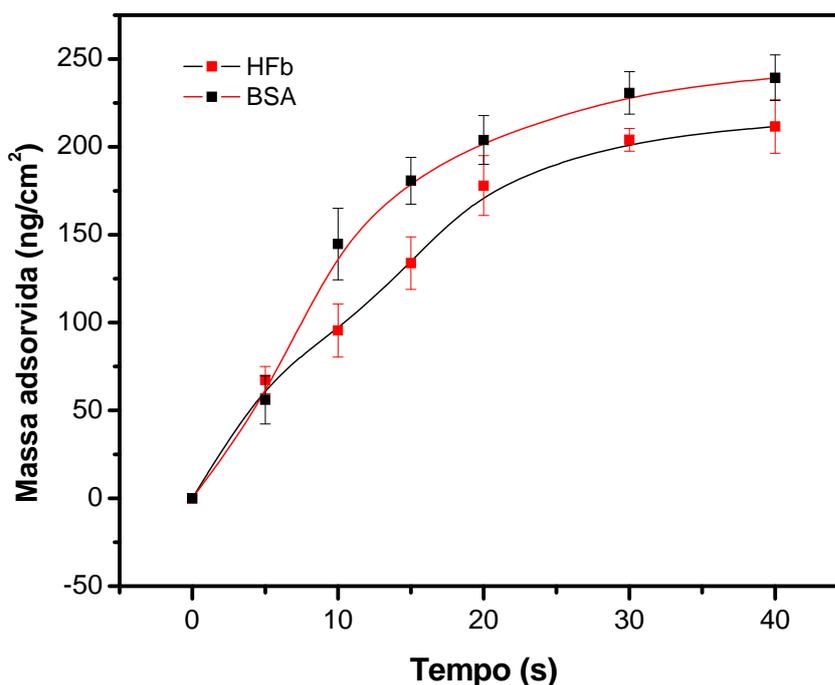
molécula de HFb e as cargas positivas do dendrímero PAMAM protonado o que favorece a interação entre o dendrímero e a proteína sérica. Esta interação é diretamente proporcional ao grau de protonação das moléculas do dendrímero PAMAM.

O empacotamento da proteína séricas HFb sobre a superfície do PAMAM deve seguir o mesmo comportamento que a adsorção de BSA.

### **7.6 – Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb**

A fim de verificar a cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb foram realizados ensaios da massa adsorvida das proteínas sobre o dendrímero PAMAM adsorvido sobre o substrato de ouro em função do tempo. Para o processo de adsorção de BSA foi utilizada a solução cuja concentração era de  $1,4 \text{ mg/L}$  e para o HFb a solução com concentração de  $0,12 \text{ mg/L}$ . De novo é necessário salientar que essa proporção de BSA/HFb está dentro da proporção dessas proteínas encontrada no sangue [23]. O comportamento da cinética de adsorção é apresentado na Figura 7.23. Observa-se que ambos os processos de adsorção seguem uma cinética de primeira ordem. Além disso, o dendrímero PAMAM possui uma maior interação com a proteína sérica BSA em condições fisiológicas. Contudo, essa maior interação está dentro do erro experimental. No entanto, a boa interação entre a proteína BSA e o PAMAM é um fator positivo uma vez que a molécula de BSA possui a habilidade de bloquear a subsequente adsorção das demais proteínas [20]. Neste caso, este resultado indica que em uma adsorção competitiva, como ocorre no corpo humano, a boa interação entre BSA e o dendrímero PAMAM contribuirá para uma minimização da adsorção de proteínas que contribuam para a formação de agregados plaquetários e o subsequente desencadeamento da cascata de coagulação. Todavia, como a adsorção de fibrinogênio foi muito elevada este resultado também sugere que o grau de compatibilidade do dendrímero PAMAM com o sangue não é muito elevado.

A fim de complementar os resultados obtidos através da técnica RPS foram realizados ensaios de adesão plaquetária em duas superfícies de vidro, sendo que uma delas foi revestida com o dendrímero PAMAM G4. Os resultados são apresentados e discutidos na próxima seção.



**Figura 7.23** – Cinética de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb sobre a superfície do dendrímero PAMAM. A curva em vermelho representa a cinética de adsorção da BSA e a curva em preto a adsorção a adsorção do HFb. As curvas em vermelho e preto são curvas de tendência e não ajustes numéricos.

### 7.7 – Ensaios de adesão plaquetária

O princípio da técnica de epifluorescência baseia-se na incorporação de alaranjado de acridina ao DNA mitocondrial das plaquetas. A localização de plaquetas ou seus agregados é feito, então, por excitação do corante com luz UV [16].

Os resultados de epifluorescência são ilustrados na Figura 7.24. Pode ser observado que o número de agregados plaquetários é significativamente maior nas superfícies de vidro não revestidas (micrografias (A) e (B)) comparativamente às superfícies revestidas com o dendrímero PAMAM (C) e (D). É fato bem conhecido da literatura que o vidro apresenta uma elevada trombogenicidade devido à sua alta energia livre de superfície ( $58,95 \text{ mJ/m}^2$ ) [17]. Já materiais biocompatíveis apresentam uma energia livre de superfície bem menor como, por exemplo, o polietileno que apresenta uma energia livre de superfície de aproximadamente  $36,72 \text{ mJ/m}^2$  [17]. Entretanto, observou-se que o revestimento do dendrímero PAMAM sobre a superfície do vidro não foi tão eficiente devido o surgimento de agregados plaquetários em

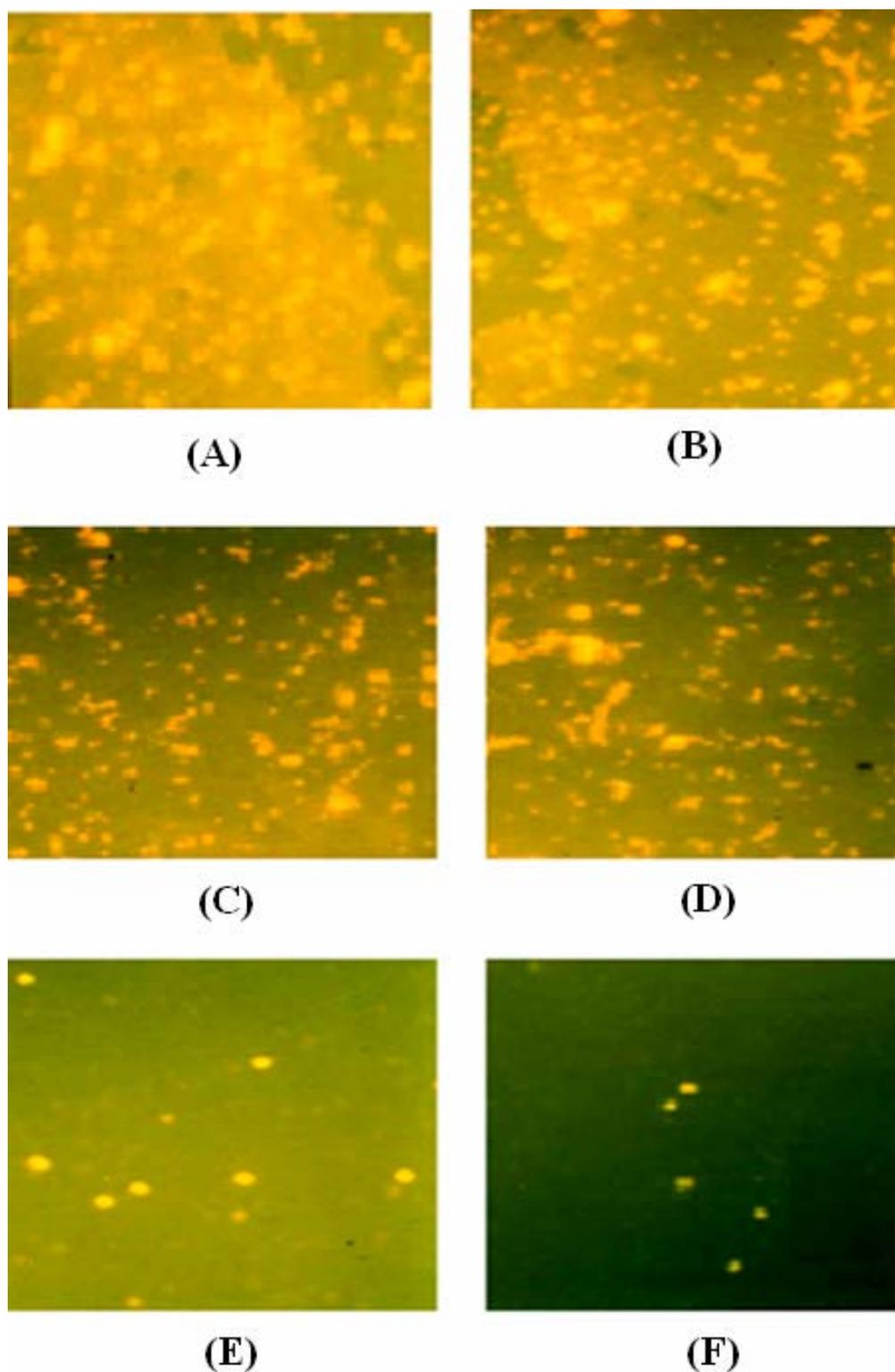
certas regiões. A fim de quantificar a redução de agregados plaquetários proporcionado pelo revestimento da lâmina de vidro com o dendrímero PAMAM foram construídos mapas de cores tridimensionais das micrografias (A) e (C) da Figura 7.24. Estes mapas estão ilustrados na Figura 7.25. As barras de cores indicam a intensidade de agregados plaquetários. Os mapas são representados por matrizes onde o valor de cada elemento indica se houve ou não a adesão de plaquetas. Para realizar o cálculo de adesão plaquetária em cada mapa foi adotado o seguinte procedimento:

- i - Foram lidos todos os elementos da matriz que constituem o mapa de cor;
- ii - Todos os elementos da matriz acima de 220 foram somados. Este valor foi tomado como o valor limite da adesão ou não de plaquetas sobre a superfície do vidro com e sem revestimento;
- iii - O resultado da soma de todos os elementos acima de 220 foi dividido pela soma de todos os elementos que constituem o mapa de cor. Esta razão fornece o percentual de adesão plaquetária.

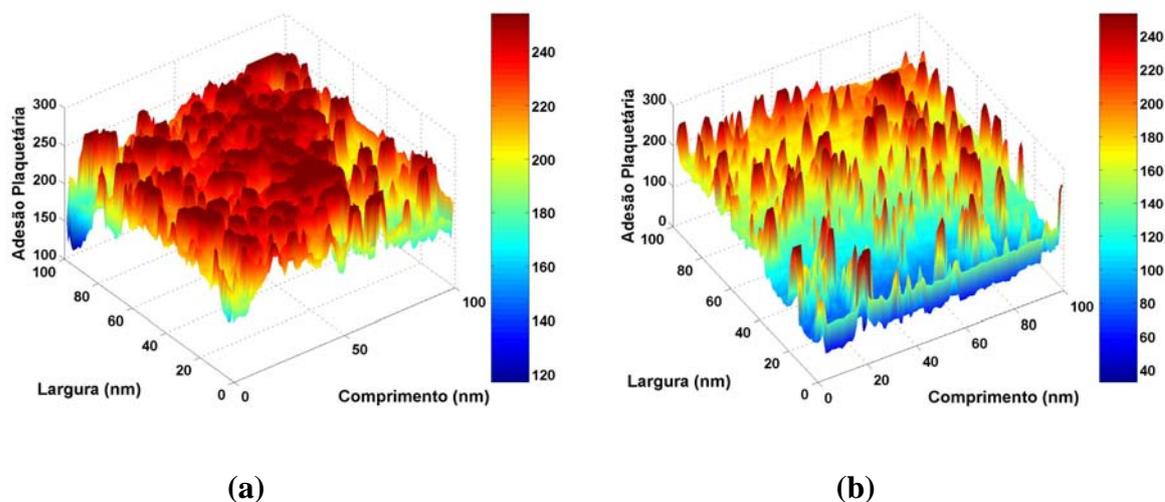
É necessário salientar, que os valores que indicam a intensidade de cor no mapa é um valor adimensional fornecido pelo *software MATLAB 7.0* ao ler a figura da micrografia de epifluorescência.

O percentual de adesão encontrado para o mapa de cor que representa a lâmina de vidro sem revestimento foi tomado como o valor máximo (100 %). Portanto, a partir de uma regra de três simples foi calculado o percentual de agregados plaquetários ainda observados após o revestimento. A partir deste procedimento, verificou-se uma redução de 81,89 % de agregados plaquetários ao revestir a lâmina de vidro com o dendrímero PAMAM.

Com base nestes resultados, observa-se que o dendrímero PAMAM não é idealmente hemocompatível uma vez que se observa na superfície do substrato de vidro revestido uma presença considerável de agregados plaquetários (Figura 7.19 (C) e (D)). A adesão plaquetária serve como um fator condicionador que determina a extensão da subsequente formação da trombose [16,18]. Estes resultados comprovam a alta interação entre o dendrímero PAMAM e as proteínas séricas BSA e HFb observada pela espectroscopia RPS.



**Figura 7.24** – Micrografias de epifluorescência das superfícies de vidro (A) e (B) e vidro revestido com o PAMAM (C), (D), (E) e (F) após exposição ao sangue humano. As micrografias (E) e (F) correspondem a uma ampliação de uma determinada região das micrografias (C) e (D), respectivamente. Aumento: 1000x.



**Figura 7.25** – Mapas de cores representativos de agregados plaquetários. Nas Figuras 7.24 (a) e (c) foram realizadas um processamento de imagem utilizando um código original do software *MATLAB 7.0* que permite uma melhor visualização das micrografias em 3 D. As Figuras 7.25 (a) e (b) correspondem às micrografias da Figura 7.24 (A) e (C), respectivamente. As barras de cores indicam a intensidade de agregados plaquetários.

Uma explicação plausível para a adesão plaquetária na superfície do dendrímero PAMAM pode ser formulada pensando-se em uma mudança conformacional da molécula de fibrinogênio devido a interação eletrostática entre os grupos amino-catiônicos da periferia do dendrímero PAMAM e a carga líquida negativa da proteína em pH próximo a 7.4. É fato conhecido da literatura que superfícies que alteram a conformação da proteína sérica HFb ou a desnaturam induzem a adesão plaquetária e a sua ativação [19]. Em síntese, a superfície do dendrímero PAMAM pode conter regiões com diferentes níveis de protonação promovendo uma distribuição randômica de energia potencial da superfície a qual altera a energia de adsorção entre o PAMAM e a proteína contribuindo para regiões onde a adesão plaquetária é mais ou menos pronunciada, como verificado através das micrografias de epifluorescência (Figura 7.24). Além disso, uma pequena rugosidade do filme dendrítico depositado sobre o vidro pode favorecer uma maior adsorção de proteínas do plasma sanguíneo devido a alterações da energia potencial na superfície dendrítica promovendo, assim, a adesão e ativação das plaquetas.

A fim de elucidar os argumentos abordados acima foi proposto um modelo qualitativo para explicar o surgimento de agregados plaquetários em certas regiões da lâmina de vidro revestida com PAMAM. O modelo consistiu na compartimentação da lamina de vidro em um mapa de cor de 100x50 compartimentos. Cada compartimento possui as dimensões do dendrímero PAMAM adsorvido sobre a lâmina de vidro. Como o dendrímero adsorvido sobre a superfície de vidro sofre mudanças conformacionais devido a interações eletrostáticas, foram adotados três tipos de diferentes conformações que permitem que as proteínas séricas não só interajam com as amins primárias do dendrímero, mas também com as amins secundárias e terciárias.

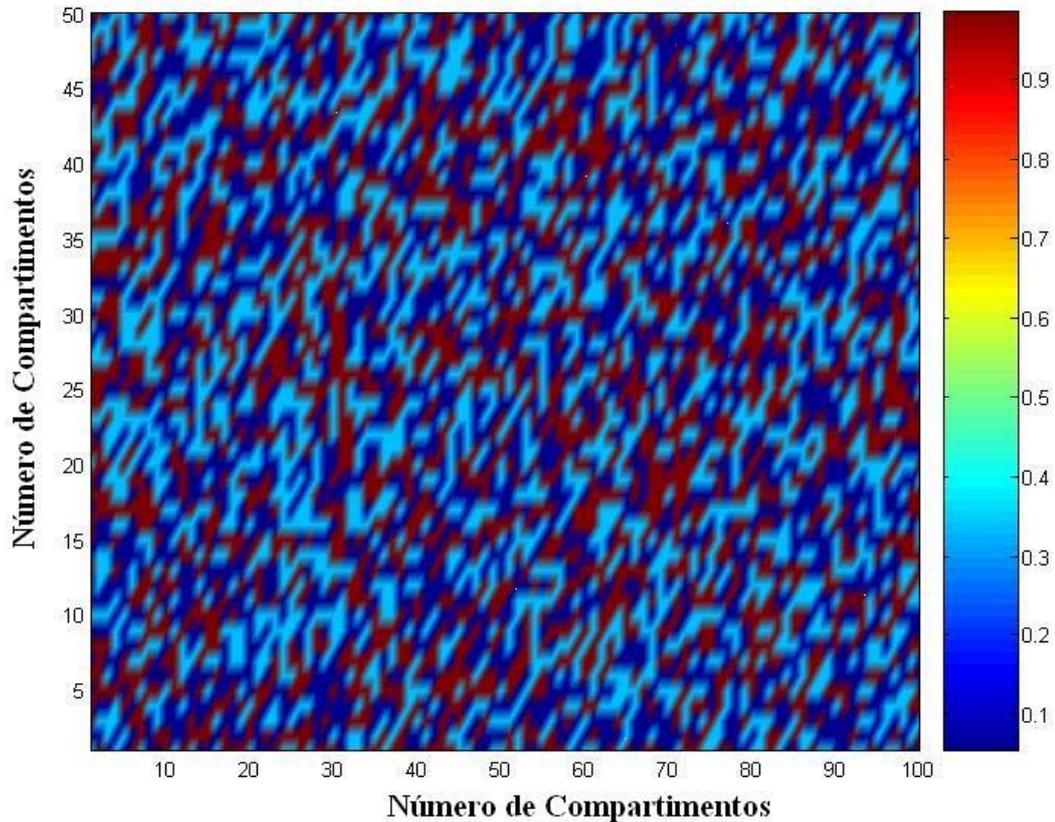
Um modelo de sítio ligante baseado no modelo de Ising clássico pode ser utilizado para fornecer uma explicação do mecanismo microscópico de protonação do dendrímero PAMAM [15]. Baseado neste modelo, os autores da referência [15], obtiveram os seguintes valores para a constante de ionização  $pK$  do dendrímero PAMAM em  $pH = 7.0 - 8.0$ :  $pK = 9.0, 5.7, 6.7$  correspondendo, respectivamente, as amins primárias, secundárias e terciárias. Neste sentido, o presente modelo admitirá que cada conformação do dendrímero adsorvido possua um  $pK$  específico conforme a interação de amins primárias, secundárias ou terciárias com as moléculas protéicas. Como o modelo é qualitativo, cada compartimento recebeu um dos três possíveis valores da constante  $pK$  de forma aleatória. O grau de protonação foi então calculado utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch dada por [21]:

$$\chi_{i,j} = \frac{10^{(pK_{i,j} - pH)}}{1 + 10^{(pK_{i,j} - pH)}}, \quad (7.2)$$

sendo  $\chi_{i,j}$  o grau de protonação do dendrímero e os índices  $i$  e  $j$  correspondem aos elementos de linha e coluna da matriz que constitui o mapa de cor, respectivamente.

O mapa de cor representativo da distribuição aleatória do grau de protonação da superfície do vidro revestida com PAMAM é apresentado na Figura 7.26. Como o grau de protonação é diretamente proporcional à carga elétrica que por sua vez é diretamente proporcional à energia potencial da superfície, o agregado plaquetário será maior nas regiões onde maior for o grau de protonação (região esta marcada pela cor vermelho escuro na Figura 7.26). Isso se deve ao fato de que o aumento do grau de protonação do dendrímero favorece

uma maior adsorção da molécula de HFb que por sua vez sofre uma mudança conformacional ou se desnatura, acarretando assim a adesão e ativação de agregados plaquetários.



**Figura 7.26** – Mapa de cor representativo dos diferentes graus de protonação do dendrímero PAMAM em  $\text{pH} = 7.0$ . A barra de cor representa o grau de protonação do dendrímero PAMAM normalizado.

Outra hipótese para o surgimento de agregados plaquetários significativos na lâmina revestida com o dendrímero PAMAM, diz respeito ao revestimento incompleto da lâmina de vidro por parte do material sintético. Como o vidro é um material altamente trombogênico estas regiões estariam suscetíveis à adesão e ativação plaquetária.

## 7.8 – Referências Bibliográficas

- [1] Cowie, J.M.G. Polymers: chemistry & physics of modern materials. *New York, Chapman & Hall*, p. 210-213, 1991.

- [2] Asthana, A.; Chauhan, A. S.; Diwan, P. V.; Jain N. K. Poly(amidoamine) (PAMAM) Dendritic Nanostructures for Controlled Sitespecific Delivery of Acidic Anti-inflammatory Active Ingredient. **Pharmacy Science Technology**. 6:536-542,2005.
- [3] Hedden et. al. Templating of inorganic nanoparticles by PAMAM/PEG dendrimer-star polymers. **Polymer**, **43**, p. 5473–54101, 2002.
- [4] Davis, A.P.; Ma, G.; Allen, H.C. Surface vibrational sum frequency and Raman studies of PAMAM G0, G1 and acylated PAMAM G0 dendrimers. **Analytica Chimica Acta**, **496**, p.117-131, 2003.
- [5] Risser, S.M.; Beratan, D.N.; Onuchicz, J.N. Electronic coupling in starburst dendrimers: connectivity, disorder, and finite size effects in macromolecular bethe lattices. **Journal of Physical Chemistry**, **97**, p. 4523-4527, 1993.
- [6] de Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of syntetic and biopolymers at the air-water interface. **Biopolymers**. 17:1759-1772, 1977.
- [7] Smiechowski, F. S.; Lvovich, V. F.; Roy, A.; Fleischman, A.; Fissell, W. H.; Riga, A. T. Electrochemical detection and characterization of Proteins. **Biosensors and Bioelectronics**. 22:670-677, 2006.
- [8] Tumolo, T.; Angnes, L.; Baptista, M. S. Determination of the index increment of molecule and macromolecule solutions by surface plásmón resonance. **Analytical Biochemistry**. 333: 273-279, 2004.
- [9] Voros, J. The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers. **Biophysical Journal**. 87:553-561, 2004.
- [10] Klajnert B, Stanislawska L, Bryszewska M, Palecz B. Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. **Biochimica et Biophysica**. 2003;1648:115-126.
- [11] Rahman, K. M. A.; Durning, C. J.; Turro, N. J.; Tomalia, D. A. Adsorption of Poly(amidoamine) Dendrimers on Gold. **Langmuir**. 16:10154-10160, 2000.
- [12] Hiraiwa, D.; Yoshimura, T.; Esumi, K. Interaction forces between poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers adsorbed on gold surfaces. **Journal of Colloid and Interfaces Science**. 2005.
- [13] Tully, D. C.; Fréchet, M. J. Dendrimers at surfaces and interfaces: chemistry and applications. **Chemical Communication**. 1129-1239, 2001.

- [14] Kleinman, M. H.; Flory, J. H.; Tomalia, D. A.; Turro, N. J. Effect of Protonation and PAMAM dendrimer size on the complexation and dynamic mobility of 2-Naphthol. *American Chemical Society*.
- [15] Cakara, D.; Kleimann, J.; Borkovec, M. Microscopic Protonation Equilibria of Poly(amidoamine) Dendrimer from Macroscopic Titrations. *Macromolecules*. 36:4201-4207, 2003
- [16] Adams, G.A.; Feuerstein, I.A. Visual fluorescent and radioisotopic evaluation of platelet accumulation and embolization. *Trans.Amer. Soc.Art.Intern* 26:17-23, 1980.
- [17] Güleç, H. A.; Sariog˘lu, K.; Mutlu, M. Journal of Food Engineering Modification of food contacting surfaces by plasma polymerisation technique. Part I: Determination of hydrophilicity, hydrophobicity and surface free energy by contact angle method. *Journal of food engineering*. 75:187-195, 2006.
- [18] Alves, S. B.; de Queiroz, A.A.A.; Higa, O. Z. Digital Image Processing for Biocompatibility Studies of Clinical Implants Materials. *Artificial Organs*. 27:444-446, 2003.
- [19] Lindon, J. N.; McManama, G.; Kushner, Leslie; Merrill, E. W.; Salzman, E. W. Does the Conformation of Adsorbed Fibrinogen Dictate Platelet Interactions With Artificial Surfaces? *Blood*. 68:355-362, 1986.
- [20] Lassen, B.; Malmsten, M. Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 186:9-16, 1997.
- [21] Kundrotas, P. J.; Karshikoff, A. Modeling of denatured state for calculation of the electrostatic contribution to protein stability. *Protein Science*. 11:1681-1686, 2002.
- [22] Spraggon, G.; Applegate, D. Crystal structure of a recombinant alpha EC domain from human fibrinogen-420. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:9099-9104, 1998.
- [23] Jozefowicz M, Jozefonvicz J, Antithrombogenic Polymers. *Pure & Appi. Chem*. 56:1335-1344, 1984.

## Capítulo 8 – Conclusões

---

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- 1- Os resultados do baixo índice de polidispersão obtido (1,15) e o pico monomodal característico obtidos a partir da análise por GPC indicam um elevado grau de pureza do dendrímero PAMAM G4 sintetizado no laboratório de Biomateriais da UNIFEI.
- 2- Os resultados da espectroscopia FTIR e <sup>1</sup>H-MNR comprovaram a estrutura dendrítica do polímero de poli(amido amina) bem como a presença dos grupos amino terminais na periferia do dendrímero.
- 3- Os resultados experimentais para os parâmetros óticos dos filmes finos de ouro para o comprimento de onda igual a *632.8 nm* obtidos através da técnica RPS, estão em boa concordância com os resultados da literatura.
- 4- Os resultados da adsorção do dendrímero PAMAM sobre substratos de ouro estão de acordo com os resultados de microscopia de força atômica discutidos na literatura, uma vez que comprovam a mudança conformacional do dendrímero ao se adsorver sobre o substrato de ouro devido a interações eletrostáticas. Esta mudança conformacional foi verificada através de uma redução na espessura da monocamada dendrítica adsorvida sobre a superfície do ouro verificada por espectroscopia RPS.
- 5- Os ensaios de adsorção das proteínas séricas BSA e HFb sobre a superfície do dendrímero PAMAM G4 foi estudado utilizando os modelos de isotermas de Langmuir e Freundlich. Os resultados obtidos sugerem a formação de multicamadas heterogêneas.
- 6- Um modelo de empacotamento das proteínas foi proposto a fim de se entender o processo de adsorção sobre o dendrímero PAMAM.

- 7- Os resultados da cinética e da energia livre de adsorção indicam uma elevada interação entre o dendrímero PAMAM e as proteínas séricas. A forte interação com a proteína BSA é um fator que contribui para a hemocompatibilidade do dendrímero PAMAM uma vez que esta molécula protéica favorece o bloqueio subsequente das demais proteínas que podem propiciar a adesão e ativação plaquetária desencadeando uma série de reações bioquímicas que culminam na formação de trombos na superfície do material. Por outro lado, a boa afinidade do dendrímero com a molécula de fibrinogênio é um resultado não adequado para as características hemocompatíveis do PAMAM, devido esta proteína ser um dos fatores principais na coagulação sanguínea.
- 8- Os resultados da microscopia de epifluorescência indicaram que o revestimento dendrítico possui boas características de hemocompatibilidade. Neste caso, embora possua uma afinidade semelhante para ambas as proteínas HSA e HFb; os resultados indicam que a camada de HSA adsorvida na superfície do dendrímero parece deslocar as moléculas de HFb uma vez que o revestimento dendrítico apresentou menos adesão plaquetária (81,89) e formação de trombos relativamente ao substrato de vidro.
- 9- O aparecimento de regiões com elevado grau de hemocompatibilidade e outras com agregados plaquetários pode ser elucidada devido há uma distribuição aleatória da energia potencial da superfície proporcionada pelos diferentes graus de protonação do dendrímero PAMAM. Essa diferença de energia potencial da superfície altera a energia de adsorção entre o PAMAM e a proteína contribuindo para regiões onde a adesão plaquetária é mais ou menos pronunciada, como verificado através das micrografias de epifluorescência. Além disso, uma pequena rugosidade do filme dendrítico depositado sobre o vidro pode favorecer uma maior adsorção do HFb do plasma sanguíneo devido a alterações da energia potencial na superfície dendrítica promovendo, assim, a adesão e ativação das plaquetas.
- 10- Outra hipótese para o surgimento de agregados plaquetários significativos na lâmina revestida com o dendrímero PAMAM, diz respeito ao revestimento incompleto da lâmina

de vidro por parte do material sintético. Como o vidro é um material altamente trombogênico estas regiões estariam suscetíveis à adesão e ativação plaquetária.

- 11- Em condições fisiológicas o dendrímero PAMAM adsorve preferencialmente a proteína BSA relativamente ao HFb conforme indicado pela maior energia livre de Gibbs de adsorção.
- 12- As técnicas RPS e de epifluorescência apresentaram resultados coerentes.
- 13- Padronizou-se a técnica RPS para avaliação das propriedades hemocompatíveis que poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de biomateriais nanoestruturados para aplicação na área cardiovascular.
- 14- A elevada afinidade entre a proteína BSA e o dendrímero PAMAM parece propiciar o surgimento de regiões como alto grau de hemocompatibilidade ilustrados através das micrografias de epifluorescência. Todavia, uma análise mais elaborada com ensaios de adsorção competitiva faz-se necessário para consolidar não só os resultados obtidos neste trabalho, mas também para viabilizar a utilização deste material na área cardiovascular.

## Capítulo 9 – Perspectivas Futuras

---

A análise da compatibilidade de materiais sintéticos com o sangue tem atraído a atenção de vários pesquisadores no mundo inteiro há pelo menos meio século. A possibilidade da descoberta de novos materiais que possam ser utilizados em próteses cardiovasculares, implantes, cirurgias reconstrutivas, dentre outros, e que possam ser aceitos integralmente pelo tecido vivo desencadearia uma revolução na biomedicina concomitantemente com a qualidade de vida da população em geral.

Os dendrímeros despontam no horizonte da química macromolecular como uma alternativa significativamente promissora para o projeto de revestimentos hemocompatíveis. Entretanto, estudos mais minuciosos sobre a hemocompatibilidade do dendrímero PAMAM ainda precisam ser efetuados não só para explorar o seu caráter hemocompatível, mas também para aumentar o grau de biocompatibilidade desta macromolécula.

Os dendrímeros foram sintetizados há pouco mais de duas décadas e suas verdadeiras propriedades hemocompatíveis estão em sua maior parte ainda carente de estudos. Trabalhos futuros que contribuam para a viabilização da utilização deste material na biomedicina e também na confecção de dispositivos óticos em miniatura baseados no fenômeno RPS para análises clínicas em tempo real poderão contribuir significativamente para a medicina cardiovascular.

Neste sentido, as seguintes perspectivas futuras podem ser apresentadas como uma continuidade ao que já foi desenvolvido neste trabalho:

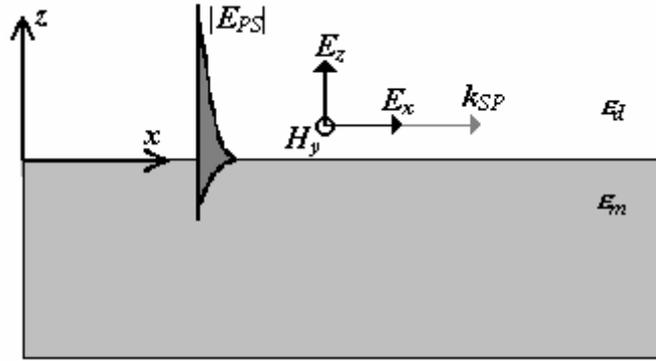
- Investigação da interação entre proteínas séricas e dendrímeros PAMAM através de simulações computacionais utilizando o método de Monte Carlo;
- Estudo da cinética de adsorção competitiva entre Albumina, Imunoglobulinas e Fibrinogênio sobre a superfície do dendrímero PAMAM a fim de simular o evento que ocorre no tecido sanguíneo humano;
- Miniaturização do dispositivo RPS acoplado a um processador digital de sinais para utilização em diagnósticos clínicos no sentido de desenvolver o avanço científico-tecnológico do país e contribuir para um diagnóstico rápido, eficiente e de baixo custo;

- Utilização do fenômeno RPS para desenvolvimento de biossensores óticos baseados em fibra-ótica para quantificação da molécula de óxido nítrico que possui um papel fundamental na neurotransmissão de impulsos nervosos durante descargas neuronais intensas (epilepsia).

## Apêndice A – Cálculo da relação de dispersão dos Plásmons de Superfície

---

O campo eletromagnético de uma onda de plásmons de superfície (OPS) em uma interface metal/dielétrico é obtido através das soluções das equações de Maxwell em cada meio e das condições de contorno associadas. A Figura A.1 apresenta uma interface entre um metal e um meio dielétrico transparente.



**Figura A.1** – Figura representativa das componentes do campo eletromagnético na interface entre um metal e um meio dielétrico transparente.  $|E_{SP}|$  é o módulo do campo eletromagnético gerado pelos plásmons de superfície.

Considerando que a onda p-polarizada do modo magnético transversal (MT) propaga-se ao longo da direção  $x$ . Para uma onda que possui esta polarização, o vetor magnético é perpendicular ao plano de incidência. As soluções das equações de Maxwell para as componentes do campo elétrico da MT podem ser escritas como:

$$\vec{E}^d = (A_x^d \hat{x} + A_z^d \hat{z}) e^{i(k_{sp}x + k_z^d z - \omega t)} \quad (\text{A.1})$$

na região  $z > 0$ , e como

$$\vec{E}^m = (A_x^m \hat{x} + A_z^m \hat{z}) e^{i(k_{sp}x + k_z^m z - \omega t)} \quad (\text{A.2})$$

na região  $z < 0$ , onde  $k_{sp}$  e  $\omega$  são os vetores de onda e frequência angular dos plásmons de superfície.

Substituindo as equações (A.1) e (A.2) na equação de onda (A.3)

$$\nabla^2 E - \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = 0, \quad (\text{A.3})$$

onde  $\varepsilon_m$  e  $\varepsilon_d$  são as constantes dielétricas do metal e dielétrico e  $c$  é a velocidade da luz, obtêm-se

$$k_{sp}^2 + (k_z^d)^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \varepsilon_d \quad (\text{A.4})$$

no meio dielétrico, e

$$k_{sp}^2 + (k_z^m)^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \varepsilon_m, \quad (\text{A.5})$$

no meio metálico.

Considerando as condições de contorno de continuidade do campo eletromagnético,

$$E_d^{\parallel} \Big|_{z=0} = E_m^{\parallel} \Big|_{z=0} \text{ e } \varepsilon_d E_d^{\perp} \Big|_{z=0} = \varepsilon_m E_m^{\perp} \Big|_{z=0}, \text{ na interface, têm-se}$$

$$E_{xo}^d = E_{xo}^m \text{ e } \varepsilon_d E_{zo}^d = \varepsilon_m E_{zo}^m. \quad (\text{A.6})$$

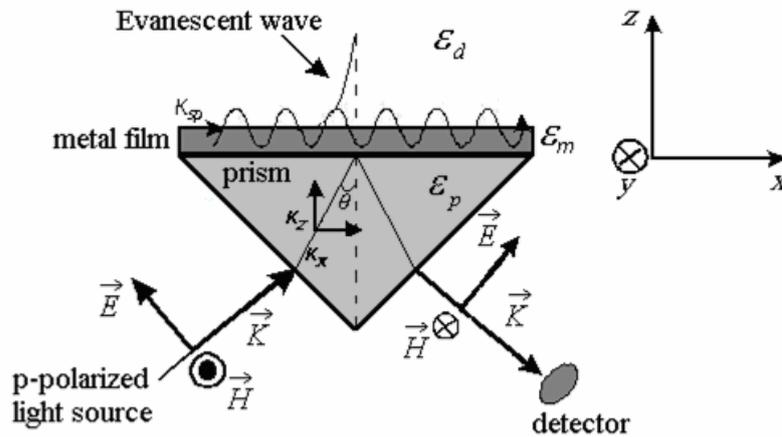
Desde que não haja carga externa em ambos os meios,  $\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0$  (Lei de Gauss), obtêm-se

$$ik_x E_{xo}^d + ik_z^d E_{zo}^d = 0 \text{ e } ik_x E_{xo}^m + ik_z^m E_{zo}^m = 0. \quad (\text{A.7})$$

Combinando as equações (A.4)-(A.7) obtêm-se a relação de dispersão para a interface metal-dielétrico, ou seja, o vetor de onda dos plásmons de superfície é descrito, matematicamente, por:

$$k_{sp}^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}. \quad (\text{A.8})$$

Uma conclusão importante é que o vetor de onda  $k_{SP}$  do modo magnético transversal é maior que os vetores de onda  $k_d = \left(\frac{\omega}{c}\right)\sqrt{\epsilon_d}$  e  $k_m = \left(\frac{\omega}{c}\right)\sqrt{\epsilon_m}$  em ambos os meios. Por esta razão é impossível excitar os PS diretamente por radiação eletromagnética. Contudo, pode-se fazer uso de configurações apropriadas para excitar OPS. A configuração mais popular é a configuração proposta por Kretschmann em 1971, na qual a onda eletromagnética é acoplada aos PS por meio de um prisma de vidro (Figura A.2).



**Figura A.2** – Diagrama representativo da configuração de Kretschmann para excitação de PS. A RPS é excitada em uma interface prisma-metal quando o ângulo de incidência da fonte de laser é tal que  $k_{SP} = k_x$ .

Através de uma relação trigonométrica elementar a componente  $x$  do vetor de onda proveniente da radiação incidente pode ser obtida através da equação (A.9).

$$k_x = \left(\frac{\omega}{c}\right)\sqrt{\epsilon_p} \sin \theta, \quad (\text{A.9})$$

sendo  $\theta$  o ângulo da radiação incidente e  $\varepsilon_p$  é a constante dielétrica do prisma. Quando a componente  $x$  do vetor de onda da radiação incidente for de igual magnitude do vetor de onda ( $k_{SP}$ ) dos PS, ocorre o fenômeno de RPS. Matematicamente, descrito por:

$$\theta_R = \arcsen\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{(\varepsilon_d + \varepsilon_m) \varepsilon_p}}\right), \quad (\text{A.10})$$

sendo  $\theta_R$  o ângulo incidente para o qual os PS entram em ressonância com a radiação incidente, chamado de ângulo ressonante.

## Apêndice B - O Método das Correções Diferenciais

---

A seguir é apresentado o método da correção diferencial que é uma extensão do método dos mínimos quadrados para mais de um parâmetro. O procedimento aqui desenvolvido para o caso de obtenção de apenas três parâmetros pode ser estendido para o caso de um número arbitrário de parâmetros.

Consideremos uma função  $f(a, b, c, x)$ , cujos parâmetros  $a, b, c$  devem ser ajustados para obtenção de uma ótima representação dos dados  $y_i (i = 1, 2, \dots, N)$ . O objetivo é, portanto, minimizar o erro absoluto quadrático,

$$F(a, b, c) = \sum_{i=1}^N [f(a, b, c, x_i) - y_i]^2 \equiv \sum_{i=1}^N r_i^2 \quad (\text{B.1})$$

Sendo  $r_i$  definido por:

$$r_i = f(a, b, c, x_i) - y_i = f_i - y_i. \quad (\text{B.2})$$

Como  $F$  é positiva, isto é  $F \geq 0$ , a melhor escolha para os parâmetros  $a, b, c$  ocorre quando,

$$\frac{\partial F}{\partial a} = \frac{\partial F}{\partial b} = \frac{\partial F}{\partial c} = 0. \quad (\text{B.3})$$

Aplicando a condição  $\frac{\partial F}{\partial a} = 0$ , obtêm-se,

$$\frac{\partial F}{\partial a} = \sum_{i=1}^N 2r_i \frac{\partial r_i}{\partial a} = 0 \quad (\text{B.4})$$

De modo análogo obtêm-se a variação de  $F$  com relação a  $b$ :

$$\frac{\partial F}{\partial b} = \sum_{i=1}^N 2r_i \frac{\partial r_i}{\partial b} = 0, \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{\partial F}{\partial c} = \sum_{i=1}^N 2r_i \frac{\partial r_i}{\partial c} = 0 \quad (\text{B.6})$$

portanto,

$$\sum_{i=1}^N r_i \frac{\partial r_i}{\partial a} = 0 \quad (\text{B.7})$$

$$\sum_{i=1}^N r_i \frac{\partial r_i}{\partial b} = 0 \quad (\text{B.8})$$

$$\sum_{i=1}^N r_i \frac{\partial r_i}{\partial c} = 0. \quad (\text{B.9})$$

Admitindo que sejam conhecidas as aproximações iniciais  $a_o, b_o, c_o$  para obtenção de  $r_i$ , então esse parâmetro pode ser aproximado em primeira ordem na forma,

$$r_i \cong r_{i0} + \left. \frac{\partial r_i}{\partial a} \right|_0 \Delta a + \left. \frac{\partial r_i}{\partial b} \right|_0 \Delta b + \left. \frac{\partial r_i}{\partial c} \right|_0 \Delta c. \quad (\text{B.10})$$

Utilizando essa última aproximação na equação (B.3) obtém

$$\sum_{i=1}^N \left( r_{i0} + \left. \frac{\partial r_i}{\partial a} \right|_0 \Delta a + \left. \frac{\partial r_i}{\partial b} \right|_0 \Delta b + \left. \frac{\partial r_i}{\partial c} \right|_0 \Delta c \right) \left. \frac{\partial r_i}{\partial a} \right|_0 = 0. \quad (\text{B.11})$$

Dado que  $\left. \frac{\partial r_i}{\partial a} \right|_0 = \left. \frac{\partial f_i}{\partial a} \right|_0$ , a última expressão pode ser expressa na forma,

$$\sum_{i=1}^N r_{i0} \left. \frac{\partial f_i}{\partial a} \right|_0 + \Delta a \sum_{i=1}^N \left( \left. \frac{\partial f_i}{\partial a} \right|_0 \right)^2 + \Delta b \sum_{i=1}^N \left( \left. \frac{\partial f_i}{\partial a} \right|_0 \left. \frac{\partial f_i}{\partial b} \right|_0 \right) + \Delta c \sum_{i=1}^N \left( \left. \frac{\partial f_i}{\partial a} \right|_0 \left. \frac{\partial f_i}{\partial c} \right|_0 \right) = 0. \quad (\text{B.12})$$

Obtêm-se, portanto, a equação linear:

$$\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial a} \right)_0^2 \Delta a + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial a} \frac{\partial f_i}{\partial b} \right)_0 \Delta b + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial a} \frac{\partial f_i}{\partial c} \right)_0 \Delta c = - \sum_{i=1}^N r_{i0} \frac{\partial f_i}{\partial a} \Big|_0. \quad (\text{B.13})$$

Um procedimento semelhante aplicado às equações (B.4) e (B.5) fornece,

$$\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial a} \frac{\partial f_i}{\partial b} \right)_0 \Delta a + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial b} \right)_0^2 \Delta b + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial b} \frac{\partial f_i}{\partial c} \right)_0 \Delta c = - \sum_{i=1}^N r_{i0} \frac{\partial f_i}{\partial b} \Big|_0 \quad (\text{B.14})$$

$$\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial a} \frac{\partial f_i}{\partial c} \right)_0 \Delta a + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial b} \frac{\partial f_i}{\partial c} \right)_0 \Delta b + \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f_i}{\partial c} \right)_0^2 \Delta c = - \sum_{i=1}^N r_{i0} \frac{\partial f_i}{\partial c} \Big|_0. \quad (\text{B.15})$$

As equações (B.13), (B.14) e (B.15) constituem um sistema de três equações diferenciais parciais, não lineares e com coeficientes variáveis que permitem determinar as correções  $\Delta a, \Delta b, \Delta c$ . Na forma matricial, obtêm-se:

$$\begin{pmatrix} \Delta a \\ \Delta b \\ \Delta c \end{pmatrix} = A(a, b, c) \cdot \begin{pmatrix} - \sum_{i=1}^N r_{i0} \frac{\partial f_i}{\partial a} \Big|_0 \\ - \sum_{i=1}^N r_{i0} \frac{\partial f_i}{\partial b} \Big|_0 \\ - \sum_{i=1}^N r_{i0} \frac{\partial f_i}{\partial c} \Big|_0 \end{pmatrix}, \quad (\text{B.16})$$

Sendo  $A(a, b, c)$  dado por:

$$A(a, b, c) = \begin{pmatrix} \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial a} \right)_0^2 & \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial a} \frac{\partial f_j}{\partial b} \right)_0 & \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial a} \frac{\partial f_j}{\partial c} \right)_0 \\ \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial a} \frac{\partial f_j}{\partial b} \right)_0 & \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial b} \right)_0^2 & \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial b} \frac{\partial f_j}{\partial c} \right)_0 \\ \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial a} \frac{\partial f_j}{\partial c} \right)_0 & \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial b} \frac{\partial f_j}{\partial c} \right)_0 & \sum_{j=1}^N \left( \frac{\partial f_j}{\partial c} \right)_0^2 \end{pmatrix}^{-1}. \quad (\text{B.17})$$

O procedimento pode ser executado iterativamente até o ponto de minimização do erro absoluto quadrático, dentro de um critério de precisão pré-estabelecido.

## Apêndice C - Cálculo da reflectância para uma estrutura de n-camadas na configuração de Kretschmann

---

Neste apêndice será desenvolvida a expressão para a reflectância da superfície do filme metálico e das camadas adjacentes, cuja dependência angular revela o efeito de ressonância de plásmons de superfície. Tal efeito está diretamente relacionado com os parâmetros ópticos e estruturais do filme metálico e da região adjacente à superfície externa do metal.

A geometria considerada está ilustrada na Figura C.1, sendo composta dos meios  $1, 2, j-1, j, j+1, n-1$  e  $n$ . As camadas estão empilhadas ao longo da direção  $z$  e possui uma extensão infinita nas direções  $x$  e  $y$ . A camada 1 e a camada  $n$  estendem-se para  $z \rightarrow -\infty$  e  $z \rightarrow +\infty$ , respectivamente, e as camadas intermediárias estão limitadas em  $z_1, z_2, \dots, z_{n-1}$ . A constante dielétrica de cada camada é designada por  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_n$ , e a espessura da  $j$ th camada é dada por:

$$d_j = z_j - z_{j-1} \quad \text{para } 2 \leq j \leq n-1.$$

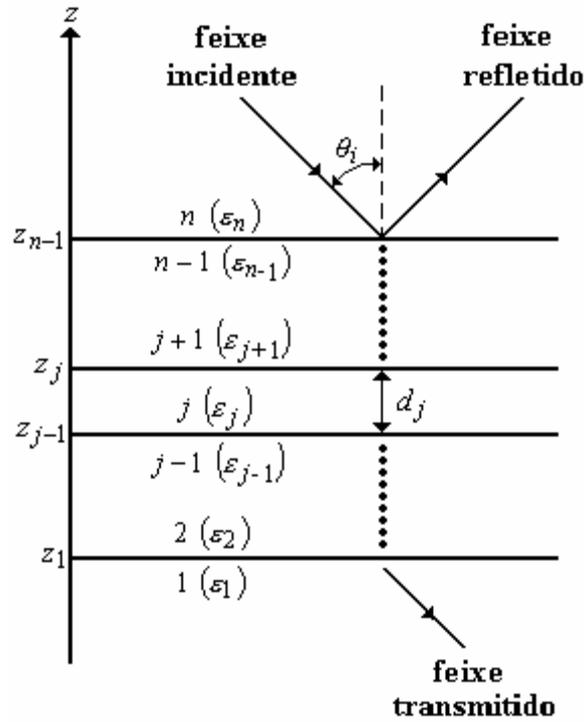
Conforme delineado na referência , admite-se que a onda incidente no meio  $n$  esteja polarizada no plano de incidência, condição necessária ao acoplamento com a oscilação de PS.

Assumindo que as camadas dielétricas e metálicas, que constituem a estrutura referida na Figura C.1, são uniformes e isotrópicas, sem perda de generalidade pode-se assumir que os PS nesta estrutura propagam-se ao longo da direção  $x$  com um vetor de onda real  $k_x$  ao longo da interface. Assim, em uma frequência  $\omega$ , a forma do campo elétrico na camada  $j$  pode ser escrito como:

$$E(j) = \left[ A(j)e^{ik_x(j)d_j} + B(j)e^{-ik_z(j)d_j} \right] e^{(k_x x - \omega t)} \quad (\text{C.1})$$

sendo a componente do vetor de onda ao longo da direção  $z$ ,  $k_z(j)$ , é dado por:

$$k_z(j) = \sqrt{\frac{\varepsilon_j \omega^2}{c^2} - k_x^2}, \quad (\text{C.2})$$



**Figura C.1** – Estrutura utilizada no cálculo do coeficiente de reflexão.

em que a componente  $c$  representa a velocidade da luz no vácuo.  $A(j)$  e  $B(j)$  são os vetores de amplitude do campo com as três componentes  $A_\mu(j)$  e  $B_\mu(j)$  para  $\mu = x, y, z$ . As relações entre  $A_\mu(j)$  e  $B_\mu(j)$  são determinadas requerendo que elas satisfaçam as equações de Maxwell e as condições de contorno nas  $n-1$  interfaces em  $z_1, z_2, \dots, z_{n-1}$ .

Ao resolver as equações de Maxwell e as respectivas condições de contorno em  $z = z_j$  para a fonte de luz p-polarizada (modo magnético transversal - MT) obtém-se como resultado:

$$\begin{bmatrix} A_x(j+1) \\ B_x(j+1) \end{bmatrix} = M_{MT}(j+1, j) \begin{bmatrix} A_x(j) \\ B_x(j) \end{bmatrix}, \quad (\text{C.3})$$

sendo  $M_{MT}(j+1, j)$  uma matriz dada por:

$$M_{MT}(j+1, j) = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} \left[ 1 + \frac{\varepsilon_j k_z(j+1)}{\varepsilon_{j+1} k_z(j)} \right] e^{ik_z(j)d_j} & \left[ 1 - \frac{\varepsilon_j k_z(j+1)}{\varepsilon_{j+1} k_z(j)} \right] e^{-ik_z(j)d_j} \\ \left[ 1 - \frac{\varepsilon_j k_z(j+1)}{\varepsilon_{j+1} k_z(j)} \right] e^{ik_z(j)d_j} & \left[ 1 + \frac{\varepsilon_j k_z(j+1)}{\varepsilon_{j+1} k_z(j)} \right] e^{-ik_z(j)d_j} \end{bmatrix}. \quad (C.4)$$

Assim, a equação (C.3) pode ser reescrita da seguinte forma para uma estrutura de n-camadas:

$$\begin{bmatrix} A_x(l) \\ B_x(l) \end{bmatrix} = \left[ \prod_{j=k}^{l-1} M_{MT}(j+1, j) \right] \begin{bmatrix} A_x(k) \\ B_x(k) \end{bmatrix} \text{ para } l \geq k+1 \quad (C.5)$$

Para a fonte de luz plano-polarizada,  $A_y(j) = B_y(j) = 0$  e, portanto,

$$A_z(j) = -\frac{k_x}{k_z(j)} A_x(j) \quad (C.6)$$

$$B_z(j) = -\frac{k_x}{k_z(j)} B_x(j) \quad (C.7)$$

Para obter a expressão para a reflectância para os plásmons de superfície na estrutura de n-camadas, é conveniente definir a matriz  $M_{MT}$  por:

$$M_{MT} = \prod_{j=k}^{l-1} M_{MT}(j+1, j) \equiv \begin{bmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{bmatrix} \quad (C.8)$$

Então,

$$\begin{bmatrix} A_x(n) \\ B_x(n) \end{bmatrix} = M_{MT} \begin{bmatrix} A_x(1) \\ B_x(1) \end{bmatrix}. \quad (C.8a)$$

Neste ponto é conveniente retornar a equação (C.2) e estabelecer uma convenção de sinal consistente. Assumindo que  $\omega$  e  $k_x$  sejam reais,  $\text{Im}k_z^2(j) > 0$  e que  $k_z^2(j)$  estejam na parte superior do plano complexo, e que  $k_z(j)$  encontra-se no primeiro quadrante  $[\text{Re}(k_z(j))] > 0$  e  $[\text{Im}(k_z(j))] > 0$  ou no terceiro quadrante  $[\text{Re}(k_z(j))] < 0$  e  $[\text{Im}(k_z(j))] < 0$  do

plano complexo. Tomando a raiz quadrada na equação (C.2) de modo que  $k_z(j)$  encontre-se no primeiro quadrante:

$$[Re(k_z(j))] > 0 \text{ e } [Im(k_z(j))] > 0.$$

Então, por inferência na equação (C.1) observa-se que  $A(j)$  representa uma onda propagando na direção do  $z$  positivo e  $B(j)$  representa uma onda propagando na direção do  $z$  negativo. Assim, a reflectância da estrutura de camadas de filmes dielétricos e metálicos é dada por:

$$R = \left| \frac{A_x(n)\hat{x} + A_z(n)\hat{z}}{B_x(n)\hat{x} + B_z(n)\hat{z}} \right|^2. \quad (C.9)$$

Utilizando a condição de que não haja nenhuma onda ascendente propagando no meio 1, isto é,

$$A_x(1) = A_z(1) = 0. \quad (C.10)$$

e ainda, as equações (C.6) e (C.7), a equação (C.9) pode ser simplificada da seguinte forma:

$$R = \left| \frac{A_x(n)}{B_x(n)} \right|^2. \quad (C.11)$$

Das equações (C.8a) e (C.10) obtêm-se:

$$\begin{bmatrix} A_x(n) \\ B_x(n) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 \\ B_x(1) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} M_{12} \\ M_{22} \end{bmatrix} B_x(1). \quad (C.12)$$

Portanto,

$$R = \left| \frac{M_{12}}{M_{22}} \right|^2. \quad (C.13)$$

De forma análoga, à transmitância para a estrutura de n-camadas para a luz p-polarizada é definida como a razão da intensidade de luz transmitida em  $z = z_1$  e a intensidade de luz incidente no meio  $n$  em  $z = z_{n-1}$ . Logo, pode-se escrever:

$$T = \frac{\left| B_x(1)\hat{x} + B_z(1)\hat{z} \right|^2}{\left| B_x(n)\hat{x} + B_z(n)\hat{z} \right|^2}. \quad (\text{C.14})$$

De novo assumindo que não haja nenhuma onda propagando-se ascendentemente no meio 1, a equação (C.10) é válida. Utilizando as equações (C.7) e (C.12), esta equação pode ser simplificada da seguinte forma:

$$T = \frac{1}{|M_{22}|^2} \left[ \cos^2 \theta + \left| \frac{k_z(n)}{k_z(1)} \right|^2 \sin^2 \theta \right], \quad (\text{C.15})$$

sendo  $\theta$  é o ângulo de incidência no meio  $n$ .