

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**POTENCIAIS APLICAÇÕES DE POLÍMEROS ESCOVA
EM BIOSSENSORES**

Henrique Antonio Mendonça Faria

Itajubá, janeiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

Henrique Antonio Mendonça Faria

**POTENCIAIS APLICAÇÕES DE POLÍMEROS ESCOVA
EM BIOSSENSORES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia como parte dos requisitos parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia

Área de Concentração: Não metais

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

Janeiro de 2013
Itajubá

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –
Bibliotecária Margareth Ribeiro- CRB_6/1700

F224p

Faria, Henrique Antonio Mendonça
Potenciais Aplicações de Polímeros Escova em Biossensores /
Henrique Antonio Mendonça Faria. -- Itajubá, (MG) : [s.n.], 2013.
104 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Polímeros escova. 2. Biossensores. 3. IgG. 4. Diagnóstico.
5. Dengue. 6. Azul da Prússia. I. Queiroz, Alvaro Antonio Alen-
car de, orient. II. Universidade Federal de Itajubá. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

Henrique Antonio Mendonça Faria

**POTENCIAIS APLICAÇÕES DE POLÍMEROS ESCOVA
EM BIOSSENSORES**

Dissertação aprovada por banca examinadora em 30 de janeiro de 2013, conferindo ao autor o título de **Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia**.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães – IFSC/USP

Prof. Dr. Maurício Silva dos Santos – UNIFEI

Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz (Orientador) – UNIFEI

Itajubá, 2013

À Simoni Venturini.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Alvaro de Queiroz pela orientação dedicada, muitas vezes fundamental para o direcionamento da pesquisa desta dissertação de Mestrado.

Aos meus pais José Maria (*in memorian*) e Victória Régia (*in memorian*) pela educação e disciplina proporcionada durante nossa convivência nessa vida.

Às minhas irmãs: Izabel e Helena pelo imenso apoio e carinho, que em muitos momentos foram imprescindíveis nessa caminhada de aprendizados.

Aos professores que me auxiliaram durante o programa de Pós-Graduação e colaboraram de maneira enriquecedora para conclusão de mais uma etapa da formação acadêmica.

Aos colegas que muitas vezes me ensinaram a ver o mundo de outro ponto de vista.

A todos os funcionários do programa de Pós-Graduação e da Unifei pelo serviço eficiente, sem o qual o objetivo final desta dissertação não seria completado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento desta pesquisa.

E finalmente a todos os indivíduos que aspiram uma melhor condição de vida em qualquer âmbito da evolução humana.

RESUMO

Os polímeros escova são formados por cadeias poliméricas ligadas a um substrato. Sua popularidade cresceu na última década devido à flexibilidade de sua síntese que permite gerar superfícies de estímulo e resposta especializadas. Os polímeros escova mimetizam muitos dos aspectos da membrana celular como porosidade seletiva e característica hidrofílica ou hidrofóbica dependente do meio. Eles possuem muitas aplicações na biomedicina já desenvolvidas. Entretanto, ainda não foi explorada a pesquisa de membranas com a topologia do tipo escova para aplicação em biossensores. O diagnóstico das doenças negligenciadas, em especial o diagnóstico da dengue, não utiliza atualmente a tecnologia dos biossensores. Devido a sua portabilidade, especificidade e rápido tempo de resposta os biossensores são uma alternativa viável para o diagnóstico da dengue. Com o intuito de contribuir para o diagnóstico dessa enfermidade esta dissertação de mestrado tem como objetivo desenvolver membranas poliméricas com a topologia escova para detecção de imunoglobulinas IgG. Aliando as características relevantes dos polímeros escova e a técnica de enxertia por radiação ionizante de raios gama foram sintetizadas membranas para atuarem como transdutor em biossensores na detecção de IgG. Como substrato para a síntese foi utilizado o polietileno (PE) e como monômero de enxerto o metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA), diluído em etanol. A dose de irradiação adequada foi de 40 kGy (Gray) a uma taxa de 6 kGy/h. Após a síntese, as membranas de PE-e-HEMA foram caracterizadas por medida de ângulo de contato, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância difusa (ATR-FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microanálise de energia dispersiva por raios X (EDX), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e medidas elétricas em corrente contínua (CC). Posteriormente foram adsorvidos fisicamente nas membranas de PE-e-HEMA Azul da Prússia e anti-imunoglobulinas IgG. Então a membrana de PE-e-HEMA biossensora foi caracterizada eletricamente na presença de concentrações de imunoglobulinas IgG humanas. A membrana biossensora apresentou uma resposta amperométrica quando imedecida em solução salina tampão (PBS - pH 7,4) contendo diferentes concentrações de IgG humana. O limite de detecção foi superior àquele encontrado em indivíduos saudáveis que é de 12 mg/mL. As membranas de PE-e-HEMA sintetizadas neste estudo são promissoras para aplicação em biossensores para o diagnóstico de doenças como a dengue.

Palavras-chave: Polímeros escova, biossensores, IgG, diagnóstico, dengue, Azul da Prússia.

ABSTRACT

The polymer brushes are highly organized macromolecular architectures. Its popularity grew in the last decade due to the flexibility of synthesis to generate surfaces of stimulus and response specialist. The polymer brushes mimic many aspects of cell membrane porosity as selective hydrophobic and hydrophilic characteristic and medium-dependent. They have many applications in biomedicine have developed. However, it has not been exploited to study the topology of membrane brush for application in biosensors. Currently on neglected diseases, especially dengue is not used biosensors for diagnosis. Biosensors are a viable alternative for the diagnosis of dengue due to its portability, specificity and fast response time. In order to contribute to the diagnosis of dengue this dissertation aims to develop polymeric membranes with the topology brush for detection of IgG immunoglobulin. Combining the relevant characteristics of the polymers brush and grafting technique by ionizing gamma membranes were synthesized to act as a transducer in biosensors for the detection of IgG. As substrate for the synthesis was used polyethylene (PE) and as the graft monomer of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) diluted in ethanol. A suitable irradiation dose was 40 kGy (10^3 Gray) at a rate of 6 kGy / h. After synthesis, the membranes of PE-g-HEMA were characterized by measuring contact angle, infrared spectroscopy by Fourier transform diffuse reflectance (ATR-FTIR), scanning electron microscopy (SEM), scanning energy dispersive microanalysis by X-rays (EDX), differential scanning calorimetry (DSC) and electrical measurements in direct current (DC). Were physically adsorbed on the membranes of PE-g-HEMA Prussian Blue and anti-IgG. Then the membrane PE-g-HEMA biosensor was electrically characterized in the presence of concentrations of human IgG. The membrane biosensor showed amperometric response when wetted in saline buffer (PBS-pH 7.4) containing different concentrations of human IgG. The detection limit was greater than that found in healthy subjects is 12 mg/mL. The membranes of PE-g-HEMA synthesized in this study are promising for application in biosensors for the diagnosis of diseases such as dengue.

Keywords: Polymer brushes, biosensors, IgG, diagnosis, dengue, Prussian Blue

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

2.1. Representação de um polímero com arquitetura molecular do tipo escova (<i>Polymer Brushes – PBs</i>)	5
2.2. Tipos de PBs: (a) homopolímero, (b) homopolímero misto, (c) copolímeros aleatórios e (d) copolímeros em bloco	7
2.3. Tipos de formação de PBs: (a) Adsorção física, (b) Adsorção química indireta (<i>Grafting to</i>), (c) Adsorção química direta (<i>Grafting from</i>)	8
2.4. Distância entre cadeias na formação de PBs	9
2.5. Conformações dos regimes dos polímeros de enxerto (Σ)	11
2.6. Mapa das áreas de risco de transmissão do vírus de dengue	20
2.7. Representação do vírus de dengue	20
2.8. Ciclo de infecção pelo vírus de dengue	22
2.9. Comparação entre os métodos de diagnóstico para a dengue	24
2.10. Efeitos da energia do fóton e número atômico (Z) nos processos que envolvem a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria	29
2.11. Processo de atenuação de um feixe de fótons em um absorvedor de espessura x ...	30
2.12. Efeito da concentração do monômero HEMA na enxertia sobre PE	33
2.13. Efeito da taxa de dose de irradiação na enxertia do HEMA sobre PE	34
2.14. Efeito da dose de irradiação na enxertia do HEMA sobre PE	35

CAPÍTULO 4

4.1. Interface entre um sólido, um líquido e um gás e o triângulo de Neumann	42
4.2. Gráfico para o polietileno apresentado no artigo original de Zisman	44
4.3. Sistema de medição do ângulo de contato “ <i>home made</i> ”	45
4.4. Medidas do ângulo de contato: gota de água sobre um filme de PE	46
4.5. Acessório ATR: interface entre o cristal, a amostra e feixes de radiação refletidos .	48
4.6. Esquema de um cristal <i>DiCompTM</i> , composto por um elemento de seleneto de zinco (ZnSe) em contato direto com o diamante	49
4.7. Processo de excitação de elétrons e emissão de Raios X	51

4.8.	Esquema de detecção pela técnica SEDX	51
4.9.	Rota de síntese do sistema (PE-e-HEMA – $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$ anti-IgG)	54
4.10.	Configuração prevista para as lâminas de teste utilizando membranas de PE-e-HEMA	55
4.11.	Esquema de conexão das membranas com o multímetro-fonte utilizado nas medidas elétricas	55
4.12.	Caixa metálica usada para isolamento eletromagnético das membranas durante as medidas de caracterização elétrica	56

CAPÍTULO 5

5.1.	Gráfico de Zisman para o PE	57
5.2.	Gráficos de Zisman para os copolímeros PE-e-HEMA	58
5.3.	Variação no ângulo de contato e energia livre de superfície em função do percentual de enxertia do monômero HEMA nas superfícies de PE	59
5.4.	Espectros de FTIR obtidos do monômero HEMA, dos filmes de PE e das membranas de copolímero PE-e-HEMA 20	60
5.5.	Micrografias da superfície dos filmes de PE (a) e das membranas de copolímero PE-e-PHEMA 20	61
5.6.	Micrografias da superfície dos filmes de PE (a) e das membranas de copolímero PE-e-PHEMA 40	62
5.7.	Micrografias do perfil dos filmes de PE (a) e das membranas de copolímero PE-e-PHEMA 20	62
5.8.	Micrografias do perfil dos filmes de PE (a) e das membranas de copolímero PE-e-PHEMA 40	63
5.9.	Micrografias do perfil copolímeros: (a) PE-e-PHEMA20 e (b) PE-e-PHEMA40 ..	63
5.10.	Espectros SEDX das membranas de copolímero PE-e-HEMA 20 (a) e PE (b)	64
5.11.	Espectros SEDX das membranas de copolímero PE-e-PHEMA 40 (a) e PE (b)	64
5.12.	Termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filme de PE	65
5.13.	Termograma de DSC da membrana de PE-e-HEMA 40	66
5.14.	Termograma de DSC da membrana de PE-e-HEMA 20	66
5.15.	Curva IxV da membrana de copolímero PE-e-HEMA medida no regime seco	67
5.16.	Modelo da estrutura atômica do Azul da Prússia	68

5.17.	Comparativo das curvas IxV aplicada em uma membrana de copolímero PE-e-HEMA 20 e 40 antes (○) e após (♦) a adsorção de íons de ferro	69
5.18.	Resposta de corrente em função da tensão aplicada no sistema PE-e-HEMA40 – $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$ anti-IgG para concentrações de IgG de 2, 7, 16 e 32 mg/mL ..	70
5.19.	Resposta de corrente para potencial constante no sistema (PE-e-HEMA20 – $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$ anti-IgG) para concentrações de IgG de 2, 7, 16 e 32 mg/mL ..	71
5.20.	Resposta de corrente em função da tensão aplicada no sistema (PE-e-HEMA40 – $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$ anti-IgG) para concentrações de IgG de 2, 7, 16 e 32 mg/mL ..	72
5.21.	Resposta de corrente para potencial constante no sistema (PE-e-HEMA40 – $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$ anti-IgG) para concentrações de IgG de 2, 7, 16 e 32 mg/mL ..	72
5.22.	Resposta de corrente em função das concentrações de IgG nos sistemas PE-e-HEMA 20 e 40 no potencial constante de 3V	73
5.23.	Densidade de corrente em função das concentrações de IgG nos sistemas PE-e-HEMA 20 e 40 no potencial constante de 3V	75
5.24.	Modelos matemáticos da curva de densidade de corrente pelas concentrações de IgG nos sistemas (PE-e-HEMA – $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$ anti-IgG)	76

ÍNDICE DE TABELAS

5.1	Ângulo de contato para solventes sobre a superfície do filmes de PE original	57
5.2	Ângulo de contato para a água sobre a superfície do filmes de PE e membranas PE-e-HEMA	58
5.3	Bandas de absorção vibracionais no monômero HEMA e na membrana de PE-e-HEMA	60
5.4	Composição química dos filmes de PE e PE-e-HEMA obtida por análise de energia dispersiva (SEDX) no microscópio eletrônico de varredura	65
5.5	Parâmetros térmicos do PE original, PE-e-HEMA 20 e 40	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM – *Atomic force microscopy*

ATR – *Attenuated total reflectance*

ATR - FTIR – *Fourier transform infrared spectroscopy attenuated total reflectance*

DENV – vírus de dengue

DSC – *Differential scanning calorimetry*

ECG – eletrocardiograma

EtOH – etanol

FET – transistor de efeito de campo

FHD – febre hemorrágica de dengue

FMMA – metacrilato de ferrocenilmetila

FTIR - *Fourier transform infrared spectroscopy*

HEMA – metacrilato de 2-hidroxietila

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

ITO – *indium tin-doped oxide* (óxido de índio dopado com estanho)

GMA – metacrilato de glicidila

GOx – enzima glicose oxidase

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NEXAFS – *Near-edge X-ray absorption fine structure*

NS1 – antígenos virais

NTA – nitrilotriacetato

NTDs – *Neglected tropical diseases*

NTs – nanopartículas

P2VP – poli(2-vinilpiridina)

P4VP – poli(4-vinil piridina)

PANI – polianilina

PBs – *Polymer brushes*

PBS – solução salina tampionada em pH 7,4

PE – polietileno de baixa densidade (usado como sinônimo de PEBD neste texto)

PE-e-HEMA – copolímero de enxerto de polietileno e metacrilato de 2-hidroxietila

PEMEIm-Cl – [cloridrato de poli(1-etil-3-(2-metacrilato de etila) imidazolina)]

PET – poli(tereftalato de etileno)

PHEMA – poli(metacrilato de 2-hidroxietila)

PINIPAAm – poli-N-isopropilacrilamida

pNIPAN – Poli(N-isopropilacrilamida)

PP – polipropileno

QDs – *quantum dots* (pontos quânticos)

RT-PCR – *Polymerase chain reverse*

SEDX – *Scanning energy dispersive X-ray analysis*

SI-ATRP – *Surface initiated atom – transfer radical polymerization*

SIMS – *Secondary ion mass spectrometry*

SRP – Espectroscopia de ressonância de plasmon

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

VFe – vinilferroceno

XPS – *X-ray photoelectron spectroscopy*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Polímeros com topologia escova	5
2.1.1. Arquiteturas de polímeros escova e métodos de síntese	6
2.1.2. Estrutura e parâmetros teóricos dos polímeros escova	9
2.1.3. Caracterização de polímeros escova	12
2.1.4. Aplicações de polímeros escova	13
2.1.4.1. Controle de adesão de células em biomateriais implantáveis	13
2.1.4.2. Elementos de nanofluidos biomiméticos	14
2.1.4.3. Sistemas bioeletrônicos híbridos PBs-enzimas	15
2.1.4.4. Interfaces entre nanopartículas e polímeros escova	16
2.1.4.5. Filmes finos de PBs em dispositivos sensores	17
2.2. Dengue: uma das 17 Doenças negligenciadas	18
2.2.1. Características de manifestação da dengue	19
2.2.2. Dispositivos biossensores para diagnóstico de dengue	26
2.3. Síntese de copolímeros escova utilizando raios gama	27
3. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Materiais	37
4.2. Síntese de copolímeros com topologia do tipo escova utilizando raios gama ...	38
4.3. Ângulo de contato e energia de superfície	39

4.3.1. Conceitos sobre o ângulo de contato	39
4.3.2. Tensão crítica de superfície por medidas de ângulo de contato	43
4.3.3. Procedimento experimental para medida de ângulo de contato.....	44
4.4. Caracterização da superfície por FTIR	47
4.4.1. Procedimento de medida dos espectros de FTIR	47
4.4.2. Espectroscopia de refletância total atenuada (ATR)	47
4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
4.5.1. Microanálise de energia dispersiva por raios X (SEDX)	50
4.6. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	52
4.7. Rota de síntese da membrana de PE-e-HEMA e imobilização de anti-IgG	53
4.8. Medidas elétricas em corrente contínua	55
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Medidas de ângulo de contato	57
5.2. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	59
5.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
5.3.1. Análise de energia dispersiva por raios X (SEDX)	64
5.4. Análise térmica por DSC	65
5.5. Caracterização elétrica	67
 6. CONCLUSÃO	77
6.1. Considerações finais	77
6.2. Perspectivas	78
 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	79

CAPÍTULO 1 — INTRODUÇÃO

Esta breve introdução procura esclarecer, em linhas gerais, sobre o tema desenvolvido nesta dissertação. As características dos Polímeros Escova (*Polymer Brushes* – PBs) inicialmente levantados nesta seção serão melhor definidas nos capítulos que constituem o corpo do texto. Serão expostas também informações iniciais sobre o quadro atual de manifestação da dengue, a motivação que levou à síntese de membranas transdutoras de PBs e a metodologia utilizada neste estudo.

Durante a última década os PBs emergiram como uma nova classe de materiais avançados. A sua versatilidade funcional e formação das cadeias permitem a criação de estruturas moleculares com potencial para aplicação em diversas áreas da ciência de materiais (1).

A crescente popularidade dos PBs deve-se a sua versatilidade para criar filmes de composição química, espessura e densidade de enxertia também em pequena escala (até 100nm) (2). Por outro lado a combinação de PBs com a técnica de litografia permite a criação de superfícies complexas a partir de modelos planejados (3,4).

Os PBs são estruturas poliméricas macromoleculares formadas por cadeias que se ligam a um substrato (5). Os PBs se diferenciam dos polímeros de enxerto tradicionais pela atuação de forças intermoleculares que causam o alongamento das cadeias na direção normal ao substrato onde estão ligadas (6).

Os filmes de PBs mimetizam muitos aspectos da membrana celular. Pode-se citar a formação de poros que são seletivos ao pH (7) e a mudança de topologia de superfícies em decorrência da interação com diferentes solventes (8–13). As superfícies dinâmicas dos PBs quando em contato com fluidos biológicos tanto podem impedir a adesão celular em dispositivos implantáveis (14–17) quanto favorecer a ligação de biomoléculas de interesse em mecanismos de sensoriamento (18–20).

As características únicas dos PBs oferecem uma miríade de possibilidades funcionais. A sua reorganização molecular em diferentes meios possibilita a fabricação de superfícies de estímulo-resposta altamente eficientes. Essa característica adaptável ao meio externo faz dos PBs materiais de grande interesse para a interface com o meio biológico (21).

No centro do desenvolvimento dos polímeros escova estão as pesquisas desenvolvidas desde a década de 1950 (22,23). A abordagem teórica da formação das cadeias poliméricas nos PBs foi introduzida por Gennes (24). Atualmente, o conhecimento adquirido nos estudos

anteriores permite o desenvolvimento as aplicações dos PBs como, por exemplo, em biomateriais (25).

Assim, os PBs têm potencial para o desenvolvimento de dispositivos capazes de interagir com fluídos fisiológicos, como os biossensores. Dispositivos bioeletroquímicos baseados em PBs demonstram o potencial de integração entre o meio biológico, química de polímeros e microeletrônica (26,27).

Os PBs se localizam em uma área multidisciplinar do conhecimento que integra a química, a física e mesmo a biologia através da ciência de polímeros. A possibilidade do controle eficiente da sua síntese em pequena escala (10 a 100 nm) garante o acesso a novas rotas para a criação de superfícies especializadas no reconhecimento de biomoléculas (28–30).

A motivação desta dissertação de mestrado foi o reconhecimento da deficiência no uso da tecnologia dos biossensores no diagnóstico das doenças negligenciadas (*Neglected tropical diseases – NTDs*), em especial a dengue. Então, considerando as inúmeras qualidades dos PBs com potenciais aplicações em biossensores esta dissertação iniciou o desenvolvimento de membranas transdutoras com a topologia escova visando o diagnóstico de doenças.

A dengue é uma doença viral infecciosa amplamente disseminada no mundo. Ela está incluída no grupo das 17 enfermidades negligenciadas segundo a WHO (*World Health Organization - Organização Mundial da Saúde*) (31). A dengue é considerada atualmente como a mais importante doença viral transmitida por mosquitos. A incidência é de mais de 50 milhões de infecções anuais que ocorrem em 100 países onde é endêmica (32). Além disso, mais de 2,5 bilhões de pessoas que vivem nas áreas de risco podem contrair o vírus da doença. Sendo ainda que a ocorrência mundial de casos cresceu 30 vezes nos últimos 50 anos (32).

Existem quatro sorotipos do vírus que estão distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em contraste com as outras enfermidades negligenciadas a dengue é predominante nas cidades. E uma vez que as estatísticas mundiais apontam para o aumento da população urbana (33), a dengue ainda continuará sendo uma enfermidade preocupante nas próximas décadas.

Atualmente não existe um método único para o diagnóstico de dengue. Os métodos mais confiáveis fornecem resultados definitivos, porém o resultado é demorado e muitas vezes de custo inacessível à população das regiões de incidência. Por outro lado, os testes rápidos mais utilizados, não oferecem o diagnóstico conclusivo da doença (34).

O tratamento clínico da dengue quando ministrado no início dos sintomas evita a ocorrência dos casos severos que levam ao óbito. A Organização Mundial da Saúde salienta a urgência na criação de métodos mais eficientes para a detecção do vírus da dengue (32). De fato, o diagnóstico precoce é a chave para reduzir a zero os casos de morte pela doença.

O quadro atual da enfermidade é alarmante e, além disso, o sucesso na obtenção de vacinas tetravalentes ainda é incerto como noticiado recentemente (35,36). Então as esperanças de muitos indivíduos acometidos por essa enfermidade estão depositadas no surgimento de novos métodos para o diagnóstico da doença.

Os biossensores são uma alternativa promissora para atender as necessidades atuais do diagnóstico da dengue. Em especial, os biossensores eletroquímicos são os mais versáteis para o diagnóstico de doenças virais (37). Eles possuem rápido tempo de resposta e funcionamento simples. Um elemento essencial do biosensor é a membrana transdutora responsável pela interface entre as moléculas biológicas e os sistemas eletrônicos de processamento.

Esta dissertação de mestrado tem como objetivo desenvolver membranas transdutoras para aplicação em biossensores eletroquímicos aplicados ao diagnóstico da dengue. A pesquisa desses biossensores foi focada na síntese de membranas de copolímeros com a topologia escova (PBs) para aplicação em biossensores para detecção de imunoglobulina IgG.

Os PBs, ainda pouco explorados nas aplicações de biossensores, são estruturas macromoleculares promissoras para imobilização e reconhecimento de biomoléculas (25). Contudo, atualmente, os métodos de síntese de PBs utilizam reações químicas. Então, com o intuito de explorar uma rota alternativa de síntese para os PBs foi utilizado neste estudo o método de síntese por radiação ionizante por raios gama de uma fonte de cobalto 60 (^{60}Co).

O método de polimerização por radiação ionizante (*grafting radiation*), muito utilizado em copolímeros de enxerto, apresenta vantagens sobre a metodologia convencional de síntese de polímeros devido à formação de radicais livres e a operação em temperatura ambiente. A síntese por radiação ionizante tem alta eficiência de polimerização sem necessitar de adição e posterior remoção de catalisadores (38).

Os filmes de polietileno de baixa densidade (PE) foram usados como substrato da enxertia. O monômero enxertado foi o metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) e o solvente utilizado nas soluções foi o etanol (EtOH). Na rota de síntese enxerta-se o monômero HEMA sobre os filmes de PE por irradiação simultânea.

Os componentes da síntese são acondicionados em ampolas de vidro e expostos à irradiação, com dose de 40 kGy (1 Gray \approx 1 Joule/kg) a uma taxa de 6 kGy/hora (39).

Esta dissertação focaliza no desenvolvimento de uma membrana transdutora com a topologia escova para aplicação em biossensores. Para atingir o objetivo foram utilizados os melhores resultados da metodologia e dos parâmetros de irradiação empregados na síntese das membranas de copolímero PE-e-HEMA, estudados anteriormente pelo grupo de Polímeros Bioativos e Biomiméticos.

Grande parte do estudo foi dedicada a uma revisão minuciosa da literatura. Esta revisão inclui a maioria das publicações sobre os PBs que possuam ligação com sistemas de sensoriamento ou interação com o meio biológico. Muitos aspectos teóricos sobre o tema, não abordados neste texto, poderão ser encontrados nas referências da dissertação.

A redação e apresentação gráfica desta dissertação de mestrado seguem as Normas para Apresentação de Dissertações e Teses estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG) da UNIFEI, na versão de julho de 2012.

A dissertação está dividida em seis capítulos. A temática do estudo é introduzida no **Capítulo 1**, salientando o potencial de utilização dos polímeros escova (PBs) em membranas transdutoras para o diagnóstico de doenças como a dengue. O **Capítulo 2** faz uma revisão da literatura sobre os PBs, descreve os aspectos da manifestação da dengue e apresenta o método de síntese por radiação ionizante. No **Capítulo 3** são expostos os objetivos gerais e específicos da dissertação. O **Capítulo 4** é dedicado a descrever a metodologia empregada na síntese e caracterização das membranas de polímeros escova por radiação de raios gama. O **Capítulo 5** apresenta os resultados obtidos na caracterização das estruturas de PBs, medidas elétricas e ensaios com imunoglobulina IgG. Finalmente no **Capítulo 6** são discutidas as principais conclusões decorrentes da pesquisa e desenvolvimento das membranas de enxerto de PE-e-HEMA com topologia escova. Além do que, são apresentadas as perspectivas para o desenvolvimento das membranas sensíveis de PE-e-HEMA conjugada com dispositivos biossensores.

CAPÍTULO 2 — REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLÍMEROS COM TOPOLOGIA ESCOVA

Os polímeros com topologia tipo escova (*Polymer Brushes – PBs*) são caracterizados por um conjunto de cadeias poliméricas ligadas a uma superfície ou interface (5). Devido às forças de interação intermoleculares o agrupamento das cadeias tende a se esticar na direção normal à superfície onde estão fixadas. Além disso, estiramento ocorre nas condições de equilíbrio térmico e químico do polímero.

O estiramento e organização das cadeias na direção normal onde estão enxertadas diferenciam os PBs dos polímeros tradicionais que possuem uma conformação aleatória das cadeias (6). A formação das cadeias alongadas nos PBs afeta muitos aspectos do comportamento do polímero e resulta na formação de novas propriedades para essas estruturas. Uma delas é a mudança da morfologia da superfície com o solvente presente no meio de contato. A Figura 2.1 ilustra uma conformação típica do PBs em diferentes tipos de solventes.

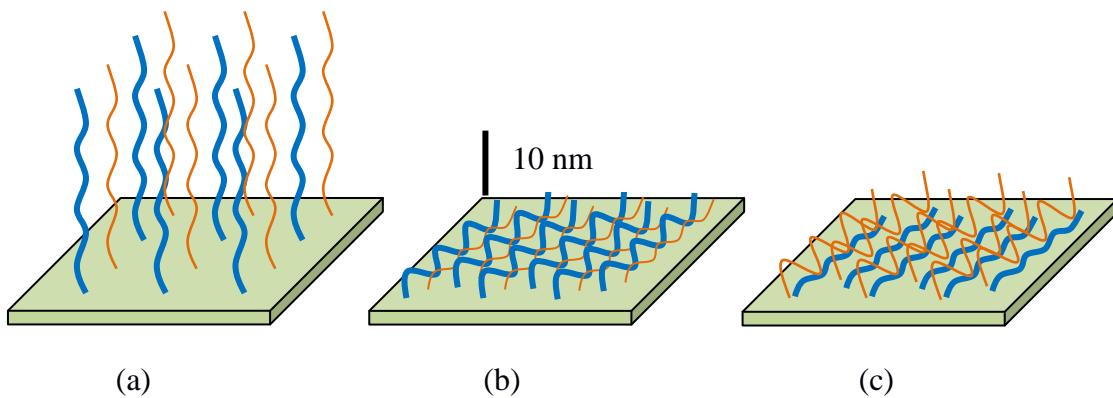


Figura 2.1: Representação de um polímero com arquitetura molecular tipo escova (Polymer Brushes — PBs). Em (a) é representada a arquitetura tipo escova em seu solvente ideal. Dependendo da constante dielétrica do meio o material apresenta morfologia com estrutura externa hidrofóbica (b) ou hidrofílica (c). A cor azul (linhas grossas) indica as regiões de alta densidade eletrônica e a vermelha (linhas finas) as regiões de baixa densidade.

Dentre os exemplos de novas propriedades exibidas pelos PBs estão a localização interfacial de grupos terminais (40), o controle de floculação (41), de segregação de fase e resposta a estímulos externos (42), manipulação da molhabilidade (8–13) e controle de adesão de moléculas, proteínas e células nas superfícies dos materiais (43,44).

Atualmente, as aplicações de PBs têm atraído áreas como química, física, ciência das superfícies, ciência de materiais, nanotecnologia, engenharia biomédica e biologia (25). As pesquisas em polímeros escova têm sido muito ativas nos últimos 20 anos (45,46). Esses polímeros têm exibido excelente robustez mecânica e estabilidade química. Ao se olhar o desenvolvimento dos PBs no início do século XXI, fica claro que eles também integram a classe de materiais em nanoscala (1).

Os polímeros escova atraíram atenção pela primeira vez na década de 1950, quando foi descoberto que moléculas poliméricas enxertadas eram efetivas para prevenir floculação em partículas coloidais (22,23,47,48). Os primeiros tratamentos quantitativos para os PBs foram reportados por Gennes (24). Todos esses estudos introduziram a abordagem teórica dos PBs.

Na década de 1990 alguns grupos de pesquisa (49) apresentaram estudos de PBs que ajudaram a reconhecer a diferença entre essas estruturas e as estruturas dos polímeros tradicionais. A partir de então os PBs começaram a ser usados em aplicações como materiais adesivos (50), superfícies que alteram a hidrofilicidade com a temperatura (51), lubrificantes (52) e polímeros surfactantes (49).

Uma das vantagens dos PBs é que as superfícies podem ser sintetizadas conforme a aplicação. Por exemplo, diferentes concentrações de monômero podem ser enxertadas, produzindo superfícies com variação de porosidade e espaçamento de cadeias (25).

Entretanto, pergunta-se qual a sua relevância nas aplicações tecnológicas. Eles serão mesmo necessários em contraste com os materiais existentes? Uma maneira de responder essa questão é verificar se a modificação da superfície por PBs trazem um ganho para o desempenho sobre outros materiais existentes como filmes finos e superfícies auto organizadas em escala nanométrica (25).

2.1.1. Arquiteturas de polímeros escova e métodos de síntese

A interface de ligação das cadeias poliméricas em um PB pode ocorrer entre dois polímeros sólidos, entre dois líquidos, entre um líquido e o ar, ou ainda entre soluções fundidas de homopolímeros (5). Entretanto, este texto de dissertação irá focalizar no estudo de polímeros escova em substrato de superfícies sólidas.

Em termos da composição química os PBs ligados em substrato sólido podem ser divididos em homopolímeros, homopolímeros mistos, copolímeros aleatórios e copolímeros em bloco. Esses tipos de PBs estão ilustrados na Figura 2.2.

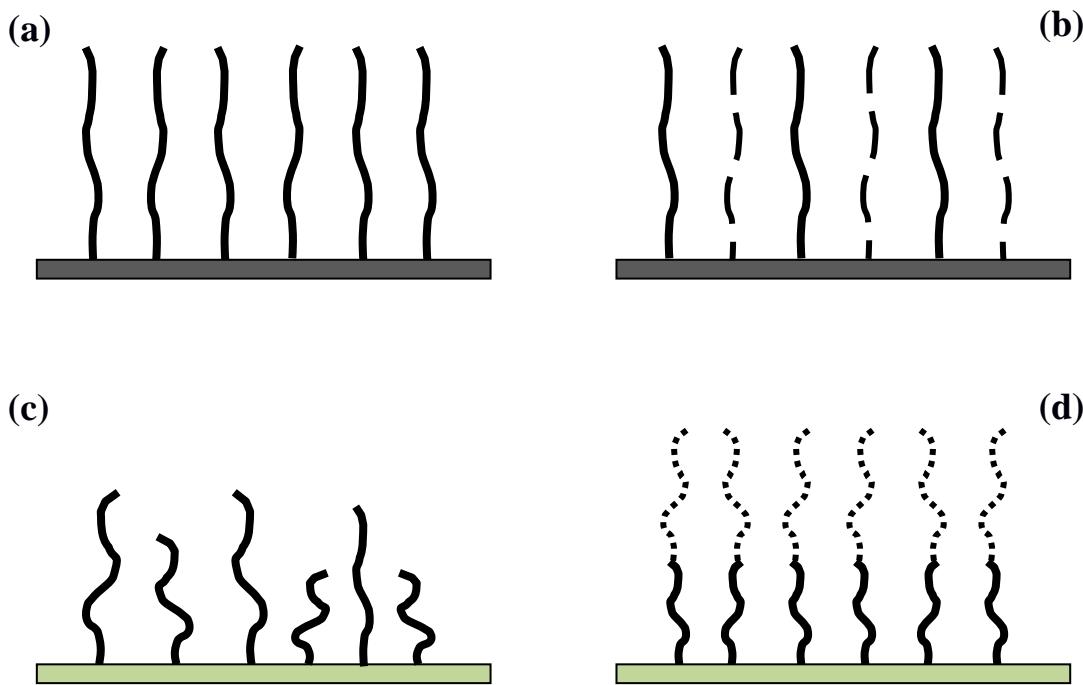


Figura 2.2: Tipos de PBs: (a) homopolímero , (b) homopolímero misto , (c) copolímeros aleatórios e (d) copolímeros em bloco. Adaptado da fonte: (5).

Os polímeros escova podem ser preparados em substrato sólido por adsorção física ou por adsorção química, também chamada ligação covalente de cadeias (5).

Os primeiros estudos com PBs focalizaram em sistemas formados por adsorção física, isto é, a seletiva adsorção de um bloco ou de duplo bloco polimérico em uma superfície (53–55). A superfície e o solvente eram escolhidos de forma a maximizar a adsorção do enxerto, pela ação de interação entre o bloco, o solvente e a superfície. Embora o método seja simples na formação de polímeros de enxerto, a adsorção física é instável e a ligação pode ser desfeita pela ação de solventes ou variação de temperatura.

A ligação covalente (adsorção química) das cadeias poliméricas no substrato passou a atrair a atenção devido a sua estabilidade. A preparação de PBs por ligação covalente pode ser obtida por duas técnicas de enxertia: a enxertia indireta (*Grafting To*) (56) e enxertia direta no substrato (*Grafting From*) (5). As ligações covalentes entre o substrato e as cadeias poliméricas proporcionam PBs resistentes às condições químicas comuns do meio ambiente.

A enxertia indireta (*Grafting To*) requer a amarração de cadeias poliméricas pré-formadas na superfície de um substrato. A imobilização do iniciador no substrato pode ser obtida pelo seu tratamento com plasma ou radiação luminosa. A técnica indireta emprega polímeros pré-formados com grupos terminais reativos, capazes de ligar a cadeia polimérica

ao substrato. Os grupos funcionais reativos incluem tiois, silanos, amino e carboxílico (1). A Figura 2.3 ilustra os dois tipos de formação de PBs por ligação covalente das cadeias.

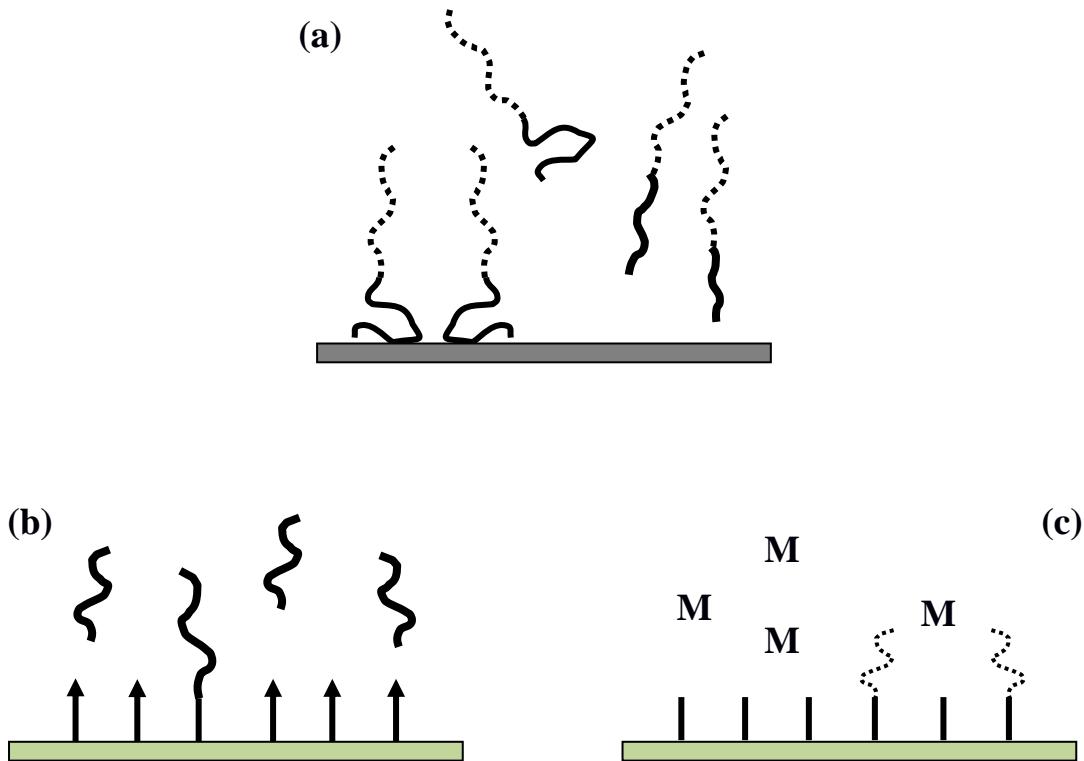


Figura 2.3: Tipos de formação de PBs: (a) Adsorção física, (b) Adsorção química indireta (*Grafting to*), (c) Adsorção química direta (*Grafting from*). Adaptado da fonte: (5).

Na segunda técnica, a enxertia é local (*Grafting From*) e utiliza iniciadores no substrato e a subsequente polimerização *in situ* de um monômero para gerar o PB. Ela permite a obtenção de membranas poliméricas com alta densidade de enxertia. Na abordagem direta as cadeias são simplesmente sintetizadas no substrato previamente modificado por iniciadores. A polimerização ocorre diretamente no substrato. Este método versátil permite o controle da formação e pode ser viabilizado por técnicas de polimerização como radiação ionizante ou iniciadores químicos (1).

Outro aspecto positivo das abordagens de enxertia é que os filmes de PBs gerados são compatíveis com uma larga variedade de substratos e nanomateriais (1). Esses substratos compreendem uma grande variedade de polímeros orgânicos como a celulose (57), poli(estireno) (58), poli(cloreto de vinila) (59), poli(metacrilato) (60). Também substratos inorgânicos podem ser usados, destacando o Al_2O_3 (61), Fe_3O_4 (62), ZnO (63), CdSe (64),

GaAs (65), mica (66), diamante (67), nanotubos de carbono (68,69) entre outros (1). As ligações covalentes entre o substrato e as cadeias poliméricas proporcionam PBs resistentes às condições químicas comuns do meio ambiente.

2.1.2. Estrutura e parâmetros teóricos dos polímeros escova

A estrutura de uma superfície polimérica pode ser avaliada pela distância média (D) entre as cadeias enxertadas. A distância (D) é medida entre as faces externas de duas cadeias vizinhas. Para pequenas distâncias entre as cadeias as forças de interação atuam de modo a forçar as cadeias a uma posição normal à superfície, como ilustrado na Figura 2.4.

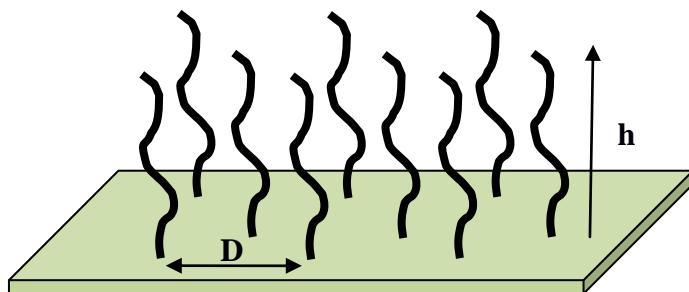


Figura 2.4: Distância média entre cadeias (D) na formação de PBs. Altura da cadeia (h). O pequeno distanciamento favorece a organização intercadeias na direção normal à superfície enxertada.

Caso contrário, se o parâmetro D é maior do que a distância de alcance das forças intermoleculares as cadeias irão sobrepor-se formando um emaranhado aleatório. Desta forma, o que diferencia a formação do PBs dos polímeros comuns é a proximidade suficiente para que as cadeias permaneçam estiradas na direção normal à superfície (6).

Comumente é usado na literatura (6) o parâmetro de densidade de ligação (Σ) para a caracterização quantitativa da transição entre os regimes dos polímeros comuns e dos PBs. A densidade de ligação (Σ) representa o número de cadeias que ocupam uma área nas condições de equilíbrio do polímero, ou seja, solvente ideal e temperatura ambiente. Este parâmetro é adimensional. A Equação (2.1) expressa a relação para a densidade das cadeias (Σ) (6).

$$\Sigma = \sigma \pi R_g^2 \quad (2.1)$$

Sendo σ a densidade de enxertia, R_g o raio de giração da cadeia, na condição de equilíbrio do polímero: solvente ideal e temperatura ambiente. O raio de giração corresponde à distância na qual deve ser concentrada toda a massa da cadeia que resulte no mesmo momento de inércia de todo o corpo da cadeia. Considerando a cadeia do polímero equivalente a um cilindro, o raio de giração em torno do seu eixo principal pode ser estimado como expresso na Equação (2.2).

$$R_g^2 = \frac{I}{M} = \frac{r^2 M}{2M} = \frac{r^2}{2} \quad (2.2)$$

Sendo I o momento de inércia do cilindro em torno do seu eixo, M a massa do cilindro e r o seu raio. A densidade de enxertia, em unidades de cadeias por m^2 , é determinada pela Equação (2.3).

$$\sigma = \frac{h \rho Na}{Mn} \quad (2.3)$$

Sendo h a altura da cadeia, ρ a densidade da cadeia polimérica, Na o número de Avogadro e Mn a massa molecular do polímero. Entretanto a densidade de enxertia pode ser determinada, na maior parte dos casos (6), pela Equação (2.4).

$$\sigma = \frac{1}{D^2} \quad (2.4)$$

O que resulta na expressão para o cálculo da densidade de ligação dada por (2.5).

$$\Sigma = \frac{\pi r^2}{2D^2} \quad (2.5)$$

Então o parâmetro Σ pode ser usado para avaliar as características de copolímero de enxerto quanto à sua topologia. Entretanto, para o cálculo exato, a expressão (2.4) exige as dimensões relativas às cadeias enxertadas, como a distância média (D) e seu raio (r).

A definição teórica estabelece três regimes de formação das cadeias: $\Sigma < 1$ regime de fraca interação, $\Sigma = 1$ intermediário e $\Sigma > 1$ regime de alto alongamento. Entretanto, nos sistemas reais a transição entre um simples polímero de enxerto e um polímero escova é menos nítida devido às características estatísticas e a dispersão das ligações das cadeias (70). A Figura 2.5 ilustra a conformação dos regimes dos polímeros de enxerto.

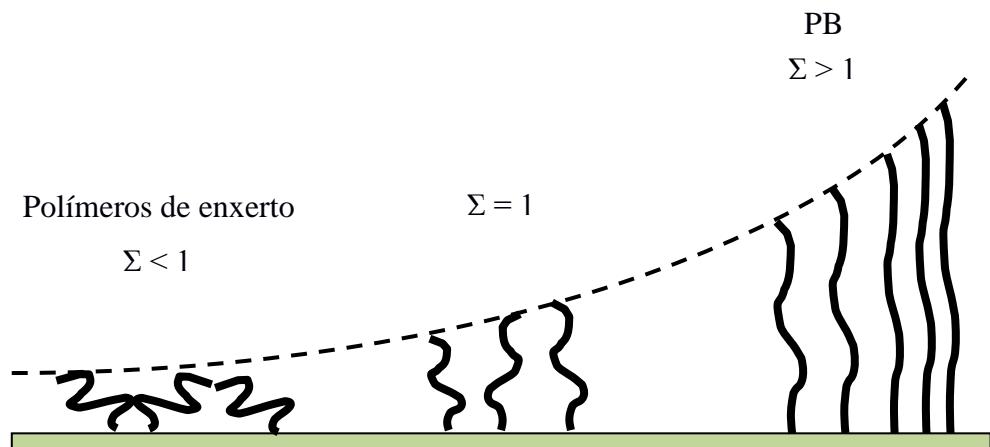


Figura 2.5: Conformações dos regimes dos polímeros de enxerto. Para $\Sigma < 1$ a superfície enxertada se distribui emaranhada e aleatória, caracterizando um polímero de enxerto tradicional. $\Sigma = 1$ é uma região de transição e para $\Sigma > 1$ um PB.

Por outro lado, em PBs reais o regime das cadeias corresponde a valores típicos de $\Sigma > 5$. Contudo, este valor varia de sistema para sistema. Por exemplo, Kent (54) relatou $\Sigma > 12$ em camadas de poli(dimetilsicosano)-b-PS na técnica Langmuir-Blodgett para o regime de maior alongamento. Outro estudo de Cheng e colaboradores (6) em poliestireno escova enxertado com poli(L-ácido lático) revelou o início do regime escova para $\Sigma = 3,7$ e a formação de alto alongamento para $\Sigma = 14$.

Genzer e colaboradores realizaram um estudo experimental rigoroso (71) da relação entre a densidade de enxertia e os regimes de conformação das cadeias. A dependência da espessura do filme e a densidade do iniciador foi estudado em polímeros de poliacrilamida covalentemente ligados. O limite de mudança do regime de fraca interação e o de polímeros escova foi de $\Sigma = 6$, o que corresponde a $\sigma = 0,065 \text{ cadeias/nm}^2$ consistente com os estudos

teóricos (54). Long e colaboradores (72) reportaram a medida do raio de giração ($R_g = 2.3$ nm) em polímero precursor em poliestireno e estabeleceram com autoridade o regime das cadeias no PB em $\Sigma = 10$.

Um valor médio entre os limites dos regimes pode ser definido como sendo: $\Sigma < 1$ de Fraca interação, $1 < \Sigma < 5$ de transição e $\Sigma > 5$ polímero escova (6).

Embora seja encontrado na literatura o uso do termo polímero escova (*Polymer brush* - PBs) como sinônimo de polímeros de enxerto (*Grafted Polymer*), somente é possível determinar o regime escova pela definição teórica com o conhecimento da densidade de ligação (Σ). O cálculo de Σ é simples, entretanto, os valores numéricos dos parâmetros somente podem ser obtidos por técnicas avançadas de caracterização estrutural. Na prática pouquíssimos estudos presentes na literatura calculam o parâmetro de densidade de ligação, sendo a avaliação feita por outras características como auto-organização das cadeias, mudança de regime em diferentes solventes.

2.1.3. Caracterização de polímeros escova

As técnicas de caracterização mencionadas nesta seção foram levantadas com base em nas referências bibliográficas citadas nesta dissertação. As técnicas mais comuns para caracterização dos PBs são a análise do ângulo de contato, a microscopia de força atômica (*Atomic force microscopy* – AFM), a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a microanálise eletrônica por raios X (*Scanning energy dispersive X-ray analysis* - SEDX) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (*Fourier transform infrared spectroscopy attenuated total reflectance* - ATR FTIR).

A microscopia de força atômica (AFM) tem sido usada para visualizar a morfologia da superfície de filmes finos de polímeros escova, principalmente naqueles que apresentam dimensões em pequena escala (10 – 100nm). A AFM é uma técnica ideal para investigação dessas estruturas poliméricas macromoleculares. Em filmes finos de PBs de dimensões mesoscópicas o MEV é também usado para investigação da morfologia da superfície.

Outras técnicas mais sofisticadas de análise de superfície são utilizadas em alguns estudos, principalmente naqueles que determinam os parâmetros de ligação das cadeias (D e r). Entre elas pode-se citar: a espectroscopia foto-eletrônica de raios X (*X-ray photoelectron spectroscopy* – XPS), a absorção de raios X em baixo ângulo (Near-Edge X-ray Absorption Fine Structure – NEXAFS) e a espectrometria de massa de íons secundários (*Secondary Ion Mass Spectrometry* – SIMS).

As técnicas SEDX e XPS são utilizadas para determinar a composição química da superfície dos polímeros escova. A técnica NEXAFS fornece a análise quantitativa na dimensão da escala mesoscópica. A SIMS é uma técnica que detecta os íons secundários emitidos por uma amostra após serem bombardeados por partículas de alta energia. A técnica SIMS é capaz de identificar a funcionalização química do substrato e a cobertura pelo polímero escova.

2.1.4. Aplicações de polímeros escova

Os polímeros escova (PBs) têm sido estudados em um grande número de aplicações. Dentre elas podem ser enumeradas aplicações em sistemas coloidais (73,74), na manipulação de superfícies de estímulo e resposta (7,75–77), na combinação de materiais porosos de estímulo e resposta (78,79), na catálise e biocatálise em microrreatores (78–80), conjugando nanopartículas de PBs esféricas para transdução óptica e catálise (81,82), em eletrodos quimicamente modificados (83,84), como nanomembranas coloidais modificadas (85), em eletrólitos de polímero no estado sólido (86), como membranas condutoras de prótons (87), na integração com mecanismos de transdução (88,89), em filmes finos poliméricos com resposta mecano-crônicas (90,91).

Entretanto, nesta dissertação de mestrado a revisão das aplicações de PBs será focalizada nos estudos com maior afinidade com o desenvolvimento de biossensores.

2.1.4.1. Controle de adesão de células em biomateriais implantáveis

Os PBs ganharam espaço nas aplicações que promovem o aumento da vida útil dos biomateriais poliméricos implantáveis (14–17). A sua característica fundamental é a biocompatibilidade (92), ou seja, a qualidade de não reatividade quando em contato com o meio biológico.

Apesar do imenso benefício do uso de biomateriais poliméricos, uma significante porcentagem deles é colonizada por bactérias e se tornam foco de infecção nos organismos. A formação de biofilmes é a causa da colonização e a consequente infecção. A formação de um biofilme segue uma sequência de eventos que envolve a deposição, adesão e aderência de microrganismo na matriz do biomaterial polimérico (92).

A formação de biofilme causa grave problema funcional aos biomateriais. Sendo a única solução a sua substituição no organismo. Recentemente os PBs têm sido usados com

sucesso na confecção dos dispositivos implantáveis (93–98). A superfície desses biomateriais funcionalizada com PBs diminui a taxa de adesão de biomoléculas e prolonga a sua vida útil.

Por outro lado, devido à característica moldável das estruturas do tipo escova, os PBs podem ser usados para promover a adesão de proteínas (99) em aplicações que incluem o diagnóstico e a cultura de células.

2.1.4.2. Elementos de nanofluidos biomiméticos

Outro campo que tem atraído um grande número de cientistas para as aplicações dos PBs é a criação de dispositivos que mimetizam a funcionalidade dos sistemas biológicos. Dispositivos, inspirados nos sistemas biológicos, com nanoporos e nanocanais são de particular interesse por causa das suas potenciais aplicações em biologia sintética, manipulação molecular, eletrônica de nanofluidos e biosensores.

A purificação de proteína pela técnica nitrilotriacetato (NTA) tem sido adaptada para membranas de PBs com poli(HEMA) a fim de criar substratos com alta afinidade (100). As membranas cobertas com PBs têm atraído a atenção para aplicações como canais iônicos que mimetizam os canais biológicos (101).

O desenvolvimento de superfícies porosas com unidades macromoleculares ativas fornece a modulação de suas propriedades físico-químicas, permitindo o controle do transporte de íons através dos poros. Azzaroni colaboradores desenvolveram um elemento nanofluido poroso com resposta ao pH do meio (102,103). As características dos nanoporos emergem devido à sinergia das forças entrópicas de transporte causadas pela assimetria do canal e os efeitos eletrostáticos devido às cargas nas paredes dos poros. De maneira similar, com propriedade de retificação em resposta ao pH um dispositivo similar foi desenvolvido pelo mesmo grupo (104).

A aplicação de PBs como porta química foi estudada inicialmente pelo grupo de Ito (105,106). Os PBs covalentemente ligados a membranas porosas foram usados como sensor de pH, foto-sensor e sensor de oxidoredução . Esta aplicação para os PBs ainda se mostra promissora e apresenta muitas possibilidades de desenvolvimentos.

O Jiang colaboradores desenvolveram um novo conceito para criar nanodispositivos com propriedades de retificação de pH através da modificação assimétrica de nanocanais simples (107). Esses nanocanais podem ser chaveados do estado ligado para o estado fechado com resposta a uma mudança de pH. O transporte de íons também pode ser ativado por

mudança na temperatura que provoca a mudança conformacional dos canais, abrindo e fechando os poros (108).

O mesmo grupo de Jiang aperfeiçoou o conceito de chaveamento de nanocanais através da enxertia de terminações de tiol em (poli-N-isopropilacrilamida – PNIPAAm) (109) escova em nanocanal cobertos de ouro. O chaveamento neste caso é controlado tanto pelo pH quanto pela temperatura. Acima de 40°C o nanoporo apresenta estado de alta condutividade. Independentemente, as propriedades de retificador são controladas pela variação de pH.

2.1.4.3. Sistemas bioeletrônicos híbridos PBs-enzimas

A bioeletrônica tem caminhado para uma pesquisa interdisciplinar que aponta para a integração de biomoléculas e elementos eletrônicos de sistemas funcionais (26). A descoberta de novas estratégias para manipular a comunicação elétrica entre reações de óxido-redução de enzimas e eletrodos é o cerne apara o desenvolvimento de uma variedade de dispositivos bioeletrônicos. Em essência a criação de estruturas híbridas auto-organizadas em superfícies 2D e 3D representam a chave para a obtenção de sistemas de estímulo-resposta eficientes.

Minko e colaboradores (110) desenvolveram um interessante conceito de porta lógica enzimática utilizando os PBs. Esta primeira ideia aponta para uma biocomputação baseada em sistemas que integram enzimas e materiais que respondem a estímulos, e com potencial para aplicação direta em biossensores. Esta plataforma foi constituída de poli (4-vinil piridina – P4VP) escova funcionalizada com enzimas como glicose oxidase, esterase e uréase. O mesmo grupo usou a P4VP para oxidação eletrocatalítica de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH).

A integração de enzimas oxido-redutoras em polímeros escova eletroativos foi recentemente estudada por Neoh e colaboradores (27). Foi desenvolvido um biossensor amperométrico preparado por polimerização radicalar (*Surface initiated atom – transfer radical polymerization* – SI-ATRP) com substrato de ITO (óxido de índio dopado com estanho, *indium tin-doped oxide*). O copolímero escova foi constituído de metacrilato ferrocenilmetila (FMMA) e metacrilato glicidila (GMA). A enzima glicose oxidase (GOx) foi imobilizada no substrato de ITO modificado por reação entre os grupos epoxídeos do GMA e os grupos Amina da GOx. Os resultados revelaram a sensibilidade dos eletrodos ITO/P(FMMA) – b – P (GMA – GOx) de 10,9 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$.

2.1.4.4. Interfaces entre nanopartículas e polímeros escova

A síntese de filmes finos poliméricos com nanopartículas confinadas é um tópico central na ciência e tecnologia dos materiais. O maior interesse desses novos nanomateriais é no campo da óptica e de sensores (111). Os PBs conjugados com nanopartículas em filmes finos proporcionam propriedades únicas para essas duas classes de materiais.

Os PBs facilitam a organização e a imobilização de nanopartículas metálicas e transformam sua resposta óptica e eletrônica pelo meio dielétrico (1). Dentro desse campo alguns estudos integrando PBs e nanopartículas em dispositivos sensores foi reportado pela literatura e serão comentados nos parágrafos seguintes.

O grupo de Minko (29) apresentou nanosensores baseados em nanopartículas de ouro que melhoraram a resposta do sistema de espectroscopia de ressonância de plasmon (SRP). O poli(2-vinilpiridina) P2VP polímero escova foi usado como unidade funcional à resposta de pH. Tokarev e colaboradores (28) explorou a combinação de poli (metacrilato de N, N' – demetilaminoetila) escova em superfície de ressonância de plasmon com nanopartículas metálicas para facilitar a transdução da variação de pH em sinais ópticos. O grupo de Miyashita (112) descreveu a fabricação de nanodispositivo combinando pNIPAN [Poli(N-isopropilacrilamida)] escova e nanopartículas de ouro organizadas seletivamente para detecção óptica em nanoescala em SRP.

Um conceito similar foi utilizado por Gupta colaboradores com PINIPAAm (poli-N-isopropilacrilamida)-ouro em superfícies macroscópicas (113). O grupo de Ionov enxertou PBs de P2VP [poli(2-vinilpiridina)] que responde a solvente e imobilizou nanocristais de CdSe na parte superior da camada polimérica (30). Nesse dispositivo a intensidade fluorescente dos pontos quânticos (QDs) foi fortemente dependente do meio solvente o qual influenciou a espessura da camada e a distância dos pontos à superfície.

Os pontos quânticos também podem ser imobilizados nos PBs através de ligação covalente em superfícies utilizando poli(ácido acrílico) escova (114). Esta abordagem possibilita a ligação irreversível e distribuição homogênea no substrato.

Usando a espectroscopia de impedância eletroquímica Zhou e colaboradores (115) mostraram que o [cloridrato de poli(1-etil-3-(2-metacrilato de etila) imidazolina – PEMEIm-Cl] escova com nanopartículas localizadas de Pd exibiram alta atividade eletrocatalítica para redução de oxigênio, não observada em nanopartículas livres. Em adição, os pesquisadores observaram que a atividade catalítica do nanocompósito escova é dependente da espessura do filme.

Stamm e colaboradores (116) desenvolveram uma membrana sensível ativa usando nanopartículas de Ag incorporadas em poli[metacrilato de 2-dimetilamina etila–PDMAEMA) escova. O nanocompósito foi obtido pela incubação na superfície do polímero escova com uma solução de AgNO_3 , seguida pela redução coordenada de íons Ag^+ em solução aquosa de NaBH_4 . A região *in situ* de íons coordenados com polieletrólitos do tipo escova é uma estratégia comprovada com sucesso na imobilização de nanopartículas (NTs) dentro do PBs.

Recentemente, Huck e colaboradores dedicaram esforços para controlar NTs em PBs (117). Esses autores exploraram o uso de PBs para a organização direta da nanopartículas em superfícies. Azzaroni colaboradores (118) observaram que as nanopartículas metálicas são completamente confinadas dentro das camadas do filme fino polimérico.

Os estudos mencionados nesta revisão bibliográfica têm demonstrado que PBs servem como versáteis plataformas para aplicação na forma de filmes finos híbridos em dimensões nanométricas. A mudança fundamental causada pelo uso de PBs é que as nanopartículas podem ser organizadas diretamente no meio polimérico. Elas podem ser organizadas em regiões particulares do PBs devido à afinidade com meio químico (119).

2.1.4.5. Filmes finos de PBs em dispositivos sensores

Filmes finos de polímeros escova têm sido usados para aumentar o desempenho de sensores (18). Entre os exemplos estão os sensores de umidade (19) e os fotosensores complexados com íons (20).

Os PBs atuando como filmes ultrafinos têm sido usados para modificar superfícies e poros de membranas (120). Substratos orgânicos como polipropileno (PP) (121), polissulfonato (122), nylon (123,124), poli(tereftalato de etileno - PET) (125) e policarbonato (126) com polímeros de topologia escova têm suas propriedades químicas de superfície modificadas. Essas membranas de PBs são promissoras para as aplicações biotecnológicas.

Os polímeros escova (PBs) possuem uma vasta gama de aplicações. A grande interface com a biomedicina é caracterizada pela sua funcionalidade pode proporcionar superfícies que mimetizem o meio biológico. Embora os PBs possuam todas as potencialidades e mecanismos de estímulo e resposta comprovados a literatura ainda não reporta estudos dessas estruturas poliméricas em biosensores aplicados ao diagnóstico de doenças.

Por outro lado o poli(metacrilato de 2-hidroxietila – PHEMA) tem sido usado em biosensores amperométricos para detecção de glicose (127). Recentemente, Ishihara e colaboradores (128) apresentaram um biosensor enzimático utilizando o copolímero de

vinilferroceno e PHEMA (VFe-co-PHEMA). A enzima glicose oxidase (GOx) foi imobilizada na matriz desse copolímero. A resposta de corrente foi detectável com eficiência nas concentrações de hipoglicemia, hiperglicemia e níveis normais de glicose em soro (1,3 a 22 mM).

Em outro estudo (129) apresentado por Jusoh o PHEMA foi usado com o propósito de melhorar o desempenho do biossensor de glicose. O uso do PHEMA possibilitou maior linearidade de resposta devido a sua característica hidrofílica.

O uso de PBs em biossensores para o diagnóstico é plenamente viável como demonstram estudos realizados em outras áreas. Além disso, o PHEMA com hidrofilicidade elevada e a presença de grupos hidroxila na cadeia apresenta boa compatibilidade para imobilização de biomoléculas. Desta forma a aplicação de PBs de PHEMA em dispositivos de biossensores se mostra promissora e com amplo campo para o desenvolvimento.

2.2. DENGUE: UMA DAS 17 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças negligenciadas (*Neglected tropical diseases – NTDs*) afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo. Essas enfermidades se propagam nas condições de pobreza e desorganização. Elas afetam os indivíduos politicamente marginalizados que vivem em áreas rurais remotas ou na periferia de grandes centros urbanos.

As NTDs têm um grande impacto na vida dos indivíduos, famílias e comunidades dos países em desenvolvimento, constituindo um sério obstáculo ao desenvolvimento socioeconômico. Muitas delas causam sequelas irreversíveis que limitam a vida produtiva e afetam especialmente mulheres e crianças (130).

A WHO lista 17 enfermidades como doenças negligenciadas (130): Dengue, Raiva, Tracoma, Úlcera de Bauru, Treponematose, Hanseníase, Doença de Chagas, Tripanossomíase humana africana (doença do sono), Leishmaniose, Cisticercose, Dracunculose, Equinococose, Trematodiase, Filariose linfática (elefantíase), Oncocercose (cegueira dos rios), Esquistossomose e Helmintíase de solo. Em 149 países elas são endêmicas (restritas a uma região).

Atualmente, em escala global, a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*) prioriza a intervenção em três doenças negligenciadas: Dengue, Dracunculose e Raiva (32). Esse informe de 2012 revela ainda que as ações contra as doenças negligenciadas têm sido concentradas no controle de vetores e na distribuição de

medicamentos. A WHO salienta a necessidade de uma estratégia de pesquisa para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico acessíveis a todos os indivíduos que deles necessitem.

As pesquisas para obtenção de novos métodos de diagnóstico até o momento não conseguiram atender a demanda requerida para essas doenças. A atuação de pesquisadores no desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico é de grande relevância para a população acometida por essas enfermidades. Finalmente, segundo a WHO, a dengue é a doença negligenciada que mais causa impacto na população das Américas (32).

2.2.1. Características de manifestação da dengue

A dengue é uma enfermidade infecciosa causada pelo vírus de dengue (DENV). Ela é transmitida pela picada do mosquito da espécie *Aedes* infectado por um dos quatro sorotipos virais existentes. É uma doença infecciosa de manifestação clínica dinâmica. Atualmente a WHO classifica a dengue como uma doença única que inclui a dengue clássica e a febre hemorrágica de dengue (FHD) (32).

A enfermidade afeta habitantes de zonas tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente, 2,5 bilhões de pessoas vivem em mais de 100 países onde o vírus da dengue pode ser transmitido. Mais de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente no mundo com um total de 15 a 20 mil mortes. Hoje a dengue é considerada pela WHO como a mais importante doença viral transmitida por mosquito. Nos últimos 50 anos a incidência cresceu 30 vezes (32). O mapa da Figura 2.6 ilustra os países onde a dengue apresenta risco de transmissão.

Nas Américas a dengue continua sendo um problema de saúde pública, apesar dos esforços dos países membros no sentido de minimizar o impacto das epidemias. Os padrões climáticos da região são favoráveis à proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor da enfermidade no continente. No Brasil o número de casos relatados pelo Ministério da Saúde em 2011 foi de 764.032, em todo território nacional (131) correspondendo a 76 % de todos os casos registrados nas Américas.

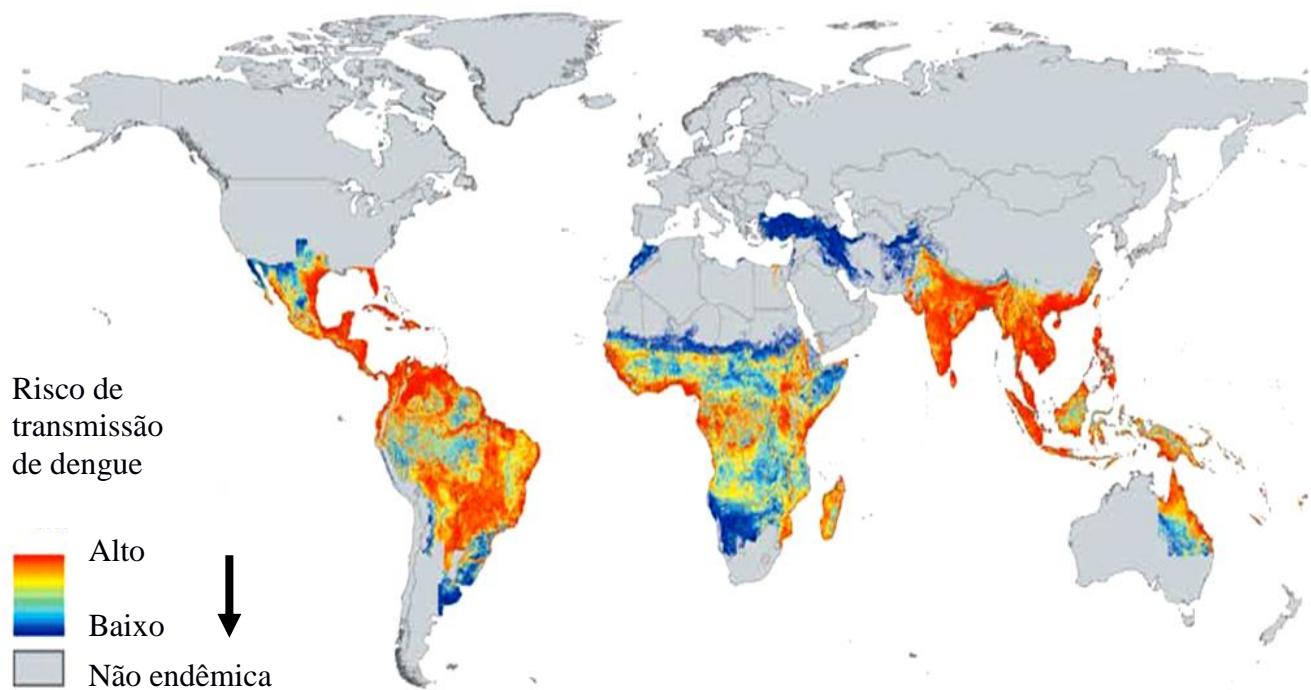


Figura 2.6: Mapa das áreas de risco de transmissão do vírus de dengue. O mapa é baseado em dados da WHO combinado com centros de vigilância integrada, Gideon online, ProMED, DengueMap, Eurosurveillance e publicações da literatura. Fonte: (132).

O vírus dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. O vírus é esférico e possui o genoma na forma de fita simples de RNA. Uma capa protetora com aproximadamente 40 a 50 nm de diâmetro envolve o núcleo. Sua composição protéica consiste de três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (133). Existem atualmente quatro sorotipos: DENV1, DENV2, DENV3, DENV4. A Figura 2.7 ilustra a estrutura de um vírus DENV.

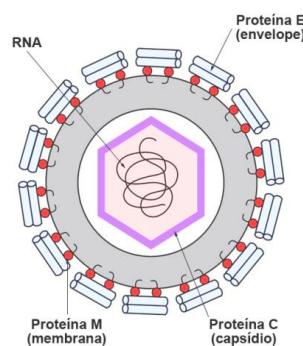


Figura 2.7: Representação do vírus de dengue (DENV). Fonte:(134).

Os diferentes sorotipos do vírus da dengue são transmitidos ao homem pela picada do mosquito *Aedes* infectado, especialmente o *Aedes aegypti* na região das Américas. Esse mosquito é uma espécie tropical e subtropical amplamente distribuída em todo o mundo, entre as latitudes 35° N e 35° S. Surtos de dengue também são atribuídos ao *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e várias espécies de *Aedes scutellaris*. Cada uma dessas espécies possui comportamento, ecologia e distribuição geográfica determinada (32).

Os estágios larvais se desenvolvem em habitats de águas abertas, principalmente em recipientes artificiais associados às habitações humanas. Estudos sugerem (135) que a maioria das fêmeas de *Aedes aegypti* passam a sua vida em torno das habitações humanas onde emergem como adultas. Isto significa que as pessoas, e não os mosquitos, propagam o vírus rapidamente entre comunidades.

O sangue dos seres humanos com viremia da dengue é ingerido por mosquitos fêmeas durante a alimentação. Em seguida, o vírus infecta o intestino médio do mosquito e, subsequentemente, há propagação sistêmica ao longo de um período de 8 a 12 dias. Após este período de incubação extrínseco (no mosquito), o vírus pode ser transmitido para outros seres humanos. Depois disso, o mosquito permanece infeccioso para o resto da sua vida e prolifera o vírus nas reproduções. Os ovos podem permanecer viáveis, mesmos secos, por um período de um ano o que permite a disseminação do inseto pelos meios de transporte (32).

Após a incubação do vírus no homem pelo mosquito a manifestação dos sintomas da dengue inicia-se entre 3 e 7 dias. A enfermidade começa abruptamente e passa por três fases: febril, crítica e de recuperação que se completam em torno de 14 dias. Após uma primeira infecção o indivíduo pode contrair novamente um vírus dengue de outro sorotipo caracterizando a infecção secundária. Ademais, outros *flavivirus* como o da febre amarela e da encefalite também possuem reação cruzada com o vírus dengue e podem induzir uma segunda infecção (132).

A infecção secundária na maioria das vezes evolui para os casos severos de dengue causando expressivo número de óbitos caso não sejam tratados no início dos sintomas. Todavia, os sinais clínicos não prevêem qual paciente evoluirá para o caso grave (132). A Figura 2.8 ilustra o ciclo de infecção pelo vírus dengue e os momentos de maior eficácia dos métodos de diagnóstico atuais.

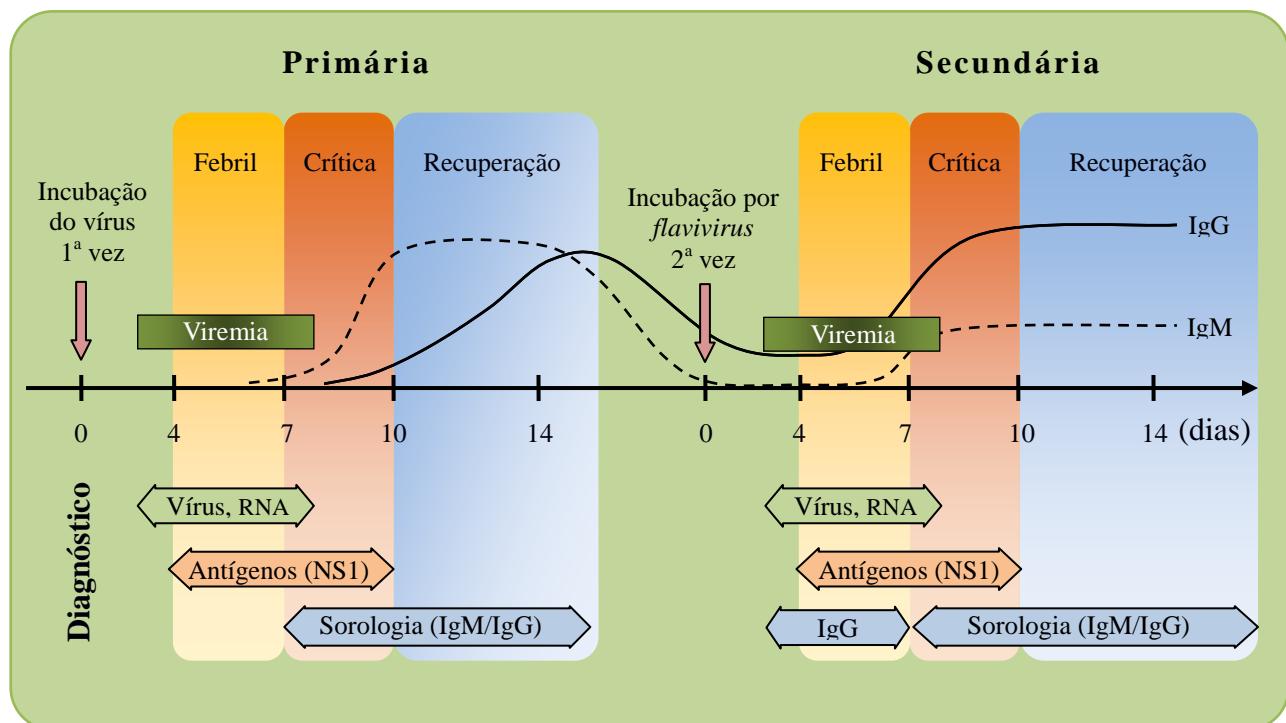


Figura 2.8: Ciclo de infecção pelo vírus de dengue: as concentrações de imunoglobulinas IgG e IgM têm comportamento dinâmico em ambos os tipos de infecção. Os procedimentos de diagnóstico atuais são divididos em quatro grupos: isolamento de vírus, detecção de antígenos (NS1), detecção de genoma (RNA) e sorologia (IgM/IgG).

Na fase febril os pacientes desenvolvem febre alta e repentina, que dura de 2 a 3 dias. Esta fase febril aguda é acompanhada de cefaleia, mialgia, artralgia ou dor retrororbital. Podem ocorrer manifestações hemorrágicas cutâneas como petequias e equimoses. Durante a fase febril o paciente pode apresentar desidratação e transtornos neurológicos. Além dessas manifestações as convulsões são comuns em crianças pequenas (132). A primeira anormalidade no sangue, que poderá caracterizar a dengue, é uma redução progressiva do número total de células brancas.

A fase crítica ocorre após o declínio da febre e caracteriza-se pelo aumento da permeabilidade capilar juntamente com a elevação dos níveis de hematócrito. Os sintomas graves que podem surgir nessa fase são o choque por extravasamento de plasma, hemorragias internas e o comprometimento dos órgãos. Esta fase dura entre 1 e 3 dias (132). A leucopenia (diminuição da taxa de leucócitos) progressiva seguida por uma diminuição rápida na contagem de plaquetas tipicamente precede o extravasamento de plasma. Nesse momento, os pacientes que não apresentam aumento da permeabilidade capilar melhoram (32).

Na fase de recuperação o estado geral do paciente melhora. O estado hemodinâmico estabiliza, os líquidos extravasculares são reabsorvidos e em consequência há o aumento gradual da diurese. São comuns na fase de convalescência a bradicardia (diminuição na frequência cardíaca) e alterações do eletro-cardiograma (ECG). O hematócrito se estabiliza ou diminui devido ao efeito de diluição do fluido reabsorvido. A contagem de leucócitos normalmente começa a subir imediatamente após a redução da febre, embora a recuperação do número de plaquetas seja geralmente posterior ao do número de leucócitos (32).

Após a pessoa ser infectada pelo vírus desenvolverá febre e a infecção estará largamente disseminada pelo organismo. O vírus pode ser encontrado no soro, plasma, células sanguíneas ou tecidos específicos por aproximadamente 4 a 5 dias, após o aparecimento dos sintomas. O vírus de dengue infecta as células nucleares periféricas do sangue dentro de poucos dias após a picada do mosquito. A taxa de infecção revelada pelo antígeno marcador é usualmente de 1:1000 a 1:10000. Níveis detectáveis de anticorpos aparecem após a fase crítica, 5 a 6 dias (135).

Os indivíduos que não foram infectados previamente com algum tipo de *flavivirus*, nem foram imunizados com uma vacina *flavivirus* (febre amarela ou encefalite japonesa) desenvolvem uma resposta autoimune primária. A imunoglobulina dominante nesta primeira infecção é do tipo IgM. A resposta autoimune primária aparece dentro de 4 a 6 dias após o início dos sintomas. Uma vez detectado, os níveis de IgM crescem rapidamente até atingirem um pico em até 2 semanas. A partir desse ponto máximo esta imunoglobulina declina a níveis não detectáveis em 2 ou 3 meses (135).

Os anticorpos inibem a hemoaglutinação das células vermelhas do sangue pelo vírus da dengue. A inibição da hemoaglutinação aparece simultaneamente com a detecção da IgM. A imunoglobulina IgG antidengue aparece fracamente após a primeira semana da enfermidade. A infecção primária da dengue é caracterizada pela alta razão molar IgM/IgG (135).

Nas infecções secundárias por *flavivirus* a imunoglobulina dominante é a IgG. A IgM aparece em alguns momentos, com uma cinética de infecção semelhante a que ocorre na infecção primária, entretanto com níveis dramaticamente menores. Na infecção secundária ocorrem altos índices de IgG antidengue ainda na fase crítica da doença. Uma vez detectada, os níveis de IgG crescem rapidamente atingindo o pico em 10 dias após o aparecimento dos sintomas. O nível alto de IgG permanece por 10 meses ou toda vida do indivíduo. Os níveis de IgM na etapa de convalescência são mais baixos nas infecções secundárias e atingem o pico

também em 10 dias; em alguns casos, nem são detectáveis. A infecção secundária da dengue é caracterizada pela baixa razão molar IgM/IgG (135).

Ambos os anticorpos antidengue IgM e IgG neutralizam o vírus. A neutralização cresce rapidamente à medida que a febre se torna mais fraca diminuindo a sensibilidade na detecção de vírus no soro (34).

Os procedimentos de diagnóstico laboratorial para a dengue compreendem atualmente quatro grupos: isolamento viral, testes sorológicos, detecção de genoma (RNA) e detecção de抗ígenos virais (NS1) (34).

A escolha do método de diagnóstico depende da finalidade para a qual os testes são realizados: diagnóstico clínico, estudo epidemiológico e desenvolvimento de vacinas. Também o tipo do laboratório e as técnicas disponíveis, assim como os custos e o tempo de coleta das amostras devem ser considerados na escolha. Os métodos de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade exigem conhecimentos técnicos e tecnologias mais complexas, enquanto os testes rápidos, mais acessíveis, são de menor sensibilidade e especificidade. A Figura 2.9 ilustra uma relação inversa entre a facilidade de utilização de um método de diagnóstico tradicional e a confiança nos resultados (34).

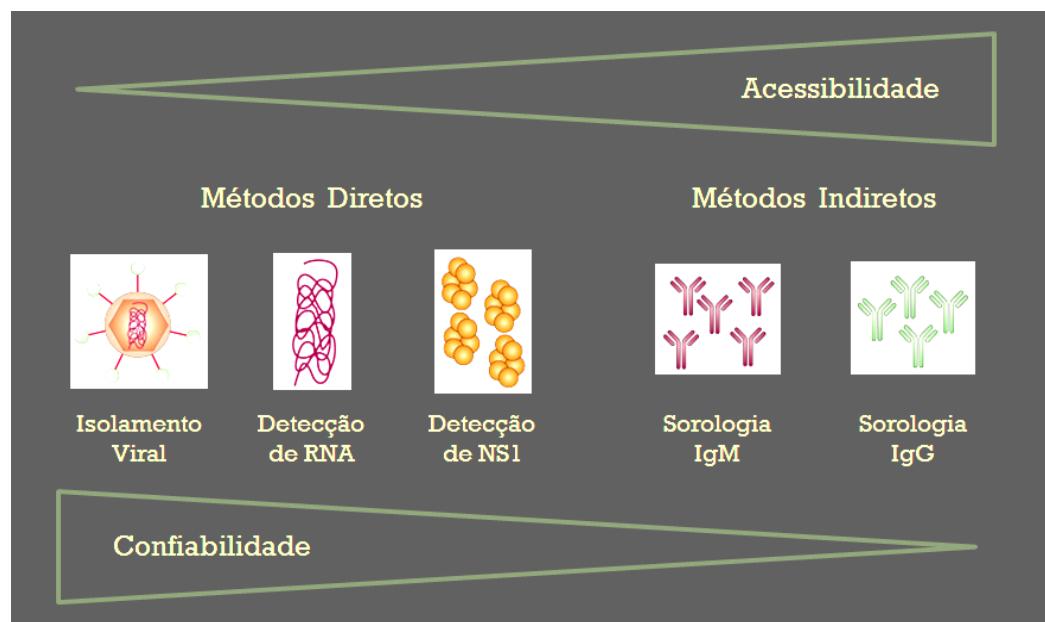


Figura 2.9: Comparação entre os métodos de diagnóstico para a dengue. Adaptado da Fonte: (34).

A análise sorológica consiste na identificação de imunoglobulinas (IgM e IgG) específicas em hemometabólicos. A sorologia é o procedimento mais simples e auxilia na

identificação de infecções primárias e secundárias. Contudo, pode fornecer resultados falso-positivos de diagnóstico devido à reação cruzada do vírus dengue com outro *flavivirus* (34). Além disso, a sorologia não fornece diagnóstico nas fases iniciais da infecção.

Os testes sorológicos podem produzir resultados falso-positivos devido à ativação de células policlonais *B-cell* ou anticorpos de reação cruzada, obtidos por certos grupos epitopos (determinante antigênico) de *flavivirus* (34). Epitopos comuns, especialmente aqueles de membrana com glicoproteína (antígeno de maior estrutura) causam o aparecimento prematuro de anticorpos provocados pela infecção com um sorotipo de dengue ou de reação cruzada com outros sorotipos. Resultados falso-positivos de diagnóstico de dengue podem ocorrer especialmente em áreas onde outros *flavivirus* estão presentes. Pela especificidade da resposta da detecção IgM antidengue, diagnósticos acurados de infecção por *flavivirus* podem ser obtidos. Entretanto, não se consegue a determinação do sorotipo específico que causa a infecção (34).

Portanto, o diagnóstico sorológico é menos específico do que o diagnóstico por cultura. O teste sorológico em populações expostas a outros tipos de *flavivirus* apresenta certo grau de incerteza no resultado (34). O grau de confiabilidade nos testes sorológicos pode ser aumentado pelo uso de testes de neutralização (soro diluição, constância de vírus e teste de redução de plaquetas), os quais são capazes de distinguir os tipos de uma resposta imune primária para diferentes sorotipos de dengue (133).

O isolamento viral e a detecção do genoma são os métodos mais específicos de diagnóstico (133). A detecção de vírus da dengue em culturas é um diagnóstico definitivo, mas os aspectos práticos envolvendo cuidados especiais na coleta e maior tempo para o resultado limitam o seu uso. E o que é mais importante, o período em que o vírus pode ser detectado com sucesso é breve. Durante um ou dois dias após a diminuição da febre os aumentos dos níveis de anticorpos nas amostras interferem na cultura do vírus. Também a cultura de vírus requer instalações sofisticadas de laboratório com alto custo (133). Portanto, esse serviço só é utilizado nos estudos epidemiológicos e de desenvolvimento de vacinas.

A técnica mais eficaz de detecção de RNA utiliza a transcrição de cadeia reversa (*Polymerase chain reverse – RT-PCR*) em tempo real. Esta técnica de diagnóstico identifica o sorotipo do vírus e fornece resultado em até de 2 horas. Ela não é tão complexa quanto a cultura de vírus. Pode ser usada após a diminuição da febre ou em situações onde as amostras não estão em condições ideais para a cultura de vírus (133). Porém, devido ao alto custo dos equipamentos e a complexidade de operação ela é uma técnica inviável como alternativa de

diagnóstico em muitos países onde ocorrem as infecções pelo vírus de dengue. As amostras para o teste de RNA podem ser extraídas do soro, plasma ou células.

O RNA da dengue também pode ser identificado em células usando a *in situ Hybridization* ou a imunocitoquímica. Embora a *in situ Hybridization* seja um método mais sensível, poucos laboratórios têm experiência para aplicá-lo. Em contraste, a detecção de antígeno por imunocitoquímica é simples e tem sido explorada há vários anos. Com a existência de novos reagentes comerciais disponíveis esse método pode oferecer a mesma especificidade do isolamento de vírus (133).

Por outro lado a detecção de antígenos NS1 identifica o vírus, é acessível e de custo reduzido. Mas, os testes atuais com base em reagentes, apresentam menor sensibilidade (133) do que os métodos de isolamento viral e a detecção do genoma.

A determinação de ambos os tipos, vírus e anticorpos, são preferidas a uma abordagem única. Assim o uso de alternativas que confirmem os resultados (MAC-ELISA ou Hemoaglutinação-inibição IH) podem melhorar a qualidade do diagnóstico (133).

2.2.2 Dispositivos biossensores para diagnóstico de dengue

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para o diagnóstico de dengue é recente e remonta os últimos 7 anos. O número de estudos encontrados na literatura ainda é pequeno. Observa-se a tendência na pesquisa e desenvolvimento de genossensores. Essa revisão cita os estudos mais significativos, descritos nos parágrafos seguintes.

Um dos primeiros estudos de detecção de RNA por hibridização foi proposto por Kwakye e colaboradores em 2006 (136). Nesse biosensor eletroquímico de microfluidos, um microeletrodo interdigitalizado combinado com um micropotenciómetro quantificou o RNA viral por detecção amperométrica. Embora com tempo de resposta de 60 minutos, o sistema composto de esferas magnéticas e microbombas apresentou uma operação complexa.

Outro genossensor estudado posteriormente utilizou a imobilização de RNA complementar em eletrodo de carbono modificado com filme de quitosana (137) e apresentou resultados promissores, mas o seu estudo não foi continuado. Recentemente (138) foi proposto um biossensor com nanofios de silício estruturados em transistor de efeito de campo (FET). A hibridização da sequência peptídica imobilizada na superfície dos nanofios com amostras de soro produziram cargas negativas que alteraram a resistividade do canal entre a fonte e o dreno. Com tempo de resposta de 30 minutos, esta proposta tem a vantagem de

acoplamento direto com a tecnologia do silício. Esse dispositivo substituiu as etapas de marcação da técnica tradicional RT-PCR, porém ainda foram necessárias as demais etapas do processo da polimerase de cadeia reversa.

Mais recentemente Souza (139) e colaboradores propuseram um estudo preliminar de um genossensor amperométrico utilizando substrato de grafite. A ativação do substrato através de potencial elétrico possibilitou a imobilização dos oligonucleotídeos do RNA. A resposta de impedância desse biossensor diferencia cada sorotipo com diferenças de $10\text{ k}\Omega$ para detecção.

Oliveira e colaboradores têm estudado a imobilização de lectinas vegetais (140–142) em substratos metálicos e poliméricos para detecção de RNA viral. A afinidade de cada sorotipo com essas lectinas produziram uma resposta diferenciada de impedância, o que forneceu a discriminação entre os sorotipos do vírus dengue.

2.3. SÍNTESE DE COPOLÍMEROS ESCOVA UTILIZANDO RAIOS GAMA

A radiação ionizante envolve radiações eletromagnéticas de alta energia capazes de excitar e ionizar átomos após sua interação com a matéria. São classificadas como radiações ionizantes os raios γ , raios X, elétrons rápidos, partículas pesadas (prótons, dêuterons) e nêutrons. Quanto à sua natureza de interação, as radiações ionizantes podem ser classificadas em radiações diretamente ionizantes (partículas com carga elétrica) e indiretamente ionizantes (partículas eletricamente neutras) (143).

A classificação das radiações ionizantes baseia-se nas forças responsáveis pelas interações com a matéria e na modelagem utilizada para descrevê-las. É sabido que fôtons interagem pela ação de campos eletromagnéticos, atuando sobre partículas carregadas do meio (144). Por outro lado, as partículas carregadas têm sua ação em elétrons do meio por interações coulombianas consecutivas. Já os nêutrons atuam sobre prótons e nêutrons de núcleos atômicos pela força nuclear forte.

Neste estudo foram utilizadas radiações indiretamente ionizantes, a exemplo dos fôtons de raios gama provenientes de uma fonte de ^{60}Co . Durante sua interação com a matéria, os fôtons apresentam uma probabilidade de interação (μ) que depende essencialmente de sua energia e do meio que atravessam (145). O parâmetro μ também pode se denominado de coeficiente de atenuação, com unidades de $(1/\text{cm})$. Então, μ é dado pela Equação (2.6).

$$\mu = \tau + \sigma + \kappa + \sigma_R \quad (2.6)$$

Sendo τ , σ , κ e σ_R as probabilidades de interação por livre caminho médio devido aos efeitos fotoelétrico, Compton, produção de pares e Rayleigh, respectivamente.

No efeito fotoelétrico, a interação do fóton com a matéria resultará na liberação de um elétron fortemente ligado com posterior desaparecimento do fóton (145). Nesse caso, a energia cinética do elétron emitido é dada pela Equação (2.7).

$$T = h\nu - E_b \quad (2.7)$$

Sendo $h\nu$ a energia do fóton incidente e E_b a energia de ligação do elétron. A probabilidade de interação pelo efeito fotoelétrico dependerá da energia do fóton incidente e da natureza da matéria com a qual o fóton interage (145). O coeficiente mássico de atenuação para o efeito fotoelétrico é dado ela Equação (2.8).

$$\frac{\tau}{\rho} = \left(\frac{Z}{h\nu} \right)^3 \quad (2.8)$$

Sendo ρ a densidade do material e Z o número atômico. A relação (2.8) é expressa em unidades de $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

No efeito Compton, o fóton transfere sua energia a um elétron fracamente ligado. A energia cinética adquirida pelo elétron é dada pela Equação (2.9).

$$T = h\nu - h\nu' \quad (2.9)$$

Sendo $h\nu$ e $h\nu'$ as energias do fóton antes e após a interação com a matéria, respectivamente. O coeficiente mássico de atenuação para o efeito Compton é independente de Z , sendo predominante no intervalo de energia de keV.

A produção de pares ocorre quando o fóton gasta toda sua energia na produção de um par elétron-pósitron com energias cinéticas T^- e T^+ , respectivamente (145). O elétron e o pósitron não recebem necessariamente igual energia, sendo a energia cinética média, \bar{T} , expressa pela Equação (2.10).

$$T = \frac{h\nu - 1,022 \text{ MeV}}{2} \quad (2.10)$$

A energia mínima do fóton para a produção de pares é de 1,022 MeV (145), sendo que a probabilidade de produção de pares aumenta com a energia do fóton e o número atômico (Z) do material.

No caso do fóton sofrer uma interação Rayleigh, haverá somente sua dispersão no material e não originará nenhuma ionização (146). A predominância do tipo de interação do fóton com a matéria vai depender da energia do fóton e de Z do material. A Figura 2.10 ilustra as regiões de predominância relativa dos três principais tipos de interação citados.

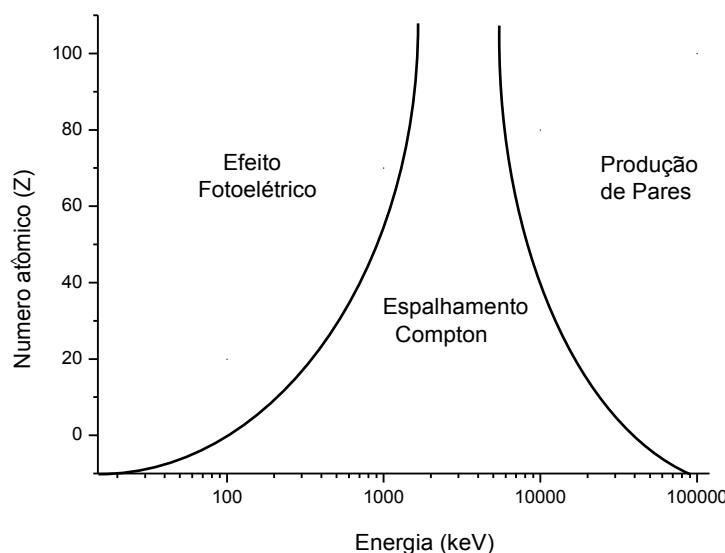


Figura 2.10: Efeitos da energia do fóton e número atômico (Z) nos processos que envolvem a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria. Adaptado da Fonte: (145)

A capacidade de penetração dos fótons aumenta com sua energia, em consequência, a probabilidade de interação (μ) diminui. Deste modo, em sistemas macromoleculares, dependendo de sua energia os fótons podem interagir no nível superficial ou volumétrico do material (146).

Como já observado, se o tipo de interação envolve o efeito Compton, se gerará apenas radiação dispersa. Caso predomine o efeito fotoelétrico, haverá maior absorção da radiação e, consequentemente, o rendimento quanto ao processo de obtenção dos polímeros escova será significativamente aumentado.

A Figura 2.11 ilustra um perfil de atenuação da radiação em um material absorvedor .

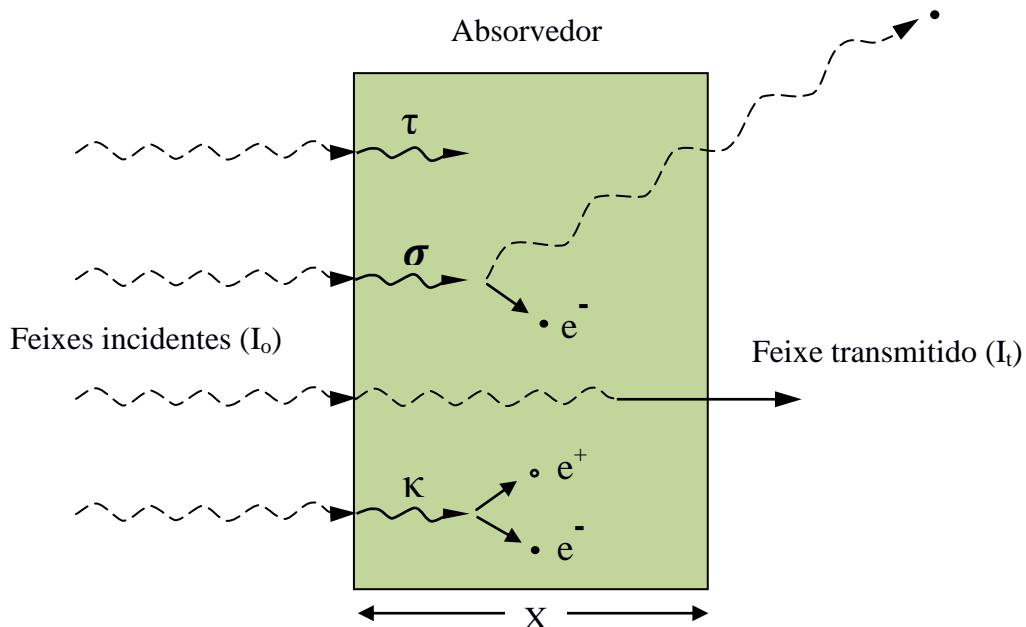


Figura 2.11: Processo de atenuação de um feixe de fótons de intensidade (I_0) em um absorvedor de espessura x : (τ) efeito fotoelétrico, (σ) espalhamento Compton e a (κ) produção de pares. Os fótons que atravessam o absorvedor sem interação constituem o feixe transmitido (I_t). Adaptado da Fonte: (147).

A coeficiente linear de atenuação da radiação por um agente absorvedor é dado pelas Equações (2.11) e (2.12).

$$I_t = I_0 e^{-\mu x} \quad (2.11)$$

$$\mu = \tau + \sigma + \kappa \quad (2.12)$$

Sendo I_t a intensidade do fóton transmitido, I_o a intensidade inicial do fóton, x é a espessura do absorvedor e μ coeficiente de atenuação (1/cm).

Por sua natureza orgânica, os polímeros podem sofrer interações com as radiações de baixa energia (calor, radiações ultravioleta) ou de alta energia (raios gama, elétrons). Em qualquer destes casos, o mecanismo da iniciação é do tipo homolítico, formando-se radicais livres. No caso de radiações de alta energia geram-se radicais livres diretamente na massa do monômero, e essa operação pode ser controlada com grande precisão pela intensidade (taxa de dose e dose de irradiação) dessas radiações (148). O produto obtido é de elevada pureza, isento de aditivos, o que é qualidade importante especialmente para utilização em biossensores.

Devido à sua energia, a radiação gama interage com o polímero produzindo preferencialmente o efeito Compton. O elétron produzido neste processo perde sua energia cinética ionizando e excitando as moléculas do polímero, acarretando a formação de radicais. Há também a formação de elétrons secundários, que possuem energia suficiente para ionizar e excitar as moléculas poliméricas, até alcançar a energia térmica (elétron termalizado) (149).

A interação da macromolécula com elétrons termalizados resulta em moléculas ionizadas e moléculas excitadas que posteriormente se recombina ou dissociam para produzir radicais livres ou íons. O excesso de íons é neutralizado pelo processo de solvatação. A formação de radicais livres é o processo mais importante da interação da radiação ionizante com os polímeros. Estes radicais livres têm uma participação importante nas reações químicas que ocorrem nos polímeros irradiados (150).

Assim, a interação da radiação com o polímero inicia uma sequência de inúmeros eventos complexos que podem ser divididos nos estágios físico ou físico-químico (148–150). No estágio físico (10^{-1} s a 10^{-15} s) a energia transferida provoca excitações moleculares e ionização. As espécies formadas são muito instáveis sofrendo reações secundárias tanto espontaneamente como por colisão com as moléculas vizinhas. Já no estágio físico-químico (10^{-14} s a 10^{-11} s) há a formação de espécies secundárias reativas e radicais livres.

Neste estudo foi utilizado etanol (EtOH) como solvente para o monômero HEMA no processo de irradiação simultânea. Do ponto de vista termodinâmico o processo de dissolução pode ser definido pela energia livre da mistura (151), Equação (2.13).

$$G_M = H_M - T S_M \quad (dp = 0 \text{ e } dT = 0) \quad (2.13)$$

Se a energia livre de Gibbs ($G_M < 0$) o processo é espontâneo. Quando não existem interações específicas ($TS_M > 0$) há o aumento da desordem no processo de dissolução. A solubilidade depende da entalpia (H_M). Com exceções de substâncias muito polares que interagem de forma específica, a maioria das dissoluções de polímeros é endotérmica e $H_M > 0$. Nesse caso, a seleção de solventes para polímeros, como o PHEMA, pode se basear na teoria de Hildebrand e Scott para estabelecer um critério de seleção. Nesse caso, quanto mais próximo de zero H_M , mais termodinamicamente favorável será a mistura (152), dada pela Equação (2.14).

$$H_M = V_M \varphi_1 \varphi_2 (\delta_1 - \delta_2) \quad (2.14)$$

Sendo V_M o volume molar da mistura, φ_1 e φ_2 as frações em volume dos componentes da mistura e δ_1 e δ_2 representam os parâmetros de solubilidade dos componentes da mistura, solvente e polímero, respectivamente.

O parâmetro de solubilidade (δ_i) de polímeros é definido pela Equação (2.15).

$$\delta_1 = \left(\frac{\Delta E_i}{V_i} \right)^{1/2} \quad \text{com} \quad E_i = HV_i - RT \quad (2.15)$$

Sendo E_i a energia coesiva, V_i o volume do componente, R a constante dos gases e T a temperatura. O quociente $\Delta E_i/V_i$ representa a densidade de energia coesiva, que indica a intensidade das interações em cada componente. Quando $\delta_1 = \delta_2$, implica que $H_M = 0$ ou seja, o polímero é miscível no solvente selecionado.

O parâmetro de solubilidade do etanol (EtOH) é igual a $11,75 \text{ (cal/cm}^3\text{)}^{1/2}$ (153,154) e do PHEMA $14,5 \text{ (cal/cm}^3\text{)}^{1/2}$ (155). Observa-se que $\delta_{\text{EtOH}} \approx \delta_{\text{PHEMA}}$ e, nesse caso $G_M < 0$ no solvente selecionado (EtOH).

O processo de enxertia do HEMA na superfície de PE é afetado pela difusão do monômero e do solvente dentro da matriz polimérica. Para se conseguir um elevado nível de enxertia, o monômero deve reagir com o maior número possível de radicais gerados pela radiação ionizante. Nesse caso, a difusão do monômero na matriz polimérica será máxima

quando $\delta_{EtOH} \approx \delta_{2PHEMA}$. Nessa interpretação, o EtOH é capaz de "conduzir" as moléculas do monômero o mais próximo possível dos radicais criados na matriz polimérica e por este meio induzir a reação de enxertia com elevada eficiência.

O efeito da concentração do monômero HEMA no percentual de enxertia foi extensamente estudado por Queiroz e colaboradores (39). A variação da concentração do HEMA no solvente EtOH é apresentada na Figura 2.12. À medida que se aumenta a concentração do monômero, aumenta-se o percentual de enxertia até atingir-se o máximo, ao redor de 40%, a partir do qual se observa uma diminuição do processo. A curva que melhor se ajusta aos dados experimentais é uma gaussiana.

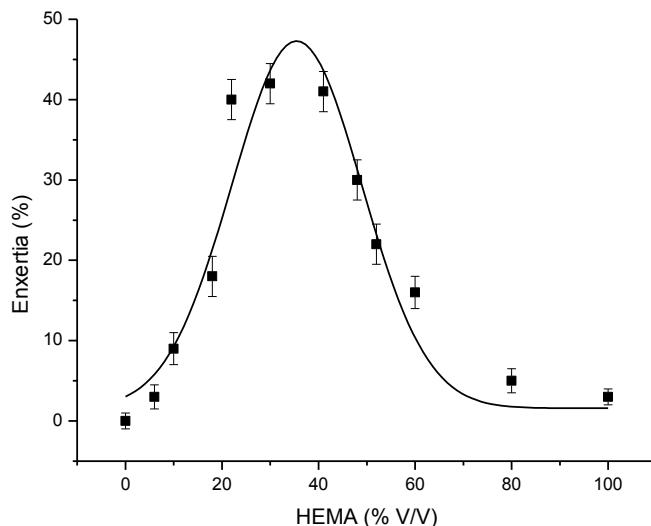


Figura 2.12: Efeito da concentração do monômero HEMA na enxertia sobre PE. Condições de enxertia: taxa de dose de irradiação de $6,0 \text{ kGy.h}^{-1}$ e 40 kGy (raios γ de ^{60}Co), temperatura de irradiação: 25°C e atmosfera inerte ($N_{2(g)}$). A barra de incerteza corresponde a três medidas. Fonte: (39)

O comportamento observado na Figura 2.12 é explicado pelo fato de que para baixas concentrações do monômero, mesmo que sua difusão no substrato seja alta, a concentração de radicais será baixa. A alta concentração do monômero leva a um aumento tanto da difusão como da concentração de radicais, aumentando-se assim o percentual de enxertia, até atingir-se o ponto onde haverá a formação do homopolímero insolúvel, o poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA). A formação do PHEMA insolúvel desfavorece a reação de enxertia do HEMA no substrato (PE) (156).

A Figura 2.13 mostra a dependência entre o percentual de enxertia e a taxa de dose de irradiação com raios gama. Observa-se que os mais altos percentuais de enxertia foram obtidos para uma taxa de dose de irradiação de 6 kGy.h^{-1} , indicando que existe um aumento na velocidade do processo a baixas taxas de dose até atingir-se uma enxertia na qual a velocidade é máxima. De acordo com os resultados, obtidos em estudos anteriores (39), nota-se que ao utilizar-se a técnica de irradiação simultânea com raios γ , uma taxa de dose baixa é mais efetiva na obtenção de altos níveis de enxertia do que uma taxa de dose mais alta. Isto se deve ao fato de que a uma taxa de dose de irradiação mais elevada, a homopolimerização torna-se alta, diminuindo a disponibilidade do monômero e consequentemente, o percentual de enxertia.

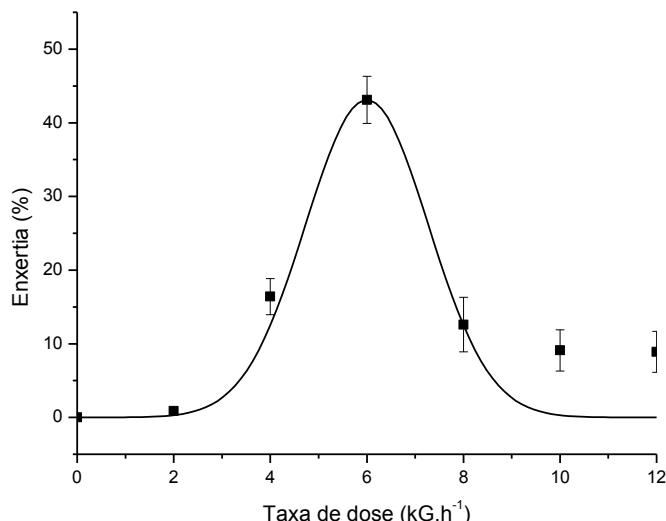


Figura 2.13: Efeito da taxa de dose de irradiação na enxertia do HEMA sobre PE. Condições de enxertia: Concentração do monômero: 40% v/v; solvente: EtOH; temperatura: 25°C; dose de irradiação: 40 kGy, atmosfera inerte ($N_{2(g)}$). A barra de incerteza corresponde a três medidas. Fonte: (39).

O efeito da dose de irradiação no processo de enxertia do HEMA, sobre o PE via irradiação simultânea com raios gama é mostrado na Figura 2.14. Nota-se que o percentual de enxertia aumenta com a dose de irradiação, atingindo-se rapidamente a saturação para taxas de dose elevadas. A saturação do percentual de enxertia a altas doses pode ser atribuída a uma acumulação na quantidade de radicais formados na matriz de PE (157).

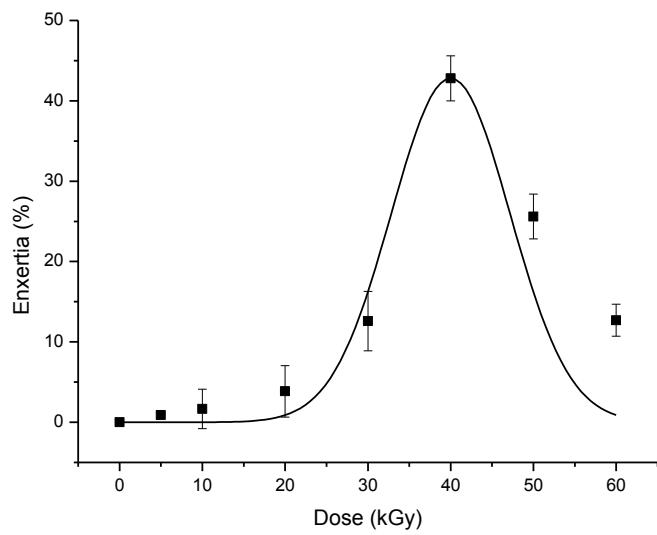


Figura 2.14: Efeito da dose de irradiação na enxertia do HEMA sobre PE. Condições de enxertia:
Concentração do monômero: 40% v/v; solvente: EtOH; temperatura de irradiação: 25°C; taxa de dose de
irradiação: 6,0 kGy.h⁻¹, atmosfera inerte ($N_{2(g)}$). A barra de incerteza corresponde a três medidas. Fonte: (39)

CAPÍTULO 3 — OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

3.1. OBJETIVO GERAL

Esta dissertação de mestrado tem como objetivo geral desenvolver filmes finos poliméricos com a topologia escova para aplicação em biossensores. O estudo é direcionado para a detecção de imunoglobulinas IgG. A fim de explorar uma nova rota de síntese para as estruturas do tipo escova é utilizada a técnica de enxertia por radiação ionizante através de raios gama (γ). Um substrato de polietileno (PE) recebe a enxertia de cadeias do polímero poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Sintetizar filmes finos de copolímeros PE-e-HEMA com topologia do tipo escova utilizando radiação gama (γ) de uma fonte de cobalto 60 (^{60}Co);
- ◆ Caracterizar estruturalmente os filmes obtidos com técnicas físico-químicas de análise como: ângulo de contato, FTIR, MEV, SEDX e DSC;
- ◆ Imobilizar íons de ferro na superfície porosa das membranas de PE-e-HEMA por adsorção física, promovendo um aumento na condutividade da membrana;
- ◆ Imobilizar imunoglobulina anti-IgG na superfície porosa das membranas para promover uma resposta de detecção eficiente da imunoglobulina IgG humana;
- ◆ Avaliar a resposta elétrica do sistema (PE-e-HEMA — $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ — anti-IgG) em concentrações de IgG que incluem valores acima daqueles normais encontradas em indivíduos saudáveis.

CAPÍTULO 4 — MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Os filmes de polietileno de baixa densidade (PE) utilizados como substrato do enxerto foram obtidos comercialmente da 3M em folhas de 29 x 31 cm. A espessura do filme original medida com micrômetro Mitutoyo mecânico foi de 40 µm. As folhas foram cortadas em filmes de dimensões de 3x1,5 cm. Depois de recebidas as amostras foram lavadas com solução aquosa de detergente (15% v/v) e enxaguados com água destilada e etanol (EtOH) por 5 minutos e secas à temperatura ambiente de 25⁰ C em câmara de vácuo de -600 mmHg por 12 horas.

O monômero utilizado para enxertia foi o metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA), com uma pureza de 97%, estabilizado com 200 ppm de éter etílico de hidroquinona, adquirido da Sigma-Aldrich, Co. St. Louis-MO, EUA, e utilizado como recebido. Como solvente do monômero utilizou-se etanol [C₂H₆O – PM 46,07 (Peso molecular), > 95% (pureza mínima)], obtido também da Sigma-Aldrich.

Os outros solventes utilizados para lavagem das membranas e medidas do ângulo de contato foram: clorofórmio de grau espectroscópico (CHCl₃ – PM 119,38, > 99,5%), N,N-dimetilformamida (C₃H₇NO – PM 73,01, > 99,8%), glicerol (C₃H₅(OH)₃ – PM 92,01, > 99,5%), dicloroetano (CH₂ClCH₂Cl – PM 98,96, > 98,9%) adquiridos da Sigma-Aldrich. O óleo de rícino (C₅₄H₁₀₀O₇ – PM 861,37, > 99,0%) adquirido da Paba, SP. A água destilada foi obtida no destilador da AmericanLab modelo Pilsen Al 071/5L instalado no laboratório de biomateriais da UNIFEI.

Como base para diluição de biomoléculas foi utilizada solução salina tamponada (PBS) em pH 7,4 preparada com os seguintes compostos: NaCl (138 mM), KCl (2,7 mM), KH₂PO₄ (1,8 mM), Na₂HPO₄ (10 mM), adquiridos da Sigma. E água de Milli Q da Millipore 18,3 MΩ.cm, pH 6, preparada no laboratório de biomateriais. O pH final da solução foi ajustado para 7,4 na temperatura de 25 °C.

Para aumentar a condutividade das membranas de copolímero PE-e-HEMA foram usados o ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆] – PM 329,17, > 98,5%) e o ferrocianeto de potássio tri hidratado (K₄[Fe(CN)₆]3H₂O – PM 422,27, > 98,5%) adquiridos da empresa Vetec, RJ. A anti-imunoglobulina humana (*anti-Human IgG*, cod.: I – 3382) e a imunoglobulina humana (IgG *human*, cod.: I – 5406) foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

As amostras de PE (substrato) originais e os copolímeros de enxerto (PE-e-HEMA) foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy attenuated total reflectance – ATR-FTIR*) em um espectrofômetro Perkin-Elmer modelo S 100 e microscopia eletrônica de varredura (MEV), em um microscópio Shimadzu modelo SS-550. As amostras para as micrografias do MEV foram recobertos com ouro em um equipamento *ION Coater* da Shimadzu. A análise da composição química das membranas foi realizada por espectroscopia de energia dispersiva por Raios X (*Scannig energy dispersive X-ray spectroscopy – SEDX*), acoplado ao MEV.

A análise térmica de calorimetria exploratória diferencial (*Differential scanning calorimetry – DSC*) utilizou um equipamento Shimadzu modelo DSC 60. A caracterização elétrica e resposta eletroquímica das membranas biossensores foram realizadas em uma fonte/multímetro Keithley modelo 2612 de dois canais.

Todos os equipamentos citados estão instalados no Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais Avançados da UNIFEI, campus de Itajubá. Nos subitens seguintes serão detalhadas as técnicas de caracterização utilizadas nesta dissertação de mestrado.

4.2. SÍNTESE DE COPOLÍMEROS COM TOPOLOGIA DO TIPO ESCOVA UTILIZANDO RAIOS GAMA

A síntese de polímeros utilizando a radiação ionizante apresenta algumas vantagens sobre as metodologias convencionais. Neste método ocorre a formação de radicais livres ou reações iônicas e não é necessário o aquecimento do sistema reacional nem a adição de catalisadores.

Os copolímeros de enxerto foram obtidos pela utilização da irradiação simultânea com fonte de cobalto 60 (^{60}Co) em um irradiador multipropósito do Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN) na cidade de São Paulo. A irradiação simultânea em fonte de ^{60}Co envolve a exposição de um substrato aos raios gama (γ) em presença de um monômero diluído em solvente. Durante a irradiação o monômero sofre polimerização pelos raios gama originando o homopolímero PHEMA e o copolímero de enxerto PE-e-PHEMA.

No processo de síntese foi utilizado como substrato o polietileno de baixa densidade (PE) ao qual foi enxertado o monômero hidrofílico HEMA (metacrilato de 2-hidroxietila).

Antes da síntese por radiação os filmes de PE originais (substrato) foram cortados em dimensões de 3x1,5cm, lavados com solução aquosa de detergente (15% v/v), enxaguados em água destilada e EtOH por 5 minutos e posteriormente secos em câmara de vácuo de -600 mmHg à temperatura ambiente de 25 °C por 12 horas. Após o tratamento cada membrana foi pesada em balança analítica da Shimadzu modelo AY 220, divisão de 0,1 mg e precisão de 1,0 mg.

As amostras secas dos filmes de PE foram colocadas em contato com HEMA e solvente em 5 ampolas de vidro. O monômero foi utilizado em duas concentrações, diluído a 20 e 40% v/v em etanol (EtOH). Cada ampola foi fechada em atmosfera de N₂ e levada à irradiação na fonte de ⁶⁰Co. A taxa de dose foi 6 kGy/h e as doses foram de 40 kGy.

Após a irradiação os filmes de copolímeros foram separados da solução ainda líquida do PHEMA e submetidos a um ciclo de lavagem e enxágue com a finalidade de retirar o homopolímero PHEMA aderido à membrana de copolímero PE-e-HEMA. A lavagem consistiu de imersão das membranas de copolímero PE-e-HEMA em água destilada, etanol e clorofórmio. A membrana foi imersa alternadamente em cada solvente por uma hora com tempo final de 6 horas. Em cada troca de solvente os resíduos de PHEMA aderidos ao copolímero foram manualmente removidos. Após a lavagem os filmes foram imersos em água destilada por 12 horas. No dia seguinte foram secos em câmara de vácuo de -600 mmHg à temperatura ambiente de 25°C.

O polímero PHEMA obtido paralelamente ao processo de enxertia das membranas foi submetido ao processo de rotoevaporação. As soluções das ampolas foram reunidas em dois balões volumétricos, respeitando as concentrações de 20 e 40% utilizadas na enxertia. As soluções de cada concentração foram rotoevaporadas em separado em um rotoevaporador Ika – RV 100 à temperatura de 60°C, 120 RPM por 2 horas. Em seguida foram colocados em placa de petri e secos à temperatura ambiente de 25°C.

4.3. ÂNGULO DE CONTATO E ENERGIA DE SUPERFÍCIE

4.3.1. Conceitos sobre o ângulo de contato

Um dos métodos mais sensíveis para se obter uma informação verdadeira a respeito de uma superfície sólida é a medida do ângulo de contato (158). Ele pode ser medido entre uma interface Sólido/Líquido/Vapor (S/L/V) ou Sólido/Líquido/Líquido (S/L/L). A medida do

ângulo de contato é utilizada frequentemente nas áreas de ciência e engenharia de superfícies (158).

Frequentemente a água é usada nas medidas de ângulo de contato devido a sua relevância para inúmeras funções no meio biológico. Entretanto, o uso de outros solventes pode proporcionar a determinação da energia de superfície de um substrato.

A técnica de ângulo de contato tem como base o equilíbrio no ponto de contato (S/L/V) ou (S/L/L). A termodinâmica de superfície é a mesma da tradicional, mas somente o termo do trabalho (dW) deverá ser substituído por (γdA) (158). O equilíbrio é considerado em termos da tensão de superfície (γ), expresso na Equação (4.1).

$$\gamma = \frac{dW}{dA} \quad (4.1)$$

Sendo que γ representa o trabalho necessário para criar uma unidade de área da nova superfície. Nos sistemas onde cargas elétricas estão presentes o trabalho elétrico deve ser incluído, usualmente representado pelo potencial eletroquímico (μ). As unidades de tensão de superfície podem ser expressas por [mJ/m^2] e [mN/m], ou seja, unidades de energia.

A adsorção é representada pela concentração de partículas na região interfacial, o que resulta em uma diminuição da energia livre na interface. A Equação de absorção de Gibbs (4.2) é uma Equação fundamental para química de superfície. Ela relaciona o excesso (ou deficiência) de componentes com a mudança na energia livre da superfície (158).

$$d\gamma(T) = - \sum \Gamma_i d\mu_i \quad (4.2)$$

Sendo ($\Gamma_i = N_i/A$) o excesso do componente i na superfície. Quando $\Gamma_i > 0$ existe adsorção e contrariamente quando $\Gamma_i < 0$ existirá a deficiência de componentes na superfície. A Equação (4.2) é em essência a Equação de Gibbs-Duhem da termodinâmica clássica aplicada para uma interface (158).

O trabalho de coesão (W_c) para formar a nova superfície poderá ser relacionado com a energia interfacial, como indicado pela Equação (4.3).

$$W_c = 2\gamma_A \quad (4.3)$$

Quando duas fases (A e B) estão em contato, haverá interação de aderência entre elas, chamado de trabalho de adesão (W_{AB}). A energia livre interfacial pode ser definida pela Equação (4.4).

$$\gamma_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - W_{AB} \quad (4.4)$$

Ou seja, o trabalho realizado para formar cada superfície, γ_A e γ_B , menos a interação mútua de adesão (W_{AB}) entre A e B.

Para duas fases idênticas:

$$\gamma_A = \gamma_B \quad e \quad W_{AB} = W_c$$

E a Equação (4.4) se reduz a (4.3).

$$0 = \gamma_A + \gamma_B - W_{AB} \quad \Rightarrow \quad W_c = 2\gamma_A$$

Assumindo, por exemplo, uma superfície sólida em um meio de vapor puro, as moléculas de vapor podem ser absorvidas na superfície.

No alto vácuo a energia livre de uma superfície sólida é representada por γ_S^0 . A mesma superfície após o equilíbrio com um vapor tem uma energia livre γ_{SV} . A diferença entre esses dois parâmetros é definida como pressão de espalhamento (π), indicada por (4.5).

$$\pi = \gamma_S^0 - \gamma_{SV} \quad (4.5)$$

Em um meio complexo uma variedade de interações pode ocorrer. Nesse caso existe uma hierarquia para a interação interfacial. Primeiramente serão adsorvidos os sais; em seguida os solventes polares e finalmente os não polares (158).

A interface entre três fases, não deformáveis e em equilíbrio: um sólido, um líquido e o vapor pode ser ilustrada como na Figura 4.1. A interface entre essas fases pode ser representada pelo triângulo de Neumann.

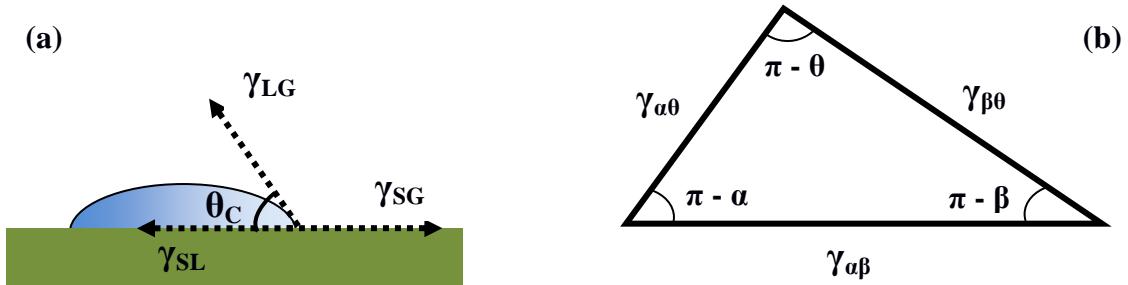


Figura 4.1: (a) Interface entre um sólido, um líquido e um gás. (b) Triângulo de Neumann que relaciona os componentes vetoriais das forças de interação na interface. Adaptado da Fonte: (158)

Das relações trigonométricas do triângulo de Neumann resulta a expressão (4.6).

$$\gamma_{\alpha\beta} = \gamma_{\alpha\theta} \cos\alpha + \gamma_{\beta\theta} \cos\beta \quad (4.6)$$

Substituindo as relações dos vetores para o caso de uma interface sólido, líquido e um gás teremos para as três fases em equilíbrio a Equação (4.7).

$$F(T, V, N) = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LV} \cos\theta \quad (4.7)$$

Sendo $F(T, V, N)$ a energia livre de Helmholtz, e γ as energias de interface sólido vapor (γ_{SV}); sólido líquido (γ_{SL}); líquido vapor (γ_{LV}). θ é o ângulo de contato de equilíbrio na junção entre as três fases. No equilíbrio a energia livre será nula ($F=0$), o que resulta na Equação de Young para o estado de equilíbrio expressa pela Equação (4.8).

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos\theta \quad (4.8)$$

A Equação de Young (4.8) é uma das equações fundamentais da físico-química de superfície. Na derivação da Equação está implícito que o sólido é suficientemente rígido e não sofre deformação. Esta hipótese não será válida para géis ou superfícies deformáveis. A Equação de Young é um caso especial da Equação (4.6) onde $\alpha + \beta = \pi = \theta$.

A Equação (4.8) é termodinamicamente válida considerando que as três fases estão em equilíbrio na interface de contato. Entretanto, como os polímeros apresentam um equilíbrio de sua estrutura que é dependente da temperatura e do meio em que se encontra. Então para medidas confiáveis do ângulo de contato esse parâmetro deverá ser constante.

Uma relação entre a medida do ângulo de contato e a energia de superfície pode ser feita se as seguintes condições forem atendidas (158):

- A superfície sólida deve ser rígida e não deformável. Módulo de elasticidade ($E > 0.035 \text{ MPa}$). Para o PE o módulo de elasticidade é de $0,172 - 0,282 \text{ GPa}$;
- A superfície sólida deve ser lisa. Estudos experimentais sugerem que devem apresentar rugosidade menor do que $0,1 \text{ mm}$, ou seja, aparência lisa a olho nu é geralmente satisfatória;
- A superfície deve ser sólida e homogênea;
- A superfície líquida deve possuir tensão bem conhecida e que permanece constante durante o experimento;
- O sólido não deve interagir com o líquido, ou seja, não deve inchar e nem desprender partículas;
- O sólido não deverá absorver o líquido ou o vapor;
- Os grupos de superfície no sólido não devem se reorientar ou reequilibrar em resposta a mudanças no meio líquido;

Entretanto, essas hipóteses podem ser intencionalmente controladas nas medidas de do ângulo de contato que busquem estudar a cinética de equilíbrio.

4.3.2. Tensão crítica de superfície por medidas de ângulo de contato

A medida da tensão crítica de superfície (γ_C) utiliza a técnica introduzida por Zisman e colaboradores (159) sendo um método muito usado para caracterizar superfícies de polímeros.

A tensão crítica (γ_c) é um parâmetro obtido através da medida do ângulo de contato (θ) de líquidos diferentes em uma mesma superfície. Um gráfico do $\cos\theta$ em função da tensão de superfície dos líquidos é construído. A projeção do intercepto da reta que melhor se ajusta aos pontos do gráfico e o $\cos\theta = 1,0$ fornece o valor de γ_c da superfície estudada. A Figura 4.2 ilustra o gráfico apresentado por Zisman para o polietileno (PE).

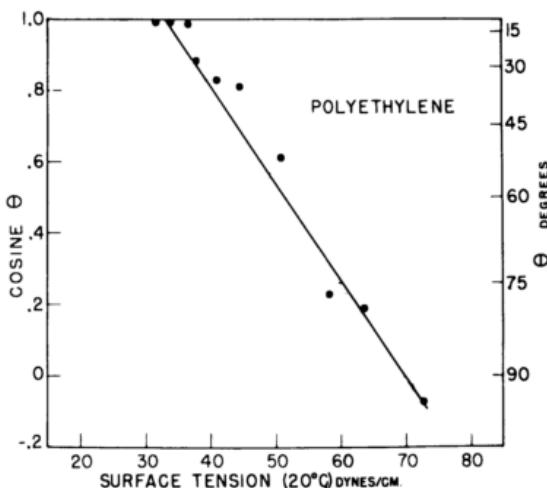


Figura 4.2: Gráfico para o polietileno apresentado no artigo original de Zisman. A projeção do intercepto entre a reta que melhor se ajusta aos dados experimentais e o $\cos\theta = 1,0$ fornece a tensão crítica de superfície ($\gamma_c \approx 31 \text{ mN/m}$) para o polietileno. Fonte: (159).

Embora álcool e água interajam com a superfície polimérica, o método é usual entre a comunidade de biomateriais, bem como em outras áreas onde o controle das propriedades de superfície é importante. Valores de γ_c para vários polímeros são tabulados no *Polymer Handbook* (160). O ângulo de contato é extremamente sensível às características da superfície sólida sendo uma técnica poderosa para investigação de superfícies de polímeros.

4.3.3. Procedimento experimental para medida de ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato (θ) têm sido amplamente utilizadas para avaliar as propriedades superficiais dos materiais, tais como, tensão superficial crítica, componentes dispersivas e polares da energia superficial livre, interações ácido-base na superfície, cristalinidade superficial, orientação superficial dos grupos funcionais, rugosidade superficial e molhabilidade (161).

Existem vários métodos para medir o ângulo de contato e diversos equipamentos comerciais disponíveis no mercado. Entretanto, a técnica de medição pode ser executada com

uma montagem experimental que inclui conjuntos de lentes, fonte de luz e anteparo. Esta abordagem é de fácil acesso e pode ser configurada em qualquer laboratório. Esta proposta foi introduzida por Galembeck (162) e os resultados concordam com aqueles obtidos através de equipamentos mais sofisticados.

Neste estudo as medidas do ângulo de contato nos polímeros de PE e de enxerto (PE-e-HEMA) seguiram o procedimento de projeção e de sombra proposto por Galembeck. Para o sistema de lentes e projeção foi utilizado um projetor comercial de slides fotográficos da marca Bikoh (*Japan*) modelo SL-811 35mm. A Figura 4.3 ilustra o sistema “*home made*” montado no laboratório.

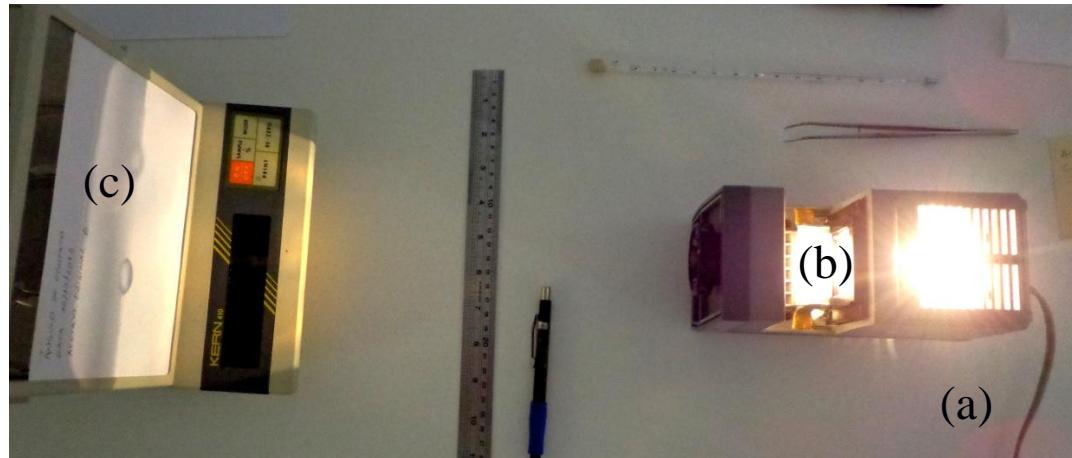


Figura 4.3: Sistema de medição do ângulo de contato “home made”:
(a) projetor; (b) porta amostra; (c) anteparo.

Durante o procedimento de medida as temperaturas do ambiente e na plataforma da amostra foram mantidas em 25 °C, em razão de os dados da tensão superficial dos líquidos puros (γ_L) serem encontrados tabelados nesta temperatura.

Foi depositada uma gota de 10 μL de solvente sobre a superfície sólida e as medidas das dimensões foram tomadas em seguida. A Figura 4.4 ilustra a imagem da gota projetada no anteparo e as marcações dos catetos do triângulo para o cálculo do ângulo de contato.

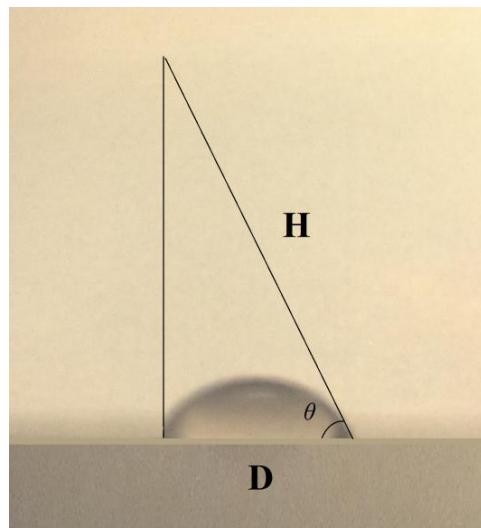


Figura 4.4: Medidas do ângulo de contato: gota de água sobre um filme de PE e projeção da sombra no anteparo. O ângulo é calculado pela medida dos catetos do triângulo retângulo traçado na no papel de projeção da imagem.

As medidas das dimensões dos catetos do triângulo foram realizadas com paquímetro da marca Digimess com goniômetro de dez divisões. A Equação (4.9) foi utilizada para o cálculo do ângulo.

$$\theta = \arccos \left(\frac{D}{H} \right) \quad (4.9)$$

Para o cálculo da energia de superfície pelo gráfico de Zisman foram utilizados cinco solventes em estado puro: água destilada, óleo de rícino, glicerol, *N,N*-dimetilformamida e dicloroetano com especificação definida no item 4.1 materiais, e utilizados como recebidos.

Os valores da tensão superficial de cada solvente (γ_L) utilizados para construção do gráfico de Zisman foram obtidos do *Handbook of Chemistry and Physics* (163). O programa *Origin 8.0* foi usado para traçar os gráficos de Zisman e determinar a tensão crítica da superfície (γ_c) dos filmes de PE e das membranas de PE-e-HEMA.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE POR FTIR

4.4.1. Procedimento de medida dos espectros de FTIR

A análise dos espectros de infravermelho por transformada de Fourier (*Infra red Fourier Transform – FTIR*) é uma técnica espectroscópica vibracional que avalia os grupos funcionais presentes nas amostras. Os espectros FTIR constituem a impressão digital de uma molécula. A comparação com os valores de uma biblioteca de frequências características de diferentes grupos funcionais possibilita obter informações sobre a composição e estrutura molecular da amostra.

Os ensaios de espectroscopia de infravermelho foram realizados no espectrofotômetro com transformada de Fourier (FTIR) no equipamento da Perkin Elmer série 100, instalado no laboratório de Biomateriais. A aquisição e manipulação dos espectros foram realizadas através dos programas (software) *Spectrum 100* instalado em um computador acoplado ao equipamento.

Os espectros FTIR dos filmes de PE e das membranas de copolímero PE-e-HEMA, assim como dos polímeros PHEMA foram obtidos diretamente das amostras sólidas no acessório universal de refletância total atenuada (*Universal – ATR*) do espectrofotômetro Perkin Elmer. A espectroscopia de reflectância total atenuada é uma técnica que permite a análise de amostras sem a necessidade da preparação tradicional. Todos os espectros foram obtidos à temperatura ambiente, com uma resolução de 4 cm^{-1} , no intervalo entre $650 - 4000\text{ cm}^{-1}$, e com uma acumulação de dezesseis varreduras.

4.4.2. Espectroscopia de refletância total atenuada

O acessório de refletância total atenuada (*Attenuated total reflectance - ATR*) elimina a necessidade de células de transmissão e pastilhas ao efetuar medições em materiais líquidos, semi-sólido e sólidos. A espectroscopia de ATR funciona especialmente bem para amostras opacas. A técnica fornece informações sobre as propriedades da superfície dos materiais e pode ser útil para análise qualitativa e medidas quantitativas (164).

A espectroscopia ATR utiliza o fenômeno da reflexão interna total. Um feixe de radiação passa através de um cristal e sofre reflexão interna total através dele. Uma pequena fração da radiação penetra a superfície da amostra posicionada na superfície do cristal. Parte da radiação é absorvida pela amostra, em consequência, há uma redução na intensidade do

feixe refletido. A Figura 4.5 ilustra a interface entre o cristal do acessório ATR e a amostra, assim como os feixes de radiação refletidos (164). A profundidade de penetração do feixe radiante por ATR é função do comprimento de onda, índice de refração do cristal e o ângulo de incidência do feixe.

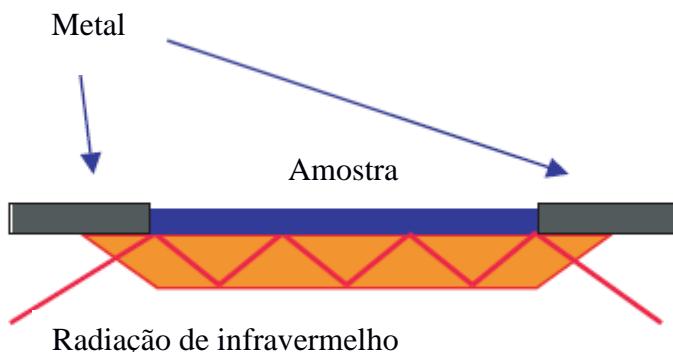


Figura 4.5: Acessório ATR: interface entre o cristal, a amostra e os feixes de radiação refletidos. Fonte: (164)

A radiação de penetração é chamada de onda evanescente. A onda evanescente criada se projeta apenas poucos micrômetros além da superfície do cristal. A profundidade de penetração da onda depende do material analisado. A onda evanescente formada decai rapidamente a partir de curtas distâncias (μm) da superfície do cristal. Por conseguinte, um bom contato entre o cristal e a amostra deve ser mantido durante a execução das medidas em ATR. Com frequência os accessórios ATR empregam um braço de pressão para manter o contato próximo entre a amostra e o cristal (164).

O acessório instalado no espectrofotômetro Perkin Elmer do laboratório de biomateriais utiliza um UATR universal (*Universal - ATR*). O UATR é um acessório versátil e ideal para análise de sólidos, líquidos, pastas e geles. O UATR emprega um cristal *DiCompTM*, que é composto por uma ATR de diamante com um elemento de seleneto de zinco (ZnSe) em contato direto com o diamante como ilustrado na Figura 4.6. Um elemento de foco fornece a interface óptica para a radiação infravermelha dos cristais. O cristal *DiComp* alia a dureza e a resistência química do diamante com o menor custo do ZnSe (164).

Ambos os componentes do *DiComp* ATR têm índice de refração semelhante. A radiação penetra a superfície da amostra em contato com o diamante por uma extremidade e por reflexões sucessivas emerge na outra face do cristal.

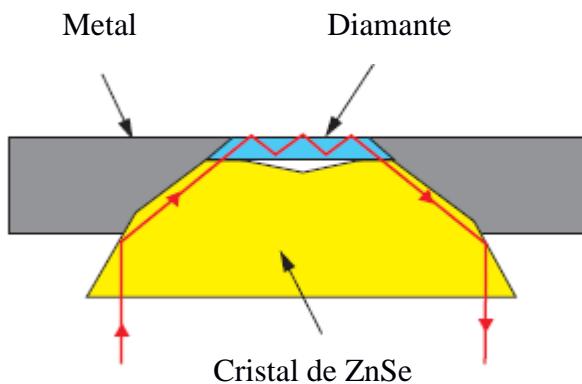


Figura 4.6: Esquema de um cristal DiCompTM, composto por um elemento de seleneto de zinco (ZnSe) em contato direto com o diamante. A amostra é colocada sobre o diamante. Fonte: (164)

A reflexão difusa é um processo complexo que ocorre quando um feixe de radiação atinge a superfície. Como a superfície de cada partícula da amostra está orientada aleatoriamente a radiação é refletida em todas as direções. Contudo, na maioria dos casos a intensidade da radiação refletida independe do ângulo de observação e a técnica ATR-FTIR é extremamente eficaz para obtenção de espectros vibracionais.

4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise morfológica para avaliação das modificações microestruturais da superfície dos filmes de PE e das membranas de copolímeros PE-e-HEMA foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias foram obtidas no microscópio eletrônico da Shimadzu modelo SS 550 com resolução máxima de 3,5 nm e magnificância de 20 a 300.000x e com aceleração do feixe de 0,5 a 30 KeV.

As amostras foram cobertas com uma fina película de ouro antes da análise, no equipamento *Ion Coater* da Shimadzu. As amostras do filme e membranas foram fixadas no suporte metálico do MEV com resina e todo conjunto foi metalizado por 10 minutos sob pressão reduzida de 15 Pa e corrente de 6 mA .

Neste estudo foram obtidas micrografias com magnificância de x3000 e x14000 dos filmes de PE e das membranas de PE-e-HEMA nas concentrações do monômero de 20 e 40%. Foram analisadas amostras das superfícies e do perfil das membranas.

Para as medidas do perfil foram cortados das membranas fragmentos de 1 mm de largura, os quais foram posicionados na posição perpendicular ao suporte. Este procedimento permitiu a visualização do perfil do enxerto e a medida precisa da sua espessura.

Com o objetivo de avaliar a constituição dos elementos químicos presentes nos filmes foi utilizado o acessório de microanálise de energia dispersiva por raios X (SEDX). Este acessório, acoplado ao MEV possibilita análise quantitativa dos elementos presentes nas amostras. No estudo dos copolímeros foram feitas varreduras das superfícies e dos perfis das amostras.

4.5.1. Microanálise de energia dispersiva por raios X (SEDX)

O acessório para microanálise por varredura dispersiva de Raios X (*Scanning energy dispersive X-ray analysis - SEDX*) é acoplado ao MEV. Ele detecta raios X característicos, emitidos de uma região microscópica da amostra quando bombardeada por um feixe de elétrons. As linhas de raios X especificam o número atômico da amostra e o seu comprimento de onda pode ser utilizado para identificar o elemento que emite a radiação (165).

O feixe de elétrons produzido pelo MEV é suficientemente energético para ionizar camadas profundas dos átomos e produzir a emissão de raios X. A resolução espacial da análise depende da energia de raios X detectada e da natureza do material. Entretanto, a análise SEDX não é capaz de detectar o elemento H devido a sua baixa energia da transição. A Figura 4.7 ilustra, de forma esquematizada, o processo de excitação de elétrons para produção de raios X.

A técnica de SEDX considera o princípio de que a energia de um fóton (E) está relacionada com a freqüência eletromagnética (ν) pela relação $E = h\nu$, onde h é a constante de Planck. Fótons com energias correspondentes a todo espectro de raios X atingem o detector de raios X quase que simultaneamente, e o processo de medida é rápido, o que permite analisar os comprimentos de onda de modo simultâneo.

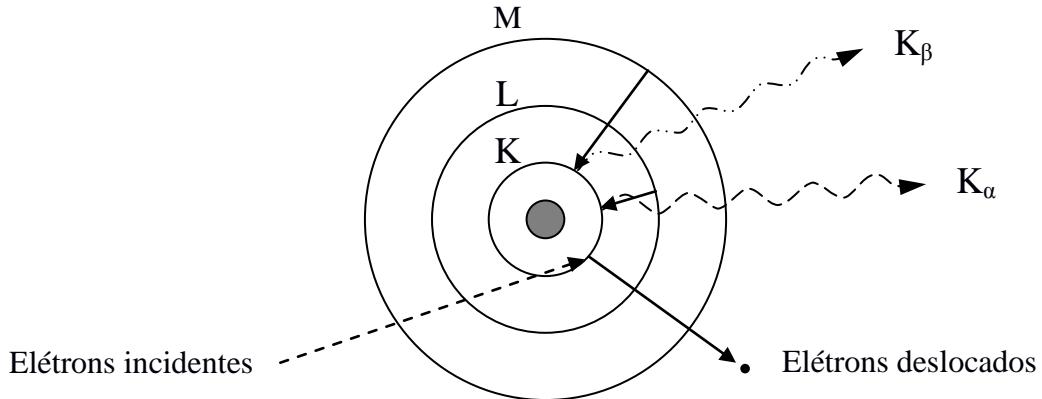


Figura 4.7: Processo de excitação de elétrons e emissão de Raios X. Adaptado da Fonte: (165)

Através da análise dos picos obtidos no espectro podem ser determinados os elementos presentes na amostra. O esquema do detector utilizado para captação dos raios X na técnica de espectroscopia por dispersão de energia (SEDX) é mostrado na Figura 4.8.

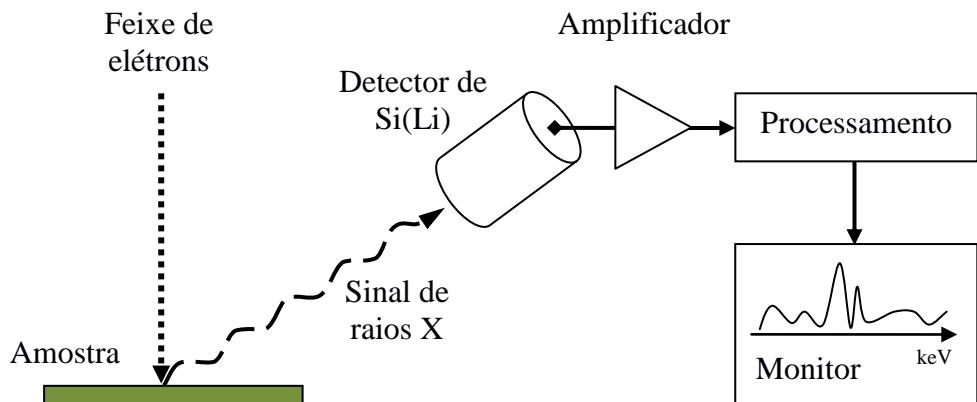


Figura 4.8: Esquema de detecção pela técnica SEDX. Adaptado da Fonte: (165).

O programa computacional ligado ao detector determina a energia dos fôtons recebidos e traça gráficos com a abscissa sendo a energia dos fôtons (keV) e a ordenada o número de fôtons recebidos (contagens). O tempo necessário para adquirir o espectro de boa qualidade fica em torno de 2 minutos. A interpretação dos espectros é facilitada por uma base de dados que contém, para cada elemento, as energias e a intensidade das raias que as produziu. É possível localizar, para cada energia do espectro, a lista dos elementos que possuem uma raya neste domínio energético (165).

4.6. CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

A análise térmica estuda as propriedades dos materiais em função da temperatura. Quando um material é submetido a um grande intervalo de temperatura pode sofrer alterações físicas ou químicas, as quais são acompanhadas pela perda ou absorção de energia sob a forma de calor. Podem ainda observar-se variações da condutibilidade elétrica ou termomecânica dos materiais (166).

A análise térmica possibilita a caracterização qualitativa e quantitativa, num intervalo de temperatura pré-definido sob rigorosos regimes de aquecimento e resfriamento, com um consumo mínimo da amostra ($0,1 \mu\text{g} - 10 \text{ mg}$). A sua eficiência e produtividade tornou-a uma ferramenta fundamental nos estudos das temperaturas de transição de fase e de caracterização da decomposição de materiais poliméricos para uso na medicina (167).

Utilizando uma amostra de referência, termicamente inerte ou com elevado ponto de fusão, a técnica de calorimetria exploratória diferencial (*Differential scanning calorimetry – DSC*) registra a variação da temperatura da amostra relativamente à de referência, enquanto ambas são submetidas a um programa de aquecimento.

Sempre que a amostra absorve calor haverá um pico endotérmico. Em polímeros esse pico endotérmico pode ocorrer na temperatura de transição vítreia (*glass temperature – T_g*) ou também na temperatura de fusão (*melt temperature – T_M*), neste último caso associada à entalpia de fusão (ΔH_M).

A entalpia de fusão do polímero está relacionada com a energia necessária para quebrar as ligações intermoleculares, e pode ser usada para avaliar a sua cristalinidade. Assim, polímeros mais cristalinos, possuem ligações intermoleculares mais fortes e em maior número. Portanto, temperaturas e entalpias de fusão mais elevadas (168).

A determinação da temperatura de fusão e respectiva entalpia específica das diferentes amostras analisadas, polímero original PE e copolímeros PE-e-HEMA, foi realizada num equipamento da Shimadzu modelo DSC 60. As amostras, de peso compreendido entre 3 e 5 mg foram seladas hermeticamente em cápsulas de alumínio à temperatura ambiente de 25°C . A taxa de aquecimento foi de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ varrendo de -60 a 180°C . Como material de referência na plataforma de aquecimento do DSC foi utilizado uma cápsula de alumínio vazia, selada hermeticamente.

4.7. ROTA DE SÍNTESE DA MEMBRANA DE PE-E-HEMA E IMOBILIZAÇÃO DE ANTI-IgG

Como preparação prévia para a imobilização de anti-imunoglobulinas (anti-IgG) as membranas de copolímero de PE-e-HEMA receberam imobilização de sais de Ferricianeto ($K_3[Fe(CN)_6]$) e Ferrocianeto de potássio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6]3H_2O$), ambos na concentração de 10 mM, preparados em solução tampão de PBS pH 7,4. Esta combinação resulta no composto de coordenação Azul da Prússia. A função da adsorção prévia do Azul da Prússia é a de aumentar a condutividade da superfície das membranas.

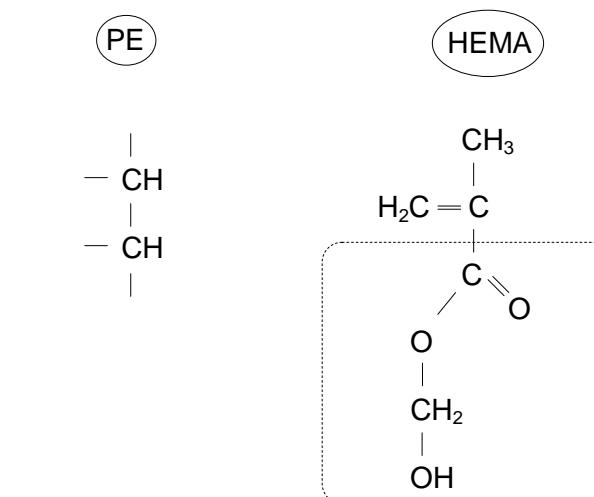
A imobilização do composto de coordenação Azul da Prússia foi feita por adsorção física. Os filmes modificados PE-e-HEMA foram imersos na solução por 120 minutos. Para estabelecer o tempo de adsorção foram feitas adsorções entre 10s e 6 horas e nenhuma mudança significativa na condutividade das membranas foi observada para adsorções com tempo de imersão superior a 120s.

Finalmente foi efetuada a imobilização de anti-IgG sobre o copolímero de PE-e-HEMA. A imobilização da anti-IgG seguiu o mesmo procedimento utilizado para adsorção dos sais de Ferro. A anti-IgG humana foi preparada em solução tampão PBS pH 7,4 na titulação de 10 mg/mL. A titulação foi escolhida considerando o critério de afinidade do antígeno-anticorpo desenvolvido por Becker (169).

Para as medidas de resposta elétrica foram preparadas imunoglobulinas IgG humana com concentrações de 2, 7, 16 e 32 mg/mL em solução de PBS pH 7,4. Essas concentrações cobrem toda a faixa do nível normal de IgG no sangue humano que variam de 7 a 12 mg/mL. Valores de IgG acima de 16 mg/mL caracterizam uma resposta imunológica para infecções (170,171).

Após a descrição de todas as técnicas de síntese e caracterização empregada no desenvolvimento deste estudo será apresentada a sequência do processo de construção dos copolímeros PE-e-HEMA com topologia escova.

A rota completa de construção das membranas seguiu quatro passos. A primeira etapa consistiu na síntese dos copolímeros através da radiação por raios gama. Em seguida, os copolímeros foram submetidos a um processo de lavagem e secagem. A terceira etapa consistiu da imobilização dos sais de ferro. Finalmente foram adsorvidas na superfície porosa das membranas a anti-IgG humana. A Figura 4.9 ilustra as etapas da geração das membranas biossensores chamados de sistema (PE-e-HEMA – $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$ – anti-IgG).



PE: Polietileno (substrato)

HEMA: metacrilato de 2-Hidroxietila
(monômero)

EtOH: Solução em etanol

① ↓ Radiação



Fonte: ^{60}Co $\left\{ \begin{array}{l} 1\text{kGy por ciclo} \\ \text{Capacidade :} 4,3 \text{ m}^3 \end{array} \right.$

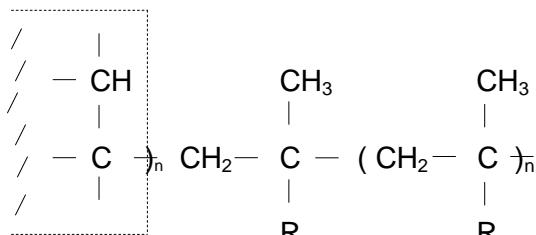
Dose: 40 kGy (40 kJ/Kg)

Tempo de exposição: 6h

Taxa dose: 6,0 kGy/h

$$\lambda_{\text{R}}\gamma \approx 10^{-11} \text{ m}$$

② ↓ Copolímero

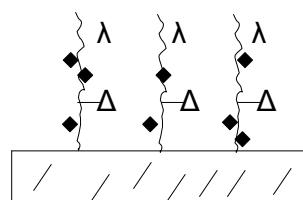


Lavagem em solventes

Remoção do poli(HEMA)

Secagem a temperatura de 25°C

③ ↓ ④ Imobilização de Azul da Prússia e anti-IgG



Δ - Anti IgG

\blacklozenge - Azul da Prússia

λ - Imunoglobulinas IgG humana

Figura 4.9: Rota de síntese do sistema (PE-e-HEMA – $[\text{Fe}^{+3}|\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG).

4.8. MEDIDAS ELÉTRICAS EM CORRENTE CONTÍNUA

Os filmes de PE-e-HEMA desenvolvidos neste estudo tem por finalidade a aplicação em biossensores. Assim, a membrana transdutora deverá ser ligada a contatos elétricos e disposto em uma fita de teste acoplável a dispositivos eletrônicos. Deste modo, a membrana poderá atuar como um transdutor para aquisição de sinal eletroquímico. A Figura 4.10 ilustra a configuração prevista para o uso das membranas de PE-e-HEMA.

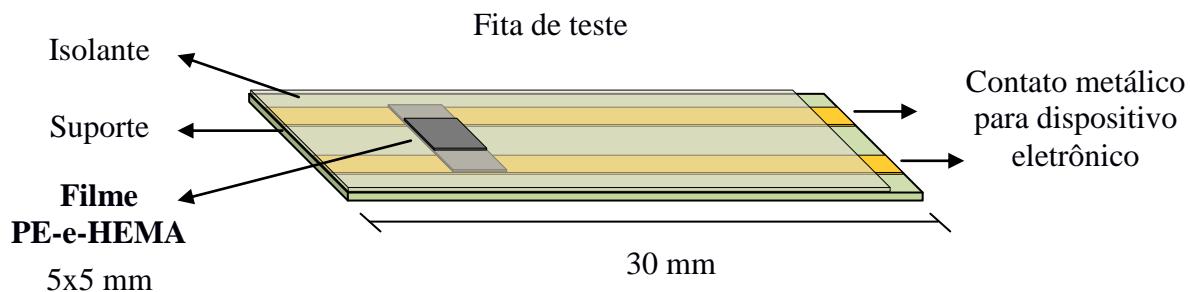


Figura 4.10: Configuração prevista para as lâminas de teste utilizando membranas de PE-e-HEMA.

Tendo em vista que a maior parte dos circuitos eletrônicos baseados na tecnologia do Si utiliza corrente contínua para operação, todos os ensaios de caracterização elétrica foram realizados em regime de corrente contínua com um multímetro-fonte (*Source meter*) Keithley. Todas as medidas foram realizadas à temperatura de 25ºC no laboratório de biomateriais.

Um multímetro-fonte marca Keithley modelo 2612 de dois canais foi conectado aos filmes PE e membranas de PE-e-HEMA na configuração de dois pontos. Foram usados para conexão cabos coaxiais com terminais de garras planas. Os filmes foram cortados em dimensões de 10x10 mm e a conexão com a garra foi realizada em toda lateral da membrana, como ilustra a Figura 4.11.

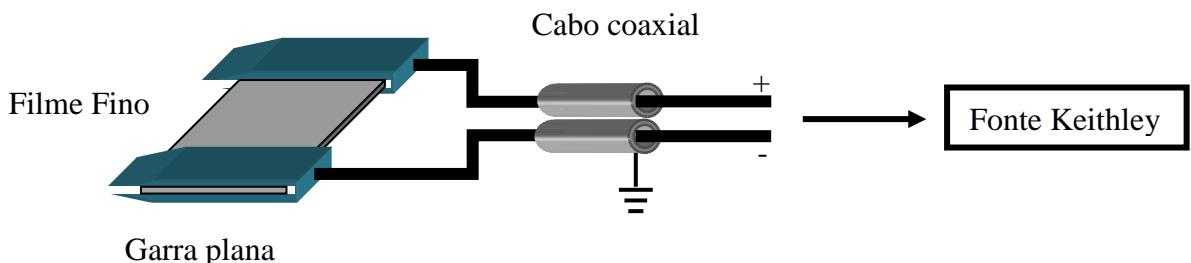


Figura 4.11: Esquema de conexão das membranas com o multímetro utilizado nas medidas elétricas.

Foram feitas medidas de corrente em função da tensão aplicada no regime de rampa linear na faixa de 0 a 5V cc. Também foi utilizado um potencial constante de 3V para determinação de variações da corrente em função de concentrações de imunoglobulinas IgG. Todas as medidas elétricas foram realizadas com repetição mínima de três vezes para assegurar a reproduzibilidade das medidas dentro da margem de erro experimental.

Uma caixa com isolamento metálico, ilustrada na Figura 4.12, foi confeccionada com a função de proteger a membrana de radiações eletromagnéticas durante as medidas. Desta forma, a resposta das membranas transdutoras foi exclusivamente devida às reações bioquímicas em sua superfície.

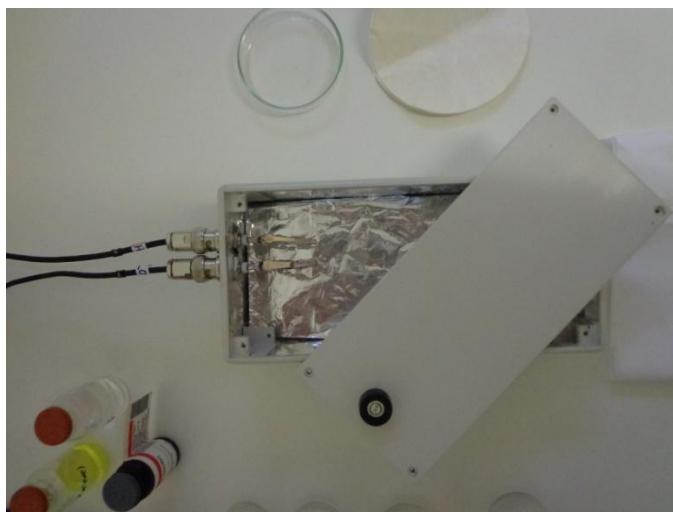


Figura 4.12: Caixa metálica usada para isolamento eletromagnético das membranas durante as medidas de caracterização elétrica.

Os filmes de PE originais e as membranas PE-e-HEMA com 20 e 40% do monômero foram caracterizadas eletricamente no regime seco, no regime úmido em soluções de PBS pH 7.4 e em soluções de PBS contendo concentrações de imunoglobulinas IgG (2 a 32 mg/mL). No regime úmido, após cada imersão de 120s em solução, a membrana foi seca em papel de filtro utilizando a técnica do “mata-borrão”. Para a resposta de corrente em função da concentração de IgG foi usada uma mesma membrana PE-e-HEMA. Entre cada medida de concentração distinta a membrana foi lavada em solução de PBS. Após cada lavagem uma medida de prova foi realizada com a membrana umedecida somente em solução de PBS. Este procedimento foi adotado para verificar a existência de um fator acumulativo nas medidas das concentrações de IgG.

CAPÍTULO 5 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

A enxertia do HEMA na superfície do PE gerou mudanças significativas nas propriedades físico-químicas do polímero original como avaliadas através da medida do ângulo de contato. Para os filmes de PE, obteve-se um ângulo de contato igual a $66,43^\circ$ para o solvente água. A Tabela 5.1 relaciona os ângulos de contato dos cinco solventes utilizados para determinação da energia de superfície dos filmes de PE original.

Tabela 5.1: Ângulo de contato para solventes sobre a superfície dos filmes de PE original.

Solvente	Ângulo de contato θ (graus) a 25 °C	$\cos \theta$	Energia de superfície do solvente γ_L (10^{-3} N/m) a 25 °C
Água	$66,43 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	72,0
Óleo de rícino	$18,27 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,03$	54,9
Glicerol	$61,29 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,01$	64,0
Dimetilformamida	$25,92 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,02$	36,0
Dicloroetano	0,00	1	32,0

γ_L : valores consultados na Fonte (163).

O gráfico de Zisman para o cálculo da tensão superficial do filme de PE original é mostrado na Figura 5.1. O ângulo de contato nulo expresso por $\cos\theta=1$ representa a total absorção do solvente pelo filme.

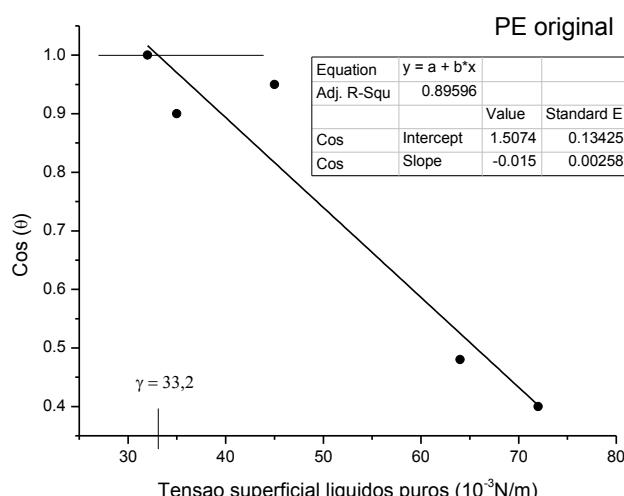


Figura 5.1: Gráfico de Zisman para o PE: a projeção do intercepto da reta ligando os valores do ângulo de contato para cada solvente e o $\cos\theta=1$ fornece a energia superficial para o PE ($\gamma = 33,2$ mN/m).

A tensão superficial obtida para o filme de PE original ($\gamma = 33,20 \pm 0,10$) mN/m apresentou uma diferença de menos de 3,4% do valor encontrado na literatura para o polietileno de ($\gamma = 31,0$ mN/m) (159). O que demonstra a eficácia do método “*home made*” configurado no laboratório de biomateriais. Os gráficos de Zisman para dos copolímeros de PE-e-HEMA são ilustrados na Figura 5.2.

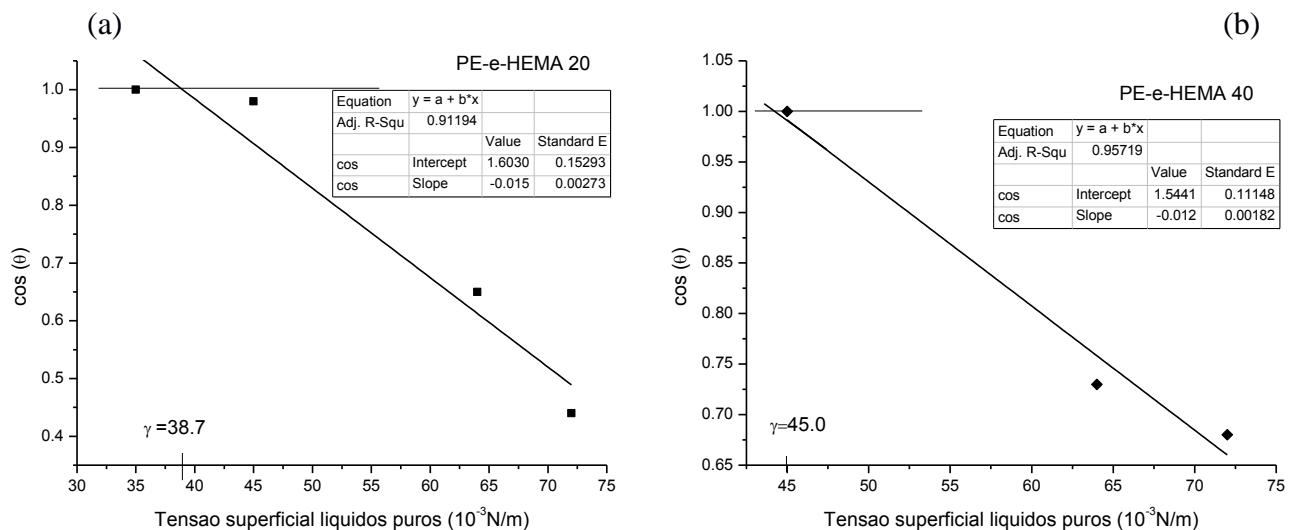


Figura 5.2: Gráficos de Zisman para os copolímeros PE-e-HEMA: (a) concentração de 20% e (b) 40%.

As membranas de PE-e-HEMA apresentaram um aumento na tensão superficial em relação ao filme original de PE, como mostrado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Ângulo de contato para a água sobre a superfície do filmes de PE e membranas de PE-e-HEMA.

Amostra	Ângulo de contato θ para água (graus) a 25 °C	Energia de superfície γ_{PE} ($10^{-3}N/m$) a 25 °C
PE original	$66,43 \pm 0,01$	$33,20 \pm 0,10$
PE-e-HEMA 20	$63,82 \pm 0,02$	$34,76 \pm 0,06$
PE-e-HEMA 40	$47,09 \pm 0,01$	$45,0 \pm 0,06$

Como pode ser observado, o ângulo de contato diminuiu, à medida que o porcentual de enxertia aumentou, demonstrando que um alto percentual de enxertia tornou a superfície do PE mais hidrofílica. Este efeito se deve ao monômero HEMA um polímero com característica hidrofílica. Alguns grupos contendo oxigênio presentes no HEMA são

introduzidos na superfície, aumentando consequentemente sua energia superficial e melhorando sua molhabilidade, devido à formação de grupos hidrofílicos.

O comportamento hidrofílico medido pelo ângulo de contato com a água acompanhou o aumento da tensão superficial das membranas de PE com a enxertia do HEMA, ilustrado na Figura 5.3.

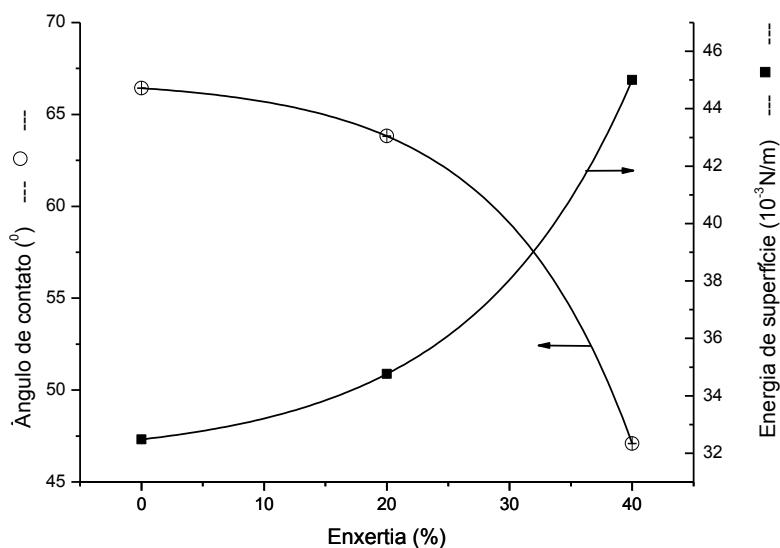
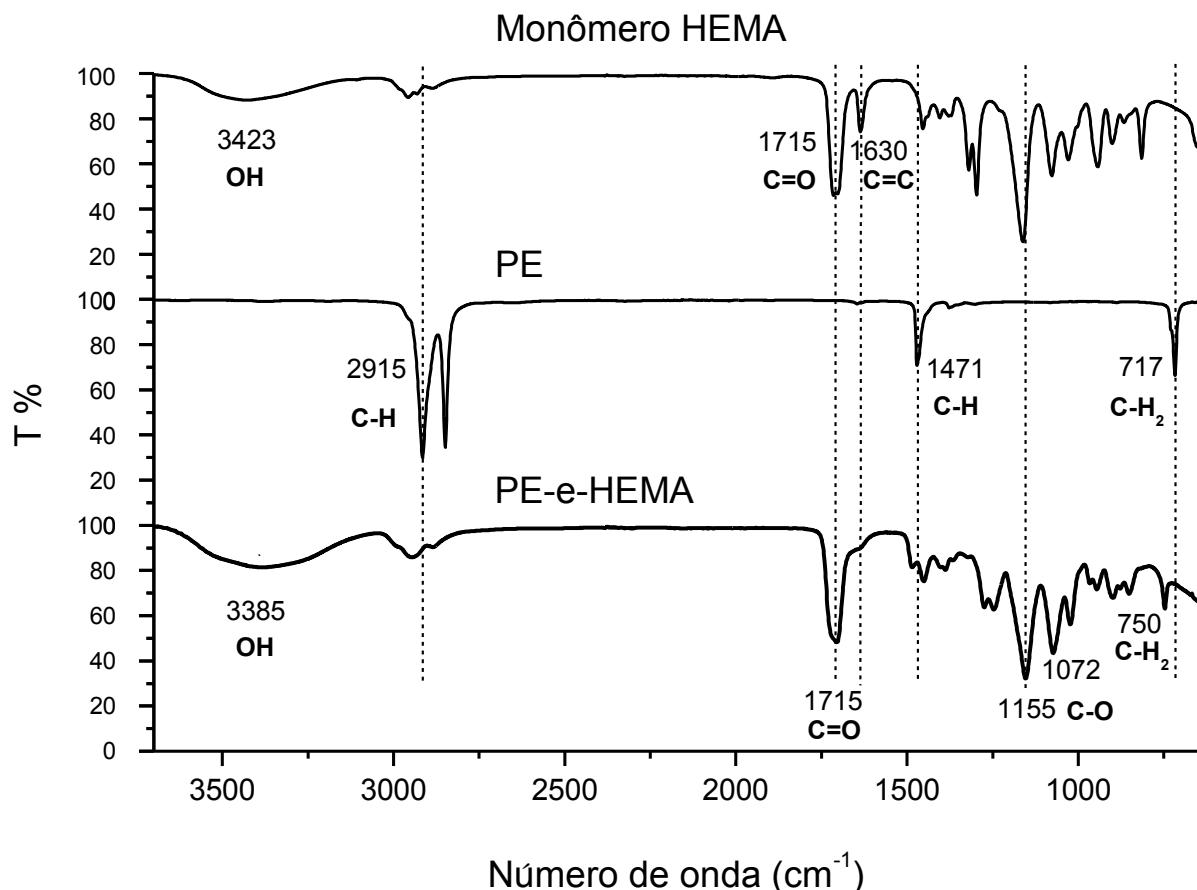


Figura 5.3: Variação no ângulo de contato e energia livre de superfície em função do percentual de enxertia do monômero HEMA nas superfícies de PE sintetizados neste estudo.

5.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)

A análise por FTIR nos filmes de PE original e nas membranas de copolímero de PE-e-HEMA preparados neste estudo, baseou-se na identificação das principais bandas de absorção vibracional associadas aos grupos funcionais presentes nas moléculas.

Na Figura 5.4 é ilustrado o espectro FTIR do PE original, das membranas de copolímero PE-e-PHEMA de 20% e do monômero HEMA. No espectro do PE original aparecem as principais bandas de absorção vibracional do polietileno. A primeira próxima dos 2900 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico da ligação C–H e a segunda em 1471 cm^{-1} referente à deformação angular também da ligação C–H. Essas bandas são características dos alcanos (hidrocarboneto saturado com ligações simples). Uma banda única é observada na região dos 717 cm^{-1} , associado ao movimento de rotação (*rocking*) do $-\text{CH}_2$ caracterizando a amostra como um polietileno amorfo. Não existe nesta região a formação de um duplet que seria indicativo da presença das regiões de maior cristalinidade no PE (172).



.Figura 5.4: Espectros de FTIR obtidos do monômero HEMA, dos filmes de PE e das membranas de copolímero PE-e-HEMA 20.

A tabela 5.3 relaciona as principais bandas de absorção vibracional no monômero HEMA e na membrana de PE-e-HEMA, características dos polímeros metacrílicos.

Tabela 5.3: Bandas de absorção vibracional no monômero HEMA e na membrana de PE-e-HEMA.

Ligação	Absorção (cm ⁻¹)	Característica
-CH ₂	750	rotação
C—O	1155	estiramento
C—O	1072	estiramento
C=C	1630	estiramento
C=O	1715	estiramento do grupo carbonila
O—H	3600-3200	ligações de hidrogênio

Fonte: (172)

No monômero HEMA as bandas presentes nas regiões de 3423cm^{-1} e 1715cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos grupos –OH e C=O. Estas bandas também podem ocorrer devido às ligações entre os grupos hidroxila do HEMA enxertado e moléculas de água absorvidas da atmosfera, no momento da análise (172).

Na membrana de copolímero de enxerto PE-e-HEMA observa-se o desaparecimento da banda de 717 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$) presente no PE e da banda de 1630 cm^{-1} (C=C) presente no monômero HEMA. A ausência destas bandas evidencia o efeito da radiação γ e do enxerto do HEMA no substrato de PE. As outras duas bandas do PE estão presentes na membrana de copolímero PE-e-HEMA, porém, aparecem com a intensidade de transmitância reduzida e um pequeno deslocamento para a esquerda.

5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As superfícies do filme de PE e das membranas de copolímero PE-e-HEMA foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observa-se o aparecimento de rugosidade na superfície da matriz de PE após o processo de enxertia do HEMA. Observa-se também no PE-e-HEMA um grande número de poros ao contrário daquela observada no polímero base com uma superfície completamente lisa, ilustradas na Figura 5.5.

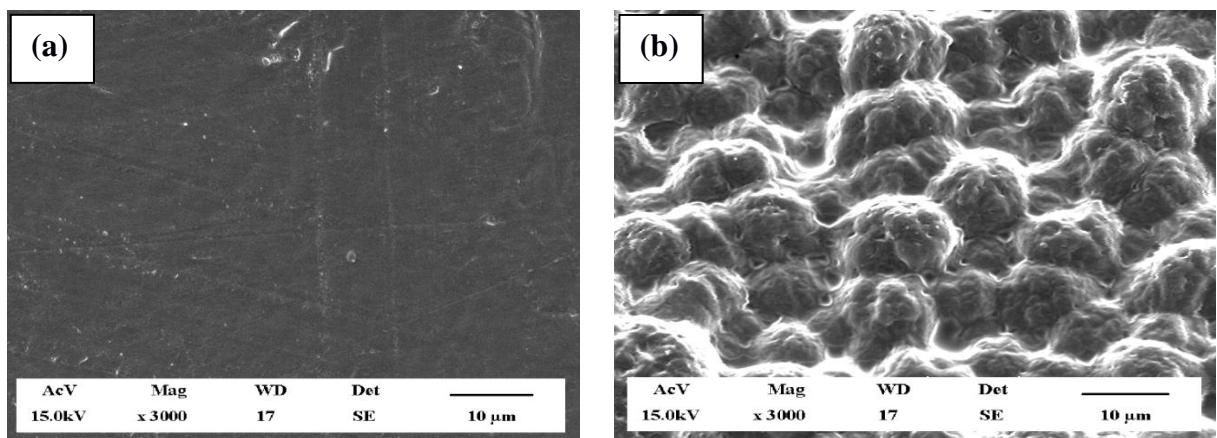


Figura 5.5: Micrografias da superfície dos filmes de PE original (a), e das membranas de copolímero PE-e-HEMA (b) na concentração de 20% de monômero.

A superfície rugosa das membranas de copolímero PE-e-HEMA sintetizadas neste estudo apresentaram topografia bastante uniforme e regular. Estes resultados se diferenciam daqueles encontrados na literatura para o PE-e-HEMA (173,174) em que a superfície apresenta estados de agregação dispersos e com porosidade desuniforme.

Na copolimerização por raios gama utilizando a concentração de 20 % do monômero observa-se uma tendência da projeção dos conjuntos de cadeias na direção normal à superfície como pode ser vista na Figura 5.5 (b). Entretanto, nas membranas com a concentração de 40% esta projeção não foi tão significativa, como ilustra a Figura 5.6 (b).

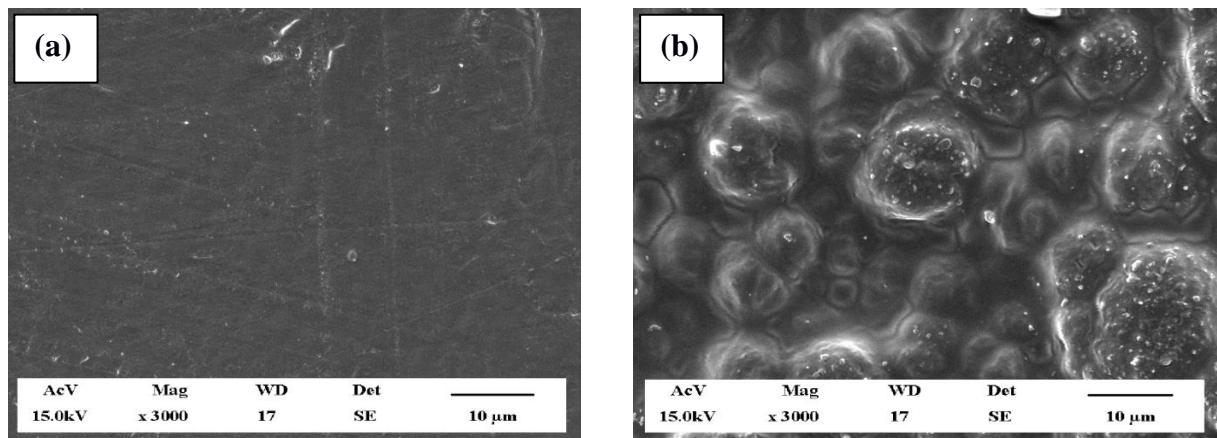


Figura 5.6: Micrografias da superfície dos filmes de PE original (a), e das membranas de copolímero PE-e-HEMA (b) na concentração de 40% de monômero.

O efeito da projeção dos conjuntos de cadeias pode ser melhor visualizado nas micrografias de perfil. A Figura 5.7 ilustra o perfil do filme de PE original e das membranas de copolímero PE-e-HEMA na concentração de 20% do monômero. Para a realização destas micrografias o filme de PE e as membranas de PE-e-HEMA foram cortadas com lâmina à temperatura ambiente de 25 °C.

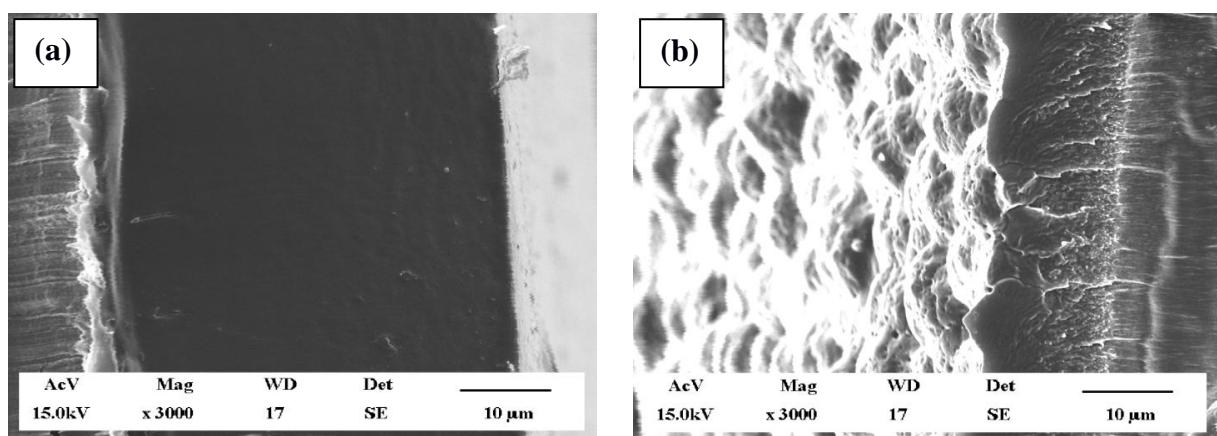


Figura 5.7: Micrografias do perfil do filmes de PE original (a), e das membranas de copolímero PE-e-HEMA (b) na concentração de 20% de monômero.

Nas micrografias de perfil das membranas de copolímero PE-e-HEMA (Figuras 5.7 b e 5.8 b) fica mais nítida a projeção do conjunto de cadeias na direção normal ao substrato com a formação de semi-esferas. Também pode ser observada a formação de porosidade. A distribuição desses poros é uniforme nas semi-esferas. Esta formação pode vir a ser benéfica para a imobilização de biomoléculas na superfície da membrana, contribuindo para um melhor desempenho do dispositivo biossensor a ser projetado.

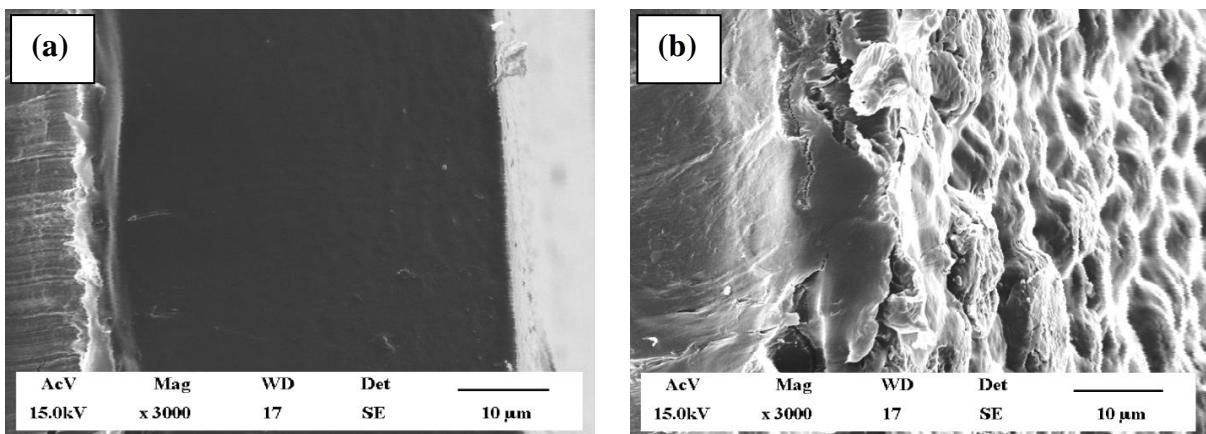


Figura 5.8: Micrografias do perfil do filmes de PE original (a), e das membranas de copolímero PE-e-HEMA (b) na concentração de 40% do monômero.

Nas micrografias da Figura 5.9 o perfil das membranas com aumento de 14.000x é possível identificar a formação semi-esférica do conjunto de cadeias e a distribuição de poros. A membrana de copolímero PE-e-HEMA 20 apresentou maior número de poros do que o PE-e-HEMA 40. Contudo, o diâmetro dos poros foi maior no PE-e-HEMA 40.

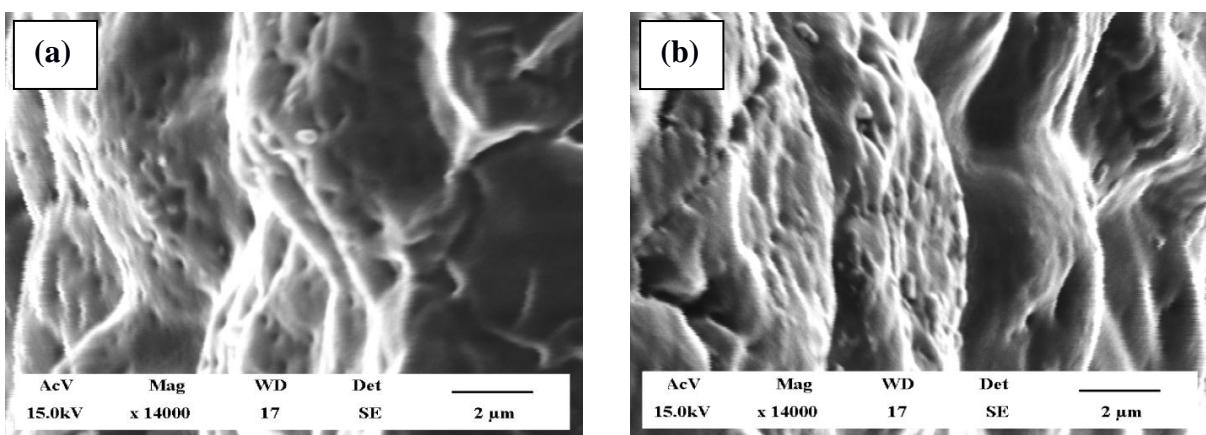


Figura 5.9: Micrografias do perfil da membranas de copolímeros: (a) PE-e-PHEMA 20 e (b) PE-e-HEMA 40.

O aparecimento da projeção dos conjuntos de cadeias pode ser devido a efeitos de tensão superficial surgida no processo de enxertia. Entretanto, esta observação só poderá ser confirmada por outras técnicas de análise como a absorção de raios X em baixo ângulo (NEXAFS), não utilizada neste estudo.

5.4.1. Análise de energia dispersiva por raios X (SEDX)

A Figura 5.10 mostra o espectro SEDX da membrana de PE-e-PHEMA 20 e do filme de PE original. Para melhor visualização dos gráficos foram suprimidos os picos correspondentes ao elemento Au utilizado na metalização das amostras.

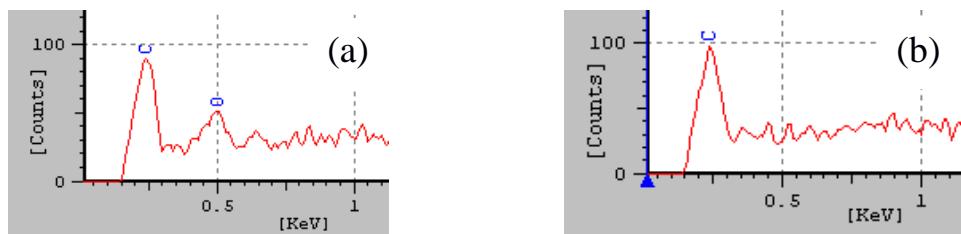


Figura 5.10: Espectros SEDX das membranas de copolímero PE-e-HEMA 20 (a) e PE original (b)

O que diferencia os dois espectros da microanálise é o aparecimento do elemento oxigênio na membrana de copolímero PE-e-HEMA, inexistente no PE original. O mesmo padrão do espectro SEDX é revelado na membrana de copolímero PE-e-HEMA 40 e ilustrado na Figura 5.11

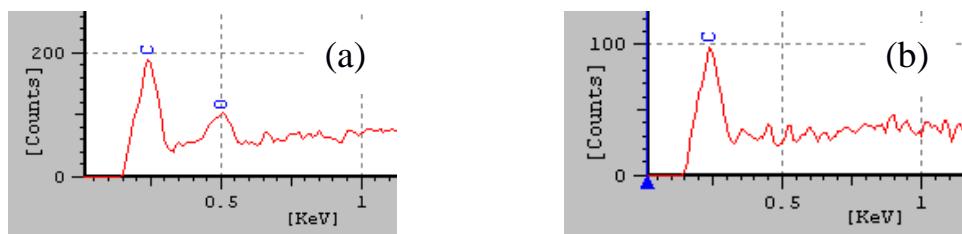


Figura 5.11: Espectros SEDX das membranas de copolímero PE-e-PHEMA 40 (a) e PE original (b).

A análise SEDX fornece o cálculo quantitativo de cada elemento em porcentagem de peso (W%). A tabela 5.4 relaciona o percentual relativo para os elementos químicos obtida pela análise SEDX presentes nos filmes de PE, de nas membranas de PE-e-HEMA .

Tabela 5.4: Composição química dos filmes de PE e das membranas de PE-e-HEMA obtida por análise de energia dispersiva (EDX) no microscópio eletrônico de varredura.

Amostra	Carbono C W%	Oxigênio O W%	Ouro Au W%
PE original	20,31	-	79,69
PE-e-HEMA 20	9,50	8,93	81,57
PE-e-HEMA 40	18,60	20,51	60,89

5.5. ANÁLISE TÉRMICA POR DSC

O comportamento térmico das amostras de polímero original PE, e copolímeros PE-e-HEMA caracterizado através da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), permitiu avaliar a estabilidade estrutural das membranas poliméricas.

As membranas de PE-e-HEMA sintetizadas neste estudo apresentaram esta estabilidade estrutural como ilustrado nos termogramas das Figuras 5.13 e 5.14, comparativas com o termograma do substrato de PE ilustrado na Figura 5.12.

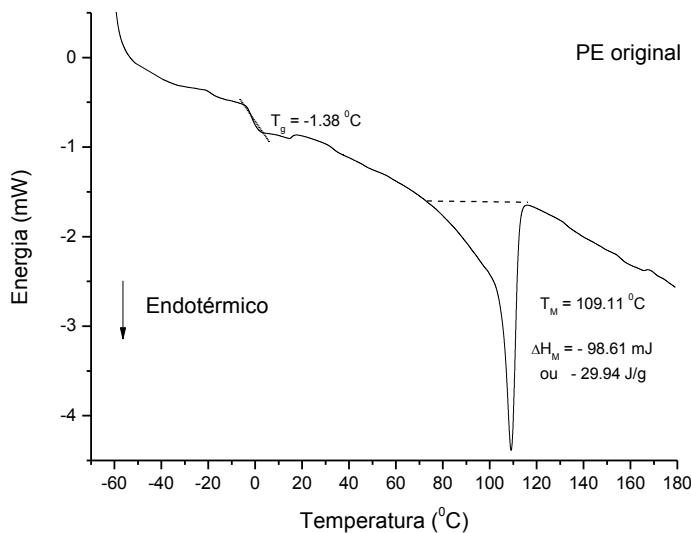


Figura 5.12: Termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filme de PE original.

A temperatura de transição vítreia (T_g) manifesta no termograma DSC como um salto de capacidade calorífica, produzindo um degrau na linha da energia em função da temperatura. Abaixo desta temperatura os movimentos moleculares são reduzidos e o polímero adquire o estado sólido rígido. Outro parâmetro térmico importante é a temperatura

de fusão (T_f), caracterizada pelo estado molecular desordenado. A temperatura de transição vítreia e a temperatura de fusão definem o limite térmico inferior e superior de estabilidade mecânica. A Figura 5.13 ilustra o termograma de DSC para a membrana de PE-e-HEMA 40.

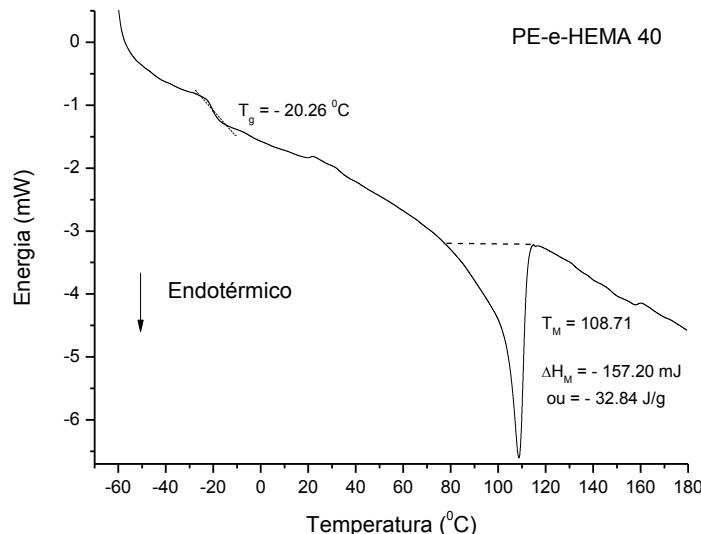


Figura 5.13: Termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da membrana de PE-e-HEMA40.

O aumento na entalpia de fusão (ΔH_M) observada nos novos copolímeros PE-e-HEMA indica que houve uma maior organização estrutural devido às ligações entre a matriz do PE e o HEMA. Entretanto, praticamente não ocorreu diferença na temperatura de fusão de 109,11 entre o filme original PE e as membranas de copolímeros.

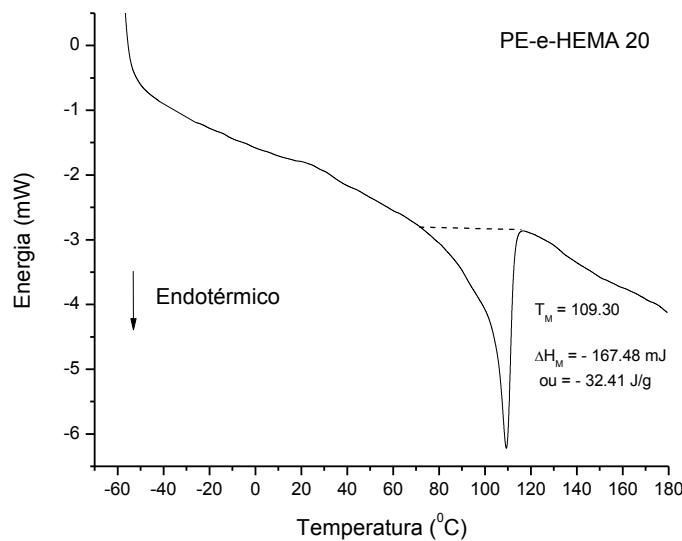


Figura 5.14: Termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) da membrana de PE-e-HEMA 20.

Os parâmetros do comportamento térmico do polímero calculados nos termograma de DSC como temperaturas de transição vítreo (T_g), temperatura de fusão (T_M) e entalpia de fusão (ΔH_M) estão apresentado na tabela 5.5.

Tabela 5.5: Parâmetros térmicos do filme de PE original e membranas PE-e-HEMA 20 e 40.

Amostra	$T_g(^{\circ}\text{C})$	$T_M(^{\circ}\text{C})$	$m\text{J}$	ΔH_M J/g
PE	-1.38	109,11	- 98,61	-29,94
PE-e-HEMA 20	-	109,30	-187,48	-32,41
PE-e-HEMA 40	-20,26	108,71	-157,20	-32,84

T_g : transição vítreo, T_M : temperatura de fusão e ΔH_M : entalpia de fusão

A T_g das membranas de copolímero PE-e-HEMA ficou abaixo da encontrada na literatura para o PE (-125 a -80 °C) (160). Os copolímeros PE-e-HEMA possuem estabilidade térmica na faixa de temperatura de trabalho de biossensores (10 a 50 °C).

5.6. CARACTERIZAÇÃO ELÉTRICA

As medidas da corrente em função de tensão para os filmes de PE e membranas de copolímeros PE-e-HEMA com a topologia escova no regime seco exibiram o comportamento típico de um material dielétrico. O gráfico da Figura 5.15 ilustra uma grande dispersão de pontos. Esse padrão é semelhante ao medido pela fonte Keithley em circuito aberto.

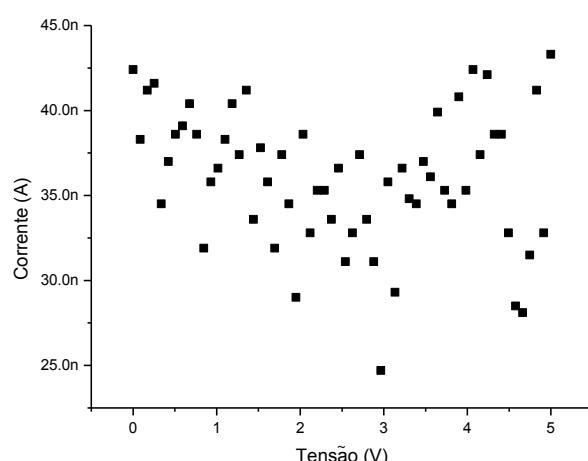


Figura 5.15: Curva IxV das membranas de copolímero PE-e-HEMA medida no regime seco.

Após terem sido umedecidos em solução tampão fosfato (PBS) em pH 7,4 as membranas de copolímeros apresentaram boa condução de corrente. Contrariamente, os filmes de PE originais não mudaram o seu padrão dielétrico mesmo na presença de soluções em sua superfície.

Os membranas de PE-e-HEMA apresentaram na caracterização elétrica a característica amperométrica, quando em contato com soluções de eletrólitos. Ou seja, para diferentes concentrações do analito (IgG) foram obtidas respostas de variação de corrente. O comportamento amperométrico das membranas biosensoras se manteve estável nas medidas com solução de PBS pH 7,4 e nas soluções com concentrações variadas de IgG, para as condições experimentais empregadas.

A adsorção de sais de Ferricianeto ($[Fe(CN)_6]^{3-}$) e Ferrocianeto ($[Fe(CN)_6]^{4-}$) melhorou a resposta de corrente dos copolímeros PE-e-HEMA. Os íons ferricianeto e ferrocianeto adsorvidos na estrutura do polímero escova PE-e-HEMA formam o composto de coordenação de valência mista de fórmula $Fe^{+3}_4[Fe^{+2}(CN)_6].xH_2O$, conhecido como Azul da Prússia. O Azul da Prússia é um hexacianoferrato com estrutura cúbica de face centrada. Esse composto consiste em íons férricos (Fe^{+3}) e ferrosos (Fe^{+2}) alternados nos sítios do retículo, ligados a grupos $-CN$. O Fe^{+2} é ligado ao carbono e o Fe^{+3} ao nitrogênio, de acordo com a representação esquemática de sua célula unitária presente na Figura 5.16.

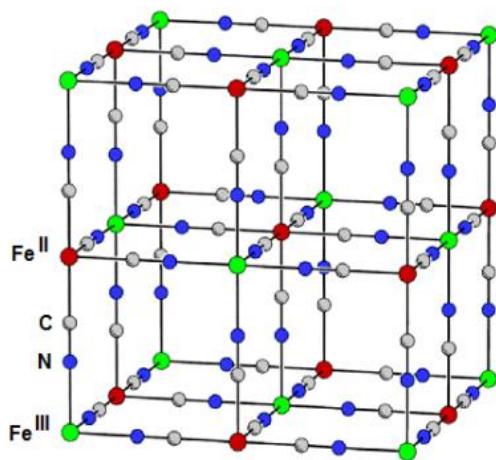


Figura 5.16: Modelo da estrutura atômica do Azul da Prússia. Adaptado da Fonte (175).

Dessa forma, o Azul da Prússia é constituído por núcleos metálicos de Fe^{+2} e Fe^{+3} alternadamente, sendo intercalados por ligantes ciano em ponte, de modo que cada centro atômico de ferro está coordenado a seis grupos ciano. Estes últimos são ligantes de campo

forte. A nuvem eletrônica do CN perturba fortemente os níveis de energia de campo ligante do metal e seus elétrons de valência, e promove o emparelhamento destes últimos nos orbitais de menor energia. O arranjo espacial dos orbitais toma a forma do octaedro (175).

No caso do polímero escova PE-e-HEMA forma-se o Azul da Prússia “solúvel” cuja fórmula estequiométrica é $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$. O termo “solúvel” diz respeito a uma tendência do composto em peptizar. Isto é, o processo de transporte entre fases pelo qual passa um determinado colóide ao se misturar com uma fase dispersa. Dessa forma, o Azul da Prússia “solúvel” quando colocado em contato com um agente dispersante (cadeias de PHEMA) apresenta maior facilidade em se dispersar pelo meio (PHEMA). Isto parece ocorrer devido à presença de íons potássio, bem como sua mobilidade no meio dispersante (PE-e-HEMA) (176).

A transferência de elétrons entre os átomos de ferro ocorre por meio de diversas transições entre níveis de energia das espécies envolvidas, responsáveis pelas transições de intervalênci. Assim, o Azul da Prússia de um modo geral, possui uma considerável condutividade elétrica na faixa dos semicondutores, se enquadando perfeitamente nesta classe de materiais em termos de propriedades elétricas (177). Desta forma a adsorção do Azul da Prússia nas membranas de copolímero PE-e-HEMA pode contribuir para o aumento da sensibilidade do dispositivo biosensor projetado a partir do polímero escova.

A Figura 5.17 ilustra os gráficos comparativos das curvas IxV entre as membranas de PE-e-HEMA 20 e 40 puros (\circ) e as membranas PE-e-HEMA 20 e 40 com $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]$ adsorvidos (\blacklozenge), medidos no regime úmido em solução de PBS.

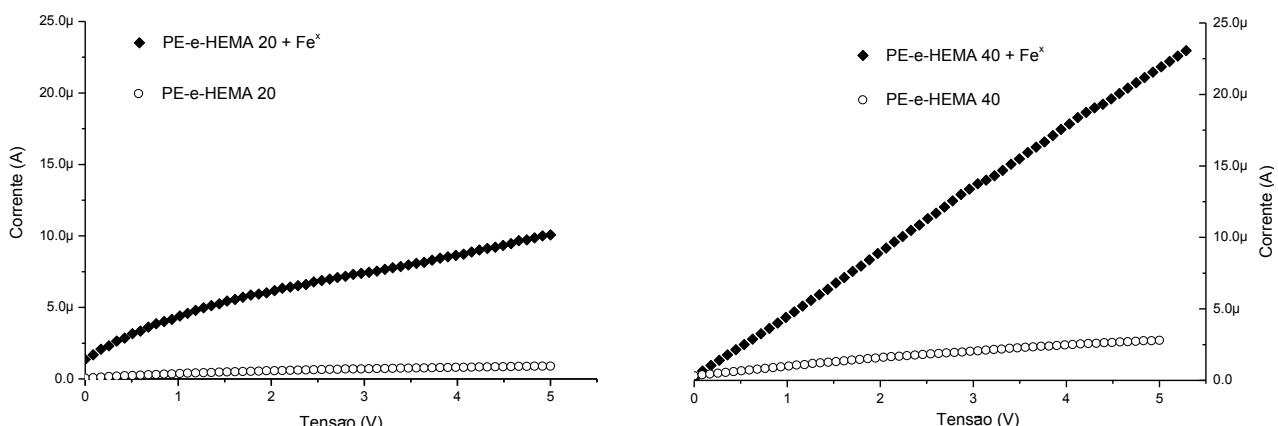


Figura 5.17: Comparativo das curvas IxV das membranas de copolímero PE-e-HEMA 20 e 40 antes (\circ) e após (\blacklozenge) a adsorção de $[Fe^{+3}[Fe^{+2}(CN)_6]^-$, medidos após imersão em solução de PBS pH 7,4.

Para o valor de tensão aplicada 3V a adsorção de $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ aumentou em 4,5 μA a corrente das membranas de copolímero PE-e-HEMA 20. Um aumento mais alto de 12,5 μA ocorreu na membrana de PE-e-HEMA 40 para o mesmo valor de tensão (3V). Tendo em vista o aumento da condutividade após a adsorção do Azul da Prússia as medidas de resposta amperométrica em relação às concentrações de IgG foram realizadas no sistema composto de copolímero, Azul da Prússia e anti-imunoglobulina (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]$ – anti-IgG).

A resposta de corrente para a rampa de tensão de 0 a 5V do sistema (PE-e-HEMA20 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG), umedecido em soluções de IgG, é ilustrada na Figura 5.18.

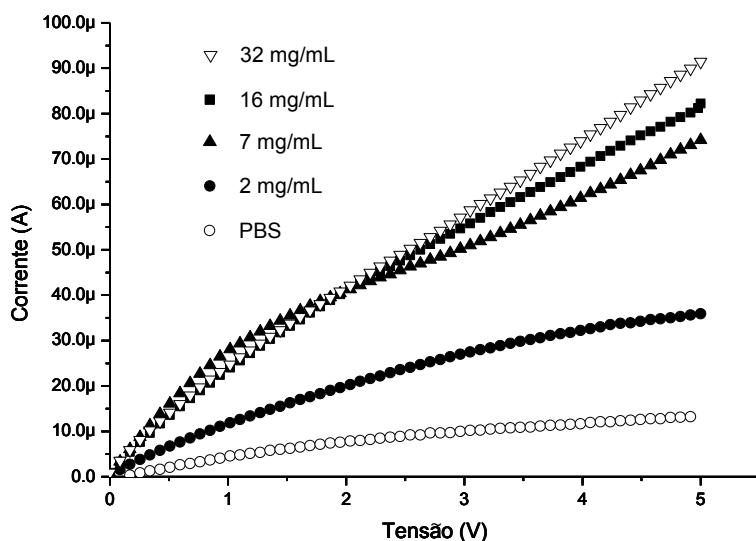


Figura 5.18: Resposta de corrente em função da tensão aplicada no sistema (PE-e-HEMA20 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) para concentrações de IgG de 2, 7, 16, 32 mg/mL. A curva de controle PBS serve de base para avaliação de resposta.

As curvas IxV apresentaram uma tendência para saturação típica do mecanismo de condução iônica (178,179). A corrente iônica ilustradas no gráfico da Figura 5.18 foi proporcional aos íons resultantes da ligação entre a IgG e a anti-IgG adsorvida na membrana. A produção de íons é justificada devido ao fato da membrana, ao ser umedecida com a solução de IgG, parte das moléculas da imunoglobulina se ligam por afinidade química com a anti-IgG gerando íons que participam do processo de condução. Um comportamento semelhante é encontrado em polímeros escova apresentados na literatura (21,79,104,108,180).

Uma contra prova para verificar a existência deste mecanismo foi realizada tomando-se os mesmos parâmetros da curva IxV e das concentrações de IgG mas para um sistema sem

a imobilização de anti-IgG. Este sistema de prova (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]$) não apresentou discriminação capaz de diferenciar diferentes concentrações de IgG.

A estabilidade da resposta amperométrica em um intervalo de tempo necessário para leitura de resultados em um biossensor (até 60s) é um fator importante no projeto do biossensor. Então, a fim de verificar esta estabilidade foi aplicado um potencial constante de 3V e novas medidas de resposta amperométrica foram medidas nas mesmas concentrações de IgG utilizadas na medida de rampa e ilustradas na Figura 5.19,

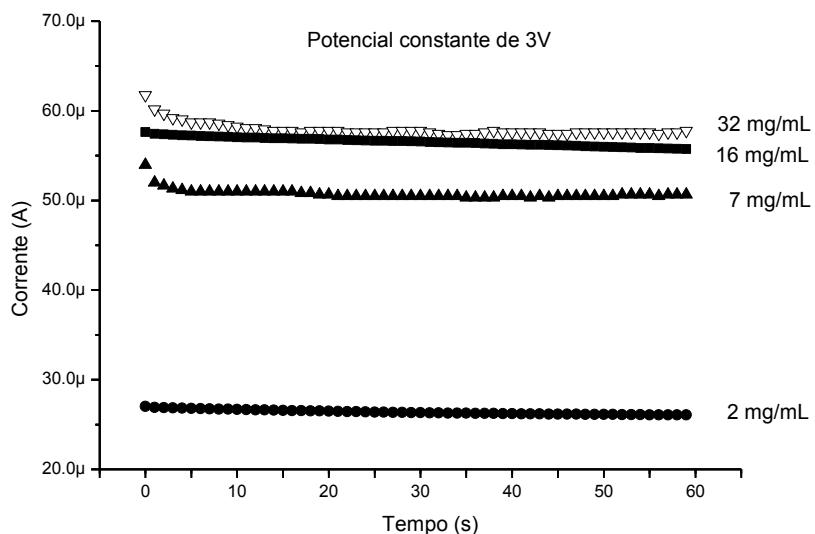


Figura 5.19: Resposta de corrente para um potencial constante para o sistema (PE-e-HEMA20 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]$ – anti-IgG) para concentrações de IgG de 2, 7, 16, 32 mg/mL.

A resposta de corrente da membrana transdutora permaneceu estável sob a aplicação de um potencial constante de 3V até o tempo de 60s. Para o sistema com o PE-e-HEMA 20 houve uma variação de 30,95 μA no intervalo de 2 a 16 mg/mL de IgG. Embora a relação de resposta de corrente não seja linear o resultado corresponde a uma média de 2,21 μA por mg/mL. Entretanto há uma diferença de 0,2 μA entre as concentrações de 16 e 32 mg/mL, indicando que o sistema biossensor (PE-e-HEMA20 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]$ – anti-IgG) tem uma sensibilidade reduzida a partir das concentrações de 16 mg/mL.

O sistema (PE-e-HEMA40 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]$ – anti-IgG) mostrou uma melhor sensibilidade para detecção de IgG. O mesmo mecanismo de condução iônica se aplica para o sistema com a membrana PE-e-HEMA40. A Figura 5.20 ilustra a resposta de corrente em função da tensão aplicada de 0 a 5V, nas mesmas condições empregadas para o sistema anterior com a membrana PE-e-HEMA 20.

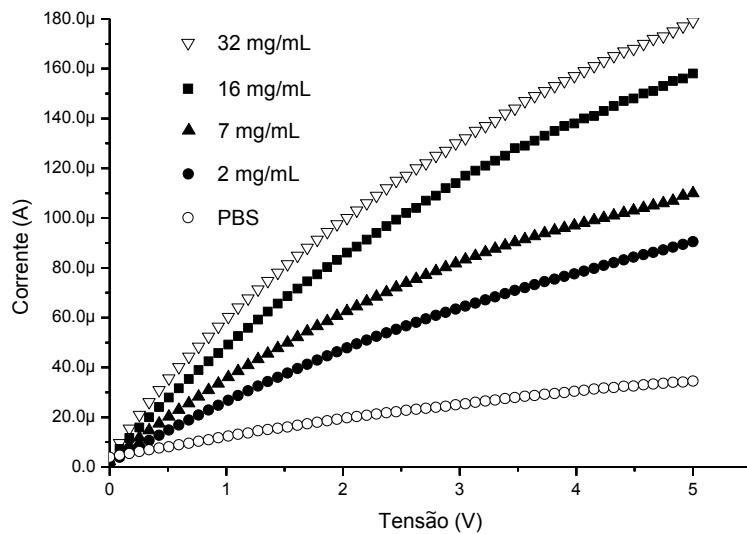


Figura 5.20: Resposta de corrente em função da tensão aplicada no sistema (PE-e-HEMA40 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) para concentrações de IgG de 2, 7, 16, 32 mg/mL. A curva de controle PBS serve de base para avaliação de resposta.

Uma resposta homogênea ocorreu em toda a faixa de tensão medida. Além do que, houve nesse sistema com a membrana PE-e-HEMA 40 um aumento significativo nos valores da corrente para cada concentração, ilustrado na Figura 5.21, para o potencial constante de 3V.

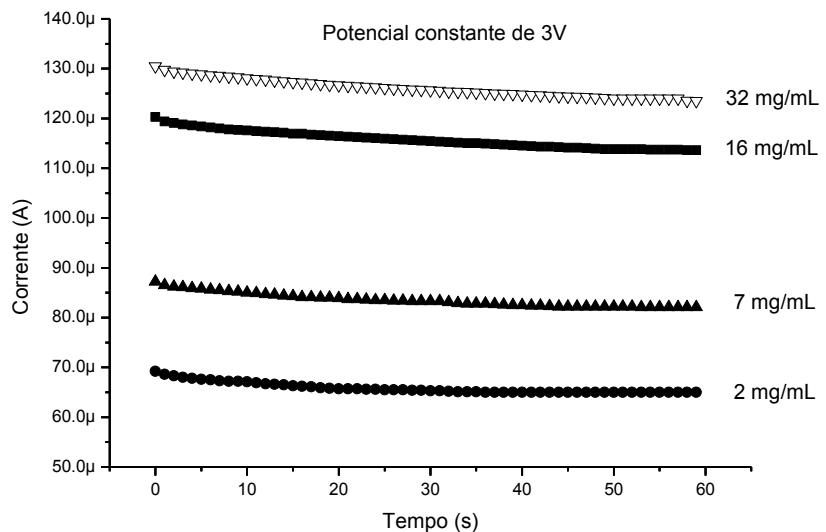


Figura 5.21: Resposta de corrente para um potencial constante no sistema (PE-e-HEMA40 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) para concentrações de IgG de 2, 7, 16, 32 mg/mL.

A sensibilidade do sistema com a membrana PE-e-HEMA 40 foi além do limite de 16 mg/mL observado no sistema com a membrana PE-e-HEMA 20. O que mostra melhor desempenho do sistema (PE-e-HEMA40 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) para a aplicação em biossensores na detecção IgG. Deste modo o dispositivo biossensor poderá identificar concentrações de IgG diferente daquelas incluídas nas concentrações normais no sangue humano que é de 7 a 12 mg/mL (170,171).

O sistema biosensor (PE-e-HEMA40 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) apresentou uma variação de corrente de 49,0 μA no intervalo de 2 a 16 mg/mL. Comparativamente maior do que o sistema com a membrana de copolímero PE-e-HEMA 20. Ademais, houve uma diferença de 10,3 μA entre as concentrações de 16 e 32 mg/mL, o que indica uma boa sensibilidade da membrana também para valores altos de concentração de IgG.

A resposta amperométrica em função da concentração de IgG nos dois sistemas aproximou-se de uma curva logarítmica, como ilustrado na Figura 5.22, com os valores medidos no potencial constante de 3V.

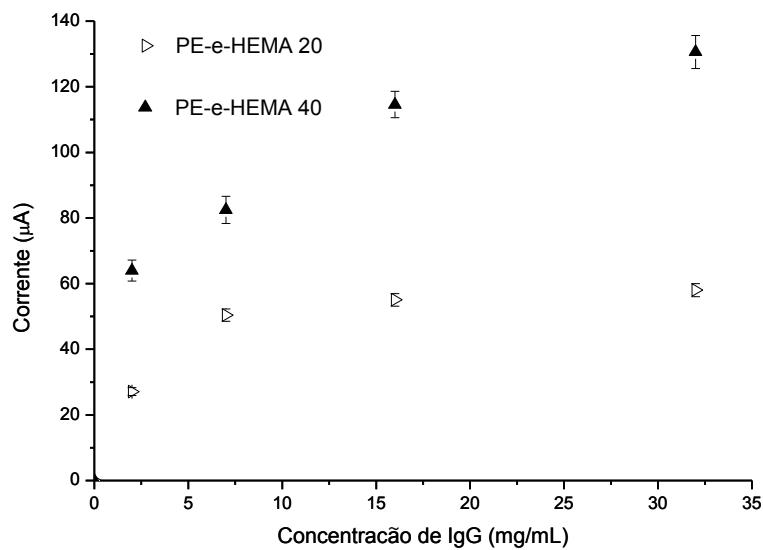


Figura 5.22: Resposta de corrente em função das concentrações de IgG nos sistemas (PE-e-HEMA20 – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) no potencial constante de 3V. A barra de erro representa o desvio para quatro repetições.

Até o momento, poucos biossensores de imunoglobulinas foram reportados na literatura. Entretanto, a título de comparação é possível fazer uma referência a biossensores similares que utilizam a nanotecnologia e os biossensores amperométricos de glicose.

A nanotecnologia tem sido utilizada para a detecção dos limites inferiores de imunoglobulinas. Yun e colaboradores (181) desenvolveram um biossensor condutimétrico com nanofios de polianilina (PANI) para a detecção de IgG. Neste estudo foram utilizadas concentrações de IgG de 5,4 ng/mL a 2,78 µg/mL com uma variação da condutância de 1,0 a 1,5 µS. A utilização de nanotubos de carbono modificado com aptâmeros em biossensor foi reportada por Tamiya e colaboradores (182). A região sensível atuou como porta em um transistor de efeito de campo (FET). O dispositivo foi utilizado para a detecção de IgE com um limite mínimo de detecção de 250 pM (0,037 mg/mL).

Quando aplicada em biossensores de glicose a nanotecnologia promove uma melhora nos níveis de detecção. Neste sentido, Adronov e colaboradores (183) desenvolveram um biossensor conjugado com polieletrólitos para detecção amperométrica de glicose. O dispositivo apresentou uma resposta linear para as concentrações de 0,5 a 5,0 mM de glicose com uma variação correspondente de corrente de 15 a 60 µA e incremento de 5 µA por mM de glicose.

Até o momento, os biossensores que utilizam filmes finos de PE-e-HEMA, como o desenvolvido nesta dissertação, foram estudados unicamente para a detecção de glicose. A literatura reporta um biossensor amperométrico com membrana de PHEMA desenvolvido por Brahin colaboradores (184). O estudo apresenta um limite máximo de detecção de 4,5 mg/mL de glicose e uma corrente correspondente de 12 µA. Outro estudo associando ferroceno e PHEMA foi apresentado por Jusoh (129) com um limite de 5,5 mg/mL, porém com a corrente máxima de 0,75 µA.

A sensibilidade de detecção dos sistemas (PE-e-HEMA – Fe⁺³[Fe⁺²(CN)₆]⁻ – anti-IgG) desenvolvidos nesta dissertação foram 2,5 vezes acima dos níveis reportados para biossensores de glicose que utilizam membranas de PHEMA. Este resultado indica que a metodologia de síntese das membranas de PE-e-HEMA através de raios gama e a adsorção de Azul da Prússia gerou uma membrana mais sensível em relação àquelas empregadas para a detecção de glicose.

Por outro lado, a detecção de pequenas concentrações de imunoglobulinas, como aquelas obtidas pelos biossensores que utilizam a nanotecnologia, ainda não foi comprovada experimentalmente no sistema biossensor (PE-e-HEMA – Fe⁺³[Fe⁺²(CN)₆]⁻ – anti-IgG). Contudo, no âmbito deste estudo é possível uma estimativa do funcionamento do novo sistema biossensor em baixas concentrações pela modelagem matemática.

A relação entre a corrente e a área da membrana (200 mm^2) permite mensurar a densidade de corrente por mm^2 que circula na membrana. Este parâmetro é mais adequado para o projeto de lâminas para a utilização em biossensores. Desta forma, a densidade de corrente foi calculada para os dois novos sistemas. A área de 200 mm^2 levou em conta que as membranas de superfície de 100 mm^2 foram imersos na solução e após a secagem em mata-borrão houve a condução por ambos os lados. A Figura 5.23 ilustra o gráfico da densidade de corrente em função das concentrações de IgG sistema biossensor (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG), medidos no potencial constante de 3V.

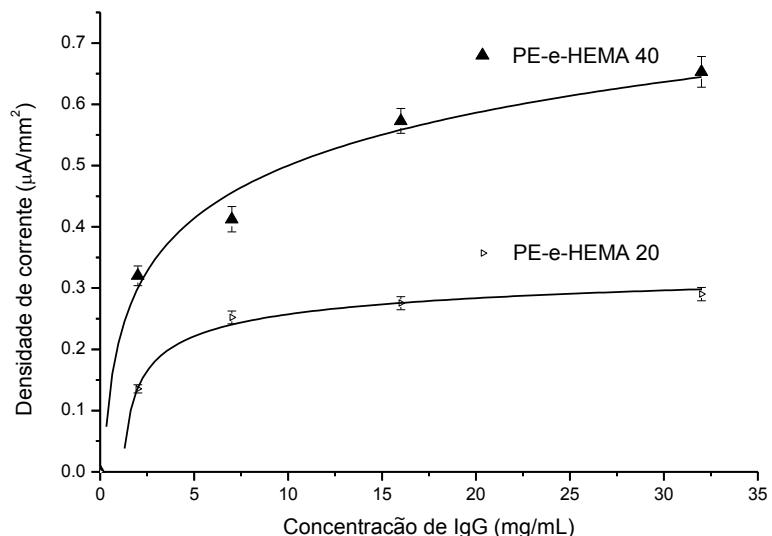


Figura 5.23: Densidade de corrente em função das concentrações de IgG nos sistemas (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) no potencial constante de 3V. A barra de erro representa o desvio para quatro repetições.

Os modelos matemáticos que mais se aproximam da resposta amperométrica do biossensor (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) foram obtidos por aproximação numérica no programa *Origin 8.0*. Para o sistema com a membrana transdutora PE-e-HEMA 20 o modelo logarítmico de *Bradley* ajusta-se dentro da margem de erro. Para o sistema com a membrana PE-e-HEMA 40 a curva logarítmica ajustou bem para concentrações de IgG acima de 16mg/mL. Porém, o ponto com a concentração de 7 mg/mL ficou afastado. As equações dos modelos estão ilustradas na Figura 5.24.

Model	Bradley	PE-e-HEMA 20		Model	Log3P1	PE-e-HEMA 40	
Equation		$y = a * \ln(-b * \ln(x))$		Equation		$y = a - b * \ln(x + c)$	
		Value	Standard Err			Value	Standard Err
Densidade d	a	0.10	0.01	Densidade	a	0.21	--
Densidade d	b	-5.69	0.80	Densidade	b	-0.12	--

Figura 5.24: Modelos matemáticos da curva da densidade de corrente em função das concentrações de IgG nos sistemas biossensores (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG).

Esta modelagem matemática levou em consideração os dados experimentais obtidos para imunoglobulinas IgG no âmbito deste estudo. Assim, a reprodutibilidade dos resultados dependerá da observância do procedimento e condições experimentais descritas na metodologia. Outro fator relevante é que os polímeros com a topologia escova podem ser facilmente modificados pelas condições do meio, como solventes, temperatura e pressão. Desta forma, para que os mesmos resultados sejam obtidos na reprodução das medidas os parâmetros dos insumos e condições do meio deverão ser iguais aos descritos neste estudo.

Todavia, será enriquecedor para a complementação deste estudo que novos experimentos sejam realizados com as membranas de PE-e-HEMA. As condições experimentais poderão ser modificadas intencionalmente, com objetivo de ampliar as possibilidades de uso destas membranas sensíveis. Os parâmetros como temperatura de trabalho e tipos de biomoléculas imobilizadas poderão ser modificados e poderão enriquecer o conjunto de resultados desta dissertação de mestrado.

Em adição, lado o comportamento do novo sistema biossensor poderá ser avaliado experimentalmente no regime de baixas concentrações de imunoglobulinas. A complementação ao estudo será enriquecedora e poderá consolidar a aplicação do sistema biossensor (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) com topologia escova no campo dos imunossensores.

CAPÍTULO 6 — CONCLUSÃO

6.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As membranas de copolímero PE-e-HEMA sintetizados no âmbito deste estudo apresentaram muitas das características dos polímeros escova. Dentre elas pode-se citar a topografia superficial semi-esférica regular e uma distribuição de poros uniforme. A característica hidrofílica possibilitou a imobilização física de biomoléculas como a anti-IgG. Em adição, o sistema composto da membrana PE-e-HEMA e biomolécula se mostrou eficiente como superfície de estímulo e resposta, um comportamento típico dos PBs.

Contudo, optamos por definir a membrana de PE-e-HEMA sintetizada através de raios gama como um copolímero com topologia escova. Este critério se deve ao fato de que não foram utilizadas na caracterização das membranas técnicas para a verificação dos parâmetros dimensionais e conformacionais das cadeias poliméricas. Por exemplo, a técnica de absorção de raios X em baixo ângulo (NEXAFS) adequada para esta caracterização a nível molecular. Essa técnica pode determinar a densidade de ligação (Σ), que define com rigor teórico a estrutura polimérica como um PB.

A síntese das membranas de copolímero PE-e-HEMA com topologia escova, apresentou características completamente diferenciadas daquelas observadas no substrato original de polietileno. As medidas de ângulo de contato comprovaram o aumento da energia superficial e em consequência o aumento da característica hidrofílica. Este comportamento é vantajoso nas aplicações de biossensores para hemometabólicos, pois permite uma dinâmica eficiente de detecção já que água é um elemento fundamental nos processos bioquímicos.

As membranas de PE-e-HEMA 20 e PE-e-HEMA 40 mostraram estabilidade térmica na análise de DSC em uma ampla faixa de temperatura que inclui aquelas típicas de ambientes de utilização de biossensores (10 a 50 °C). Os espectros de infravermelho e a microanálise de raios X confirmaram as ligações covalentes estáveis estabelecidas entre o substrato de PE e o monômero HEMA. As taxas de dose de radiação definidas a partir de estudos anteriores permitiu a geração de uma superfície polimérica rugosa, rica em poros revelada pelas micrografias eletrônicas de varredura.

Todavia o ponto de maior relevância alcançado no desenvolvimento das membranas de PE-e-HEMA foi a resposta elétrica caracterizada em corrente contínua. O novo sistema biossensor (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) apresentou um comportamento

amperométrico quando umedecido em solução salina tampão contendo concentrações de imunoglobulina IgG humana entre 2 a 32 mg/mL.

Os limites de detecção de IgG comprovados experimentalmente (de 2 a 32 mg/mL), incluíram os níveis normais no indivíduo saudável (de 7 a 16 mg/mL). Por outro lado, a sensibilidade de detecção média foi de 3,5 μA por mg/mL de IgG. Esta sensibilidade ficou acima dos valores reportados na literatura para membranas de PHEMA usadas na detecção de glicose, por exemplo.

Para completar o estudo de forma objetiva foi obtido um modelo matemático para a curva de resposta da densidade de corrente ($\mu\text{A}/\text{mm}^2$) em função da concentração de IgG. Portanto, as membranas de PE-e-HEMA 20 e PE-e-HEMA 40 com topologia escova são promissores para detecção de imunoglobulinas como a IgG.

6.2. PERSPECTIVAS

Como perspectiva para o desenvolvimento do sistema biossensor (PE-e-HEMA – $\text{Fe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^-$ – anti-IgG) com topologia escova está a sua conjugação com dispositivos eletrônicos. A primeira etapa a ser complementada é o desenvolvimento de lâminas contendo um fragmento deste sistema transdutor. As dimensões do fragmento poderão ser calculadas a partir do parâmetro de densidade de corrente obtido para IgG. Entretanto, para outras biomoléculas novas medidas quantitativas deverão ser realizadas.

Na etapa seguinte, o projeto do circuito eletrônico poderá ser executado utilizando parâmetros de resposta amperométrica e a curva que modela a variação da densidade de corrente em função da concentração do analito. Deve ser levado em conta que o destino dos dispositivos biossensores, visando o diagnóstico de doenças negligenciadas requer operação em situações extremas. Assim, é necessária a avaliação da resposta do conjunto lâmina e dispositivo eletrônico em função de variações de temperatura, umidade e pressão.

Finalmente grandes benefícios poderão advir do estudo do comportamento das membranas de PE-e-HEMA na imobilização de outras biomoléculas como proteínas NS1 e ácidos nucleicos. Este desenvolvimento está relacionado diretamente ao diagnóstico de dengue. O que mostra que a aplicação dos polímeros com a topologia escova tem grande potencial para desenvolver um biossensor completo para o diagnóstico desta enfermidade.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- (1) AZZARONI, O. Polymer Brushes Here, There, and Everywhere: Recent Advances in Their Practical Applications and Emerging Opportunities in Multiple Research Fields. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 3225–3258, 2012.
- (2) AONO, Masakazu; Bando, Yosio; Ariga, K. Nanoarchitectonics: pioneering a new paradigm for nanotechnology in materials development. **Advanced Materials**, v. 24, n. 2, p. 150–151, 2012.
- (3) DUCKER, Robert; Garcia, Andres; Zhang, Jianming; Chen, Tao; Zauscher, S. Polymeric and biomacromolecular brush nanostructures: progress in synthesis, patterning and characterization. **Soft Matter**, v. 4, n. 9, p. 1774–1786, 2008.
- (4) ORSKI, Sara V.; Fries, Kristen H.; Sontag, S. Kyle; Locklin, J. Fabrication of nanostructures using polymer brushes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 37, p. 14135–14149, 2011.
- (5) ZHAO, B.; Brittain, W.J. Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules. **Polymer Science**, v. 25, p. 677–710, 2000.
- (6) BRITTAINE, William J.; Minko, S. A Structural Definition of Polymer Brushes. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 45, n. 16, p. 3505–3512, 2007.
- (7) AZZARONI, O.; Brown, A. A.; Huck, W.T.S. Tunable Wettability by Clicking Counterions Into Polyelectrolyte Brushes. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 151–154, 2007.
- (8) MINKO, S.; Müller, M.; Usov, D.; Scholl, A.; Froeck, C.; Stamm, M. Lateral versus Perpendicular Segregation in Mixed Polymer Brushes. **Physical Review Letters**, v. 88, n. 3, p. 2–5, 2002.
- (9) STROOCK, Abraham D.; Whitesides, G.M. Controlling flows in microchannels with patterned surface charge and topography. **Accounts of Chemical Research**, v. 36, n. 8, p. 597–604, 2003.
- (10) ISMAGILOV, R. F.; Rosmarin, T. D.; Kenis, J. A.; Chiu, D. T.; Zhang, W.; Stone, H. A.; Whitesides, G.M. Pressure-driven laminar flow in tangential microchannels: an elastomeric microfluidic switch. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 19, p. 4682–4687, 2001.
- (11) LIANG, Liang; Feng, Xiangdong; Martin, Paul F. C.; Peurung, L.M. Temperature-Sensitive Switch from Composite Poly (N-isopropylacrylamide) Sponge Gels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 75, p. 1735–1739, 1999.
- (12) YU, Cong; Mutlu, Senol; Selvaganapathy, Ponnambalam; Mastrangelo, Carlos H.; Svec, Frantisek; Fréchet, J.M.J. Flow control valves for analytical microfluidic chips without mechanical parts based on thermally responsive monolithic polymers. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1958–1961, 2003.
- (13) XU, Chang; Wu, Tao; Drain, Charles Michael; Batteas, James D.; Beers, K.L. Microchannel Confined Surface-Initiated Polymerization. **Macromolecules**, v. 38, n. 1, p. 6–8, 2005.
- (14) MURATA, Hironobu; Koepsel, Richard R.; Matyjaszewski, Krzysztof; Russell, A.J. Permanent, non-leaching antibacterial surface-2: how high density cationic surfaces kill bacterial cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 32, p. 4870–4879, 2007.
- (15) GLINEL, Karine; Jonas, Alain M.; Jouenne, Thierry; Leprince, Jérôme; Galas, Ludovic; Huck, W.T.S. Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 71–77, 2009.

- (16) TILLER, Joerg C.; Lee, Sang Beom; Lewis, Kim; Klibanov, A.M. Polymer surfaces derivatized with poly(vinyl-N-hexylpyridinium) kill airborne and waterborne bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 465–471, 2002.
- (17) ZDÝRKO, Bogdan; Klep, Viktor; Li, Xiaowei; Kang, Qian; Minko, Sergiy; Wen, Xuejun; Luzinov, I. Polymer brushes as active nanolayers for tunable bacteria adhesion. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 3, p. 680–684, 2009.
- (18) VAIŠOCHEROVÁ, Hana; Yang, Wei; Zhang, Zheng; Cao, Zhiqiang; Cheng, Gang; Piliarik, Marek; Homola, Jirí; Jiang, S. Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 20, p. 7894–7901, 2008.
- (19) BILEN, Bukem; Skarlatos, Yani; Aktas, Gulen; Inci, Mehmet Naci; Dispınar, Tugba; Kose, Meliha Merve; Sanyal, A. In situ measurement of humidity induced changes in the refractive index and thickness of polyethylene glycol thin films. **Journal of Applied Physics**, v. 102, n. 7, p. 073534, 2007.
- (20) FRIES, Kristen; Samanta, Satyabrata; Orski, Sara; Locklin, J. Reversible colorimetric ion sensors based on surface initiated polymerization of photochromic polymers. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, v. 47, p. 6288–6290, 2008.
- (21) CHEN, Tao; Ferris, Robert; Zhang, Jianming; Ducker, Robert; Zauscher, S. Stimulus-responsive polymer brushes on surfaces: Transduction mechanisms and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 1, p. 94–112, 2010.
- (22) WAARDEN, M.V.D. Stabilization of carbon-black dispersions in hydrocarbons. **Journal of Colloid Science**, v. 5, p. 317–325, 1950.
- (23) WAARDEN, M.V.D. Adsorption of aromatic hydrocarbons in nonaromatic media on carbon black. **Journal of Colloid Science**, v. 6, p. 443–449, 1951.
- (24) GENNES, P.G.D. Conformations of Polymers Attached to an Interface. **Macromolecules**, v. 13, n. 5, p. 1069–1075, 1980.
- (25) AYRES, N. Polymer brushes: Applications in biomaterials and nanotechnology. **Polymer Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 769–777, 2010.
- (26) WILNER, I. Biomaterials for sensors, fuel cells, and circuitry. **Science**, v. 298, n. December, p. 2407–2408, 2002.
- (27) ZHANG, Z. B.; Yuan, S. J.; Zhu, X. L.; Neoh, K. G.; Kang, E.T. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared via successive surface-initiated atom-transfer radical polymerization. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1102–1108, 2010.
- (28) TOKAREV, Ihor; Tokareva, Iryna; Minko, S. Optical nanosensor platform operating in near-physiological pH range via polymer-brush-mediated plasmon coupling. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 2, p. 143–146, 2011.
- (29) TOKAREVA, Iryna; Minko, Sergiy; Fendler, Janos H.; Hutter, E. Nanosensors based on responsive polymer brushes and gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 49, p. 15950–15951, 2004.
- (30) IONOV, L.; Sapra, S.; Synytska, A.; Rogach, A. L.; Stamm, M.; Diez, S. Fast and Spatially Resolved Environmental Probing Using Stimuli-Responsive Polymer Layers and Fluorescent Nanocrystals. **Advanced Materials**, v. 18, n. 11, p. 1453–1457, 2006.

- (31) WHO. **Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases.** Geneva: WHO Press, 2012. 42p.
- (32) WHO. **Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012 - 2020.** Geneva: WHO Press, 2012.43p.
- (33) ROBERTS, L. Population news 9 billion? **Science**, v. 333, n. July, p. 540–543, 2011.
- (34) PEELING, Rosanna W.; Artsob, Harvey; Pelegrino, Jose Luis; Buchy, Philippe; Cardosa, Mary J.; Devi, Shamala; Enria, Delia A.; Farrar, Jeremy; Gubler, Duane J.; Guzman, Maria G. Halstead, Scott B.; Hunsperger, Elizabeth; Kliks, Susie; Margolis, H.S.; Nathanson, Carl M. ; Nguyen, Vinh Chau ; Rizzo, Nidia ; Vazquez, Susana; Yoksan, S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews. Microbiology**, n. 12, p. S30–S37, 2010.
- (35) HALSTEAD, S.B. Dengue vaccine development: a 75% solution? **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1535–1536, 2012.
- (36) SABCHAREON, Arunee; Wallace, Derek; Sirivichayakul, Chukiat; Limkittikul, Kriengsak; Chanthavanich, Pornthep; Suvannadabba, Saravudh; Jiwariyavej, Vithaya; Dulyachai, Wut; Pengsaa, Krisana; Wartel, T. Anh; Moureau, Annick; Saville, Melanie; Bouckenoghe, Alain; Viviani, Simonetta; Tornieporth, Nadia G.; Lang, J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559–1567, 2012.
- (37) D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19-20, p. 1749–1761, 2011.
- (38) NASEF, M. Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 6, p. 499–561, 2004.
- (39) QUEIROZ, A.A.A. de (1993). Obtenção de copolímeros de enxerto via radiação iozante, caracterização e estudo de suas propriedades hemocompatíveis. Tese de doutorado. 168 pp.
- (40) NETZ, Roland R.; Schick, M. Polymer Brushes: From Self-Consistent Field Theory to Classical Theory. **Macromolecules**, v. 31, n. 15, p. 5105–5122, 1998.
- (41) RAVIV, Uri; Giasson, Suzanne; Kampf, Nir; Gohy, Jean-François; Jérôme, Robert; Klein, J. Lubrication by charged polymers. **Nature**, v. 425, p. 163–165, 2003.
- (42) BALAZS, Anna C.; Singh, Chandbalekha; Zhulina, Ekaterina; Chern, Shyh-Shi; Lyatskaya, Yulia; Pickett, G. Theory of Polymer Chains Tethered at Interfaces. **Progress in Surface Science**, v. 55, n. 3, p. 181–269, 1997.
- (43) SZLEIFER, I. Polymers and proteins: interactions at interfaces. **Solid State and Materials Science**, v. 2, n. 3, p. 337–334, 1997.
- (44) SENARATNE, Wageesha; Andruzzi, Luisa; Ober, C.K. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2427–2448, 2005.
- (45) BARBEY, Raphaël; Lavanant, Laurent; Paripovic, Dusko; Schüwer, Nicolas; Sugnaux, Caroline; Tugulu, Stefano; Klok, H.-A. Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: synthesis, characterization, properties, and applications. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 11, p. 5437–527, 2009.
- (46) LUZINOV, Igor; Minko, Sergiy; Tsukruk, V.V. Responsive brush layers: from tailored gradients to reversibly assembled nanoparticles. **Soft Matter**, v. 4, n. 4, p. 714–725, 2008.

- (47) CLAYFIELD, E. J.; Lumb, E.C. A theoretical approach to polymeric dispersant action II. Calculation of the dimensions of terminally adsorbed macromolecules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 22, n. 3, p. 285–293, 1966.
- (48) MACKOR, E. L.; Waals, J.H.V.D. The statistics of the adsorption of rod-shaped molecules in connection with the stability of certain colloidal dispersions. **Journal of Colloid Science**, v. 7, p. 535–550, 1952.
- (49) MILNER, S. T. . Polymer Brushes. **Science**, v. 251, p. 905–914, 1991.
- (50) RAPHAEL, E.; Gennes, P.G.D. Ruber-Ruber Adhesion with Connector Molecules. **Journal of Physics Chemistry**, v. 96, n. 10, p. 4002–4007, 1992.
- (51) TAKEI, Yoshiyuki G.; Aoki, Takashi; Sanui, Kohei; Ogata, Naoya; Sakurai, Yasuhisa; Okano, T. Dynamic Contact Angle Measurement of Temperature-Responsive Surface Properties for Poly(N-isopropylacrylamide) Grafted Surfaces. **Macromolecules**, v. 27, n. 21, p. 6163–6166, 1994.
- (52) JOANNY, J.F. Lubrication by Molten Polymer Brushes. **Langmuir**, v. 8, n. 3, p. 989–995, 1992.
- (53) PARSONAGE, Edward; Tirrell, Matthew; Watanabe, Hiroshi; Nuzzo, R.G. Adsorption of Poly(2-vinylpyridine)-Poly(styrene) Block Copolymers from Toluene Solutions. **Macromolecules**, v. 24, n. 8, p. 1987–1995, 1991.
- (54) KENT, M.S. A quantitative study of tethered chains in various solution conditions using Langmuir diblock copolymer monolayers. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 6, p. 243–270, 2000.
- (55) COSGROVE, Terence; Heath, Timothy G.; Ryan, Keith; Crowley, T.L. Neutron scattering from Adsorbed Polymer Layers. **Macromolecules**, v. 20, n. 11, p. 2879–2882, 1987.
- (56) TIRRELL, Matthew; Patel, Sanjay; Hadzioannout, G. Polymeric amphiphiles at solid-fluid interfaces : Forces between layers of adsorbed block copolymers. **Proceeding National Academic Science - USA**, v. 84, n. July, p. 4725–4728, 1987.
- (57) LINDQVIST, Josefina; Nyström, Daniel; Ostmark, Emma; Antoni, Per; Carlmark, Anna; Johansson, Mats; Hult, Anders; Malmström, E. Intelligent dual-responsive cellulose surfaces via surface-initiated ATRP. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2139–2145, 2008.
- (58) BONTEMPO, Debora; Tirelli, Nicola; Masci, Giancarlo; Crescenzi, Vittorio; Hubbell, J.A. Thick Coating and Functionalization of Organic Surfaces via ATRP in Water. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 23, n. 7, p. 417–422, 2002.
- (59) ZOU, Yuquan; Kizhakkedathu, Jayachandran N.; Brooks, D.E. Surface Modification of Polyvinyl Chloride Sheets via Growth of Hydrophilic Polymer Brushes. **Macromolecules**, v. 42, n. 9, p. 3258–3268, 2009.
- (60) LIU, Jikun; Pan, Tao; Woolley, Adam T.; Lee, M.L. Surface-modified poly(methyl methacrylate) capillary electrophoresis microchips for protein and peptide analysis. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 23, p. 6948–6955, 2004.
- (61) GORMAN, Christopher B.; Petrie, Randall J.; Genzer, Jan; Carolina, N. Effect of Substrate Geometry on Polymer Molecular Weight and Polydispersity during Surface-Initiated Polymerization. **Macromolecules**, v. 41, n. 13, p. 4856–4865, 2008.
- (62) MARUTANI, Eizo; Yamamoto, Shinpei; Ninjbadgar, Tsedev; Tsujii, Yoshinobu; Fukuda, Takeshi; Takano, M. Surface-initiated atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate on magnetite nanoparticles. **Polymer**, v. 45, n. 7, p. 2231–2235, 2004.

- (63) FAN, Xiaowu; Lin, Lijun; Dalsin, Jeffrey L.; Messersmith, P.B. Biomimetic anchor for surface-initiated polymerization from metal substrates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 45, p. 15843–15847, 2005.
- (64) SILL, Kevin; Emrick, T. Nitroxide-Mediated Radical Polymerization from CdSe Nanoparticles. **Chemical Materials**, v. 16, n. 7, p. 1240–1243, 2004.
- (65) CAI, Qin Jia; Fu, Guo Dong; Zhu, Fu Rong; Kang, En-Tang; Neoh, K.-G. GaAs-polymer hybrids formed by surface-initiated atom-transfer radical polymerization of methyl methacrylate. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 44, n. 7, p. 1104–1107, 2005.
- (66) CHEN, Meng; Briscoe, Wuge H.; Armes, Steven P.; Cohen, H.; Klein, J. Polyzwitterionic brushes: Extreme lubrication by design. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 4, p. 511–523, 2011.
- (67) HUTTER, Naima A.; Steenackers, Marin; Reitinger, Andreas; Williams, Oliver A.; Garrido, Jose A.; Jordan, R. Nanostructured polymer brushes and protein density gradients on diamond by carbon templating. **Soft Matter**, v. 7, n. 10, p. 4861–4867, 2011.
- (68) KONG, Hao; Li, Wenwen; Gao, Chao; Yan, Deyue; Jin, Yizheng; Walton, David R. M.; Kroto, H.W. Poly(N-isopropylacrylamide)-Coated Carbon Nanotubes: Temperature-Sensitive Molecular Nanohybrids in Water. **Macromolecules**, v. 37, n. 18, p. 6683–6686, 2004.
- (69) WU, Wei; Tsarevsky, Nicolay V.; Hudson, Jared L.; Tour, James M.; Matyjaszewski, Krzysztof; Kowalewski, T. “Hairy” single-walled carbon nanotubes prepared by atom transfer radical polymerization. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 3, n. 10, p. 1803–1810, 2007.
- (70) WENNING, L; Müller, M.; Binder, K. How does the pattern of grafting points influence the structure of one-component and mixed polymer brushes? **Europhysics Letters (EPL)**, v. 71, n. 4, p. 639–645, 2005.
- (71) WU, Tao; Efimenko, Kirill; Genzer, J. Combinatorial study of the mushroom-to-brush crossover in surface anchored polyacrylamide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 32, p. 9394–9395, 2002.
- (72) VISWANATHAN, Kalpana; Long, Timothy E.; Ward, T.C. Silicon surface modification with trialkoxysilyl-functionalized star-shaped polymers. **Journal of Polymer Science Part A**, v. 43, n. 16, p. 3655–3666, 2005.
- (73) SAIGAL, Trishna; Dong, Hongchen; Matyjaszewski, Krzysztof; Tilton, R.D. Pickering Emulsions Stabilized by Nanoparticles with Thermally Responsive Grafted Polymer Brushes. **Langmuir**, v. 26, n. 19, p. 15200–15209, 2010.
- (74) GOEL, Vivek; Pietrasik, Joanna; Dong, Hongchen; Sharma, Jitendra; Matyjaszewski, Krzysztof; Krishnamoorti, R. Structure of Polymer Tethered Highly Grafted Nanoparticles. **Macromolecules**, v. 44, n. 20, p. 8129–8135, 2011.
- (75) LUTZ, Jean-François; Akdemir, Ozgür; Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers exhibiting a similar LCST: Es The Age of Poly(NIPAM) Over? **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 40, p. 13046–13047, 2006.
- (76) LEMIEUX, M.; Usov, D.; Minko, S.; Stamm, M.; Shulha, H.; Tsukruk, V.V. Reorganization of Binary Polymer Brushes: Reversible Switching of Surface Microstructures and Nanomechanical Properties. **Macromolecules**, v. 36, n. 19, p. 7244–7255, 2003.
- (77) IONOV, Leonid; Minko, Sergiy; Stamm, Manfred; Gohy, Jean-François; Jérôme, Robert; Scholl, A. Reversible Chemical Patterning on Stimuli-Responsive Polymer Film: Environment-Responsive Lithography. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 27, p. 8302–8306, 2003.

- (78) JUAN, F.; Ruiz-Hitzky, E. de Selective Functionalization of Mesoporous Silica. **Advanced Materials**, v. 12, n. 6, p. 430–432, 2000.
- (79) CASASÚS, Rosa; Marcos, María Dolores; Martínez-Máñez, Ramón; Ros-Lis, José V.; Soto, Juan; Villaescusa, Luis A.; Amorós, Pedro; Beltrán, Daniel; Guillem, Carmen; Latorre, J. Toward the Development of Ionically Controlled Nanoscopic Molecular Gates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 28, p. 8612–8613, 2004.
- (80) COSTANTINI, Francesca; Benetti, Edmondo M.; Tiggelaar, Roald M.; Gardeniers, Han J. G. E.; Reinhoudt, David N.; Huskens, Jurriaan; Vancso, G. Julius; Verboom, W. A brush-gel/Metal-Nanoparticle Hybrid Film as an Efficient Supported Catalyst in Glass Microreactors. **Chemistry European Journal**, v. 16, n. 41, p. 12406–12411, 2010.
- (81) WUNDER, Stefanie; Polzer, F.; Yan, Mei, Yu; Ballauff, M. Lu, Kinetic Analysis of Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by Metallic Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 19, p. 8814–8820, 2010.
- (82) Yan; Lunkenbein, Thomas; Preussner, Johannes; Proch, Sebastian; Breu, Josef; Kempe, Rhett; Ballauff, M. Lu, Composites of Metal Nanoparticles and TiO₂ Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes. **Langmuir**, v. 26, n. 6, p. 4176–4183, 2010.
- (83) KIM, Bo Yun; Ratcliff, Erin L.; Armstrong, Neal R.; Kowalewski, Tomasz; Pyun, J. Ferrocene Functional Polymer Brushes on Indium Tin Oxide via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. **Langmuir**, v. 26, n. 3, p. 2083–2092, 2010.
- (84) TAM, Tszy Kin; Pita, Marcos; Motornov, Mikhail; Tokarev, Ihor; Minko, Sergiy; Katz, E. Modified Electrodes with Switchable Selectivity for Cationic and Anionic Redox Species. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 35–40, 2010.
- (85) SCHEPELINA, Olga; Zharov, I. Polymer-Modified Opal Nanopores. **Langmuir**, v. 22, n. 25, p. 10523–10527, 2006.
- (86) SATO, Takaya; Morinaga, Takashi; Marukane, Shoko; Narutomi, Takuya; Igarashi, Tatsuya; Kawano, Yuko; Ohno, Kohji; Fukuda, Takeshi; Tsujii, Y. Novel Solid-State Polymer Electrolyte of Colloidal Crystal Decorated with Ionic-Liquid Polymer Brush. **Advanced Materials**, v. 23, n. 42, p. 4868–4872, 2011.
- (87) YAMEEN, Basit; Kaltbeitzel, Anke; Langner, Andreas; Duran, Hatice; Muler, Frank; Gosele, Ulrich; Azzaroni, O.W.K. Facile large-scale fabrication of proton conducting channels. **Journal of Americam Chemical Societ**, v. 130, n. 15, p. 13140–13144, 2008.
- (88) ZHOU, Feng; Shu, Wenmiao; Welland, Mark E.; Huck, W.T.S. Highly Reversible and Multi-Stage Cantilever Actuation Driven by Polyelectrolyte Brushes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 16, p. 5326–5327, 2006.
- (89) ABU-LAIL, Nehal I.; Kaholek, Marian; LaMattina, Bruce; Clark, Robert L.; Zauscher, S. Micro-cantilevers with end-grafted stimulus-responsive polymer brushes for actuation and sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 114, n. 1, p. 371–378, 2006.
- (90) PUCCI, Andrea; Ruggeri, G. Mechanochromic polymer blends. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 23, p. 8282–8291, 2011.
- (91) CARUSO, Mary M; Davis, Douglas A.; Shen, Qilong; Odom, Susan A.; Sottos, Nancy R.; White, Scott R.; Moore, J.S. Mechanically-induced Chemical Changes in Polymeric Materials. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 11, p. 5755–5798, 2009.
- (92) REMES, A.; Williams, D.F. Immune response in biocompatibility. **Biomaterials**, v. 13, n. 11, p. 731–743, 1992.

- (93) CRINGUS-FUNDEANU, Irina; Luijten, Jeroen; van der Mei, Henny C.; Busscher, Henk J.; Schouten, A.J. Synthesis and Characterization of Surface-Grafted Polyacrylamide Brushes and Their Inhibition of Microbial Adhesion. **Langmuir**, v. 23, n. 9, p. 5120–5126, 2007.
- (94) FUNDEANU, Irina; van der Mei, Henny C.; Schouten, Arend J.; Busscher, H.J. Polyacrylamide brush coatings preventing microbial adhesion to silicone rubber. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 64, n. 2, p. 297–301, 2008.
- (95) GAO, Guangzheng; Lange, Dirk; Hilpert, Kai; Kindrachuk, Jason; Zou, Yuquan; Cheng, John T. J.; Kazemzadeh-Narbat, Mehdi; Yu, Kai; Wang, Rizhi; Straus, Suzana K.; Brooks, Donald E.; Chew, Ben H.; Hancock, Robert E. W.; Kizhakkedathu, J.N. The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 3899–3909, 2011.
- (96) NEJADNIK, M. Reza; van der Mei, Henny C.; Norde, Willem; Busscher, H.J. Bacterial adhesion and growth on a polymer brush-coating. **Biomaterials**, v. 29, n. 30, p. 4117–4121, 2008.
- (97) RAMSTEDT, Madeleine; Cheng, Nan; Azzaroni, Omar; Mossialos, Dimitris; Mathieu, Hans Jörg; Huck, W.T.S. Synthesis and Characterization of Poly(3-Sulfopropylmethacrylate) Brushes for Potential Antibacterial Applications. **Langmuir**, v. 23, n. 6, p. 3314–3321, 2007.
- (98) TAKAHASHI, Hironobu; Nakayama, Masamichi; Itoga, Kazuyoshi; Yamato, Masayuki; Okano, T. Micropatterned thermoresponsive polymer brush surfaces for fabricating cell sheets with well-controlled orientational structures. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1414–1418, 2011.
- (99) ZHANG, Zheng; Vaisocherová, Hana; Cheng, Gang; Yang, Wei; Xue, Hong; Jiang, S. Nonfouling behavior of polycarboxybetaine-grafted surfaces: structural and environmental effects. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2686–2692, 2008.
- (100) JAIN, Parul; Sun, Lei; Dai, Jinhua; Baker, Gregory L.; Bruening, M.L. High-Capacity Purification of His-tagged Proteins by Affinity Membranes Containing Functionalized Polymer Brushes. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 10, p. 3102–3107, 2007.
- (101) YAMEEN, Basit; Kaltbeitzel, Anke; Langer, Andreas; Müller, Frank; Gösele, Ulrich; Knoll, Wolfgang; Azzaroni, O. Highly proton-conducting self-humidifying microchannels generated by copolymer brushes on a scaffold. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 48, n. 17, p. 3124–3128, 2009.
- (102) KOSIŃSKA, I.D.; Hänggi, P. Rectification in synthetic conical nanopores: A one-dimensional Poisson-Nernst-Planck model. **Physical Review E**, v. 77, n. 3, p. 031131, 2008.
- (103) SIWY, Z.; Fuliński, A. Fabrication of a Synthetic Nanopore Ion Pump. **Physical Review Letters**, v. 89, n. 19, p. 4–7, 2002.
- (104) YAMEEN, Basit; Li, Mubarak; Neumann, Reinhard; Ensinger, Wolfgang; Knoll, Wolfgang; Azzaroni, O. Proton-regulated rectified ionic transport through solid-state conical nanopores modified with phosphate-bearing polymer brushes. **Chemical Communications**, v. 46, n. 11, p. 1908–1910, 2010.
- (105) ITO, Yoshihiro; Nishi, Shugo; Park, Yong Soon; Imanishi, Y. Oxidoreduction-Sensitive Control of Water Permeation through a Polymer Brushes-Grafted Porous Membrane. **Macromolecules**, v. 30, n. 19, p. 5856–5859, 1997.
- (106) ITO, Yoshihiro; Ochiai, Yasushi; Park, Yong Soon; Imanishi, Y. pH-Sensitive Gating by Conformational Change of a Polypeptide Brush Grafted onto a Porous Polymer Membrane. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, n. 7, p. 1619–1623, 1997.

- (107) HOU, Xu; Liu, Yujie; Dong, Hua; Yang, Fu; Li, Lin; Jiang, L. A pH-Gating Ionic Transport Nanodevice: Asymmetric Chemical Modification of Single Nanochannels. **Advanced Materials**, v. 22, p. 2440–2443, 2010.
- (108) YAMEEN, Basit; Ali, Mubarak; Neumann, Reinhart; Ensinger, Wolfgang; Knoll, Wolfgang; AZZARONI, O. Synthetic proton-gated ion channels via single solid-state nanochannels modified with responsive polymer brushes. **Nano letters**, v. 9, n. 7, p. 2788–2793, 2009.
- (109) GUO, W.; Xia, H. et al. Integrating Ionic Gate and Rectifier Within One Solid-State Nanopore via Modification with Dual-Responsive Copolymer Brushes. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 20, p. 3561–3567, 2010.
- (110) TAM, T.K.; Zhou, J. et al. Biochemically controlled bioelectrocatalytic interface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 33, p. 10888–10889, 2008.
- (111) YANG, Yongfang; Song, Xiaohui; Yuan, Liang; Li, Mao; Liu, Jinchuan; Ji, Rongqin; Zhao, H. Synthesis of PNIPAM polymer brushes on reduced graphene oxide based on click chemistry and RAFT polymerization. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 329–337, 2012.
- (112) MITSUISHI, Masaya; Koishikawa, Yasushi; Tanaka, Hiroyuki; Sato, Eriko; Mikayama, Takeshi; Matsui, Jun; Miyashita, T. Nanoscale Actuation of Thermoreversible Polymer Brushes Coupled with Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 23, n. 14, p. 7472–7474, 2007.
- (113) GUPTA, Smrati; Agrawal, Mukesh; Uhlmann, Petra; Simon, Frank; Stamm, M. Poly(N -isopropyl acrylamide)-Gold Nanoassemblies on Macroscopic Surfaces: Fabrication, Characterization, and Application. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 2, p. 504–509, 2010.
- (114) GUPTA, Smrati; Uhlmann, Petra; Agrawal, Mukesh; Lesnyak, Vladimir; Gaponik, Nikolai; Simon, Frank; Stamm, Manfred; Eychmüller, Alexander. Covalent immobilization of quantum dots on macroscopic surfaces using poly(acrylic acid) brushes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 214–220, 2008.
- (115) YU, K.; Wang, H. et al. Stimuli-responsive polyelectrolyte block copolymer brushes synthesized from the Si wafer via atom-transfer radical polymerization. **Langmuir**, v. 23, n. 3, p. 1443–1452, 2007.
- (116) GUPTA, Smrati; Agrawal, Mukesh; Conrad, Marc; Hutter, Naima Aurelia; Olk, Phillip; Simon, Frank; Eng, Lukas M.; Stamm, Manfred; Jordan, Rainer. Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) Brushes with Incorporated Nanoparticles as a SERS Active Sensing Layer. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 11, p. 1756–1761, 2010.
- (117) OREN, Ron; Liang, Ziqi; Barnard, Jonathan S.; Warren, Scott C.; Wiesner, Ulrich; Huck, W.T.S. Organization of nanoparticles in polymer brushes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 5, p. 1670–1671, 2009.
- (118) AZZARONI, Omar; Brown, Andrew A.; Cheng, Nan; Wei, A.; Jonas, Alain M.; Huck, W.T.S. Synthesis of gold nanoparticles inside polyelectrolyte brushes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 32, p. 3433–3439, 2007.
- (119) LIU, Zhen; Pappacena, Kristen; Cerise, Jane; Kim, Jaeup; Durnig, Christopher J.; O'Shaughnessy, Ben; Levicky, R. Organization of Nanoparticles on Soft Polymer Surfaces. **Nano Letters**, v. 2, n. 3, p. 219–224, 2002.

- (120) BRUENING, Merlin L.; Dotzauer, David M.; Jain, Parul; Ouyang, Lu; Baker, G.L.B. Creation of Functional Membranes Using Polyelectrolyte Multilayers and Polymer Brushes. **Langmuir**, v. 24, n. 15, p. 7663–7673, 2008.
- (121) YAO, F.; Fu, G.; Zhao, J.; Kang, E.; Neoh, K. Antibacterial effect of surface-functionalized polypropylene hollow fiber membrane from surface-initiated atom transfer radical polymerization. **Journal of Membrane Science**, v. 319, n. 1, p. 149–157, 2008.
- (122) DONG, Han-Bang; Xu, You-Yi; Yi, Zhuan; Shi, J.-L. Modification of polysulfone membranes via surface-initiated atom transfer radical polymerization. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 21, p. 8860–8866, 2009.
- (123) XU, F. J.; Zhao, J. P.; Kang, E. T.; Neoh, K. G. Li, J. Functionalization of Nylon Membranes via Surface-Initiated Atom-Transfer Radical Polymerization. **Langmuir**, v. 23, n. 16, p. 8585–8592, 2007.
- (124) ZHANG, Z. B.; Zhu, X. L.; Xu, F. J.; Neoh, K. G.; Kang, E.T. Temperature- and pH-sensitive nylon membranes prepared via consecutive surface-initiated atom transfer radical graft polymerizations. **Journal of Membrane Science**, v. 342, n. 1, p. 300–306, 2009.
- (125) FRIEBE, Alexander; Ulbricht, M. Controlled Pore Functionalization of Poly(ethylene terephthalate) Track-Etched Membranes via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. **Langmuir**, v. 23, n. 20, p. 10316–10322, 2007.
- (126) LOKUGE, Ishika; Wang, Xuejun; Bohn, P.W. Temperature-Controlled Flow Switching in Nanocapillary Array Membranes Mediated by Poly(N-isopropylacrylamide) Polymer Brushes Grafted by Atom Transfer Radical Polymerization. **Langmuir**, v. 23, n. 1, p. 305–311, 2007.
- (127) PÉREZ, J. P. Hervás; López-Cabarcos, E.; López-Ruiz, B. The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 5, p. 233–245, 2006.
- (128) HIMURO, Y.; Takai, M. et al. Poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) mediator as immobilized enzyme membrane for the fabrication of amperometric glucose sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 136, n. 1, p. 122–127, 2009.
- (129) JUSOH, Norhana; Abdul-Aziz, Azila; Supriyanto, E. Improvement of Glucose Biosensor Performances Using Poly (hydroxyethyl methacrylate) Outer Membrane. **International Journal of Biology and Biomedical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 77–86, 2012.
- (130) WHO. **Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases**. 2010.184p.
- (131) SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Ministério da Saúde Calendário Epidemiológico. Disponível em <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em 20/02/2012.
- (132) SIMMONS, Cameron P.; Farrar, Jeremy J.; Chau, Nguyen van Vinh; Wills, B. Current Concepts Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 2012.
- (133) GUZMAN, Maria G.; Halstead, Scott B.; Artsob, Harvey; Buchy, Philippe; Farrar, Jeremy; Gubler, Duane J.; Hunsperger, Elizabeth; Kroeger, Axel; Margolis, Harold S.; Martínez, Eric; Nathan, Michael B.; Pelegrino, Jose Luis; Simmons, Cameron; Yoksan, Suttee; Peeling, R.W. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7–16, 2010.
- (134) FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) (2009). CD-ROM: Dengue - Topics in International Health.
- (135) OPS. **Dengue Guias para El Diagnóstico, tratamiento, prevención y control**. La Paz: OPS/OMS, 2009.170p.

- (136) KWAKYE, Sylvia; Goral, Vasily N.; Baeumner, A.J. Electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid detection with integrated minipotentiostat. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 12, p. 2217–2223, 2006.
- (137) TELES, F. R. R.; França dos Prazeres, D. M.; de Lima-Filho, J.L. Electrochemical Detection of a Dengue-related Oligonucleotide Sequence Using Ferrocenium as a Hybridization Indicator. **Sensors**, v. 7, n. 11, p. 2510–2518, 2007.
- (138) ZHANG, Guo-jun; Zhang, Li; Huang, Min Joon; Hong, Zhan; Luo, Henry; Kai, Guang; Tay, Ignatius; Lim, Eu-jin Andy; Kang, Tae Goo; Chen, Y. Sensors and Actuators B : Chemical Silicon nanowire biosensor for highly sensitive and rapid detection of Dengue virus. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 146, n. 1, p. 138–144, 2010.
- (139) SOUZA, Elaine; Nascimento, Gustavo; Santana, Nataly; Ferreira, Danielly; Lima, Manoel; Natividade, Edna; Martins, Danyelly; Lima-Filho, J. Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. **Sensors**, v. 11, n. 6, p. 5616–5629, 2011.
- (140) OLIVEIRA, Maria D. L.; Correia, Maria T. S.; Diniz, F.B. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 728–732, 2009.
- (141) OLIVEIRA, Maria D. L.; Nogueira, Maurício L.; Correia, Maria T. S.; Coelho, Luana C. B. B.; Andrade, C.A.S. Sensors and Actuators B : Chemical Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on Cratylia mollis lectin affinity. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 155, n. 2, p. 789–795, 2011.
- (142) ANDRADE, Cesar A. S.; Oliveira, Maria D. L., de M.C.P.; Coelho, Luana C. B. B.; Correia, Maria T. S.; Nogueira, Maurício L.; Singh, Pankaj R.; Zeng, X. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic-inorganic nanocomposite and Bauhinia monandra lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 517–23, 2011.
- (143) KNOLL, G.F. **Radiation Detection and Measurement**. New York: Wiley, 1989.
- (144) CHUNG, K.C. **Introdução à Física Nuclear**. Rio de Janeiro: Ed. UERJ, 2001.
- (145) FAHRNER, W.R. **An Overview of Radiation-Matter Interactions**. Hagen: Elsevier Science B. V., 1999. Chapter 9, 553–637p.
- (146) ENGE, H.A. **Introduction to Nuclear Physics**. New York: Addison Wesley, 1979.
- (147) FRIEDLANDER, G.; JW, Kennedy; JM., M. **Nuclear and Radiochemistry**. New York: Wiley and Sons, 1981.
- (148) BOLT, R. O.; Carroll, J.G. **Radiation Effects on Polymers**. London: Elsevier Applied Science, 1991.
- (149) CLEGG, D.W.; Collyer, A. **Irradiation Effects on Polymers**. London: Elsevier Applied Science, 1991.
- (150) CORISH, P.J. **Radiation Effects on Polymers Radiation Process**. New York: Pergamon, 1992.
- (151) ORWOLL, Robert A.; Arnold, P.A. **Physical Properties of Polymers Handbook**. New York: AIP Press, 1996. Chapter 14, 177–197p.
- (152) BILLMEYER, F.W. **Textbook of Polymer Science**. New York: John-Wiley & Sons, 1985.

- (153) RAPPI, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard III, W.A.; Skid, W.M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. **American Chemical Society**, v. 114, n. 25, p. 10024–10035, 1992.
- (154) BELMARES, M; Blanco, M; Goddard, W. A.; Ross, R. B.; Caldwell, G.; Chou, S.-H.; Pham, J.; Olofson, P. M.; Thomas, C. Hildebrand and Hansen Solubility Parameters from Molecular Dynamics with Applications to Electronic Nose Polymer Sensors. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 15, p. 1814–1826, 2004.
- (155) OGUZ, Okay; Cigdem, G. Synthesis and Formation Mechanism of Porous 2-Hydroxyethyl Methacrylate-Ethylene Glycol Dimethacrylate Copolymer Beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 46, p. 401–410, 1992.
- (156) HEGAZY, El-Sayed A.; Ishigaki, Isao; Okamoto, J. Radiation grafting of acrylic acid onto fluorine-containing polymers. I. Kinetic study of preirradiation grafting onto poly(tetrafluoroethylene). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 3117–3124, 1981.
- (157) RABIE, Abdelgawad; Odian, G. Kinetics of diffusion-free radiation graft polymerization of styrene onto polyethylene. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition**, v. 15, n. 2, p. 469–488, 1977.
- (158) ANDRADE, J.D. **Biomedical Polymers**. Plenum Press, 1985.
- (159) ZISMAN W. **Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution**. Whashington, D. C.: Advances in Chemistry Series, n 43. American Chemical Society, 1964.1–51p.
- (160) WITHIN, S. **Polymer Handbook**. Edited by: Brandrup, J.; Immergut, Edmund H.; Grulke, Eric A.; Abe, Akihiro; Bloch, Daniel R. © 1999. New York.: John Wiley & Sons, 2005.
- (161) KWOK, D. Y.; Neumann, A.W. Contact angle interpretation in terms of solid surface tension. **Colloids and Surfaces A**, v. 161, n. 1, p. 31–48, 2000.
- (162) GALEMBECK, F. Superfícies de Polietileno, Suas Características e Sua Adesão. **Polímeros: Ciencia e Tecnologia**, v. 1, n. 0192, p. 34-38, 1991.
- (163) JASPER, J.J. The Surface Tension of Pure Liquid Compounds. **Journal of Physics Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 841–1009, 1972.
- (164) ELMER PERKIN. **Manual: Attenuated total reflectance - ATR**. Waltham: 2004.
- (165) DEDAVID, Berenice Anina; Gomes, Carmem Isse; Machado, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- (166) GOLDSTEIN, R. J.; Eckert, E. R. G.; Ibele, W. E.; Patankar, S.V.; Simon, T. W.; Kuehn, T. H.; Strykowski, P. J.; Tamma, K. K.; Bar-Cohen, A.; Heberlein, J. V. R.; Davidson, J. H.; Bischof, J.; Kulacki, F. A.; Kortshagen, U.; Garrick, S. Heat transfer – a review of 2000 literature. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 45, n. 14, p. 2853–2957, 2002.
- (167) FORD, James L.; Mann, T.E. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 5, p. 422–430, 2012.
- (168) HATAKEYAMA, T.; Quinn, F.X. **Thermal Analysis – Fundamentals and Applications to Polymer Science**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994.
- (169) BECKER, W. Determination of Antisera Titres Using the Single Radial Immunodiffusion Method. **Immunochemistry**, v. 6, n. 1, p. 539–546, 1969.
- (170) HAMILTON, R.G. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 1707–1725, 1987.

- (171) HAMILTON, R.G.; Abmli, D. **The Human IgG Subclasses**. Baltimore: Calbiochem-Novabiochem Corporation, 2001.
- (172) SILVERSTEIN, R. M. ; Webster, F. X.; Kiemle, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. New York: 2005.
- (173) FERREIRA, L. M.; Falcão, A. N.; Gil, M.H. Elemental and topographic characterization of LDPE based copolymeric films obtained by gamma irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 265, p. 193–197, 2007.
- (174) MORSHEDIAN, Jalil; Mirzataheri, Mojgan; Bagheri, Rouhollah; Moghadam, M. Solventless Surface Modification of LDPE through Electron Beam Radiation Grafting of. **Iranian Polymer Journal**, v. 14, n. 2, p. 139–144, 2005.
- (175) ROBIN, M.B. The Color and Electronic Configurations of Prussian Blue. **Inorganic Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 337–342, 1962.
- (176) RICCI, F.; Palleschi, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 3, p. 389–407, 2005.
- (177) ELLIS, D.; Eckhoff, M.; Neff, V.D. Studies of the Oxidation and Reduction of Thin Films of Prussian Blue. **Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 14, p. 1225–1231, 1981.
- (178) NODA, Akihiro; Watanabe, M. Highly conductive polymer electrolytes prepared by in situ polymerization of vinyl monomers in room temperature molten salts. **Electrochimica Acta**, v. 45, p. 1265–1270, 2000.
- (179) WALKER, C.W.J. Proton-conducting polymer membrane comprised of a copolymer of 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid and 2-hydroxyethyl methacrylate. **Journal of Power Sources**, v. 110, p. 144–151, 2002.
- (180) YAMEEN, Basit; Ali, Mubarak; Neumann, Reinhard; Ensinger, Wolfgang; Knoll, Wolfgang; Azzaroni, O. Single conical nanopores displaying pH-tunable rectifying characteristics. manipulating ionic transport with zwitterionic polymer brushes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 6, p. 2070–2071, 2009.
- (181) LEE, Innam; Luo, Xiliang; Cui, Xinyan Tracy; Yun, M. Highly sensitive single polyaniline nanowire biosensor for the detection of immunoglobulin G and myoglobin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 7, p. 3297–3302, 2011.
- (182) MAEHASHI, Kenzo; Katsura, Taiji; Kerman, Kagan; Takamura, Yuzuru; Matsumoto, Kazuhiko; Tamiya, E. Label-Free Protein Biosensor Based on Sptamer-Modified carbon Nanotube Field-Effect Transistors. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 782–787, 2007.
- (183) PANG, Xin; Imin, Patigul; Zhitomirsky, Igor; Adronov, A. Conjugated polyelectrolyte complexes with single-walled carbon nanotubes for amperometric detection of glucose with inherent anti-interference. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 9147–9154, 2012.
- (184) BRAHIM, Sean; Narinesingh, Dyer; Guiseppi-Elie, A. Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 1, p. 53–59, 2002.